



Wie Bakterien Metalle zerstören oder Kupfer gewinnen

Wolfgang Sand, Aquatische Biotechnologie im Biofilm Centre Universität Duisburg-Essen, Germany



Wie Bakterien Metalle zerstören oder Kupfer gewinnen

2 verschiedene Prozesse mit den gleichen Mechanismen?

Zellformen von Mikroorganismen

UNIVERSITÄT

_B_URG

LM CENTR



Zelloberfläche

| Größe | 1 x 1 | μm |
|-------|-------|----|
| | | |

- Oberfläche 6 x 10⁻¹² m²
- Volumen 10⁻¹⁸ m³

1 mL = 10¹² Zellen = 6 m² aktive Oberfläche

Leben ist möglich bei:

UNIVERSITÄT

BURG

- Temperaturen von -10°C bis 116°C
- Drücken von nahe 0 bis über 1000 bar (Teilvakuum bis Tiefsee/ tiefer Untergrund)
- pH von -3 bis nahe 14
- osmotischem Druck bis >210 bar (ges. NaCl)
- ohne Sauerstoff
- Redoxpotentialen zwischen -450 und +820 mV
- Wasseraktivitäten aw bis 0,61 (= -680 bar)



Werkstoffe für Mikroorganismen: ALLE!

Metalle

(Eisen- und Nichteisenmetalle)

Mineralische Werkstoffe

(Beton, Naturstein, Glas, Mineralien)

Organische Werkstoffe

(Zellulose/Holz, organische Synthese/Polymere, Kohlenwasserstoffe -fest-flüssig-gasförmig-)





Anheftung an Oberflächen und Biofilmbildung

In welchen Dimensionen müssen wir denken?





UNIVERSITÄT

BURG

CHHOLOGY

CENTR











Mikroorganismus - Werkstoff





Schema der Wechselwirkungen bei der bakteriellen Adhäsion an feste Substrata





TEM-Aufnahme mariner, in MnO₂ eingekapselter Bakterien (b) Bakterienzelle (c) Bakterienkapsel





Geschützt im Biofilm

š

Glutardialdehydeinsatz gegen Biofilm auf Stahl in Weißwasser (Papierherstellung)

UNIVERSITÄT

s

BURG

ACUATICHNOLOGY

BIOFILM CENTR







Beton und Naturstein

Kann ein chemischer Test die Wechselwirkungen zwischen Werkstoff und Mikroorganismen erfassen?

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN



š

Abb. 6 Geringfügige Unterschiede zwischen verschiedenen Betonen bei chemischen Schwefelsäure-Einlagerungstests

A DUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTRI



Abb. 5 Vergleich eines gegen biogene Schwefelsäure-Korrosion widerstandsfähigen mit einem wenig widerstandsfähigen Beton





Metalle (Stahl und Co)

Synergie zwischen Elektrochemie und Mikrobiologie

MIC-Mechanismus bei Manganoxidanten (момоs)

UNIVERSITÄT

UIS

BURG

A O UATICH NOLOGY

BIOFILM CENTR

- $1 \rightarrow$ Biofilmbildung
- 2 → Biomineralisation von MnO₂ durch MOMOs
 3 → MnO₂ kommt in direkten Kontakt mit nicht-rostendem Stahl = anodische Potenzialänderung ("Ennoblement")
 4 → Wenn auch Chloridkonzentration über kritischem Niveau
- - = Loch-/Spaltkorrosion



UNIVERSITÄT DEUSSEN G ABIGATECHROLOGY BIOFILM CENTRE

Spundwandkorrosion in Büsum im Niedrigwasserbereich

UNIVERSITÄT DEUSSEBURG

> Mechanismus der Biokorrosion an Stahlspundwänden

A O UATICH HOLOGY

BIOFILM CENTR

A = StahlspundwandB = schwarze Schicht (Eisensulfid)C = Biofilm mit MakrofoulingD = Wasser

Oberer Teil = Spritzwasserzone

Unterer Teil = Immersionszone

high tide (O₂ limited)

full oxygen penetration

low tide

 $(O_2 \text{ non-limited})$

partial oxygen penetration

dimensions not proportional

+ S.O. + polythionates

SRB

SOB

Fe + S.O. + polythionates

SO,

SRB

FeS

FeS

Fe

Fe²⁺



Grenzflächenprozesse = was und wo messe ich eigentlich?

Wasserphase



A QUATICH HOLOGY



UNIVERSITÄT DEUSSEBURG





Schema der Mini-**Plant-**Anlage zur Simulation von MIC

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN



Ringsäule der Mini-Plant-Anlage mit von außen eingesetzten Elektroden

A Q U ATTICH NOLOGY

BIOFILM CENTR

AQUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTR



Ringstück aus der Mini-Plant mit Biofilm und Ablagerungen





pH an Grenzfläche Metall/Biofilm und im Prozeßwasser

pH at interface of mild steel and biofilm (—), pH of bulk medium (—) pH at interface of stainless steel and biofilm (—)





Und nun: Biologische Erzlaugung = Bioleaching

Paracelsus: Cu-bioleaching in Hungary in the 15th century (town Zips)

UNIVERSITÄT

UISBURG SSEN A O UATICHNOLOGY

BIOFILM CENTRE



Georgius Agricola: De Re Metallica





UNIVERSITÄT

D_EUIS_EBURG

ADUATICH NOLOGY

BIOFILM CENTRE



UNIVERSITÄT DEUISEBURG ESSEN



UNIVERSITÄT DUISBURG ARUATICHNOLOGY

BIOFILM CENTR



Industrial Bioleaching





Bioleaching - BRGM

UNIVERSITÄT

U I S B U R G

ADUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTRE







A OUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTR

UNIVERSITÄT

UISBURG



Acid rock drainage occurs

naturally as part of the rock weathering process but is exacerbated by large-scale earth disturbances characteristic of mining and other large construction activities, usually within rocks containing an abundance of sulfide minerals.



UNIVERSITÄT

UIS

_B_URG

AOUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTRI

Acid Mine Drainage at an abandoned mine site near La Union, Spain





Mineral dissolution by attached cells



UNIVERSITÄT

UIS

E N R G

AOUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTRE



UNIVERSITÄT DUISBURG



Single cell of *A. ferrooxidans* attached to pyrite

CH # 0 1 0 0

CENTR

LM



Magnification of the image detail, arrow indicates the EPS-layer

Cells of *L. ferrooxidans* on pyrite

UNIVERSITÄT

D_EUIS_EBURG

ABIOTECHNOLOGY

BIOFILM CENTRE



UNIVERSITÄT DEUSSENURG





AFM-images of EPS-producing cells of *Leptospirillum ferrooxidans* attached to pyrite

after 6 (A), 24 (B), or 48 h (C) of incubation





EPS, reaction space and dimensions

A O U A T I C H H O L O G Y

BIOFILM CENTR

Pseudo-capsule between cells and pyrite: Tributsch 1979



(A) Formation of "pseudo capsule" around leaching regions, which contain a sulfur transporting carrier
 (B) Sulfide corrosion across a sulfur transporting organic film
 (phospholipid, which dissolves sulfur or contains a sulfur complexing agent)





The Attachment Anomaly:

A OUATICH HOLOGY

BIOFILM CENTRI

Plenty of free surface area on pyrite grains for planktonic cells





EPS components

š

| ALL C | F-IL | and and | | | | SBURG | BIOFILM | |
|--------------------|-----------------------------------|------------|---------------|---------|----------|---------------|---------|------------|
| Species | | A | <u>. f.</u> | | ł | A. t. | L. fo. | L. fi. |
| Strain | R1 | A | 2 | SPIII/3 | K6 | RAM 8T | R3 | P3A |
| | pl + s | <u>[0]</u> | 5 | pl+ s | pl | pl | pl+s | pl+s |
| Substrate | µg EPS per 10 ¹⁰ cells | | | | | | | |
| IronII ions | 215 | <u>141</u> | L | n.d. | / | / | n.d. | n.d. |
| Pyrite | 2.760 | <u>363</u> | <u>31.574</u> | 33 | / | / | 5.500 | 4.500 |
| Chalcopyrite | n.d. | <u>515</u> | <u>18.183</u> | n.d. | / | / | n.d. | n.d. |
| Sulfur | 1.155 | <u>199</u> | <u>7.510</u> | n.d. | 20 | 100 | 1 | / |
| / - no suitable su | bstrate | n.d r | not determi | ined | pl — pla | nktonic cells | s — ses | sile cells |

Substrate dependance of extractable EPS

EPS extracted from 10¹⁰ planktonic (pl) and/or sessile (s) cells of *A. ferrooxidans* (A.f.) strains R1, A2 or SPIII/3, *A. thiooxidans* (A.t.) strains K6 or Ram 8T, L. *ferrooxidans*(L. fo.) strain R3 as well as *L. ferriphilum* (L. fi.) strain P3A grown on different substrates.

Amount and chemical composition of EPS from 10¹⁰ cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

UNIVERSITÄT

BURG

| | | % of total EPS (w/w) | | | | |
|-----------------|-----------------------------|----------------------|--------|-------------------------|-----|-----|
| Substrate | (µg/10 ¹⁰ cells) | Sugars | Lipids | FFA ^a | Nb | Pc |
| Iron(II)sulfate | 215 ± 30 | 55.2 | 36.9 | 5.5 | 0.5 | 0.7 |
| Pyrite | 2760 ± 301 | 48.5 | 39.4 | 5.8 | 0.5 | 8.0 |
| Sulfur | 1155 ± 94 | 40.9 | 53.8 | 8.0 | 0.6 | 2.8 |

^a free fatty acids, ^b nitrogen, ^c phosphorus

HHOLOG

BIOFILM CENTR

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN BIOFILM CENTRE



EPS composition of cells of *A. ferrooxidans* R1





UNIVERSITÄT DEUSSENURG





Atomkraft-mikroskopische Aufnahme einer mit chemoorganotrophen Bakterien besiedelten, 50 μ m x 50 μ m (A) bzw. 5 μ m x 5 μ m großen Edelstahloberfläche (B).





Atomkraft-mikroskopische Vermessung einer ursprünglich mit chemoorganotrophen Bakterien besiedelten Edelstahloberfläche nach Entfernung des Biofilmes.

A = Übersichtsaufnahme einer 100 x 100 μ m großen Oberfläche mit zahlreichen Pittingstellen

B = 2D-Profil der in A dargestellten Oberfläche an einer ausgewählten Stelle

Rasterkraftmikroskopie

UNIVERSITÄT

BURG

- kombinierte Rasterkraft-Epifluoreszenzmikroskopie nach FISH-Visualisierung
 - = AFM & EFM

(Bildung, Struktur und Zusammensetzung von Biofilmen)





Biomaterials Workstation[™] =

Combination of atomic force microscopy (AFM) with epifluorescence microscopy (EFM)





A O UATICHNOLOGY

BIOFILM CENTR

NanoWizard®II Atomic force micro-scope (JPK Instruments Germany)



Epifluorescence microscope (Zeiss®, AxioImager A1m)

Shuttle stage

UNIVERSITÄT DEUSSEN RG ADUATICHEDLOGY BIOFILM CENTRE

EFM image of DAPI stained cells



Visualization of sessile cells by AFM & EFM on pyrite

Mixed culture from a coal mining area in East Germany



EFM : cells on pyrite (FISH probe

EUB338, specific for most bact.)



Cells of A. ferrooxidans on pyrite defect site AFM-image



UNIVERSITÄT

AQUATICH HOLOGY

UNIVERSITÄT DEUSSEN RG

A O UAT CHHOLOG

LM

CENTR

Cells of A. ferrooxidans on pyrite defect site EFM-image



Rasterkraftmikroskopie +++

UNIVERSITÄT

BURG

- kombinierte Rasterkraft- und Epifluoreszenzmikroskopie (Visualisierung mittels FISH)
 - = AFM & EFM

(Bildung, Struktur und Zusammensetzung von Biofilmen)

dazu die Kelvinsonde!
 (Potentialunterschiede auf Oberflächen)

AFM gekoppelt mit Kelvin-Probe



Fig. 1. Schematic diagram of the JPK Nanowizard II with Kelvin Force Module for topography and potential visualization.

Each line is scanned twice. In the first pass (trace), topographic features of the surface are recorded in intermittent contact mode. Cantilever oscillation at resonance frequency is driven by vibrations of the dither piezo. Cantilever movement is measured by the deflection of a laser beam reflected from the cantilever onto a 4 quadrant photo detector. Z-position of the X-Y-Z piezo is adjusted by the topography feedback loop to maintain a constant oscillation amplitude. The piezo movement is recorded and used to create a topographic image of the surface.

During second pass (retrace), surface potential is mapped in hover mode. Using the topographic information from trace, the cantilever is lifted to a constant height (typically 50 nm) over the surface. Cantilever oscillation is no longer driven mechanically by the dither piezo but electrically by application of an oscillating voltage at resonance frequency. The dc bias of the tip is adjusted by a feedback loop until cantilever oscillation stops, i.e. the air gap between tip and surface is field-free. The output of the CPD feedback loop is recorded and used to create the surface potential map.



- Which member of a mixed culture is the first colonizer of a metal sulfide surface?
- Which member of a mixed culture requires a precolonization by other bacteria?
- Where on the mineral surface does primary attachment occur?
- What are the EPS-compounds involved in attachment and which compounds are exposed to the solution phase (inhibiting attachment)?
- What is the effect of addition of chelators, metal cations, detergents etc. on the biofilm and primary attachment?



BURG

- How is bacterial attachment influenced by the electrochemistry of the metal sulfide surface?
- Does the crystallographic orientation (planes) impact bacterial attachment and is this related to the electrochemistry of the metal sulfide surface?
- Which metal sulfides are colonizable and in which pattern?

Answers to all these questions will allow us to optimize or to inhibit bioleaching much better than we are able to do at present.

Immer noch wach??? Danke für die Aufmerksamkeit!

UNIVERSITÄT

UISBURG SSEN APINATECH HOLOGY

BIOFILM CENTRE

