

Die bakterielle Oxydation von Pyrit

ELISABETH STUMM-ZOLLINGER

Division of Engineering and Applied Physics,
Harvard University, Cambridge, Mass., U.S.A.

Eingegangen am 15. Oktober 1971

Bacterial Mediation in the Oxidation of Pyrite

Summary. 1. The oxidation of pyrite (the pyrite being in aqueous suspension or in water saturated atmosphere) is mediated by *Ferrobacillus ferrooxidans* and by Fe(II) oxidizing bacteria isolated from acid mine drainage water.

2. The rate of oxidation appears to be proportional to the quantity of bacteria present, e.g., ca. 0.1 Eq/h/g bacteria (dry weight) or 1 Eq/h/g bacterial nitrogen. If bacterial densities become too large, other factors become rate determining. The autotrophic nature of the pyrite oxidation mediating bacteria was ascertained by measuring the assimilation of $^{14}\text{CO}_2$.

3. The pyrite oxidation rate is within wide limits independent of the pyrite surface area concentration. Hence neither surface area dependent reaction steps nor diffusion processes are rate-limiting. These results are compatible with the cycle proposed in reaction (3).

4. The metabolic capacity of the Fe(II) oxidizing organisms does not seem to be fully realized in the oxidation of pyrite. As possible cause of this it may be assumed that a large part of the oxidized iron is transformed into Fe(III) oxide, which is non reactive with respect to pyrite.

Zusammenfassung. 1. *Ferrobacillus ferrooxidans* und Fe(II)-oxydierende Isolate aus Kohlenbergwerkssickerwasser katalysieren die Oxydation von Pyrit durch Sauerstoff. Dabei können Pyrit oder pyrithaltige Agglomerate sowohl in wäßriger Suspension als auch in feuchter Atmosphäre als Substrat für bakterielles Wachstum dienen.

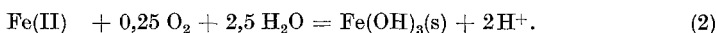
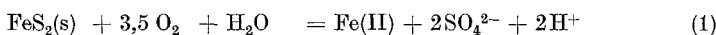
2. Die beobachtete Assimilation von $^{14}\text{CO}_2$ weist auf die autotrophe Natur dieser Bakterien hin.

3. Die Geschwindigkeit der Pyritoxydation ist weitgehend der Anzahl der vorhandenen Bakterien proportional; ca. 0,1 Äq/Std/g Bakterien (Trockengewicht) oder 1 Äq/Std/g Bakterienstickstoff.

4. Die Geschwindigkeit der Pyritoxydation ist innerhalb weiter Grenzen unabhängig von der Oberflächenkonzentration des Pyrites. Somit sind oberflächenabhängige Reaktionsschritte sowie auch Diffusionsvorgänge nicht geschwindigkeitsbestimmend.

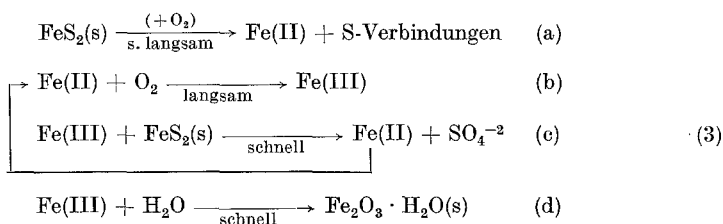
5. Die metabolische Leistungsfähigkeit der Fe(II)-oxydierenden Bakterien wird bei der Oxydation von Pyrit nicht voll ausgenützt. Es mag angenommen werden, daß ein großer Teil des oxydierten Eisens in — bezüglich Pyrit — nicht-reaktives Eisen(III)-oxyd umgewandelt wird.

Es ist bekannt, daß Pyrit (FeS_2) unter aeroben Bedingungen oxydiert wird:

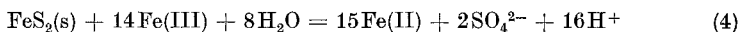


Wo Pyrit in der Natur vorkommt, z. B. bei Ablagerungen von Kohle, Schiefer und Kupfererzen, macht sich bei Kontakt mit Luft diese Oxydation vor allem durch die dabei frei werdende Säure bemerkbar.

Das folgende vereinfachte Reaktionsschema



wurde verwendet (Singer u. Stumm, 1970), um die Geschwindigkeitsabhängigkeit der Oxydationsreaktion zu erklären. Danach wird zweiwertiges Eisen in der Initialreaktion (3a) entweder durch Dissoziation oder Oxydation des Pyrites freigesetzt. Dadurch wird ein Reaktionskreislauf ermöglicht, bei dem in Reaktion (3b) Fe(II) zu Fe(III) oxydiert wird, das dann nach (3c) mit dem Pyrit (Garrels and Thompson, 1960) reagiert und dabei zusätzliche Fe(II), SO_4^{2-} und Protonen nach der stöchiometrischen Gleichung



liefert. Dieses Reaktionsmodell ist ähnlich demjenigen von Temple u. Delchamps (1953).

Die relativen Geschwindigkeiten der Reaktionen (3) wurden in unserem Laboratorium unter sterilen Bedingungen untersucht, und es wurde festgestellt, daß Pyrit vor allem durch Fe(III) (Reaktion 3c) und nur äußerst langsam durch O_2 (Reaktion 3a) oxydiert wird.

Dementsprechend ist die Oxydation von Fe(II) durch O_2 die geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit unter sterilen Bedingungen, in Abhängigkeit des pH (Abb. 1), ist bekannt (Stumm u. Lee, 1961; Singer u. Stumm, 1970). Danach ist bei dem durch die oxydative Auflösung von Pyrit sich einstellenden tiefen pH mit Reaktionsgeschwindigkeiten zu rechnen, die um mehrere Größenordnungen kleiner sind [für die Oxydation von Fe(II) bei pH 3, $p\text{O}_2 = 0,2 \text{ atm}$, 25°C , ergibt sich eine Halbwertszeit von ca. 10 Jahren] als die in der Natur beobachteten Geschwindigkeiten.

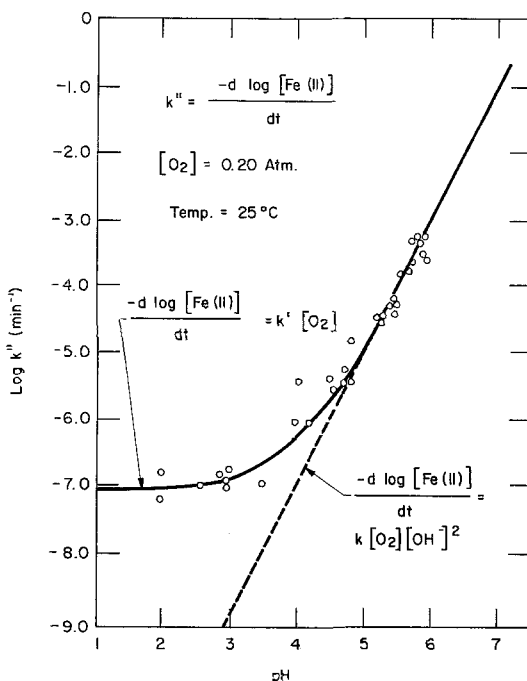


Abb. 1. Geschwindigkeit der Oxydation von Fe(II) als Funktion des pH in abiotischen Systemen (Singer u. Stumm, 1970)

Wohl können verschiedene homogene und heterogene Katalysatoren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und damit auch die Gesamt-oxydationsreaktion etwas beschleunigen (Singer u. Stumm, 1970), doch lassen sich die natürlicherweise auftretenden Geschwindigkeiten am besten durch eine bakterielle Katalyse erklären. Daß autotrophe Eisenbakterien, wie z.B. *Ferrobacillus ferrooxidans* oder *Thiobacillus ferrooxidans*, die Energie der Reaktion 3b [$\Delta G = -6,5$ kcal per Mol Fe(II) bei pH 3] für ihr Wachstum ausnützen können, ist allgemein bekannt (Dugan u. Lundgren, 1965; Silverman u. Ehrlich, 1964; Silverman u. Lundgren, 1959; Tuttle et al., 1969). Solche Bakterien sind aus Drainagewasser von Kohlenbergwerken in USA (West Virginia, Pennsylvania, Ohio) isoliert worden. Trotzdem besteht eine Kontroverse (Proceedings of Symposium on Coal Mine Drainage Research, 1968), ob solche Bakterien lediglich im Abfluß aus Kohlenminen in den eisenhaltigen Abwässern auftreten, oder ob sie maßgeblich kausal an der Oxydation des Pyrites beteiligt sind.

Es war Aufgabe dieser Arbeit, abzuklären, wie autotrophe Bakterien die Oxydation von Pyrit beeinflussen. Entsprechend den in der Natur

vorkommenden Verhältnissen wurde der bakterielle Einfluß auf die Oxydation sowohl an in wäßriger Lösung suspendiertem Pyrit als auch an festem Pyrit in wasserdampfgesättigter Atmosphäre untersucht.

Material und Methoden

Pyrit. Die Untersuchungen wurden an 2 Typen von Pyrit durchgeführt: 1. Reiner, kristalliner Pyrit, welcher mehr als 99% FeS_2 enthält, und 2. pyritische Kohlenabgänge mit einem Pyritgehalt von ca. 5% der Barnes und Tucker, West Virginia, Kohlenmine. Beide Pyritsorten wurden mit Wasser gewaschen und vermörsert. Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm wurden experimentell verwendet. Sie wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Lösungen. Anorganische Lösungen wurden zubereitet mit Reagentien von analytischem Reinheitsgrad und mit doppelt destilliertem Wasser. Wenn nötig, wurden die Lösungen autoklaviert. Fe(II)-Lösungen wurden mit FeSO_4 hergestellt. Medium 9K ist von Silverman u. Lundgren (1959) beschrieben worden. Die gebrauchsbereite Lösung hat einen pH von 2,6.

Bakterien. Als Eisenoxydation katalysierende Bakterien dienten: 1. *Ferrobacillus ferrooxidans* (American Type Culture Collection Nr. 13661) und 2. ein Isolat aus einem Kohlenbergwerksabfluß in Elkins, West Virginia. Der Stamm wurde auf Medium 9K Ion-Agar isoliert.

Inkubation des Pyrites. Pyritproben wurden entweder in Fe(II)-freiem Medium 9K suspendiert oder aber damit angefeuchtet und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre ausgesetzt (Abb. 2).

Messung von Oxydationsgeschwindigkeiten. Die Oxydationsgeschwindigkeiten wurden mikromanometrisch bei 25°C in einem Warburgapparat gemessen. Die Sauerstoffverbrauchswerte der Proben wurden korrigiert um die Blindwerte, die an sterilem, im übrigen aber gleich wie die experimentellen Proben behandeltem Pyrit bestimmt worden waren. Gelegentlich wurde der Oxydationsvorgang auch verfolgt durch Messung der Fe(II)-Konzentration.

Bestimmung der Pyritmengen. Zur Bestimmung der in den Proben vorhandenen Pyritmengen wurde das Pyrit-Bakterien-Kohle-Salzgemenge in siedendem Königswasser in Lösung gebracht. Die Eisenkonzentration wurde dann in 0,1 M HCl atom-absorptionsspektrophotometrisch gemessen (Perkin-Elmer 303).

Assimilation von Kohlenstoff-14. Um die autotrophe Natur der bakteriellen Aktivität auf Pyrit zu demonstrieren, wurde die Assimilation von Kohlenstoff-14 bestimmt. In einem großen Warburggefäß (100 ml) von ähnlicher Konstruktion wie der Apparat in Abb. 2 wurde kristalliner Pyrit auf ein Millipore Membranfilterpapier gelegt. Das Filterpapier war in Kontakt mit Fe-freiem 9K Medium. Während der Inkubation mit eisenoxydierenden Bakterien wurde der Pyrit einer $^{14}\text{CO}_2$ -Gasphase ausgesetzt. Letztere wurde hergestellt, indem man festes $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ mit Schwefelsäure behandelte, nachdem alles $^{12}\text{CO}_2$ mit CO_2 -freier Luft aus dem Gefäß ausgeblasen worden war. Zur Bestimmung des assimilierten Kohlenstoff-14 wurden Pyrit und Filterpapier in einem geschlossenen Apparat (Methode der nassen Oxydation; Jeffay u. Alvarez, 1961) oxydiert. Das dabei freigesetzte CO_2 wurde absorbiert in einer Lösung von Äthylenglykolmonoäthyläther in Äthanolamin. Der Kohlenstoff-14 wurde gemessen in einem Beckman Beta-Mate II-Liquid-Szintillations-Zähler mit Hilfe von nichtpolarem Szintillationsmedium. Standardisiertes ^{14}C -Toluol diente als interner Standard zur Messung der Zählungsausbeute.

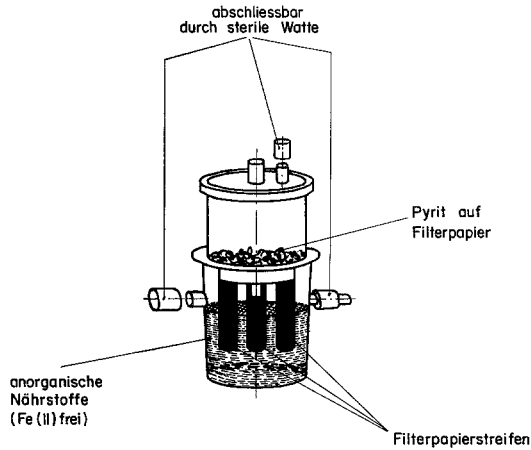


Abb. 2. Apparat für die Oxydation von Pyrit in wasserdampfgesättigter Atmosphäre

Resultate

Die mikrobielle Oxydation von sauren (pH 2–3) Fe(II)-Lösungen und von Pyrit, sowohl in wäßriger Suspension als auch in wasserdampfgesättigter Luft, läßt sich mit *Ferrobacillus ferrooxidans* wie auch mit Isolaten aus Kohlenbergwerksabwässern nachweisen. In Fe(II)-Lösungen ist das Wachstum der Bakterien durch Doppelungszeiten von 8–20 Std charakterisiert. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Sauerstoffoxydation von Fe(II) von der Konzentration der Zellen ab, wie das bereits von Lundgren u. Mitarb. beschrieben wurde. Auch die Oxydation von Pyrit ist weitgehend von der Anzahl der aktiven Zellen abhängig (Abb. 3–5). Erstaunlich ist, daß die bakteriell katalysierte Oxydation von Pyrit in wasserdampfgesättigter Atmosphäre ebenfalls mit bemerkenswerter Geschwindigkeit (Abb. 3) stattfindet. Daß es sich beim Katalysator um autotrophe Bakterien handelt, wurde durch die Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme bewiesen. Vergleichende Untersuchungen über die Aufnahme von $^{14}\text{CO}_2$ in sterilen und mit eisenoxydierenden Bakterien inoculierten Pyritproben zeigten signifikante Assimilation von $^{14}\text{CO}_2$ in den letzteren.

Kinetik

Abb. 3 zeigt, daß die Geschwindigkeit der mikrobiell katalysierten Oxydation von Pyrit in einer feuchten Atmosphäre etwas abhängig ist von der Menge (Oberfläche) des Pyrites. Bei dieser Versuchsanordnung [verschiedene Mengen von Pyrit, welcher mit Fe(II)-freiem 9 K Medium leicht angefeuchtet und mit aus Kohlenbergwerksdrainagewasser isolierten Bakterien 2–3 Monate in einer wasserdampfgesättigten Atmo-

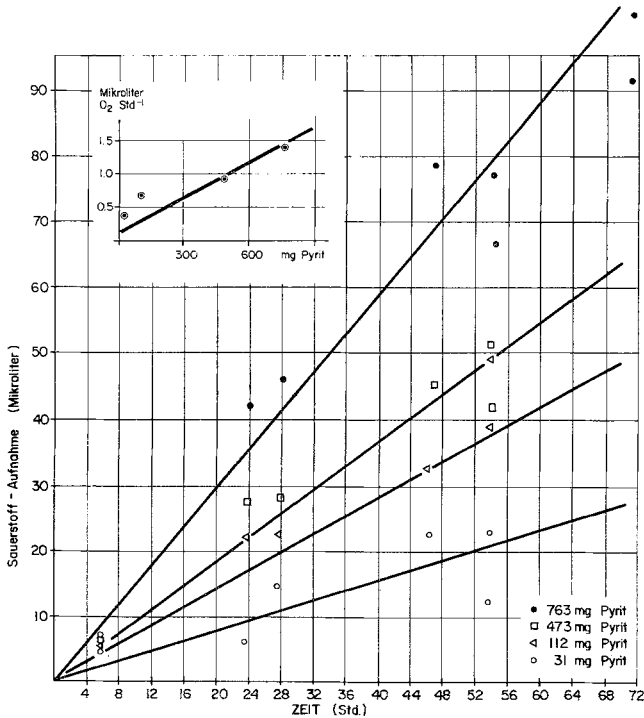


Abb. 3. Bakteriell katalysierte Oxydation von kristallinem Pyrit in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Temperatur 25°C. Organismen: Kohlenminendrainage-Isolat

sphäre inkubiert worden war, wurden in Warburgflaschen übertragen] nimmt die Anzahl der Zellen mit der Menge (Oberfläche) des zur Anwendung gelangenden Pyrites zu.

Abb. 4 und 5 vergleichen die Abhängigkeit der Oxydationsgeschwindigkeit von Pyrit in wäßriger Suspension 1. von der Konzentration der Bakterien und 2. von der Oberflächenkonzentration des zur Anwendung gelangenden Pyrites. Die Resultate von Abb. 4 wurden erhalten in Proben, die gleiche Mengen Pyrit (650 ± 50 mg) in 25 ml Fe(II)-freiem K 9 Medium enthielten, aber mit verschiedenen Mengen Bakterien [2,5 bis 25 μ g Bakterien-Trockengewicht (ca. $2,5-25 \cdot 10^6$ Zellen)] inoculiert worden waren. Diese Bakterien waren Reinkulturen (Isolat aus Kohlenbergwerksdrainagewasser), die über Zeiträume von 2–3 Monaten in Suspensionen von Pyrit in Fe(II)-freiem K 9 Medium inkubiert worden waren. In diesen kurzfristigen Experimenten wurde der Pyrit vorgängig der Inoculation durch 20minütige Immersion in kochendem Wasser

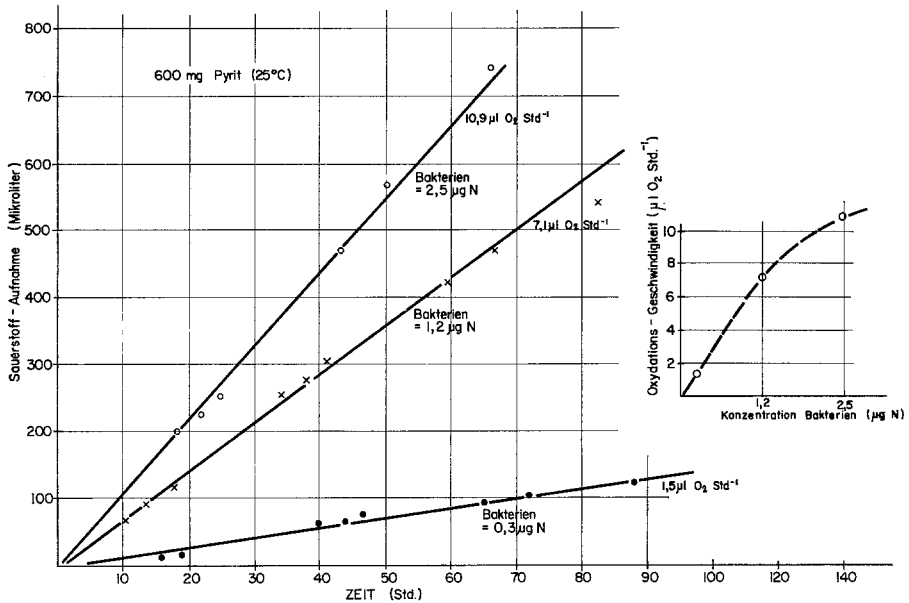


Abb.4. Effekt der Bakterienkonzentration auf die Geschwindigkeit der Oxydation von in wäßriger Lösung suspendiertem, kristallinem Pyrit. Temperatur 25°C. Organismen: Kohlenminendrainage-Isolat

„sterilisiert“. Kontrollen zeigten, daß die Aktivität der schon vor der „Sterilisation“ auf dem Pyrit vorhanden gewesenen Organismen für die Dauer der experimentellen Messungen vernachlässigbar gering war.

Die Resultate der Abb.5 wurden erhalten, indem verschiedene Mengen von Pyrit (verschiedene Oberflächenkonzentrationen), suspendiert in wäßriger Lösung, mit gleich großen Inocula [Reinkulturen von Fe(II) oxydierenden Bakterien, aus Kohlenbergwerksdrainagewasser isoliert] geimpft wurden.

Die in Abb.4 und 5 wiedergegebenen Resultate zeigen, daß die Oxydationsgeschwindigkeit von suspendiertem Pyrit unabhängig ist von der Oberflächenkonzentration des Pyrites, daß sie aber abhängt von der Menge der vorhandenen Bakterien. In jeder Probe wurden weitgehend zeitunabhängige Oxydationsgeschwindigkeiten beobachtet, da die Zahl der Organismen in den Inocula groß genug war, daß die Dauer der experimentellen Beobachtung kurz gehalten werden konnte; somit blieb die relative Konzentration der Bakterien pro Probe annähernd konstant. Diese Unabhängigkeit der Pyritoxydation von der Pyritoberflächenkonzentration zeigt, daß die geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion in der Pyritoxydation [Oxydation von Fe(II) zu Fe(III)] in Lösung statt-

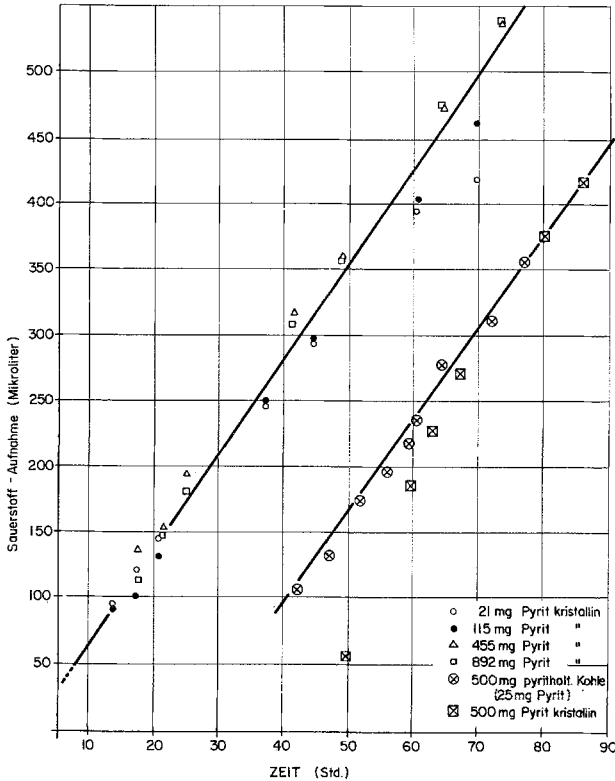


Abb. 5. Die Geschwindigkeit der bakteriell katalysierten Oxydation von in wäßriger Lösung suspendiertem Pyrit ist unabhängig von der Pyritoberflächenkonzentration. Organismen: Kohlenbergwerksdrainage-Isolat. Organismenkonzentration in allen Proben dieselbe

findet. Zur Synthese von 10^6 Zellen (ca. $1 \mu\text{g}$ Trockengewicht) muß ungefähr $1 \mu\text{Äq Fe(II)}$ oxydiert werden (Stumm u. Morgan, 1970, S. 557). Die Geschwindigkeit der Oxydation ist in der Größenordnung von $0,1 \text{ Äq (h}^{-1}\text{)}$ pro Gramm Bakterien (Trockengewicht) oder $1 \text{ Äq (h}^{-1}\text{)}$ pro Gramm Bakterienstickstoff. Wenn die Dichte der Bakterien zu groß wird, können andere Faktoren geschwindigkeitsbestimmend werden. Abb. 5 zeigt ebenfalls, daß die Geschwindigkeit der bakteriell katalysierten Oxydation unabhängig davon ist, ob reiner Kristallpyrit oder pyrithaltige Kohlenabgänge vorliegen.

Abb. 6 vergleicht die Oxydationsgeschwindigkeiten von Fe(II) -Lösungen (9 K Medium) in Gegenwart und Abwesenheit von suspendiertem Pyrit. Anfänglich sind die beiden Geschwindigkeiten ähnlich ($30\text{--}40 \mu\text{l O}_2$ per Stunde). In der Probe, die keinen Pyrit enthält,

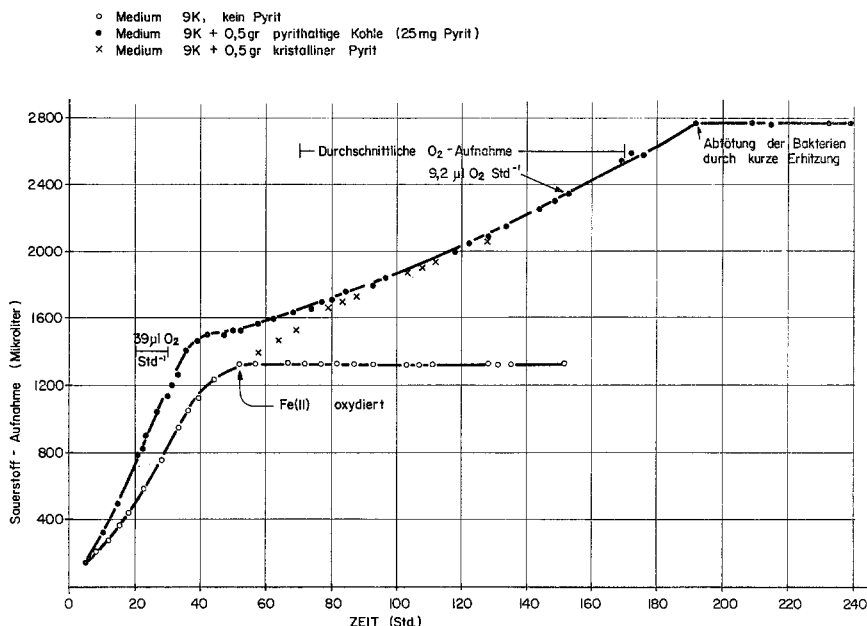


Abb. 6. Vergleich der Oxydationsgeschwindigkeiten von kristallinem Pyrit, Kohlenbergwerkpyrit und gelöstem Eisen(II). Temperatur 25°C. Organismen: Kohlenminenabfluß-Isolat

kommt die Oxydation zum Stillstand, wenn die Konzentration des in der Lösung vorhandenen Fe(II) Null erreicht hat (nach ca. 50 Std). In der Pyrit enthaltenden Probe ist die Oxydationsgeschwindigkeit etwas schneller als in der Vergleichsprobe, wird dann aber, nachdem das meiste in Lösung vorhandene Fe(II) oxidiert ist, 3—4-mal kleiner und erreicht schließlich Werte, die den typischen heterogenen Oxydationsgeschwindigkeiten des Pyrites entsprechen.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Resultate zeigen, daß *Ferrobacillus ferrooxidans* und Fe(II)-oxydierende Isolate aus Kohlenbergwerkssickerwasser die Oxydation von Pyrit durch Sauerstoff katalysieren, und daß Pyrit oder pyrithaltige Agglomerate sowohl in wäßriger Suspension als auch in feuchter Atmosphäre als Substrat für bakterielles Wachstum dienen können, wobei die im letzteren Fall beobachtete Assimilation von $^{14}CO_2$ auf die autotrophe Natur dieser Bakterien hinweist.

Daß die Oxydationsgeschwindigkeit weitgehend der Anzahl der vorhandenen Bakterien proportional ist, deutet darauf hin, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch die bakterielle Aktivität

kontrolliert wird. Damit steht in Übereinstimmung, daß die Oxydationsgeschwindigkeit innerhalb weiter Grenzen unabhängig von der Oberflächenkonzentration und der Natur des Pyrites ist. Unter diesen Umständen sind also oberflächenabhängige Reaktionsschritte sowie auch Diffusionsvorgänge nicht geschwindigkeitsbestimmend. Diese Gesetzmäßigkeiten stützen den in Reaktion (3) vorgeschlagenen Reaktionsscyclus.

Die metabolische Leistungsfähigkeit der Fe(II) oxydierenden Bakterien wird allerdings bei der Oxydation von Pyrit nicht voll ausgenutzt. Wie Abb. 6 zeigt, ist unter sonst vergleichbaren Bedingungen die Geschwindigkeit der Oxydation von Pyrit wesentlich kleiner als diejenige von löslichem Fe(II). Als mögliche Ursache dieses Tatbestandes mag angenommen werden, daß der größte Teil des zu Fe(III) oxydierten Eisens in — bezüglich der Oxydation von Pyrit — nicht-reaktives Fe(III)oxyd umgewandelt wird, so daß in Gegenwart von Pyrit lediglich eine sehr kleine Stationärkonzentration von löslichem Fe(II) aufrechterhalten wird. Ohne zusätzliche Untersuchungen kann aber diese Erniedrigung der metabolischen Aktivität nicht befriedigend erklärt werden. Scheinbar nimmt die Geschwindigkeit der bakteriellen Oxydation von Pyrit nur bis zu einer bestimmten kritischen bakteriellen Konzentration zu; danach wird ein anderer Faktor geschwindigkeitsbestimmend.

Literatur

- Dugan, P. R., Lundgren, D. G.: Energy supply for the chemo-autotroph *Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bact. **89**, 825—834 (1965).
- Garrels, R. M., Thompson, M. W.: Oxydation of pyrite by Fe(III). Amer. J. Sci. **A-258**, 57—64 (1960).
- Jeffay, H., Alvarez, J.: Liquid scintillation counting of ^{14}C . Analyt. Chem. **33**, 612—614 (1961).
- Proceedings of Symposium on Coal Mine Drainage Research, 2nd. Pittsburgh: Mellon Institute 1968.
- Silverman, M. P., Ehrlich, H. L.: Microbial formation and degradation of minerals. Advanc. appl. Microbiol. **6**, 153—206 (1964).
- Lundgren, D. G.: Studies of the chemosynthetic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high yields. J. Bact. **77**, 642—647 (1959).
- Singer, P. C., Stumm, W.: Acid mine drainage: The rate determining step. Science **167**, 1121—1123 (1970).
- Stumm, W., Lee, G. F.: Oxygenation of ferrous iron. Ind. Eng. Chem. **53**, 143—146 (1961).
- Morgan, J. J.: Aquatic chemistry, p. 557. New York: Wiley-Interscience 1970.
- Temple, K. L., Delchamps, E. W.: Autotrophic bacteria and the formation of acid in bituminous coal mines. Appl. Microbiol. **1**, 255—258 (1953).
- Tuttle, J. H., Dugan, P. R., MacMillan, C. B., Randles, C. I.: Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. J. Bact. **97**, 594—602 (1969).

Dr. Elisabeth Stumm-Zollinger
Zürichstr. 127
CH-8700 Küsnacht, Schweiz