

Kombination der mikrobiologischen Prozesse Bioleaching und saure Phosphorrückgewinnung sowie ihr Einsatz im Rahmen von Dekontamination und Rohstoffrückgewinnung aus schwermetallbelasteten Feststoffen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol.

Jennifer Katharina Bernadette Zimmermann

aus Aachen

Berichter:

Universitätsprofessor Dr. Wolfgang Dott

Universitätsprofessor Dr. Andreas Schäffer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

*„Sie kennen meine Methode Hatch,
keine Teilergebnisse vor der endgültigen Aufklärung.
Der wahrhaft logische Geist scheut das Verkünden
noch unzureichend durchdachter Schlüsse“*

Prof. Dr. Dr. Dr. Augustus van Dusen
Denkmaschine und Amateurkriminologe

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
KURZFASSUNG	II
ABSTRACT	IV
ABKÜRZUNGEN	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOLEACHING	1
1.2 BIOLEACHING ZUR REINIGUNG SCHWERMETALLBELASTETER FESTSTOFFE	4
1.3 EINSATZ VON BIOLEACHING ZUR WERTSTOFFRÜCKGEWINNUNG	4
1.4 BIOLOGISCH INDUZIERT SAURE PHOSPHORRÜCKGEWINNUNG	7
1.5 ZIELSETZUNG	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 KULTIVIERUNG VON <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i> UND <i>THIOOXIDANS</i>	12
2.2 KULTIVIERUNG DER SYNTHROPHISCHEN MISCHPOPULATION	12
2.3 BIOLEACHINGREAKTOR	13
2.4 BIOLEACHINGVERFAHREN	14
2.4.1 Eingesetzte Feststoffe	14
2.4.2 Bestimmung der Säurekapazität im Feststoffeluat	15
2.4.3 Dekontamination schwermetallbelasteter Feststoffe mit Bioleaching	15
2.4.4 Kombiniertes Bioleaching und saure Phosphorrückgewinnung aus Klärschlammasche	16
2.5 CHEMISCHE ANALYTIK	17
2.5.1 Ionenchromatographische Bestimmung von Phosphat und Sulfat	17
2.5.2 Photometrische Bestimmung von Phosphat und Gesamtphosphat	17
2.5.3 Bestimmung der Schwermetalle mit ICP-Massenspektrometrie	17
2.5.4 Sequentielle Phosphorfractionierung im Feststoff	18
2.5.5 Ionenchromatographische Bestimmung von Chrom(VI)	18
2.5.6 Bestimmung von Klärschlammparametern	19
2.6 MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON AEDS	21
2.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie mit DAPI	21
2.6.2 Charakterisierung der ökophysiologischen Gruppen im AEDS-Konsortium	21
2.6.3 Physiologische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen	22
2.6.4 Chemische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen mittels FTIR	23
2.6.5 Molekularbiologische Charakterisierung der Mikroorganismen	25
2.7 ÖKOTOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG DER FESTSTOFFE	26
2.7.1 Herstellung der Testlösung	26
2.7.2 Algenwachstumstest mit <i>Desmodesmus subspicatus</i>	27
2.7.3 Daphnien- Immobilisationstest	27
2.7.4 Lumineszenzhemmtest mit <i>Vibrio fischeri</i>	27
2.7.5 Zellvermehrungshemmtest mit <i>Pseudomonas putida</i> und <i>Vibrio fischeri</i>	27
2.7.6 umu-Genotoxizitätstest	27
3 ERGEBNISSE	29

3.1	BIOLEACHING ZUR METALLABREICHERUNG AUS FESTSTOFFEN	30
3.1.1	<i>Physikalisch-chemische Eigenschaften der Feststoffe</i>	30
3.1.2	<i>Vergleichendes Bioleaching metallbelasteter Feststoffe</i>	32
3.1.2.1	Metallfreisetzung im einstufigen Bioleachingprozess	32
3.1.2.2	Metallfreisetzung im zweistufigen Bioleachingprozess	34
3.1.3	<i>Einordnung der behandelten Feststoffe nach LAGA Richtlinie</i>	35
3.1.4	<i>Toxikologische und Ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe</i>	37
3.1.4.1	Chrom (VI) in der Bioleachinglösung	37
3.1.4.2	Eluate für die toxikologische und ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe	38
3.2	BIOLEACHING UND PHOSPHORFREISETZUNG	42
3.2.1	<i>Klärschlammasche</i>	43
3.2.1.1	Klärschlamm	43
3.2.1.2	Phosphorfreisetzung aus Faulschlamm	45
3.3	KOMBINIERTES BIOLEACHING UND BIOLOGISCH INDUZIERTE PHOSPHORRÜCKGEWINNUNG	46
3.3.1	<i>Kultivierung des Bakterienkonsortiums</i>	46
3.3.2	<i>Phosphorfreisetzung mit AEDS aus Klärschlammasche</i>	48
3.3.3	<i>Saure Phosphorrückgewinnung</i>	49
3.3.3.1	Nachweis der mikrobiell bedingten Phosphorfixierung	50
3.3.3.2	Verhalten der Schwermetalle während der Refixierung von Phosphor	51
3.3.3.3	Charakterisierung des Feststoff aus der Phosphorfixierung	52
3.3.3.4	Einflussfaktoren auf die Phosphorrefixierung	56
3.3.4	<i>Mikrobiologische Charakterisierung von AEDS</i>	56
3.3.4.1	Bestimmung der ökophysiologischen Gruppen	57
3.3.4.2	Chemische Charakterisierung: FTIR	59
3.3.4.3	Morphologische und Physiologische Charakterisierung	62
3.3.4.4	Molekularbiologische Identifizierung über 16S-rRNA Gene-Sequenzierung	63
3.3.4.5	Kultivierungsunabhängige Charakterisierung: ARDRA-Analyse (Amplified rDNA restriction analysis)	65
3.3.4.6	Zusammenfassung der mikrobiologischen Zusammensetzung von AEDS	67
4	DISKUSSION	68
4.1	BIOLEACHING ZUR REINIGUNG SCHWERMETALLBELASTETER FESTSTOFFE	68
4.1.1	<i>Eigenschaften der Feststoffe</i>	68
4.1.2	<i>Einflussfaktoren auf das Bioleaching von metallbelasteten Feststoffen</i>	68
4.1.3	<i>Toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des gelaugten Feststoffs</i>	71
4.2	BIOLEACHING ZUR WERTSTOFFRÜCKGEWINNUNG	74
4.2.1	<i>Phosphorrücklösung aus Feststoffen</i>	74
4.3	PHOSPHORREFIXIERUNG	76
4.3.1	<i>Bioleaching und biologisch induzierte Phosphorrückgewinnung</i>	76
4.3.1.1	Anreicherung des AEDS-Konsortiums	76
4.3.1.2	Phosphorrückgewinnung und Schwermetallfreisetzung mit AEDS	77
4.3.1.3	Phosphorfällung und -akkumulation	78
4.4	MECHANISTISCHE AUFKLÄRUNG DER BIOLOGISCHEN PHOSPHORRÜCKGEWINNUNG	81
4.5	MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES AEDS-KONSORTIUMS	82
5	ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	91

VI ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
VII APPENDIX	99
DANKSAGUNG	104
LEBENS LAUF	105

Kurzfassung

Bioleaching ist neben dem Einsatz in der Metallgewinnung, eine vielversprechende Technologie zur biologischen Boden- und Abfallreinigung. In dieser Arbeit wurde die Bioleachingtechnologie zur Dekontamination und zur Wertstoffrückgewinnung metallbelasteter Feststoffe angewandt und bewertet.

Durch das in dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Bioleaching unterschiedlicher Feststoffe (Aschen, Schlämme, Böden von Altlastenstandorten) ist es gelungen, grundlegende Verfahrensbedingungen zu formulieren, um die Machbarkeit einer Sanierung der Feststoffe zu prognostizieren. Dabei stellte sich heraus, dass die Matrix des Feststoffs maßgeblichen Einfluss auf die Metallabreicherung hat, insbesondere die thermische Vorbehandlung. Durch den Verbrennungsvorgang kommt es zu Änderungen bei den Bindungsverhältnissen der Metalle und somit zu einer Änderung ihrer Laugbarkeit.

Ein weiterer großer Einflussfaktor auf die Metalllaugung ist die Säurekapazität des Feststoffs in wässriger Lösung als Maß für seine Pufferkapazität. Wird durch den Feststoff ein zu hoher pH-Wert gekoppelt mit einer hohen Säurekapazität in der Bioleachinglösung bewirkt, wird die Bakterienaktivität gehemmt und die Metallfreisetzung nachhaltig verringert.

Die Bewertung des gelaugten Feststoffs erfolgt sowohl nach chemisch-analytischen Kriterien, gemäß LAGA und LAWA, als auch mittels ökotoxikologischer Tests.

Mit dem Bioleachingverfahren können die Feststoffe gemäß den gesetzlichen Vorgaben von Metallen abgereichert werden. Die Entstehung toxischer Metallspezies (hier: Chrom VI) während des Bioleachingprozesses kann ausgeschlossen werden. Für den gelaugten Feststoff kann eine verringerte ökotoxische Wirkung festgestellt werden. Das gewählte ökotoxikologische Testsystem orientiert sich an dem Austragungspfad Boden-Grundwasser.

Die Ergebnisse belegen, dass Bioleaching ein kostengünstiges Verfahren darstellt, zur *In Situ* als auch *Ex Situ*-Reinigung von metallbelasteten Feststoffen.

Das Bioleaching mit kombinierter Rückgewinnung von Wertstoffen, insbesondere Phosphor, stellt einen neuen Ansatz in der Umwelttechnik dar. Mit dem Bioleachingverfahren konnte Phosphor aus Klärschlammasche und aus anaerob stabilisiertem Faulschlamm gelöst werden und liegt als freie Phosphorsäure vor.

Die Abtrennung des gelösten Phosphors von den mitgelaugten Schwermetallen wird bisher mit aufwendigen Verfahren durchgeführt (Membranverfahren, Verdampfungsverfahren mit anschließender Fällung des Phosphors). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte biotechnologische Kombination aus Phosphorfreisetzung mittels Bioleaching und der Phosphorrefixierung in Biomasse mit dem neu entwickelten Bakterienkonsortium AEDS (*Acidithiobacillus enriched digested sludge*), ist eine Alternative zu den chemisch/physikalischen Verfahren. Die biotechnologische Prozesskombination orientiert sich an dem bekannten Verfahren der biolo-

gischen Phosphoreliminierung aus der Abwasserbehandlung. Hierbei wird Phosphor in Form von Polyphosphaten von den Bakterien gespeichert und in der Biomasse festgelegt.

Mit der Bakterienpopulation AEDS kann die Rücklösung des Phosphors aus der Asche sowie die Abtrennung des gelösten Phosphors von der metallischen Lösung in einem Schritt durchgeführt werden. Die mikrobiologische Grundlage für die saure Phosphorrückgewinnung sind drei Prozesse:

1. Freisetzung von Phosphor aus Klärschlammasche durch Bioleaching mit *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
2. Phosphorakkumulation durch polyphosphatspeichernde Mikroorganismen der Klasse *Actinobacteria*.
3. Mikrobiell induzierte Fe(III)-Phosphatfällung durch *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Die Charakterisierung der Mikroorganismen in der AEDS-Lösung mit einer Kombination verschiedener Methoden (FTIR, physiologische und morphologische Untersuchungen, Identifizierung der 16S-rRNA Gene und ARDRA-Analyse) ermöglicht die Identifizierung von bislang unbekannten polyphosphatspeichernden Bakterien aus der Gruppe der Aktinobakterien. Das während der sauren Phosphorrückgewinnung entstehende Sediment ist ein phosphatreicher Feststoff, der aus Fe(III)-Phosphat und Polyphosphaten besteht.

Die weitere Identifizierung der am Prozess der sauren Phosphorrückgewinnung beteiligten Mikroorganismen sowie der Einsatz des Feststoffs als Phosphorrohstoff soll Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Abstract

The bioleaching process is, besides metallurgy, a promising technology for the decontamination of waste solids and contaminated soils. In this work, bioleaching was executed and evaluated for decontamination and nutrient recovery from heavy metal loaded solids.

By comparing the bioleaching behavior of different waste solids (ash, sludge and soil) it was possible to shape process conditions to predict the decontamination of solids before starting the bioleaching process. Two effects are predominantly responsible for a successful decontamination of waste solids. First factor is the matrix of the solid, in particular the thermal pre-treatment. By incinerating waste or sludge the attachment behavior of metals can change. This leads to changes in metal solubility.

The second factor is the buffer capacity of the waste solid in aqueous solution. A high buffer capacity leads to the inhibition of microbial activity and a decreasing metal release.

The toxicological evaluation of the bioleached solids was done by LAGA and LAWA guidelines and by ecotoxicological tests.

With bioleaching process the heavy metal loaded solids can be decontaminated according to LAWA and LAGA guidelines. The occurrence of toxic metal species during the bioleaching process, like chromium VI, can be excluded. The bioleached solids are less ecotoxic than the untreated waste solids.

The results show, that the bioleaching process is an economical technology for the decontamination of waste solids.

The combination of the bioleaching process with a microbial phosphorus recovery, is a new approach in environmental technology. With the bioleaching process, besides heavy metals, phosphorus can be resolved from phosphorus enriched waste solids, like sewage sludge incineration ash and sewage sludge.

These days, the separation of resolved phosphorus from solved heavy metals is realized by costly processes like membrane techniques or volatilization. In this work the combination of the two microbiological processes bioleaching of phosphorus and phosphorus accumulation into biomass by newly AEDS bacterial consortium (*Acidithiobacillus* enriched digested sludge) is an alternative technique to common physical/chemical processes.

The biotechnological process combination is geared to the enhanced biological phosphorus removal (EBPR) in the waste water treatment. In the EBPR phosphate is stored as polyphosphate by special microorganisms into biomass.

With the AEDS bacterial consortium phosphorus can be released and recovered in one step. The microbiological principles of the combined phosphorus release and recovery are three metabolic processes:

1. Release of phosphorus from sewage sludge incineration ash through bioleaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
2. Phosphorus accumulation by polyphosphate accumulating microorganism of *Actinobacteria* class.
3. Microbiologically induced iron-(III)-phosphate precipitation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

The characterization and identification of microorganisms in AEDS bacterial consortium was conducted by using different methods (FTIR, physiological and morphological methods, identification of 16S-rRNA genes and ARDA analysis). By using this variety of methods it was possible to identify up to now unknown polyphosphate accumulating bacteria of *Actinobacteria* class. The occurring biomass sediment is phosphorus enriched and has low amounts of heavy metals. The accumulated phosphorus is available as polyphosphate and iron-(III)-phosphate.

The further characterization of the acidic phosphorus recovery and the identification of the involved microorganisms will be a promising field of future phosphorus recovery research.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEDS	Acidithiobacillus enriched digested sludge
API	Analytical Profile Index
ARDRA	Amplified rDNA restriction analysis
AS	Ausgefaulter Schlamm
BO	Boden
BR	Brennraumasche
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DENI	Schlamm der Denitrifikation
DOC	Dissolved organic carbon
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal
EOS	Elektroofenasche
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
FS	Faulschlamm
FTIR	Fourier Transformations Infrarot Spektroskopie
GV	Glühverlust
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, konz. (96%)
ICP-MS	Inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry
KAA	Klärschlammasche
KBE	Kolonien-bildende Einheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LAGA	Länderarbeitsgemeinschaft Abfall
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MgSO ₄ * 7H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat

Na_2CO_3	Natriumcarbonat
$\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3$	Natriumthiosulfat
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
NITRI	Schlamm der Nitrifikation
P	Phosphor
Poly-P	Polyphosphat
P-PO	Phosphor aus Phosphat
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polycyclic chain reaction
PS	Primärschlamm
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RS	Rücklaufschlamm
S_8	Schwefel
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIT	Deponiematerial Sittard
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
TOC	Total organic carbon
w/v	Weight per volume
ZF	Zyklonfilterasche

1 Einleitung

1.1 Bioleaching

Das Bioleaching hat sich in den vergangenen 20 Jahren vom unkontrollierten Kupferleaching aus aufgeschütteten Halden zu einem wirtschaftlich relevanten Biomining-Zweig entwickelt (Olson et al. 2003). Mit einer Beteiligung von bis zu 25% ist Bioleaching ein starker wirtschaftlicher Faktor für die Kupfergewinnung in Chile, Kanada und den USA geworden. Als Bioleaching wird die Überführung von unlöslichen Kupfer-, Zink- und Uranerzen in wasserlösliche Metallsulfate bezeichnet. Nach Drainage werden die gelaugten Metalle durch Einengen und Fällung aus der Bakterienlösung gewonnen. Der Einsatz des kommerziellen Bioleachingverfahren ist in den letzten Jahren immer weiter gestiegen. Das *In Situ* Heap-Leaching (Haldenleaching) sowie das *Ex Situ* Stirr Leaching (Tank-Leaching) sind die bevorzugten Anwendungen zur Gewinnung von Metallen und konkurrieren erfolgreich mit anderen Fördertechnologien, die sich oftmals kostspieliger und energieaufwendiger gestalten (Brombacher et al. 1997, Brierley 2009).

Die Vorteile des Bioleaching gegenüber konventioneller Metallgewinnung sind:

- Ökonomisches Laugen gering konzentrierter oder unreiner Erze,
- Laugung bei niedrigen Temperaturen und atmosphärischem Druck,
- Zugabe von teuren Chemikalien entfällt durch die biogene Produktion von Schwefelsäure,
- einfache Handhabung, sowie
- keine Emission von CO₂ (wenig Energieaufwand, Mikroorganismen fixieren CO₂).

Die mikrobiologische Grundlage des Bioleachings ist die Verwertung anorganischer Elektronendonatoren, die von schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien zur Energiegewinnung herangezogen werden (Silverman und Lundgren, 1958). Als Elektronendonatoren dienen reduzierte Schwefelverbindungen (Thiosulfat, Tetrathionat, elementarer Schwefel, Sulfide). Durch die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen entsteht Schwefelsäure, die den pH-Wert der Bioleachinglösung auf Werte bis zu pH 1 senken kann. Bei den hierfür verantwortlichen Bakterien handelt es sich um *Acidithiobacillus*-Arten, eine Gruppe gramnegativer, aerober, chemolithotropher, acidophiler Bakterien, die fähig sind reduzierte Metallsulfide zu oxidieren und Metalle in Lösung zu bringen. Die Leaching-Fähigkeit von *Acidithiobacillus* beruht auf der Freisetzung von säureunlöslichen Metallen durch Ein-Elektronen-Oxidationen (Thiosulfatmechanismus) und der Freisetzung von säurelöslichen Metallen mittels Protonen-attacke (Polysulfidmechanismus) (Abbildung 1.1.1) (Rohwerder et al. 2003).

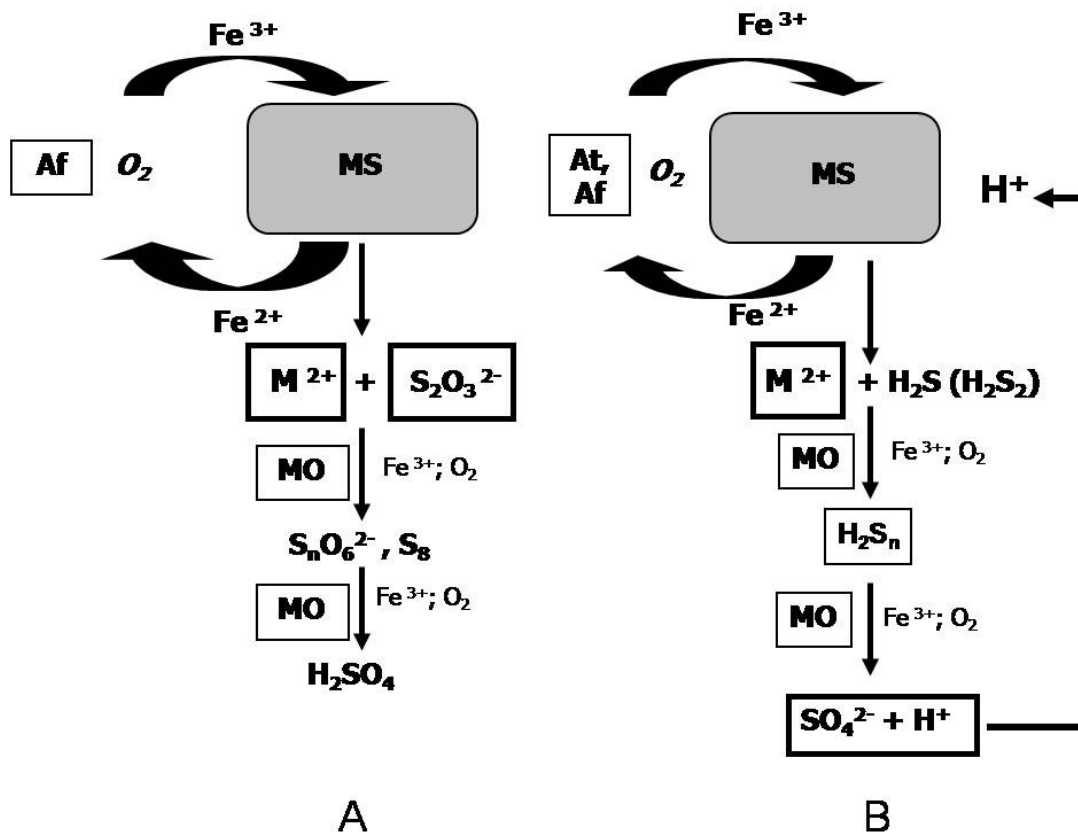


Abbildung 1.1.1: Stoffwechselwege des Bioleachings: A: Thiosulfatweg: Säureunlösliche Metalle. B: Polysulfidweg: Säurelösliche Metalle. Af: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, At: *Acidithiobacillus thiooxidans*, MO: Mikroorganismus, MS: Metallsulfide (verändert nach Rohwerder 2003).

Der Thiosulfatweg wird bevorzugt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Af) durchgeführt. Zur Energiegewinnung oxidiert *A. ferrooxidans* $\text{Fe}(\text{II})$ in saurem Milieu zu $\text{Fe}(\text{III})$. Das entstehende $\text{Fe}(\text{III})$ oxidiert durch Elektronenübertragung säureunlösliche Metallsulfide. Die Oxidation ist ein sechs Ein-Elektronenoxidationsschritt, $\text{Fe}(\text{III})$ wird dabei wieder zu $\text{Fe}(\text{II})$ reduziert und steht dem Bakterium erneut zur Verfügung. Die bei diesem Prozess freigesetzten Bestandteile sind das Metallkation und Thiosulfat (Schippers et al. 1996). Das freie Thiosulfat wird von *A. ferrooxidans* zu Sulfat oxidiert. Der beschriebene Mechanismus wird daher nach dem ersten auftretenden Zwischenprodukt Thiosulfatweg genannt.

Demgegenüber steht der Polysulfidweg, bei dem säurelösliche Metallsulfide durch eine Kombination aus $\text{Fe}(\text{III})$ -Elektronenübertragung und Protonenangriff freigesetzt werden. Der Mechanismus des Protonenangriffs geht auf die produzierte Schwefelsäure durch *Acidithiobacillus thiooxidans* (At) zurück. Bei dem Protonenangriff entsteht als erstes Zwischenprodukt Polysulfid, Namensgeber der Reaktion (Schippers und Sand 1999). Der Polysulfidweg kann auch abgekoppelt vom Thiosulfatweg auftreten und wird bevorzugt vom schwefeloxidierenden Bakterium *A. thiooxidans* genutzt.

Die Oxidationsreaktionen können nur in direktem Kontakt des Bakteriums mit dem Feststoff stattfinden. *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans* bilden daher extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), mit denen sie einen Biofilm auf dem Feststoff bilden. Die EPS vermitteln die Anheftung des Bakteriums an die Feststoffoberfläche, das Redoxmilieu in der EPS ermöglicht eine Stabilisierung der benötigten Fe(III)-Ionen für die Metallfreisetzung (Sand und Gehrke 2006). In Abbildung 1.1.2 A ist die Rolle der EPS während des Bioleachings schematisch dargestellt.

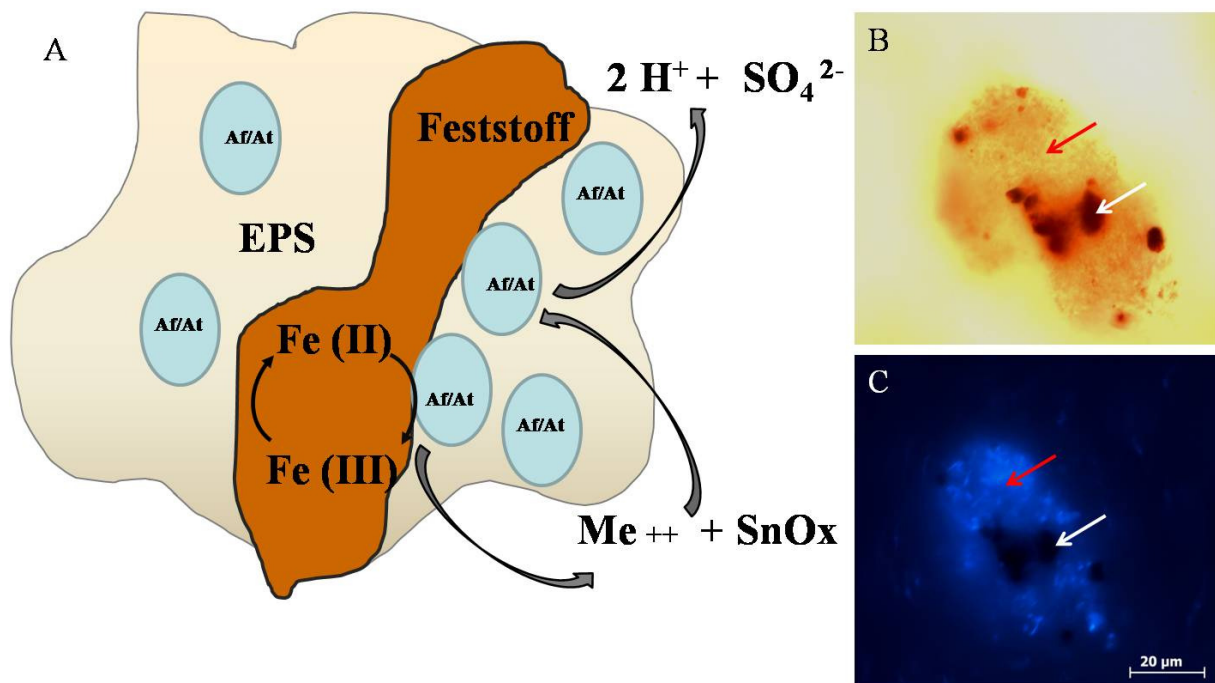


Abbildung 1.1.2: A: Rolle der EPS beim Bioleaching Af: *Adicithiobacillus ferrooxidans*, At *Acidithiobacillus thiooxidans*. B: Lichtmikroskopische Aufnahme des Biofilms von *A. ferrooxidans* (roter Pfeil) Feststoff (weißer Pfeil). C: DAPI-Färbung des Biofilms von *A. ferrooxidans*

Die Bildung des Biofilms kann mit einer DAPI-Färbung visualisiert werden. In Abbildung 1.1.2.B sieht man auf einer lichtmikroskopischen Aufnahme einen Feststoffpartikel der von einem Biofilm umschlossen ist. In Abbildung 1.1.2.C ist das gleiche Bild nach DAPI-Färbung zu sehen. Die Bakterienmasse umschließt den Feststoff und ermöglicht die Oxidationsreaktionen an der Feststoffoberfläche. Bei der technischen Anwendung des Bioleaching ist darauf zu achten, dass die Bakterien die Möglichkeit haben einen Biofilm auf dem Feststoff auszubilden. Ebenso wichtig ist das gewählte Bakterienkonsortium, vorzugsweise besteht es aus einer Mischung aus *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans*, um durch die Kombination beider Bioleaching-Mechanismen die Metallausbeute zu steigern (Rawlings und Johnson 2007).

1.2 Bioleaching zur Reinigung schwermetallbelasteter Feststoffe

Das Bioleaching zur Erzlaugung beschränkt sich auf die großen Abbaugebiete in Südamerika, Nordamerika und Australien. Die Laugung von Schwermetallen bietet sich jedoch nicht nur zur Metallgewinnung sondern ebenfalls zur Reinigung schwermetallbelasteter Feststoffe an. Im Fokus stehen dabei Reststoffe aus der Abwasserbehandlung (Klärschlamm), aus der thermischen Nachbehandlung kontaminierter Feststoffe (Klärschlammasche, Flugasche) und schwermetallbelastete Altlasten von Industriestandorten (Böden, Sedimente). Besonders die biologische Sanierung von metallbelasteten Klärschlämmen im Zuge der stetig steigenden Mengen an anfallendem Klärschlamm und Klärschlammasche ist von besonderem Interesse und wird eingehend diskutiert (Couillard und Mercier 1991, Shanableh und Omar 2003, Lombardi et al. 2006, Parthak 2009).

Bei der Laugung schwermetallbelasteter Feststoffe stehen zwei Mechanismen im Vordergrund. Zum einen die Entfernung von Metallen durch das Bioleaching und zum anderen eine Immobilisierung von Metallen im Feststoff (Tsezos 2009). Nach der sauren Bioleachingbehandlung sind die im Feststoff verbleibenden Metalle nicht mehr wasserelutierbar. Durch die Metallfreisetzung wird die Ökotoxizität des Feststoffs verringert. Ökotoxikologische Untersuchungen wurden bisher für Müllverbrennungsaschen und Klärschlämme nach dem Bioleaching durchgeführt. In beiden Fällen haben die Feststoffe nach dem Bioleaching eine verringerte Ökotoxizität (Renoux et al. 2001, Römbke et al. 2009). Somit bietet dieses Verfahren einen vielversprechenden Ansatz zur *In Situ*-Sanierung von Böden, Sedimenten und Schlämmen.

Für die Durchführung der Feststoffsanierung mit dem Bioleachingverfahren gibt es keinen einheitlich etablierten Ansatz, ferner sind die Rahmenbedingungen für die Anwendbarkeit des Verfahrens nicht geklärt. Für jedes zu sanierende Material muss der Prozess optimiert und angepasst werden. Alleine für die Behandlung von Klärschlämmen gibt es mehr als 20 Verfahrensempfehlungen mit unterschiedlichen Kombinationen von Mikroorganismen (Pathak 2009). Eine Betrachtung des Bioleachings unter einheitlich festgelegten Kriterien sowie Aussagen über die Machbarkeit der Bioleachingbehandlung von kontaminierten Feststoffen unterschiedlicher Herkunft stehen bis heute aus.

1.3 Einsatz von Bioleaching zur Wertstoffrückgewinnung

In Zeiten des rasanten Bevölkerungswachstums werden nicht regenerierbare Ressourcen mehr und mehr verbraucht. Eine drastische Reduktion des Rohstoffabbaus ist im Angesicht des stetig steigenden Bedarfs nicht realisierbar. Nachhaltigkeit und die Entwicklung von geschlossenen Stoffkreisläufen sollen wichtige Ressourcen schonen und alternative Nutzungskonzepte unterstützen. Ein wichtiger Rohstoff, dessen Lagerstätten in den nächsten 100 Jahren zur Neige gehen, ist Phosphor (Montag 2008). Das Element Phosphor ist nicht nur für

eine Vielzahl biologischer Vorgänge unabdingbar, es stellt auch den limitierenden Faktor für das Pflanzenwachstum und somit für die Produktion von Nahrungsmitteln für die Weltbevölkerung dar. 80% des derzeit gewonnen Phosphors werden in Form von Phosphatdünger auf unsere Felder ausgebracht. Im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen kann Phosphor jedoch zurückgewonnen werden. Eine Senke für anthropologisch eingebrachten Phosphor ist die Abwasserbehandlung (Abbildung 1.3.1).

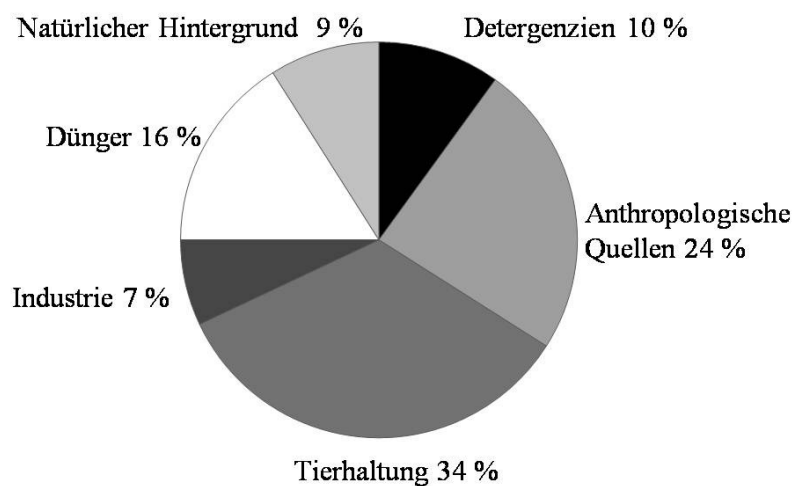


Abbildung 1.3.1: Phosphor-Quellen im Abwasser der Europäischen Union (Barnard 2009)

Als Bestandteil unserer Nahrung, Ingredienz in Pflegemittel und Pharmaka gelangt es über Abwässer in die Kläranlage. Um die Eutrophierung von Gewässern zu vermeiden, wird Phosphor in Form von Phosphat aus dem Abwasser entfernt und im Schlamm festgelegt. Die bis in die sechziger Jahre erfolgte Nutzung des entstehenden Klärschlamms in der Landwirtschaft zur Substitution von Nährstoffen wird in Deutschland kontrovers diskutiert. Neben den Nährsubstanzen sind Schadstoffe, insbesondere Schwermetalle, persistente organische Stoffe (z.B. endokrine Disruptoren, Bisphenol A) sowie pathogene Mikroorganismen, in zunehmendem Maße problematisch. Eine angestrebte Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfKlärV 2003) soll diesem Problem Rechnung tragen. Im Eckpunktepapier des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) vom Dezember 2006 sollen die Grenzwerte für Schwermetalle und Organika in Klärschlämmen verschärft werden um eine landwirtschaftliche Nutzung der Klärschlamme zu ermöglichen. Die verminderte landwirtschaftliche Nutzung, das stetig steigende Schlammauftreten und das Vorsorgeprinzip einiger Bundesländer (Bayern, Baden-Württemberg) veranlasst die Behörden im verstärkten Maße zur Klärschlammverbrennung. Die entstehende Klärschlammmasche zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Phosphor, im Median 6,2% (Montag 2008), aus. Die organischen

Schadstoffe und pathogenen Mikroorganismen werden beim Verbrennungsprozess zerstört, Probleme bereiten weiterhin die Schwermetalle, die durch den Verbrennungsschritt angereichert werden. Damit der enthaltene Phosphor bei einer Deponierung der Asche nicht aus dem Stoffkreislauf entfällt, werden verstärkt Konzepte zur Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlammasche gesucht und getestet. Fast alle getesteten Verfahren beruhen auf einer Säurelaugung der Klärschlammasche mit anorganischen Säuren und einer späteren Abtrennung des gelösten Phosphors mittels physikalischer oder chemischer Trennungsmethoden (Tabelle 1.3.1). Das Endprodukt aller Verfahren sollte ein möglichst reines Phosphatprodukt sein, das sich als Düngemittel einsetzen lässt.

Tabelle 1.3.1: Projekte und Verfahren zur Phosphorrücklaugung aus Klärschlammasche

Projekt	Phosphorlaugung	Referenz
BioCon	Schwefelsäure	Hultmann et al. 2000
SEPHOS	Schwefelsäure	Cornel und Schaum 2005
SUSAN	Verdampfung Schwermetalle	Adam et al. 2008
RüPA	Salzsäure	Montag 2008

Die chemischen Verfahren zur Phosphorrückgewinnung sind zum Teil sehr aufwendig und energieintensiv. Als Alternative soll das Bioleachingverfahren eingesetzt werden, um neben den Schwermetallen auch Phosphor aus der Asche zu laugen. Das mikrobiologische Bioleaching stellt ein vielversprechendes Verfahren dar und steht im Gegensatz zu den gängigen Rückgewinnungsstrategien (Zimmermann und Dott 2009). Dabei steht die Übertragung des Verfahrens von der Metallaugung auf die Phosphorlaugung sowie die Phosphorrückgewinnung mit entsprechender Ausbeute im Fokus der Untersuchungen.

1.4 Biologisch induzierte saure Phosphorrückgewinnung

Nach der Rückgewinnung des Phosphors durch chemische Säurelaugung aus dem Feststoff ist die Trennung des gelösten Phosphors von der metallhaltigen Lösung der nächste Schritt zur Gewinnung eines recycelten Phosphorprodukts. Die Reinheit des gefällten Phosphors steht hierbei im Vordergrund. Um eine Applikation des Produkts in der Landwirtschaft zu gewährleisten, müssen die Grenzwerte der Schwermetalle, vorgegeben durch die Düngemittelverordnung, unterschritten werden (DümV 2008). Ziel aller chemischen Verfahren ist das Fälln des Phosphors und der Verbleib der Schwermetalle in der Lösung. In Tabelle 1.4.1 sind die Verfahren zur Abtrennung des Phosphors aus Klärschlammmasche in den aktuellen Forschungsprojekten zusammengefasst.

Tabelle 1.4.1: Verfahren zur Trennung und Fällung von Phosphor aus der metallhaltigen Lösung

Projekt	Verfahren	Referenz
BioCon	Ionentauscher /Fällung Kalziumphosphat	Hultmann et al. 2000
SEPHOS	Fällung Aluminiumphosphat + Nachbehandlung	Cornel und Schaum 2005
SUSAN	Verdampfung Schwermetalle mit Rauchgas	Adam et al. 2008
RüPA	Solventextraktion/ Fällung Kalziumphosphat	Montag 2008

Die verschiedenen Ansätze beruhen auf chemischen und thermischen Verfahren, die teils sehr aufwendig und energiebedürftig sind. Im Rahmen der biologischen Phosphoreliminierung aus Abwasser gibt es Bestrebungen, Phosphor nicht nur aus dem Abwasser zu eliminieren, sondern gezielt zurückzugewinnen (van Horn 2007). Die biologische Phosphoreliminierung findet in der Abwasserbehandlung zur Entfernung von Phosphor aus Abwasser statt und ist als EBPR (**E**nhanced **B**iological **P**hosphorus **R**emoval) bekannt (Oehmen 2007).

Die Phosphoreliminierung durch Mikroorganismen beruht auf der Aufnahme von Phosphor in Form von Phosphat in die Zelle und der Bildung von Polyphosphaten, die im Zellinneren aufgebaut und gespeichert werden. Der Aufbau der Polyphosphate ist in Abbildung 1.4.1 schematisch dargestellt und beginnt über die Bereitstellung von Energie über den Abbau zu Acetyl CoA, das in den Tricarbonsäurezyklus (TCA) und Glyoxylat Zyklus eingeschleust wird. Die im TCA entstehenden Reduktionsäquivalente (NAD(P)H_2) werden in die Atmungskette eingebracht und bewirken durch die oxidative Phosphorylierung die Bereitstellung von ATP. Das gebildete ATP wird für die Deckung des Energiebedarfs der Zelle und für den Aufbau von Polyphosphaten genutzt.

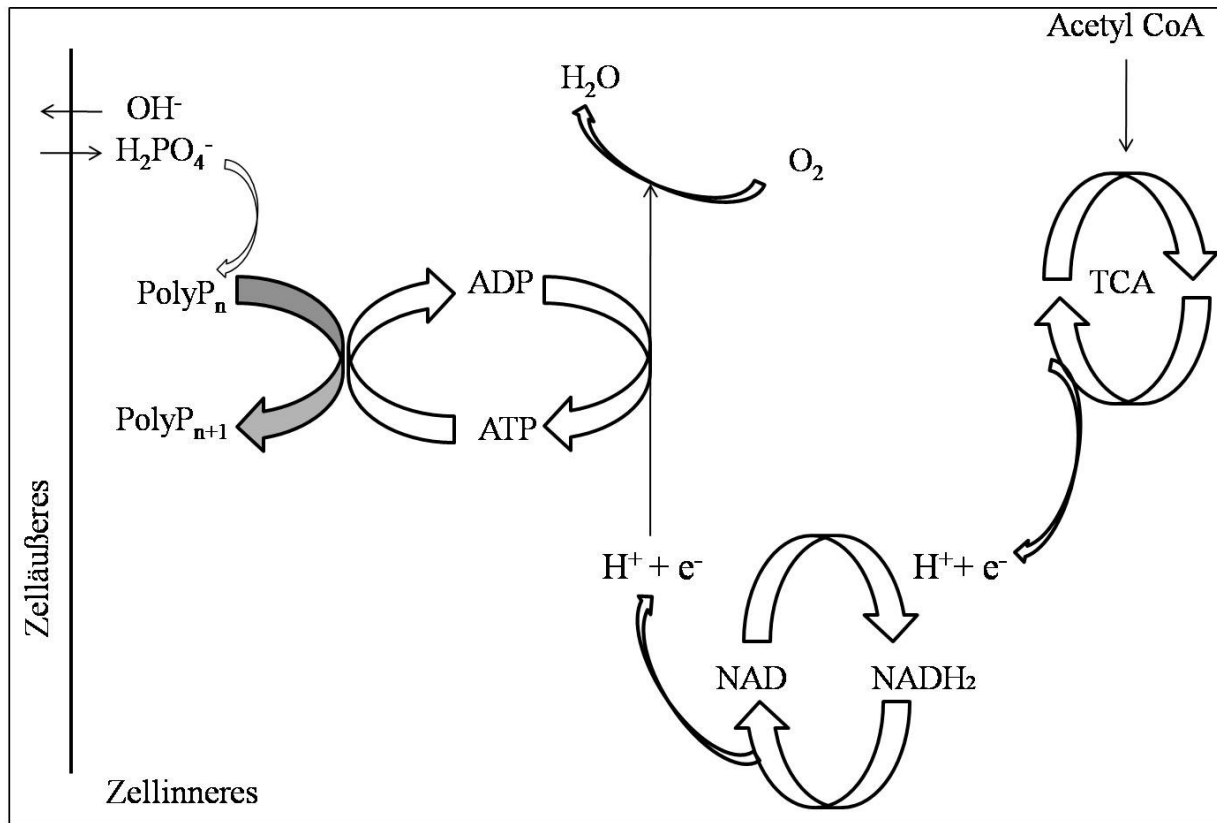


Abbildung. 1.4.1: Schematische Darstellung der Polyphosphatbildung

Bei Polyphosphatsynthese handelt es sich um einen enzymatischen Prozess, an dem in vielen polyphosphatbildenden Mikroorganismen das gleiche Enzym beteiligt ist. Die Polyphosphatkinase (PPK) katalysiert sowohl den Aufbau von Polyphosphaten unter Bildung von ADP (1), als auch den Abbau der Polyphosphate unter Bildung von ATP (2) (Kronberg et al. 1999). Obgleich der Mechanismus der Polyphosphatbildung in verschiedenen Mikroorganismen derselbe ist, werden die gebildeten Polyphosphate für unterschiedliche Zwecke von den Mikroorganismen aufgebaut und genutzt.



Besonders gut untersucht ist die Bildung von Polyphosphaten in der EBPR, in der die Polyphosphate den Mikroorganismen als Energiespeicher dienen. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen werden die Polyphosphate abgebaut und die Energie der energiereichen

Phosphoranhydridbindungen zur Bildung von ATP genutzt. In Abbildung 1.4.2 ist der Mechanismus der Polyphosphatspeicherung in der EBPR schematisch dargestellt.

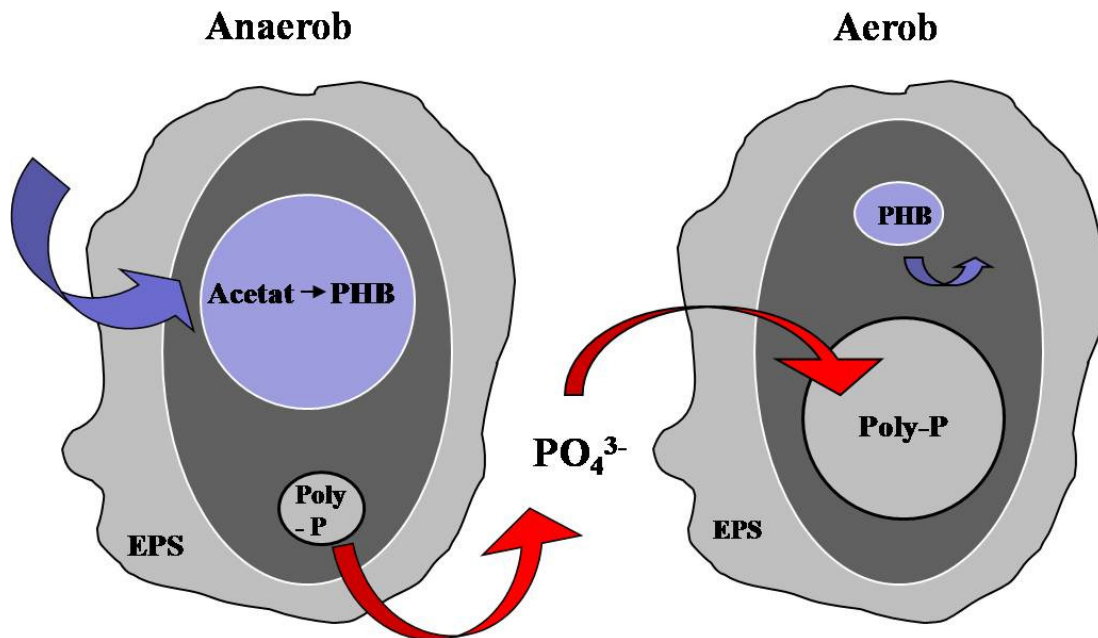


Abbildung 1.4.2: Mechanismus der Polyphosphatspeicherung in der EBPR. In der anaeroben Phase nimmt die Bakterienzelle Acetat auf und speichert es in Form von Fettsäuren (PHB). Zum Umbau von Acetat zu PHB wird Energie aus den gespeicherten Polyphosphaten (Poly-P) gewonnen. In der aeroben Phase kehrt sich der Mechanismus um: PHB wird abgebaut und anorganisches Phosphat als Poly-P gespeichert. EPS: Extrazelluläre Polymere Substanz.

Unter anaeroben Bedingungen verwenden die Mikroorganismen Acetat als C-Quelle, welches zu AcetylCoA umgesetzt wird. Das dabei verbrauchte ATP wird durch den Transfer einer Phosphorgruppe von den gespeicherten Polyphosphaten auf ADP wieder zur Verfügung gestellt (siehe Formel 2). Beim Abbau der Polyphosphate wird anorganisches Phosphat aus der Zelle in die Umgebungslösung freigesetzt. Das gebildete AcetylCoA wird zu Polyhydroxyfettsäuren kondensiert und gespeichert. Beim Wechsel zu aeroben Bedingungen wird der Fettsäurespeicher zur Energiegewinnung genutzt, es entsteht ein Überschuss an ATP, das unter Aufnahme von Phosphat aus der Umgebungslösung zur Bildung der Polyphosphate genutzt und somit die überschüssige Energie in der Phosphoranhydridbindung gespeichert wird. Dabei nehmen die Bakterien mehr Phosphat auf als sie verbrauchen, man spricht von *Luxury Uptake* (Hoffmeister et al. 1990, Bark et al. 1992 & 1993).

Neben der Speicherung von Polyphosphaten im Wechsel aerober/anaerober Bedingungen in der Abwasserbehandlung wurde die Aufnahme von Phosphat in die Zelle und die Bildung von Polyphosphat bei Mikroorganismen beobachtet, die die Polyphosphate nutzen um osmotischen Stress zu senken (Ault-Riché et al. 1998), Metalle zu komplexieren (Rao und Kronberg,

1996) oder Schwankungen des pH-Werts in der Umgebungslösung auszugleichen (Bental et al. 1991, McGrath et al. 2001). Viele extremophile Mikroorganismen zeigen eine stressbedingte gesteigerte Phosphataufnahme unter Bildung von Polyphosphaten, darunter auch *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Das Bakterium nutzt gespeicherte Polyphosphate zur Chelatierung toxischer Schwermetalle und kann hohe Konzentrationen an Arsen, Cadmium und Kupfer tolerieren (Alvarez und Jerez 2004, Osorio et al. 2008). Zusätzlich reagieren einige Mikroorganismen auf niedrige pH-Werte (pH 5.5) mit einer erhöhten Aufnahme von Polyphosphaten. Dieses Phänomen wurde in der Abwasserbehandlung beobachtet und beschrieben (McGrath et al. 2001, Mullan et al. 2006).

Die an der Polyphosphatspeicherung in der Abwasserbehandlung beteiligten Mikroorganismen sind bis heute noch nicht vollständig bekannt. Zunächst galten Bakterien der Gattung *Acinetobacter* als sicher an der Phosphatakkumulation beteiligt (Kämpfer et al. 1990). Die Beteiligung anderer, nicht isolierbarer Mikroorganismen musste jedoch schon damals angenommen werden. Die Reinkulturen der potentiellen phosphatakkumulierenden *Acinetobacter* zeigten nicht die gleiche Phosphataufnahme wie die Umweltproben aus dem laufenden Prozess in den Kläranlagen (Hollender et al. 2002). Die Suche nach weiteren Mikroorganismen, PAO's (Phosphate accumulating organisms) ergab, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen an der Phosphoreliminierung beteiligt sind oder sein können (Tabelle 1.4.2). Es gibt eine Vielzahl von identifizierten Bakterien aus Klärschlamm, die eine Phosphatakkumulation zeigen.

Tabelle 1.4.2: Phosphoreliminierende Mikroorganismen aus der EPBR

Mikroorganismus	Akkumulationsweg	Referenz
<i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Pseudomonas maltipholia</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Ewingella americana</i>	aerob/anaerob	Kämpfer et al. 1990
<i>Rhodocyclus</i>	aerob/anaerob	Beer et al. 2005
<i>Candidatus accumulibacter phosphatis</i>	aerob/anaerob	Crocetti et al. 2002
<i>Pseudomonas putida</i>	Stickstofflimitation	Tobin et al. 2007
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Metallstress	Seufferheld et al. 2008
<i>Burkholderia cepacia</i>	pH-Stress	Mullan et al. 2006
<i>Candida humicola</i>	pH-Stress	McGrath et al. 2001
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Microbacterium delftia acidovorans</i>	aerob/anaerob	Hollender et al. 2002
<i>Microlantus phosphovorius</i>	aerob	De Bashan und Bashan 2004

Die sich entwickelnden Bakterienpopulationen sind von Kläranlage zu Kläranlage verschieden, ebenso verschiebt die Einwirkung von Stressoren die mikrobiologische Besiedlung im Klärschlammbecken (Beer et al. 2005). Die Aktivität eines Schlamms kann in der Regel nicht

auf einen einzigen Akkumulationsmechanismus zurückgeführt werden, sondern ist eine Kombination aus der Vielzahl von Möglichkeiten, die zur Phosphatspeicherung führen.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit metallbelastete Feststoffe durch Bioleaching gereinigt werden können, inwieweit eine mikrobiologische Wertstoffrückgewinnung, insbesondere von Phosphor, möglich ist, und ob die beiden Prozesse gekoppelt werden können.

1. Bioleaching metallbelasteter Feststoffe

Im ersten Teil der Arbeit steht das Bioleaching zur Dekontamination schwermetallbelasteter Feststoffe im Vordergrund. Verschiedene Feststoffe, deren Materialeigenschaften, ihr Verhalten während des Bioleachings und der Dekontaminationsgrad sollen unter definierten Bedingungen im *Labscale*-Maßstab miteinander verglichen werden. Die bisherigen Konzepte zum Einsatz des Bioleachings beziehen sich stets auf einzelne Feststoffe und erlauben keine Bewertung des Bioleachings im Rahmen einer allgemeinen Anwendbarkeit zur Reinigung verschiedener metallbelasteter Feststoffe. Ziel ist es, einheitlich festgelegte Kriterien zu formulieren, durch die sich die Machbarkeit des Bioleachings in Abhängigkeit von den Feststoffeigenschaften im Vorfeld abschätzen lässt. Die ökotoxikologische Bewertung der abgereicherten Feststoffe soll die Betrachtung des Bioleachings zur Dekontamination metallbelasteter Feststoffe abrunden.

2. Wertstoffrückgewinnung mit Bioleaching

Im zweiten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob das Bioleachingverfahren zur Rücklösung von Phosphor aus Klärschlamm und Klärschlammasche eingesetzt werden kann und ob es den Anforderungen der Wertstoffrückgewinnung entspricht. Im Vergleich mit den bereits angewandten chemischen Verfahren soll das Bioleaching zur Phosphorrücklösung genutzt und bewertet werden. Im Zuge der Wertstoffrückgewinnung stellt der Einsatz des Bioleachings ein neues Anwendungsfeld dar.

3. Kombination von Bioleaching und saurer Phosphorrückgewinnung

Im dritten Teil der Arbeit sollen die gleichzeitige Lösung des Phosphors und seine Abtrennung von der schwermetallreichen Lösung in einem mikrobiologischen Prozess durchgeführt werden. Ziel ist es, ein phosphorreiches, schwermetallarmes Produkt herzustellen, das durch wenige Aufarbeitungsschritte in den Wertstoffkreislauf des Phosphors eingeschleust werden kann. Die an diesem kombinierten Prozess beteiligten Mikroorganismen sollen identifiziert und eine mechanistische Aufklärung über den Ablauf des Prozesses gegeben werden. Als Vorbild dient die EBPR zur Eliminierung von Phosphor aus Abwasser.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *thiooxidans*

Für die Bioleachingversuche in der vorliegenden Arbeit wurden zwei Stämme der *Acidithiobacillus*-Gattung bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) ausgewählt und kultiviert (*Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 583, *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887). Die Bakterienpopulationen entstammen einer Mine zur Erzlaugung von Kupfer und sind auf das Lösen von Schwermetallen sowie auf die Produktion von Schwefelsäure konditioniert. Die Kultivierung wurde bei 22 °C mit Belüftung unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Bakterien wurden auf ein Medium mit elementarem Schwefel adaptiert (Tabelle 2.1.1). Das Bakterienwachstum wurde über den sinkenden pH-Wert und die steigende Sulfatkonzentration im Medium überwacht. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen der Bakterien in der Neubauerkammer bestimmt. Bei einer Bakteriendichte von 10^7 Zellen/ml und einem pH-Wert von 2.3-1.5 wurde die Bakterienlösung als Bioleachingmedium eingesetzt.

Tabelle 2.1.1: Zusammensetzung *Acidithiobacillus* Medium

Zusammensetzung Medium	g/l
KH ₂ PO ₄	3,0
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5
(NH ₄)SO ₄	3,0
CaCl ₂	0,2
Na ₂ CO ₃	2,0
Na ₂ S ₃ O ₃	5,0
S ₈	10,0

pH: 4.4 - 4.7 mit 0,2 M H₂SO₄

2.2 Kultivierung der syntrophischen Mischpopulation

Die Mischpopulation zur kombinierten Lösung und Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlammasche wurde aus anaerob stabilisiertem Faulschlamm gewonnen (Kläranlage Aachen, Soers). Die Kläranlage Aachen Soers verfügt über eine Bio-P-Stufe zur biologischen Phosphoreliminierung. Somit stellt der Schlamm ein ideales Anreicherungsmedium für phosphatakkumulierende Mikroorganismen dar. Auch die schwefeloxidierenden Bioleachingbakterien sind Bestandteil der Bakterienpopulation im Faulschlamm und werden durch die Zugabe von elementarem Schwefel gezielt im Schlamm angereichert. Der Faulschlamm wurde nach einer Verweilzeit von 10 Tagen aus dem Faulturm entnommen und unter Zugabe von elementarem

Schwefel und Belüftung für 2-4 Wochen bei 22° C inkubiert. Der durch die Anreicherung der schwefeloxidierenden Mikroorganismen sinkende pH-Wert diente als Wachstumskontrolle. Bei Erreichen des gewünschten pH-Werts (pH2) wurde der Schlamm bei 12.500 x g 20 Min. zentrifugiert und der Überstand als Bioleachingmedium eingesetzt. Die Zellzahl nach Zentrifugation im Schlamüberstand wurde mit der Neubaurkammer bestimmt und der Überstand mit einer Zellzahl von 10^5 Zellen/ml für die Bioleachingversuche eingesetzt. Das Bakterienkonsortium wird im Folgenden als AEDS bezeichnet (*Acidithiobacillus Enriched Digested Sludge*).

2.3 Bioleachingreaktor

Zur technischen Übertragung des Bioleachingprozesses aus der Erzlaugung auf die Laugung von Klärschlammmasche wurde in Anlehnung an das Prinzip des Haldenleachings (Abbildung 2.3.1) ein Bioleachingreaktor im Labormaßstab entwickelt. Beim Haldenleaching wird die Bakteriensuspension mittels Berieselungsanlage auf die Halde aufgebracht. Die Bioleachinglösung perkoliert die Erzhalde und löst die Metalle. In einem Sammelbecken wird die angereicherte Laugungslösung aufgefangen.

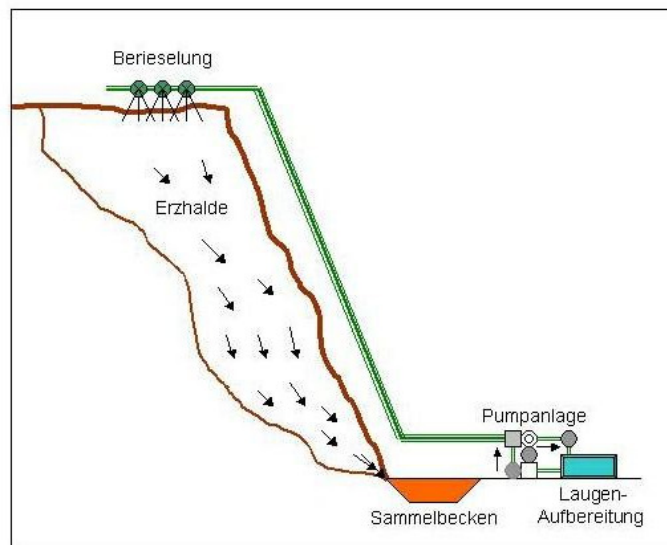


Abbildung 2.3.1: Prinzip des Haldenbioleachings in der Erzlaugung (Quelle: www.Mineralienatlas.de, Peter Seroka)

Dieser Kreislauf wird einige Male wiederholt, bis die Metallkonzentration in der perkolierenden Lauge für eine Aufbereitung ausreichend hoch ist.

Der Bioleachingreaktor im Labormaßstab nutzt ebenfalls das Prinzip der Perkolation über den Feststoff (Abbildung 2.3.2). Die Halde wird durch eine Perkolationssäule ersetzt. In der Säule liegt die Asche auf einer Glasfritte. Die Asche wird kontinuierlich mit der Bakterienlösung berieselt, die Bakterienlösung wird wieder in das Kulturgefäß zurückgeführt aus dem sie

erneut in die Säule gepumpt wird (25 ml/min). Am Ablauf der Perkolationssäule werden Proben zur Analyse der Laugungslösung sowie zur Bestimmung des Phosphorgehalts genommen. Durch die kontinuierliche Berieselung der Asche mit Bakterienlösung haben die Bakterien die Möglichkeit auf der Asche einen Biofilm zu bilden und Metalle und Phosphor in Lösung zu bringen. Die Dauer der Bioleachingversuche lag bei 8, 10 und 14 Tagen.

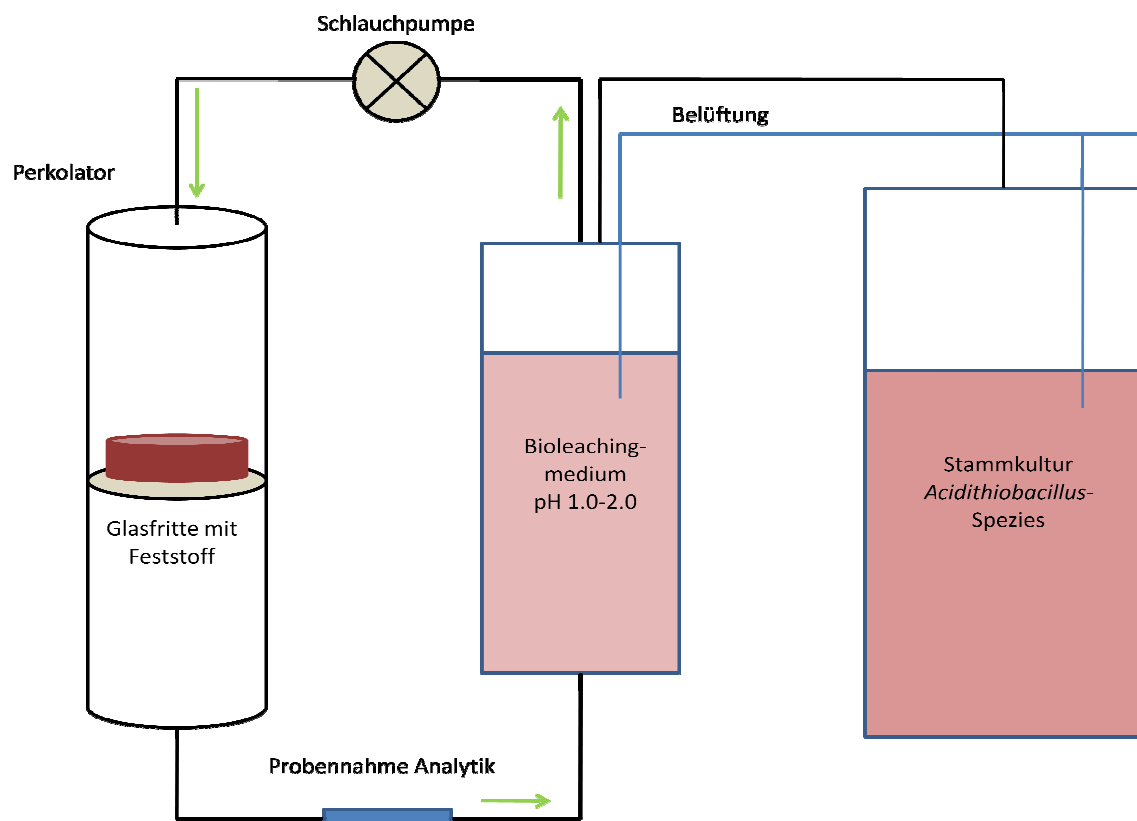


Abbildung 2.3.2: Schematischer Aufbau des Bioleachingreaktors im Labormaßstab: Perkolator mit permeabler Glasfritte und Asche.

2.4 Bioleachingverfahren

2.4.1 Eingesetzte Feststoffe

Bei den im Bioleachingverfahren eingesetzten Feststoffen handelt es sich um Verbrennungsaschen, um Industrieschlacke sowie um schwermetallbelasteten Boden. Herkunft und Art der Feststoffe sind in Tabelle 2.4.1 zusammengefasst. Die Feststoffe wurden dem Institut von einem Industriepartner zur Behandlung mit dem Bioleaching überlassen. In allen Feststoffen lag eine erhöhte Metallbelastung vor. Die Feststoffe wurden zunächst mit dem Bioleachingverfahren zur Dekontamination von Schwermetallen behandelt. Zur Rückgewinnung von Phosphor wurde die Klärschlammasche der Kläranlage Bonn eingesetzt. Vor Einsatz in den

Bioleachingreaktor wurden alle Feststoffe bei 105°C für 12 Stunden getrocknet und durch Mahlen in der Kugelmühle (S 1000, Retsch) homogenisiert.

Tabelle 2.4.1: Herkunft und Behandlungsverfahren der Feststoffe

Feststoff	Herkunft	Verfahren
Klärschlammasche (KAA)	Kläranlage Bonn, Salierweg: Monoverbrennungsanlage	Bioleaching: Dekontamination/ Phosphorrückgewinnung
Ausgefallter Schlamm (AS)	Kläranlage Bonn, Salierweg, nach Zentrifugation	Bioleaching: Dekontamination/ Phosphorrückgewinnung
Verbrennungsasche Zyklonfilter (ZF)	Biomasseheizkraftwerk Mark Schwaben Firma EON	Bioleaching: Dekontamination
Verbrennungsasche Brennraum (BR)	Biomasseheizkraftwerk Mark Schwaben Firma EON	Bioleaching: Dekontamination
Verbrennungsasche Rostofen (RO)	Biomasseheizkraftwerk Mark Schwaben Firma EON	Bioleaching: Dekontamination
Elektroofenschlacke (EOS)	Rückstände Elektroofen stahl- verarbeitende Industrie	Bioleaching: Dekontamination
Boden (BO)	Stolberg	Bioleaching: Dekontamination
Boden aus Deponierung (SIT)	Deponie Sittard	Bioleaching: Dekontamination

2.4.2 Bestimmung der Säurekapazität im Feststoffeluat

Zur Ermittlung des pH-Werts und der Säurekapazität im wässrigen Eluat der Feststoffe wurden 10 g Material mit 100 ml Millipore Wasser für 24h über Kopf geschüttelt. In den gewonnenen Eluaten wurde der pH-Wert bestimmt (pH-Meter, VWR). Die Säurekapazität wurde nach DIN 38409-7 (2005) durch Titration mit 0,1 molarer Salzsäure bestimmt. Sie gilt als Maß für die Pufferkapazität des Eluats.

2.4.3 Dekontamination schwermetallbelasteter Feststoffe mit Bioleaching

Die zur Dekontamination eingesetzten schwermetallbelasteten Feststoffe wurden zunächst einem einstufigen Bioleachingverfahren unterzogen. Der Feststoff wurde einmalig mit einer Bakterienlösung versehen, die kontinuierlich über eine Dauer von 8 Tagen über den Feststoff perkolierte. Feststoffe mit einer hohen Säurekapazität wurden mit einem zweistufigen Bioleaching behandelt. Hierbei wurde die Bakterienlösung nach einer bestimmten Zeit zur Gänze durch frische Bakterienlösung ersetzt.

Im einstufigen Prozess wurden 5 g homogenisierter Feststoff in den Bioleachingperkolator eingesetzt. In das Kulturgefäß wurden 800 ml Bakterienkultur (*Acidithiobacillus ferrooxidans*

und *thiooxidans*), pH2 gegeben. Die Bioleachinglösung wurde mit einer Schlauchpumpe in den Bioleachingperkolator gepumpt. Nach Perkolation des Feststoffs gelangte die Lösung zurück in das Kulturgefäß. Die Bioleachingansätze liefen zwischen acht Tagen (Dekontamination) bzw. zehn bis vierzehn Tagen (Phosphorrückgewinnung) in denen der Feststoff kontinuierlich perkoliert wurde. Die Probenahme des Bioleachingmediums zur Kontrolle der Metall- und Phosphorfreisetzung erfolgte alle vierundzwanzig Stunden. Nach Beenden des Bioleachings wurde die verbleibende Asche dreimal mit Millipore-Wasser gewaschen und bei 105°C getrocknet. Nach Trocknung wurde die Asche zur Rückstandsbestimmung der Metalle mit der ICP-MS vermessen (siehe Abschnitt 2.5.3).

Beim zweistufigen Bioleachingprozess wurde bei gleicher Einwaage nach drei Tagen Perkolation das Bioleachingmedium im Kulturgefäß vollständig durch frische Bakterienlösung ersetzt. Der Ansatz wurde anschließend weitere fünf Tage beprobt und abschließend die Asche wie oben weiterverarbeitet. Die Flüssigproben wurden nach Zugabe von 1 ml HNO₃ (Suprapor) bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach Abschluss der Versuchsreihe wurden die Metallgehalte mit ICP-MS bestimmt.

2.4.4 Kombiniertes Bioleaching und saure Phosphorrückgewinnung aus Klärschlammasche

Zur Phosphorrückgewinnung kombiniert mit der Dekontamination von belasteten Feststoffen wurde ein Bakterienkonsortium (AEDS) genutzt, welches die Eigenschaft besitzt Metalle zu lösen und gleichzeitig gelösten Phosphor in die Biomasse aufzunehmen. Bei der Phosphorrückgewinnung wurden 5g phosphathaltiger Feststoff eingesetzt (Klärschlammasche, KA Bonn) und mit 800 ml AEDS-Medium perkoliert. Das Verfahren war einstufig und die Feststoffe wurden über einen Zeitraum von zehn bis fünfzehn Tagen kontinuierlich perkoliert. Die Probenahme zur Bestimmung des Phosphor- und Metallgehalts des Mediums erfolgte alle vierundzwanzig Stunden. Nach Ende des Bioleachings wurde die Asche wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben behandelt und analysiert. Die Bestimmung von Phosphor als *ortho*-Phosphat erfolgte photometrisch sowie ionenchromatographisch. Das entstandene Produkt aus der Phosphorrückgewinnung wurde bei 25.000 x g 20 Minuten bei 22°C zentrifugiert und anschließend bei 105°C für zwölf Stunden getrocknet. Das Produkt wurde zur Aufklärung der Elementarzusammensetzung mit der ICP-MS gemessen. Zur Identifizierung der entstandenen Phosphorverbindungen (organisch oder anorganisch) wurde das Produkt einer Phosphorfraktionierung (Bast 1988, Te Baere 1990) unterzogen (siehe Abschnitt 2.5.4) und der Phosphorgehalt der einzelnen Fraktionen photometrisch bestimmt.

2.5 Chemische Analytik

2.5.1 Ionenchromatographische Bestimmung von Phosphat und Sulfat

Die Bestimmung des freigesetzten Phosphors als *ortho*-Phosphat sowie des entstandenen Sulfats erfolgte mit dem Ionenchromatographen ICS 3000 mit Leitfähigkeitsdetektor (Dionex). In Anlehnung an DIN 38405-19 wurde die Methode für die Messung hoher Phosphatgehalte modifiziert. Für die Bestimmung des Phosphatgehalts wurde eine höhere Kalibrierung eingesetzt (1-20 mg/l). Die Bestimmung von Sulfat wurde nach DIN 38405-19 durchgeführt. Alle Proben wurden vor Analyse filtriert (PALL Life Science Supor PES 0.45 µm) und wenn nötig verdünnt (Millipore-Wasser).

2.5.2 Photometrische Bestimmung von Phosphat und Gesamtphosphat

Gelöstes *ortho*-Phosphat und Gesamtphosphat nach Aufschluss wurden mit dem Küvettentest Phosphat/Gesamtphosphat von Dr. Lange (LCK 350, 6 mg/l – 60 mg/l Hach- Lange) am Photometer DR 2800 (Hach-Lange) bestimmt. Vor der Analyse wurden die Proben filtriert (0.45 µm, PALL Life Science Supor PES) und 1:200 mit Millipore-Wasser verdünnt. Zur Bestimmung des Gesamtphosphats wurden die Proben unfiltriert mittels Küvettentest LCK 350 im HTS 100 (Hach-Lange) aufgeschlossen und nach Aufschluss und Verdünnung (1:200) am Photometer gemessen.

2.5.3 Bestimmung der Schwermetalle mit ICP-Massenspektrometrie

Die Metallgehalte der Feststoffe sowie der Leachinglösung wurden mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS System Elan DRC II, Perkin Elmer) bestimmt. Die flüssigen Proben wurden mit 65 % HNO₃ (Suprapor, VWR) angesäuert und mit 100 µl internem Rhodiumstandard versetzt (1 µg/ml). Die Feststoffproben wurden homogenisiert und mit Königswasser (HCl:HNO₃ 3:1) in der Mikrowelle aufgeschlossen. Als Kalibrierstandard diente eine Standardmultielementlösung mit 30 Elementen (Merck 110580). Zur Bestimmung der Elemente Fe, P, Pb, Mg und Al wurde mit höher konzentrierten Standards nachkalibriert, diese wurden aus Standardlösungen der einzelnen Elemente (Merck) angesetzt. Die Bestimmungsgrenzen für flüssige und feste Proben sind in Tabelle 2.5.1 zu sehen.

Tabelle 2.5.1: Nachweisgrenzen der einzelnen Elemente mit ICP-MS

Element	Flüssigprobe [µg/l]	Feste Probe [µg/kg]
P, Ca	< 50	<1000
Zn	< 5	< 25
Fe, Se, Mn	< 0,8	< 80 Mn; < 25 Se
Al, As, Mg	< 0,5	< 40 As; < 100 Al
Cd, Cr, Cu, Co, Ni, V, Pb, Mo	< 0,2	< 40 Pb; < 10 Cu, Cr, Ni ; < 2,5 Co, V, Mo

2.5.4 Sequentielle Phosphorfractionierung im Feststoff

Die Phosphorfractionierung des Sediments wurde in Anlehnung an die Methodik nach Psenner und Uhlmann durchgeführt. Sie ermöglicht die Differenzierung verschiedener organischer und anorganischer Phosphorverbindungen und ihre quantitative Bestimmung. Der Feststoff wurde sequentiell mit verschiedenen Extraktionsmitteln behandelt (Crocetti et al. 2000, de Baere et al. 2002). Im entstandenen Eluat wurden der Phosphat- und Gesamtposphatgehalt photometrisch, die Elementzusammensetzung in Lösung und Feststoff mit ICP-MS bestimmt. Für die Phosphorfractionierung wurden 0,5 g getrockneter Feststoff mit jeweils 3 ml des entsprechenden Extraktionsmittels inkubiert. Nach Zentrifugation (Hereaus, 3500 rpm) wurden Phosphat im Überstand bestimmt. Das ermittelte *ortho*-Phosphat entspricht dem gelösten, leicht verfügbaren Phosphor (L-PO), die Differenz zwischen *ortho*-Phosphat und Gesamtposphat entspricht dem schwer verfügbaren Phosphor (S-PO) das nicht als *ortho*-Phosphat in Lösung geht und dem organisch gebundenen Phosphat entspricht. Die Extraktionsmittel und gelösten Phosphorfractionen sind in Tabelle 2.5.2 aufgelistete.

Tabelle 2.5.2: Verfahrensschema der Phosphorfractionierung nach Psenner und Uhlmann

Extraktionsmittel	Zeit/Temp	Bezeichnung	Extrahierte Verbindungen
Dest. Wasser	20 Minuten 20°C	Wasser L-PO	Gelöste/locker adsorbierte Phosphate
		Wasser S-PO	Gelöste Polyphosphate, Polyphosphatbruchstücke nach Zellyse
Natriumhydrogencarbonat/Dithionith (NaD)	30 Minuten 40°C	NaD L-PO	An Fe(OH) ₃ chemisch/ absorbiertes gebundenes Phosphat
		NaD S-PO	Zellphosphate, hydrolysiert
1 M NaOH (Na)	16 Stunden 20 ° C	Na L-PO	An Metalloxide (Fe/Al) chemisch/adsorptiv gebundenes Phosphat
		Na S-PO	Hauptteil des org. Phosphats/Polyphosphat
0,5 M HCl (H)	16 Stunden 20 °C	H L-PO	Ca und Mg-Phosphate
		H S-OP	Restgehalt an organischen Phosphatverbindungen

2.5.5 Ionenchromatographische Bestimmung von Chrom(VI)

Der Bioleachingprozess wurde auf die Lösung von sechswertigem Chrom in der Bioleachinglösung analysiert. Zur Aufnahme der Freisetzungskinetik von Chrom wurden zu Beginn des Bioleachingprozesses (Probenahme alle 15 Minuten, 0-145 Minuten) bis zum Ende des Versuchs (zwei Tage) Proben genommen und sofort auf ihren Gehalt an Chrom(VI) bestimmt.

Die EPA-Methode 218.6 zur Chrom(VI)-Bestimmung wurde leicht modifiziert (geringer Flussrate des Eluenten) um eine sensitivere Nachweisgrenze zu ermöglichen. Die Parameter sind in Tabelle 2.5.3 dargestellt.

Tabelle 2.5.3: Parameter zur Bestimmung von Chrom (VI) mit dem Ionenchromatographen

Parameter		Parameter	
Gerätetyp	ICS 3000 Ionenchromatograph, Dionex	Detector	UV-Detector, Dionex
Säule	Guard column: NG AS7 Dionex Column: AS 7, Dionex	Time/Retention time	15 min, Peak 6,3 min.
Eluent	250 mM Ammoniumsulfat/100 mM Ammoniumhydroxid	Detection UV	530 nm
PCR	Diphenylcarbazid	Pressure	1900 psi
Injection volume	25 µl	Loop volume	50 µl
Flow Eluent	0,25 ml/min	Flow PCR	0,25 ml/min
LOD	2 µg/l	LOQ	5 µg/l

2.5.6 Bestimmung von Klärschlammparametern

Bestimmung des Kohlenstoffgehalts im Schlamm durch Glühverlust: Zunächst wurde der Glühverlust des Schlammes vor und nach der Bakterienanreicherung bestimmt. Die Bestimmung des Glühverlustes erfolgte nach DIN EN 12879 (2001) mit bei 105 °C getrockneten Schlammproben (Ermittlung der Trockensubstanz nach DIN EN 1288, 1996). Der Glühverlust ist das Maß für den Anteil organischer Verbindungen im Schlamm. Die Ermittlung des Glühverlustes erfolgte für jeden Schlamm im dreifachen Ansatz.

Charakterisierung des Schlammüberstands vor und nach Anreicherung: Das Zentrifugat des Klärschlammes aus der anaeroben Klärschlammbehandlung der Kläranlage Aachen Soers wurde vor und nach der Anreicherung der AEDS-Bakterien charakterisiert. Die Anionen und Kationen wurden ionenchromatographisch und mittels ICP-MS erfasst. Desweiteren wurden folgende Parameter im Überstand des Schlammes bestimmt:

Proteine und Huminstoffe: Die Bestimmung des Protein- und Huminstoffgehalts im Überstand erfolgte nach Frolund et al. 1996. Zur Protein- und Huminstoffbestimmung wurden folgende Arbeitslösungen eingesetzt:

Lösung 1: 0,143 M NaOH und 0,27 M Na₂CO₃ – Lösung in Wasser

Lösung 2: 0,057 M Kupfersulfatlösung

Lösung 3: 0,124 M Di-Natriumtetrat-Dihydrat-Lösung

Lösung 4: Millipore-Wasser

Mix zur Proteinbestimmung: Lösung 1,2 und 3 im Verhältnis 100:1:1

Mix zur Huminsäurebestimmung: Lösung 1,2 und 4 im Verhältnis 100:1:1

Phenol-Reagenz: 5 ml Folin Ciocalteus Phenolreagenz in 6 ml Millipore-Wasser

Je 0,5 ml Probe wurde mit 0,7 ml der benötigten Arbeitsreagenz (Protein- oder Huminstoffbestimmung) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 0,1ml Phenolreagenz hinzugefügt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 750 nm im Photometer (Dr Lange 2800 Spektralphotometer) gemessen. Alle Messungen wurden gegen Millipore-Wasser durchgeführt. Für die Huminstoffbestimmung wurde eine Kalibration zwischen 0-300 mg/l genutzt. Für die Proteinbestimmung eine Kalibration von 0-80 mg/l. Der LOD und LOQ für die Humine lag bei 1,2 und 3,6 mg/l, für die Proteine bei 0,1 und 0,3 mg/l.

Aus den Werten für die Absorption der Proteine und Humine wurden mit folgenden Formeln die Konzentrationen in der Lösung berechnet:

$$A_{\text{Protein}} = 1,25 * (A_{\text{Protein gem.}} - A_{\text{Humin gem.}})$$

$$A_{\text{Humin}} = A_{\text{Humin gem.}} - (0,2 * A_{\text{Protein}})$$

$A_{\text{Protein/Humin}}$: Errechnete Absorption

$A_{\text{Protein gem.}}$: Gemessene Absorption der Proteine bei 750 nm

$A_{\text{Humin gem.}}$: Gemessene Absorption der Humine bei 750 nm

Die Formeln müssen angewendet werden, da die Proteinbestimmung durch Huminstoffe gestört wird und diese Störung in Form eines Faktors in die Berechnung der Konzentration der Proteine eingezogen werden muss.

Organischer Kohlenstoffgehalt (TOC): Die Methode zur Bestimmung des TOC (total organic carbon) beruht auf der Oxidation der in der Probe enthaltenen Kohlenstoffverbindungen und der anschließenden Messung des entstandenen Kohlenstoffdioxides. Dazu wurden die Proben sowohl filtriert (0,45µm Filter) als auch unfiltriert analysiert. Bei den filtrierten Proben wurde der DOC (dissolved organic carbon, gelöster Kohlenstoff) bestimmt. Die unfiltrierten Proben wurden während der Messung gerührt. In diesen Proben wurde der TOC (total organic carbon) ermittelt.

2.6 Mikrobiologische Charakterisierung von AEDS

2.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie mit DAPI

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) bindet an die AT-reichen Regionen der DNA und ermöglicht eine *In vivo*-Visualisierung von Zellen und Mikroorganismen. Das Anregungsoptimum liegt bei 365 nm und das Emissionsmaximum (DNA) bei 456 nm (blaues Licht). Neben DNA können mit DAPI Polyphosphate sichtbar gemacht werden. Bindet DAPI an Polyphosphate, verschiebt sich das Emissionsspektrum auf 520 nm und emittiert gelbes Licht (Allan und Miller 1980). Der DAPI-Farbstoff wurde zur Detektion von Polyphosphaten sowohl in der Mischkultur von AEDS als auch in den Isolaten eingesetzt. Dazu wurde 1 ml AEDS-Kultur bei 13.000 rpm zentrifugiert und 2x mit PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann mit 50 µl DAPI-Farbstoff im Dunkeln 20 Minuten inkubiert. Nach Auftragen auf einen Objektträger wurde die Probe mit dem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM R) mikroskopiert und fotografiert (Kamera Leica DFC420 C). Die Isolate wurden vor der DAPI-Färbung auf dem Objektträger hitzefixiert, anschließend gefärbt und ausgewertet. Die DAPI-Färbung wurde zusätzlich zur Visualisierung gebildeter Biofilme während des Bioleachings genutzt. Nach Ende des Bioleachingversuchs wurden ca. 1 g Feststoff vorsichtig aus dem Perkolator entnommen, mit DAPI gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet.

2.6.2 Charakterisierung der ökophysiologischen Gruppen im AEDS-Konsortium

Um das Bakterienkonsortium ökophysiologisch zu charakterisieren wurden Titerbestimmungen mit verschiedenen Medien durchgeführt. Als Medien wurden CASO, steriler angereicherter, zentrifugierter Klärschlamm, ein Selektiv-Medium mit Kristallviolett, das sporenbildende Bakterien hemmt und ein für Schwefel-oxidierende Bakterien optimiertes Medium eingesetzt. Das CASO-Medium diente zur Anzucht der heterotrophen Mikroorganismen aus dem AEDS-Ansatz. Da die Bedingungen in der AEDS-Lösung sehr sauer sind, wurde vermutet, dass sich eine Vielzahl von Sporen in der Lösung befinden können, die unter günstigen Bedingungen (CASO) auskeimen und die Charakterisierung des Bakterienkonsortiums verfälschen. Kristallviolett hemmt das Wachstum sporenbildender Bakterien und das Auskeimen von Sporen. Das Selektionsmedium für Schwefel/Eisen-Oxidierer soll *Acidithiobacillus* und andere Schwefeloxidierer anreichern. Die Kontrolle des Wachstums in den Schwefelmediumansätzen verlief über den pH-Wert.

Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist in Tabelle 2.6.1 zusammengefasst. Es wurde jeweils 1 ml AEDS-Ansatz in die 10^{-1} -Verdünnungsstufe (9 ml) der Medien pipettiert. Die Medien wurden bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-12} angeimpft. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, bei 28°C, aerob im Schüttler. Nach 10 Tagen wurden die Ansätze ausgewertet.

Die bewachsenen Medien wurden nach Auswertung zur Gewinnung von Isolaten weiterverwendet.

Tabelle 2.6.1: Zusammensetzung der Medien zur Titerbestimmung

Medium	Zusammensetzung [g/l]
CASO	Pepton aus Casein 15,0; Pepton aus Sojamehl 5,0; Natriumchlorid 5,0; pH: 7,3
Medium S	Kaliumdihydrogenphosphat 3,0; Magnesiumsulfat 0,5; Ammoniumsulfat 3,0; Calciumchlorid 0,2; Natriumcarbonat 2,0; Schwefel 10,0; Eisensulfat 8,0; Natriumtetrathionat 5,0; pH: 4.4 - 4.7
Klärschlamm-medium	Klärschlamm (500 ml); Schwefel 10g/l; bei pH 2,2 wurde der Schlamm zentrifugiert, 2x steril filtriert (Bottleneckfilter, 0,2 µm, VWR)
Sporenbildner	Pepton aus Casein 15,0; Pepton aus Sojamehl 5,0; Natriumchlorid 5,0; pH: 7,3 + 1% Kristallviolett

2.6.3 Physiologische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

Die eingetrübten Titermedien (CASO, Kristallviolett) wurden auf CASO-Platten ausgestrichen. Alle Kolonien von Platten mit 50-70 Kolonien wurden isoliert und auf CASO-Agar solange passagiert bis die Kolonien-Morphologie einheitlich erschien. Die Reinheit der Kolonien wurde mikroskopisch überprüft.

Nach Erhalt der Reinkulturen wurden zur Identifizierung der Mikroorganismen die im folgenden beschriebenen physiologische und enzymatische Tests durchgeführt.

Bestimmung des Gram-Verhaltens

Die Bestimmung des Gram-Verhaltens ist eine der wichtigsten Differentialfärbungen in der Bakteriendiagnostik. Die Zellwand der meisten Eubakterien besteht aus Peptidoglykan. Gram-positive Bakterien besitzen bis zu 40 Schichten der Peptidoglykane in ihrer Zellwand, Gram-negative Bakterien hingegen haben eine dünne Peptidoglykanschicht. Durch Kristallviolett werden diese Schichten eingefärbt. Bei Waschschriff mit Alkohol kann die Farbe nicht mehr aus den Schichten der Gram-positiven Bakterien gewaschen werden und die Bakterien erscheinen dunkelblau-violett im Mikroskop, während die Gram-negativen entfärbt und mit Safarinrot gegengefärbt werden.

Zur Bestimmung des Gram-Verhaltens wurden alle Isolate gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Als Kontrollorganismus dienten *Bacillus cereus* (Gram-positiv) und *Escherichia coli* (Gram-negativ). Jede Kolonie wurde zusätzlich morphologische charakterisiert und fotografiert.

Endosporenfärbung

Zur weiteren Klassifizierung der Mikroorganismen wurde eine Endosporenfärbung mit Malachitgrün durchgeführt. Einige Gram-positive Bakterien können Endosporen ausbilden. Beim

Wachstum auf heterotrophen Nährböden können neben den tatsächlich vermehrungsfähigen, lebenden Mikroorganismen auch Endosporen auskeimen. Dies führt zu einer Verfälschung der tatsächlichen Bakterienpopulation der AEDS-Probe. Daher sollte der Anteil der Sporenbildner im Isolat identifiziert werden. Als Sporenfärbung diente die Malachitgrün-/Safarindifferentialfärbung, die mikroskopisch ausgewertet werden kann.

Oxidase-Test

Der Oxidase-Test ist ein einfaches biochemisches Verfahren zum Nachweis des Enzyms CytochromC-Oxidase, einem Enzym, dass in der Atmungskette aerober Bakterien vorhanden ist. Der Test wurde mit dem Bacident^R Oxidasetest der Firma VWR für alle Isolate durchgeführt.

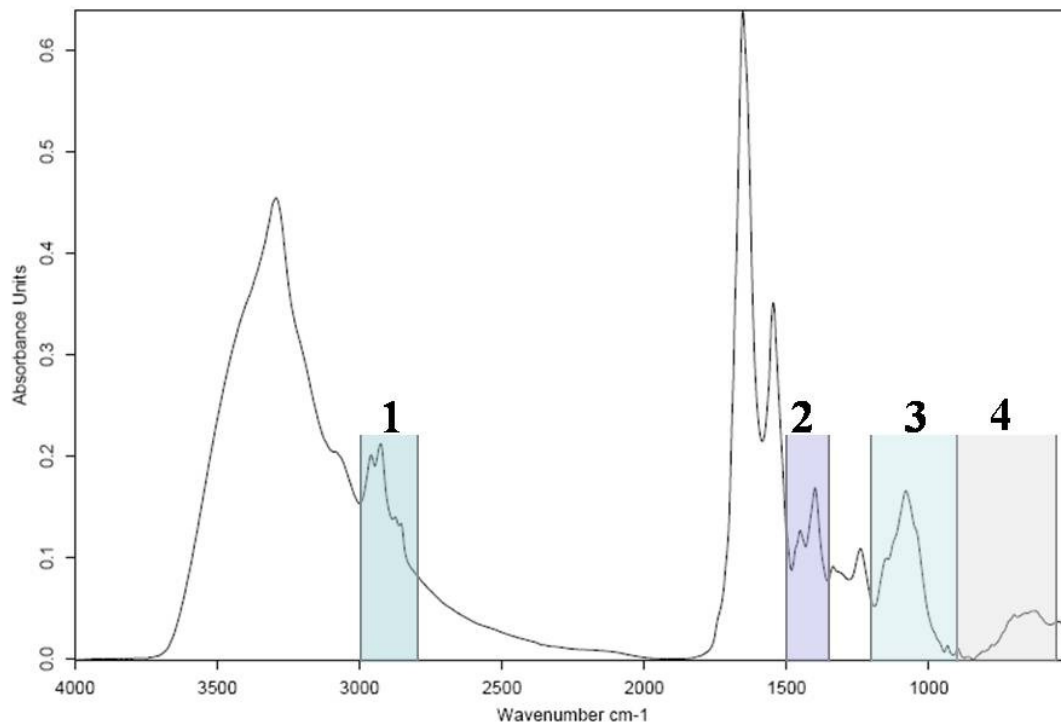
API-Testsysteme

Der API-Test (Analytical Profile Index) von Biomeri  ux ist eine miniaturisierte Form der sogenannten `Bunten Reihe` zur biochemischen und enzymatischen Charakterisierung und Identifizierung von ausschließlich klinisch relevanten Bakterien, Hefen und Pilzen. Die Charakterisierung beruht auf 21 miniaturisierten biochemischen Reaktionen. Die gewonnen Isolate wurden mit verschiedenen API-Testsystemen getestet. Nur Ergebnisse mit dem Attribut `sehr gute Identifizierung` wurden in diese Arbeit einbezogen. Es wurden folgende Testsysteme verwendet: API 20 NE, Identifizierung Gram-negativer, nicht fermentierender Stäbchen, API 20 E, Identifizierung von Enterobacteriaceen und anderen Gram-negativen Stäbchen und API Coryne, Identifizierung von Corynebakterien und coryneformen Bakterien, API CH zur Identifizierung von *Bacillus*-Arten. Die Tests wurden laut Vorschrift durchgeführt und nach über Nacht Inkubation bei 37  C mit den Testreagenzien versetzt. Die Auswertung erfolgte mit der API-Datenbank. Diese Datenbank ist nur bedingt geeignet um Umweltproben zu charakterisieren. Dennoch bietet sie einen ersten Überblick über mögliche Bakterien auf Genus-Level.

2.6.4 Chemische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen mittels FTIR

In der Infrarot-Spektroskopie (IR) wird die Eigenschaft von Atomen genutzt, innerhalb eines Moleküls nach Anregung durch IR-Strahlung um ihre Gleichgewichtslage zu schwingen. Die IR-Strahlung wird absorbiert wenn die einfallende Strahlungsfrequenz mit der natürlichen Schwingungsfrequenz des Dipolmoments im Molekül übereinstimmt. Diese Frequenzen liegen im Mitinfrarotbereich (4000-500 cm⁻¹) (Skoog und Leary, 1996). Aufgrund der genau festgelegten Energiemenge für die Anregung bestimmter Atome, kann die Absorption funktioneller Gruppen in den organischen Molekülen in den Bakterienzellen spezifischen Wellenzahlen zugeordnet werden. Auf dieser Basis ist es möglich, das Spektrum in spektrale Berei-

che einzuteilen, denen die Absorption bestimmten Zellbestandteilen zugeordnet werden kann (Abbildung 2.6.1).



	Wellenlängenbereich [cm ⁻¹]	Zellbestandteile
1	3000-2800	Fettsäuren
2	1500-1400	Proteine, Fettsäuren, Phosphate
3	1200-900	Polysaccharide, Zellphosphate
4	900-700	Fingerprint-Region

Abbildung 2.6.1: FTIR-Spektrum von *Klebsiella pneumoniae*. Die markierten Spektralbereiche können bestimmten Zellbestandteilen zugeordnet werden (Tabelle)

Die FTIR-Spektren von Mikroorganismen zeigen die Absorption aller Zellbestandteile und sind ein Abbild der kompletten chemischen Zusammensetzung des Bakteriums und können als dessen Fingerabdruck gesehen werden. Neben der Identifizierung von Mikroorganismen durch den direkten Vergleich der FTIR-Spektren mit Referenzspektren in einer Datenbank, können die Absorptionsmuster genutzt werden, um Ähnlichkeiten zwischen den Spektren zu ermitteln und somit Aussagen über die Ähnlichkeitsbeziehung der Bakterien zu machen.

Clusteranalysen der Spektren der analysierten Isolate können zur Untersuchung verschiedener Eigenschaften von Bakterien wie Verwandtschaftsgrad, Unterscheidung Bakterien/Pilze und Gramverhalten genutzt werden indem man die Frequenzbereiche betrachtet, die für die gewünschte Eigenschaft charakteristisch sind. Durch die Verwendung unterschiedlicher Clusteranalysen, die jeweils ein anderes Datenprocessing nutzen, kommt es zu Unterschieden in der

Heterogenität in den aufgetragenen Clustern. Die Heterogenität (H) ist das Maß für die Ähnlichkeit zwischen den Bakterienspektren. Generell gilt für jedes Cluster, je geringer die Heterogenität, desto größer die Ähnlichkeit zwischen den Spektren. In Tabelle. 2.6.2 sind die Parameter der durchgeführten Clusteranalysen zu sehen.

Tabelle. 2.6.2: Parameter der Clusteranalyse der FTIR-Spektren

Analyse	Frequenzbereiche [cm ⁻¹]	Data Preprocessing	Algorithmus	Dendrogramm
Bakterien/Pilze	3001-2799	Erste Ableitung	Standard	Wards Algorithmus
	1500,5-1399,2			
	1200,6-899,7			
Gramverhalten	3001-2799	Erste Ableitung	Standard	Single Linkage
	1500,5-1399,2			
	1200,6-899,7			
Spezies	3001-2799,4	Erste Ableitung mit Vektor Normalisierung	Standard	Wards Algorithmus
	1350,119,0			
	900,7-699,1			

Die Isolate wurden mit dem Bruker IFS 28/B Spektroskop gemessen und die Clusteranalysen der FTIR-Spektren wurden mit der Software OPUS IDENT (Bruker Optics) durchgeführt. Die Datenbank wurde mit durch PCR identifizierten Reinkulturen sowie mit Stämmen der DSMZ aufgebaut. Alle Isolate und Reinkulturstämme wurden vierfach gemessen und in die Datenbank eingepflegt.

2.6.5 Molekularbiologische Charakterisierung der Mikroorganismen

Kultivierungsabhängige Charakterisierung: Nach den physiologischen Tests und der chemischen Charakterisierung wurden die Isolate mittels 16S-rRNA Gen-Analyse identifiziert. Die 16S-rRNA Gene wurde mittels PCR vervielfacht und das PCR-Produkt nach Aufreinigung sequenziert (Primer M13 F und M13 R, Fa. MWG). Die Sequenzen wurden in das Softwareprogramm MEGA importiert, aligned und einer Ähnlichkeitsberechnung unterzogen.

Kultivierungsunabhängige Charakterisierung: Um vor allem die nicht kultivierbaren Mikroorganismen in der AEDS-Lösung bestimmen zu können, wurde die Identifizierung mit ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis) durchgeführt. Mit der ARDRA-Analyse können kultivierbare und nicht kultivierbare Bakterien auf DNA-Ebene identifiziert werden. Die gesamte DNA der AEDS wird extrahiert und in anderen Mikroorganismen exprimiert (Klone). Die Klone werden vereinzelt und einem Restriktionsverdau unterzogen. Dabei wird das

sogenannte Amplikon, die Ziel-DNA im Klon, mit verschiedenen Enzymen verdaut. Die Kombination der Restriktionsmuster ergibt ein Profil, dass eine Eingruppierung in OTUs (Operational Taxonomic Units) mit ähnlichen oder gleichen Klonen, zulässt. Aus den OTUs werden je ein oder zwei Klone voll sequenziert (16S-rRNA Gene) und identifiziert.

Für die AEDS-Analyse zum Zeitpunkt der höchsten Phosphorakkumulation wurde die DNA im Doppelansatz aus der Bakterienlösung extrahiert. Die Klonierung erfolgte mit Promega pGEM-T Vector Systems nach Protokoll. Zur Herstellung der Klon-Masterplatte wurden nur Klone verwendet, die auf Nährmedium eine weiße Kolonie bilden. Blaue Kolonien weisen darauf hin, dass das Insert nicht eingebaut wurde (β -Galactosidase-System). Es wurden insgesamt 108 Klone aus der AEDS-Lösung gewonnen. Die Klonierung wurde mittels PCR mit M13-Primern kontrolliert. Nach der Kontrolle wurden 78 Klone weiter analysiert. Die Klone wurden zweimal einem Restriktionsverdau mit ARDRA unterzogen (HinPI-Restriktionsenzym und HPA II-Restriktionsenzym). Den Restriktionsmustern konnten 36 OTUs zugeordnet werden. Aus den OTUs wurde jeweils ein Klon ausgewählt, dessen 16S-RNA-Gene voll sequenziert wurden (Primer M13 F und M13 R). Die Sequenzen wurden in das Softwareprogramm MEGA importiert, aligned und einer Ähnlichkeitsberechnung unterzogen.

2.7 Ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe

Neben der chemischen Charakterisierung wurde der Einfluss der Metallfreisetzung auf die Ökotoxizität der Feststoffe untersucht. Die ökotoxikologischen Untersuchungen wurden mit der Klärschlammasche (KA Bonn) und Boden aus Stolberg durchgeführt.

2.7.1 Herstellung der Testlösung

Zum Einsatz in die ökotoxikologischen Testsysteme wurden wässrige Eluate der Feststoffe vor und nach dem Bioleaching gewonnen. Es handelt sich um 100 g/l Eluate nach DIN EN 12457-4. Hierzu wurden im Verhältnis Feststoff:Wasser 1:10 30 g Feststoff mit 300 ml Millipore-Wasser versetzt und für 24 Stunden bei 10 U/Min auf dem Überkopfschüttler (GFL Überkopfschüttler, Burgwedel) geschüttelt. Nach Absetzen des Feststoffs wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand in die Testsysteme eingesetzt. Die Eluate wurden vor und nach dem Bioleaching gewonnen und in Form einer dualen Verdünnungsreihe in die Testsysteme eingesetzt. Die Ökotoxizität wurde für alle Test in Form des LID 20-Werts ausgegeben (*Lowest Ineffective Dilution*). Der LID 20-Wert gibt die erste duale höchstkonzentrierte Verdünnungsstufe an, bei der keine Hemmung bzw. eine Hemmung kleiner 20% auftritt. Der LID-Wert erlaubt einen Vergleich und eine ganzheitliche Bewertung der ökotoxikologischen Tests.

2.7.2 Algenwachstumstest mit *Desmodesmus subspicatus*

Der Algentest mit *Desmodesmus subspicatus* CHODAT wurde nach DIN L33 und ISO 8692 (2004) durchgeführt. Hierbei werden die Algen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Eluate versetzt und die *In vivo*-Chlorophyll-Fluoreszenz über einen Zeitraum von zweiund-siebzig Stunden in vierundzwanzig Stunden Intervallen bestimmt. Die Algen befinden sich bei Einsatz in den Test in der exponentiellen Wachstumsphase. Eine Hemmung des Wachstums durch die zu testende Probe kann anhand der Chlorophyll-Fluoreszenz der lebenden Algen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 440 nm bestimmt werden. Die Chlorophyll-Fluoreszenz steht im direkten Verhältnis mit der sich entwickelnde Algenbiomasse während der exponentiellen Wachstumsphase. Die Inkubation der Algen und die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz wurden im Infors MULTITRONTM Inkubator durchgeführt.

2.7.3 Daphnien- Immobilisationstest

In diesem Test wurde die Konzentration bestimmt, bei der innerhalb von vierundzwanzig Stunden 50% der eingesetzten Daphnien immobilisiert werden. Die Testbedingungen entsprechen der ISO 6341 (1996). Es wurden Süßwasserkrebse der Art *Daphnia Magna* STRAUS eingesetzt, die aus einer 3-4 Wochen alten Zucht stammen. Pro Verdünnung wurden 4 Parallelen mit jeweils 5 Tieren verwendet. Die Tiere wurden im Dunkeln bei 20 °C im Brutschrank inkubiert. Nach vierundzwanzig Stunden wurde die Anzahl der immobilisierten Daphnien bestimmt.

2.7.4 Lumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri*

Hier wurde die Hemmung der Lichtemission des Bakteriums *Vibrio fischeri* DSM 7151 nach einer Expositionsdauer von 30 min. ermittelt. Die Messung wurde nach ISO 11348-1 (1998) mit dem Biolumineszenzgerät LUMISTox (Dr. Lange GmbH Berlin, Düsseldorf) durchgeführt.

2.7.5 Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* und *Vibrio fischeri*

Die Wachstumshemmung wird über die optische Dichte erhoben. Die Tests wurden nach DIN 38412 L37 (1999) für *Vibrio fischeri* und DIN 38412 Teil 8 (1991) für *Pseudomonas putida* durchgeführt. Abweichend von der Norm wurden für die Tests Mikrotiterplatten (PS-Microplate, 96-Well, Greiner GmbH, Solingen) genutzt.

2.7.6 umu-Genotoxizitätstest

Die genotoxische Wirkung einer Substanz kann mit dem umu-Test gemäß ISO 13829 (2000) untersucht werden. Dabei wird die genotoxische Wirkung auf *Salmonella choleraesius subsp. choleraesius* TA 1535/pSK1002 bestimmt. Beim umu-Test erfolgt die Detektion des genotoxischen Potentials durch die photometrische Messung des Umsatzes von ONPG durch β -Galaktosidase. Dieses Enzym wird durch das lacZ-Gen codiert und ist mit dem Reparatur-

gen umuC auf einem Plasmid fusioniert worden. Der Vektor pMC 1403 trägt das Fusionsprodukt umuC lacZ, das unter der Kontrolle eines umu-Operons steht. Die Ergebnisse der Tests können nicht ohne weiteres auf Eukaryonten übertragen werden, da den Bakterien das metabolisierende Enzym fehlt. Daher werden dem Test Enzyme der Rattenleber zugesetzt (S9-Mix), mit denen die metabolische Aktivierung durchgeführt werden kann.

3 Ergebnisse

In Abbildung 2.7.1 ist die Struktur dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt. Durch Einsatz des Bioleachings mit verschiedenen metallbelasteten Feststoffen unter standardisierten Bedingungen und einem Perkolatorsystem im Labormaßstab, konnte eine Aussage über die Grenzen und Möglichkeiten dieser Technologie gemacht werden.

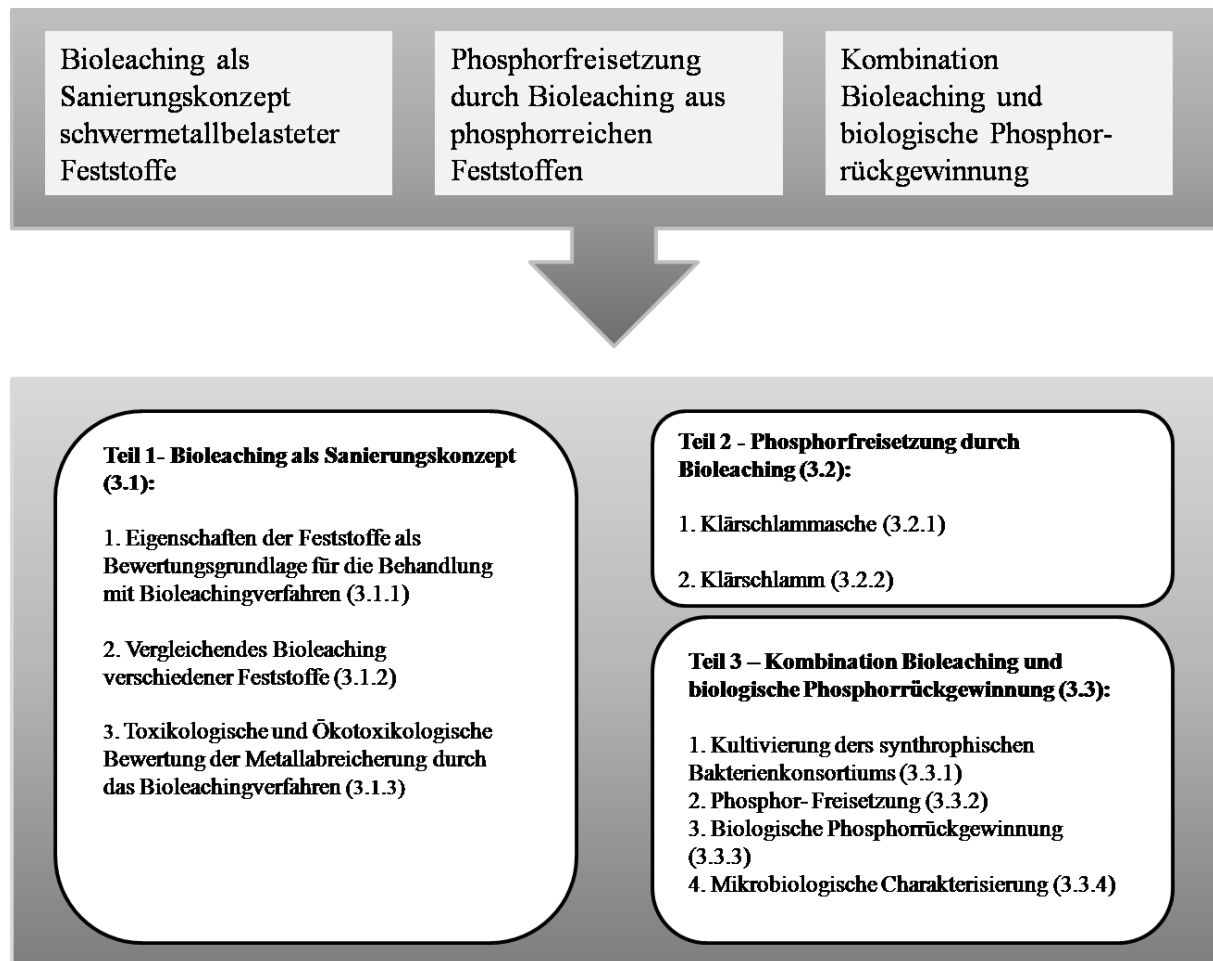


Abbildung 2.7.1: Übersicht über die untersuchten Aspekte zum Bioleaching und zur biologisch induzierten Phosphatakkumulation mit den Verweisen auf die Kapitel im Ergebnisteil

Die Metallanreicherung der verschiedenen Proben wurde miteinander verglichen. Die Entstehung und Stabilität toxischer Metallspezies (Chrom (VI)) während des Bioleachingprozesses wurde analysiert. Am Beispiel von Klärschlammasche und schwermetallbelastetem Boden wurden etablierte ökotoxikologische Tests vor und nach Bioleaching durchgeführt und bewertet. Neben der Freisetzung der Metalle durch Bioleaching wurde die Freisetzung von Phosphor durch Bioleaching untersucht. Hierzu wurden die phosphorreichen Feststoffe Klärschlammasche und Klärschlamm eingesetzt.

Für die Phosphorrückgewinnung mit einer Kombination aus Bioleachingorganismen und phosphoreliminierenden Bakterien wurde ein syntrophisches Bakterienkonsortium angereichert, mikrobiologisch charakterisiert und identifiziert.

3.1 Bioleaching zur Metallabreicherung aus Feststoffen

3.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Feststoffe

Vor dem Einsatz der verschiedenen Materialien in den Bioleachingperkolator wurden deren Eigenschaften untersucht. Um das Verhalten der Feststoffe in wässriger Lösung zu ermitteln wurden die Feststoffe eluiert, pH-Wert, Säurekapazität und Leitfähigkeit der Eluate bestimmt. Besonderes Augenmerk lag auf der Säurekapazität der Feststoffe in wässriger Lösung, die als Maß für die Pufferkapazität des Feststoffs gilt. Eine hohe Säurekapazität und der dadurch bedingten Änderung des pH-Werts im Bioleachingmedium kann die Bakterienaktivität beeinträchtigen und eine zufriedenstellende Freisetzung der Schwermetalle verhindern (Du et al. 1995). Da die Bakterienkultur für das Bioleaching der verschiedenen Feststoffe mit dem gleichen pH-Wert (pH 2) eingesetzt wurde, musste ausgeschlossen werden, dass es durch eine hohe Pufferkapazität des Feststoffs zu einer starken Verschiebung in den alkalischen pH-Bereich kommt.

In Tabelle 3.1.1 sind die Eigenschaften der einzelnen Proben dargestellt.

Tabelle 3.1.1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Feststoffeluat

Feststoff	pH im Eluat (100 g/l)	Säurekapazität [mmol/l]	Leitfähigkeit [mS/cm]
Klärschlammasche (KAA)	10,5	1,3	1,0
Zyklonfilterasche (ZF)	12,5	83,8	20,9
Brennraumasche (BR)	12,6	89,5	17,2
Rostofenasche (RO)	12,6	82,0	52,7
Elektroofenasche (EOS)	10,7	11,4	0,5
Ausgefaulter Schlamm (AS)	6,8	36,3	3,2
Boden (BO)	7,8	15,3	2,3
Deponiematerial (SIT)	8,9	0,9	0,3

Die pH-Werte der einzelnen Feststoffeluat schwanken von 6,8 – 12,6. Klärschlammasche (KAA), Boden (BO), Elektroofenschlacke (EOS) und Deponiematerial (SIT) weisen pH-Werte im leicht alkalischen auf. Die industriellen Verbrennungsaschen zeigen deutlich alkalischere pH-Werte. Die Säurekapazität der Eluate ist für die industriellen Verbrennungsaschen höher, als für die anderen Proben. Für die Aschen lag sie bei 82- 89 mmol/l, die anderen Feststoffe weisen eine Säurekapazität von 0,9-36 mmol/l auf. Die Leitfähigkeit in den Eluaten der industriellen Verbrennungsaschen lag auch hier über der Leitfähigkeit der anderen Proben. Die

hohe Pufferkapazität der industriellen Verbrennungsaschen machte es notwendig sie in einem zweistufigen Bioleachingprozess abzureichern.

Der Metallgehalt der Feststoffe wurde bestimmt, um die Art und Höhe der Kontamination festzustellen (Tabelle 3.1.2).

Tabelle 3.1.2: Schwermetallgehalt der Feststoffe [mg/kg TM]

Analyt	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT
As	34,7	19,6	10,0	25,2	36,4	17,4	724,0	4,4
Cd	-	-	13,7	0,1	93,5	-	10,7	0,3
Co	20,9	9,0	7,3	10,7	542,9	5,6	13,5	17,4
Cr	253,0	92,1	35,3	110,3	48,7	4722,6	21,1	281,2
Cu	638,7	291,2	95,1	120,0	65137,0	120,9	218,3	37,2
Mn	10823,2	2258,2	20934,0	32991,4	19398,8	45989,0	351,4	1408,7
Mo	22,4	8,3	3,1	4,1	9,3	70,9	1,3	10,2
Ni	64,3	*	*	*	*	*	88,9	*
Pb	235,0	171,7	29,3	1,3	431,0	4,5	1858,7	2,3
V	51,3	31,3	29,1	31,2	25,1	935,5	29,4	172,4
Zn	3866,1	1420,0	876,6	38,1	13434,2	198,6	476,6	180,3

Fett: Deponierung - : unterhalb der Bestimmungsgrenze; *: nicht gemessen

Die Metallgehalte in den Verbrennungsaschen und in den natürlichen Proben unterscheiden sich stark voneinander. Die Gesamtbelastung der Schwermetalle in Faulschlamm (AS), Zyklonfilterasche (ZF) und Brennraumasche (BR) ist gegeben, es gibt jedoch keine Konzentrationsspitze für ein bestimmtes Metall.

Die Klärschlammasche (KAA) und Rostofenasche (RO) enthalten so hohe Konzentrationen an Kupfer, Zink und Blei, dass eine unbedenkliche Wiederverwertung der Feststoffe nicht möglich ist. Die Elektroofenschlacke (EOS) und das Deponiesediments (SIT) haben Chrombelastungen, die eine Deponierung der Aschen vorschreibt. Der Boden aus der Bleiverhüttung (BO) weist sehr hohe Arsen- und Bleiwerte auf. Die Rostofenasche (RO) zeichnet sich durch eine Belastung mit toxischen Metallen (Cd, Co, Cu, Pb, Zn) aus. Die Konzentrationsspitzen einzelner Metalle in den Proben bieten die Möglichkeit, die Metallabreicherung für eine große Bandbreite an möglichen Metallkontaminationen anzuwenden.

Die Laugung der unterschiedlichen Feststoffe unter denselben Randbedingungen (Temperatur, Initial-pH-Wert, Zeit, Kulturbedingungen der Bakterienlösung, Volumen der Bakterienlösung, Feststoffeinsatz [g]) in den Bioleachingperkolator diente der direkten Vergleichbarkeit

des Verhaltens verschiedener Matrices während des Leachingprozesses und erlaubte Aussagen über die Dekontamination von Feststoffen mit Bioleaching.

3.1.2 Vergleichendes Bioleaching metallbelasteter Feststoffe

Zunächst wurden alle Feststoffe einem einstufigen Bioleaching unterzogen. Als Entscheidungskriterien für den Einsatz in einem zweistufigen Bioleachingverfahren dienten die Metallfreisetzungsraten aus dem ersten Verfahren, die Höhe und Art der Metallgehalte sowie die Säurekapazität der Feststoffe und dem pH-Wert im Bakterienmedium.

3.1.2.1 Metallfreisetzung im einstufigen Bioleachingprozess

In der ersten Untersuchung wurden alle Proben in einem einstufigen Prozess behandelt. Hierbei wird einmalig die Bakterienlösung (pH 2.0) in den Perkolator gegeben und kontinuierlich über einen Zeitraum von 8 Tagen über den Feststoff perkoliert. In dieser Zeit kommt es zur Ausbildung eines Biofilms auf und um die Feststoffpartikel. Die Ausbildung des Biofilms ist neben der Sulfatproduktion, dem Stoffwechselprodukt der Bakterien, ein wichtiger Marker für einen optimalen Bioleachingprozess.

In Tabelle 3.1.3 ist die Freisetzung der Metalle aus den Feststoffen zusammengestellt.

Tabelle 3.1.3: Metallfreisetzung [%] aus den Feststoffen im einstufigen Bioleachingprozess

Analyt	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT
Metallfreisetzung [%]								
As	100	98,3	25,5	15,5	55,5	52,6	54,5	1,7
Cd	-	-	87,8	0,0	38,00	-	12,1	-
Co	3	36,0	70,9	73,0	0,0	52,3	23,9	30,5
Cr	44,1	39,9	0,0	0,0	0,0	39,5	20,6	25,6
Cu	32,0	87,6	59,3	0,7	0,0	15,8	27,3	5,3
Mn	80,6	95,1	51,6	41,5	44,9	35,1	26,0	41,3
Mo	50	31,2	2,0	56,3	9,8	29,5	21,3	3,9
Ni	0,0	*	0,0	0,0	0,0	*	24,8	*
Pb	0,0	74,5	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	3,1
V	35,8	28,2	15,5	13,9	0,0	0,0	19,9	*
Zn	25	89,7	12,7	0,0	10,4	0,0	0,0	67,2
pH _{Ende}	1,6-2,1	2,2	3,27	5,72	5,38	2,62	2,5	2,10

*: nicht bestimmt, -: unterhalb der Bestimmungsgrenze

Je nach Matrix des Feststoffes werden die Metalle besser oder schlechter gelöst. Die Reduzierung der Metallbelastung im Faulschlamm kann erfolgreich durchgeführt werden. Für die

Gesamtheit der Metalle kann in dem einstufigen Bioleachingprozess eine Abreicherung über 20 % erreicht werden. Besonders gut werden Zink (89%), Kupfer (87%) und Arsen (98%) freigesetzt.

Aus der Klärschlammasche können mit Ausnahme von Blei alle Metalle gelaugt werden. Die Belastung mit Kupfer und Zink kann um 30% gesenkt werden. Die Klärschlammasche zeigt, wie alle thermisch behandelten Feststoffe (Zyklonfilter-, Brennraum-, Rostofenasche, Elektroofenschlacke) eine schlechte Laugbarkeit von Blei. Der thermische Behandlungsschritt kann zur Bildung nicht-laugbarer Bleiverbindungen führen.

Durch die hohe Säurekapazität der Feststoffe in wässriger Lösung, ist die Laugbarkeit der industriellen Verbrennungsaschen (ZF, BR und RO) verringert. Besonders die Rostofenasche, als hoch kontaminierter Feststoff, wird kaum von toxischen Metallen abgereichert. Die Pufferkapazität und der pH-Wert in der Bioleachinglösung der industriellen Verbrennungsaschen ist höher als bei den anderen eingesetzten Feststoffen. Der hohe pH-Wert in der Lösung hemmt das Wachstum der acidophilen Mikroorganismen (Kumar und Nagendran, 2007), was sich deutlich an der Stagnation der Sulfatproduktion zeigt (Abbildung 3.1.1). Eine erhöhte Metallfreisetzung aus den industriellen Verbrennungsaschen ist nur mit einem zweistufigen Bioleachingverfahren möglich.

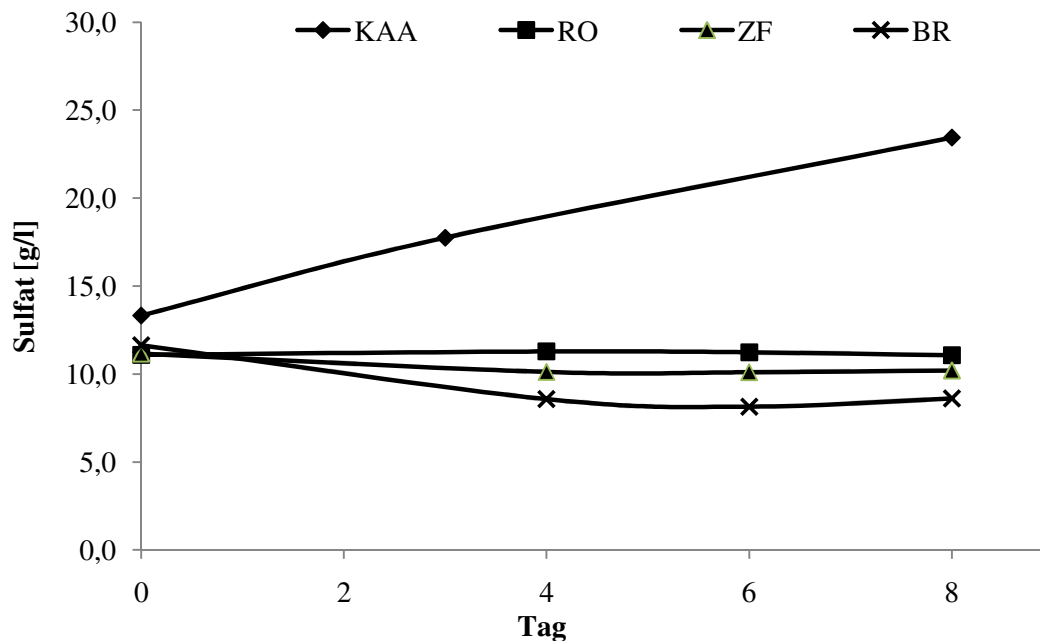


Abbildung 3.1.1: Sulfatproduktion der Mikroorganismen während des Bioleachingprozesses [g/l]. KAA: Klärschlammasche, RO: Rostofenasche, ZF: Zyklonfilterasche, BR: Brennraumasche

Obwohl der pH-Wert der Lösung am Ende der Behandlung niedrig ist und auch der Sulfatgehalt ansteigt, scheinen die Bindungsverhältnisse der Metalle im Material der Deponierung in Sittard ungünstig für die Bioleachingbakterien zu sein.

Aus der Elektroofenschlacke lassen sich As zu 52%, Co zu 50% und Cr zu 40% laugen, während Zn, Cu und V nur in geringem Maße oder gar nicht freigesetzt werden.

3.1.2.2 *Metallfreisetzung im zweistufigen Bioleachingprozess*

Die Metallfreisetzung aus gepufferten Feststoffen steigt mit dem zweistufigen Bioleachingverfahren um durchschnittlich 20% gegenüber dem einstufigen Prozess (Tabelle 3.1.4)

In der ersten Stufe werden dabei vornehmlich die säurelöslichen Metalle durch die von den Bakterien produzierte Schwefelsäure gelöst (Tag 1-4). Nach dem Abtrennen der ersten Bakterienlösung, werden in der zweiten Stufe (Tag 5-8) die säureunlöslichen Metalle durch die Aktivität der Bioleachingbakterien (Thiosulfatmechanismus) freigesetzt. Die Freisetzungsraten der Metalle steigen deutlich an, so dass für Zyklonfilterasche und die Brennraumasche eine ausreichende Abreicherung von Metallen stattfindet. Blei verbleibt jedoch auch im zweistufigen Bioleaching in den Industrieaschen. Aus der hochbelasteten Rostofenasche können die toxischen Metalle Cd, Co, Cu und Zn gut in Lösung gebracht werden.

Tabelle 3.1.4: Metallfreisetzung [%] aus den Verbrennungsaschen nach zweistufigem Bioleaching

Analyt	KAA	ZF	BR	RO
As	84,22	59	7,4	65
Cd	-	100	39,8	100
Co	40	92	78,5	91
Cr	51,38	33	17,3	56,1
Cu	57	100	88,5	100
Mn	75,7	66,0	40,2	65,8
Mo	46,1	15,8	39,6	50
Pb	18,7	0,0	0,7	6,9
V	40	48,5	32,9	26,3
Zn	43,3	82,5	66,2	98,0
pH _{Ende}	2,14	2,10	2,36	2,11

-: Unterhalb der Nachweisgrenze

Der Einfluss des pH-Werts auf die Bakterienaktivität lässt sich im zweistufigen Bioleachingprozess anhand der Sulfatproduktion der Mikroorganismen abschätzen (Abbildung 3.1.2.). In der ersten Bioleachingstufe wird ein Großteil der puffernden Substanzen (vornehmlich Carbonate) aus den Aschen gelöst, so dass die Säurekapazität der Feststoffeluate in der zweiten Bioleachingstufe soweit herabgesetzt wird, dass günstige Bedingungen für die Mikroorganismen vorliegen.

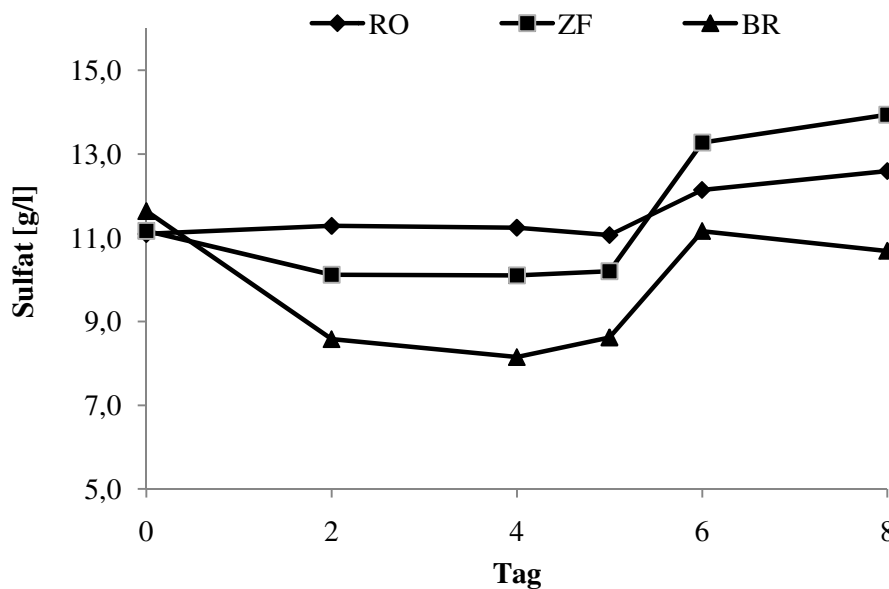


Abbildung 3.1.2: Sulfatproduktion der Mikroorganismen im zweistufigen Bioleachingprozess. In der zweiten Stufe (Tag 5) steigt die Sulfatproduktion der Bakterien an.

Durch die sequentielle Anwendung des Bioleachingprozesses können somit auch Feststoffe mit einer hohen Pufferkapazität in der Bioleachinglösung erfolgreich einer Bioleachingbehandlung unterzogen werden. Für moderat belastete Feststoffe (hier Klärschlammasche) kann durch die zweistufige Behandlung eine Verbesserung der Metallaugung erzielt werden.

3.1.3 Einordnung der behandelten Feststoffe nach LAGA Richtlinie

Eine weitere Bewertung des Bioleachings erfolgt nach den technischen Regeln der LAGA (Länder Arbeitsgemeinschaft Abfall, LAGA Mitteilung 20, 2003). In der Richtlinie werden Kraftwerksabfälle, mineralische Abfälle, Bodenmaterial, sowie Schlacken und Aschen nach ihrem Schadstoffgehalt in bestimmte Verwertungsstufen eingruppiert, die einen Einsatz der Materialien als Baumaterial erlauben (Abbildung 3.1.3).



Abbildung 3.1.3: Darstellung der Einbauklassen nach LAGA-Richtlinie (1997)

Um die Dekontamination der Feststoffe mit Bioleaching zu bewerten werden die Metallkonzentrationen im Feststoff vor (Tabelle 3.1.5) und nach Bioleaching (Tabelle 3.1.6) miteinander verglichen und anhand der Grenzwerte der LAGA Richtlinien den möglichen Einbauklassen zugeordnet. Nach der Bioleachingbehandlung können die Feststoffe teilweise in eine bessere Einbauklasse eingruppiert werden.

Vor dem Leaching werden, bis auf die Brennraumasche, alle Feststoffe so eingestuft, dass sie nur einer Deponierung zugeführt werden können. Die Brennraumasche lässt sich nach LAGA Z2 für einen eingeschränkten Einbau mit Sicherheitsmaßnahmen nutzen. Nach dem Bioleaching können der Klärschlamm, die Brennraumasche, die Zyklonfilterasche und der Boden der Deponierung Sittard nach LAGA Z1.2 genutzt werden. Die Klärschlammasche, die beiden anderen Verbrennungaschen sowie die Elektroofenschlacke können weiterhin nur einer Deponierung zugeführt werden. Der gewählte Bioleachingzeitraum von 8 Tagen ist für eine Sanierung dieser Feststoffe nicht ausreichend, jedoch zeigt sich schon nach 8 Tagen eine deutliche Verringerung der Metallkonzentrationen in den Feststoffen (Abreicherung in Klärschlammasche 43 % Zn, Elektroofenschlacke 40% Cr, Altlastenboden 54% As).

Tabelle 3.1.5: Einstufung der Feststoffe nach LAGA Richtlinie 20 vor Bioleaching. Rot: Überschreiten LAGA Z2

Analyt [mg/kg]	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT	LAGA Z1.1	LAGA Z1.2	LAGA Z2
As	34,7	19,6	10,0	25,2	36,4	17,4	724,0	4,4	20	30	50
Cd	-	-	13,7	0,1	93,5	-	10,7	0,3	0,6	1	3
Co	20,9	9,01	7,3	10,7	542,9	5,6	13,5	17,4			
Cr	253	92,1	35,3	110,3	48,7	4722,6	21,1	281,2	50	100	200
Cu	638,6	291,2	95,1	120,0	65137	120,9	218,3	37,2	40	100	200
Mn	10823	2258,2	20934	32991	19398	45989	351,4	1408,7			
Mo	22,4	8,3	3,1	4,1	9,3	70,9	1,3	10,2			
Ni	64,3	*	*	*	*	*	88,9	*	40	100	200
Pb	235	171,7	29,3	1,3	431,0	4,5	1858,6	2,3	100	200	300
V	51,3	31,3	29,1	31,2	25,1	935,5	29,4	172,2			
Zn	3866	1420	876,6	38,1	13434	198,6	476,6	180,0	120	300	500
Einstufung	>Z2	>Z2	>Z2	Z2	>Z2	>Z2	>Z2	>Z2			

* Nicht gemessen, - unterhalb der Bestimmungsgrenze

Tabelle 3.1.6: Einstufung der Feststoffe nach LAGA Richtlinie 20 nach Bioleaching. Rot: Überschreitungen nach LAGA Z2

Analyt [mg/kg]	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT	LAGA Z1.1	LAGA Z1.2	LAGA Z2
As	1,8	0,2	7,7	23,3	12,5	8,2	329,5	5,6	20	30	50
Cd	-	-	0,0	0,0	0,0	-	9,4	0	0,6	1	3
Co	13,4	5,8	0,6	2,3	0,5	2,7	10,31	12,8			
Cr	96,3	55,4	23,5	91,2	20,3	2858,3	16,8	205,9	50	100	200
Cu	312,6	26,2	0,0	13,8	0,0	101,8	158,8	40,9	40	100	200
Mn	75,7	109,9	0,0	0,0	0,0	29826	260,2	1208,9			
Mo	12,0	5,7	2,6	2,5	4,6	50	1,0	12,9			
Ni	*	*	*	*	*	5,2	66,9	*	40	100	200
Pb	184,7	43,8	29,3	1,3	401,0	1027,7	1161,4	2,3	100	200	300
V	20,3	*	19,5	21,0	18,5	6,6	23,6	-			
Zn	2193,1	145,6	153,4	12,9	270,0	209,3	493,6	60,9	120	300	500
Einstufung	>Z2	Z1.2	Z1.2	Z1.2	>Z2	>Z2	>Z2	Z2			

* Nicht gemessen, - unterhalb der Bestimmungsgrenze

3.1.4 Toxikologische und Ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe

Neben der Metallanreicherung und der Einordnung nach LAGA wurde die Entstehung toxischer Metallspezies während des Bioleaching sowie die Ökotoxizität der Feststoffe vor und nach Bioleaching untersucht. Die wässrigen Eluate der Feststoffe vor und nach Bioleaching wurden nach LAWA toxikologisch bewertet.

3.1.4.1 Chrom (VI) in der Bioleachinglösung

Der Bioleachingprozess ändert durch die Oxidation von Schwefelverbindungen die Redoxverhältnisse in der Bioleachinglösung und kann die Entstehung toxischer Metallspezies begünstigen. Eine besonders toxische Metallspezies stellt hexavalentes Chrom dar. Daher wurde in dieser Untersuchung das Auftreten von Chrom(VI) sowie seine Stabilität während des Bioleachingprozesses verfolgt.

In Abbildung 3.1.4 ist zu erkennen, dass es während des Bioleachingprozesses intermediär zur Bildung von Chrom (VI) kommt. Nach 30 Minuten Leaching hat die Chromkonzentration 50% des Chrom-Endgehalts (0,7 mg/l nach 5 Tagen) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt kann Chrom(VI) in der Lösung detektiert werden, 33% des Gesamt-Chroms liegen zu diesem Zeitpunkt als Cr(VI) in der Bioleachinglösung vor.

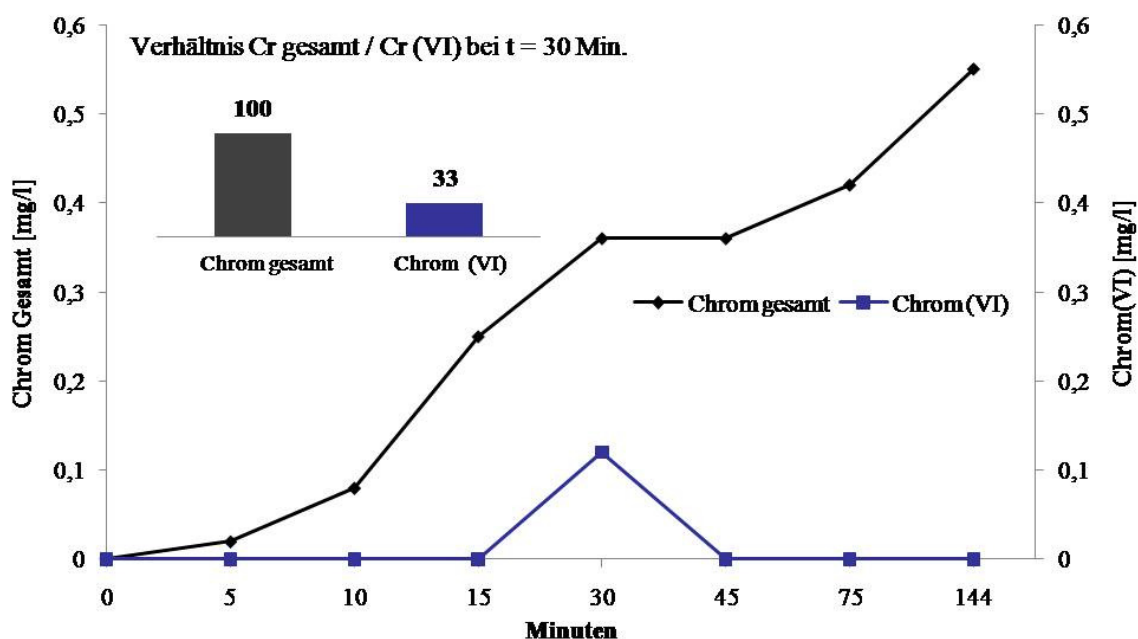


Abbildung 3.1.4: Kinetik der Chrom (VI) und Chrom_{gesamt} – Freisetzung aus Klärschlammmasche während des Bioleachings. Nach 30 Minuten kann Chrom(VI) detektiert werden. Nach 45 Minuten ist es zu Chrom(III) reduziert worden (n=2). Oben Rechts: Verhältnis Chrom_{gesamt}/Chrom (VI) bei t= 30 Min.

Nach weiteren 15 Minuten kann kein Chrom(VI) in der Umgebungslösung gemessen werden. Das gesamte Chrom(VI) ist zu Chrom(III) reduziert worden. Durch die schnelle Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III) verliert die Lösung einiges an toxischem Potential.

3.1.4.2 Eluate für die toxikologische und ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe

Die Wirkungsweise und Bewertung der verschiedenen Tests ist in Tabelle 3.1.7 zusammengefasst. Die Bewertung verläuft über den LID-Wert nach der Empfehlung der DECHEMA für den Pfad Boden-Grundwasser (Römbke et al. 2006). Der LID-Wert stellt die Verdünnung einer dualen Verdünnungsreihe dar, bei der ein Effekt auftritt. Tritt bei hohen LID-Werten eine Hemmung auf, hat die Probe ein großes toxikologisches Potential.

Tabelle 3.1.7: Eingesetzte ökotoxikologische Testverfahren

Testsystem	Toxizitätsschwelle	Toxikologische Wirkung
Algentest	LID > 4	Akut
Daphnientest	LID > 4	Chronische
Lumineszenzhemmtest	LID > 8	Akut
Wachstumstest mit	LID > 2	Chronisch
Umu-Genotoxizitätstest	Ja/Nein	Genotoxisch

Vor dem Bioleaching lassen sich aus beiden Feststoffen Metalle mit Wasser eluieren. Aus der Asche werden insgesamt mehr Metalle freigesetzt als aus dem Boden. Die toxischen Metalle Arsen, Nickel und Kupfer können im Wassereluat der Asche gemessen werden (Tabelle 3.1.8).

Tabelle 3.1.8: Metallgehalte im 100 g/l Eluat der Klärschlammasche vor und nach Bioleaching [mg/l]

Analyt	Asche vor Leaching	Asche nach Leaching	LAWA-Maßnahmen schwellwerte
As	1,76	1,32	0,02-0,06
Cd	-	-	0,01-0,02
Co	0,01	0,01	0,1-0,25
Cr	-	-	0,1-0,25
Cu	0,45	0,34	0,1-0,25
Fe	3,32	2,49	
Mn	10,85	8,14	
Mo	0,01	0,01	0,1-0,25
Ni	0,11	0,08	0,1-0,25
Pb	-	-	
V	0,09	-	
Zn	-	0,84	2,0
ΣMetalle*	33,19	13,22	
pH-Wert	10,58	4,6	
Leitfähigkeit [µS]	1609	2750	

* incl. Ca, Mg, Al - : unterhalb der Nachweisgrenze, Fett: Überschreitung der Grenzwerte nach LAWA

Die Leitfähigkeit der Asche ist etwas niedriger als die des Bodens, der pH-Wert ist in der Asche jedoch deutlich höher.

Nach dem Bioleaching finden sich erwartungsgemäß 60 % weniger Metalle im Ascheeluat als vorher. Die Mobilität bei Wasserelution von Arsen, Cobalt, Kupfer, Nickel und Vanadium im Feststoff kann durch das Bioleaching verringert werden. Lediglich Zink zeigt eine erhöhte Mobilität im Feststoff nach dem Bioleaching. Zink spricht auf die Bioleachingbehandlung stets sehr gut an, da es gut säurelöslich ist. Durch Bioleaching können 25-40% Zink aus der Asche freigesetzt werden, dies führt jedoch auch zu einer erhöhten Mobilisierung von Zink bei einer erneuten Wasserelution und könnte somit für den Austragungspfad Feststoff-Grundwasser verfügbar gemacht werden. Wie erwartet kann kein Blei im Eluat nachgewiesen werden, weder vor noch nach dem Bioleaching.

Bei der Einordnung der Metallgehalte im Eluat vor und nach Bioleaching nach der LAWA-Richtlinie (Länderarbeitsgemeinschaft Wasser, LAWA 2004) zeigt sich eine Verbesserung für

Nickel, Kupfer und Arsen werden weiterhin aus der Asche gelaugt. Dennoch wird die Eluierbarkeit von Arsen und Kupfer bereits nach 8 Tagen Bioleachingbehandlung gesenkt. Somit ist Bioleaching auch im Bezug auf eine Festlegung von Metallen im Feststoff unter Erfüllung der gesetzlichen Vorgaben erfolgversprechend.

Im Bodeneluat vor dem Bioleaching können deutlich weniger Metalle gemessen werden, als in der Asche (Tabelle 3.1.9).

Tabelle 3.1.9: Metallgehalte im 100 g/l Eluat des Bodens (Stolberg) vor und nach Bioleaching [mg/l]

Analyt	Boden vor Leaching	Boden nach Leaching	LAWA-Maßnahmen schwellwerte
As	-	-	0,02-0,06
Cd	-	-	0,01-0,02
Co	-	-	0,1-0,25
Cr	-	-	0,1-0,25
Cu	0,01	0,03	0,1-0,25
Fe	2,14	2,50	
Mn	0,00	0,23	
Mo	0,04	0,02	0,1-0,25
Ni	0,01	0,02	0,1-0,25
Pb	-	-	
V	-	0,01	
Zn	0,02	-	2,0
Σ*Metalle	2,22	2,80	
pH-Wert	7.82	6.3	
Leitfähigkeit [μS]	2250	2189	

*incl. Ca, Mg, Al. -: unterhalb der Nachweisgrenze

Die hohe Leitfähigkeit im Bodeneluat rührt wahrscheinlich von gelösten Erdalkalimetallen und Anionen her, die durch die Wasserelution freigesetzt werden. Interessanterweise wird weder Arsen noch Blei aus dem Boden gelaugt, obwohl der Boden sehr hohe Konzentrationen an Arsen (723 mg/kg) und Blei (1858 mg/kg) aufweist. Im Bodeneluat nach Bioleaching finden sich mehr gelöste Metalle als vor dem Bioleaching, denn Fe, Cu, Zn und Ni lassen sich auch nach Bioleaching im Wassereluat nachweisen. Durch den Bioleachingprozess wird die Mobilität der Metalle im Bodengefüge leicht erhöht. Hoch konzentriertes Blei und Arsen verbleiben auch nach dem Bioleaching festgelegt im Boden und können im Eluat nach Bioleaching nicht gemessen werden, obgleich es zu einer Freisetzung von Arsen und Blei in die Bioleachinglösung kommt. Somit hat das Bioleaching eine Metalllösung für die Hauptkontaminanten erzeugt, sie jedoch nicht nachträglich im Feststoff für den Austragungs-pfad Boden-Grundwasser verfügbar gemacht. Die eluierten Metalle erreichen nicht den ge-

gesetzlichen Maßnahmenschwellwert nach LAWA, so dass der Boden als unbedenklich eingestuft werden kann.

Die ökotoxikologischen Tests mit dem wässrigen Eluat von Asche und Boden vor dem Bioleaching zeigen unterschiedliche Ergebnisse für die Feststoffe. In den Tests zeigt sich eine erhöhte chronische Toxizität für die Asche (Abbildung 3.1.5), für den Boden eine akut toxische (Abbildung 3.1.6).

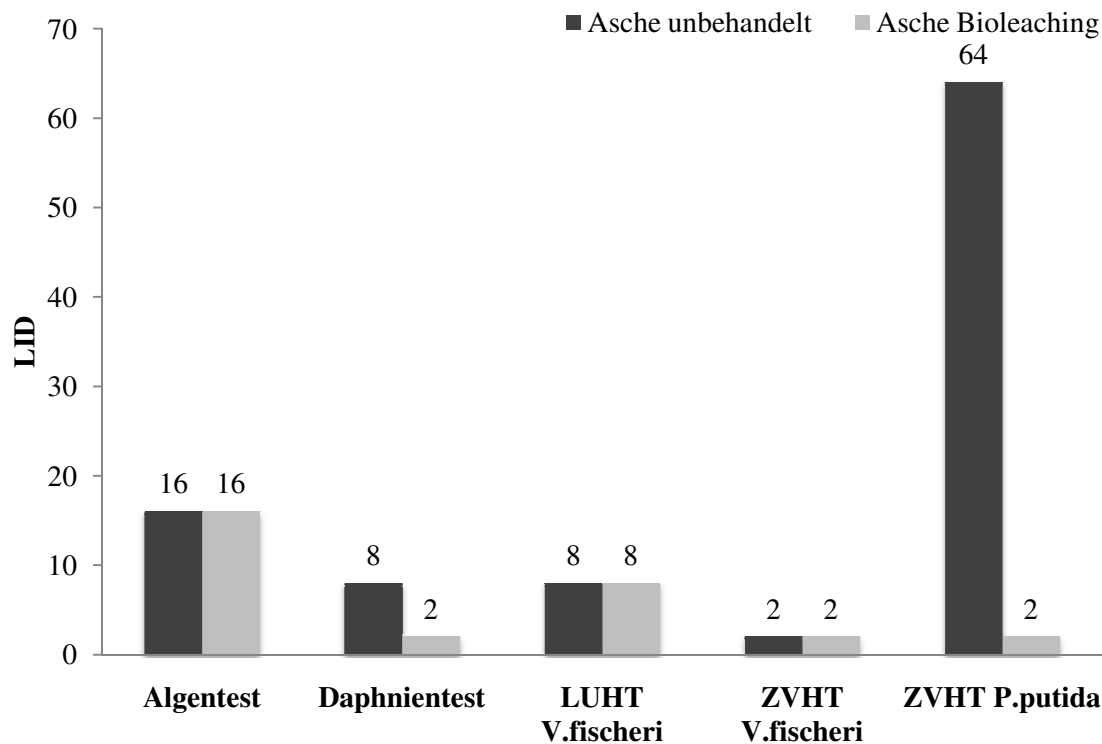


Abbildung 3.1.5: Ökotoxikologische Bewertung der Klärschlammasche vor und nach Bioleaching

Nach der Bioleachingbehandlung zeigt sich für beide Feststoffe eine verringerte Ökotoxizität. Die verminderte Toxizität der Asche wird besonders durch die gesunkenen LID-Werte im Zellvermehrungshemmttest mit *Pseudomonas putida* und im Daphnientest deutlich. Die verminderte Laugbarkeit von Schwermetallen um ca. 60% verbessert beide Tests deutlich, die LID-Werte erreichen die gesetzlichen Vorgaben von einem $LID \leq 2$.

Für den Boden verringert sich der LID-Wert des Algentests (Abbildung 3.1.5) und des Lumineszenzhemmtests. Nach Bioleaching sinkt der LID-Wert für den Lumineszenzhemmttest unter die gesetzliche Toxizitätsschwelle. Der *umu*-Genotoxizitätstest ergab für keinen der Feststoffe einen Effekt, so dass eine genotoxische Wirkung der Eluate ausgeschlossen werden kann. Obgleich die LID-Werte über den angegebenen Toxizitätsschwellen für eine unbedenkliche Nutzung beider Feststoffe liegen, zeigt sich schon nach der

kurzen Bioleachingbehandlung von 8 Tagen eine Verringerung der Toxizität in beiden Proben.

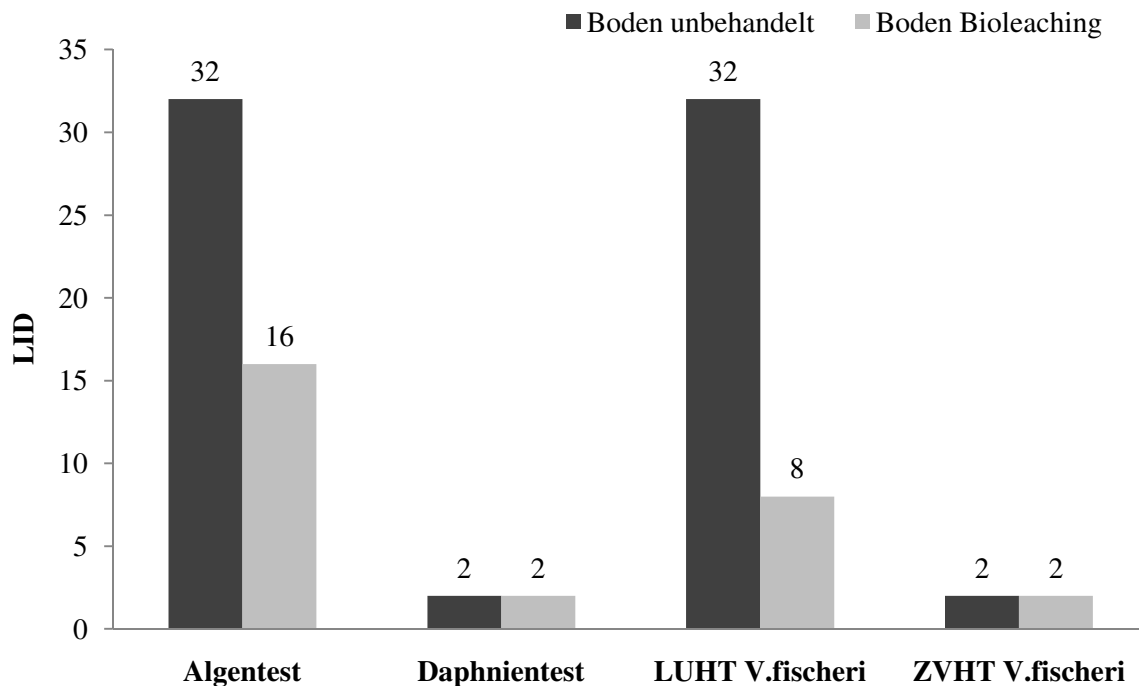


Abbildung 3.1.6: Ökotoxikologische Bewertung des Bodens (Stolberg) vor und nach Bioleaching

3.2 Bioleaching und Phosphorfreisetzung

Neben den Schwermetallen werden auch Pflanzennährstoffe, wie Calcium, Magnesium und Phosphor aus den Feststoffen gelaugt. Zur Phosphorrückgewinnung wurden Klärschlamm- asche und getrockneter Faulschlamm mit Bioleaching behandelt und die Laugbarkeit von Phosphor aus den Feststoffen untersucht.

Klärschlammaschen können nur dann zur Phosphorrückgewinnung eingesetzt werden, wenn sie aus einer Monoverbrennungsanlage stammen. Tatsächlich wird ein Großteil des anfallenden Klärschlamm als Zuschlag in Müllverbrennungsanlagen verbrannt. Die entstehenden Aschen sind nicht mehr mit Phosphor angereichert und enthalten mehr Schwermetalle. Um nicht nur auf Klärschlammasche aus Monoverbrennungsanlagen zurückgreifen zu müssen, wurde auch Klärschlamm hinsichtlich einer möglichen Phosphorrückgewinnung mit Bioleaching untersucht. Eine Kläranlage mit einer angeschlossenen Monoverbrennung diente als Model für eine Phosphorrückgewinnung aus Klärschlamm und Klärschlammasche. Dies ermöglichte den direkten Vergleich der Phosphorrücklösung aus beiden Feststoffen.

3.2.1 Klärschlammasche

Die verwendete Klärschlammasche weist einen Phosphorgehalt, dargestellt als Phosphor aus Phosphat ($P-PO_4$), von $80 \text{ mg/g} \pm 9 \text{ mg/g}$ auf. Mit dem Bioleachingprozess lassen sich bis zu 93 % des Phosphors rücklösen (Abbildung 3.2.1).

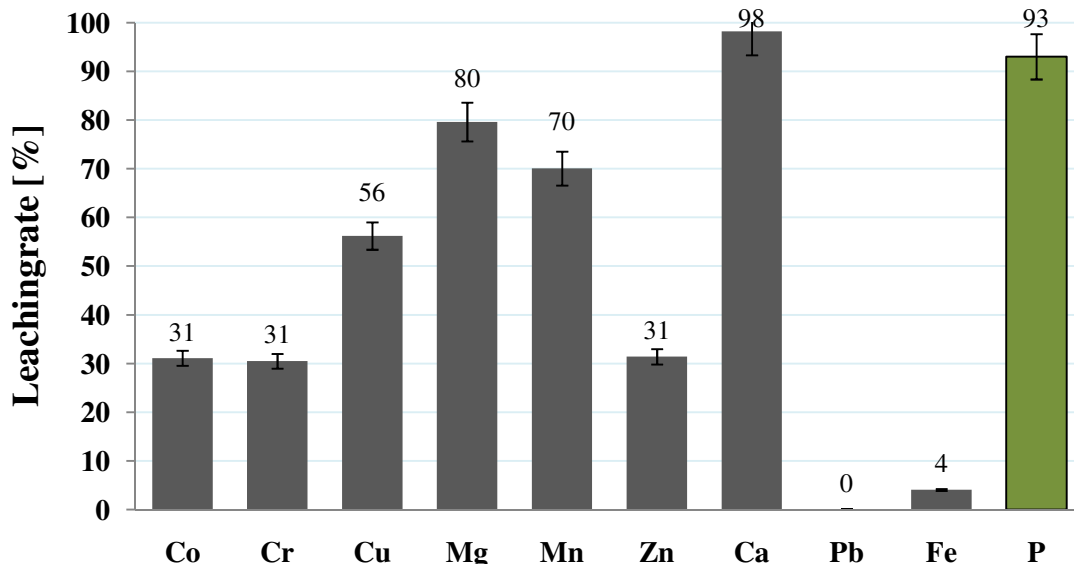


Abbildung 3.2.1: Rücklösung von Phosphor, Magnesium, Calcium und Schwermetallen durch Bioleaching (n=5).

Der Phosphor liegt in der Bioleachinglösung als freie Phosphorsäure vor. Die Rücklösung von Magnesium und Calcium aus der Asche ist ebenfalls möglich und erreicht eine Rücklösung bis zu 80 % für Magnesium und bis zu 93 % für Calcium.

Die verminderte Laugung von Blei und Eisen aus thermisch behandelten Feststoffen ist nachteilig, wenn der Feststoff dekontaminiert werden soll. Bei der Rückgewinnung von Phosphor hat der Verbleib von Blei und Eisen im Feststoff einen Vorteil. Je weniger toxische Metalle mit dem Phosphor in Lösung gehen, desto einfacher kann der gelöste Phosphor zurückgewonnen werden. Die selektive Rücklösung von Phosphor und der Verbleib von Eisen und Blei im Feststoff kann als fraktioniertes Bioleaching zur Phosphorrücklösung bezeichnet werden.

3.2.1.1 Klärschlamm

Die Phosphorkonzentrationen im Verhältnis zu den Metallkonzentrationen in den einzelnen Behandlungsstufen der Abwasserreinigung wurden bestimmt. Dabei handelt es sich um Primärschlamm (PS), Rücklaufschlamm aus der aeroben Belebung (RS), Schlamm aus der Nitrifikation (NITRI), Schlamm aus der Denitrifikation (DENI) und ausgefauter Schlamm nach der anaeroben Stabilisierung im Faulturm (FS).

Die Phosphorkonzentrationen in den verschiedenen Klärschlammfraktionen liegen bei 8–22 mg P/g Klärschlamm in der Trockenmasse (Abbildung 3.2.2).

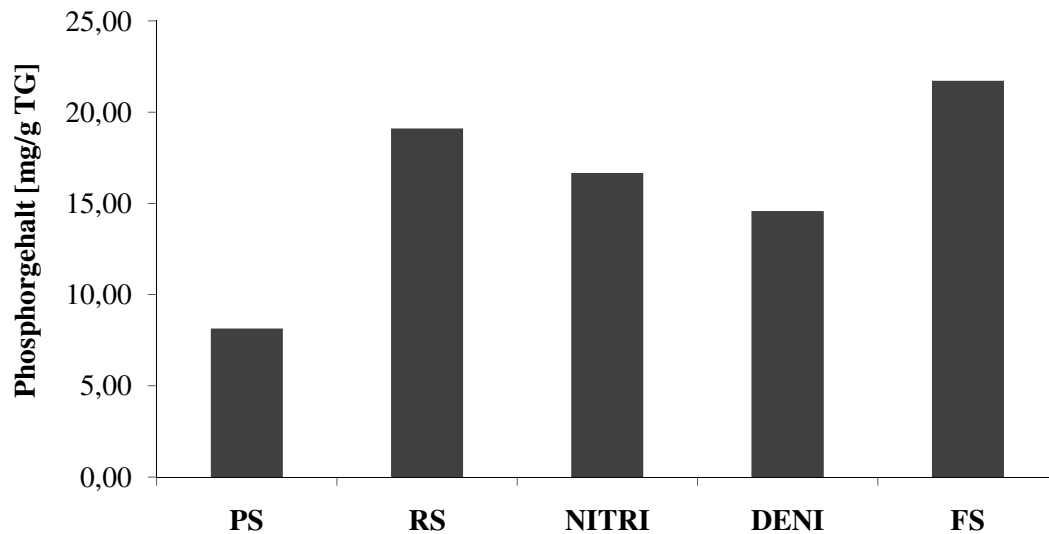


Abbildung 3.2.2: Phosphorkonzentrationen in den Klärschlammfraktionen der Kläranlage Bonn Salierweg [mg P/g TM] PS: Primärschlamm, RS: Rücklaufschlamm, NITRI: Nitrifikation, DENI: Denitrifikation, FS: Faulschlamm

Im Faulschlamm und im Rücklaufschlamm findet sich der höchste Anteil an Phosphor (19–22 mg P/g TM). Verglichen mit den Phosphorwerten von 73–80 mg/g in der Verbrennungsasche aus derselben Kläranlage liegen die Werte deutlich niedriger.

Die Metallgehalte der einzelnen Behandlungsstufen ändern sich nur geringfügig (Abbildung 3.2.3). Die höchsten Metallkonzentrationen zeigen sich im Faulschlamm. Das für ein Bioleaching günstigste Verhältnis zwischen Phosphor und Schwermetallen zeigt sich im Rücklaufschlamm der aeroben Stufe. Für das Bioleaching von Phosphor wird dennoch der Faulschlamm eingesetzt. Der Faulschlamm wird eingesetzt, weil er arm an pathogenen Mikroorganismen und persistenten organischen Schadstoffen ist. Durch die anaerobe Schlammbehandlung werden verbleibende organische Verbindungen metabolisiert und pathogene Mikroorganismen abgetötet, zusätzlich werden vermehrt Metallsulfide gebildet, die als Substrat für die Bioleachingbakterien dienen.

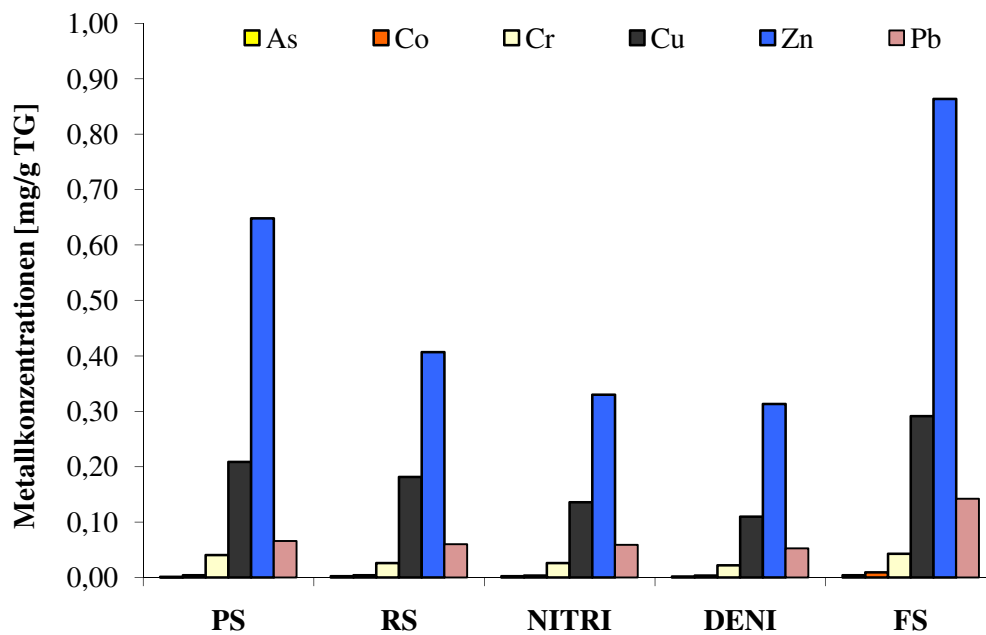


Abbildung 3.2.3: Metallgehalte in den Klärschlammfraktionen der Kläranlage Bonn, Salierweg [mg/g TM]

3.2.1.2 Phosphorfreisetzung aus Faulschlamm

Die Phosphorrücklösung aus Klärschlamm erreicht Werte bis zu 85 % (Abbildung 3.2.4).

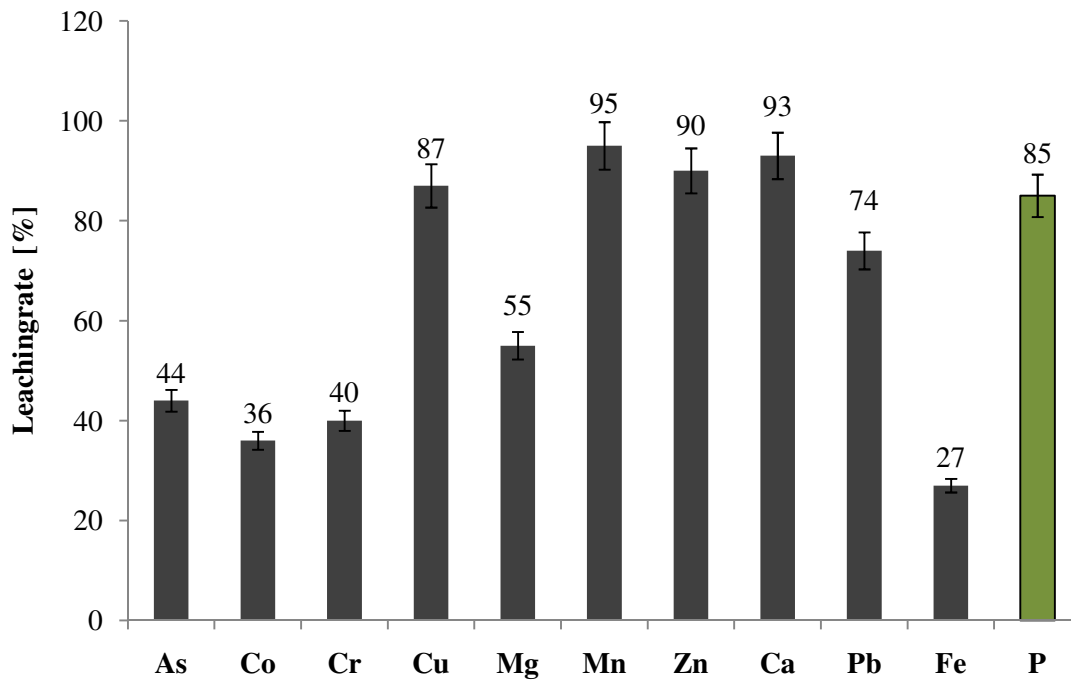


Abbildung 3.2.4: Metall- und Phosphorfreisetzung [%] durch Bioleaching aus Faulschlamm

Im Vergleich mit der Asche lösen sich alle Metalle gut aus dem Schlamm heraus. Die Laugung von Blei, Eisen, Zink und Mangan ist im Vergleich zu der Asche erhöht. Die gute Freisetzung der Metalle ist bei der Phosphorrückgewinnung nachteilig. Zwar kann ein hoher Prozentsatz Phosphor zurück in Lösung gebracht werden, gleichzeitig werden jedoch die Metalle verstärkt freigesetzt, so dass sich das Verhältnis Phosphor-Metalle auf die Seite der Metalle verschiebt.

3.3 Kombiniertes Bioleaching und biologisch induzierte Phosphorrückgewinnung

Nach der Freisetzung von Phosphor aus Klärschlammasche und Klärschlamm stand die Abtrennung des gelösten Phosphors von den gelösten Schwermetallen im Fokus der weiteren Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein biotechnologischer Prozess zur Phosphorrückgewinnung eingesetzt. In Anlehnung an die aus der Abwasserreinigung bekannte biologische Phosphoreliminierung wurde ein Bakterienkonsortium angereichert, welches den gelösten Phosphor refixiert und in der Biomasse festlegt. Dabei sollte das Konsortium sowohl die Bioleachingorganismen der Gattung *Acidithiobacillus*, als auch säuretolerante phosphorakkumulierende Mikroorganismen enthalten. Ziel war es, den Phosphor in einem Prozess mit Bioleaching aus der Asche zu lösen und in die Biomasse zu refixieren.

3.3.1 Kultivierung des Bakterienkonsortiums

Die Anreicherung der Bakterien wurde in anaerob stabilisiertem Klärschlamm einer Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung durchgeführt. Ziel war es neben der Anreicherung mit den Bakterien den verbleibenden Schlamm für eine weitere Nutzung zu konditionieren. Dazu wurden die Schlammparameter im Überstand zu Beginn und zum Ende der Anreicherung überprüft, um die Auswirkungen der pH-Wert-Senkung zu dokumentieren und Hinweise auf die Beschaffenheit des Schlammes nach der Anreicherung zu bekommen. Die Dauer der Bakterianreicherung ist abhängig von der Belüftung, Schwefelgehalt und der Temperatur. Die jahreszeitlichen Schwankungen der Temperatur haben einen großen Einfluss auf die Schlammzusammensetzung und damit auf den Wachstumsprozess der Bakterien (Abbildung 3.3.1).

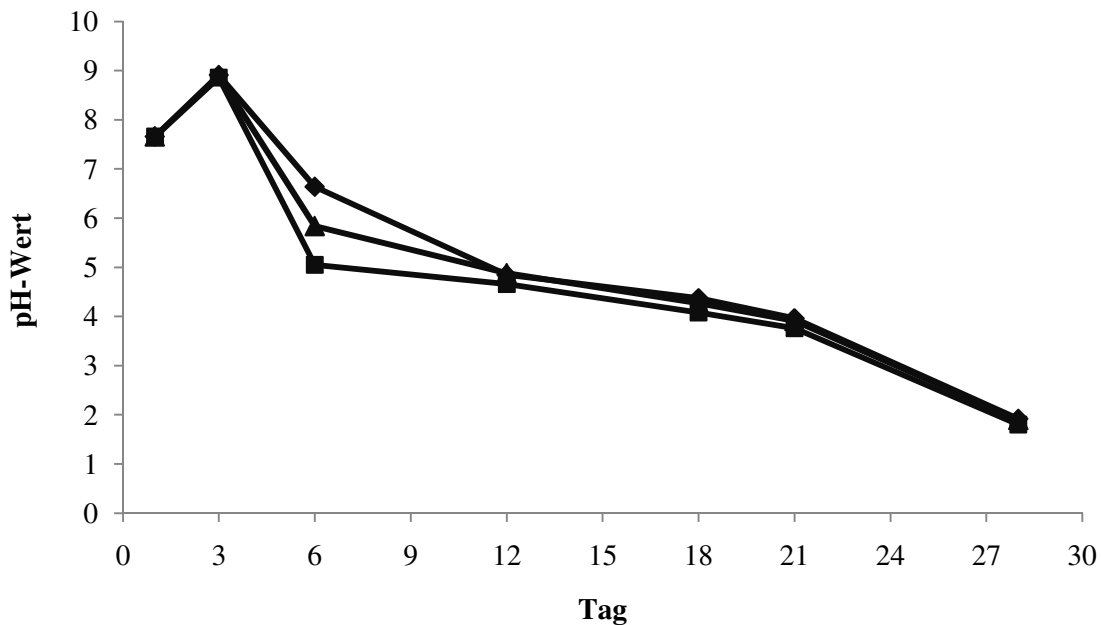


Abbildung 3.3.1: pH-Wert-Verlauf dreier Ansätze während der Anreicherung von AEDS.

Die Ansätze in den Wintermonaten benötigen bis zu 30 Tage, um den für das Bioleaching gewünschten pH-Wert zu erreichen. In den Sommermonaten verkürzt sich diese Phase auf 14-16 Tage.

Beim Vergleich der Inhaltsstoffe im Schlammüberstand vor und nach der Anreicherung zeigen sich deutliche Unterschiede (Tabelle 3.3.1). Der Proteingehalt des Schlammes steigt mit zunehmender Anreicherung an. Ebenso der Trockenrückstand und der Glühverlust. Durch die entstehende Säure erhöht sich der Gehalt an Huminstoffen im Schlammüberstand. Deutliches Anzeichen für eine gelungene Anreicherung mit den Bioleachingbakterien ist der stark gestiegene Sulfatgehalt, der durch die Oxidation von Schwefel durch die Bakterien der Gattung *Acidithiobacillus* entsteht. Das Vorliegen von Fe^{3+} im sauren Schlammüberstand ist ein Hinweis für die Anwesenheit von *A. ferrooxidans*, da das Gleichgewicht $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ im sauren Milieu auf der Seite von Fe^{2+} liegt. Durch die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch *A. ferrooxidans* kann Fe^{3+} in der EPS der Bakterien stabilisiert werden (Gehrke et al., 1998). Durch die von den Bakterien produzierte Säure werden neben Phosphor auch Schwermetalle aus dem Klärschlamm ausgelaugt. Die Konzentrationen von Kupfer, Nickel und Blei im Schlammüberstand steigen an. Erreicht der Schlamm den gewünschten pH-Wert (vorzugsweise ≤ 2) wurde der Feststoffanteil abgetrennt und die saure Lösung in den Bioleachingreaktor überführt, um Phosphat und Schwermetalle aus Klärschlammasche zu lösen. Der angereicherte Klär-

schlammüberstand wird im weiteren Verlauf als AEDS bezeichnet (*Acidithiobacillus enriched digested sludge*).

Tabelle 3.3.1: Chemische Zusammensetzung des Schlammüberstands vor und nach der Anreicherung mit Bakterien der Gattung *Acidithiobacillus*. Die Tabelle zeigt Mittelwerte aus drei Ansätzen

Analyt	Schlamm vor Anreicherung	Schlamm nach Anreicherung
pH	7,3	1,98
Proteine [mg/l]	19,6	31,4
Huminstoffe [mg/l]	28,1	207,1
Trockenmasse	3,5 %	9,6 %
Glühverlust	63 %	75,4 %
TOC [mg/l]	804,8	1277,5
DOC [mg/l]	617,1	1154,1
P-PO ₄ ³⁻ [mg/l]	12,6	400,8
SO ₄ ²⁻ [mg/l]	n.a.	17917,2
Fe ²⁺ [mg/l]	101	457
Fe ³⁺ [mg/l]	23	238
Zn [mg/l]	20,7	31,5
Mn [mg/l]	109,3	84,8
As [mg/l]	0,3	0,5
Cu [mg/l]	0,3	4,2
Cr [mg/l]	0,02	0,3
Ni [mg/l]	0,9	1,2
Pb [mg/l]	n.a.	0,9

3.3.2 Phosphorfreisetzung mit AEDS aus Klärschlammasche

Die AEDS-Kultur dient dazu, analog zur Reinkultur mit *Acidithiobacillus*, Phosphor und Schwermetalle aus der Klärschlammasche zu lösen. Bei der Freisetzung von Phosphor und den Metallen aus der Asche mit AEDS gibt es einige Unterschiede zur der Freisetzung mit der Reinkultur (Abbildung 3.3.2). Mit dem Bakterienkonsortium AEDS kann bis zu 66 % Phosphor unter den standardisierten Bedingungen zurückgelöst werden, mit der Reinkultur bis zu 93 %. Die Bioleachinglösung der AEDS-Kultur enthält, bedingt durch die Anreicherung aus Klärschlamm, bereits Phosphor (400 mg P-PO₄/l). Somit wird sowohl aus dem Klärschlamm als auch aus der Klärschlammasche Phosphor zurückgelöst. Dieser Phosphorakkumulationsschritt bleibt bei der Reinkultur von *A. ferrooxidans* aus. Bei der Aschelaugung mit AEDS werden Chrom und Kupfer nicht oder nur wenig aus der Asche freigesetzt. Für die Phosphorrückgewinnung aus der Bioleachinglösung ist dies von großem Vorteil, da es sich bei Chrom

und Kupfer um Metalle handelt, die laut Düngemittelverordnung nur in geringen Mengen in einem Phosphatdünger vorkommen dürfen. Ebenso Blei, das aufgrund der thermischen Vorbehandlung im Feststoff verbleibt (siehe auch Kapitel 3.2.1).

Somit kann mit AEDS, im Vergleich zum Bioleaching mit der Reinkultur, weniger Phosphor aus der Asche gelöst werden, der Vorteil der Laugung mit AEDS liegt jedoch bei dem Verbleib der Metalle Chrom, Kupfer und Blei in der Asche.

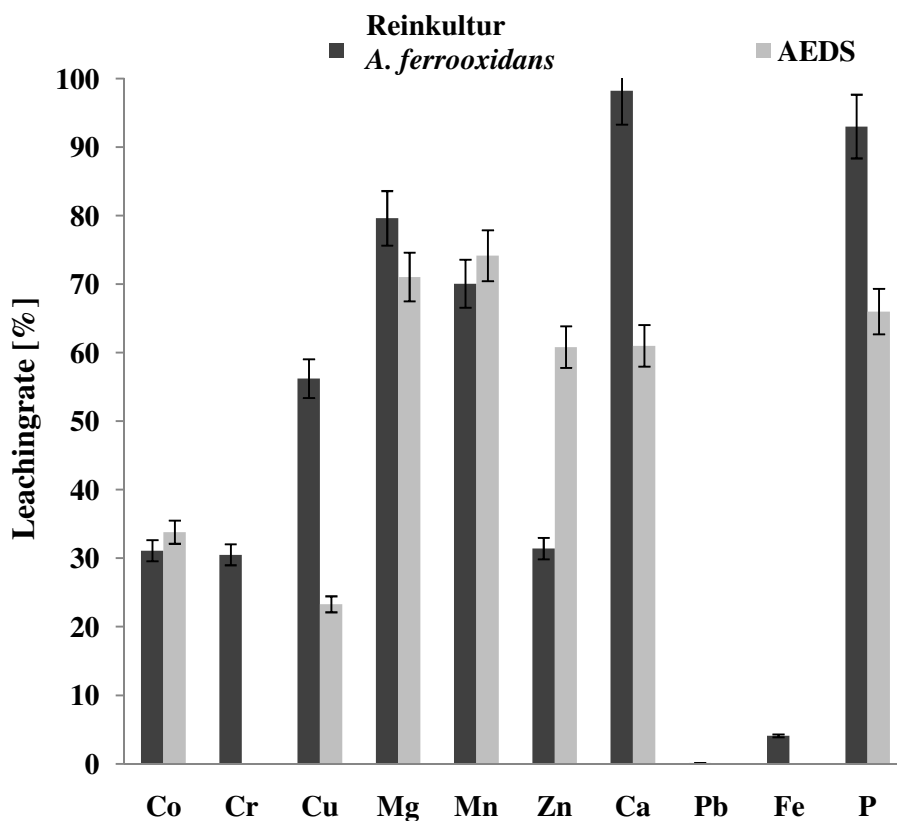


Abbildung 3.3.2: Metall- und Phosphorfreisetzung [%] durch Bioleaching mit AEDS und Reinkultur (n=5)

3.3.3 Saure Phosphorrückgewinnung

Betrachtet man die Phosphorkonzentration (hier bestimmt als *ortho*-Phosphat) über einen Zeitraum von 12 Tagen, zeigt sich, dass der Phosphorgehalt in der AEDS-Lösung ab Tag 3 sinkt (Abbildung 3.3.3). In den anderen beiden Leachingmedien (Reinkultur und 2 molare Schwefelsäure) verbleibt Phosphor in Lösung.

Im Medium der AEDS-Kultur vor dem Bioleaching befindet sich bereits Phosphor aus dem Anreicherungsschritt (785 mg/l $\pm$ 10 mg/l Phosphat). Durch das Bioleaching der Klär-

schlammasche werden weitere $317 \text{ mg/l} \pm 10 \text{ mg/l}$ Phosphat in Lösung gebracht. An Tag 12 sinkt der Phosphatgehalt der AEDS- Probe. Es werden $411 \text{ mg/l} \pm 10 \text{ mg/l}$ Phosphor aus der Lösung in die Biomasse refixiert. Zusammen mit der sinkenden Phosphorkonzentration tritt eine starke Eintrübung des Mediums auf, die bei den anderen beiden Medien ausbleibt. Nach Zentrifugation und Trocknung kann der Rückstand als Feststoff gewonnen werden.

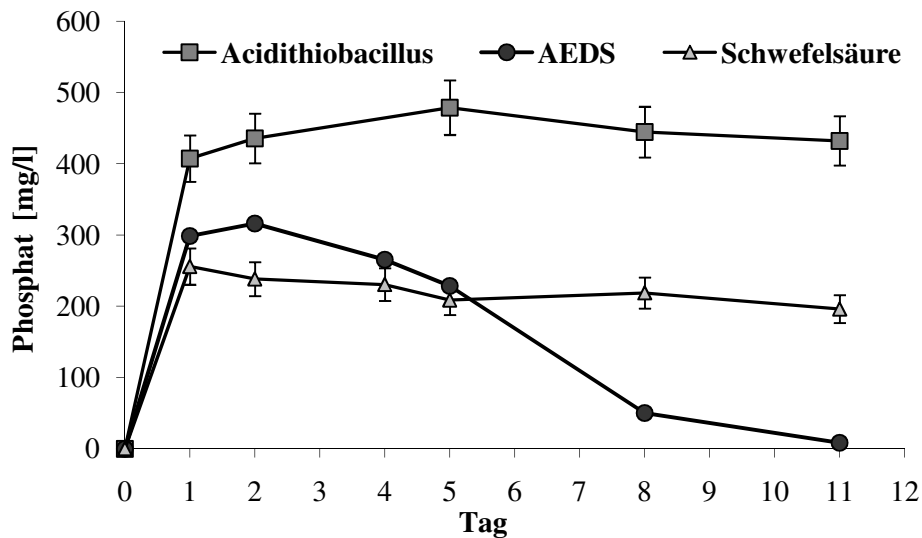


Abbildung 3.3.3: Phosphorfreisetzung und Rückfixierung mit Reinkultur ($n=5$), AEDS und Schwefelsäure (2M) ($n=5$) aus 2 g Klärschlammasche. Die aufgetragene Phosphatkonzentration zeigt exemplarisch die Ergebnisse aus einem Versuch. Weitere Graphen zur Phosphatrefixierung finden sich im Anhang.

3.3.3.1 Nachweis der mikrobiell bedingten Phosphorfixierung

In Abbildung 3.3.4 ist dargestellt, wie bei Zusatz von Natriumazid die Phosphorfällung gehemmt wird.

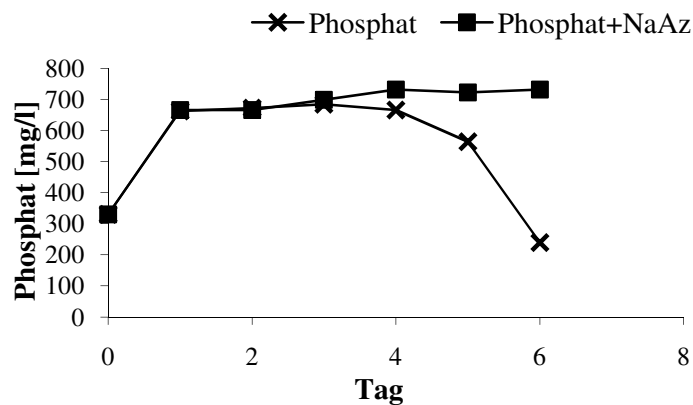


Abbildung 3.3.4: Nachweis der mikrobiellen Induktion durch Hemmung der Mikroorganismen mit Natriumazid. Exemplarische Auftragung, weitere siehe Anhang.

Nach 3 Tagen beginnt im Ansatz ohne Natriumazid die Phosphorfixierung verbunden mit der Eintrübung der Lösung. In dem Ansatz mit Natriumazid bleibt der Phosphor in Lösung. Nach 3 Tagen beginnt die Phosphorkonzentration, bedingt durch die abgestorbenen Mikroorganismen, zu steigen. Die Ergebnisse der Versuche belegen eine biologisch induzierte Phosphorfixierung.

3.3.3.2 Verhalten der Schwermetalle während der Refixierung von Phosphor

Nach Lösung von Phosphor und Metallen aus Klärschlammasche sinkt ab Tag 3 die Phosphorkonzentration im Medium, während die Metalle weiterhin in Lösung bleiben (Abbildung 3.3.5).

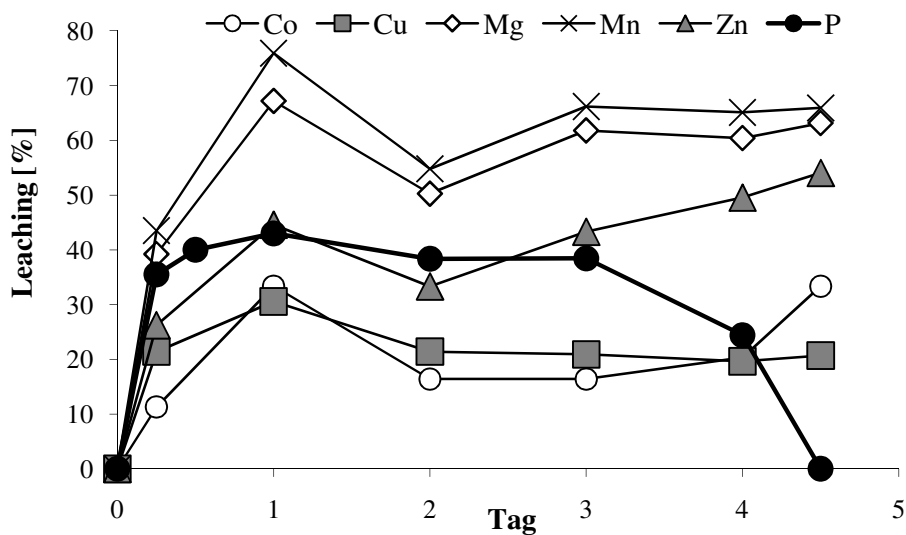


Abbildung 3.3.5: Verhalten der Schwermetalle während der Phosphorrückgewinnung. Die gezeigten Ergebnisse stehen exemplarisch für n=6 Versuche zum Verhalten der Schwermetalle in Lösung.

Unter den sauren Bedingungen in der AEDS-Lösung erfolgt eine selektive Refixierung von Phosphor. Durch Zentrifugation lässt sich der entstandene phosphorhaltige Feststoff leicht von den in der Lösung befindlichen Metallen abtrennen.

Der Konzentrationsverlauf von Eisen und Phosphor im AEDS-Medium lässt eine direkte Beteiligung von Eisen an der Phosphorrückgewinnung vermuten (Abbildung 3.3.6).

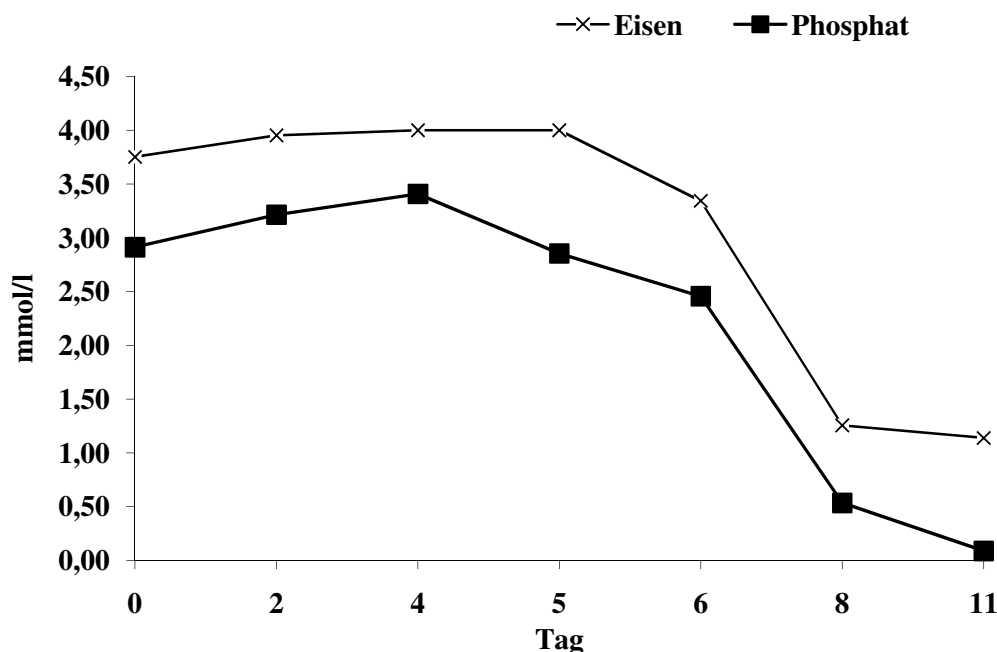


Abbildung 3.3.6: Eisen- und Phosphatgehalt in der AEDS-Lösung (mmol/l) im Bioleachingmedium.

Der Phosphorgehalt sinkt ab Tag 4, während der Eisengehalt weiterhin stabil bleibt. Ab Tag 5 beginnt der Eisengehalt langsam zu sinken und läuft schließlich nahezu parallel zum sinkenden Phosphorgehalt. Aus der Graphik geht hervor, dass der Phosphorgehalt in den ersten Tagen der Phosphorrefixierung auf eine andere Weise der AEDS-Lösung entzogen wird, als durch eine Fällung mit Eisen. Bei einer reinen Eisenphosphatfällung würden Eisen und Phosphor äquimolar (1:1) aus der Lösung gefällt. Die Konzentrationen in der Lösung sinken für Phosphor um 3,32 mmol Phosphor und für Eisen um 2,6 mmol und liegen demnach in einem molaren Verhältnis von 1,2:1 vor. Die Differenz von 1,1 mmol entspricht dem Phosphor, der nicht mit Eisen gefällt wird. Dabei handelt es sich um 29 % des refixierten Phosphors. Hierbei kann es sich um die Aufnahme von gelöstem Phosphor in die Bakterienzelle handeln. Im weiteren Verlauf wird das gewonnene Phosphorprodukt auf die molaren Verhältnisse sowie auf die verschiedenen Bindungsarten von Phosphor untersucht und analysiert.

3.3.3.3 Charakterisierung des Feststoff aus der Phosphorfixierung

Das molare Verhältnis von Phosphor und Eisen, das sich während der Fällung in der Lösung gezeigt hat, findet sich im ausgefällten Feststoff wieder. In Tabelle 3.3.2 ist das molare Verhältnis zwischen Phosphor und Eisen von drei Feststoffen zu sehen.

Tabelle 3.3.2: Molare Verteilung von Phosphor und Eisen im Feststoff

	P_{gesamt} [mol]	Fe [mol]	P_{plus} [mol]	Molares Verhältnis	[%]
Feststoff 1	3,46	3,14	0,32	1,1:1	8,9
Feststoff 2	4,41	3,65	0,66	1,2:1	17
Feststoff 3	1,80	1,40	0,4	1,3:1	22

Die Menge an P_{plus} schwankt im Feststoff je nach Ansatz zwischen 8 – 22%. Dieser Phosphor liegt nicht als Eisenphosphat im Feststoff vor. Die sequentielle Extraktion nach Psenner et al. (1988) mit verschiedenen Lösungsmitteln ermöglicht es, die Bindungsverhältnisse von Phosphor in Feststoffen wie Sedimente, Böden und Schlämmen zu bestimmen und den organischen Phosphoranteil (Zellphosphate, Polyphosphate) zu ermitteln. Durch die Behandlung mit verschiedenen Extraktionsmitteln können organische und Eisen-gebundene Phosphate quantifiziert werden und ermöglicht somit Aussagen über die Zusammensetzung des phosphatreichen Feststoffs. In Abbildung. 3.3.7 wird die Extraktion vereinfacht dargestellt, die Durchführung der Extraktion ist in Kapitel 2.5.4 beschrieben.

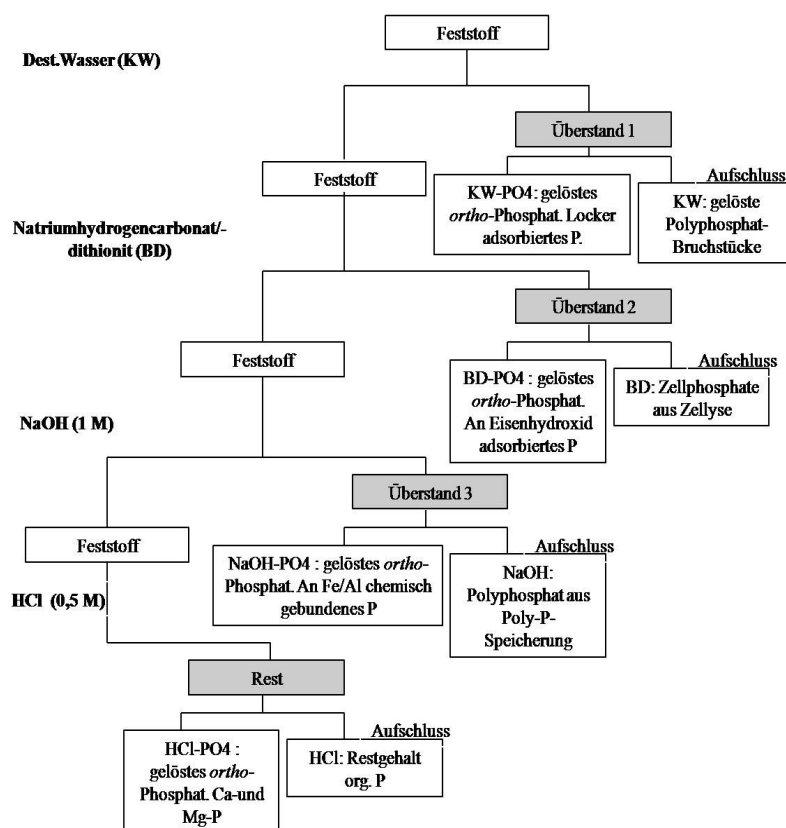


Abbildung. 3.3.7: Sequentielle Extraktion (nach Psenner et al. 1988) des Feststoffs mit verschiedenen Extraktionsmitteln (P: Phosphor).

In Tabelle. 3.3.3 ist die Zusammenfassung der ermittelten Anteile der verschiedenen Phosphorspezies (gemessen als *ortho*-Phosphat) in den Fraktionen der sequentiellen Extraktion aufgetragen.

Tabelle. 3.3.3: Ergebnisse der sequentiellen Phosphorfractionierung zweier Feststoffe

Feststoff 1			Feststoff 2	
Gesamtphosphat [mg/g TS]		317,0	397,2	
Fraktionen	Anorganisches Phosphat	Organisches Phosphat	Anorganisches Phosphat	Organisches Phosphat
[mg/g TS]				
KW (Wasser)	13	1,9	12,4	6,24
BD (Natriumbicarbonat)	21,6	0,6	22,65	6,55
NaOH	201	15	228,45	38,8
HCl	19,2	2,8	14,15	0,85

Von dem anorganisch gebundenen Phosphor geht nur ein kleiner Teil mit destilliertem Wasser in Lösung. Dies deutet darauf hin, dass sich kaum gelöstes und locker adsorbiertes Phosphor im Feststoff befindet. Im zweiten Extraktionsschritt wird an Eisenhydroxid assoziierter Phosphor in Lösung gebracht. Die Assoziation an $\text{Fe}(\text{OH})_3$ fällt gering aus, da Fe^{2+} bei einem pH-Wert von ≤ 2 nur in geringem Maße chemisch zu Eisenhydroxid oxidiert wird. Phosphor kann als Phosphat an Eisenhydroxid assoziiert ausfallen. Mit NaOH löst sich der größte Anteil des Phosphors aus dem Feststoff. Dabei handelt es sich um an Eisen gebundenen Phosphor, der sofort als rostbraunes Eisenhydroxid ausfällt. In Verbindung mit den Ergebnissen der elementaren Zusammensetzung des Feststoffs (Tabelle 3.3.4) bedeutet dies, dass der Feststoff größtenteils aus Fe(III)-Phosphat besteht. Die Zugabe von Salzsäure im letzten Extraktionsschritt löst den entstandenen Rückstand vollständig auf. Hierbei handelt es sich um Calcium- und Magnesiumphosphate.

Der organische Phosphor findet sich in jeder Fraktion der Extraktion. Der Großteil des organisch gebundenen Phosphors wird mit Natronlauge aus dem Feststoff gelöst. In dieser Fraktion befinden sich laut Psenner et al. (1988) in der Hauptsache Polyphosphate. Neben den Polyphosphaten finden sich in der Wasserfraktion (KW) locker absorbierte Polyphosphate, in der Bicarbonatfraktion (BD) die Zellphosphate. Der Restgehalt an organischem Phosphor löst sich mit HCl. Der Anteil von organischem Phosphor im Feststoff macht zwischen 11-15 % aus. Der Verlust an Phosphor während der Extraktion liegt bei 8-10 %, so dass die Ergebnisse der Extraktion das molare Verhältnis im Feststoff bestätigen.

Die Ergebnisse der Extraktion weisen darauf hin, dass es sich bei der mikrobiologischen Phosphatrefixierung um einen gekoppelten Prozess aus mikrobiologisch induzierter Fe(III)-Phosphatfällung und einer Polyphosphatakkumulation handelt.

In Tabelle 3.3.4 sind die Metall- und Phosphatkonzentrationen in den extrahierten Feststoffen im Vergleich zur Klärschlammasche zu sehen. Beide Feststoffe weisen ein Verhältnis Phosphor - Metalle auf, als die Klärschlammasche. Die Metallgehalte sind in den Feststoffen geringer, der Phosphoranteil höher.

Tabelle 3.3.4: Metallgehalte von zwei P-Produkten im Vergleich zu Klärschlammasche

	Feststoff 1 g/kg	Feststoff 2 g/kg	Klärschlammasche g/kg	%- Abreicherung im P-Produkt
Al	5,4	3,3	53,3	91,8
Ca	6,4	6,9	87,4	92,4
Mg	0,7	0,5	12,1	95,0
Mn	1,2	0,1	10,8	94,0
Phosphat	317,3	397,2	223,4	0,0
Pb	0,2	0,4	0,2	0,0
Cu	< 0,002	< 0,05	0,6	95,7
Cr	< 0,03	< 0,05	0,2	80,0
Zn	0,18	< 0,06	3,0	96,0

Die Bleikonzentration bleibt in den Feststoffen ähnlich hoch und höher wie in der Asche. Das Blei stammt aus der Anreicherung der AEDS-Population aus Klärschlamm. Aus der Klärschlammasche selbst wird kaum Blei freigesetzt, da die Bleifreisetzung aus thermisch behandelten Feststoffen nicht oder nur sehr gering ist. Die Konzentrationen der Metalle Zink, Chrom, Aluminium, Mangan und Kupfer im Feststoff sind deutlich geringer als in der Klärschlammasche.

3.3.3.4 Einflussfaktoren auf die Phosphorrefixierung

In einem getrennten Versuch wurde der Einfluss des pH-Wertes sowie der Einfluss der Eisenkonzentrationen auf die Phosphorrefixierung untersucht. In Abbildung 3.3.8 ist die *ortho*-Phosphatabnahme bei den drei pH-Werten und unterschiedlichen Eisenkonzentrationen zu sehen.

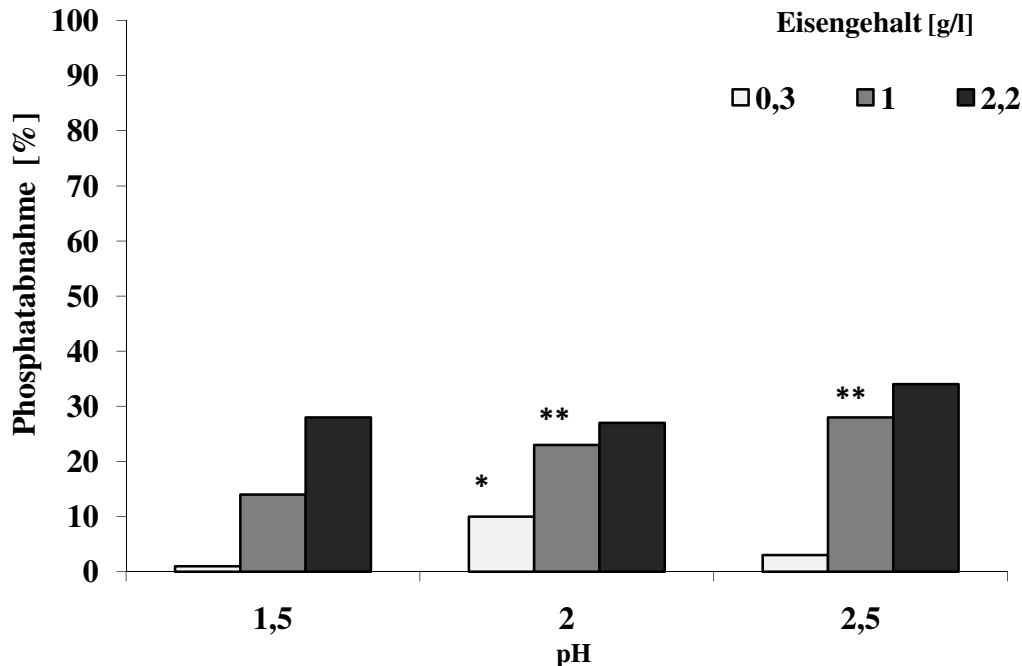


Abbildung 3.3.8: Einfluss von Eisengehalt und pH-Wert auf die Phosphorrefixierung. * signifikant erhöhte Abnahme gegenüber Konzentrationen 1 und 3, ** signifikant erhöht gegenüber Konzentration 1.

Bei steigenden Eisenkonzentrationen steigt die Phosphatabnahme im Medium unabhängig vom pH-Wert des Mediums. Bei hohen Eisenkonzentrationen (2,2g/l) in der Lösung wird bei allen drei pH-Werten die größte Phosphatabnahme in der Lösung erreicht, die bei standardisierten Versuchsbedingungen bei 30% liegt.

Bei sinkenden Eisenkonzentrationen (1,0 und 0,3 g/l) reduziert sich die Phosphorrefixierung von 30 auf 5-3%. Eine Ausnahme zeigt sich bei pH 2, hier ist die Reduzierung am geringsten ausgeprägt (11 %).

Bei Eisenkonzentrationen ≥ 1 g/l ist der pH für die Phosphorrefixierung vernachlässigbar. Bei Eisenkonzentrationen < 1 g/l wird bei pH 2 die beste Phosphorrefixierung erreicht.

3.3.4 Mikrobiologische Charakterisierung von AEDS

In diesem Abschnitt wird das AEDS-Konsortium mikrobiologisch charakterisiert und identifiziert, um Aussagen über die Hauptakteure des Prozesses machen zu können. Die eingesetzten

Methoden zur Charakterisierung und Identifizierung sollen einen möglichst großen Ausschnitt der AEDS-Kultur erfassen. In Abbildung 3.3.9 ist die Vorgehensweise der mikrobiologischen Untersuchungen schematisch dargestellt. Jedes Verfahren liefert ein anderes Spektrum des AEDS-Konsortiums.

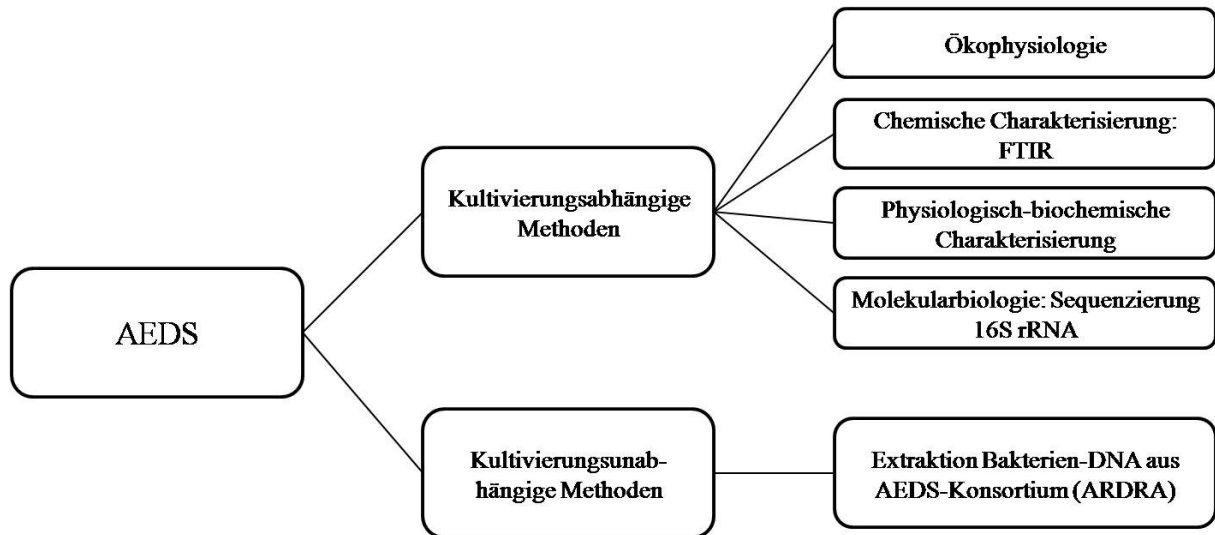


Abbildung 3.3.9: Schematische Darstellung der mikrobiologischen Charakterisierung der AEDS-Kultur

3.3.4.1 Bestimmung der ökophysiologischen Gruppen

In Tabelle 3.3.5 sind die Ergebnisse der Bestimmung der ökophysiologischen Gruppen im AEDS-Konsortium zu sehen. In sterilem, anaerob stabilisiertem Faulschlamm bei pH 2 wachsen Mikroorganismen bis zu einer Verdünnung von 10^{12} . In diesem Medium wachsen alle Mikroorganismen, die das AEDS-Konsortium bilden.

Bis zur Verdünnung 10^{10} können Eisen- und Schwefel oxidierenden Bakterien in Schwefelmedium nachgewiesen werden. Phosphorakkumulierenden Bakterien sind in der CASO-Bouillon mit und ohne Zusatz von Kristallviolett ermittelt worden. Kristallviolett hemmt das Wachstum von Sporenbildnern und Sporen, so dass nur vegetative, teilungsfähige Zellen in der Bouillon ein Wachstum zeigen. Die CASO-Bouillon ohne Kristallviolett ist deutlich stärker bewachsen, als die CASO-Bouillon mit Kristallviolett. Bis zur Verdünnungsstufe 10^7 wachsen ohne Kristallviolett aerobe, heterotrophe und organotrophe Mikroorganismen, zu denen auch die Phosphorakkumulierer gehören. Es kann jedoch auch zum Auskeimen von Sporen kommen, die als Dauerstadium in der sauren AEDS-Lösung vorliegen. Der Zusatz von Kristallviolett hemmt das Wachstum von sporenbildenden Mikroorganismen und das Auskeimen der Sporen. Im Kristallviolett-Ansatz erfolgt das Wachstum der Bakterien bis zu einer Verdünnung von 10^2 .

Tabelle 3.3.5: Bestimmung der ökophysiologischen Gruppen in der AEDS-Kultur. Die Ergebnisse stehen für 3 Titerbestimmungen.

Zielorganismen	Bestimmung	Letzte bewachsene Verdünnungsstufe
Chemolithotrophe Mikroorganismen	Schwefelmedium: pH-Wert	10^{10}
Aerobe und fakultativ anaerobe, heterotrophe und organotrophe Mikroorganismen	CASO-Bouillon. Isolierung der gewachsenen Kolonien: Trübung.	10^7
Nicht sporulierende aerobe heterotrophe und organotrophe Mikroorganismen	CASO-Bouillon: + Kristallviolett: Trübung, Gelbfärbung Medium	10^2
Wachstum der AEDS-Kultur	Steriler angesäuerter Faulschlamm + Fe und PO_4 : Trübung	10^{12}

3.3.4.2 Chemische Charakterisierung: FTIR

Die erste durchgeführte Clusteranalyse mit den gemessenen Spektren der Isolate dient zur Unterscheidung zwischen Bakterien und Pilzen, insbesondere Hefen (Abbildung 3.3.10).

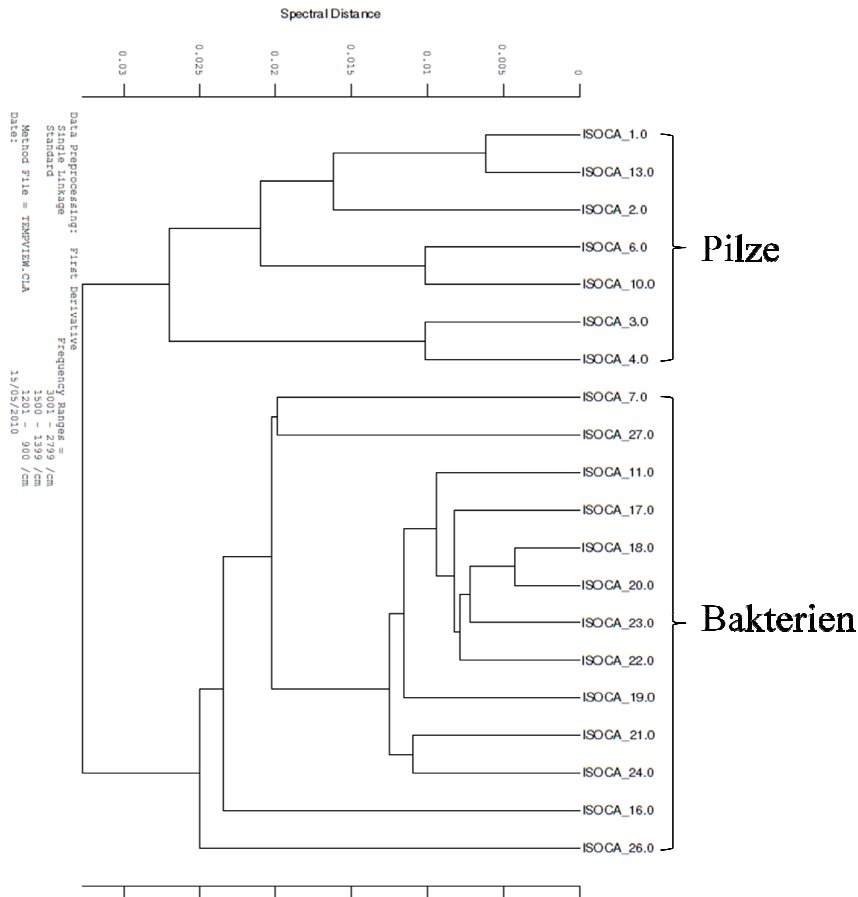


Abbildung 3.3.10: FTIR- Cluster-Analyse zur Unterscheidung zwischen Pilzen und Bakterien

Die Clusteranalyse ergibt eine Ähnlichkeitsmatrix, in der sich, unter den gewählten Clusterparametern, Spektren von Mikroorganismen mit der größten Verwandtschaft zusammen gruppieren. Es sind zwei große Subcluster zu erkennen, die sich bei einer Heterogenität $H=0,3$ trennen. Im oberen Subcluster befinden sich die Hefen, im unteren die Bakterien. Die den Bakterien zugeordneten Spektren werden einer weiteren Clusteranalyse unterzogen, mit der zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien unterschieden werden kann (Abbildung 3.3.11).

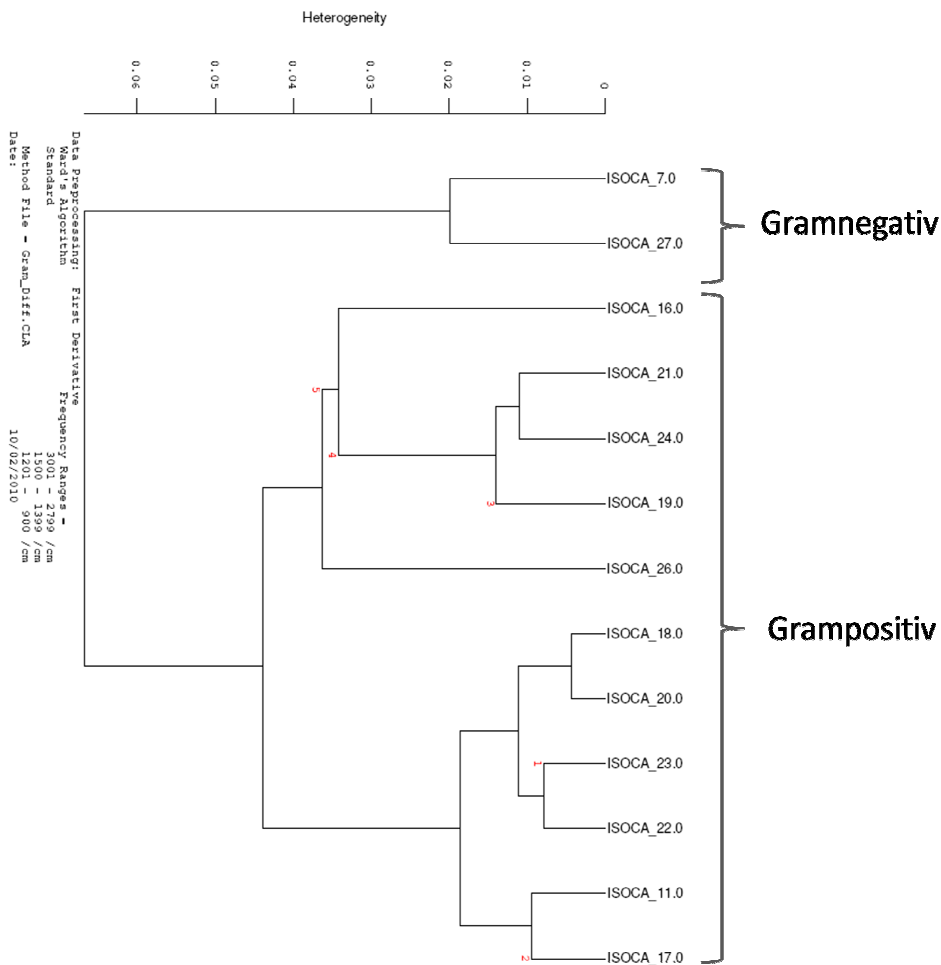


Abbildung 3.3.11: FTIR-Cluster Analyse zur Bestimmung des Gramverhaltens

Es erfolgt eine Trennung der Matrix in zwei Subcluster, bei $H = 0,07$. Das obere Subcluster beinhaltet potentielle gramnegative Organismen, das untere die Grampositiven. Die Richtigkeit der Zuordnung der Isolate des unteren Subclusters zu den grampositiven Bakterien, wurde durch die Gramfärbung bestätigt. ISOCA 7 konnte als gramnegativ bestätigt werden.

In einer weiteren Clusteranalyse wurden die Spektren der grampositiven Isolate mit bekannten Referenzspektren aus der Datenbank verglichen und die Verwandtschaft der bekannten Referenzen zu den Isolaten auf Spezies/Stammebene ermittelt. Bei den Referenzstämmen handelte es sich um die Spektren eines Sporenbildners (*Bacillus subtilis*), eines Aktinomyzeten (*Rhodococcus rhodocrous*) und zweier Corynebakterien (*Corynebacterium amonigens*, *Corynebacterium lilium*). Die Ähnlichkeitsmatrix trennt sich in drei Cluster auf, in denen sich die verschiedenen Referenzisolate wiederfinden (Abbildung 3.3.12).

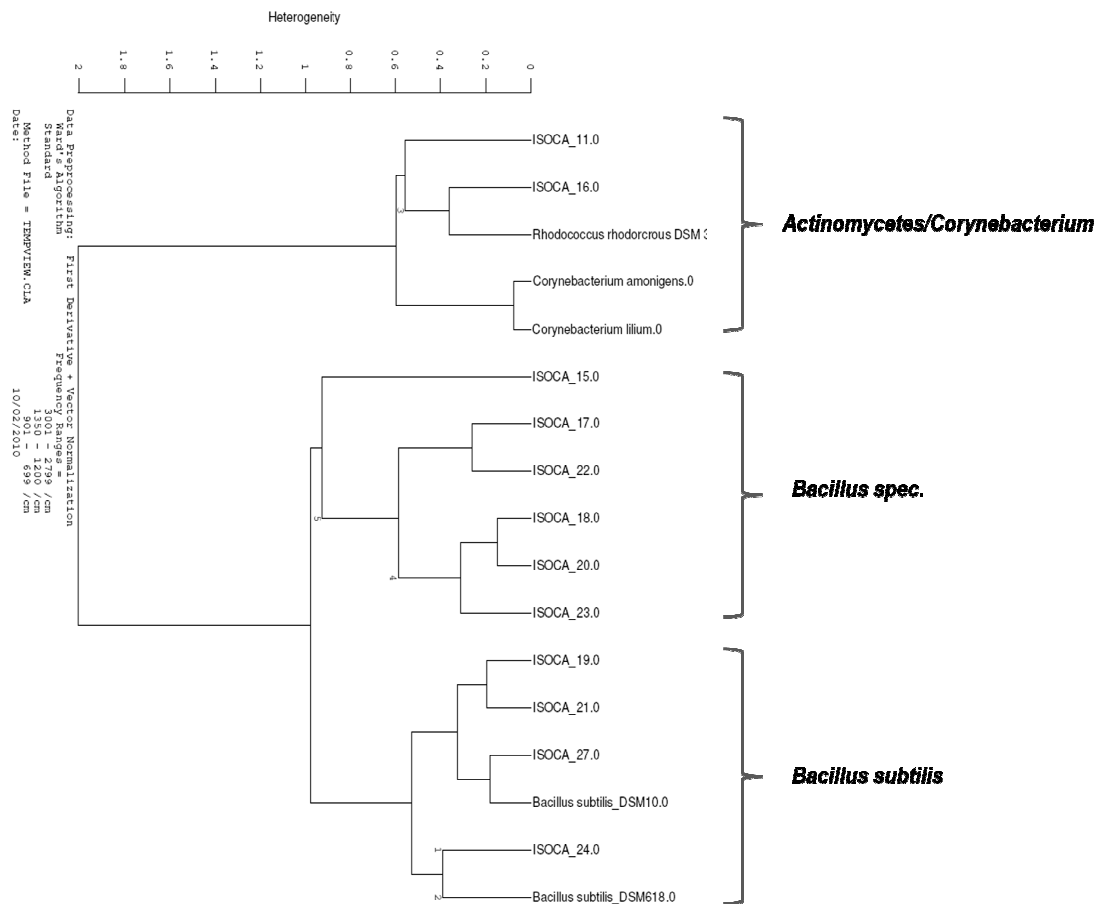


Abbildung 3.3.12: FTIR-Clusteranalyse zur Stamm und Spezies-Trennung.

Auf den Niveau von $H=1,1$ liegen zwei Subcluster vor. Im oberen Subcluster finden sich die Isolate der Corynebakterien und des Aktinomyzeten. Zwei Isolate (IsoCa11 und 16) aus dem AEDS-Konsortium gruppieren sich in dieses Subcluster ein.

In dem untern Subcluster finden sich die Referenzisolate der Sporenbildner wieder. Bei $H=0,6$ trennt sich dieses Cluster erneut in zwei Subcluster auf. Das untere beinhaltet Isolate, die eine enge Verwandtschaft zu *Bacillus subtilis* aufweisen. Im oberen Cluster gruppieren sich Isolate, die ebenfalls zu den Bazillen gehören. Die Resultate der Clusteranalyse wurden durch die Ergebnisse der 16S rRNA-Genanalyse bestätigt (siehe Kapitel 3.3.4.4).

3.3.4.3 Morphologische und Physiologische Charakterisierung

In Abbildung 3.3.6 sind die Ergebnisse der morphologischen und physiologischen Untersuchungen zu sehen.

Abbildung 3.3.6: Ergebnisse der morphologischen und biochemischen Test der Isolate aus AEDS

Kolonie	Gram	Zell-morphologie	Oxidase	Sporen-färbung	API-Test	Poly-P-färbung
ISOCA 1	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Zygosaccharomyces</i> 80%	/
ISOCA 2	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91%	/
ISOCA 3	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91%	/
ISOCA 4	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91%	/
ISOCA 5	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91%	/
ISOCA 6	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91 %	/
ISOCA 7	-	Stäbchen	+	-	<i>Ps.paucimobilis</i> 99%-	-
ISOCA 8	+	Coryneforme	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp. 95%	+
ISOCA10	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Candida famata</i> 91%	/
ISOCA11	+	Coryneforme	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp. 95%	+
ISOCA12	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA13	/	Pilzhyphen	/	/	<i>Zygosaccharomyces</i> 87%	/
ISOCA14	+	Coryneforme	+	-	n.möglich	-
ISOCA15	+	Stäbchen	-		<i>Bacillus cereus</i> 92%	-
ISOCA16	+	Coryneforme	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp. 95%	-
ISOCA17	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA18	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA19	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA20	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA21	+	Stäbchen	+	+	<i>Bacillus cereus</i> 99,5%	-
ISOCA22	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA23	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA24	+	Stäbchen	+	+	<i>Bacillus subtilis</i> 99,5%	-
ISOCA25	+	Stäbchen	+	+	-	-
ISOCA26	+	Stäbchen	-	-	<i>Brevibacillus</i> 66,5%	-
ISOCA27	+	Stäbchen	+	+	-	-

Die Färbungen und biochemischen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der FTIR-Analyse. Neben den Sporenbildnern und Hefen, können auch nicht-sporulierende Bakterien-spezies gefunden werden, die im sauren Milieu leben und sich vermehren können. Die Ergebnisse für die Isolate IsoCa 7, 8, 11, 14 und 16 spiegeln die Resultate der FTIR-Analyse wie-

der. Es kann ein gramnegatives fadenförmiges Bakterium isoliert werden (IsoCa 7). Die Identifizierung mittels API-Test ergibt *Pseudomonas paucimobilis*. Die folgenden 4 Isolate sind grampositive, nicht-sporulierende Stäbchen und haben laut API-Test, wie auch in der FTIR-Analyse eine Ähnlichkeit mit der Gattung *Rhodococcus*, einem Bakterium aus der Gruppe der Aktinomyzeten. Um festzustellen, ob die gefundenen Isolate die Fähigkeit besitzen Phosphat aufzunehmen und als Polyphosphat zu speichern, wurde eine Polyphosphatfärbung mit DAPI-Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt (Abbildung 3.3.13). Die Isolate IsoCa 8 und 11 zeigten nach Färbung gelbe Polyphosphat-Einschlüsse im Zellinneren. Die gespeicherten Polyphosphate verschieben die Wellenlänge des emittierten Lichts ins Gelbe, sie sind somit als hellgelbe Punkte im Zellinneren zu erkennen.

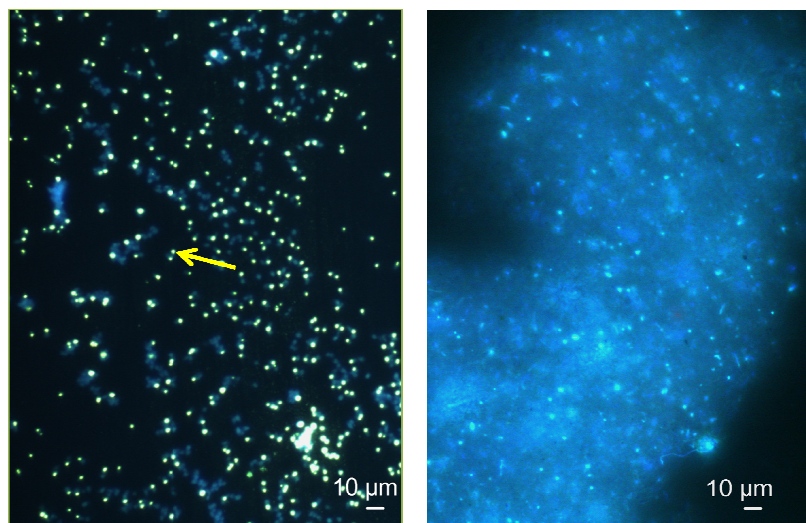


Abbildung 3.3.13: Links: DAPI- Färbung des Isolats ISOCA 8. Pfeil: Gelbe Polyphosphatgranula im Zellinneren. Rechts: Kontrolle ohne Polyphosphatgranula.

3.3.4.4 Molekularbiologische Identifizierung über 16S-rRNA Gene-Sequenzierung

Die 16S-rRNA Gen-Sequenzierung wurde für fast alle Bakterienisolate durchgeführt (Tabelle 3.3.7). Bei den Isolaten IsoCa 8, 11, 14, 17 und 23 handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um neu entdeckte Arten. IsoCa 8, 11 und 14 weisen eine große Ähnlichkeit mit *Gordonia hirsuta* auf. Die 16S-rRNA Gene hat jedoch Abweichungen, die einer neuen Art zuzuschreiben sind. Bei diesen Isolaten handelt es sich um grampositive, Oxidase-positive, nicht-sporenbildende, coryneforme Bakterien. Da sich bei diesen Isolaten eine positive Polyphosphatfärbung gezeigt hat, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um neu entdeckte phosphatakkumulierende Bakterien. IsoCa 16 wurde als *Gordonia cholesterolivorans* identifiziert.

Tabelle 3.3.7: Ergebnisse der 16S rRNA-Gen Identifizierung der AEDS-Isolate

Kolonie	API-Test	FTIR	16sRNA-Identifizierung
ISOCA 1	<i>Zygosaccharomyces</i> 80	Pilze	/
ISOCA 2	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA 3	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA 4	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA 5	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA 6	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA 7	<i>Ps.paucimobilis</i>	Gram-negativ	Ähnlich: <i>Oceanobacillus</i>
ISOCA 8	<i>Rhodococcus sp.</i> 95 %	n.möglich	Ähnlich: <i>Gordonia hirsuta</i>
ISOCA10	<i>Candida famata</i> 91 %	Pilze	/
ISOCA11	<i>Rhodococcus sp.</i> 95 %	Actinom-	<i>Rhodococcus equi</i>
ISOCA12			<i>Bacillus cereus</i>
ISOCA13	<i>Zygosaccharomyces</i> 87	Pilze	/
ISOCA14	n.möglich	n.möglich	Ähnlich: <i>Gordonia</i>
ISOCA15	<i>Bacillus cereus</i> 92 %	Andere	<i>Bacillus mycoides</i>
ISOCA16	<i>Rhodococcus sp.</i> 95 %	Actinomy-	<i>Gordonia cholesterolivorans</i>
ISOCA17	-		Ähnlich: <i>Bacillus</i>
ISOCA18	-	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Lysinibacillus</i>
ISOCA19	-		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
ISOCA20	-	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
ISOCA21	<i>Bacillus cereus</i> 99,5 %	<i>B.acillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
ISOCA22	-		<i>Bacillus frigoritolerans</i>
ISOCA23	-	<i>Bacillus sp.</i>	Ähnlich: <i>B. massiliensis</i>
ISOCA24	<i>Bacillus subtilis</i> 99,5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
ISOCA25	-		<i>Bacillus subtilis</i>
ISOCA26	<i>Brevibacillus</i> 66,9 %		
ISOCA27	-		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Das Isolat IsoCa 17 ist ein grampositives, oxidase-positives Stäbchen mit Sporenbildung. Es weist eine Ähnlichkeit mit *Bacillus pocheonensis* auf, die 16S-rRNAGene zeigen auch hier Abweichungen von der Sequenz von *Bacillus pocheonensis*, so dass es sich bei IsoCa 17 ebenfalls um eine neue Art handelt. Auch die 16S-rRNA Gene von IsoCa 23 weist nur Ähnlichkeit mit der 16S-rRNA Gene einer Art der Gattung *Bacillus* auf, auch hier wird vermutete, dass es sich um ein neu entdecktes Bakterium handelt. Bei den anderen Kolonien handelt es sich um Sporenbildner der *Bacillus*-Spezies, die als Sporen in der sauren Lösung überlebt haben und nicht als vegetative Zellen vorliegen.

3.3.4.5 Kultivierungsunabhängige Charakterisierung: ARDRA-Analyse (Amplified rDNA restriction analysis)

Die Tabelle 3.3.8 zeigt die Ergebnisse der ARDRA- Analyse des AEDS-Konsortiums.

Tabelle 3.3.8: Ergebnisse der ARDRA-Analyse der AEDS-Lösung.

Klon Nr.	Zuordnung 16S rRNA	Verw. %	Accession	bp
2	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1454
3	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	99	AJ459804	1458
5	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
8	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
10	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
39	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
48	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
49	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
55	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	100	AJ459804	1458
65	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	569 F
72	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
88	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
93	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
108	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	99	AJ459804	1458
110	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
126	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
133	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
146	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
163	Acidithiobacillus ferrooxidans / albertensis	98	AJ459804	1458
1	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
30	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
85	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
95	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
118	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
124	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
171	Fulvimonas soli (neue Gattung)	92	NR_025465	1461
4	Rhodanobacter thiooxydans (neue Gattung)	92	AB286179	1461
57	Rhodanobacter thiooxydans (neue Gattung)	92	AB286179	1461
144	Rhodanobacter thiooxydans (neue Gattung)	92	AB286179	1461
17	Acidithiobacillus ferrooxidans strain 2	98	DQ909077	1502
20	Acidiphilium cryptum strain YT1	97	AM502929	1415
26	Uncultured bacterium clone CEM_Eug_c3	98	EU370273	623
36	Uncultured bacterium clone MC1	99	EU662620	813 (F)
40	Acidiphilium cryptum strain Lhet2	97	NR_025851	1415
60	Dokdonella koreensis strain NML 01-0233	94	EF589679	547
63	Dyella yejuensis strain R2A16-10	93	DQ181549	1370
90	Alicyclobacillus ferrooxydans strain TC-34	97	EU137838	1456
94	Dyella yejuensis strain R2A16-10	94	DQ181549	857

Der Großteil der gefundenen Klone stammen von *Acidithiobacillus ferrooxidans/albertensis*. Desweiteren finden sich weitere Bakterienarten, die als Schwefeloxidierer gelten (*Alicyclobacillus ferrooxydans*). *Acidiphilum cryptum* ist ein heterotrophes, azidophiles Bakterium, dass oft mit *Acidithiobacillus* vergesellschaftet ist.

Neben einigen gramnegativen Stäbchen, die oft in Boden und Klärschlamm zu finden sind (*Dyella*, *Dokdonella*), fanden sich zwei Bakteriengruppen, die neben den Schwefelbakterien den Hauptteil der identifizierten Klone aus dem AEDS-Konsortium ausmachen. Zum Einen fand sich ein Bakterium, dessen 16S-rRNA Gene der von *Fulvimonas soli* ähnelt. Die Sequenz lässt sich jedoch nicht genau zuordnen, sodass der Klon die DNA einer neuen Gattung tragen könnte. *Fulvimonas* ist ein gramnegatives Stäbchen, das aus Böden und Schlämmen isoliert werden kann (Mergaert 2002). Der zweite Klon wird der Gattung *Rhodanobacter* zugeordnete. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein neu entdecktes Bakterium handelt. *Rhodanobacter thiooxydans* nutzt Thiosulfat und oxidiert es zu Sulfat (Lee 2007).

3.3.4.6 Zusammenfassung der mikrobiologischen Zusammensetzung von AEDS

Zusammenfassend ist in Tabelle 3.3.9 die in dieser Arbeit ermittelte Zusammensetzung des AEDS-Konsortiums aufgetragen. Die als neu beschriebenen Arten werden durch weitere Untersuchungen charakterisiert.

Tabelle 3.3.9: Zusammensetzung der AEDS-Population

Differenzierung	Art	Ident.	Poly-P
Schwefel/Eisen-oxidierer	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> / <i>albertensis</i>	ARDRA	+
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> strain 2	ARDRA	+
	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i> strain TC-34	ARDRA	n.b.
	NEUE ART: ähnlich <i>Rhodanobacter</i>	ARDRA	n.b.
Sporen negativ	<i>Rhodococcus equi</i>	IsoCa 11	+
	NEUE ART: ähnlich <i>Gordonia hirsuta</i>	IsoCa 14	+
	NEUE ART: ähnlich <i>Gordonia hirsuta</i>	IsoCa 8	+
	<i>Gordonia cholestrolivorans</i>	IsoCa 16	+
	NEUE ART: ähnlich <i>Fulvimonas soli</i>	ARDRA	n.b.
	<i>Acidiphilium cryptum</i> strain Lhet2	ARDRA	n.b.
	<i>Acidiphilium cryptum</i> strain YT1	ARDRA	n.b.
	<i>Dokdonella koreensis</i> strain NML 01-0233	ARDRA	n.b.
	<i>Dyella yejuensis</i> strain R2A16-10	ARDRA	n.b.
Sporen positiv	<i>B. subtilis</i>	IsoCa 21, 24, 25	-
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	IsoCa 19, 27	-
	NEUE ART: ähnlich <i>B. pocheonensis</i>	IsoCa 17	-
	NEUE ART: ähnlich <i>B. massiliensis</i>	IsoCa 23	-
	<i>B. cereus</i>	IsoCa 12	-
	<i>B. mycoides</i>	Iso Ca 15	-
	<i>B. frigoritolerans</i>	IsoCa 22	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	IsoCa 20	-
	<i>Lysinibacillus parviboronicarpiens</i>	IsoCa 18	-
Pilze	<i>Hefen</i>	IsoCa1-6, 10, 13	-
Unidentifiziert	<i>IsoCa 26</i>		
	<i>Uncultured bacterium clone CEM_Eug_c3</i>	ARDRA	n.b.
	<i>Uncultured bacterium clone MC1</i>	ARDRA	n.b.

*Polyphosphatfärbung positiv in Reinkultur, n.b: nicht bestimmt, da nicht kultivierbar

4 Diskussion

4.1 Bioleaching zur Reinigung schwermetallbelasteter Feststoffe

Die Dekontamination von Feststoffen ist in Anlehnung an das Mietenleaching, durch die Entwicklung eines Perkolatorsystems umgesetzt worden. Bereits durchgeführt wird das Bioleaching als Dekontaminationsstrategie für Klärschlamm (Couillard und Chartier, 1991), kontaminierte Sedimente (Chartier et al., 2001; Löser et al., 2007), Böden (Kumar und Nagendran, 2009) und Aschen aus der Müllverbrennung (Brombacher et al., 1998; Ishigaki et al., 2005). Über das Bioleaching von Klärschlammaschen und Industrieaschen gibt es keine experimentellen Daten. Um das Bioleaching als generell anwendbare Dekontaminationsstrategie abzuschätzen und um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen, war es wichtig, alle Feststoffe unter definierten Bedingungen zu behandeln. Daher wurden einheitliche Bedingungen gewählt wie den Bioleachingperkolator, die zeitliche Begrenzung der Versuche auf acht Tage und die definierten Kulturbedingungen von *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans*.

4.1.1 Eigenschaften der Feststoffe

Die Charakterisierung der Feststoffe vor dem Einsatz in den Bioleachingperkolator sollte Anhaltspunkte über die Ausgangsbelastung geben. Die Eigenschaften der gewählten Feststoffe unterschieden sich beträchtlich. Die größten Unterschiede gab es bei der Säurekapazität der Feststoffe in wässriger Lösung und der Metallbelastung der Feststoffe. Die Metallkonzentrationen in Faulschlamm, Zyklonfilterasche, Deponiematerial und Brennraumasche waren hoch, wiesen jedoch keine Spitzenbelastungen auf. Die Klärschlammasche und Rostofenasche enthielten Spitzenkonzentrationen an Kupfer, Zink und Blei. Der Boden war stark arsen- und bleibelastet, die Schlacke hatte hohe Chromkonzentrationen. Die Heterogenität der Metallbelastungen in den Feststoffen ermöglicht eine Bewertung des Bioleachings zur Reinigung hoch kontaminierter Feststoffe und den Einsatz zur Dekontamination von Materialien mit Spitzenbelastungen.

4.1.2 Einflussfaktoren auf das Bioleaching von metallbelasteten Feststoffen

Es konnte aus allen Feststoffen Metalle gelöst werden, die Metallfreisetzung zeigte jedoch deutliche Unterschiede, je nach Art des Feststoffs. Zunächst hat die Säurekapazität des Feststoffs in wässriger Lösung einen großen Einfluss auf den Bioleachingprozess. Desweiteren zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen thermisch behandelten (Aschen) und natürlichen Proben (Boden). Die teils sehr hohen Metallkonzentrationen zeigen die Grenzen des Bioleachings auf. Im Folgenden werden drei Parameter beschrieben, die den Bioleachingverlauf stark beeinflussen.

Säure-/Pufferkapazität: Maßgeblich für eine gute Abreicherung ist das Verhalten der Feststoffe in wässriger Lösung. Es zeigte sich, dass die Bakterienaktivität im Medium durch zu hohe pH-Werte, gekoppelt mit einer hohen Säurekapazität, beträchtlich verringert wird. Als Marker für die Bakterienaktivität hat sich neben der Biofilmbildung, die Messung der Sulfatkonzentration als sensitiv und reproduzierbar herausgestellt. Feststoffe, die in wässriger Lösung eine Säurekapazität ≤ 36 mmol/l aufweisen, lassen sich mit einem einstufigen Bioleachingverfahren behandeln. Bei Werten > 36 mmol/l wird ein zweistufiges Bioleaching empfohlen. Dabei werden in der ersten Stufe alle alkalisch wirkenden Substanzen und säurelöslichen Metalle entfernt. In der zweiten Stufe bleibt der pH-Wert in der Bioleachinglösung konstant und es bieten sich optimale Bedingungen für die Mikroorganismen. Für Feststoffe, die in wässriger Lösung eine geringe Säurekapazität aufweisen, kann der zweistufige Bioleachingprozess zu einer gesteigerten Metallfreisetzung führen. Es können bis zu 20% mehr Metalle aus dem Feststoff gelaugt werden.

Matrix des Feststoffs und Bindungszustand der Metalle: Das Material und die Vorbehandlung des Feststoffs ist ein entscheidendes Kriterium für den Bioleachingerfolg. Besonders deutlich wird dies bei der Freisetzung von Blei. Im Vergleich mit den natürlichen Proben (Boden, Faulschlamm) zeigen die thermisch behandelten Feststoffe (Klärschlammasche, Verbrennungaschen) kaum bzw. keine Laugung von Blei.

Eine generalisierte Erklärung liefern Brombacher et al. (1998): Das Laugen von Blei steht in Konkurrenz mit einer Fällung des Bleis mit dem entstehenden Sulfat. Vergleicht man jedoch die Blei-Laugung aus den thermisch behandelten Feststoffen mit der der natürlichen Proben, fällt auf, dass sich die schlechte Blei-Laugung auf die thermisch behandelten Feststoffe beschränkt. Die schlechte Bleilöslichkeit der thermisch behandelten Aschen ist auf Matrixeffekte zurückzuführen und ist nicht bedingt durch Fällungsreaktionen. Im Verlaufe des Bioleachings konnte zu keinem Zeitpunkt Blei in der Leachinglösung der Aschen nachgewiesen werden. Durch den thermischen Behandlungsschritt könnten sich Bleiverbindungen bilden, die weder säurelöslich noch für die Bakterien zugänglich sind.

Die Laugung von Blei aus dem natürlichen Proben lässt sich mit Werten aus der Literatur in Einklang bringen. Der Wert für Klärschlamm in dieser Arbeit ist mit bis zu 75% in Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Die Freisetzung von Blei aus Klärschlamm mit Bioleaching liegt bei Tyagi et al. (1993) bei 0-31 %, bei Blais et al. (1993) bei 9-17 % und bei Ryu et al. (2003) bei 30-99%. Die detektierte Bleifreisetzung aus dem Boden (37%) stimmt mit den gefundenen Literaturwerten von 27-60 % (Kumar und Nagendran 2007, Kumar und Nagendran 2009) überein. Für das Deponierungsmaterial (3% Bleirücklösung) können keine Literaturwerte angegeben werden.

Ein weiterer Matrixeffekt zeigt sich bei der Freisetzung von Zink. Bei saurem pH-Wert löst sich Zink sehr gut aus dem Klärschlamm und den Verbrennungsaschen. Beim Laugen des Bodens konnte jedoch keine Freisetzung von Zink gemessen werden, obgleich die Belastung deutlich niedriger ist als in den anderen Feststoffen. Sequentielle Extraktionen zur Aufklärung der Bindungsverhältnisse in Böden deuten darauf hin, dass Zink zum Großteil an Silikate gebunden ist (Ure et al. 1993, Carbonell et al. 2009). Es wird vermutet, dass die Bindung von Zink an das Bodenmaterial komplexer ist als in den Verbrennungsaschen. Dadurch sinkt die Bioverfügbarkeit des Zinks. Im Gegensatz dazu ist die Zinkfreisetzung aus ausgefaultem Klärschlamm sehr hoch. Im ausgefaulten Klärschlamm ist Zink zum Großteil an die organische Matrix assoziiert (Alvarez et al. 2002) und gut bioverfügbar. Die anaerobe Inkubation von Klärschlamm begünstigt zusätzlich die Bildung von Metallsulfiden, die von den Bakterien als Substrat genutzt werden (Hayes und Theis 1978, Wong und Henry 1984b).

Durch das vergleichende Bioleaching wird deutlich, dass die Vorbehandlung der Feststoffe einen sehr großen Einfluss auf die Dekontamination durch Bioleaching hat. Bei moderat belasteten Aschen ist ein einstufiges Bioleaching ausreichend. Sollen jedoch gezielt bestimmte Metalle abgereichert werden, muss die Behandlung des Feststoffs mit in Betracht gezogen werden. Um Blei zufriedenstellend zu entfernen, sollte auf einen Verbrennungsschritt verzichtet werden. Ist Zink hochkonzentriert, bietet sich eine Faulturmbehandlung an, um das Zink in bioverfügbarere Sulfide umzuwandeln.

Metallbelastung: Der Vergleich von Feststoffen mit unterschiedlichen Metallbelastungen zeigt deutlich die Grenzen des Bioleachingverfahrens. Trotz guter Freisetzungsraten kann der Feststoff bei sehr hohen Belastungen im Rahmen der gewählten Bedingungen nicht zufriedenstellend und nach gesetzlichen Vorgaben abgereichert werden. Dennoch können innerhalb von acht Tagen Feststoffe mit einem Metallaufkommen ohne Spitzenbelastung, wie sie sich im ausgefaulten Klärschlamm und in der Zyklonfilterasche darstellt, so aufgereinigt werden, dass sie nicht mehr deponiert werden müssen.

Eine toxische Wirkung der freigesetzten Metalle auf die Bakterien kann ausgeschlossen werden. *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *thiooxidans* können sehr hohe Metallgehalte tolerieren. Die Einordnung der Feststoffe nach LAGA wird in die Gesamtbewertung des Bioleachings einbezogen. Es findet unter den standardisierten Bedingungen eine beträchtliche Metallabreicherung durch das Bioleaching statt, die aber nach LAGA nicht ausreicht, um eine Unbedenklichkeit auszusprechen. Für einige der untersuchten Feststoffe kann durch die Bioleachingbehandlung von einer Deponierung abgesehen werden. Faulschlamm, Zyklonfilterasche, Brennraumasche und das Deponiesediment können nach den LAGA-Richtlinien wieder eingesetzt werden. Das Bioleachingverfahren ist auch mit Blick auf die LAWA-Richtlinie (Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser) erfolgversprechend.

Fazit: Die obengenannten Parameter lassen im Vorfeld der Bioleachingbehandlung eine Prognose zu, inwieweit eine Sanierung des Feststoffs erfolgreich sein kann (Abbildung 4.1.1).

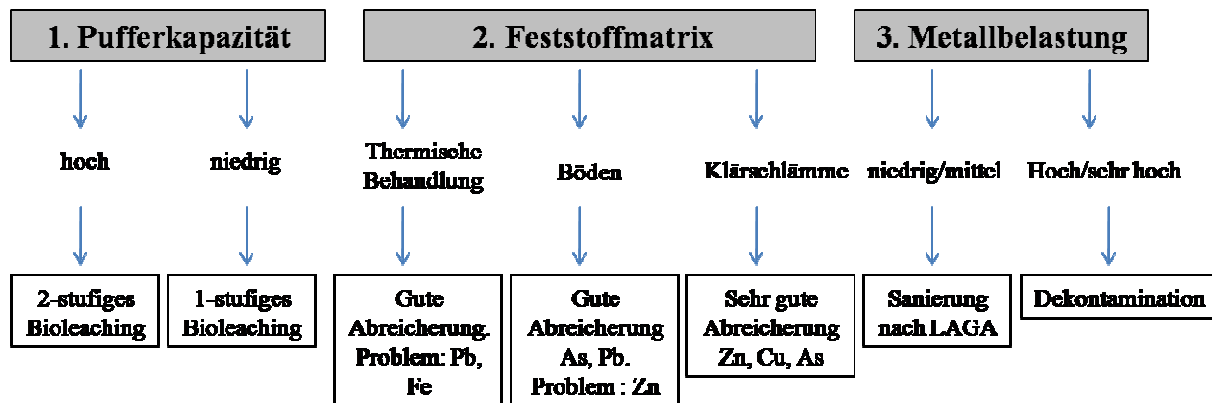


Abbildung 4.1.1: Schema zur Beurteilung des Sanierungserfolges von Feststoffen durch das Bioleachingverfahren im Vorfeld der Versuchsplanung.

Unter den hier gewählten standardisierten Bedingungen zeigt sich, dass mit dem Bioleachingverfahren in Abhängigkeit von den Feststoffeigenschaften immer Metalle gelaugt werden können. Bei einer hohen Säurekapazität in der wässrigen Lösung der Feststoffe kann im Vorfeld über ein ein- oder zweistufiges Bioleachingverfahren entschieden werden. Die Vorbehandlung des Feststoffs hat großen Einfluss auf die Laugung von Blei. Aus thermisch behandelten Feststoffen lässt sich kein Blei laugen. Die Einordnung der Metallgehalte der Feststoffe nach LAGA ermöglicht eine Bewertung des Bioleachingverfahrens nach gesetzlichen Vorgaben. Die Ermittlung der Feststoffeigenschaften vor der Bioleachingbehandlung ermöglicht eine Prozessoptimierung im Vorfeld des Prozesses, die die Sanierungsleistung mit Bioleaching steigern kann.

4.1.3 Toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des gelaugten Feststoffs

Ob die Sanierung eines Feststoffs erfolgreich ist, zeigt sich nicht nur durch die Entfernung von Schwermetallen, sondern auch anhand seiner reduzierten Ökotoxizität. Das Lösen von Metallen aus Feststoffen kann jedoch zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit der Metalle und somit gesteigerter Toxizität des Feststoffs führen. Neben den mobilisierten Metallen im Feststoff können veränderte Redoxverhältnisse in der Lösung, der niedrige pH-Wert, die hohen Sulfatkonzentrationen und das Auftreten von toxischen Metallspezies Einfluss auf die Toxizität von Feststoff und Bioleachinglösung haben. Der Einfluss des Bioleachings auf den Feststoff wurde mittels ökotoxikologischer Tests bewertet. Es wurden Testbatterien gewählt, mit denen gezielt der Austragungspfad Feststoff-Grundwasser eingestuft werden kann. Neben der

Mobilisierung der Metalle im Feststoff können in der Bioleachinglösung toxische Metallspezies entstehen. Daher wurden das Verhalten von Chrom und die Bildung von Chrom(VI), als Beispiel für eine hochtoxische Metallspezies, während des Bioleachings untersucht.

Ökotoxikologische Bewertung der Feststoffe: Die Ökotoxizität der Feststoffe vor und nach Bioleaching wurde mit Klärschlammasche als Vertreter der thermisch behandelten Feststoffe sowie mit einer natürlichen, stark belasteten Probe, dem Boden aus der Bleiverhüttung in Stolberg, untersucht. Die Bewertung der Testergebnisse erfolgt nach dem Vorschlag der DECHEMA zur ökotoxikologischen Bewertung des Pfades Boden-Grundwasser des Jahres 2005 (siehe Abschnitt 3.1.3).

Die Bioleachingbehandlung konnte die Ökotoxizität für beide Feststoffe verringern. Es wird deutlich, dass auch hier die Matrix des Feststoffs eine große Rolle spielt. Schon in den Eluaten zeigt sich, dass die Metalle in der Asche anders gebunden sind als im Boden. Die Asche zeigt eine insgesamt höhere Metallmobilität als der Boden, obgleich die Ausgangswerte der Metalle im Boden teilweise höher ausfallen (Bsp. Arsen, Blei).

Wird die Asche nach der Bioleachingbehandlung mit Wasser eluiert, verringert sich der Aus-
trag von Schwermetallen in die wässrige Lösung. Bereits nach acht Tagen Bioleaching wird die nachträgliche Eluierbarkeit von Metallen mit Wasser verringert. Die Metallgehalte im Eluat liegen zwar über den gesetzlichen Vorgaben nach LAWA, das Bioleachingverfahren ist jedoch erfolgversprechend für die Festlegung von Metallen im Feststoff.

Bei der Elution des Bodens werden mehr Metalle gelaugt als vor der Behandlung. Der Boden ist den normalen Witterungsbedingungen ausgesetzt. Wassereluierbare Metalle wurden bereits durch Regenwasser aus dem Boden entfernt. Somit lösen sich vor dem Bioleaching weniger Metalle im Eluat als im Eluat nach der Laugung. Mit der Bioleachingbehandlung ändern sich sowohl Redoxpotential als auch pH-Wert des Bodens. Dies kann zu einer nachträglichen Mobilisierung von Metallen führen, die zuvor in der Matrix des Bodens festgebunden vorlagen und nun wassereluierbar werden. Die Metallgehalte liegen jedoch deutlich unter den Grenzwerten nach LAWA.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus den ökotoxikologischen Tests zeigt es sich, dass beide Feststoffeluat erhöhte LID-Werte vor dem Bioleaching aufweisen, die nach dem Bioleaching sinken. Die Verringerung der Ökotoxizität der beiden Feststoffe ist in Tabelle 4.1.1 im Vergleich mit dem Bewertungsschema nach DECHEMA aufgetragen.

Tabelle 4.1.1: LID-Werte von Asche und Boden vor und nach Bioleaching im Vergleich mit den Toxizitätsschwellen der DECHEMA

<u>Asche</u>		<u>Boden</u>		LID-Werte DECHEMA, 2005
Vor	Nach	Vor	Nach	
16	16	32	16	Algentest > 4
8	2	2	2	Daphnientest > 4
8	8	32	8	Lumitest >8
2	2	2	2	Wachstumstest V. fischerii > 2
64	2	Kein Ergebnis		Wachstumstest Ps.putida > 2

Interessant ist, dass die Testbatterie unterschiedlich auf die Eluate der beiden Feststoffe reagiert. Bei der Asche sind die LID-Werte der chronischen Tests erhöht, während der Boden erhöhte LID-Werte bei den akuten Tests hat.

Der Daphnientest (chronisch) gilt als besonders sensitiv für eine Schwermetallbelastung (Neufeld und Wallach 1984) reagiert auf das Ascheeluat. Eine Korrelation mit einem bestimmten Metall ist jedoch nicht möglich. Der Boden weist eine geringere Metallbelastung im Eluat auf, die das Wachstum der Daphnien nicht beeinträchtigt. Die hohe Leitfähigkeit in beiden Feststoffeluaten könnte zu den erhöhten LID-Werten im Algentest führen. Für den Algentest konnte eine Korrelation zwischen der Leitfähigkeit eines Eluats und seiner Algentoxizität gemacht werden (Latif und Zach 2000). Der Lumineszenzhemmtest reagiert in Anwesenheit von AOX-Verbindungen (Kostka-Rick 2004). Generell ist der AOX-Gehalt in Aschen geringer als in Böden. Dies könnte eine Erklärung für die erhöhten LID-Werte im Lumineszenzhemmtest des Bodens sein.

Der Einsatz ökotoxikologischer Testsysteme erweist sich als sinnvoller Parameter zur Einschätzung des Bioleachings und sollte für eine ganzheitliche Betrachtung eines Prozesses immer hinzugezogen werden.

Toxikologische Bewertung - Chrom(VI): Durch die Freisetzung der Metalle und den niedrigen pH-Wert kann die Bakterienlösung nach der Bioleachingbehandlung nicht der kommunalen Abwasserbehandlung zugeführt werden. Überlegungen zur Verwertung der Bioleachinglösung gehen in Richtung Recycling der zurückgewonnen Metalle (Cu, Zn) aus der Lösung. Bei der Aufarbeitung der Lösung ist es wichtig zu wissen, mit welchen Metallen man umgehen muss. Daher wurde in dieser Arbeit die Entstehung toxischer Metallspezies während des Bioleachingprozesses untersucht. Chrom(VI) wurde gewählt, da es sich um eine der toxischsten Metallspezies handelt und leicht auf Änderungen im Redoxpotential reagiert.

Wichtige Einflussgröße zur Bildung von Chrom(VI) sind die Redoxverhältnisse in der Lösung. Beim chemischen Leaching mit anorganischen Säuren ändert sich das Redoxpotential in der Lösung nicht (Fang et al. 2007). Durch Bakterienaktivität wird das Redoxpotential jedoch erhöht. Die oxidative Umgebung begünstigt die Entstehung von Chrom(VI).

In der Tat stellte sich heraus, dass es kurzzeitig zu einem Auftreten von Chrom(VI) in der Umgebungslösung kommt. Das entstandene Chrom(VI) wird schnell zu Chrom(III) reduziert, da es als starkes Oxidationsmittel in Gegenwart von anderen Elektronengebern schnell zu Chrom(III) umgesetzt werden kann (Topf 2007). Neben der chemischen Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III), hat *A. ferrooxidans* die Fähigkeit, Chrom(VI) in seiner EPS (Extrazellulären Polymeren Substanz) zu Chrom(III) zu reduzieren und präzipitieren (Baillet et al. 1998). Ob es sich bei der Konversion um eine chemische Reduktion oder mikrobiologisch induzierte Präzipitation durch *A. ferrooxidans* handelt, lässt sich nur vermuten. Eine Präzipitation von Arsen-Verbindungen in der extrazellulären polymeren Substanz von *Acidithiobacillus* wurde bereits beobachtet (Baillet et al. 1998).

4.2 Bioleaching zur Wertstoffrückgewinnung

4.2.1 Phosphorrücklösung aus Feststoffen

Die Nutzung des Bioleachingprozesses zur Rückgewinnung von gebundenem Phosphor aus phosphorreichen Feststoffen ist gelungen. Die gelaugten Feststoffe stammen aus der Abwasserbehandlung, die eine Senke für Phosphorverbindungen darstellt. Zunächst wurde Klärschlammasche einer Monoverbrennungsanlage mit dem Bioleachingverfahren behandelt. Dort konnte eine Rücklösung von bis zu 93% des gebundenen Phosphors erreicht werden. Dies entspricht der mit chemischer Laugung oder thermischer Behandlung erzielten Rücklösung von Phosphor aus Klärschlammasche (Adam 2008). Bei einem Gehalt von 74 mg P/g Asche ist die Rücklösung von wirtschaftlichem Interesse.

Neben der Freisetzung von Phosphor werden die Schwermetalle in Lösung gebracht. In Abhängigkeit vom gelaugten Feststoff kommt es hierbei zu Unterschieden in der Metallfreisetzung. Blei und Eisen verbleiben in der thermisch behandelten Klärschlammasche, während sie aus dem Faulschlamm gelöst werden. Die in Kapitel 4.1 beschriebenen Matrixeffekte der thermisch behandelten Feststoffe erweisen sich bei der Phosphorrücklösung als Vorteil. Zur Produktion von Düngemitteln (Magnesium-Ammonium-Phosphat, Calciumphosphat) durch die Fällung von Phosphat aus der Bioleachinglösung müssen die Grenzwerte für Metalle, z.B. Blei, nach Düngemittelverordnung (DüMV 2008) (Tabelle 4.2.1) unterschritten werden.

Tabelle 4.2.1: Kennzeichnungs- und Grenzwerte für Schwermetalle nach der Düngemittelverordnung (DüMV, 2008).

Analyt	Kennzeichnungspflicht [mg/kg TG]	Grenzwert [mg/kg TG]
As	2	4
Pb	20	40
Cd	1	1,5
Cr	300	-
Cr(VI)	1,2	2
Ni	40	80

Um die Phosphorrücklösung nicht auf Klärschlammaschen aus Monoverbrennungsanlagen festzulegen, wurde auch Klärschlamm direkt zur Phosphorrückgewinnung eingesetzt. Die Phosphorgehalte der einzelnen Schlammproben wurden mit den Metallgehalten ins Verhältnis gesetzt, um die besten Voraussetzungen für eine praktikable Phosphorrückgewinnung zu gewährleisten, der Rücklaufschlamm zeigte hierbei das beste Verhältnis Phosphor-Metalle.

Zur Rücklösung von Phosphor wurde Faulschlamm eingesetzt, begründet durch den höheren Hygienisierungsgrad des Schlamms. Neben der Hygienisierung durch die anaerobe Schlammbehandlung findet eine zusätzlich saure Stabilisierung des Schlamms durch das Bioleachingverfahren statt, die zu einem zusätzlichen Abtöten pathogener Mikroorganismen durch die sauren und oxidativen Bedingungen führt (Pathak et al. 2009). Die Anzahl coliformer Bakterien verringert sich sehr schnell mit der Abnahme des pH-Wertes während des Bioleachingprozesses (Blais et al. 2001).

Die Rücklöseraten für Phosphor aus Faulschlamm erreichen bis zu 85% des im Schlamm gebundenen Phosphors. Die Schwermetalle werden insgesamt deutlich besser freigesetzt als bei der Asche. Blei und Eisen lösen sich aus dem Schlamm und verbleiben in der Lösung. Das Verhältnis zwischen Phosphor und Metallen liegt im Faulschlamm auf Seiten der Metalle, obwohl die Metallbelastung geringer ist als in der Asche.

Das Verhältnis Phosphor-Metalle in der Aschelösung liegt auf Seiten des Phosphors. Die gute Rücklösung von Magnesium und Calcium, als neben Phosphor wichtige Pflanzennährstoffe, ist ein zusätzlicher Vorteil gegenüber dem Faulschlammeaching, bei dem die Rücklösung von Calcium und Magnesium verringert ist.

Fazit: Die Rücklösung von Phosphor aus Klärschlamm und Klärschlammasche ist eine vielversprechende Alternative zur chemischen Laugung mit anorganischen Säuren. Als Substrat eignet sich die Klärschlammasche besser, da sie zum einen deutlich höhere Phosphorkonzentrationen aufweist, und es zum anderen durch die thermische Behandlung zu einem fraktionierten Bioleaching kommt, in dessen Verlauf Blei und Eisen im Feststoff verbleiben. Voraussetzung für die Phosphorlaugung aus Asche ist die Monoverbrennung. Durch die

Mitverbrennung von Haus-oder Sondermüll würde der Metallgehalt im thermisch behandelten Reststoff steigen und das Verhältnis Phosphor-Metall verschieben. Alternativ ist die Phosphorlaugung aus Klärschlamm möglich, kann jedoch durch die sehr gute Metallrücklösung größere Probleme bei der späteren Aufarbeitung des Phosphors mit sich bringen.

4.3 Phosphorrefixierung

Das Recycling von Klärschlammasche zur Phosphorrückgewinnung ist Gegenstand zahlreicher Forschungsschwerpunkte und Verfahren (PASCH, SEPHOS, BioCon). Bei diesen Verfahren wird der Phosphor durch chemische Laugung mit starken Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure) aus der Asche gelaugt und die Schwermetalle mittels aufwendiger Membran- oder Fällungsverfahren abgetrennt. Zusätzlich gibt es Verfahren, die eine thermische Nachbehandlung der Asche durchführen, um die Schwermetalle zu verdampfen (SUSAN, Mephrec). Diese Verfahren sind meist sowohl kosten- als auch energieintensiv.

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zur Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlammasche sieht eine biologische Prozesskombination vor, in der der Phosphor und die Schwermetalle aus der Asche gelöst werden und der rückgelöste Phosphor von den Metallen abgetrennt und recycelt werden kann. Die Kombination zweier biotechnologischer Verfahren zeigt sich als vielversprechender Ansatz zur Nutzung phosphorhaltiger Reststoffe. Durch die Anreicherung eines syntrophen Bakterienkonsortiums, das Phosphor und Schwermetalle im Bioleachingprozess freisetzen kann und freigesetzten Phosphor in der Biomasse refixiert, ist das Verfahren einer biologischen Phosphorrückgewinnung erstmals umgesetzt worden. Die Charakterisierung des Phosphorprodukts sowie die Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen sollen die mechanistische Aufklärung des Prozesses ermöglichen.

4.3.1 Bioleaching und biologisch induzierte Phosphorrückgewinnung

4.3.1.1 Anreicherung des AEDS-Konsortiums

Das Bioleaching mit schwefeloxidierenden autochthonen Mikroorganismen aus Klärschlamm ist ein gut beschriebenes Verfahren zur Entfernung von Schwermetallen aus Klärschlamm (Couillard und Mercier 1993, Shanableh und Omar 2003). Der Fokus der bisherigen Untersuchungen lag bisher ausschließlich auf der Entfernung von Schwermetallen aus dem Klärschlamm, ohne eine genauere Betrachtung über den Verbleib des Phosphors anzustellen. In dieser Arbeit wird das Bioleaching mit schwefeloxidierenden Mikroorganismen nach Shanableh und Omar (2003) durchgeführt, unter besonderer Berücksichtigung des Phosphorverbleibs. Im Unterschied zu der Vorgehensweise von Shanableh und Omar (2003) wurde zur Anreicherung anaerob stabilisierter Klärschlamm mit biologischer Phosphoreliminierung, statt Boden und eine Klärschlammmixtur, eingesetzt. Der Grund lag in der Überlegung neben den schwefeloxidierenden Mikroorganismen Bakterien anzureichern, die anorganisches Phosphat entweder in Form von Polyphosphaten speichern können oder den Phosphor anderweitig

in der Biomasse fixieren. Der Einsatz anaerob stabilisierten Klärschlamm hat zudem den Vorteil, arm an organischen Schadstoffen und pathogenen Mikroorganismen zu sein (Fritsche 1998). Der Verlauf der Anreicherung ist ein stabiler Prozess, dessen größte Abhängigkeit in einer ausreichenden Belüftung liegt. Die Kontrolle der Bakterienaktivität lässt sich gut über den sinkenden pH-Wert überwachen, so dass keine aufwändigen Messungen notwendig sind um den Prozess zu stabilisieren.

Durch das Absenken des pH-Werts wird die Schlammszusammensetzung deutlich verändert, es kommt zu einer Freisetzung von Phosphor und Schwermetallen. Kupfer, Blei und Zink gehen in Lösung, zusätzlich steigen sowohl der Proteingehalt der Lösung, der Huminstoffgehalt und die Sulfatkonzentration. Die Vermehrung der Biomasse zeigt sich an der gestiegenen Trockenmasse und an dem erhöhten Glühverlust des Schlamms. Der Vorteil dieser Form der Bakterianreicherung ist die Gewinnung eines biotechnologisch hochinteressanten Bakterienkonsortiums AEDS und die gleichzeitige Aufarbeitung problematischer Klärschlämme durch Bioleaching. Der Schlamm ist für einen Einsatz in der Landwirtschaft nutzbar. Die Vorteile dieses Schlamms sind der niedrige Gehalt an Schwermetallen, die zusätzliche Hygienisierung (Pathak et al. 2009) und der gestiegene Huminstoffgehalt. Für die Ausbringung des Schlamms in der Landwirtschaft muss die Prozesssteuerung so verlaufen, dass der dem Schlamm zugegebene Schwefel von den Bakterien ganz umgesetzt wurde, um eine erneute Besiedlung des ausgebrachten Schlamms mit säurebildenden Schwefeloxidierern zu vermeiden. Der niedrige pH-Wert des Schlamms kann durch Aufkalken neutralisiert werden.

4.3.1.2 Phosphorrückgewinnung und Schwermetallfreisetzung mit AEDS

Mit der Reinkultur *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans* konnten 95% des in der Asche gebundenen Phosphors gelöst werden (Abschnitt 3.2.3). Mit der AEDS-Kultur waren es 66%. Jedoch enthalten die AEDS-Lösungen nach Bioleaching einen höheren Phosphorgehalt, der aus dem Anreicherungsprozess aus Klärschlamm stammt. Durch die Kombination der Anreicherung aus einem Klärschlamm und des anschließenden Bioleachings von Klärschlamm asche kommt der Phosphorgehalt auf eine Konzentration, die wirtschaftlich interessant ist.

Die schlechtere Löslichkeit des Phosphors aus der Klärschlamm asche mit AEDS im Vergleich zur Reinkultur beruht vermutlich zum Einen auf der Verwertung des Phosphors durch andere Mikroorganismen in der AEDS-Lösung, zum Anderen kann der hohe DOC-Wert Einfluss auf das Wachstum der chemolithoautotrophen Bioleachingbakterien haben. Zusätzlich kann der erhöhte Huminstoffgehalt der Lösung zu einer Komplexierung von Eisen- Mangan- und Phosphationen führen (Eifler 2005). Somit wird den Bakterien Eisen entzogen, das sie zur Energiegewinnung benötigen. Auch Phosphor wird der Lösung als freies *ortho*-Phosphat entzogen.

Das Bioleaching von Blei kommt mit der AEDS-Lösung zu einem vergleichbaren Ergebnis wie die Freisetzung mit Reinkulturleaching. Die thermische Vorbehandlung des Feststoffs ist auch hier der Grund der schlechten Bleifreisetzung (Abschnitt 3.1.5). Die Freisetzung von Calcium und Magnesium, sowie die von Kupfer und Chrom aus der Asche mit AEDS sind geringer als mit der Reinkultur. Die gelösten organischen Verbindungen, insbesondere Essig- und Propionsäure, in der AEDS-Lösung können hier der Grund für eine verringerte Metallfreisetzung sein. Die Bioleaching-Bakterien der *Acidithiobacillus*-Arten sind chemolithoautotroph und werden durch organische Säuren, insbesondere Essig- und Propionsäure, gehemmt. Dadurch unterbleibt die Freisetzung von Chrom aus dem Feststoff (Gu und Wong 2004, 2005), ebenso die Freisetzung von Kupfer. In Bezug auf die Phosphorrückgewinnung hat eine schlechtere Metalllöslichkeit den Vorteil, dass die Leachinglösung weniger Metalle enthält, die bei der anschließenden Phosphorrefixierung im Feststoff gebunden werden könnten.

4.3.1.3 Phosphorfällung und –akkumulation

Die Kombination einer biologisch induzierten Phosphorfällung mit der Bildung von Polyphosphaten ist in dieser Arbeit gelungen.

Dabei zeigte es sich, dass das Verhalten von Eisen während des Prozesses in engem Zusammenhang mit dem sinkenden Phosphorgehalt in der Lösung steht. Dies wird in der Betrachtung der erstellten Kinetiken und molaren Verhältnisse über das Verhalten von Eisen und Phosphor deutlich. Der Eisengehalt der Lösung verringert sich wie der Phosphorgehalt nach Ablauf von elf Tagen stark. Es kann angenommen werden, dass es sich hierbei um eine mikrobiologisch induzierte Fe(III)-Phosphatfällung handelt. Eine Eisenphosphatfällung unter sauren Bedingungen wurde bei Bioleachingversuchen mit *Acidithiobacillus* in Klärschlamm beobachtet (Drogui et al. 2005). Das durch die Stoffwechselaktivität von *Acidithiobacillus* gebildete Fe(III) wird in der EPS der Bakterien stabilisiert (Gehrke et al 1998). Hier gebunden, bietet es sich dem Phosphorsäureanion als Bindungspartner an und fällt als wasserunlösliches Fe(III)-Phosphat aus. Dieser Prozess kann bei einer Sanierung von Klärschlämmen durch endogen angereicherte Acidithiobacillen von Nachteil sein. Die Bakterien benötigen das Eisen zur Aufrechterhaltung ihres Energiebedarfs. Durch die Fällung wird es ihnen entzogen. Im Hinblick auf die Phosphorrückgewinnung ist dieser Vorgang ein großer Vorteil und ermöglicht eine biologisch induzierte Rückgewinnung.

Betrachtet man den Verlauf der Phosphorkonzentration und Molarität in der AEDS Lösung, fällt auf, dass der Phosphorgehalt einige Tage vor der Eisenkonzentration sinkt. Zu diesem Zeitpunkt wird das gelöste Phosphat vermutlich in Form von Polyphosphaten im Zellinneren der neu entdeckten Bakterienarten gespeichert. Durch eine spezifische Färbung von intrazellulärem Polyphosphat konnten Bakterien in der AEDS-Lösung nachgewiesen werden, die Polyphosphatgranula im Zellinneren aufweisen (Abschnitt 3.3.4.3). Die Ergebnisse der Fär-

bung erhärten die Annahme der Polyphosphatspeicherung im ersten Abschnitt der Phosphorrefixierung. Die Kombination der beiden Prozesse wird von unterschiedlichen Bakterienarten durchgeführt, die nur als gemeinschaftliche Population dieses Verhalten zeigen.

Durch die chemische Extraktion zur Aufklärung der Bindungsverhältnisse im Feststoff konnten die Vermutungen zum Refixierungsprozess bestätigt werden. Der größte Anteil des im Produkt vorliegenden Phosphors ist an Eisen gebunden. Dabei wird unterschieden zwischen einer Kopräzipitation mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ und einer direkten Fällung mit $\text{Fe}(\text{III})$ -Ionen. Durch die Wahl des Extraktionsmittels kann zwischen beiden Eisenfällungen unterschieden werden. Nur ein kleiner Teil des Phosphors im Produkt ist an $\text{Fe}(\text{OH})_3$, an $\text{Fe}(\text{III})$ -Ionen gebundener Phosphor macht den Hauptteil des im Feststoff vorliegenden Phosphors aus. Die Kopräzipitation mit Eisenhydroxid findet nur dann statt, wenn eine chemische Oxidation von $\text{Fe}(\text{II})$ zu $\text{Fe}(\text{III})$ stattfindet, da $\text{Fe}(\text{III})$ in der Lösung nicht stabilisiert wird. Fällt Eisenhydroxid aus, können Metallionen komplexiert und Phosphatanionen als Liganden mit ausgefällt werden (Faramaz et al. 2005). Die abiotische Oxidation von $\text{Fe}(\text{II})$ zu $\text{Fe}(\text{III})$ fällt bei pH-Werten unter 3 jedoch vernachlässigbar klein aus (Rohwerder et al. 2003).

Bei der biologischen Oxidation von $\text{Fe}(\text{II})$ zu $\text{Fe}(\text{III})$ werden die $\text{Fe}(\text{III})$ -Ionen in der EPS der Bakterien stabilisiert und stehen dem Phosphatanion als Bindungspartner zu Verfügung, $\text{Fe}(\text{III})$ -Phosphat fällt aus.

Dass es sich bei der Oxidation von $\text{Fe}(\text{II})$ zu $\text{Fe}(\text{III})$ um einen biologisch katalysierten Prozess handelt, wird durch die Ergebnisse zur Untersuchung der Einflussgröße auf die biologische Phosphorrückgewinnung bestätigt. Die optimale Umsetzung von $\text{Fe}(\text{II})$ zu $\text{Fe}(\text{III})$ kann bei pH2 beobachtet werden. Besonders bei niedrigen Eisenkonzentrationen in der AEDS-Lösung kann durch mikrobielle Eisenoxidation eine Phosphorrückgewinnung beobachtet werden. Die niedrigen Eisenkonzentrationen können mit realistischen Eisengehalten im Bioleachingmedium gleichgesetzt werden, da sich Eisen wegen der Matrixeffekte schlecht aus Klärschlammaschen löst.

Neben dem Eisen hat der pH-Wert der AEDS-Lösung einen Einfluss auf die Phosphorrückgewinnung. Der gesamte Prozess läuft bei pH 2 optimal ab. Die Phosphorabnahme ist auch bei niedrigen Eisenkonzentrationen signifikant gegen die Abnahme bei den anderen pH-Werte erhöht. Die guten Ergebnisse bei pH 2 sind sehr vielversprechend um eine quantitative Phosphorrückgewinnung bei niedrigen Eisenkonzentrationen durchführen zu können. Bei pH2 hat das Eisen- und Schwefel-oxidierende Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* sein Wachstumsoptimum (Pathak 2009).

Bei hohen Eisenkonzentrationen (≥ 3 g/l $\text{Fe}(\text{II})$) hat der pH-Wert einen geringen Einfluss auf die Menge zurückgewonnen Phosphors. Bei pH-Wert 1.5 werden die schlechtesten Ergebnis-

se im Konzentrationsbereich 0,3-2 g/l Fe(II) erreicht. Bei pH-Werten unter 2 wird das Wachstum und somit auch die Fe(II)-Oxidation der Bioleachingbakterien gehemmt (Bosecker 1997). Die ermittelten Einflussgrößen auf die Phosphorrückgewinnung sind wichtige Anhaltspunkte um den beteiligten Bakterien optimale Bedingungen zu bieten und die Phosphorausbeute zu maximieren.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Extraktion des organischen Phosphors und Polyphosphate aus dem Feststoff bestätigt sich die Annahme, dass es sich bei der Phosphorrefixierung um einen gekoppelten Prozess aus Polyphosphatakkumulation und mikrobiologisch induzierter Fe(III)-Phosphatfällung handelt. Insgesamt besteht das Produkt bis zu 22% aus Polyphosphaten und organischem Phosphor. Der hohe Glühverlust von bis zu 66% weist auf die Bildung von Biomasse hin, in der die Phosphorrückgewinnung stattfindet.

Die elementare Zusammensetzung des Feststoffs zeigt, dass im Feststoff deutlich weniger Metalle und mehr Phosphor vorliegen als in der Klärschlammasche. Die Metalle verbleiben während der biologischen Phosphorfixierung in Lösung, einzig Blei bildet eine Ausnahme. Es reichert sich im Feststoff an, und die Bleikonzentration im Feststoff kann mit der Bleikonzentration in der Klärschlammasche gleichgesetzt werden. Das Blei stammt aus dem zur Anreicherung genutzten Klärschlamm. Der Nachteil der Anreicherung aus einem Substrat mit einer erhöhten Hintergrundbelastung an Metallen liegt auf der Hand: Das Phosphorprodukt aus der AEDS-Population kann nicht sofort weiterverwendet werden. Zur Abtrennung des Bleis kann das Produkt jedoch mit Natronlauge umgefällt werden. Dabei löst sich das an Fe(III) gebunden Phosphat, während das Eisen als Eisenhydroxid sofort ausfällt. Blei wird an das Eisenhydroxid assoziiert und fällt mit aus. Aus der entstehenden alkalischen Lösung lässt sich durch Zusatz von Calcium sehr gut wasserlösliches, pflanzenverfügbares Calciumphosphat fällen.

Fazit: Die Trennung von rückgelöstem Phosphor von gelösten Schwermetallen in der Bioleachinglösung konnte durch die Kombination zweier biotechnologischer Prozesse erzielt werden. Das angereicherte Bakterienkonsortium AEDS ermöglicht zwei Formen der Phosphorrückgewinnung, bei der verschiedene Bakteriengruppen zum Einsatz kommen. Im ersten Teil der Phosphorrefixierung werden Polyphosphate durch polyphosphatspeichernde Bakterien gebildet. Mit der biologischen Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) durch das Bioleachingbakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* setzt 3-4 Tage später die Fällung von Fe(III)-Phosphat ein. Während der Phosphor mit der Biomasse sedimentiert, verbleiben die Metalle weiterhin in Lösung und es entsteht ein phosphorreicher, metallarmer Feststoff. Einzig Blei wird zusammen mit dem Phosphor ausgefällt. Die Prozesskombination aus Bioleaching und biologischer Phosphorrückgewinnung mit dem AEDS-Konsortium ermöglicht eine einfache Wiedergewinnung von Phosphor aus Klärschlammasche. Durch Zusammensetzung

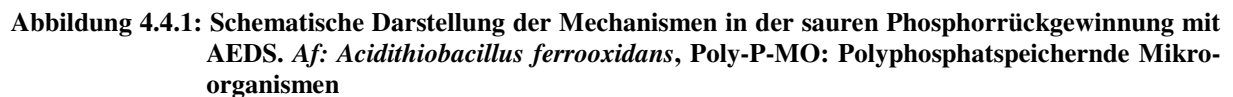
des Feststoffs aus organischen und anorganischen Phosphorverbindungen scheint ein Einsatz des Feststoffs als Dünger mit Langzeitwirkung in der Landwirtschaft möglich.

4.4 Mechanistische Aufklärung der biologischen Phosphorrückgewinnung

Der Mechanismus, der hinter der Phosphorrefixierung mit AEDS steht, kann annäherungsweise beschrieben werden und stützt sich auf die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse, sowie auf molekularbiologischen Arbeiten zum Thema Phosphor und Stressantwort (Osorio et al 2008, Seufferheld et al. 2008). Der entstandene Feststoff, sowie die Kinetik von Eisen- und Phosphorkonzentrationen in der Lösung während der Refixierung, deuten darauf hin, dass es sich bei diesem Prozess um vornehmlich zwei Mechanismen handelt.

Der erste Mechanismus ist ein Schutzmechanismus des Bioleachingbakteriums *A. ferrooxidans*. Um mit hohen Metallkonzentrationen umgehen zu können, nutzt *A. ferrooxidans* Phosphor auf zwei unterschiedliche Arten. Zum einen speichert es Phosphor als Polyphosphat, um Metalle im Zellinnern zu komplexieren und die intrazelluläre Metallkonzentration möglichst gering zu halten. Zum anderen kann Phosphat mit den in der EPS-stabilisierten Fe(III)-Ionen ausfallen. Diese beiden Mechanismen werden von Osorio et al. (2009) auf Proteinebene vorhergesagt. In dieser Arbeit kann die durch *A. ferrooxidans* induzierte Fe(III)-Phosphatfällung nachgewiesen werden. Die Bildung von Polyphosphaten durch *Acidithiobacillus* ist bekannt (Alvarez und Jerez 2004), wurde jedoch nie unter dem Aspekt der Phosphorrückgewinnung betrachtet. Die Fe(III)-Phosphatfällung hat den Vorteil, dass durch den sinkenden Eisengehalt die Bedingungen in der Lösung verbessert werden und es anderen polyphosphatspeichernden Mikroorganismen ermöglicht wird, das Habitat zu besiedeln.

Der zweite Mechanismus beruht auf der bereits erwähnten stressinduzierten Polyphosphatspeicherung durch *Actinobacteria*. Tobin et al. (2007) konnten eine Phosphorakkumulation unter leicht azidischem pH-Wert feststellen (pH 5.5). Durch das gezielte Ausschalten von Genen, die bei der Stressantwort eingeschaltet werden, zeigte sich keine Phosphatakkumulation mehr (Tobin et al. 2007, Seufferheld et al. 2008). Dass die Phosphorakkumulation unter derart extremen Bedingungen wie die in der AEDS-Lösung stattfinden kann, ist das Ergebnis des syntrophischen Zusammenlebens verschiedener Bakterienarten, die sich gegenseitig beeinflussen. Der Stoffwechselweg und die Detoxifizierung der Umgebungslösung durch *A. ferrooxidans* ermöglicht es, dass sich bisher unbekannte sowie bekannte Bakterien in der AEDS-Lösung anreichern lassen, welche eine Phosphorakkumulation durchführen. In Abbildung 4.3.1 ist der beschriebene Mechanismus für die mikrobiologisch induzierte saure Phosphorrefixierung schematisch dargestellt.



Methodik

Die Kombination der verschiedenen Methoden zur Charakterisierung und Identifizierung von Umweltproben ist notwendig, um eine mikrobiologische Charakterisierung der Probe zu gewährleisten. Die kultivierungsabhängigen Methoden (chemische Charakterisierung mit FTIR, biochemische Tests, Zellmorphologie und molekularbiologische Methoden) liefern eine zuverlässige Bestimmung bis zur Bakterienart, eine vorherige Isolierung des Bakteriums ist jedoch unabdingbar. Da Umweltproben eine Vielzahl von Mikroorganismen beinhalten, ist es schwierig eine repräsentative Anzahl von Isolaten zu erhalten. Daher wurde die ARDRA-Methode zur kultivierungsunabhängigen Identifizierung der AEDS-Bakterien durchgeführt. Der Schwachpunkt der ARDRA-Analyse ist die DNA-Extraktion und die anschließende Klonierung. Ein Teil der extrahierten DNA lässt sich gut klonieren, dennoch verbleibt nicht-klonierbare DNA im Ansatz und damit nicht-identifizierbare Bakterien.

Durch die Kombination kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden konnte die Zusammensetzung der AEDS-Kultur aufgeklärt werden und polyphosphatspeichernde Mikroorganismen isoliert und identifiziert werden. Trotz der Wahl verschiedener Isolationsmedien und -strategien gelingt es jedoch nie, alle Mikroorganismen eines Habitats zu isolieren und zu identifizieren.

Zusammensetzung der AEDS-Population

Die genaue Identität der polyphosphatspeichernden Bakterien (Poly-P-Bakterien) ist bis heute nicht geklärt. Eine Vielzahl von Mikroorganismen weist die Fähigkeit zur Phosphatspeicherung auf. Zwar können in den Bakterien Polyphosphatgranula nachgewiesen werden, werden jedoch isolierte Bakterien als Reinkultur zur Phosphatspeicherung eingesetzt, zeigen sie oftmals keinen *Luxury Uptake* mehr (Hollender et al. 2002). Die an dem Prozess beteiligten Bakterien und deren Wechselwirkungen während der biologischen Phosphorspeicherung sind noch nicht zur Gänze verstanden und beschrieben. Dennoch gibt es einige Bakterien, die die Phosphorspeicherung in den Kläranlagen durchführen. Sie werden im Allgemeinen als PAO's bezeichnet (Phosphate Accumulating Organisms) und sind eine Vielzahl von Bakterien und Hefen, bei denen eine Phosphorakkumulation nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 1.4). Die Identifizierung der PAO's aus der Phosphoreliminierung in Kläranlagen konnte die Poly-P-Bakterien auf zwei Klassen eingrenzen. Je nach Kläranlage liegen β -Proteobakterien (Crocetti et al. 2000, Ahn et al. 2007) oder Aktinobakterien (de-Bashan und Bashan 2004, Beer et al. 2006) vor. Interessant ist hierbei, dass die Bakterien nicht nur, wie lange angenommen, während des als biologische Phosphoreliminierung beschriebenen Mechanismus aus aerober/anaerober Inkubation den *Luxury Uptake* zeigen, sondern dass auch andere Stressfaktoren eine Phosphorspeicherung induzieren können (pH-Wert, Metallgehalt, Stickstofflimitation, Salinität, hohe organische Fracht) (Ahn et al. 2007). Phosphor spielt in der Stressantwort vieler Bakterien eine wichtige Rolle. Entweder wird es als Polyphosphat eingelagert um Metallkationen zu komplexieren (Osorio et al. 2008) oder das Phosphatanion dient dazu, den osmotischen Druck zwischen Zelle und Umgebungslösung auszugleichen. Andere Bakterien fixieren Phosphor in ihren EPS um dort Metallkationen abzufangen und auszufällen (Seufferheld et al. 2008).

Das Bioleaching von phosphorreicher Klärschlammasche mit der AEDS-Lösung bedeutet für die Bakterien Stress (niedrige pH-Werte, hohe Metallkonzentrationen), die eine stressinduzierte Phosphorrückfixierung induzieren können. Welche Bakterien in welcher Form an der sauren Phosphorrefixierung beteiligt sind, sollte durch die mikrobiologische Charakterisierung erforscht werden. Der Einsatz der kultivierungsunabhängigen ARDRA-Analyse, gekoppelt mit der kultivierungsabhängigen 16S-rRNA Gen-Identifizierung von Isolaten aus der AEDS gibt einen Überblick über mögliche saure PAO's in der AEDS-Kultur. Die hier präsen-

tierten Ergebnisse sind die erste ökologische Beschreibung eines bislang vollkommen unbekannten Habitats und versuchen annähernd die Population in der AEDS-Lösung zu beschreiben.

Die mikrobiologische Charakterisierung und Identifizierung von AEDS erbrachte, dass sich AEDS-Kultur aus vier Bakterienklassen zusammensetzt (Abbildung 4.5.1).

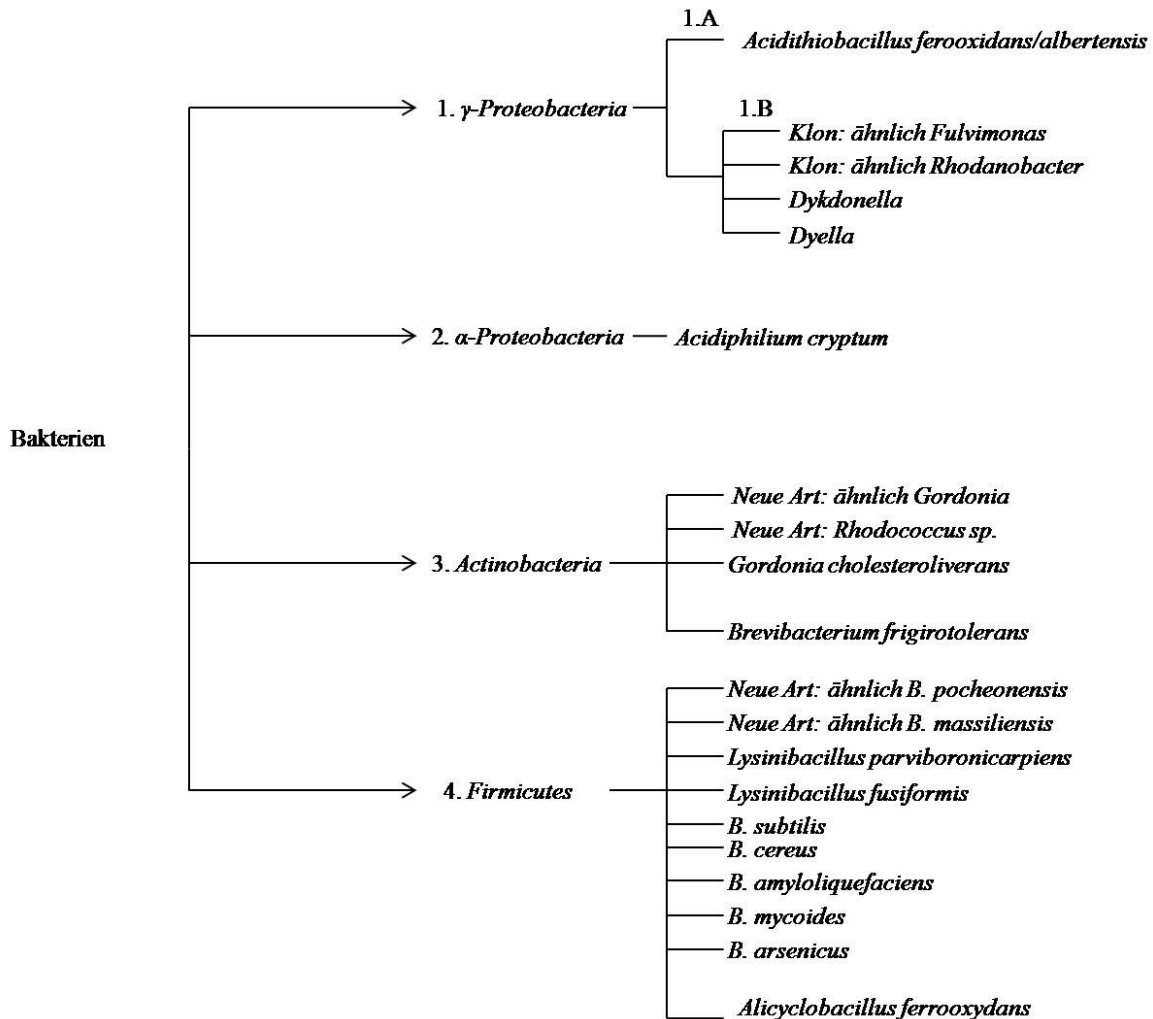


Abbildung 4.5.1: Identifizierte Bakterienklassen und -arten der AEDS-Lösung.

Den größten Anteil machen die γ -Proteobakterien (1) aus. Zu ihnen zählen die Acidithiobacillen (1A), sowie eine Gruppe eng miteinander verwandte Mikroorganismen, zu denen auch die neu entdeckten Klone mit Ähnlichkeit zu *Fulvimonas* und *Rhodanobacter* zählen (1B).

Das große Vorkommen von *Acidithiobacillaceae* in der AEDS-Lösung (1A) belegt die gelungene Anreicherung von Bioleachingbakterien. Erstaunlicherweise findet sich in der AEDS-Lösung ausschließlich *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Acidithiobacillus thiooxidans* konnte nicht angereichert werden, obwohl Schwefel als primäres Substrat zugegeben wurde. Ob-

wohl *A. ferrooxidans* bevorzugt Eisen oxidiert, wird der Schwefel stabil und reproduzierbar in Schwefelsäure umgesetzt und ermöglicht ein gutes Bioleaching aus Klärschlammmasche. Dass *Acidithiobacillus* nicht nur an der Phosphorfällung beteiligt ist, sondern auch Polyphosphate speichern, kann ist nachgewiesen worden. Die Familie der *Xanthomonadaceae* gehört ebenfalls zur Klasse γ -Proteobakterien (1B). Sie sind als gram-negative Stäbchen charakterisiert und sind in Böden, Schlämmen und Wasser zu finden (Yoon et al. 2006). Zu dieser Familie gehören auch zwei in der ARDRA-Analyse als neue Art identifizierte Klone. Besonders interessant ist der Klon mit einer großen Ähnlichkeit zu dem Thiosulfat-oxidierenden Bakterium *Rhodanobacter thiooxidans*. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen säuretoleranten Verwandten, der zur Thiosulfatoxidation befähigt ist und somit syntrophisch mit den Acidithiobacillen lebt. Thiosulfat stellt ein Zwischenprodukt der Oxidationsketten der Acidithiobacillen dar und steht dem *Rhodanobacter*-ähnlichen Bakterium als Substrat zur Verfügung. Ob dieses und die anderen Bakterien eine Rolle in der Polyphosphatspeicherung spielen, kann nicht beantwortet werden. Bemerkenswert ist, dass für die *Xanthomonadaceae* bisher keine Säuretoleranz im Bereich ≤ 2 festgestellt werden konnte und in dieser Arbeit erstmals entdeckt wurde. Lediglich für *Rhodanobacter thiooxidans* wird eine schwache Säuretoleranz beschrieben, die aber nicht unter pH 4,5 reicht (Lee et al. 2007).

In der AEDS-Lösung konnte ein Vertreter der α -Proteobacteria (2) entdeckt werden. Es handelt sich um das eisenreduzierende, heterotrophe Bakterium *Acidiphilium cryptum*. *Acidiphilium* ist ein klassischer Besiedler von *Acidithiobacillus*-Habitaten. Es ist ein heterotrophes Bakterium, das sich von den durch *A. ferrooxidans* entstehenden organischen Stoffwechselprodukten ernährt. *A. cryptum* wächst nur bei geringem organischem Kohlenstoffgehalt in der Umgebungslösung (Harrison 1981).

Die dritte Bakterienklasse, die in der AEDS-Lösung vorliegt sind die *Actinobacteria* (3). Hierbei handelt es sich um gram-positive, nicht-sporulierende, kokoide Stäbchen. Sie konnten aus der AEDS-Lösung isoliert und identifiziert werden. Das Isolat *Rhodococcus* sp. konnte nicht weiter charakterisiert werden, da es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine neue Bakterienart handelt, die aus der AEDS-Kultur isoliert werden konnte. Nach Sequenzierung und Datenbankabgleich handelt es sich um ein Bakterium mit großer Ähnlichkeit zu *Rhodococcus*.

Weitere neue Arten konnten in enge Verwandtschaft mit *Gordonia hirsuta* gebracht werden. *Gordoniae* gehören zu den Corynebakterien und wurden aus vielen Umwelthabitaten isoliert. Ihre Bedeutung stieg mit der Erkenntnis, dass sie ein hohes Maß an Biodegradation und Bioremediation durchführen können (Drzyzga et al. 2009). Des weiteren konnte *Gordonia cholesteroliverans* identifiziert werden, ein Bakterium, dass als schwach säuretolerant beschrieben wird (Drzyzga et al. 2009). Sowohl die neue *Rhodococcus*- Art als auch die neue

Gordonia-Art zeigten positive Poly-P-Färbungen. Es wird vermutet, dass sie an der Speicherung von Polyphosphaten im ersten Teilabschnitt der Phosphorrückfixierung mit AEDS beteiligt sind.

Die Aktinobakterien werden immer wieder neben den β -Proteobakterien als mögliche PAO's gehandelt. Besonders Bakterien, die eine Verwandtschaft mit *Gordonia* aufweisen, konnten in der biologischen Phosphoreliminierung nachgewiesen werden (Crocetti et al. 2000, Beer et al. 2006). In dieser Arbeit konnte erstmalig die Polyphosphatspeicherung von *Gordonia* in saurer Umgebung nachgewiesen werden. Neben der Fähigkeit zur Polyphosphatspeicherung verfügen die Bakterien über eine erstmals detektierte Säuretoleranz, die bisher nur für *Rhodococcus* beschrieben wurde.

Die Klasse der *Firmicutes* (4), im Speziellen die *Bacillus*-Arten stellen den Großteil sporulierender, gram-positiver Stäbchen. Es wird angenommen, dass diese Bakterien als Sporen in der AEDS-Lösung vorliegen. Die Polyphosphat-Färbung war für alle Isolate negativ. Ihr Beitrag zur Phosphorrefixierung wird als gering erachtet. Als säureresistent wird einzig *Alicyclobacillus ferrooxydans* beschrieben. Es lebt in den gleichen Habitaten wie *Acidithiobacillus*, oxidiert Eisen, Thiosulfat und Pyrit und gilt ebenfalls als Bioleachingorganismus (Jiang et al. 2008). Eine Polyphosphatspeicherung dieses Bakteriums ist nicht bekannt. Unter den isolierten Bazillen befinden sich ebenfalls unbekannte Arten, die zukünftig näher beschrieben werden.

Die Ergebnisse der Bakterienidentifizierung von AEDS belegen die syntrophische Bakterienökologie zur Phosphorrückgewinnung.

Neben den Bioleachingbakterien *Acidithiobacillus ferrooxidans* leben Mikroorganismen, die in Bioleachinghabitaten vergesellschaftet sind. Die Polyphosphat-speichernden Mikroorganismen wurden in der Klasse der *Actinobacteria* gefunden. Diesen wird eine besondere Rolle in der kombinierten Phosphorrefixierung zugesprochen. Sie können trotz der hohen Metallgehalte und des niedrigen pH-Wertes Polyphosphate speichern.

Die aus der biologischen Phosphateliminierung bekannten PAO's aus der Klasse der β -Proteobacteria finden sich nicht in der AEDS-Lösung. Einzig die Aktinobakterien spielen sowohl in der sauren als auch in der neutralen Polyphosphatspeicherung eine Rolle.

Ein großer Unterschied zwischen der biologischen Phosphoreliminierung und der AEDS-Refixierung ist die strikt aerobe Inkubation des Ansatzes. Die Phosphorfixierung der Aktinobakterien wird in AEDS nicht durch den Wechsel aerob/anaerob unter Zugabe von Acetat bewirkt. Vermutlich induziert die extreme Umgebung eine Stressreaktion bei den polyphosphatspeichernden Bakterien, die zu einer Phosphoraufnahme führt. Ein weiterer Stressor kann der für Aktinobakterien geringe Gehalt an organischen C-Quellen in der AEDS-Lösung sein. Die gesteigerte Phosphorspeicherung unter Hungerbedingungen wurde bereits mehrfach beobachtet (Seufferheld, 2008).

Fazit: Die Anreicherung der AEDS-Population mit dem Bioleachingbakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* konnte nachgewiesen werden. *A. ferrooxidans* wird eine doppelte Funktion im Phosphorfixierungs-Prozess zugeordnet, die Eisenoxidation und die Speicherung von Polyphosphaten. Neu entdeckte Arten aus der Gruppe der Aktinobakterien sind dazu in der Lage, bei niedrigen pH-Werten Polyphosphate zu speichern und pH-Werte ≤ 2 zu tolerieren. Die Charakterisierung der AEDS-Population beschreibt erstmalig die an der sauren Phosphorspeicherung beteiligten Mikroorganismen.

5 Zusammenfassung und Fazit

Bioleaching ist neben dem Einsatz in der Metallgewinnung, eine vielversprechende Technologie zur biologischen Boden- und Abfallreinigung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren zur Dekontamination und Wertstoffrückgewinnung metallbelasteter Feststoffe angewandt, verglichen und bewertet. Dabei handelte es sich um Aschen aus Verbrennungsprozessen, um Boden von einem Altlastenstandort, sowie um Sedimente und Klärschlamm, die sich aufgrund ihres hohen Phosphor- und Metallgehalts für eine Dekontamination und eine Wertstoffrückgewinnung eigneten.

Vergleichendes Bioleaching schwermetalbelasteter Feststoffe

Im Rahmen dieser Arbeit konnten grundlegende Verfahrensbedingungen formuliert werden, die es ermöglichen, die Machbarkeit einer Sanierung von Feststoffen mit dem Bioleaching zu prognostizieren. Verschiedene Feststoffe wurden unter definierten und standardisierten Bedingungen mit dem Bioleachingverfahren behandelt. Die Einflüsse der Feststoffeigenschaften auf die Metalllaugung mit Bioleaching wurden über das standardisierte Verfahren ermittelt. Die Bewertung des Bioleachingverfahrens erfolgte mittels toxikologischer und ökotoxikologischer Untersuchungen und nach gesetzlichen Vorgaben (LAGA, LAWA).

Die Matrix des Feststoffs, seine Säurekapazität in wässriger Lösung sowie die Höhe der Metallbelastung können schon im Vorfeld der Bioleachingbehandlung als Parameter für die Machbarkeit einer Sanierung genutzt werden. Die thermische Vorbehandlung der Feststoffe führt zu einer Veränderung der Feststoffmatrix und zu Änderungen bei den Bindungsverhältnissen der Metalle, insbesondere Blei, und somit zu einer Änderung der Laugbarkeit der Metalle. Die Säurekapazität im Feststoffeluat trägt entscheidend dazu bei, dass der Bioleachingprozess stabil ablaufen kann. Ein zu hoher pH-Wert, gekoppelt mit einer großen Säurekapazität in der Bioleachinglösung hemmt die Bakterienaktivität und verringert den Leachingerfolg nachhaltig. Besonders thermisch behandelte Feststoffe weisen eine sehr hohe Säurekapazität in wässriger Lösung auf, woraus folgt, dass thermisch behandelte Feststoffe einem zweistufigen Bioleaching unterzogen werden müssen.

Die Metallbelastung der Feststoffe in Abhängigkeit ihrer Matrix ist der dritte Einflussfaktor für den Bioleachingprozess. Sehr hohe Metallgehalte wurden unter den gewählten standardisierten Bedingungen (acht Tage) deutlich reduziert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei einer entsprechenden Prozessführung die Abreicherung nach gesetzlichen Vorgaben erreicht wird. Für die Behandlung von Feststoffen mit hohen Metallkonzentrationen ist eine längere Bioleachingbehandlung erfolgversprechend.

Die Bewertung des Feststoffs vor und nach Bioleaching erfolgt sowohl chemisch, gemäß LAGA und LAWA, als auch toxikologisch und ökotoxikologisch. Das gewählte ökotoxikologische Testsystem orientierte sich an dem Austragungspfad Boden-Grundwasser. Für die Klärschlammasche und den hochbelasteten Boden wurde nach dem Bioleaching eine Verringerung der Ökotoxizität beobachtet.

Die Entstehung der toxischen Metallspezies Chrom(VI) wurde durch die Untersuchungen zur Bildung und Verbleib von Chrom(VI) in der Leachinglösung ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass Chrom(VI) kurz nach der Freisetzung aus der Asche nachgewiesen werden kann, jedoch schnell zu Chrom(III) reduziert wird.

Unter den standardisierten Bedingungen kann bereits nach acht Tagen eine Aussage über die Machbarkeit einer Sanierung getroffen werden, was die Optimierung des Prozesses für den eingesetzten Feststoff ermöglicht. Die Ergebnisse belegen, dass mit Hilfe des Bioleachings ein einfaches Verfahren zur Verfügung steht, das sowohl *In Situ* als auch *Ex Situ* angewendet werden kann

Bioleaching zur Wertstoffrückgewinnung: Phosphorfreisetzung

Bisherige Verfahren zur Phosphorrückgewinnung beruhen auf der Laugung phosphorreicher Reststoffe aus der Abwasserbehandlung (Klärschlamm, Klärschlammasche) mit chemischen Säuren. Die biologische Wertstoffrückgewinnung mit Bioleaching konnte in dieser Arbeit umgesetzt werden. Diese kann mit den chemischen Technologien konkurrieren und quantitativ Phosphor aus Klärschlamm und Klärschlammasche laugen.

Bioleaching zur Wertstoffrückgewinnung: Phosphorfreisetzung und saure Phosphorrückgewinnung

Die Abtrennung des gelösten Phosphors von den mitgelaugten Schwermetallen wird bisher mit chemisch/physikalischen Verfahren durchgeführt (Membranverfahren, Verdampfungsverfahren mit anschließender Fällung des Phosphors). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte biotechnologische Kombination aus Phosphorfreisetzung mittels Bioleaching und der Phosphorrefixierung in Biomasse mit AEDS (Acidithiobacillus enriched digested sludge) zeigt eine Alternative zu den obengenannten Verfahren auf. Durch die Anreicherung von Bioleaching-Bakterien aus anaerob stabilisiertem Klärschlamm und die Behandlung von Klärschlammasche mit AEDS werden große Mengen Phosphor aus den Feststoffen gelöst. Mit AEDS kann die Lösung des Phosphors aus der Asche, sowie die Abtrennung und Refixierung des Phosphors von der metallischen Lösung in einem Schritt durchgeführt werden. Für die azidische Phosphorrückgewinnung sind drei hintereinander geschaltete, durch Mikroorganismen katalysierte Stoffwechselprozesse verantwortlich:

1. Freisetzung von Phosphor aus Klärschlammasche durch Bioleaching mit *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
2. Phosphorakkumulation durch polyphosphatspeichernde Mikroorganismen der Klasse *Actinobacteria*.
3. Mikrobiell induzierte Fe(III)-Phosphatfällung durch *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Das entstehende Sediment besteht aus Fe(III)-Phosphat und Polyphosphaten. Der Phosphatgehalt im Sediment ist gegenüber dem Phosphatgehalt der Klärschlammasche deutlich erhöht (30–50%), der Metallgehalt im Sediment stark reduziert (80–96%). Den größten Einfluss auf die saure Phosphorrückgewinnung haben der pH-Wert und die Konzentration an Fe(II) in der AEDS-Lösung. Der optimale pH Wert liegt bei 2, die minimal benötigte Fe(II)-Konzentration bei 0,25 g/l.

Die Identifizierung der Mikroorganismen in der AEDS-Lösung sowie der Nachweis ihrer Aktivität konnte im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden. Die Kombination verschiedener Methoden (FTIR, physiologische und morphologische Untersuchungen, Identifizierung der 16S-rRNA-Gene und ARDRA) erlaubt eine Beschreibung der AEDS-Kultur. Neben *Acidithiobacillus*-Arten sind Aktinobakterien an der Poly-Phosphat-Speicherung beteiligt, was mittels Fluoreszenzfärbung der Polyphosphatgranula nachgewiesen wurde. Durch die Analyse der 16S-rRNA Gene konnten bisher unbekannte, nicht charakterisierte Aktinobakterien identifiziert werden, die eine enge Verwandtschaft zu *Gordonia hirsuta* aufweisen. Eine vollständige Charakterisierung ist im Hinblick auf eine technische Anwendung von großem Interesse.

Die saure Phosphorrückgewinnung ist ein ähnlich einfach handhabbarer Prozess, wie das Bioleaching zur Dekontamination von Feststoffen. Die Umsetzung im technischen Maßstab wird bereits erprobt und verspricht gute Ergebnisse. Ziel künftiger Untersuchungen ist es, eine Subkultivierung des AEDS-Konsortiums unter synthetischen Bedingungen zu ermöglichen, dies macht den Prozess unabhängig von der Klärschlammversorgung.

Fazit: Die Anwendung der Bioleachingtechnologie zur Aufbereitung schwermetallbelasteter Feststoffe und zur Wertstoffrückgewinnung von Phosphor hat ein großes, bislang wenig genutztes Potential. Sowohl die Dekontamination als auch die Phosphorrückgewinnung sind zukünftig interessante Anwendungsfelder, die eine CO₂-neutrale und kostengünstige Alternative zu chemisch/physikalischen Verfahren sein können.

6 Literaturverzeichnis

- Adam C., Kley, G., Simon F.G. and Lehmann A. (2008): Recovery of nutrients from sewage sludge – Results of the European research-project SUSAN. *Water Practice & Technology*, 3(1)
- Adam C.(2008): Optionen der landwirtschaftlichen Verwertung von P aus der Abwasserreinigung: Technische Möglichkeiten. Braunschweiger Nährstofftage 10.-11. November 2008, Vortrag.
- Adam C., Vogel C., Wellendorf S., Schick J., Kratz S., Schnug E. (2009): Phosphorus recovery by thermochemical treatment of sewage sludge ash - Results of the European FP6-project SUSAN. In: International Conference on Nutrient Recovery from Waste Water streams. Herausgeber: Ashley K., Mavinic D., Koch F. IWA Publishing, London-New York. ISBN: 1843392321. S.: 417-430.
- Ahn J., Schroeder S., Beer M., Mcilroy S., Bayly R.C., May J.W., Vasiliadis G., Seviour R.J. (2007): Ecology of the Microbial Community Removing Phosphate from Wastewater under Continuously Aerobic Conditions in a Sequencing Batch Reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2257-2270.
- Alvarez E. A., Mochon M. C., Sanchez J. C. J., Rodriguez M. T. (2002): Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants. *Chemosphere* 47(7): 765-775.
- Alvarez S. und Jerez C. (2004): Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5177-5182.
- Allan R.A., Miller J.J. (1980): Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. *Canadian Journal of Microbiology*, 26:497-510.1
- Ault-Riche D., Frarley C.D., Tzeng C.M., Kronberg A. (1998): Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180: 1841-1847.
- Baillet F., Magnin J. P., Cheruy A., Ozil P. (1998): Chromium precipitation by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology Letters* 20(1): 95-99.
- Bark K., Sponner A., Kämpfer P., Grund S., Dott W. (1992): Differences in polyphosphate accumulation and phosphate adsorption by *Acinetobacter* isolates from wastewater producing polyphosphate: AMP phosphotransferase. *Water Research*. 26(10): 1379-1388.
- Bark K., Kämpfer P., Sponner A., Dott W. (1993): Polyphosphate-dependent enzymes in some coryneform bacteria isolated from sewage sludge. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters* 107: 133-138.
- Barnard J.L. (2009): Elimination of eutrophication through resource recovery. In: International Conference on Nutrient Recovery from Waste Water Streams. Hrsg: Ashley K., Mavinic D., Koch F., IWA Publishing 2009. ISBN: 1843392321.
- Bast E. (1999): *Mikrobiologische Methoden: Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin. ISBN: 3-8274-0786-9.
- Beer M., Stratton H.M., Griffiths P.C., Seviour R.J. (2005): Which are the polyphosphate accumulating organisms in full scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia? *Journal of Applied Microbiology* 100: 233-243.
- Bental M., Pick U., Avron M., Degani H. (1991): Polyphosphate metabolism in the alga *Dunaliella salina* studied by ³¹P-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1092: 21-28.
- Blais J. F., Tyagi R. D., Auclair J. C. (1993): Metals Removal from Sewage-Sludge by Indigenous Iron-Oxidizing Bacteria. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* 28(2): 443-467.
- Blais J. F., Shooner R.D., Tyagi R.D., Munier A.S., Vidyarthi A.S., Surampalli R.Y. (2001): Class A pathogene reduction in the SSDML process. *Practical Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management* 5(2): 48-57.
- Bosecker K. (1997): Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 20:591-604.

- Brierley C. (2009): Biohydrometallurgy: Whats the future? *Advanced Materials Research* 71-73: 3-10.
- Brombacher C., Bachofen R., Brandl H. (1997): Biohydrometallurgical processing of solids: a patent review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 577-587.
- Brombacher C., Bachofen R., Brandl H. (1998): Development of a laboratory-scale leaching plant for metal extraction from fly ash by *Thiobacillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1237-1241.
- Carbonell G., Bravo J. C., Lopez-Mancisidor P., Pro J., Torija C. F., Tarazona J. V. (2009): Distribution, fractionation and mobility assessment of heavy metals in a spiked soil using a multi-species soil system. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7(3): 629-637.
- Chartier M., Mercier G., Blais J.F. (2001): Partitioning of trace metals before and after biological removals of metals from sediments. *Water Research* 35(6): 1435-1444.
- Cornel P. and Schaum C. (2005): Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlamm, 80. Siedlungswasserwirtschaftliches Kolloquium, 13.10.2005, Stuttgart, Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, No. 184 ISBN: 3486630954.
- Couillard D. and Chartier M. (1991): Removal of metals from aerobic sludges by biological solubilization in batch reactors. *Journal of Biotechnology* 20: 163-180.
- Couillard, D. and Mercier, G. (1993): Removal of metals and fate of N and P in the bacterial leaching of aerobically digested sewage sludge. *Water Research* 27(7): 1227-1235.
- Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L.L. (2000): Identification of polyphosphate accumulating organisms and design of 16S rRNA direct probes for their detection and quantification. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1175-1182.
- De Baere T., de Mendoca R., Claeys G., Verschraege G., Mijs W., Verhelst R., Rottiers S., Van Simaey L., De Ganck C., Vanechoutte M. (2002): Evaluation of amplified rDNA restriction (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnosis laboratory. *BMC Microbiology* 2:4.
- De Bashan L.E. und Bashan Y. (2004): Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Research* 38(19): 4222-4246.
- DIN ISO 11465 (1996): Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der Trockensubstanz und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse - Gravimetrisches Verfahren. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN 12457-4 (2003): Charakterisierung von Abfällen – Auslaugung – Übereinstimmungsuntersuchung für die Auslaugung von körnigen Abfällen und Schlämmen-Teil 4: Einstufiges Schüttelverfahren mit einem Flüssigkeits-/Feststoffverhältnis von 10l/kg für Materialien mit einer Korngröße unter 10 mm (ohne oder mit Korngrößenredizierung), Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN 12879 (2001): Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN 38405-7 (2005): Wasserbeschaffenheit Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) - Teil 7: Bestimmung der Säure- und Basekapazität, Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN 38405-19 (1988): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der gelösten Anionen Fluorid, Chlorid, Nitrit, Orthophosphat, Bromid, Nitrat und Sulfat mittels Ionenchromatographie - Teil 1: Verfahren für gering belastete Wässer, Deutsches Institut für Normung e. V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN 38412 L8 (1991): Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Bakterien (*Pseudomonas*-Zellvermehrungs-Hemmtest), Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN 38412 L33 (1991): Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (*Scenedesmus*-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN 38412 L37 (1999): Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von

- Bakterien (Photobacterium phosphoreum-Zellvermehrungshemmtest), Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin
- Drogué P., Mercier G., Blais J.F. (1998): Bioproduction of ferric sulfate used during heavy metals removal from sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*. 34: 816-824.
- Drzyzga O., Navarro Llorens J.M., Fernandez De Las Heras L., Garcia Fernandez E. and Perera J. (2009): *Gordonia cholesterivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(5): 1011-1015.
- Du Y. G., Tyagi R. D., Sreekrishnan T. R. (1995): Operational Strategy for Metal Bioleaching Based on Ph Measurements. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 121(7): 527-535.
- DüMV - Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsstoffen (2008), Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr.60, Hrsg.: Bundesanzeiger, Bonn.
- Eifler D.(2005): Charakterisierung von Huminstoffen durch Fraktionierung und Metallgehaltsbestimmung mittels eines gekoppelten Systems Kapillarelektrophorese – induktiv gekoppeltes Plasma. Dissertation, Universität Hamburg. http://deposit.ddb.de/cgi-n/dokserv?idn=97557891x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=97557891x.pdf
- Eixler S., Selig U., Karsten U. (2005): Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms. *Hydrobiologia*. 533:135-143.
- EPA Method 218.6 (1991): Determination of dissolved hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial wastewater effluents by ion chromatography. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Fang D., Jin C.J., Zhou L.X. (2007): Removal of Cr from tannery sludge by indigenous sulfur-oxidizing bacteria. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42:2065-2069.
- Faramarz D.A., Raghu S. 3, Ernest B., Ziadin S.S., Amid M.(2005): Modelling of ferric iron complexation and precipitation reactions associated with acid mine drainage environments. 9th International Minewater Congress, Oviedo, Spanien. Abstractbook.
- Fitzgerald G.B., Nelson T.C. (1966): Extraction and enzymatic analysis for limiting or surplus phosphorus in algae. *J. of Phycol.* 2: 32-37.
- Fritsche W. (1998): *Umweltmikrobiologie- Grundlagen und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag, Jena. ISBN: 3437350080.
- Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen P.H.. (1996) : Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30(8): 1749-1758.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., Sand W. (1998): Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2743-2747.
- Gu X., Wong J.W.C. (2004): Identification of inhibitory substances affecting bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. *Environmental Science & Technology* 38(10): 2934-2939.
- Gu X., Wong J.W.C. (2005): Degradation of inhibitory substances by heterotrophic microorganisms during bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. *Chemosphere* 69 (2): 311-318.
- Harrison A. P., JR. (1981): *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., Heterotrophic Bacterium From Acidic Mineral Environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31(3): 327-332.
- Hayes T.D., Theis T.L. (1978): The distribution of heavy metals in anaerobic digestion. *Journal of Water Pollution Control* 50: 61-72.
- Hoffmeister D., Weltin D., Dott W. (1990): Untersuchungen zur bakteriellen Phosphateliminierung. *GWF Wasser Abwasser*.131(5): 270-277.
- Hollender J., Dreyer U., Kronberger L., Kämpfer P., Dott W. (2002): Selective enrichment and characterization of a phosphorus-removing bacterial consortium from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 106-111.
- Hultman B., Levlin E., Stark K. (2000). Phosphorus recovery from sewage sludges: Research and experiences in Nordic Countries, *Scope Newsletter CEEP*, (41), 29-32.

- ISO 11348-1 (1998): Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 1: Method using fresh prepared bacteria, International Organisation for Standardization, Genf, Switzerland
- ISO 6341 (1996): Water Quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test, International Organisation for Standardization, Genf, Switzerland
- ISO 8692 (2004): Water Quality – Fresh water algae growth inhibition test with unicellular green algae, International Organisation for Standardization, Genf, Switzerland
- ISO 13829 (2000): Water Quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using umu-test, International Organisation for Standardization, Genf, Switzerland.
- Ishigaki T., Nakanishi A., Tateda M., Ike M., Fujita M. (2005): Bioleaching of metal from municipal waste incineration fly ash using a mixed culture of sulfur-oxidizing and iron-oxidizing bacteria. *Chemosphere* 60: 1087-1094.
- Jiang C.Y., Liu Y., Liu Y.Y., You X.Y., Guo X., Liu S.J. (2008): *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(12): 2898-2903.
- Kämpfer P., Eisenträger A., Hergt V., Dott W. (1990): Untersuchungen zur bakteriellen Phosphateliminierung. 1. Mitteilung: Bakterienflora und bakterielles Phosphatspeichervermögen in Abwasserreinigungsanlagen. *Wasser-Abwasser* 131 (4): 156-164.
- Kostka-Rick R. (2004): Ökotoxikologische Charakterisierung von Abfall-Literaturstudie. Hrsg.: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Band 3. ISSN: 09490477.
- Kronberg A., Rao N.N., Ault-Riché D. (1999): Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Reviews of Biochemistry* 68: 89-125.
- Kumar R.N., Nagendran R. (2007): Influence of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Chemosphere* 66: 1775-1781.
- Kumar R.N., Nagendran R. (2009): Fractionation behavior of heavy metals in soil during bioleaching with *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Journal of Hazardous Materials* 169(1-3).
- Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA) (1997): Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen. In: Mitteilungen der Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA) 20, Erich-Schmidt-Verlag, Berlin, 1998. ISBN: 3503050116.
- Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) (2004): Ableitung von Geringfügigkeitsschwellenwerten für das Grundwasser. http://www.lawa.de/documents/GFS-Bericht-DE_a8c.pdf
- Lee C.S., Kim K.K., Aslam Z. and Lee S.-T. (2007): *Rhodanobacter thiooxydans* sp. nov., isolated from a biofilm on sulfur particles used in an autotrophic denitrification process. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(8): 1775-1779.
- Latif M. und Zach A. (2000): Toxicity studies of treated residual wastes in Austria using different types of conventional assays and cost-effective microbioassays. In: New microbioassays for routine toxicity screening Herausg.: Persoone G., Janssen C. und De Coen W.: 367-383.
- Lombardi A., Gracia Jr O. and Menezes A. (2006): The effects of bacterial leaching and metal partitioning in sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1013-1019.
- Löser C., Zehnsdorf A., Hoffmann P., Seidel H. (2007): Remediation of heavy metal polluted sediment by suspension and solid-bed leaching: Estimate of metal removal efficiency. *Chemosphere* 66: 1699-1705.
- McGrath J.W., Cleary S., Mullan A., Quinn J.P. (2001): Acid stimulated phosphate uptake by activated sludge microorganisms under aerobic conditions. *Water Research* 35 (18): 4317-4322.
- Mergaert J., Cnockaert M.C. and Swings J. (2002): *Fulvimonas soli* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from soil after enrichment on acetylated starch plastic. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(4): 1285-1289.
- Montag D. (2008): Phosphorrückgewinnung aus der Abwasserreinigung-Entwicklung eines Verfahrens zur Integration in kommunalen Kläranlagen. Dissertation. Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen. http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=98906901x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=98906901x.pdf

- Mullan A., Mc Grath J.W., Adamson T., Irwin S., Quinn J.P. (2006): Pilot-Scale evaluation of the application of low pH-Inducible polyphosphate accumulation to the biological removal of phosphate from wastewaters. *Environmental Science & Technology* 40: 296-301.
- Neufeld R.D. und Wallach S. (1984). Chemical and toxicity analysis of leachates from coal conversion solid wastes. *J WPCF* 56(3):266-273.
- Oehmen A., Lemos P.C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L.L. and Reis M.A.M. (2007): Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research* 41: 2271-2300.
- Olson G.J., Brierley J.A., Brierley C.L. (2003): Bioleaching review part B- Progress in bioleaching: Applications of microbial processes by the mineral industries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 249-257.
- Osorio H., Martinez V., Nieto P.A., Holmes D.S., Quatrini R. (2008): Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiology* 8: 203.
- Pathak A., Dastidar M. G., Sreekrishnan T. R. (2009): Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management* 90(8): 2343-2353.
- Psenner R., Boström B., Dinke M., Petterson K., Pucsko R., Sager M (1988): Fractionation of phosphorus in suspended matter and sediment. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 30: 98 – 103.
- Rao N.N., Kronberg A. (1996): Inorganic phosphate support resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*: 1394-1400.
- Rawlings D, Johnson D. (2007): The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153: 315-324.
- Renoux A.Y., Tyagi R. D., Samson R. (2001): Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Research* 35(6): 1415-1424.
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W. (2003): Bioleaching review part A: Progress in bioleaching fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 239-248.
- Römbke J., Eisenträger E., Hundt-Rinke K., Jänsch S., Naumann-Hensel H., Weber G. (2006): Handlungsempfehlung für die ökotoxikologische Beurteilung von Böden. In: Ernte-Erprobung und Vorbereitung einer praktischen Nutzung ökotoxikologischer Testsysteme. Hrsg: Römbke J., Eisenträger A., Hundt-Rinke K., Jänsch S., Neumann-Hensel H., Schallnaß H.J. Sidus Verlag. ISBN: 3937451102.
- Römbke J., Moser Th., Moser H. (2009): Ecotoxicological characterisation of 12 incineration ashes using 6 laboratory tests. *Waste Management* 29: 2475-2482.
- Ryu H.W., Moon H.S., Lee E.Y., Cho K.S., Choi H. (2003): Bioremediation and Biodegradation: Leaching characteristics of heavy metals from sewage sludge by *Acidithiobacillus thiooxidans* MET. *Journal of Environmental Quality* 32: 751-759.
- Sand W., Gehrke T. (2006): Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157(1): 49-56.
- Schippers A., Jozsa P., Sand W. (1996): Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3424-3431
- Schippers A. and Sand W. (1999): Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 319-321.
- Seufferheld M.J., Alvarez H.M. and Farias M.E. (2008): Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology* 74(19): 5867-5874.
- Shanableh A. and Omar M. (2003): Bio-acidification and leaching of metals, nitrogen and phosphorus from soil and sludge mixtures. *Soil and Sediment Contamination* 12(4): 565-589.
- Silverman M. and Lundgren D. (1959): Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*- I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77: 642-647.

- Tobin K.M., McGrath J.W., Mullan A., Quinn J.P., O'Connor K.E. (2007): Polyphosphate accumulation by *Pseudomonas putida* CA-3 and other medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria under aerobic growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4): 1383-1387.
- Topf M. (2007): Untersuchungen zur Cr(VI)-Reduktion von Sickerwasser einer Schlackedeponie. Dissertaion, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Tsezos M. (2009): Metal-microbes interactions: beyond environmental protection. *Advanced Materials Research* 71-73: 527-532.
- Tyagi R. D., Blais J. F., Auclair J. C. (1993): Bacterial Leaching of Metals from Sewage-Sludge by Indigenous Iron-Oxidizing Bacteria. *Environmental Pollution* 82(1): 9-12.
- Uhlmann D., Röske I., Hupfer M., Ohms G. (1990): A simple method to distinguish between polyphosphate and other phosphate fractions of activated sludge. *Water Research*, 24 (11): 1355-1360.
- Ure A. M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B. (1993): Speciation of Heavy-Metals in Soils and Sediments - an Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken under the Auspices of the Bcr of the Commission-of-the-European-Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51(1-4): 135-151.
- Van Horn J (2007): Untersuchungen zur Rückgewinnung von Phosphat aus Überschussschlamm von Kläranlagen mit vermehrt biologischer Phosphatelimination. Dissertation, Bauhaus-Universität Weimar. Hrsg.: Bauhaus-Universität Weimar, Fakultät Bauingenieurwesen, Lehrstuhl Abfallwirtschaft, Lehrstuhl Siedlungswasserwirtschaft. Schriftreihe 18 des Lehrstuhls Abfallwirtschaft und des Lehrstuhls Siedlungswasserwirtschaft. ISBN: 9783938807408.
- Wong L., Henry J.G. (1984b): Biological removal and chemical recovery of metals from sludge. In: *Proceedings of the 39th Industrial Waste Conference*, Purdue University, Lafayette, India 515-520.
- Yoon J.-H., Kang S.-J., Oh T.-K. (2006): *Dokdonella koreensis* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(1): 145-150.
- Zimmermann J, Dott W. (2009): Recovery of phosphorus from sewage sludge incineration ash by combines bioleaching and bioaccumulation. In: *International Conference on Nutrient Recovery from Waste Water Streams*. Hrsg: Ashley K., Mavinic D., Koch F., IWA Publishing 2009. ISBN: 1843392321.
- Zimmermann J., Dott W. (2009): Sequenced bioleaching and bioaccumulation of phosphorus from sludge combustion. A new way of resource reclaiming. *Advanced Materials Research* 71-73: 625-628.

VI Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Stoffwechselwege des Bioleachings: A: Thiosulfatweg: Säureunlösliche Metalle. B: Polysulfidweg: Säurelösliche Metalle. Af: Acidithiobacillus ferrooxidans, At: Acidithiobacillus thiooxidans, MO: Mikroorganismus, MS: Metallsulfide (verändert nach Rohwerder 2003)	2
Abbildung 1.1.2: A: Rolle der EPS beim Bioleaching Af: Acidithiobacillus ferrooxidans, At: Acidithiobacillus thiooxidans. B: Lichtmikroskopische Aufnahme des Biofilms von A. ferrooxidans (roter Pfeil) Feststoff (weißer Pfeil). C: DAPI-Färbung des Biofilms von A. ferrooxidans	3
Abbildung 1.3.1: Phosphor-Quellen im Abwasser der Europäischen Union (Barnard 2009)	5
Abbildung 1.4.1: Schematische Darstellung der Polyphosphatbildung	8
Abbildung 1.4.2: Mechanismus der Polyphosphatspeicherung in der EBPR. In der anaeroben Phase nimmt die Bakterienzelle Acetat auf und speichert es in Form von Fettsäuren (PHB). Zum Umbau von Acetat zu PHB wird Energie aus den gespeicherten Polyphosphaten (Poly-P) gewonnen. In der aeroben Phase kehrt sich der Mechanismus um: PHB wird abgebaut und anorganisches Phosphat als Poly-P gespeichert. EPS: Extrazelluläre Polymere Substanz.	9
Abbildung 2.3.1: Prinzip des Haldenbioleachings in der Erzlaugung (Quelle: www.Mineralienatlas.de, Peter Seroka)	13
Abbildung 2.3.2: Schematischer Aufbau des Bioleachingreaktors im Labormaßstab: Perkolator mit permeabler Glasfritte und Asche.	14
Abbildung 2.6.1: FTIR-Spektrum von Klebsiella pneumoniae. Die markierten Spektralbereiche können bestimmten Zellbestandteilen zugeordnet werden (Tabelle)	24
Abbildung 2.7.1: Übersicht über die untersuchten Aspekte zum Bioleaching und zur biologisch induzierten Phosphatakkumulation mit den Verweisen auf die Kapitel im Ergebnisteil	29
Abbildung 3.1.1: Sulfatproduktion der Mikroorganismen während des Bioleachingprozesses [g/l]. KAA: Klärschlammasche, RO: Rostofenasche, ZF: Zyklonfilterasche, BR: Brennraumasche	33
Abbildung 3.1.2: Sulfatproduktion der Mikroorganismen im zweistufigen Bioleachingprozess. In der zweiten Stufe (Tag 5) steigt die Sulfatproduktion der Bakterien an.	35
Abbildung 3.1.3: Kinetik der Chrom (VI) und Chrom _{gesamt} -Freisetzung aus Klärschlammasche während des Bioleachings. Nach 30 Minuten kann Chrom (VI) detektiert werden. Nach 45 Minuten ist es zu Chrom (III) reduziert worden (n=2). Oben Rechts: Verhältnis Chrom _{gesamt} /Chrom (VI) bei t= 30 Min.	38
Abbildung 3.1.4: Darstellung der Einbauklassen nach LAGA-Richtlinie (1997)	35
Abbildung 3.1.5: Ökotoxikologische Bewertung von Klärschlammasche vor und nach Bioleaching	41
Abbildung 3.1.6: Ökotoxikologische Bewertung des Bodens, Stolberg, vor und nach Bioleaching	42
Abbildung 3.2.1: Rücklösung von Phosphor, Magnesium, Calcium und Schwermetallen durch Bioleaching.(n=5)	43
Abbildung 3.2.2: Phosphorkonzentrationen in den Klärschlammfraktionen der Kläranlage Bonn Salierweg [mg P/g TM] PS: Primärschlamm, RS: Rücklaufschlamm, NITRI: Nitrifikation, DENI: Denitrifikation, FS: Faulschlamm	44
Abbildung 3.2.3: Metallgehalte in den Klärschlammfraktionen der Kläranlage Bonn, Salierweg [mg/g TM]	45
Abbildung 3.2.4: Metall- und Phosphorfreisetzung [%] durch Bioleaching aus Faulschlamm	45
Abbildung 3.3.1: pH-Wert-Verlauf dreier Ansätzen während der Anreicherung von AEDS.	47
Abbildung 3.3.2: Metall- und Phosphorfreisetzung [%] durch Bioleaching mit AEDS und Reinkultur (n=5)	49

Abbildung 3.3.3: Phosphatfreisetzung und Rückfixierung mit Reinkultur (n=5), AEDS und Schwefelsäure _____	50
Abbildung 3.3.4: Nachweis der mikrobiellen Induktion durch Hemmung der Mikroorganismen mit _____	50
Abbildung 3.3.5: Verhalten der Schwermetalle während der Phosphatrückgewinnung. Die gezeigten Ergebnisse stehen exemplarisch für n=6 Versuche zum Verhalten der Schwermetalle in Lösung. _____	51
Abbildung 3.3.6: Eisen und Phosphatgehalt in der AEDS-Lösung (mmol/l) im Bioleachingmedium. _____	52
Abbildung 3.3.7: Sequentielle Extraktion (nach Psenner et al. 1988) des Feststoffs mit verschiedenen Extraktionsmitteln (P: Phosphat). _____	53
Abbildung 3.3.8: Einfluss von Eisengehalt und pH-Wert auf die Phosphatrefixierung. * signifikant erhöhte Abnahme gegenüber Konzentrationen 1 und 3, ** signifikant erhöht gegenüber Konzentration 1. _____	56
Abbildung 3.3.9: Schematische Darstellung der mikrobiologischen Charakterisierung der AEDS-Kultur _____	57
Abbildung 3.3.10: FTIR- Cluster-Analyse zur Unterscheidung zwischen Pilzen und Bakterien _____	59
Abbildung 3.3.11: FTIR-Cluster Analyse zur Bestimmung des Gramverhaltens _____	60
Abbildung 3.3.12: FTIR-Clusteranalyse zur Stamm und Art-Trennung. _____	61
Abbildung 3.3.13: Links: DAPI- Färbung des Isolats ISOCA 8. Pfeil: Gelbe Polyphosphatgranula im Zellinneren. Rechts: Kontrolle ohne Polyphosphatgranula. _____	63
Abbildung 4.1.1: Schema zur Beurteilung des Sanierungserfolges von Feststoffen durch das Bioleaching verfahren im Vorfeld der Versuchsplanung. _____	71
Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der Mechanismen in der sauren Phosphatrückgewinnung mit AEDS. Af: Acidithiobacillus ferrooxidans, Poly-P-MO: Polyphosphatspeichernde Mikro organismen _____	82
Abbildung 4.5.1: Identifizierte Bakterienklassen und -arten der AEDS-Lösung. _____	84

VII Appendix



Abbildung VII-I: Bioleachingreaktor im Labormaßstab (Foto: Jennifer Zimmermann)

Tabelle VII-I: Metallgehalt im Feststoff nach 1-stufigem Bioleaching [mg/kg TM]

Analyt	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT
As	26,0	0,23	7,46	21,31	16,18	8,23	329,54	5,55
Cd	-	-	1,67	0,13	58,00	-	9,38	0
Co	20,24	5,77	2,12	2,90	542,82	2,65	10,31	12,84
Cr	141,54	55,38	35,31	110,29	48,65	2858,3	16,79	205,93
Cu	434,07	26,2	38,71	119,23	65123,99	101,76	158,75	40,86
Mn	2097,08	109,91	10142,53	19299,99	10690,66	29826,57	260,19	1208,88
Mo	11,16	5,71	3,02	1,80	8,36	50	1,01	12,92
Ni	74,98	*	*	*	*	5,19	66,88	*
Pb	231,05	43,83	29,31	1,33	431	1027,73	1161,41	2,31
V	35,79	*	24,60	26,89	25,12	6,6	23,6	-
Zn	2914,23	145,64	765,28	38,14	12034,36	209,3	493,62	60,92

Tabelle VII-II: Metallgehalt im Feststoff nach 2-stufigem Bioleaching [mg/kg TM]

Analyt	KAA	AS	ZF	BR	RO	EOS	BO	SIT
As	1,833	0,23	7,69	23,34	12,47	8,23	329,54	5,55
Cd	-	-	0,0	0,0	0,0	-	9,38	0,0
Co	13,39	5,77	0,56	2,31	0,5	2,65	10,31	12,84
Cr	96,30	55,38	23,53	91,23	20,3	2858,30	16,79	205,93
Cu	312,61	26,2	0,0	13,81	0,0	101,76	158,75	40,86
Mn	2034,9	109,91	0,0	0,0	0,0	29826,57	260,19	1208,88
Mo	12,04	5,71	2,6	2,48	4,6	50,00	1,01	12,92
Ni	*	*	*	*	*	5,19	66,88	*
Pb	184,66	43,83	29,31	1,32	401,04	1027,73	1161,41	2,31
V	20,29	*	19,53	20,95	18,51	6,60	23,60	-
Zn	2193,13	145,64	153,41	12,93	270,03	209,30	493,62	60,92

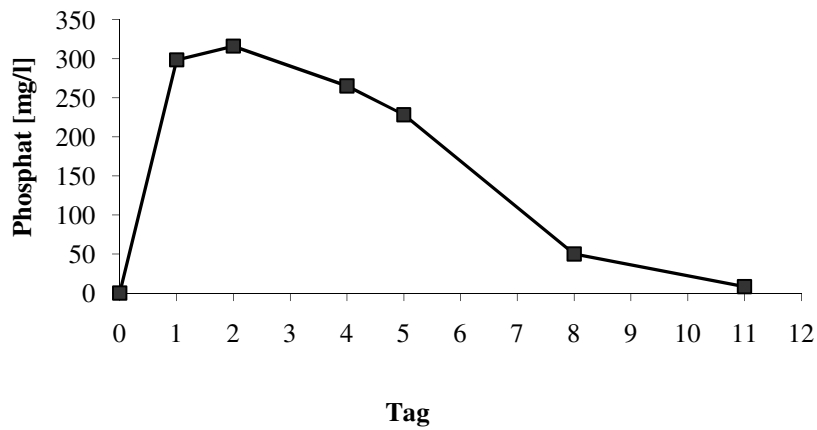
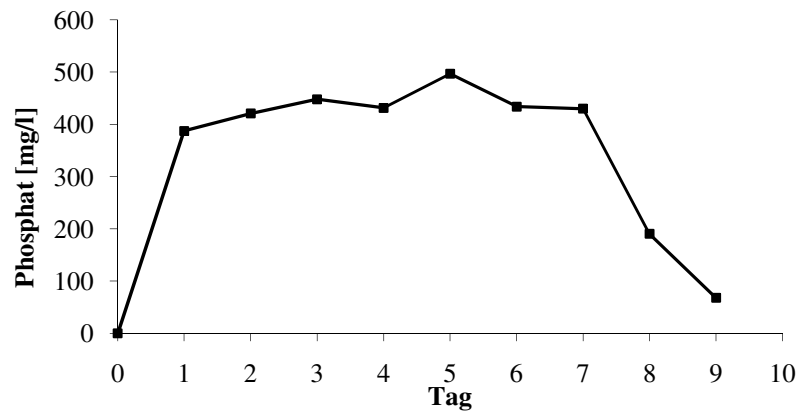
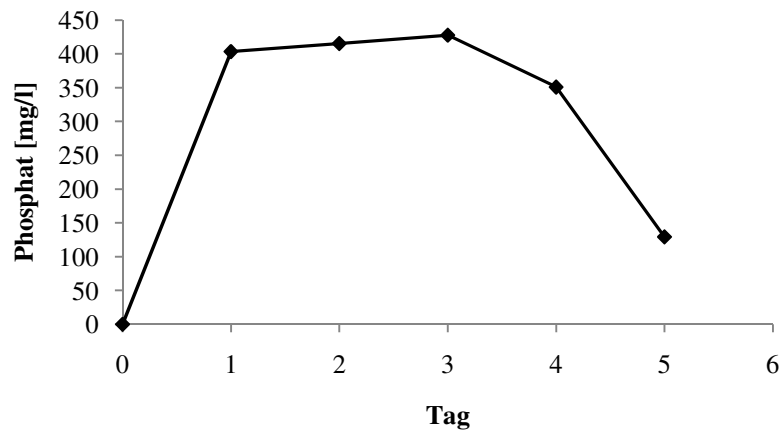


Abbildung VII-II: Beispiele für die biologisch induzierte Phosphorakkumulation. Oben: AEDS + 4 g Klärschlamm- asche. Mitte: AEDS + 3 g Klärschlamm- asche Bonn. Unten: AEDS + 2g Klärschlamm- asche.

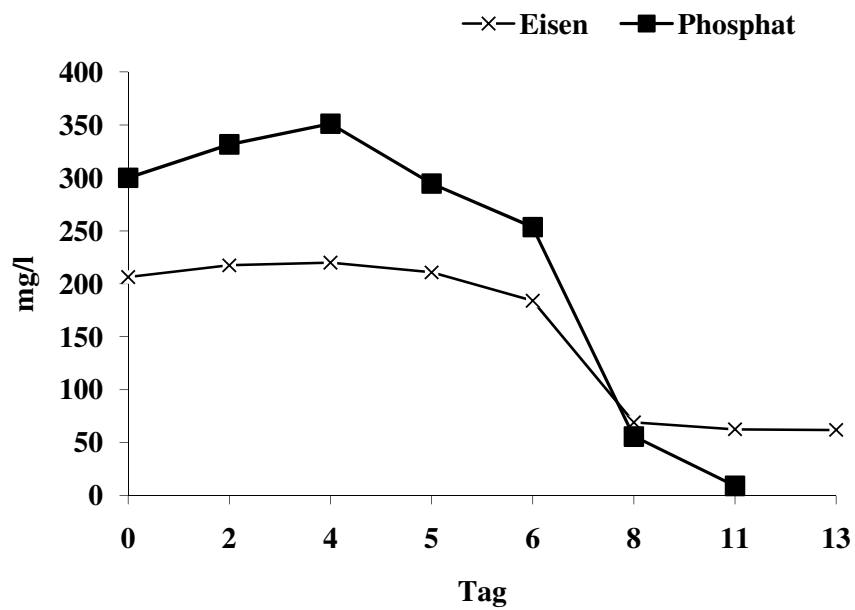


Abb. VII-III : Verhalten von Eisen und Phosphor im Bioleachingmedium. Die Phosphorkonzentration sinkt vor der Eisenkonzentration.



Abbildung VII-IV: Eintrübung des AEDS-Medium während der Phosphorfixierung



Abbildung VII-V: Phosphorprodukt als weiß-beiges Pulver

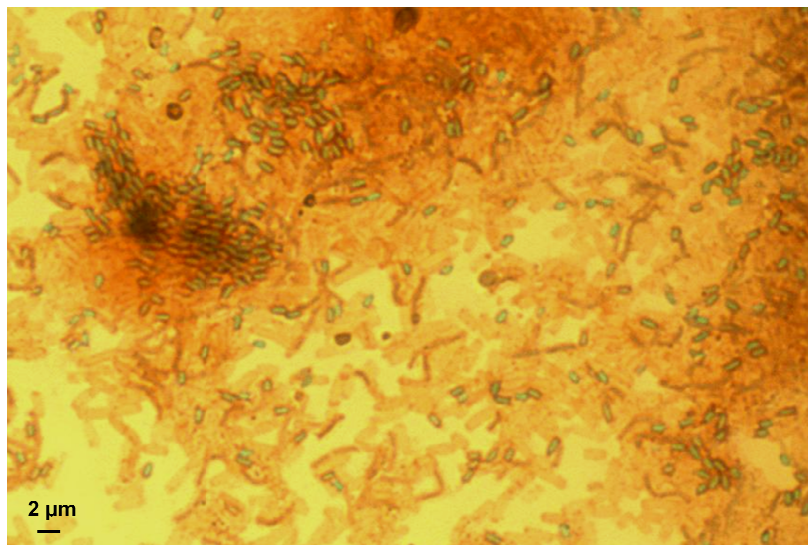


Abbildung VII-VI: Sporenfärbung von Isolat ISOCA 27. Sporen erscheinen grün in den Bakterienzellen

Danksagung

Mein Dank gilt:

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. Wolfgang Dott**, der mir durch entscheidende Fragen immer wieder neuen Anstoß gab und das Stellen von neuen Herausforderungen viele Fortschritte, nicht nur im Laufe des Promotionsprozesses, anregte und ermöglichte.

Herrn **Prof. Dr. Andreas Schäffer**, für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn **Prof. Bohrmann**, für die Übernahme der Rolle als dritten Prüfer.

Meinen Kollegen/Innen **Kai Lehnberg** und **Veronika Kossack**, deren Anregungen und Diskussionsbereitschaft oftmals überraschende und neue Wege aufzeigten. Sowohl für die Arbeit, als auch im Privaten. Danke.

Kathrin Erlinghagen, Kathrin Gerads, Andrea Prehn, Jan Brünsing, Frau van Züthphen, Heike Ehrlichmann, Nina Kuckelkorn, Sven Thoröe und Udo Kaufmann, für ihre Hilfe, ohne die ich die Arbeit nicht hätte bewerkstelligen können.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei:

Meiner Mutter, Axel, Sina, Arash und Christoph, der besten Familie der Welt!!

Markus Radermacher, für alles und für immer.

Und last but not least: *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Zimmermann
Vorname: Jennifer Katharina Bernadette
Geburtstag: 03. Juli 1978
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Qualifikationen:

1986-1997 Rhein Maas Gymnasium Aachen.
1997 Bilinguales Abitur (französisch-deutsch), Rhein Maas Gymnasium, Aachen.
1998-2006 Studium Biologie Diplom mit Abschluss Diplom-Biologin an der RWTH Aachen.
Schwerpunktfächer: Umweltanalytik, bioorganische Chemie, Humanbiologie, Pflanzenphysiologie.
2005-2006 Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Abt. Zoologie und Humanbiologie der RWTH Aachen. Thema: Gap-Junctions in der Oogenese von *Drosophila melanogaster*: Nachweis und Charakterisierung der Gap-Junction-Proteine Innexin 1 und 2.
2007-2010 Promotion am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der RWTH Aachen.