

**UNTERSUCHUNGEN ZUM MIKROBIELLEN SCHWEFELKREISLAUF  
IN SAUREN TAGEBAU-RESTSEEN  
DER NIEDERLAUSITZ (BRANDENBURG)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES GRADES  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.)  
DER  
HOHEN MATHEMATISCHE-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT  
ZU BONN

VORGELEGT VON  
JUTTA MEIER  
BONN, MAI 2001



Die vorliegende Arbeit erfolgte im Rahmen des Teilprojekts "Limnologie und Gewässerchemie geogen schwefelsaurer Bergbau-Restseen im Lausitzer Braunkohlerevier" des LENAB-Verbundprojekts, durchgeführt von der Sektion Gewässerforschung Magdeburg (Sektionsleiter: Prof. Dr. W. Geller) des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH und gefördert vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (Fkz 0339648).

Die Dissertation wurde extern unter Leitung von Priv. Doz. Dr. H.-D. Babenzien in der Abteilung Limnologie Geschichteter Seen (Abteilungsleiter: Prof. Dr. R. Koschel) des Leibniz-Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Stechlin-Neuglobsow mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Referent: Priv. Doz. Dr. Hans-Dietrich Babenzien  
(Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei)

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Hans G. Trüper  
(Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)



**Meinen Eltern**

## Abkürzungen, Symbole, Einheiten

ANC	<i>Acid Neutralizing Capacity</i> : Säuren-Neutralisierungskapazität
APS	Ammoniumpersulfat
AVS	<i>Acid Volatile Sulfur</i> : säureflüchtiger Schwefel
BNC	<i>Base Neutralizing Capacity</i> : Basen-Neutralisierungskapazität
CRS	<i>Chromium Reducible Sulfur</i> : chromreduzierbarer Schwefel
ddNTP	didesoxy-Nucleosidtriphosphat
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
DIC	<i>Dissolved Inorganic Carbon</i> : gelöster anorganischer Kohlenstoff
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i> : gelöster organischer Kohlenstoff
DOP	<i>Degree Of Pyritization</i> : Bildungsgrad von Pyrit
DOS	<i>Degree Of Sulfidization</i> : Bildungsgrad von sulfidischem Eisen
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
$\phi$	Porosität
FeOB	eisenoxidierende Bakterien
FeRB	eisenreduzierende Bakterien
$g$	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$	demineralisiertes Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	destilliertes Wasser
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonat
LENAB	Leitbilder für naturnahe Bereiche (im Lausitzer Braunkohlerevier)
$\mu$	spezifische Wachstumsrate
MPN	<i>Most Probable Number</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
$\rho$	Dichte
RS	Restsee
SOB	schwefeloxidierende Bakterien
SRB	sulfatreduzierende Bakterien
SRP	<i>Soluble Reactive Phosphate</i> : lösliches reaktives Phosphat
SRR	Sulfatreduktionsrate
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
$t_d$	Verdopplungszeit
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
$T_m$	Schmelztemperatur
TP	<i>Total Phosphate</i> : Gesamtphosphat
TRIS <sup>a</sup>	<i>Total Reduced Inorganic Sulfur</i> : reduzierter anorganischer Gesamt-schwefel
TRIS <sup>b</sup>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>

<sup>a</sup> diese Bedeutung der Abkürzung gilt für die gesamte vorliegende Arbeit mit Ausnahme von Kapitel 2.4

<sup>b</sup> diese Bedeutung der Abkürzung gilt ausschließlich in Kapitel 2.4

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1 Tagebau-Restseen im Braunkohlerevier der Niederlausitz	1
1.2 Die Bedeutung des mikrobiellen Schwefel- und Eisenkreislaufs für die Alkalinitätsbildung	2
1.3 Azidophile Mikroorganismen in schwefelsauren Habiten	6
1.4 Zielsetzung der eigenen Arbeit	10

### 2. Material und Methoden

2.1 Die Untersuchungsgewässer	12
2.1.1 Restsee 111	14
2.1.2 Restsee 107	16
2.1.3 Restsee B	17
2.2. Untersuchung von Standortparametern	18
2.2.1 Sedimentprobenahme und -aufarbeitung	18
2.2.2 Analyse physikalischer und chemischer Sedimentparameter	19
2.2.2.1 pH-Wert und Redoxpotenzial	19
2.2.2.2 Trockengewicht, Glühverlust und Porosität	20
2.2.2.3 Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff im Porenwasser	20
2.2.2.4 Reduzierte Schwefelverbindungen	20
2.2.2.5 Eisenverbindungen	21
2.2.3 Bestimmung der Sulfatreduktionsraten	22
2.2.4 Experimente zum Einfluss organischer Substrate auf die Sulfat-reduktion (Restsee 111)	24
2.2.5 Berechnung der relativen Standardabweichung	25
2.2.6 Berechnung des Verhältnisses von säureflüchtigem Schwefel zu Pyrit-Schwefel und der Bildungsgrade von Pyrit und sulfidischem Eisen	25
2.3. Mikrobiologische Untersuchungen	26
2.3.1 Stammlösungen für Kulturmedien	26
2.3.2 Medien zur Bestimmung der Anzahl kultivierbarer Zellen im Sediment	27
2.3.3 Durchführung der Zellzahlbestimmung	30
2.3.4 Gewinnung von Reinkulturen	31
2.3.5 Physiologische Charakterisierung von Reinkulturen	35

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen	37
2.4.1 Zellernte, Isolierung und Aufreinigung der Zell-DNA	37
2.4.2 Amplifikation der 16S rDNA mittels <i>Polymerase Chain Reaction</i>	37
2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung des PCR-Produktes	38
2.4.4 Partielle Sequenzierung der 16S rDNA	39
2.4.5 Phylogenetische Analyse	41
2.5 Verwendete Chemikalien und Gase	42

## 3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der Sedimente der drei Untersuchungsgewässer	43
3.1.1 Allgemeine Sedimentbeschreibung	43
3.1.2 pH-Wert und Redoxpotenzial	44
3.1.3 Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff im Porenwasser	45
3.1.4 Reduzierte Schwefel- und Eisenverbindungen	46
3.1.5 Sulfatreduktion und der Einfluss organischer Substrate	50
3.1.6 Zellzahlen kultivierbarer schwefel- und eisenoxidierender und sulfat-reduzierender Bakterien	52
3.2 Vergleich der Sedimente zu verschiedenen Probenahmeterminen	56
3.3 Charakterisierung der gewonnenen Reinkulturen	62
3.3.1 Schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme	62
3.3.2 Sulfatreduzierende Bakterienstämme	71
3.3.3 Zellzahlbestimmungen in Sedimenten von Restsee 111 basierend auf Eigenschaften der Isolate	78

## 4. Diskussion

4.1 Eisen- und Schwefelkreislauf in den Sedimenten der Restseen	79
4.1.1 Eisen(III)-Minerale und Sulfattransport	82
4.1.2 Eisen(III)-Reduktion und Reoxidation der reduzierten Eisen(II)-Verbindungen	83
4.1.3 Sulfatreduktion und Reoxidation der reduzierten Schwefelverbindungen	86
4.1.4 Kontrolle der Pyritbildung	91
4.1.5 Alkalinitätsbildung und Entwicklung der Seen	94
4.2 Funktion und Diversität der isolierten Bakterienstämme	95
4.2.1 Schwefel- und eisenoxidierende Bakterien	96
4.2.2 Sulfatreduzierende Bakterien	98
4.3 Ausblick	102

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>5. Zusammenfassung</b>	105
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	107
<b>7. Anhang</b>	127
7.1 Daten der Sedimentprobenahmen	128
7.2 Dendrogramme berechnet nach der <i>Neighbor Joining-</i> und der <i>Maximum Parsimony</i> -Methode für die sporenbildenden, sulfatreduzierenden Isolate	140
7.3 pe/pH-Diagramm für das Fe-S-K-O-H System	142



## 1. Einleitung

### 1.1 Tagebau-Restseen im Braunkohlerevier der Niederlausitz

In der Lausitzer Bergbaufolgelandschaft entsteht gegenwärtig eine Seenplatte mit mehr als 400 Seen und einer Gesamtfläche von mehr als 25000 ha (Geller & Schultze 1999, Klapper 2000, Luckner & Eichhorn 1996). Die größeren Seen erreichen nach Beendigung der Flutung Oberflächen von mehr als 1000 ha wie z.B. bis zu 1500 ha in Bärwalde und bis zu 1300 ha in Sedlitz (Klapper 2000, Nixdorf & Hemm 2000). Der Senftenberger See, der von der Schwarzen Elster durchflossen wird, besitzt eine Größe von 1200 ha. Bei einer Vielzahl der Seen handelt es sich jedoch um Kleinseen mit einer Größe von weniger als 1 ha, die aus der Zeit des vorindustriellen Tagebaus stammen (Geller & Schultze 1999).

Das Hauptvorkommen der Lausitzer Braunkohle-Lagerstätten befindet sich in der Niederlausitz, wobei die Tagebauregion Südbrandenburg und den Nordosten von Sachsen umfasst. Die tertiären Schichten der Niederlausitz sind im Übergangsbereich zwischen der überwiegend von Meeren eingenommenen Norddeutschen Senke und dem Böhmischem-Mitteldeutschen Festlandsgebiet abgelagert worden (Henningsen & Katzung 1992). Die Braunkohleflöze entstanden im unteren bis mittleren Miozän. Das Braunkohlevorkommen der Niederlausitz ist das größte in Deutschland und erreichte eine maximale Förderung von 200,5 Mio t im Jahr 1988 (Geller et al. 1998, Möbs & Maul 1994, Nixdorf & Kapfer 1998). Nach 1990 ging die Förderung drastisch zurück und lag im Jahr 1993 bei weniger als 45 % der 1988 erzielten Maximalmenge.

Nach Stilllegung der Tagebaue führt die Flutung der entstandenen Resthohlformen zur Ausbildung von Restseen. Die Restseen der Niederlausitz unterscheiden sich untereinander sehr stark hinsichtlich ihrer Morphometrie und Wasserchemie (Nixdorf et al. 1998a). Gegenwärtig bilden die neutralen Seen nur einen kleinen Anteil der gesamten Restseenfläche (Klapper 2000). Viele Seen sind stark versauert ( $\text{pH} < 4$ ) und weisen hohe Ionenkonzentrationen auf. Calcium, Eisen, Magnesium und Aluminium bilden die Hauptkationen, während Sulfat das Hauptanion bildet (Herzsprung et al. 1998). Im Gegensatz zu den neutralen, carbonatgepufferten Gewässern sind die sauren Restseen eisengepuffert. Für die Stabilisierung der pH-Werte im Bereich von pH 2 bis 4 ist das  $\text{Fe(OH)}_x$ -Puffersystem verantwortlich (Geller et al. 1998). Restseen im Bereich von pH 4,5 bis 5,5, in dem das  $\text{Al(OH)}_x$ -Puffersystem wirksam ist, kommen selten vor (Kleeberg 1998). Die Besiedlung der sauren Restseen durch höhere Organismen ist durch das Vorkommen nur weniger Arten, geringe Biomassen und die Entwicklung sehr einfacher Nahrungsnetzstrukturen charakterisiert (Packroff et al. 2000, Wollmann et al. 2000). Die geringe Produktivität dieser Seen ist durch die Kohlenstoff- und Phosphorlimitierung des Phytoplanktons bedingt (Kapfer 1998, Nixdorf & Hemm 2000, Nixdorf et al. 1998a).

## 1.2 Die Bedeutung des mikrobiellen Schwefel- und Eisenkreislaufs für die Alkalinitätsbildung

Für die Entwicklung der Bergbau-Restseen spielen die Kreisläufe der abundanten Elemente Eisen und Schwefel (Abb. 1.1) eine große Rolle. Zum einen nehmen sie Einfluss auf den Kreislauf des Kohlenstoffs. Viele der Mikroorganismen, welche die Umsetzungen der Schwefel- und Eisenverbindungen katalysieren, sind chemolithoautotroph und können bei hohen Abundanzen bedeutend zur Primärproduktion organischen Kohlenstoffs beitragen (Schlegel & Bowien 1989, Shively & Barton 1991). Eisen(III) und Sulfat bilden in anoxischen Sedimenten wichtige terminale Elektronen-Akzeptoren im Mineralisationsprozess der organischen Substanz (Lovley & Phillips 1986, Sørensen 1982, Jørgensen 1982). Zum anderen bestimmt die Balance zwischen den oxidativen, aziditätsbildenden Prozessen und den reduktiven, alkalinitätsbildenden Prozessen die Möglichkeit zur Entwicklung eines neutralen Gewässers.

Die Azidität ist definiert als die Basen-Neutralisierungskapazität (BNC) einer Lösung und entspricht der Äquivalentsumme aller in einer Lösung vorhandenen Säuren ( $BNC = [HA] + [H^+] - [OH^-]$ ), die bis zu einem Äquivalenzpunkt ( $A^-$ ,  $H_2O$ ) mit einer starken Base titriert werden können (Sigg & Stumm 1996). In den sauren, eisengepufferten Restseen wird die hohe Azidität durch die hohen Konzentrationen von Protonen ( $H^+$ ) und gelöstem Eisen(III)  $[Fe^{3+} + 3 OH^- \leftrightarrow Fe(OH)_3]$  verursacht. Die Alkalinität ist definiert als die Säure-Neutralisierungskapazität ( $ANC = [A^-] + [OH^-] - [H^+]$ ). Alkalinitätsbildung in den sauren Restseen bedeutet die Eliminierung des gelösten Eisens und Sulfats und infolgedessen der Protonen aus dem Freiwasser (Peine & Peiffer 1998).

Die Versauerung der Restseen in der Niederlausitz wird durch die Verwitterung von Eisendisulfiden ( $FeS_2$ ) verursacht (Geller et al. 1998). Die Eisendisulfide gehen aus marin-brackischen Sedimenten tertiärer Ablagerungen hervor, welche durch bergbauliche Aktivitäten an die Erdoberfläche gelangen und im tertiär geprägten Abraum enthalten sind (Heinkele et al. 1999, Katzur 1998, Thum et al. 1992). Dabei dominiert in Kippsubstraten des Lausitzer Braunkohlereviers die Form Pyrit über Markasit (Heinkele et al. 1999). Die Oxidation von Pyrit im Kippenmassiv, die Lösung der Reaktionsprodukte  $SO_4^{2-}$ ,  $Fe^{2+}$  und  $H^+$  im Sicker- und Grundwasser sowie die Oxidation von  $Fe^{2+}$  und die Ausfällung von Fe(III)-Hydroxiden und Fe(III)-Hydroxosulfaten führen zur Bildung saurer Grubenwässer (Nordstrom & Alpers 1999, Singer & Stumm 1970). In diesem als *Acid Mine Drainage* (AMD) bezeichneten Prozess wurde den schwefel- und eisenoxidierenden Mikroorganismen schon zeitig eine aktive Rolle zugeschrieben (Colmer & Hinkle 1947, Leathem et al. 1953a, 1953b). Diese besteht aus der  $H^+$ -Freisetzung durch die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen sowie der Nachlieferung des Oxidanten  $Fe^{3+}$  durch die Oxidation von  $Fe^{2+}$ . Letztere Reaktion

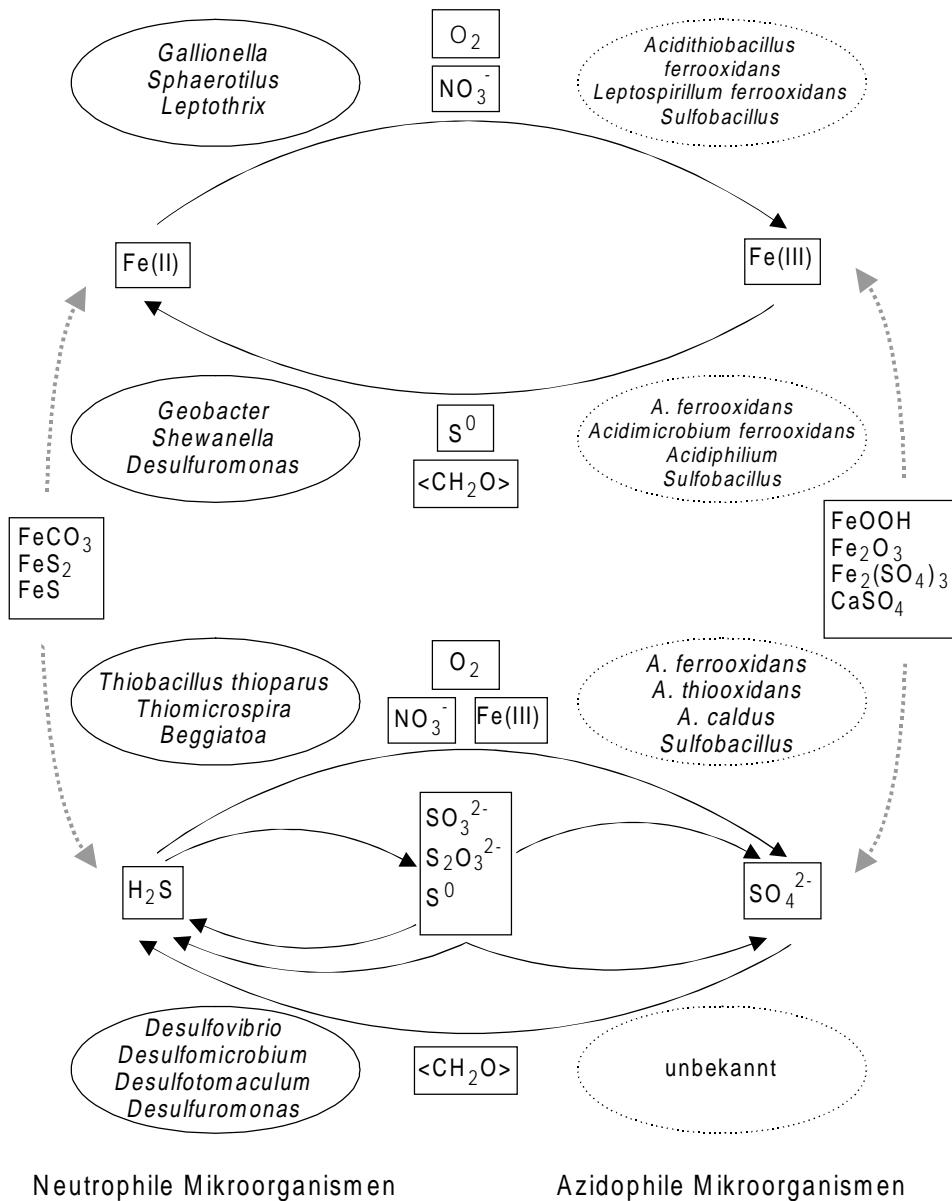


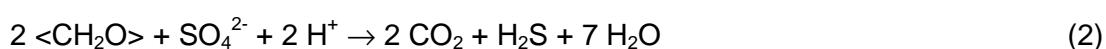
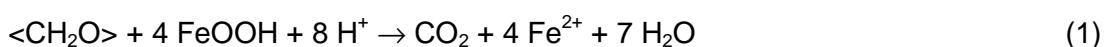
Abb. 1.1: Der anorganische Eisen- und Schwefelkreislauf (verändert nach Ehrlich 1996 und Robertson & Kuennen 1992). Beispiele mesophiler (bis moderat thermophiler) Mikroorganismen, welche die Reaktionen katalysieren, sind in Neutrophile (links) und Azidophile (rechts) eingeteilt.

ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Prozesses; er wird bei pH-Werten kleiner pH 3,5 durch die mikrobielle Katalyse stark beschleunigt (Singer & Stumm 1970). Der Angriff auf  $FeS_2$  (und andere Disulfide) erfolgt chemisch über  $Fe^{3+}$  (Luther 1987, Silverman 1967, Singer & Stumm 1970), wobei als erste Reaktionsprodukte  $Fe^{2+}$  und  $S_2O_3^{2-}$  entstehen, welche in anschließenden Reaktionen chemisch oder mikrobiell oxidiert werden (Schippers et al. 1999). Die Auflösung und Oxidation säurelöslicher Sulfide [z.B. die Monosulfide ( $FeS$ ) und Chalcopyrit ( $CuFeS_2$ )] erfolgt ebenfalls über die Oxidation mit  $Fe^{3+}$  oder über einen Protonenangriff und folgende chemische oder mikrobielle Oxidation der Lösungsprodukte (Schippers & Sand 1999).

Ob und zu welchem Grad eine Versauerung der Restseen eintritt, hängt zunächst von der Art des Flutungswassers sowie der Pufferkapazität des Bodens ab (Klapper & Schultze 1995). Die Flutung der Resthohlformen erfolgt in den meisten Fällen durch den Wiederanstieg des Grundwassers, welches häufig aus benachbarten Kippmassiven austritt und durch die oben genannten Prozesse stark belastet ist (Bozau et al. 1999, Knöller & Strauch 1999). Nur in wenigen Ausnahmen, z. B. bei sehr großen Restseen, erfolgt eine Auffüllung mit pH-neutralem Oberflächenwasser. Bei starker Pufferkapazität des Bodens, d. h. bei hohen Anteil an Carbonaten und Silikaten, wird die gebildete Säure neutralisiert und es entsteht ein neutraler, calcium- und sulfatreicher Restsee (Klapper & Schultze 1995, Zachmann et al. 1998). In der Niederlausitz bilden jedoch mit Ausnahme der nordwestlichen Region schwach gepufferte Sandböden die überwiegend eiszeitlichen Ablagerungen (Schulz & Wieglob 2000, Thum et al. 1992). Der Beitrag des Einzugsgebietes an der für den See bedeutenden Alkalinitätsbildung ist im allgemeinen bei schwach gepufferten Böden geringfügig (Cook et al. 1986, Schindler et al. 1986). Die Bedeutung der im See stattfindenden Alkalinitätsbildung nimmt darüber hinaus bei kleinem Einzugsgebiet, geringen Oberflächenzu- und -abfluss sowie langen Wasserverweilzeiten zu (Sampson et al. 1994). Daher spielen in den kleineren Restseen der Niederlausitz, einschließlich der Untersuchungsgewässer der vorliegenden Arbeit, die seeinternen alkalinitätsbildenden Prozesse eine wichtige Rolle.

Alkalinität entsteht bei Verwitterung von Aluminiumsilikaten und Calciumkarbonaten, bei Austauschreaktionen mit Basen-Kationen und bei biologischen Prozessen wie der Biosynthese (Assimilation von Nitrat, Sulfat und Phosphat), der dissimilatorischen Nitrat-, Eisen(III)- und Sulfatreduktion (letztere gekoppelt an die Bildung von Eisensulfiden) und der Ammonifikation (Cook et al. 1986, Mills et al. 1989, Sampson et al. 1994, Schindler et al. 1986). In natürlichen Seen sind die Prozesse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs und der Reduktion (bzw. Eliminierung) von Sulfat und Nitrat hauptverantwortlich für die *in situ* Alkalinitätsbildung und finden im Sediment oder nahe der Sedimentoberfläche statt (Cook et al. 1986, Sampson et al. 1994, Schindler et al. 1986). In AMD-belasteten Gewässern trägt neben der mikrobiellen Sulfatreduktion (Herlihy et al. 1987) auch die mikrobielle Eisen(III)-Reduktion bedeutend zur Alkalinitätsbildung und Neutralisierung bei (Vile & Wieder 1993).

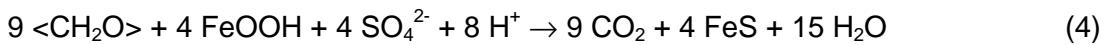
Die Alkalinitätsbildung bei der Oxidation organischen Materials (dargestellt durch die Summenformel  $\langle\text{CH}_2\text{O}\rangle$ ) mit Eisen(III) oder Sulfat als Elektronenakzeptor kann durch folgende Reaktionsgleichungen vereinfacht beschrieben werden (Anderson & Schiff 1987, Cook et al. 1986, Mills et al. 1989):



Der Übergang der Reaktionsprodukte,  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{Fe}^{2+}$ , in eine nichtlösliche Form verhindert die Diffusion und die Reoxidation im oxischen Bereich (Anderson & Schiff 1987):



Die Kombination der Reaktionen (1), (2) und (3) ergibt den Netto-Effekt, welcher aus Eisen(III)-Reduktion, Sulfatreduktion und der Bildung von FeS hervorgeht (Anderson & Schiff 1987, Cook et al. 1986):



Anorganischer Schwefel kann auch in anderer Formen als FeS z. B. als Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) festgelegt werden. Die Bildung von Pyrit erfolgt über die Reaktion von FeS mit zerovalenten Schwefel (hier summarisch dargestellt als elementarer Schwefel) (Berner 1984, Luther 1991, Middelburg 1991):

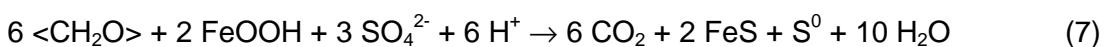


Die Entstehung von Pyrit unter anoxischen Bedingungen über die Reaktion von FeS mit Schwefelwasserstoff unter Bildung von molekularem Wasserstoff wurde bislang nur für Temperaturen von 100 °C und darüber nachgewiesen (Drobner et al. 1990).

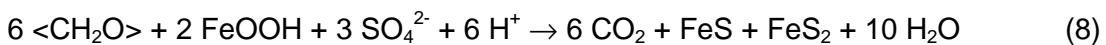
Elementarer Schwefel ( $\text{S}^0$ ) entsteht chemisch oder mikrobiell bei der unvollständigen Oxidation von Schwefelwasserstoff durch Sauerstoff oder Eisen(III). Die chemische Reoxidation mit Eisen(III) (z. B. FeOOH) kann beschrieben werden als (Aller & Rude 1988, Canfield 1989, Pyzik & Sommer 1981):



Auf diese Weise werden bei der Eisen(III)-Reduktion direkt keine Protonen verbraucht. Jedoch gibt es einen Netto-Alkalinitätsgewinn durch die vorangegangene Sulfatreduktion. Die Reaktion von  $\text{H}_2\text{S}$  mit FeOOH anstatt  $\text{Fe}^{2+}$  und die Bildung von  $\text{S}^0$  vermeiden die Abgabe von  $\text{H}^+$  wie in Gleichung (3). Die Kombination der Reaktionen (2) und (6) ergibt:



oder (Boesen & Postma 1988):



Aus den Reaktionsgleichungen (4), (7) und (8) geht hervor, dass pro Mol reduziertes Sulfat zwei Mol Protonen verbraucht werden, unabhängig davon, ob FeS,  $\text{S}^0$  oder  $\text{FeS}_2$  gebildet werden. Der neutralisierende Effekt dieser Reaktionen kann demnach vom Verlust des Sulfats aus dem Wasserkörper oder von der Akkumulation der reduzierten Schwefelverbindungen im Sediment abgeleitet werden (Cook et al. 1986, Peine & Peiffer 1998, Kleeberg 1998).

### 1.3 Azidophile Mikroorganismen in schwefelsauren Habitaten

Als erste Mikroorganismen, die an der Biooxidation von Metallsulfiden und somit an der Bildung saurer Grubenwässer beteiligt sind, wurden *Thiobacillus thiooxidans* (Colmer & Hinkle 1947, Waksman & Joffe 1922) und *Thiobacillus ferrooxidans* (Colmer et al. 1950, Temple & Colmer 1951) identifiziert. Die Typenstämme dieser Organismen wurden erst kürzlich in *Acidithiobacillus thiooxidans* bzw. *Acidithiobacillus ferrooxidans* umbenannt (Kelly & Wood 2000). Wie ihr neuer Gattungsname besagt, sind diese Organismen azidophil, d. h. sie wachsen bei pH-Werten kleiner als pH 6 (siehe Abb. 1.2A). Sie werden sogar als extrem azidophil bezeichnet, da der für ihr Wachstum optimale pH-Wert unter pH 3 liegt (Harrison 1984, Johnson 1998). Sie gelten als mesophil, da ihre optimale Wachstumstemperatur im Bereich von 20 - 40 °C liegt (siehe Abb. 1.2B). Weitere extrem azidophile, in die Erzlauge involvierte Mikroorganismen sind die extrem thermophilen Archaebakterien *Acidianus* spp., *Metallosphaera* spp., *Sulfolobus* spp. und *Sulfurococcus* spp., die moderat thermophilen Vertreter, darunter das Archaebakterium *Ferroplasma acidiphilum* sowie die Eubakterien *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* und *Sulfobacillus* spp., und die mesophilen Eubakterien *Acidiphilum acidophilum*, *Acidithiobacillus albertensis*, *Leptospirillum ferrooxidans* und *Sulfobacillus disulfidooxidans* (Bosecker 1997, Golyshina et al. 2000, Johnson 1998, Schwartz 1977). Die schwefel- und eisenoxidierenden Mikroorganismen sind häufig mit azidophilen heterotrophen Vertretern assoziiert, die auch zur Erzlauge beitragen und deren Vorkommen typisch für diese schwefelsauren Habitate ist (Bosecker 1997, Harrison 1984, Schwartz 1977). Zu diesen heterotrophen Mikroorganismen gehören die moderat thermophilen Archaebakterien *Thermoplasma* spp. und *Picrophilus* spp. und die mesophilen Eubakterien *Acidisphaera rubrifaciens*, *Acidiphilum* spp., *Acidobacterium capsulatum*, *Acidocella* spp. und *Acidomonas methanolica* (Hiraishi et al. 2000, Johnson 1998).

Die oben genannten azidophilen Mikroorganismen kommen ebenfalls in natürlichen schwefelsauren Habitaten vor (Johnson 1998, Robbins 2000). In diesen oft vulkanisch und geothermal aufgeheizten Lebensräumen, wie z. B. in heißen Schwefelquellen (Solfataren), liegen die Temperaturen weit über 40 °C, weshalb viele der extrem azidophilen Organismen thermophil sind. Eine Übersicht über azidophile Archae- und Eubakterien aus schwefelsauren Habitaten gibt Tab. 1.1 (siehe auch Johnson 1998 und Robbins 2000). Die Besiedlung saurer Grubenwässer erfolgt neben prokaryotischen Mikroorganismen auch durch azidophile Pilze, Algen, Flagellaten, Ciliaten und Amöben (Gross & Robbins 2000, Johnson 1998, Leßmann et al. 2000, Marchlewitz & Schwartz 1961, Packhoff & Woelfl 2000).

Zur Eisen(III)-Reduktion ist eine Vielzahl von Mikroorganismen befähigt (Lonergan et al. 1996, Lovley 1997, Lovley & Coates 2000), wobei es unter ihnen wie auch bei den schwefel- und eisenoxidierenden Mikroorganismen azidophile Vertreter gibt (siehe Abb. 1.1

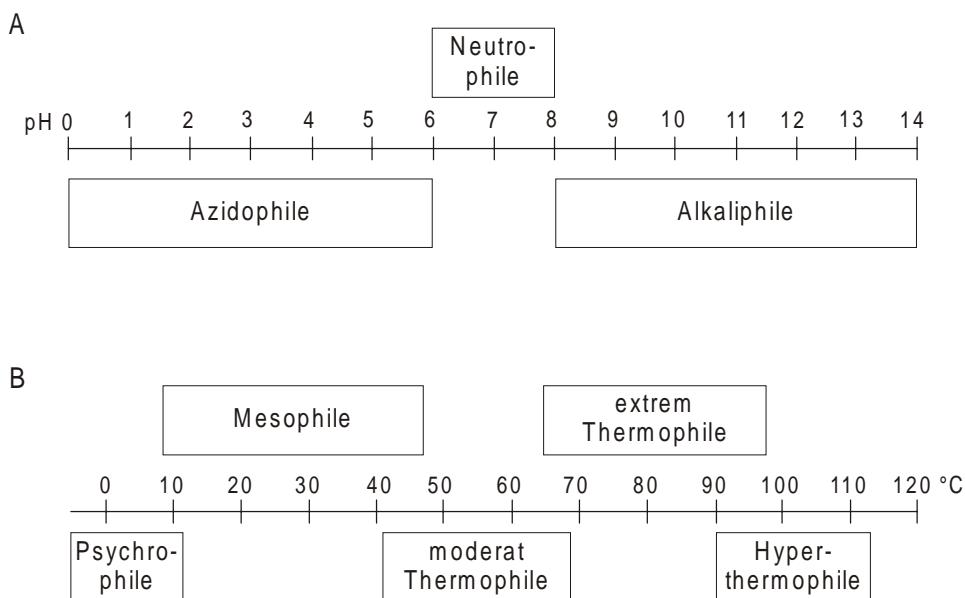


Abb. 1.2: Spanne der Temperaturen (A) und pH-Werte (B) in von Mikroorganismen besiedelten Lebensräumen (nach Madigan et al. 2000).

und Tab. 1.1). Jene sind fakultativ anaerob und zu ihnen gehören *Acidiphilium* spp., *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Sulfovibrio* spp. (Johnson & McGinness 1991a, Bridge & Johnson 1998) sowie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock & Gustafson 1976, Pronk et al. 1992). Unter den schwefelreduzierenden Mikroorganismen sind ebenfalls azidophile Vertreter zu finden, wobei es sich durchweg um thermophile Archaeabakterien handelt (siehe Tab. 1.1). Dagegen gelten alle bislang beschriebenen dissimilatorischen sulfatreduzierenden Bakterien als neutrophil oder alkaliphil (Fauque 1995, Stackebrandt et al. 1995, Widdel & Bak 1992). Hard et al. (1997) beobachteten das Wachstum von Reinkulturen einiger *Desulfovibrio*-Stämme bis minimal pH 4,0 bis 4,5 und bezeichneten dieses Verhalten als azidotolerant. Anreicherungen bei Ausgangswerten unter pH 3 führten zur Entwicklung sulfatreduzierender Kulturen (Johnson et al. 1993, Wakao et al. 1979), jedoch fand eine Abnahme des Sulfats erst bei pH 4,0 - 5,0 statt (Wakao et al. 1979). Tuttle et al. (1969a) stellten eine Abnahme des Sulfats in Reinkulturen von *Desulfovibrio*-Stämmen erst bei pH-Werten über pH 5,5 fest. Baas Becking & Wood (1955) konstatierten für eine Reihe von Umweltproben die Bildung von Schwefelwasserstoff und Eisensulfid über einen Bereich von pH 4 bis 10, welcher dem Toleranzbereich von Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien entspricht. *In situ* Messungen mit radioaktiv markiertem Sulfat demonstrierten Sulfatreduktion bei pH-Werten unter pH 4: in Vulkanseen bei pH 1,8 - 2,0 (Satake 1977) und in Sedimenten von Bergbau-Restseen bei pH 3,8 (Gyure et al. 1990).

Tab. 1.1: Azidophile Prokaryoten<sup>a,b</sup> aus schwefelsauren Habitaten.

BACTERIA (Eubakterien)		
	Mesophil bis moderat thermophil	
<b>Acidimicrobium</b> Firmicutes Actinobacteria Acidimicrobiales	<i>A. ferrooxidans</i> (Clark & Norris 1996)	chemolitho- oder chemoorgano-troph/aerob: Oxidation von Fe(II), Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph; fakultativ anaerob: Reduktion von Fe(III)
<b>Acidothermus</b> Firmicutes Actinobacteria Actinomycetales	<i>A. cellulolyticus</i> (Moshageghi et al. 1986)	chemoorganoheterotroph/aerob (cellulolytisch)
<b>Alicyclobacillus</b> Firmicutes Bacillus/Clostridium-Gruppe Bacillus/Staphylococcus-Gruppe	<i>A. acidocaldarius</i> (Darland & Brock 1971) <i>A. acidoterrestris</i> (Deinhard et al. 1987a) <i>A. cycloheptanicus</i> (Deinhard et al. 1987b)	chemoorganoheterotroph/aerob
<b>Leptospirillum</b> Nitrospira-Gruppe	<i>L. ferrooxidans</i> (Markoysan 1972) <i>L. thermoferrooxidans</i> (Golovacheva et al. 1992)	chemolithoautotroph/aerob: Oxidation von Fe(II)
<b>Sulfobacillus</b> Firmicutes Bacillus/Clostridium-Gruppe Bacillus/Staphylococcus-Gruppe	<i>S. acidophilus</i> (Norris et al. 1996) <i>S. thermosulfidooxidans</i> (Golovacheva & Karavaiko 1978) <i>S. disulfidooxidans</i> (Dufresne et al. 1996)	chemolitho- oder chemoorgano-troph/aerob: Oxidation von Fe(II), Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph; fakultativ anaerob: Reduktion von Fe(III)
Mesophil		
<b>Acidiphilium</b> α-Proteobacteria	<i>A. acidophilum</i> (Guay & Silver 1975) <i>A. angustum</i> (Wichlacz et al. 1986) <i>A. cryptum</i> (Harrison 1981) <i>A. multivorum</i> (Wakao et al. 1994) <i>A. organovorum</i> (Lobos et al. 1986) <i>A. rubrum</i> (Wichlacz et al. 1986)	chemoorganoheterotroph/aerob; fakult. anaerob: Reduktion von Fe(III); ( <i>A. acidophilus</i> : auch chemolitho-autotroph/aerob: Oxidation von Schwefelverbindungen)
<b>Acidisphaera</b> α-Proteobacteria	<i>A. rubrifaciens</i> (Hiraishi et al. 2000)	chemoorganoheterotroph/aerob; (phototroph)
<b>Acidithiobacillus</b> γ-Proteobacteria	<i>A. albertensis</i> (Bryant et al. 1983) <i>A. caldus</i> (moderat thermophil) (Hallberg & Lindström 1994) <i>A. ferrooxidans</i> (Temple & Colmer 1951) <i>A. thiooxidans</i> (Waksman & Joffe 1922)	chemolithoautotroph/aerob: Oxidation von Schwefel-verbindungen [ <i>A. ferrooxidans</i> : auch Oxidation von Fe(II)]; fakultativ anaerob: Reduktion von Fe(III)
<b>Acidobacterium</b> Fibrobacter/ Acidobacteria-Gruppe	<i>A. capsulatum</i> (Kishimoto et al. 1991)	chemoorganoheterotroph/aerob (saccharolytisch)
<b>Acidocella</b> α-Proteobacteria	<i>A. aminolytica</i> (Kishimoto et al. 1993) <i>A. facilis</i> (Wichlacz 1986)	chemoorganoheterotroph/aerob
<b>Acidomonas</b> α-Proteobacteria	<i>A. methanolica</i> (Uhlig et al. 1986)	chemoorganoheterotroph/aerob (methylotroph)
<b>"Ferromicrobium"</b> Firmicutes Actinobacteria	" <i>F. acidophilus</i> " (Bacelar-Nicolau & Johnson 1999)	chemolitho- oder chemoorgano-troph/aerob: Oxidation von Fe(II) od. org. Verbindungen; heterotroph
<b>Flavobacterium</b> Cytophaga/ Flavobacterium Flavobacteria	<i>F. acidurans</i> (Millar 1973)	chemolitho- oder chemoorgano-troph/aerob: Oxid. von Schwefel- od. org. Verbindungen; heterotroph

Tab. 1.1: Fortsetzung

<b><i>Halothiobacillus</i></b> γ-Proteobacteria	<i>H. neopolitanus</i> (Parker 1957)	chemolitho- oder chemoorganotroph/ aerob: Oxidation von Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph
<b><i>Rhodopila</i></b> α-Proteobacteria	<i>R. globiformis</i> (Pfennig 1974)	phototroph oder chemoorganotroph/anaerob; heterotroph
<b><i>Rhodopseudomonas</i></b> α-Proteobacteria	<i>R. acidophila</i> (Pfennig 1969)	phototroph oder chemoorganotroph/aerob; auto- od. heterotroph
<b><i>Thiomonas</i></b> β-Proteobacteria	<i>T. intermedia</i> (London 1963) <i>T. perometabolis</i> (London & Rittenberg 1967)	chemolitho- oder chemoorganotroph/aerob: Oxidation von Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph
ARCHAEA (Archaeabakterien)		
Extrem thermophil bis hyperthermophil		
<b><i>Acidianus</i></b> Crenarchaeota Sulfolobales	<i>A. ambivalens</i> (Zillig et al. 1986) <i>A. brierleyi</i> (Brierley & Brierley 1973) <i>A. infernus</i> (Segerer et al. 1986)	chemolithotroph/aerob: Oxidation von Schwefelverbindungen; auto- oder heterotroph; fakultativ anaerob: Reduktion von S <sup>0</sup>
<b><i>Desulfurococcus</i></b> Crenarchaeota Desulfurococcales	<i>D. mobilis</i> (Zillig et al. 1982)	chemoorganoheterotroph/ anaerob: Reduktion von S <sup>0</sup>
<b><i>Metallosphaera</i></b> Crenarchaeota Sulfolobales	<i>M. sedula</i> (Huber et al. 1989)	chemolitho- oder chemoorganotroph/aerob: Oxidation von Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph
<b><i>Stygiolobus</i></b> Crenarchaeota Sulfolobales	<i>S. azoricus</i> (Segerer et al. 1991)	chemolithoautotroph/anaerob: Reduktion von S <sup>0</sup>
<b><i>Thermofilum</i></b> Crenarchaeota Thermoproteales	<i>T. pendens</i> (Zillig et al. 1983)	chemoorganoheterotroph/ anaerob: Reduktion von S <sup>0</sup>
<b><i>Thermoproteus</i></b> Crenarchaeota Thermoproteales	<i>T. tenax</i> (Zillig et al. 1981)	chemolitho- oder chemoorganotroph/anaerob: Reduktion von NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> oder S <sup>0</sup> ; auto- oder heterotroph
Moderat thermophil bis extrem thermophil		
<b><i>Sulfolobus</i></b> Crenarchaeota Sulfolobales	<i>S. acidocaldarius</i> (Brock et al. 1972) <i>S. metallicus</i> (Huber & Stetter 1991) <i>S. shibatae</i> (Grogan et al. 1990) <i>S. solfataricus</i> (Zillig et al. 1980)	chemolitho- oder chemoorganotroph/aerob: Oxidation von Fe(II), Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph; fakultativ anaerob: Reduktion von Fe(III)
<b><i>Sulfurococcus</i><sup>c</sup></b>	<i>S. yellowstonensis</i> (Karavaiko et al. 1994)	chemolitho- oder chemoorganotroph/aerob: Oxidation von Fe(II), Schwefel- oder org. Verbindungen; auto- oder heterotroph
<b><i>Thermoplasma</i></b> Euryarchaeota Thermoplasmatales	<i>T. acidophilum</i> (Darland et al. 1970) <i>T. volcanicum</i> (Segerer et al. 1988)	chemoorganoheterotroph/aerob; fakult. anaerob: Reduktion von S <sup>0</sup>
Mesophil bis moderat thermophil		
<b><i>Ferroplasma</i></b> Euryarchaeota Thermoplasmatales	<i>F. acidiphilum</i> (Golyshina et al. 2000) "F. acidarmanus" (Edwards et al. 2000)	chemolithoautotroph/aerob: Oxidation von Fe(II)
<b><i>Picrophilus</i></b> Euryarchaeota Thermoplasmatales	<i>P. oshimae</i> (Schleper et al. 1996) <i>P. torridus</i> (Schleper et al. 1996)	chemoorganoheterotroph/aerob

<sup>a</sup>Nomenklatur entspricht Approved List of Bacterial Names (Skerman et al. 1980 oder <http://www.dsmz.de>)<sup>b</sup>Systematik nach EMBL (European Bioinformatic Institute, <http://www.ebi.ac.uk>, Stoesser et al. 2000)<sup>c</sup>nicht aufgeführt in EMBL

#### 1.4 Zielsetzung der eigenen Arbeit

Die vorliegende Arbeit war eingegliedert in das Verbundprojekt "Niederlausitzer Bergbaufolgelandschaft: Erarbeitung von Leitbildern und Handlungskonzepten für die verantwortliche Gestaltung und nachhaltige Entwicklung ihrer naturnahen Bereiche" – kurz: Leitbilder für naturnahe Bereiche oder LENAB (Wieglob et al. 2000). Bei der Erarbeitung von wissenschaftlich begründeten Leitbildern und Handlungskonzepten bilden Datenerhebung und -analyse im Plangebiet eine wichtige Basis. Sie beinhalten die Erfassung der Ausgangsbedingungen (Ist-Zustand) sowie die Prognose möglicher Entwicklungen des Untersuchungsobjektes. Dies erlaubt die Erstellung eines Zukunftsszenarios (Soll-Zustand) und die Formulierung von Maßnahmen, mittels denen das Ziel zu erreichen ist. Im Teilprojekt "Limnologie und Gewässerchemie geogener schwefelsaurer Bergbau-Restseen im Lausitzer Braunkohlerevier" wurde zum Teil wissenschaftliches Neuland betreten, da am Anfang des Projektes nur wenige Forschungsarbeiten zu diesen Seen existierten (Nixdorf et al. 2000, Packröff et al. 2000). Innerhalb des Teilprojektes sollte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit die Bedeutung des mikrobiellen Schwefelkreislaufs für die Wasserqualität der Restseen untersucht werden. Zu Beginn der Untersuchungen zum mikrobiellen Schwefelkreislauf stellte sich deshalb die Frage:

1. Ist ein natürliches Neutralisierungspotenzial in Form der dissimilatorischen Sulfat-reduktion in den Sedimenten der sauren Bergbau-Restseen vorhanden, und wie stark wirken der dissimilatorischen Sulfatreduktion die oxidativen Prozesse entgegen?

Zur Beschreibung und Quantifizierung dieser Prozesse wurden die Gehalte verschiedener Schwerfelspezies sowie die Sulfatreduktionsraten in den Sedimenten bestimmt. Besonderes Interesse galt den Mikroorganismen, die diese Reaktionen katalysieren. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Verdünnungsreihen in selektiven Medien nach der *Most Probable Number*-Methode. Diese Methode ermöglicht es, die Organismen aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften zu erfassen und zu charakterisieren. Im Vordergrund der Untersuchungen stand der Schwefelkreislauf. Da dieser jedoch eng verknüpft ist mit dem Eisenkreislauf, wurden auch die Redoxprozesse des Eisens in die Betrachtung mit einbezogen. Die Sedimentuntersuchungen verliefen parallel zu den Untersuchungen des Freiwassers, so dass der See als Ganzes charakterisiert und einzelne Prozesse vor diesem Hintergrund dargestellt werden konnten. Für die Abschätzung des Entwicklungspotenzials einer seeinternen Neutralisierung war die Beantwortung folgender Frage wichtig:

2. Durch welche Faktoren werden Sulfatreduktion sowie Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen an diesen Standorten maßgeblich beeinflusst und unter welchen Bedingungen kommt es zum Netto-Alkalinitätsgewinn?

Die Untersuchungen wurden an drei Bergbau-Restseen durchgeführt. Die Seen sind bezüglich ihrer Entstehung und der weitgehend ungestörten Entwicklung sowie ihrer Größe miteinander vergleichbar. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Wasserqualität. Zwei der Untersuchungsgewässer sind schwefelsauer, wobei sie unterschiedliche Versauerungsgrade aufweisen. Das Dritte ist neutral und wurde als Referenzstandort in die Untersuchung einbezogen. Vergleichende Untersuchungen an den drei Restseen ermöglichen, den Einfluss des pH-Wertes sowie sekundär bedingter Faktoren wie die Substratverfügbarkeit (eingeschränkte autochthone Produktion organischen Materials) oder die Sauerstoffverhältnisse (durch hohe Ionenkonzentrationen beeinflusstes Schichtungsverhalten) auf die Prozesse des Schwefel- und Eisenkreislaufs zu analysieren. Zum besseren Verständnis der Reaktionen und der auf sie einwirkenden Faktoren trägt die Kenntnis der involvierten Mikroorganismen erheblich bei. Daher stellt sich die Frage:

3. Welche Mikroorganismen sind verantwortlich für diese Prozesse und zeigen sie besondere Anpassungen an die extremen Bedingungen der sauren Restseen?

Zur Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften des Schwefelkreiskaufs wurde der Kultivierungsansatz gewählt. Mit Hilfe spezieller Isolationstechniken wurden Reinkulturen sulfatreduzierender und schwefeloxidierender Bakterien aus den Sedimenten der Restseen gewonnen. Die Bakterienstämme wurden physiologisch charakterisiert und mittels der partiellen 16S rDNA-Sequenzanalyse identifiziert. Mikroorganismen in extremen Habitaten zeigen häufig eine hohe Spezialisierung in ihrer Anpassung an herrschende Stressfaktoren (Atlas & Bartha 1993). Der Kultivierungsansatz ermöglicht es, physiologische Fähigkeiten der Mikroorganismen zu untersuchen und darüber ihre ökologische Rolle (Funktion) am Standort zu analysieren. Besonderes Interesse galt dabei den sulfatreduzierenden Bakterien. Das Vorkommen sulfatreduzierender Bakterien in schwefelsauren Kippenmassiven und Grubenwässern sowie ihre Bedeutung für Sanierungsmaßnahmen wurde vielfach beschrieben (z. B. Benner et al. 2000, Fortin et al. 2000, Webb et al. 1998), über ihre Identität und ihre Physiologie ist bislang jedoch nur wenig bekannt (Fortin et al. 1996, Johnson et al. 1993, Tuttle et al. 1969a).

Anmerkung: Der Begriff "Bakterien" wird in der vorliegenden Arbeit häufig in Verbindung mit der Beschreibung des Metabolismus verwendet, wie z. B. "sulfatreduzierende Bakterien". Dabei handelt es sich um (teils feststehende) Bezeichnungen physiologischer Gruppen, die alle prokaryotischen Vertreter einschließen. Werden dagegen ausdrücklich Mikroorganismen der Domänen Bacteria bzw. Archaea angesprochen, so werden die lateinischen Begriffe oder die vorher üblichen (deutschen) Bezeichnungen "Eubakterien" bzw. "Archaeabakterien" verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Die Untersuchungsgewässer

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Restseen (RS) ehemaliger Braunkohle-Tagebaue der Niederlausitz durchgeführt (Abb. 2.1). Die Auswahl der Untersuchungsgewässer wurde im Rahmen des LENAB-Verbundprojektes (BMBF Fkz 0339648) getroffen. Während der Projektlaufzeit vom 01.01.1995 bis 31.12.1997 wurden im Teilprojekt "Limnologie und Gewässerchemie geogen schwefelsaurer Bergbau-Restseen im Lausitzer Braunkohlerevier" Daten vom Freiwasser monatlich erhoben und die Sedimente zu gesonderten Kampagnen untersucht (siehe auch Kap. 2.2.1).

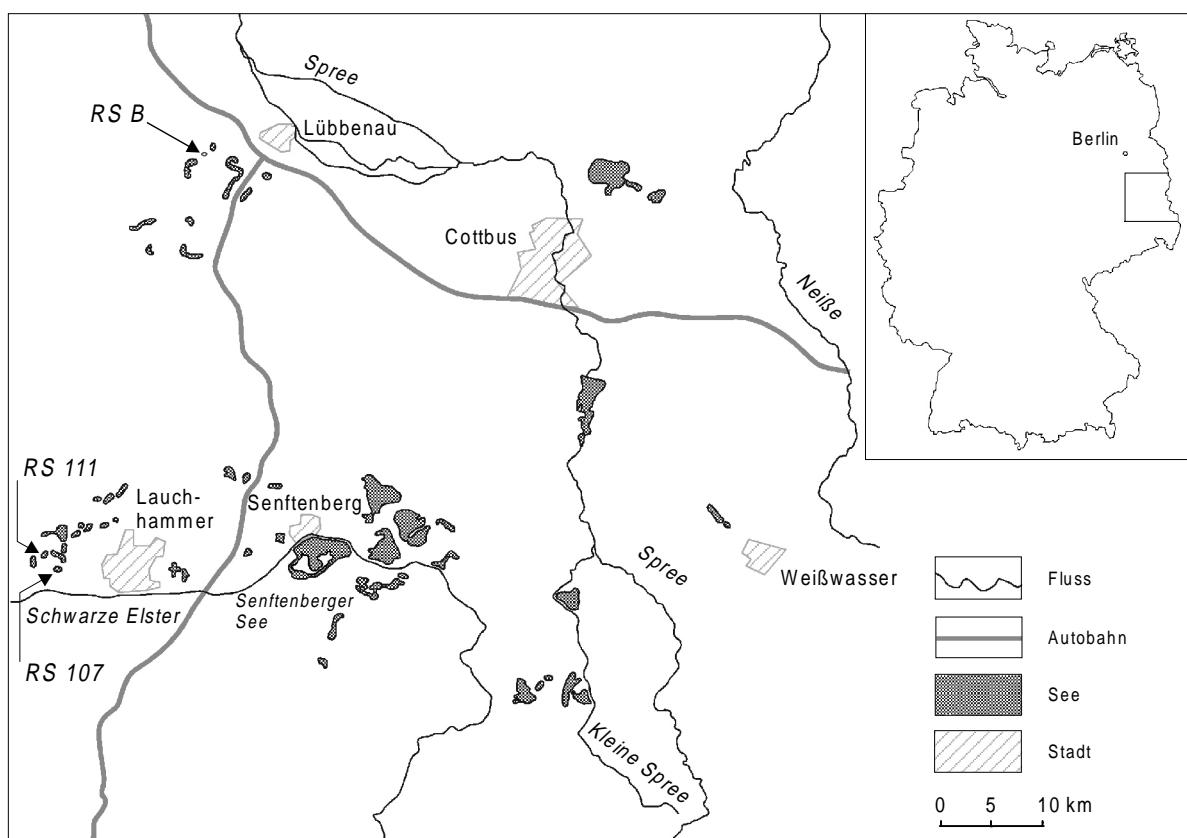


Abb. 2.1: Kartenskizze des Untersuchungsgebietes (nach Friese et al. 1998a).

Die Untersuchungsgewässer RS 111 und RS 107 sind in ehemaligen Tagebauen kleinerer Kohlevorkommen westlich der Braunkohlelagerstätte Lauchhammer entstanden. Diese Altbergbaubereiche sind durch kleinflächige Abaugebiete und Bruchfelder gekennzeichnet. Die Auskohlung erfolgte im Tagebau Plessa (RS 111) von 1929 bis 1956 und im Tagebau Agnes (RS 107) von 1897 bis 1928 (Braunkohlenausschuss 1993). Die Restseen entwickelten sich relativ ungestört und sie sind heute Bestandteil des Naturparkes

"Niederlausitzer Heidelandschaft" (Braunkohlenausschuss 1996, Schulz & Wieglob 2000). Das Untersuchungsgewässer RS B gehört zu den Restseen des Tagebaus Schlabendorf-Nord, südwestlich der Stadt Lübbenau. Dieses Gebiet ist typisch für den modernen Großtagebau. Die Aufschlussbaggerung erfolgte von 1959 bis 1962 und RS B entstand 1963/64 (Braunkohlenausschuss 1993). Eine Rekultivierung des Tagebaus fand bereits in weiten Teilen statt (Braunkohlenausschuss 1993, Schulz & Wieglob 2000).

Tab. 2.1: Limnologische Kenndaten, Hauptinhaltsstoffe und Nährstoffe der Untersuchungsgewässer (Herzsprung 1998, Packroff et al. 2000, Schimmele 1998).

	RS 111	RS 107	RS B
Oberfläche (ha)	10,7	12,2	ca. 10
Volumen ( $10^6 \text{ m}^3$ )	0,5	0,23	nb
maximale Tiefe (m)	10,2	5,0	10
mittlere Tiefe (m)	4,6	1,9	ca. 5-6
Leitfähigkeit ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	2,4 - 2,6	2,5 - 5	0,9 - 1,1
pH <sup>a</sup>	2,6	2,3	8,0
Sulfat (mM)	13,65	27,92	4,59
Chlorid (mM)	0,24	0,11	0,56
DIC (mM)	S	S	1,79
Calcium (mM)	5,65	8,91	4,2
Eisen (mM)	2,79	9,84	S
Aluminium (mM)	1,41	1,91	<<
Magnesium (mM)	1,19	1,83	0,81
Silizium (mM)	0,61	0,66	0,027
Natrium (mM)	< 0,4	< 0,2	0,5
Kalium (mM)	0,1	< 0,025	0,13
Mangan (mM)	0,055	0,20	S
Ammonium (mM)	0,20	0,43	<
Nitrat (mM)	0,023	0,014	<
TP ( $\mu\text{M}$ )	0,35	0,74	0,29
SRP ( $\mu\text{M}$ )	0,23	0,69	0,06

DIC *Dissolved Organic Carbon* : gelöster organischer Kohlenstoff

nb nicht bestimmt

S Spurenstoffe

SRP *Soluble Reactive Phosphate* : lösliches reaktives Phosphat

TP *Total Phosphate* : Gesamtphosphat

< gering, unterliegt starken saisonalen Schwankungen

<< nicht nachweisbar

<sup>a</sup> Medianwerte an der Wasseroberfläche (pH und Inhaltsstoffe)

In Tab. 2.1 sind limnologische Kenndaten, Hauptinhaltsstoffe (mit Konzentrationen größer als 0,1 mM) und Nährstoffe der drei Gewässer zusammengefasst. Die Restseen sind relativ klein, besitzen keine oberflächlichen Zu- oder Abflüsse und ihr Chemismus ist durch hohe Konzentrationen anorganischer Ionen sowie geringe Nährstoffgehalte geprägt. Sie unterscheiden sich jedoch in pH-Wert, Konzentrationen und Zusammensetzung der Wasserinhaltsstoffe und in ihrem Schichtungsverhalten (Nixdorf et al. 1998b, Packroff et al. 2000). Letzteres wird insbesondere in den sauren Seen (RS 111 und RS 107) außer durch Temperatur und Beckenform vergleichsweise stark durch gelöste Stoffe bestimmt (Schimmele 1999). Der Gehalt an gelöstem anorganischen Kohlenstoff (DIC) ist in den sauren Restseen den niedrigen pH-Werten entsprechend sehr gering. Er unterschreitet häufig den Wert von 1 mg DIC l<sup>-1</sup> (dies entspricht 0,08 mmol DIC l<sup>-1</sup>), unterhalb dessen eine Limitierung des Phytoplanktons eintritt (Nixdorf et al. 1998a, Packroff et al. 2000). Ebenfalls typisch für die sauren Gewässer ist der geringe Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff im Epilimnion (unterhalb 0,1 mmol DOC l<sup>-1</sup>, Herzsprung et al. 1998, Packroff et al. 2000).

### 2.1.1 Restsee 111

Das Untersuchungsgewässer RS 111 erstreckt sich in NNO-SSW Richtung mit einer Längsausdehnung von 900 m und einer Breite von 120 - 140 m. Der See wird westlich begrenzt durch natürlich gewachsene Sedimente aus dem Tertiär und Quartär, welche an den steilen Uferabschnitten freigelegt sind. Östlich, sowie im Süden als auch im Norden, grenzt der See an Abraumhalden, welche überwiegend tertiäres Kippenmaterial enthalten (Abb. 2.2). Durch flachere Einschnürungen ist der Restsee in drei Becken unterteilt. Im Mittelbecken wird eine maximale Tiefe von 10,2 m erreicht, wobei der Bereich mit einer Wassertiefe größer als 7,5 m nur 4 % der Gewässerfläche und 1 % des Wasservolumens entspricht (Büttner et al. 1998). Im Nord- und Südbecken sowie im Großteil des Mittelbeckens liegt die maximale Wassertiefe bei 7 m. Der Wasserspiegel wird durch Zu- und Abstrom des Grundwassers bestimmt. Die generelle Fließrichtung ist von SW nach NO, d. h. dass der See sowohl durch tertiäre und quartäre als auch durch Grundwasserleiter im Kippenmassiv gespeist wird (Knöller & Strauch 1999).

Während des Untersuchungszeitraumes 1995 - 1997 stellte sich im Mittelbecken während der Sommermonate eine thermische Schichtung ein (Packroff et al. 2000). Für den relativ kleinen, tiefsten Teil bewirkte die lang anhaltende Eisbedeckung im Winter 1995/96 und die darauffolgende Eisschmelze den Aufbau eines chemischen Gradienten und die Ausbildung einer Meromixis (Schimmele 1999). Der Wasserkörper unterhalb einer Tiefe von 6 - 7 m war durch eine erhöhte Leitfähigkeit (bis 2,9 mS cm<sup>-1</sup>) und ganzjährige Anoxie gekennzeichnet. Die Wassertemperaturen über dem Sediment lagen bei 5 - 6 °C.



Abb. 2.2: Restsee 111 im April 1997. Blick auf Mittel- und Nordbecken. An der roten Messboje liegt die Probenahmestelle bei einer Wassertiefe von 10 m.



Abb. 2.3: Färbung des Wassers (im Litoral des Nordbeckens in Restsee 111).

Die rostrote Färbung des Wassers (Abb. 2.3) ist auf hohe Konzentrationen an gelöstem Eisen zurückzuführen. Der niedrige pH-Wert und die hohen Gehalte an Sulfat und Eisen im Freiwasser (Tab. 2.1) weisen auf den Eintrag versauerter Grund- und Sickerwässer hin, die durch die Verwitterung der im Kippenmaterial vorhandenen Eisensulfide verursacht werden (Bozau et al. 1999, Geller et al. 1998). Aufgrund der geringen Nährstoffkonzentrationen, der spärlichen pelagischen Besiedlung durch Phytoplankton (bis  $10 \mu\text{g Chl a l}^{-1}$ , Tiefenchlorophyllmaxima bis  $20 \mu\text{g Chl a l}^{-1}$ ) und der geringen Primärproduktion gilt RS 111 als oligotroph

(Nixdorf & Hemm 2000, Nixdorf & Kapfer 1998, Nixdorf et al. 1998b, Packroff et al. 2000). Mikrobiologische Untersuchungen im Jahr 1996 (Meier & Babenzien 1998) zeigten, dass die Gesamtzellzahl des nicht phototrophen Bakteriplanktons keine saisonalen Tendenzen aufwies. Der Jahresdurchschnitt 1996 lag bei  $2,6 \cdot 10^5$  Zellen ml<sup>-1</sup>. Der Anteil fädiger Zellen mit Zelllängen über 10 µm war sehr hoch und erreichte bis zu 33 % der Gesamtzellzahl im Mai 1996. Das heterotrophe Potenzial, welches der maximalen Aufnahmerate von Glucose entspricht, erreichte einen maximalen Wert von 0,18 µg C l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> im August 1996.

Im RS 111 wurden an zwei Stellen Sedimentproben genommen. Der eine Probenahmepunkt befand sich im Mittelbecken an seiner tiefsten Stelle [im folgenden als "RS 111 (10 m)" bezeichnet]. Während der Sedimentkartierung von Büttner et al. (1998) stellte sich heraus, dass an dieser Stelle die Sedimente in ihrer Beschaffenheit stark von den Sedimenten an anderen Probenahmestellen abwichen. Deshalb wurde 1997 eine zweite Probenahmestelle im Mittelbecken bei einer Wassertiefe von 7 m [im folgenden als "RS 111 (7 m)" bezeichnet] hinzu genommen.

### 2.1.2 Restsee 107

Restsee 107 (Abb. 2.4) erstreckt sich in W-O Richtung über eine Längsausdehnung von 700 m und einer Breite von maximal 330 m. Aufgrund seiner geringen Tiefe ist eine Polymixis zu erwarten. Während der See in den Jahren 1995 und 1997 (und auch 1998), abgesehen von vorübergehenden Temperaturschichtungen im Sommer, gut durchmischt war, zeigte er 1996 eine fast ganzjährige Schichtung in Folge der lang anhaltenden Eisbedeckung im Winter 1995/96 (Schimmele 1999). Dies führte 1996 unterhalb einer Wassertiefe von 3 m bis zu ihrer Aufhebung durch die Herbstzirkulation im Oktober/November zu einer fast ganzjährigen Anoxie (Leßmann et al. 1999). Anfang 1997 war der Sauerstoff in sedimentnahen Wasserschichten in Folge der Eisbedeckung im Winter 1996/97 bis zu Beginn der Frühjahrszirkulation im April/Mai nahezu verbraucht. Unterstützt durch die thermische Schichtung stellten sich im Sommer 1997 unterhalb einer Wassertiefe von ca. 4 m anoxische Verhältnisse ein. Diese wurden durch die Herbstzirkulation wieder aufgehoben. Die Wassertemperaturen über dem Sediment lagen während des Untersuchungszeitraumes bei 2 - 16 °C. Für die vorliegende Arbeit wurden die Sedimentproben nahe der tiefsten Stelle bei einer Wassertiefe von ca. 4 m entnommen.

Erhöhte Ionenkonzentrationen insbesondere von gelöstem Sulfat und Eisen im Vergleich zu RS 111 weisen auf eine stärkere Versauerung hin. Hohe Ionenkonzentrationen sowie ein Teil der Sauerstoffzehrung im Hypolimnion sind auf den Eintritt von anoxischem, Eisen(II)-haltigem Grundwasser zurückzuführen (Leßmann et al. 1999). RS 107 ist bezüglich geringer Biomassen des Phytoplanktons (maximal 3,5 µg Chl a l<sup>-1</sup>) und geringer Primärproduktionsraten (0,02 - 4 µg C l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als oligotroph einzustufen (Leßmann et al. 1999,

Packroff et al. 2000). Der Jahresdurchschnitt 1996 der Gesamtzellzahl des nicht phototrophen Bakteriplanktons lag bei  $3,7 \cdot 10^5$  Zellen ml<sup>-1</sup> (Meier & Babenzien 1998). Der Anteil der fädigen Zellen erreichte maximal 26 % der Gesamtzellzahl im Oktober 1996. Das heterotrophe Potenzial war im allgemeinen höher als im RS 111 und erreichte einen maximalen Wert von 0,67 µg C l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> im Juni 1996.



Abb. 2.4: Restsee 107 im August 1995.

### 2.1.3 Restsee B

Restsee B besitzt die kleinste Oberfläche der drei Untersuchungsgewässer mit einer Längsausdehnung von 420 m und einer Breite von 250 m. Der See wird von einem breiten Schilfgürtel umgeben (Abb. 2.5). Während des Untersuchungszeitraumes 1995 - 1997 verhielt sich der See dimiktisch, d.h. der Wasserkörper wurde zur Frühjahrs- und zur Herbstzirkulation durchmischt (Schimmelle 1998). Der Sauerstoffgehalt nahm während der Sommerstagnation unterhalb einer Wassertiefe von 6 m ab, das Hypolimnion wurde jedoch nie gänzlich anoxisch. Die Temperaturen über dem Sediment lagen während des Untersuchungszeitraums bei 4 - 10 °C. Die Sedimentprobenahmen fanden nahe der tiefsten Stelle bei einer Wassertiefe von ca. 10 m statt.

Erhöhte Leitfähigkeitswerte und insbesondere der erhöhte Gehalte an Sulfat zeugen vom Ursprung eines schwefelsauren Restsees. Der erhöhte Anteil an Mergel im Boden und der neutralisierende Effekt der darin enthaltende Carbonate und Tonminerale führten jedoch zur Entwicklung eines neutralen Sees (Klapper & Schultze 1995, Zachmann et al. 1998). Aufgrund des neutralen pH-Wertes wurde RS B als Referenzstandort für die Untersuchungen gewählt. Nährstoffverhältnisse und Primärproduktion weisen RS B als meso-



Abb. 2.5: Restsee B im April 1997.

trophen See aus (Nixdorf et al. 1998b, Packroff et al. 2000). Die durchschnittliche Gesamtzellzahl des nicht phototrophen Bakteriplanktons von  $2,0 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  für das Jahr 1996 war größer als in den sauren Restseen (Meier & Babenzien 1998). Die Zellen waren jedoch viel kleiner und erreichten selten Zelllängen über 2  $\mu\text{m}$ . Der Anteil der fädigen Zellen lag meistens unter 1 % der Gesamtzellzahl. Die Werte für das heterotrophe Potenzial lagen in den Sommermonaten weit unter den Werten, die in den sauren Restseen gemessen wurden, und erreichten einen maximalen Wert von  $0,11 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Juli 1996.

## 2.2 Untersuchung von Standortparametern

### 2.2.1 Sedimentprobenahme und -aufarbeitung

Zur Untersuchung der Sedimente im Vertikalprofil erfolgten im Rahmen des Projektes umfangreiche Sedimentbeprobungen im Mai 1996 [RS 111 (10 m), RS 107], Juli 1996 (RS B) und August 1996 [RS 111 (10 m)] sowie im April 1997 und August 1997 (alle vier Standorte). Kleinere Sedimentprobennahmen fanden parallel zu den monatlichen Gewässeruntersuchungen statt. Zusätzliche Termine waren im Juni 1998 (RS B) und April 1999 [RS 111 (10 m)].

Zur Analyse der Sedimente im Vertikalprofil wurden weitgehend ungestörte Sedimentkerne mittels eines modifizierten Kajak-Brinkhurst Sedimentstecher (Mudro & Azcue 1995) gewonnen. Ansonsten wurde zur Beprobung der oberen Sedimentschicht (ca. 0 – 10 cm) ein Birge-Ekman Sedimentgreifer (Mudro & Azcue 1995) verwendet. Die Sedimentkerne wurden direkt nach der Entnahme unterteilt. Dazu wurden die Kerne in 1 cm-Intervallen aus der Plexiglassäule geschoben, geschnitten und Aliquots in Glasflaschen abgefüllt. Der verbleibende Gasraum wurde mit sauerstofffreiem Stickstoff gespült und die

Glasflaschen mit gasdichten Schraubdeckeln verschlossen. Zur Bestimmung von Sulfatreduktionsraten wurden kleine Unterkerne in 5 ml-Spritzen (die Spitzen wurden entfernt) entnommen. Die Unterkerne umfassten eine Schichtdicke von 5 cm und ein Gesamtvolumen von 6 ml. Zur Gewinnung der oberen 10 cm wurden demnach zwei Sätze von Unterkernen entnommen: 0 - 5 cm und 5 - 10 cm. Die Spritzen wurden mit Parafilm® verschlossen und in gasdichten Behältern, welche mit sauerstofffreiem Stickstoff gespült wurden, transportiert.

## 2.2.2 Analyse physikalischer und chemischer Sedimentparameter

### 2.2.2.1 pH-Wert und Redoxpotenzial

Die Messungen des pH-Wertes und des Redoxpotenzials ( $E_h$ ) erfolgten direkt am Material vom frisch geschnittenen Kern, wobei die jeweilige Messelektrode in die abgetrennte Sedimentschicht eingetaucht wurde. Es wurden kommerzielle Glaselektroden verwendet. Als Referenzelektrode zur Messung des Redoxpotenzials diente eine Ag/AgCl/KCl-Elektrode (3 M KCl). Der gemessene Wert wurde unter Berücksichtigung der Sedimenttemperatur nach folgender Formel auf die Standardwasserstoffelektrode umgerechnet und pH-korrigiert (DEV 1984: DIN 38404 C6, Fresenius et al. 1988):

$$E_{h7} = E_{hM} + E_{hAg/AgCl} + (pH_M - 7) \cdot f$$

$E_{h7}$ : Redoxpotenzial bezogen auf pH 7 (mV)

$E_{hM}$ : Redoxpotenzial gemessen gegen die Referenzelektrode (mV)

$E_{hAg/AgCl}$ : Redoxpotenzial der Referenzelektrode (mV) = 217 mV bei 10°C

$pH_M$ : pH gemessen in der Probe

$$f := \frac{E_h}{pH} = \frac{R \cdot T \cdot 2,3}{F} = 56,1 \text{ mV bei } 10 \text{ °C}$$

Die Redoxintensität (pe) wurde aus den nicht pH-korrigierten Werten des Redoxpotenzials berechnet (Sigg & Stumm 1996):

$$pe = \frac{F}{2,3 \cdot R \cdot T} \cdot E_h$$

$pe \equiv -\log\{e^-\}$ , wobei  $\{e^-\}$  die Elektronenaktivität bedeutet

$F$ : Faraday-Konstante = 96487 J V<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

$R$ : Gaskonstante = 8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

$T$ : Temperatur in Kelvin (K)

$$\frac{F}{2,3 \cdot R \cdot T} := 17,8 \text{ V}^{-1} \text{ bei } 10 \text{ °C (283 K)}$$

### 2.2.2.2 Trockengewicht, Glühverlust und Porosität

Das Trockengewicht des Sedimentes wurde über den Gewichtsverlust bei 105 °C für 12 h ermittelt. Der Glühverlust wurde über den Gewichtsverlust bei 550 °C für 4 h bestimmt. Die Porosität wurde aus dem Trockengewicht und der ermittelten spezifischen Dichte des Sedimentes berechnet. Dabei wurde angenommen, dass das durch gasförmige Sedimentbestandteile eingenommene Volumen vernachlässigbar gering ist. Danach entspricht die berechnete Porosität dem Volumenanteil des Porenwassers:

$$\phi = \frac{V_{PW}}{V_{Sed}} = \frac{\% M_{PW}}{100} \cdot \rho_{Sed}$$

$V_{PW}$  : Volumen des Porenwassers

$V_{Sed}$  : Volumen des gesamten Sediments

$\% M_{PW}$  : Gewichtsanteil des Porenwassers im Sediment

$\rho_{Sed}$  : Dichte des Sediments

### 2.2.2.3 Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff im Porenwasser

Das Porenwasser wurde durch Zentrifugation von 20 - 30 ml Sediment bei 9000  $g$  und bei 4 °C für 10 min gewonnen. Der Überstand wurde filtriert (Celluloseacetat, 0,2 µm), das Filtrat mit HCl leicht angesäuert und bei 4 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Zur Beseitigung leicht löslicher organischer Bestandteile wurden die Filter zuvor mit 100 ml lauwarmen  $H_2O_{dest}$  vorfiltriert. Die Filtration sowie die Aufbewahrung des Filtrats erfolgte unter sterilen Bedingungen, da die Proben nicht eingefroren wurden. Diese Maßnahme sowie die Ansäuerung des Filtrats dienten dazu, die Ausfällung von Fe(III)-Hydroxiden zu vermeiden.

Das gelöste Sulfat wurde entweder turbidometrisch (Tabatabai 1974) oder ionenchromatographisch bestimmt. Für die Ionenchromatographie wurde die Anionenaustauscher-Säule GAT Anions/S 250 x 4,6 mm ID (Gamma Analysentechnik GmbH, Bremerhaven-Lehe) verwendet. Der Eluent bestand aus 5 mM Phthalsäure eingestellt auf pH 5,0 mit LiOH. Die Flussrate betrug 2 ml min<sup>-1</sup>. Der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) wurde IR-spektrometrisch bestimmt (DimaTOC 100, Dirsus & Co Umwelt- und Analysentechnik, Essen). Die ionenchromatographische Bestimmung des Sulfats sowie die Bestimmung des DOC wurden von Dr. Peter Herzsprung, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, durchgeführt.

### 2.2.2.4 Reduzierte Schwefelverbindungen

Der Gehalt an reduzierten anorganischen Schwefelverbindungen im Sediment erfolgte über eine sequenzielle Rückflussdestillation (Fossing & Jørgensen 1989). Die Bestimmung

erfolgte an den mit 20 % Zinkacetat-Lösung fixierten und gewaschenen Sedimentproben, welche ebenfalls zur Bestimmung der Sulfatreduktionsraten verwendet wurden (siehe Kap. 2.2.3). Zur Extraktion der säureflüchtigen Schwefelverbindungen (AVS) wurden der Sedimentprobe 12,5 ml 3 N HCl (in 50 % Ethanol) zugesetzt und 30 min kalt und anschließend 5 min heiß (köchelnd) destilliert. Dies garantiert die vollständige Extraktion von amorphen FeS, Pyrrhotin ( $\text{FeS}_{1-x}$ ) und Mackinawit ( $\text{Fe}_{1-x}\text{S}$ ), jedoch nur eine unvollständige Reduktion von Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Cornwell & Morse 1987) und Monosulfiden aus älteren Gesteinsschichten (Rice et al. 1993). Die säureflüchtige Fraktion enthielt ebenfalls das als ZnS gebundene freie Sulfid ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  und  $\text{S}^{2-}$ ) aus dem Porenwasser. Die chromreduzierbaren Schwefelverbindungen (CRS) wurden mit 15 ml 1 N  $\text{CrCl}_2$  (in 0,5 N HCl) 40 min heiß (köchelnd) extrahiert. Unter diesen Bedingungen wird frischer Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) und gelöster elementarer Schwefel vollständig, älterer Pyrit und kolloidaler (Partikel mit 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser) sowie granularer (Partikel mit Durchmesser > 1 mm) elementarer Schwefel nur teilweise reduziert (Fossing & Jørgensen 1989, Duan et al. 1997). Organische Schwefelverbindungen und Sulfate werden nicht reduziert (Canfield et al. 1986, Zhabina & Volkov 1978).

Bei den Proben von April 1997 wurde der elementare Schwefel ( $\text{S}^0$ ) gesondert bestimmt. Im Anschluss an die Extraktion des AVS wurde das Sediment bei 3000 g für 10 min abzentrifugiert. Als Extraktionsmittel wurde Ethanol verwendet (Schippers 1998). Das Sedimentpellet wurde mit 5 ml 96 % Ethanol versetzt und während 30 min Extraktionszeit regelmäßig geschüttelt. Anschließend wurde das Sediment bei 3000 g für 10 min abzentrifugiert und die Extraktion ein zweites Mal wiederholt. Die drei Überstände wurden vereinigt und der gelöste elementare Schwefel mit 15 ml 1 N  $\text{CrCl}_2$  (in 0,5 N HCl) 40 min heiß extrahiert. Vom Rückstand wurde der restliche CRS bestimmt.

Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde unter ständigem Stickstoff-Strom ausgetrieben und in 10 ml 5 % Zinkacetat-Lösung aufgefangen. Die Masse des reduzierten Schwefels wurde spektrophotometrisch nach der Methylenblau-Methode (Cline 1969) bestimmt. Angaben des Schwefelgehaltes pro Sedimentvolumen erfolgen in  $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ .

### 2.2.2.5 Eisenverbindungen

Amorphes bzw. mikrobiell reduzierbares Eisen(III) und säurelösliches Eisen(II) wurden nach dem Protokoll von Lovley & Phillips (1987a) bestimmt. Säurelösliches Eisen(II) wurde mit 0,5 M HCl (5 ml auf ca. 0,1 g Nassgewicht Sediment) für 1 h extrahiert. In einer zweiten Sedimentprobe wurde mit 0,25 M Hydroxylamin (in 0,25 M HCl, 5 ml auf ca. 0,1 g Nassgewicht Sediment) das amorphe Eisen(III) reduziert und zusammen mit dem säurelöslichen Eisen(II) für 1 h extrahiert. Von den Extrakten wurden je 0,1 ml zu 5 ml Ferrozin-Lösung [1 g  $\text{l}^{-1}$  in 50 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N*'-2-ethan-sulfonat)-

Puffer, pH 7,0] pipettiert. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt, 2 ml abgenommen und bei 22000 g für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde die Extinktion bei 562 nm ( $E_{562}$ ) gemessen. Bei hohen Eisen(III)-Überschuss in der Sedimentprobe führt die Bildung von Fe(III)-Oxidhydraten zur Überbewertung der Eisen(II)-Konzentration. Die Korrektur erfolgte nach Hennies (1991). Als Maß für die Konzentration der Fe(III)-Oxidhydrate diente der Extinktionswert bei 400 nm. Vom  $E_{562}$ -Wert wurde ein siebtel des  $E_{400}$ -Wertes subtrahiert. Der Gehalt an amorphem Eisen(III) wurde aus der Differenz zwischen dem HCl-extrahierten Eisen(II) und dem Hydroxylamin-extrahierten Eisen(III) plus Eisen(II) berechnet. Der Eisengehalt wurde anhand der ermittelten Sedimentdichte auf das Sedimentvolumen umgerechnet und wird in  $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  angegeben. Die Bestimmung des Eisengehaltes in Sedimentproben wurde von Dr. Katrin Wendt-Potthoff, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, durchgeführt.

Wallmann et al. (1993) geben eine Übersicht über die Hydroxylamin-reduzierbaren Eisen(III)-Minerale und 1 M HCl-extrahierbaren Eisen(III)- und Eisen(II)-Minerale. Mit Hydroxylamin wird schwach kristallines Eisen(III) reduziert und somit extrahiert. Dies beinhaltet amorphes Fe(III)-(Hydr)oxid [auch als amorphes Fe(III)-Oxyhydroxid (Lovley & Phillips 1987a), *ferric gel* (Roden & Zachara 1996) oder am-FeOOH (Crosby et al. 1983) bezeichnet] und Ferrihydrit  $(\text{FeOH})_3$  [ $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Bigham et al. 1996)], wird jedoch nicht immer vollständig extrahiert (Roden & Zachara 1996)]. Lepidocrocit ( $\gamma$ -FeOOH) wird größtenteils (83 %) extrahiert. Goethit ( $\alpha$ -FeOOH), Akaganeit ( $\beta$ -FeOOH), Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) und Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) werden nur geringfügig oder gar nicht reduziert. Von den Fe-(Oxy)hydroxo-sulfaten wird Schwertmannit  $[\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4]$  aber nicht Jarosit  $[(\text{H},\text{K},\text{Na})\text{Fe}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2]$  reduziert (K. Wendt-Potthoff, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, pers. Mitt.). In 1 M HCl wird Siderit ( $\text{FeCO}_3$ ), Vivianit  $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2]$  und amorphes FeS vollständig, Mackinawit ( $\text{Fe}_{1-x}\text{S}$ ) größtenteils (92 %) und Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) nur teilweise (40 - 67 %) gelöst. Goethit, Hämatit und Akaganeit lösen sich nicht. Von den Eisen(III)-Mineralen lösen sich amorphes Fe(III)-(Hydr)oxid und Ferrihydrit vollständig und Lepidocrocit nur geringfügig, wobei die Oxidationsstufe erhalten bleibt.

### 2.2.3 Bestimmung der Sulfatreduktionsraten

Die Ratenbestimmung erfolgte mittels Radiotracer ( $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ ). Der Vergleich verschiedener Methoden in Hinblick auf Applikation des Tracers, Inkubation und Extraktion der reduzierten Schwefelverbindungen (Meier et al. 2000) zeigte, dass die direkte Injektion der Tracerlösung in ungestörte Sedimentkerne die geeignete Methode für junge Sedimente verschiedener aquatischer Systeme einschließlich der von Tagebau-Restseen darstellt. Die anschließende Extraktion der reduzierten Schwefelverbindungen mittels der Diffusionsmethode (Hsieh & Yang 1989, Ulrich et al. 1987) ergab vergleichbar gute Ergebnisse wie die Rückfluss-

destillation (Fossing & Jørgensen 1989). Obwohl die Diffusionsmethode arbeitstechnisch sehr viel einfacher ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rückflussdestillation angewandt. Letztere Methode bietet den Vorteil, die reduzierten Schwefelverbindungen sequenziell aus einer Sedimentprobe in verschiedenen Fraktionen zu gewinnen (siehe Kap. 2.2.2.4). In Abb. 2.6 ist der Arbeitsablauf schematisch dargestellt.

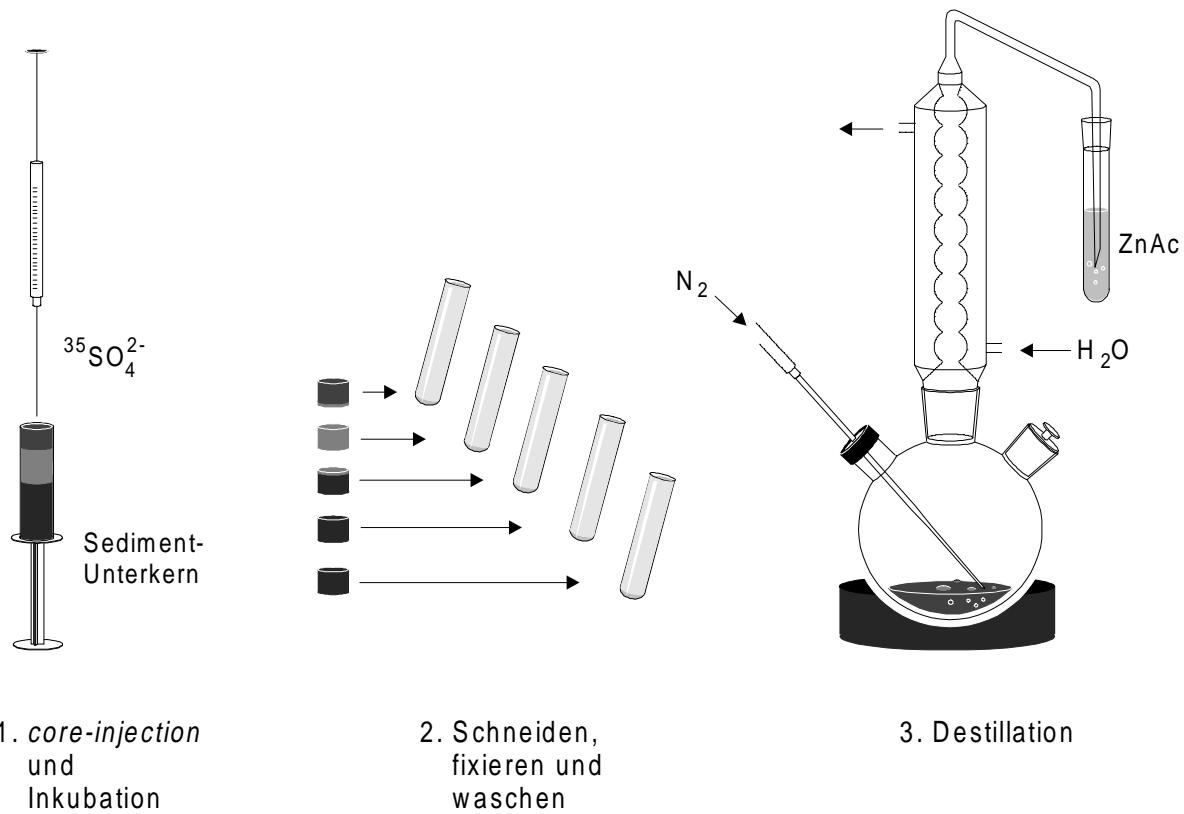


Abb. 2.6: Schematische Darstellung zur Applikation von radioaktiv markiertem Sulfat und der Aufarbeitung der Sedimentproben zur Bestimmung der Sulfatreduktionsraten.

Die Injektion der  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -Arbeitslösung ( $4 \text{ MBq ml}^{-1}$ , Amersham Corp., Braunschweig) erfolgte senkrecht zur Kernoberfläche mit einer Hamiltonspritze geführt von einem Mikromanipulator (Piker et al. 1998). Es wurden fünf Mal  $8,4 \mu\text{l}$  Lösung injiziert. Die Unterkerne wurden mit Parafilm® verschlossen und in einem gasdichten Behälter unter sauerstofffreiem Stickstoff bei *in situ*-Temperatur inkubiert. Die Inkubation dauerte abhängig von der zu erwartenden sulfatreduzierenden Aktivität des Sedimentes 4 bis 52 h. Die Kerne wurden anschließend in 1 cm-Schritten (dies entspricht 1,2 ml Sediment) geschnitten, in Zentrifugenröhren überführt und mit 5 ml 20 % Zinkacetat-Lösung für mindestens 1 h fixiert. Die Zugabe von Zinkacetat verhindert während der Aufarbeitung eine Oxidation der Sulfide bei Kontakt mit Luftsauerstoff und verhindert während der Destillation mit HCl die Oxidation durch das im Sediment vorhandene Eisen(III) (Duan et al. 1997). Das fixierte Sediment wurde bei 3000 g für 10 min abzentrifugiert und zweimal mit je 5 ml Wasser

gewaschen. Zur Bestimmung des verbliebenen  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  wurden von den Überständen jeweils 100 µl in 5 ml Szintillationscocktail (Lumagel® SB, Mallinckrodt Baker B.V., Griesheim) pipettiert. Die gewaschenen Sedimente wurden in Destillationskolben überführt und die Destillation wie in Kap. 2.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung des reduzierten  $^{35}\text{S}$ -Schwefels wurden 5 ml der Absorberlösung (5 % Zinkacetat-Lösung) in 10 ml Szintillationscocktail pipettiert. Die Radioaktivität wurde im Szintillationsspektrometer (LSC 1600TR, Canberra Packard, Dreieich) gemessen. Die Sulfatreduktionsraten (SRR) wurden unter Berücksichtigung der Porosität nach der folgenden Gleichung berechnet (Ingvorsen 1998):

$$SRR = \frac{a}{(A+a)t} \cdot [SO_4^{2-}] \cdot \phi \cdot 1,06 \text{ (in nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ d}^{-1})$$

$a$ : Radioaktivität des gesamten reduzierten  $^{35}\text{S}$ -Schwefels

$A$ : Radioaktivität des verbliebenen  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$

$t$ : Inkubationszeit (d)

$[SO_4^{2-}]$ : Sulfatkonzentration im Porenwasser (nmol ml<sup>-1</sup>)

$\phi$ : Porosität bzw. Porenwassergehalt (siehe Kap. 2.2.2.2)

1,06: Diskriminierungsfaktor

## 2.2.4 Experimente zum Einfluss organischer Substrate auf die Sulfatreduktion (Restsee 111)

Im Hinblick auf eine Sanierung der sauren Restseen wurde im Rahmen des Projektes "Untersuchungen zur Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur *in situ* Sulfatreduktion von geogen schwefelsauren Bergbaurestseen" (BMBF FKZ 02 WB 9592/6) die Stimulierung der Sulfatreduktion in den Sedimenten von RS 111 durch die Zugabe organischer Substrate untersucht. Dazu wurden 2 l-Duran-Flaschen mit 200 ml Sediment, 2000 ml Standortwasser und 15 g Stroh bestückt (Frömmichen 1997). Die organischen Substrate wurden in einer Konzentration von 30 mM (berechnet auf 2 l Standortwasser) zugegeben. In zwei Serien wurden die Substrate Pyruvat, Glucose und Succinat (08.10.-05.11.96) und die Substrate Lactat, Ethanol und Acetat (29.10.-26.11.96) getestet. Parallel wurde ein Ansatz sowohl ohne Substrat als auch ohne Stroh sowie ein Ansatz mit autoklaviertem Standortmaterial inkubiert. Es wurden Sediment-Greiferproben aus RS 111 (10 m) vom 23./24.09.96 für die erste Serie und vom 21./22.10.96 für die zweite Serie verwendet. Die Ansätze wurden vier Wochen bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) inkubiert.

Die Sedimententnahme aus den Flaschen erfolgte mit einer 10 ml-Pipette mit vergrößerter Öffnung. Zur Bestimmung der Sulfatreduktionsraten und der Schwefelverbindungen wurden 4 ml Sediment in Reagenzröhren pipettiert, der Gasraum mit sauerstofffreiem Stickstoff gespült, 50 µl  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -Arbeitslösung (4 MBq ml<sup>-1</sup>) hinzu pipettiert und

die Röhrchen mit Gummistopfen verschlossen. Die Ansätze wurden für 3 h 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Sulfatreduktionsraten und der reduzierten Schwefelverbindungen wurden wie in Kap. 2.2.3 bzw. Kap. 2.2.2.4 beschrieben durchgeführt.

## 2.2.5 Berechnung der relativen Standardabweichung

Die Messungen von Sulfatreduktionsraten, Schwefel- und Eisenverbindungen beruhen auf einer begrenzten Anzahl von Parallelen. Daher wurde der relative Fehler ( $= 100 \cdot \frac{\bar{x}_i - \bar{x}}{\bar{x}}$ ) der zwei bzw. drei Parallelen berechnet. Die relative Standardabweichung für alle Parallelbestimmungen der untersuchten Horizonte eines Standorts drückt die Variabilität der Messparameter für jeden Standort aus. Dabei wurde angenommen, dass die Varianz der relativen Fehler für die verschiedenen Sedimenttiefen gleich ist.

## 2.2.6 Berechnung des Verhältnisses von säureflüchtigen Schwefel zu Pyrit-Schwefel und der Bildungsgrade von Pyrit und sulfidischem Eisen

Das Verhältnis von säureflüchtigen Schwefel zu Pyrit-Schwefel entspricht dem Quotienten aus AVS (Mittelwert der parallelen Messwerte) und Pyrit-S. Pyrit-S wurde anhand des Mittelwerts des Gesamt-CRS abzüglich des Anteils an elementarem Schwefel (bestimmt an nur einer Parallelen) abgeschätzt.

Der Bildungsgrad von Pyrit, DOP (*Degree Of Pyritization*), ist definiert als:

$$DOP = \frac{\text{pyritic Fe}}{\text{pyritic Fe} + \text{acid-soluble Fe}} \quad (\text{Berner 1970, Raiswell \& Berner 1985})$$

Pyrit-Fe entsprach der Hälfte der Konzentration des Pyrit-S. Säurelösliches bzw. reaktives Eisen (Canfield et al. 1992) entsprach hier dem Hydroxylamin-extrahierbaren Eisen(III) plus Eisen(II) (Mittelwert der parallelen Messwerte).

Der Bildungsgrad von sulfidischem Eisen, DOS (*Degree Of Sulfidization*), ist definiert als:

$$DOS = \frac{\text{sulfidic Fe}}{\text{pyritic Fe} + \text{acid-soluble Fe}} \quad (\text{Boesen \& Postma 1988})$$

Sulfidisches Eisen entsprach der Summe aus AVS und Pyrit-Fe, wobei angenommen wurde, dass das gesamte bzw. der Hauptteil des AVS als FeS vorlag.

### 2.3. Mikrobiologische Untersuchungen

#### 2.3.1 Stammlösungen für Kulturmedien

Zur Bestimmung der Anzahl kultivierbarer Zellen im Sediment sowie zur Gewinnung und Charakterisierung von Reinkulturen wurden verschiedene Medien verwendet, die in den anschließenden Kapiteln beschrieben werden. Für die Herstellung wurden folgende Mineralmedien bzw. Stammlösungen verwendet:

Tab. 2.2: Mineralmedium A.

in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub> :	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,1 g
NaCl	0,1 g
KCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,2 g

Tab. 2.3: Mineralmedium B.

in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub> :	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,25 g
KCl	0,05 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,01 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g

Tab. 2.5: Spurenelementlösung (SL) 12B (Overmann et al. 1992).

in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	
EDTA-Di-Natriumsalz	3,0 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,1 g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	190 mg
MnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	50 mg
ZnCl <sub>2</sub>	42 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	24 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	18 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2 mg

Tab. 2.4: Selenit-Wolframatlösung (Widdel &amp; Bak 1992).

in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	
NaOH	0,4 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	6 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	8 mg

Tab. 2.6: Vitaminlösung (Stams et al. 1983)

in 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	
p-Aminobenzoësäure	0,1 g
Riboflavin	0,1 g
Thiamin	0,2 g
Nicotinsäure	0,2 g
Pyrodoxamin	0,5 g
Pantothenäsäure	0,1 g
Cobalamin	0,1 g
Biotin	0,02 g

### 2.3.2 Medien zur Bestimmung der Anzahl kultivierbarer Zellen im Sediment

Die Anzahl der kultivierbaren Zellen wurde nach *der Most Probable Number* (MPN)-Methode bestimmt (siehe Kap. 2.3.3). Die für die Verdünnungsreihen verwendeten Medien sind selektiv für die verschiedenen physiologischen Gruppen der schwefel- und eisen-oxidierenden sowie der eisen- und sulfatreduzierenden Bakterien.

### Schwefeloxidierende Bakterien (SOB)

Zur Bestimmung der Anzahl der SOB wurden zwei Medien mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet (Tab. 2.7). Als Grundlage für die Zusammensetzung des sauren Mediums (pH 4,5) diente das von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) für *Acidithiobacillus thiooxidans* angegebene Medium (Nr. 35 *Thiobacillus thiooxidans*, DSM Catalogue 1993 oder <http://www.dsmz.de>). Als neutrales Medium (pH 7) wurde das Medium von Visscher et al. (1992) leicht modifiziert verwendet. Das saure Medium wurde nach dem Autoklavieren mit steriler 1 M HCl (ca. 4 ml) auf pH 4,5 ± 0,1 eingestellt. Das neutrale Medium wurde nach dem Autoklavieren mit steriler 1 M HCl (ca. 0,5 ml) auf pH 7,0 ± 0,1 eingestellt.

Tab. 2.7: MPN-Medien für schwefeloxidierende Bakterien.

in 1000 ml Mineralmedium A:	
SL 12B	1 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (getrennt autoklaviert)	2,48 g (= 10 mM)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (10 g l <sup>-1</sup> 0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	100 µl
Vitamin B <sub>12</sub> (40 mg l <sup>-1</sup> , steril filtriert)	1 ml
<i>alternativ:</i>	
• pH 4,5	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,91 g (= 6,7 mM)
Bromphenolblau (1 g l <sup>-1</sup> )	5 ml
• pH 7	
NaHCO <sub>3</sub> anh. (getrennt autoklaviert)	0,56 g (= 6,7 mM)
Bromkresolpurpur (1 g l <sup>-1</sup> )	5 ml

### Azidophile eisenoxidierende Bakterien (FeOB)

Zur Bestimmung der Anzahl azidophiler FeOB wurden zwei Medien verwendet. Eins war mit und eins ohne organischem Substrat. Das Medium für autotrophe FeOB wurde in Anlehnung an das von der DSMZ für *Acidithiobacillus ferrooxidans* empfohlene Medium (Nr. 70 *Thiobacillus ferrooxidans*, DSM Catalogue 1993 oder <http://www.dsmz.de>) hergestellt (Tab. 2.8). Der pH-Wert lag nach dem Autoklavieren bei pH 1,6 - 1,8. Für die heterotrophen Vertreter der FeOB wurde das FTY (*Fe-Tetrathionate-Yeast*)-Medium (D.B. Johnson, University of Bangor, UK, pers. Mitt.) verwendet (Tab. 2.9). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2,4 ± 0,1 eingestellt.

Tab. 2.8: MPN-Medium für autotrophe eisenoxidierende Bakterien.

in 1000 ml Mineralmedium A:	
SL 12B	1 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (in 250 ml 0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , st. f.)	22,5 g (= 80 mM)
Vitamin B <sub>12</sub> (40 mg l <sup>-1</sup> , steril filtriert)	1 ml

Tab. 2.9: FTY-Medium (MPN-Medium für heterotrophe eisenoxidierende Bakterien)

in 1000 ml Mineralmedium B:	
SL 12B	1 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M in 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , st. f.)	25 ml (= 25 mM)
K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> (steril filtriert)	0,76 g (= 2,5 mM)
Hefeextrakt	0,2 g (= 0,02 %)

### Sulfatreduzierende Bakterien (SRB)

Die für SRB verwendete Medien (Tab. 2.10) entsprechen leicht modifiziert den Medien von Widdel & Bak (1992). Aufgrund der hohen Konzentrationen von Eisen und Magnesium im Verhältnis zu Natrium am Standort (siehe Kap. 2.1 und Tab. 2.1) wurden entweder  $MgSO_4$ , das auch für Medien mariner SRB eingesetzt wird (Widdel & Bak 1992), oder  $FeSO_4$  anstatt  $NaSO_4$  als Sulfatsalze verwendet. Zudem wurden die Medien in ihrem pH-Wert variiert.

Tab. 2.10: MPN-Medien für sulfatreduzierende Bakterien.

in 1000 ml Mineralmedium A:	
SL 12B	1 ml
Selenit-Wolframat-Lösung	0,2 ml
Resazurin	0,5 ml
Vitaminlösung (steril filtriert)	1 ml
<i>alternativ:</i>	
• $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,69 g (= 15 mM)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 g $l^{-1}$ 0,1 M $H_2SO_4$ , getr. auto.)	5 ml
•• pH 7	
NaHCO <sub>3</sub> anh. (getrennt autoklaviert)	1,68 g (= 20 mM)
Na-Lactat (8,76 ml 50 % Lsg. in 100 ml, st. f.)	10 ml (= 5 mM)
Na-Aacetat (4,1 g in 100 ml, getr. auto.)	10 ml (= 5 mM)
•• pH 3	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (getrennt autoklaviert)	2,73 g (= 20 mM)
Glycerin <sup>a</sup> (4,3 ml 87 % Lsg. in 100 ml, getr. auto.)	10 ml (= 5 mM)
• $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ /pH 3	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (in 100 ml 0,1 M $H_2SO_4$ , st. f.)	2,78 (= 10 mM)
Glycerin (4,3 ml 87 % Lsg. in 100 ml, getr. auto.)	10 ml (= 5 mM)

<sup>a</sup> Ferac, Berlin

Die Medien wurden in Widdel-Kolben (Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern) hergestellt und nach dem Autoklavieren unter sauerstofffreiem Stickstoff abgekühlt. Der pH-Wert des  $MgSO_4$ -Mediums wurde mit ca. 5 ml 1 M HCl auf  $pH 6,8 \pm 0,1$  bzw.  $pH 3,2 \pm 0,2$  eingestellt. Der pH-Wert des  $FeSO_4$ /pH 3-Mediums wurde mit ca. 0,5 ml 1 M NaOH auf  $pH 2,9 \pm 0,1$  eingestellt. Natriumdithionit diente als Reduktionsmittel. Davon wurde dem Medium mit einem sterilen Spatel so viel hinzugefügt, bis eine Entfärbung des Resazurins eintrat.

### Azidophile eisenreduzierende Bakterien (FeRB)

Zur Bestimmung der Anzahl azidophiler FeRB wurden zwei Medien mit verschiedenen Elektronendonatoren verwendet (Tab. 2.11). Das Medium für autotrophe FeRB mit elementarem Schwefel ( $S^0$ ) als Elektronendonator basierte auf den Angaben von Pronk et al. (1992). Das Medium für heterotrophe FeRB mit Glucose als Elektronendonator entsprach leicht modifiziert dem Medium von Johnson & McGinness (1991a).

Tab. 2.11: MPN-Medien für azidophile eisenreduzierende Bakterien.

in 1000 ml Mineralmedium B:	
SL 12B	1 ml
TSB ( <i>Tryptic Soy Broth</i> ) <sup>a</sup>	0,25 g (= 0,025 %)
<i>alternativ:</i>	
• $S^0$	
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 5H_2O$ (steril filtriert)	25,3 g (= 50 mM)
<i>Flowable Sulfur</i> <sup>b</sup> (11 M, getrennt autoklaviert)	13,6 ml (= 150 mM)
• <i>Glucose</i>	
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 5H_2O$ (steril filtriert)	12,6 g (= 25 mM)
Glucose (getrennt autoklaviert)	0,9 g (= 5 mM)

<sup>a</sup> Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA

<sup>b</sup> Stoller Enterprises Inc., Lancashire, UK

Die Medien wurden in Widdel-Kolben hergestellt und nach dem Autoklavieren unter sauerstofffreiem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (80/20) abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit ca. 90 ml steriler 1 M NaOH [bei 50 mM  $Fe_2(SO_4)_3$ ] auf  $pH\ 2,5 \pm 0,1$  eingestellt. Der elementare Schwefel in Form von *Flowable Sulfur* (Germida 1985) wurde vor Gebrauch vier Mal mit  $H_2O_{dest}$  (Volumenverhältnis 1:1) gewaschen und nach jeweiligen Waschvorgang wie folgt abzentrifugiert: 5 min bei 300 g nach dem 1. Waschvorgang, 5 min bei 900 g nach dem 2. und 3. Waschvorgang und 5 min bei 1500 g nach dem 4. Waschvorgang. Die Schwefelsuspension wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend sofort bis zur vollständigen Resuspension geschüttelt und mit Ultraschall behandelt. Der Schwefelgehalt der Suspension wurde nach Verdunstung des Wassers bei 90 °C bestimmt.

#### 3.3.3 Durchführung der Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl kultivierbarer, schwefel- und eisenoxidierender sowie sulfat- und eisenreduzierender Bakterien wurde die *Most Probable Number* (MPN)-Technik angewandt (Cochran 1950, Oberzill 1967). Die Verdünnungsreihen in fünf (oder acht) Parallelen mit acht (oder zwölf) Verdünnungsstufen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit je

1,5 ml Volumen durchgeführt. Das Sediment wurde zunächst vorverdünnt (20 ml Sediment in 60 ml Mineralmedium A). Die überstehende Gasphase wurde mit sauerstofffreiem Stickstoff 10 - 15 min gespült und die Ansätze gut geschüttelt. Zuerst wurden die Verdünnungsreihen zur Zählung von SRB durchgeführt. Dann wurde das Sediment ein zweites Mal vorverdünnt (10 ml Sedimentsuspension in 90 ml Mineralmedium A) und anschließend die Zählungen von FeRB, SOB und FeOB durchgeführt. Um einen Hinweis zu erhalten, ob ein größerer Anteil der SRB und FeOB als Sporen vorliegt, wurde die Sedimentsuspension pasteurisiert (20 min bei 80 °C) und eine weitere Verdünnungsreihe für SRB und FeOB durchgeführt wurde. Die Kulturmedien wurden in entsprechenden Volumina in den Mikrotiterplatten vorgelegt. Die Verdünnungsreihen für SRB wurden mit Verdünnungsfaktor zehn (100 µl Sedimentsuspension auf 900 µl Medium) im neutralen RS B und mit Verdünnungsfaktor sechs (200 µl auf 1000 µl Medium) in den sauren Seen durchgeführt. Für azidophile FeRB wurde ein Verdünnungsfaktor von zehn (100 µl auf 900 µl Medium) gewählt. Für die aeroben SOB und FeOB wurde ein kleineres Gesamtvolumen gewählt und die Verdünnungsreihen ebenfalls mit Verdünnungsfaktor zehn (50 µl Sedimentsuspension auf 450 µl Medium) durchgeführt.

Die Platten wurden mit einer sterilen, gasdurchlässigen Folie (ThinSeal™, Excel Scientific, Roth, Karlsruhe) verschlossen. SRB und FeRB wurden anoxisch (Anaerocult A mini, Merck, Darmstadt) und SOB und FeOB oxisch im Dunkeln bei 28 °C inkubiert. Nach mindestens acht Wochen wurden die beimpften Platten ausgewertet. Als positives Ergebnis wurde bei SOB der Farbumschlags des pH-Indikators, bei FeOB die Bildung eines rostfarbenen Niederschlags, bei SRB die Bildung eines schwarzen Niederschlags und bei FeRB eine Entfärbung des Mediums bewertet. Die höchstwahrscheinlich Zahl (MPN) des Orginaltiters wurden mit Hilfe des Computerprogramms von Klee (1993) bestimmt, wobei die Berechnung des 95 %-Konfidenzintervalls nach der Cornish & Fisher-Methode erfolgte.

### 2.3.4 Gewinnung von Reinkulturen

#### Azidophile schwefel- und eisenoxidierende Bakterien

Azidophile schwefel- und eisenoxidierende Bakterien wurden auf doppelschichtigen Agarose-Platten (Abb. 2.7 B) isoliert (Johnson & McGinness 1991a, Johnson 1995). In die Bodenschicht wird die Kultur eines heterotrophen, azidophilen Organismus eingebettet. Die Kultur diente dazu, die bei pH 2,5 auftretenden Säurehydrolyse-Produkte der Agarose (vorwiegend Kohlenhydrate) wegzufangen. Dies ermöglicht auf der sterilen Deckschicht das Wachstum autotropher Organismen, das durch erhöhte Konzentrationen organischer Substanzen gehemmt werden kann (Tuttle et al. 1977, Matin 1978). Der hier verwendete azidophile heterotrophe Stamm "*Acidiphilium cryptum*" SJH wurde von D.B. Johnson

(University of Wales, UK) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung der Boden- und Deckschicht sind in Tab. 2.12 bzw. Tab. 2.13 wiedergegeben. Der Deckschicht wurden verschiedene Elektronendonatoren zugesetzt: 1) nur Eisen(II), 2) Eisen(II) und Tetrathionat und 3) Eisen(II) und elementarer Schwefel ( $S^0$ , *Flowable Sulfur*).

Tab. 2.12: Zusammensetzung der Bodenschicht der Agaroseplatten zur Isolierung von azidophilen schwefel- und eisenoxidierende Bakterien.

400 ml (für 12 Platten):	
$H_2O_{demin}$	230 ml
Mineralmedium B (10x)	40 ml
SL 12B	0,4 ml
TSB ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )	0,1 g (= 0,025 %)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 M in 1 M $H_2SO_4$ , steril filtriert)	10 ml (= 25 mM)
SJH-Kultur	20 ml
Agarose Typ I: low EEO <sup>a</sup> (in 100 ml $H_2O_{demin}$ , getrennt autoklaviert)	2 g (= 0,5 %)
• bei Deckschicht mit Tetrathionat oder $S^0$	
$K_2S_4O_6$ (steril filtriert)	0,3 g (= 2,5 mM)

<sup>a</sup> Sigma-Aldrich, Stammheim

Tab. 2.13: Zusammensetzung der Deckschicht der Agaroseplatten zur Isolierung von azidophilen schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien.

200 ml (für 12 Platten):	
A. demin.	125 ml
Mineralmedium B (10x)	20 ml
SL 12B	0,2 ml
TSB ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )	0,05 g (= 0,025 %)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (27,8 g in 1 M $H_2SO_4$ , st. f.)	5 ml (= 25 mM)
Agarose Typ I: low EEO <sup>a</sup> (in 50 ml $H_2O_{demin}$ , getrennt autoklaviert)	1 g (= 0,5 %)
alternativ:	
• Tetrathionat	
$K_2S_4O_6$ (steril filtriert)	0,15 g (= 2,5 mM)
• $S^0$	
<i>Flowable Sulfur</i> (11 M, getrennt autoklaviert)	0,9 ml (= 100 mM)

Der pH-Wert der Medien wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M  $H_2SO_4$  auf  $pH 2,4 \pm 0,1$  eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden Medien und Agaroselösungen auf ca 45 °C abgekühlt. Anschließend wurden SJH-Kultur,  $FeSO_4$ -Lösung und alternativ  $K_2S_4O_6$ -Lösung und *Flowable Sulfur*-Suspension zu den Medien hinzu pipettiert. Die Medien wurden mit der

Agaroselösung durch leichtes Schwenken vermischt und auf zwölf Platten verteilt, wobei die sterile Deckschicht erst nach Verfestigung der Bodenschicht darüber gegossen wurde. Zum Animpfen der Platten wurden Aliquots aus den am höchsten verdünnten, positiven MPN-Röhrchen [Proben von RS 111 (10 m und 7 m) und RS 107 im April 1997] oder direkt von mit Mineralmedium verdünntem Sediment [Proben von RS 111 (10 m) im Juni 1997] entnommen. Die Platten wurden oxisch bei 28 °C inkubiert. Isoliert liegende Kolonien wurden in FTY-Medium (siehe Tab. 2.9, 10 mM Fe) überimpft. Zur Gewinnung einer Reinkultur wurde das Ausstreichen auf Agaroseplatten mindestens dreimal wiederholt.

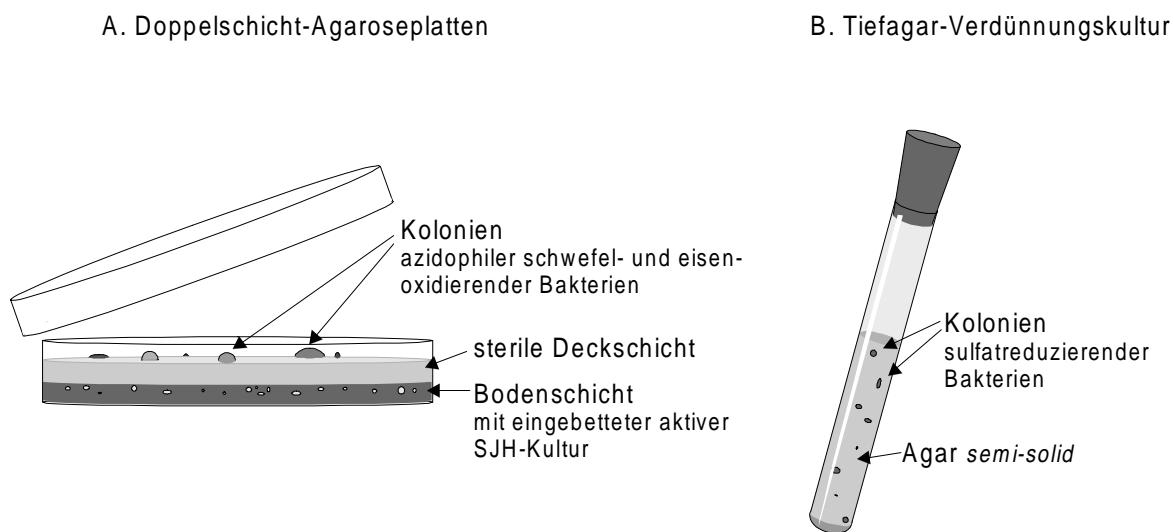


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Isolationstechniken für azidophile schwefel- und eisenoxidierende Bakterien (A) und sulfatreduzierende Bakterien (B).

Zur Stammhaltung bzw. Anzucht und Vorkonditionierung des Bakterienstammes SJH wurde das Medium aus Tab. 2.14 verwendet. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2,4 ± 0,1 eingestellt.

Tab. 2.14: Medium zur Stammhaltung von "*Acidiphilium cryptum*" SJH.

in 1000 ml Mineralmedium B:	
SL 12B	1 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M in 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , steril filtriert)	25 ml (= 25 mM)
Galactose (getrennt autoklaviert)	1,8 g (10 mM)
TSB ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )	0,25 g (= 0,025 %)
<i>bei Deckschicht mit Tetrathionat oder S<sup>0</sup></i>	
K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> (steril filtriert)	0,76 g (= 2,5 mM)

### Sulfatreduzierende Bakterien

Die Isolierung von sulfatreduzierenden Bakterien wurde sowohl bei neutralem pH-Wert als auch bei saurem pH-Wert versucht. Die Isolierung bei neutralem pH-Wert erfolgte in Tiefagar-Verdünnungsreihen (Widdel & Bak 1992) (Abb. 2.7 B). Dazu wurde das neutrale Medium aus Tab. 2.10 ( $MgSO_4/\text{pH } 7$ ) mit dem Unterschied verwendet, dass dieses in 1,5facher Konzentration (in 670 ml anstatt 1000 ml) und ohne Zusatz von  $FeSO_4$ -Lösung angesetzt wurde. Zur Herstellung der 3 %-Agarlösung wurde der Agar (Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) dreimal in  $H_2O_{\text{dest}}$  gewaschen. In 20 ml-Röhrchen wurden jeweils 3 ml Agarlösung vorgelegt, autoklaviert und auf 45 °C abgekühlt. Das Medium wurde ebenfalls auf 45 °C temperiert und jeweils 6 ml zur Agarlösung pipettiert. Zur ersten Verdünnungsstufe wurden 1 ml Inokulum hinzu gegeben, der Ansatz geschwenkt und 1 ml für die nächste Verdünnungsstufe entnommen. Das angeimpfte Röhrchen wurde mit einem Butylgummistopfen verschlossen und in ein kaltes Wasserbad gestellt. Die Verdünnungsreihen wurden bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  durchgeführt. Anschließend wurde die Gasphase mit sauerstofffreiem Stickstoff gespült, die Butylgummistopfen fest angedrückt und die angeimpften Röhrchen bei 28 °C inkubiert. Isoliert liegende Kolonien wurden in Flüssigmedium überimpft. Die Tiefagar-Verdünnungsreihen wurden so oft wiederholt, bis makroskopisch und mikroskopisch keine Unreinheiten mehr zu erkennen waren. Als Inokulum für die Tiefagar-Verdünnungsreihen wurden Aliquots aus den am höchsten verdünnten, positiven MPN-Röhrchen mit  $MgSO_4/\text{pH } 7$ -Medium (vorwiegend von den Probenahmen im April 1997) und aus einer Anreicherungskultur in  $FeSO_4/\text{pH } 3$ -Medium (siehe auch Tab. 2.10, Greiferproben von September 1997) verwendet.

Tab. 2.15: Zusammensetzung der Boden- und Deckschicht der Agaroseplatten zur Isolierung von sulfatreduzierenden Bakterien bei saurem pH-Wert.

400 ml (für 12 Platten):	
$H_2O_{\text{demin}}$	230 bzw. 250 ml
Mineralmedium B (10x)	40 ml
SL 12B	0,4 ml
Hefeextrakt	0,08 g (= 0,02 %)
Glycerin (1 M, getrennt autoklaviert)	4 ml (= 10 mM)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 M in 1 M $H_2SO_4$ , steril filtriert)	4 ml (= 10 mM)
Agarose Typ I: low EEO <sup>a</sup> (in 100 ml $H_2O_{\text{demin}}$ , getrennt autoklaviert)	2 g (= 0,5 %)
<i>nur für die Bodenschicht:</i>	
SJH-Kultur	20 ml
$K_2S_4O_6$ (steril filtriert)	0,3 g (= 2,5 mM)

Der Versuch, sulfatreduzierende Bakterien bei saurem pH-Wert zu isolieren, erfolgte auf doppelschichtigen Agaroseplatten. Die Medienzusammenstellung ist in Tab. 2.15 wiedergegeben (A. Sen, University of Bangor, UK, pers. Mitt.). Der pH-Wert wurde auf pH  $3,2 \pm 0,2$  eingestellt. Deck- und Bodenschicht besaßen die gleiche Mächtigkeit. Zum Beimpfen der Platten wurden Aliquots von verdünntem Sediment [Proben von RS 111 (10 m) und (7 m) im Juni 1997] oder aus den am höchsten verdünnten, positiven MPN-Röhrchen in  $\text{FeSO}_4/\text{pH } 3$ -Medium [Proben von RS 111 (10 m) und (7 m), RS 107 und RS B im August 1997] entnommen. Die Platten wurden bei  $28^\circ\text{C}$  anoxisch in Anaerobiertöpfen (AnaeroGen 2,5 l, Oxoid Limited, Wesel) inkubiert.

### **2.3.5 Physiologische Charakterisierung von Reinkulturen**

#### **Azidophile schwefel- und eisenoxidierende Bakterien**

Die Isolate von den oxisch inkubierten Agaroseplatten wurden auf 1. chemolithoautotrophes 2. chemoorganoheterotrophes und 3. anaerobes Wachstum untersucht. Autotrophes Wachstum wurde in Mineralmedium (MM B, SL 12B, pH 2,5) mit Eisen(II) (50 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) oder elementaren Schwefel (300 mM *Flowable Sulfur*) getestet. Chemoorganotrophes Wachstum wurde in TSB-Medium (MM B, SL 12B, TSB 0,025 %, pH 2,5) mit Glucose (10 mM) getestet. Die Medien wurden mit FTY-Kulturen beimpft und bei positivem Ergebnis zwei weitere Male überimpft. Bei negativem Ergebnis wurde der Ansatz mit frischen Kulturen (bis zu dreimal) wiederholt. Wachstum wurde anhand des rostfarbenen Niederschlags [Medium mit Eisen(II)], bzw. der Abnahme des pH-Wertes (Medium mit elementaren Schwefel) sowie der Trübung oder durch Mikroskopie (Medium mit Glucose) festgestellt. Anaerobes Wachstum bzw. Eisen(III)-Reduktion wurde an ausgewählten Stämmen getestet. Dazu wurden die Medien aus Tab. 2.11 (mit elementaren Schwefel für autotrophe und mit Glucose für heterotrophe Stämme) verwendet. In gasdicht verschließbaren 300 ml-Erlenmeyerkolben wurden ca. 100 ml Medium eingefüllt und die Gasphase mit sauerstofffreiem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (80/20) gespült. Eisen(III)-Reduktion wurde anhand der Entfärbung des Medium bzw. Messung des HCl-löslichen Eisen(II) und des Hydroxylamin-extrahierbaren Eisen(III) plus Eisen(II) (siehe Kap. 2.2.2.5) festgestellt.

#### **Sulfatreduzierende Bakterien**

Für die sulfatreduzierenden Stämme wurde ein größeres Substratspektrum aufgenommen. In Anwesenheit von 15 mM Sulfat ( $\text{MgSO}_4/\text{pH } 7$ -Medium ohne Acetat und Lactat, siehe Tab. 2.10) wurden als Elektronendonatoren (jeweils 10 mM) Lactat, Acetat, Formiat (mit

zusätzlich 2 mM Acetat als Kohlenstoffquelle), Propionat, Butyrat, Succinat, Fumarat, Methanol, Ethanol, Glycerol, Alanin und Benzoat (2 mM) getestet. In Abwesenheit von Sulfat wurde Wachstum auf Lactat, Formiat, Succinat und Methanol untersucht. In Anwesenheit von Formiat/Acetat bzw. Lactat wurden als alternative Elektronenakzeptoren Thiosulfat (15 mM), Tetrathionat (2,5 mM), Sulfit (5 mM), elementarer Schwefel bzw. *Flowable Sulfur* (100 mM), Nitrat (15 mM) und Eisen(III) [25 mM, Fe(III)-Citrat-Stammlösung mit 1 M NaOH auf pH  $6,7 \pm 0,2$  eingestellt] getestet. Die Substrattests wurden in 22 ml-Glasröhrchen mit Septum-Schraubverschluss durchgeführt. Die Röhrchen wurden mit Kulturen in MgSO<sub>4</sub>/pH 7-Medium mit je 5 mM Lactat und Acetat (Tab. 2.10) beimpft und bei positivem Ergebnis zwei weitere Male überimpft. Bei negativem Ergebnis wurde der Substrattest mit frischen Kulturen (bis zu dreimal) wiederholt. Die Trübung der Suspension galt als Indikator für Wachstum. Im zweiten Durchgang wurde in den Ansätzen mit Schwefelverbindungen als Elektronenakzeptoren die Bildung von Sulfid mit einem sauren Kupferreagenz (5 mM CuSO<sub>4</sub> in 50 mM HCl) überprüft. In den Ansätzen mit Nitrat wurde ebenfalls im zweiten Durchgang die Bildung von Nitrit und Ammonium überprüft (Test 67 und 05, Filterphotometer Nanocolor 200D, Macherey-Nagel, Düren). Die Fähigkeit, Eisen(III) zu reduzieren, wurde anhand der Entfärbung des Mediums überprüft.

Bei einigen Stämmen wurde das Wachstum bei verschiedenen pH-Werten getestet. Dazu wurde ein phosphatgepuffertes Medium (10 mM) mit 15 mM Sulfat und 10 mM Lactat (siehe Tab. 2.10) verwendet, wobei der pH-Wert auf pH 3, 4, 5, 6 und 7 eingestellt wurde. Parallel wurde carbonatgepuffertes Medium mit 15 mM Sulfat und je 5 mM Lactat und Acetat (siehe Tab. 2.10) beimpft. In diesen Ansätzen wurden die Wachstumsraten bei 28 °C mittels Trübungsmessung (Ratio XR, Hach, Loveland, Colorado) bestimmt.

Für einige Stämme wurden Nachweise für Desulfovirodin und Katalaseaktivität durchgeführt. Diese erfolgten an gewaschenen und aufkonzentrierten Zellsuspensionen. Zum Nachweis von Desulfovirodin wurde der Fluoreszenztest nach Postgate (1959) angewendet. Katalaseaktivität wurde mit einer Wasserstoffperoxid-Reagenz (ID color catalase Kit, BioMerieux, Marcy l'étoile, Frankreich) überprüft.

Mikroskopische Untersuchungen sowie die Erstellung von Phasenkontrast-Aufnahmen erfolgten am Mikroskop Typ Leica DM RB (Bensheim).

## 2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Identifizierung der isolierten Bakterienstämme wurde eine partielle Sequenzierung des 16S rRNA-Gens (16S rDNA) durchgeführt. Der Vergleich der analysierten Sequenzen mit 16S rDNA-Sequenzen aus Datenbanken ermöglichte die Bestimmung ihrer phylogenetischen Zugehörigkeit.

### 2.4.1 Zellernte, Isolierung und Aufreinigung der Zell-DNA

Zellmassen aus 140 ml (bei autotrophen Bakterienstämmen) bzw. 70 ml (bei heterotrophen Bakterienstämmen) frisch gewachsener Kulturen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 18000 g und 4 °C in sterilen, verschließbaren Zentrifugenbechern gewonnen. Zellkulturen in Eisen(II)-haltigem Medium wurden zuvor für 1 min im Ultraschallbad (Stufe 1) behandelt und der Eisen(III)-Niederschlag für 5 min bei 600 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Mineralmedium (A oder B) aufgenommen, resuspendiert und 30 min bei 18000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml TE-Puffer (10 mM TRIS Base, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, mit HCl auf pH 8 eingestellt) aufgenommen, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei 22000 g abzentrifugiert.

Zur Isolierung der Zell-DNA wurde das Zellpellet in 600 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 600 µl Phenol versetzt und für 30 min bei 55 °C aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 22000 g wurde die obere Phase abgenommen und mit 600 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 5 min bei 22000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 600 µl Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 2 min bei 22000 g zentrifugiert. Die obere Phase enthielt den DNA-Rohextrakt.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte entweder mit dem DNA purification kit Easy Pure (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) nach Anleitung oder durch Fällung mit Isopropanol. Dazu wurden zu i. d. R. 300 µl DNA-Rohextrakt 30 µl 3 M NaAcetat und 231 µl Isopropanol pipettiert. Der Ansatz wurde leicht gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde für 15 min bei 22000 g zentrifugiert und anschließend zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei 60 °C ca. 30 min getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte im Fluorometer (DyNA Quant 200, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA).

### 2.4.2 Amplifikation der 16S rDNA mittels *Polymerase Chain Reaction*

Die spezifische Amplifizierung des 16S rRNA Gens erfolgte mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) nach Saiki et al. (1988) unter Verwendung der in Tab. 2.16 aufgeführten Primer (Brosius et al. 1981). Das Gesamtvolume des PCR-Ansatzes (Tab. 2.17) betrug

50 µl, wobei 5 - 20 ng Zell-DNA eingesetzt wurden. Die PCR wurde in dünnwandigen Eppendorf-Reaktionsgefäß en im Thermocycler (Typ Progene, F. Techne, Cambridge, UK) nach dem in Tab. 2.18 angegebenen Temperaturprogramm durchgeführt.

Tab. 2.16: Verwendete Primer zur Amplifizierung der 16S rDNA (Roth, Karlsruhe).

Name	Sequenz	Länge <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>
8forward	5'> AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG <3'	20	60 °C	8 - 27
1492reverse	5'> GGT TAC CTT GTT ACG ACT T <3'	19	54 °C	1492 - 1474

<sup>a</sup> Anzahl der Nucleotide

<sup>b</sup> Schmelzpunkt nach der 2 °C + 4 °C-Regel

<sup>c</sup> *E. coli*-Nummerierung (Gutell et al. 1985)

Tab. 2.17: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Primer 8f (10 pmol µl <sup>-1</sup> )	2,5 µl
Primer 1492r (10 pmol µl <sup>-1</sup> )	2,5 µl
10x Taq-Inkubationspuffer	5 µl
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 mM) <sup>a</sup>	2 µl
Taq-DNA Polymerase (5 units µl <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0,15 µl
DNA-Lösung	0,5 - 10 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad. 50 µl

<sup>a</sup> Roth, Karlsruhe

<sup>b</sup> Boehringer Mannheim

Tab. 2.18: Temperaturprogramm für die PCR zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Start	5 min	95 °C	<i>Melting</i> : Denaturierung
10 Zyklen	45 s	94 °C	<i>Melting</i>
	45 s	55 °C	<i>Annealing</i> : Bindung des Primers
	3 min	70 °C	<i>Extension</i> : Kettenverlängerung
30 Zyklen	45 s	94 °C	<i>Melting</i>
	45 s	55 °C	<i>Annealing</i>
	3 min + 5 s	70 °C	<i>Ramping</i> : Verlängerung der Extensionszeit um je 5 s pro Zyklus
	10 min	70 °C	<i>Final Extension</i> : Abschließende Doppelstrang-Synthese

#### 2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreingung des PCR-Produktes

Eine erfolgreiche PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese der amplifizierten DNA im Vergleich zu einem DNA-Längenstandard nachgewiesen. 3 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl Farbmarker (Blue/orange 6x loading dye; Promega, Heidelberg) gemischt und in je eine Tasche des Agarose-Gels [0,8 % Agarose (Serva, Heidelberg) in 0,5x TBE-Puffer: 5,4 g l<sup>-1</sup>

Tris Base, 2,75 g l<sup>-1</sup> Borsäure, 0,42 g l<sup>-1</sup> EDTA] aufgetragen. Als DNA-Längenstandard wurde Hind III/Eco RI verdaute λ-DNA (Promega, Heidelberg) in einer eigenen Spur aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5x TBE gefüllt und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60 V für 30 - 40 min. Anschließend wurde das Gel für ca. 10 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt und die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Nach erfolgreicher Amplifizierung wurde das PCR-Produkt mit Nucleon QC kit for PCR/oligo clean up (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Anleitung gereinigt. Der DNA-Gehalt wurde, wie in Kap. 2.4.2 beschrieben, bestimmt und das gereinigte PCR-Produkt bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.4.4 Partielle Sequenzierung der 16S rDNA

Die amplifizierte 16S rDNA wurde direkt mittels *Cycle Sequencing* (Murray, 1989) sequenziert. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der *Dideoxyribonucleotide Chain-termination*-Methode nach Sanger et al. (1977) kombiniert mit der PCR-Methode (Hillis et al. 1996). Die Amplifizierung der 16S rDNA erfolgt in vier parallelen Ansätzen, die neben den vier Desoxy-Nukleotiden jeweils eines der vier Didesoxy-Nukleotide (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) enthält. Diesen Nucleotiden fehlt die 3'OH-Gruppe, welche die Bindung zum folgenden Nucleotid herstellt. Wird ein ddNTP eingebaut, so kommt es zum Kettenabbruch. Da diese an jeder Position des komplementären DNA-Stranges eingebaut werden können, entstehen ebenso viele Fragmente, wie das entsprechende Desoxy-Nukleotid in der Sequenz vorkommt. Die Fragmente in einem Ansatz enden jeweils mit dem verwendeten ddNTP. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen können die Fragmente in einer anschließenden Gelelektrophorese aufgetrennt werden, wobei die vier Ansätze in vier parallelen Spuren aufgetragen werden. Nachdem die markierten Fragmente sichtbar gemacht worden sind, kann anhand der Abfolge der Banden in den vier Spuren die Sequenz des komplementären DNA-Stranges abgelesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Abschnitt der 16S rDNA der Isolate sequenziert. Die partielle Sequenzierung erfolgte in beide Richtungen unter Verwendung der Primer 357f (Brosius et al. 1981) und 907r (Muyzer et al. 1995). Die Primer waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert (Tab. 2.19).

Tab. 2. 19: Verwendete Primer zur partiellen Sequenzierung (Roth, Karlsruhe).

Name	Sequenz	Länge <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>
357forward	5'> CTC CTA CGG GAG GCA GCA G <3'	19	64 °C	357 - 375
907reverse	5'> CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT <3'	20	56 °C	907 - 888

<sup>a</sup> Anzahl der Nucleotide

<sup>b</sup> Schmelzpunkt nach der 2 °C + 4 °C-Regel

<sup>c</sup> *E. coli*-Nummerierung (Gutell et al. 1985)

Für die *Cycle Sequencing*-PCR wurde das SequiTHERM EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-ALF™ (Biozym, Diagnostik, Hess. Oldendorf) verwendet. Das Volumen der Sequenzier-Ansätze betrug je 6 µl (Tab. 2.20). Die Sequenzierung wurde nach dem in Tab. 2.22 angegebenen Temperaturprogramm durchgeführt. Nach Ablauf des Programms wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt und jeweils 3 µl Farbmarker (STOP/Loading buffer: 95 % Formamid, 10 mM EDTA und 10 mg ml<sup>-1</sup> Blue dextran) hinzu pipettiert. Die DNA wurde bei 94 °C (2 min) denaturiert, zurück auf 4 °C abgekühlt und 6 µl des Sequenzier-Ansatzes auf das 0,35 mm Polyacrylamidgel (Tab. 2.21) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung fand in einem automatisierten A.L.F DNA Sequencer (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) statt. Die fluoreszenzmarkierten Einzelstrangfragmente werden hierbei über einen Laserscanner detektiert.

Ein Teil der 16S rDNA-Sequenzen wurde ausgehend vom PCR-Produkt von der Firma Replicon (Berlin) sequenziert.

Tab. 2.20: Zusammensetzung des Sequenzier-Ansatzes.

Sequenzier-Puffer	7,2 µl
Polymerase (5 units µl <sup>-1</sup> )	1 µl
Primer 357f/Fluos oder 907r/Fluos (10 pmol µl <sup>-1</sup> )	0,5 µl
gereinigtes PCR-Produkt (2 - 50 ng DNA pro Ansatz)	8,3 µl
auf vier Ansätze aufgeteilt	
<hr/>	
alternativ:	
• Termination mix A (0,45 mM ddATP + 0,45 µM je dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP)	2 µl
• Termination mix C (0,03 mM ddCTP + 0,45 µM je dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP)	2 µl
• Termination mix G (0,03 mM ddGTP + 0,45 µM je dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP)	2 µl
• Termination mix T (0,45 mM ddTTP + 0,45 µM je dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP)	2 µl

Tab. 2.21: Zusammensetzung des Sequenziergels.

Harnstoff	16,8 g
Hydrolink (Longranger gel solution) <sup>a</sup>	4,6 ml
10x TBE (108 g l <sup>-1</sup> TRIS Base, 55 g l <sup>-1</sup> , Borsäure, 8,3 g l <sup>-1</sup> EDTA)	4,8 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad. 40 ml
30 min röhren, dann filtrieren und entgasen	
TEMED	21,6 µl
APS (10 %)	280 µl
3 h auspolymerisieren lassen	
Laufpuffer: 0,6x TBE	

<sup>a</sup> FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA

Tab. 2.22: Temperaturprogramm der *Cycle Sequencing*-PCR.

Start	2 min	95 °C	<i>Melting</i>
25 Zyklen	45 s	94 °C	<i>Melting</i>
	45 s	55 °C	<i>Annealing</i>
	1 min	72 °C	<i>Extension</i>

#### 2.4.5 Phylogenetische Analysen

Die Sequenzen wurden vom A.L.F. DNA Sequencer-Programm Evaluation (ALFwinTM version 1.00) automatisch ausgewertet. Die so erhaltenen Sequenzen wurden in den Multicolor Sequenz Alignment Editor (<http://www-3.igb-berlin.de/abt3/hepperle>, Hepperle 1999) eingelesen. Anhand der Signalkurven sowie durch den Vergleich der beiden komplementären Stränge (*forward* und *reverse*) wurden unklare Zuweisungen manuell korrigiert oder unvollständige Sequenzabschnitte ergänzt.

Das *Alignment* (die Zuordnung der homologen Nucleotid-Positionen der einzelnen Sequenzen zueinander) erfolgte manuell anhand der Sekundärstruktur von *Escherichia coli* (Gutell et al. 1986). Die partiellen 16S rDNA-Sequenzen der Isolate wurden mit Sequenzen der Datenbanken RDP (Ribosomal Database Project II, <http://www.cme.msu.edu>, Maidak et al. 2000) und EMBL (European Bioinformatic Institute, <http://www.ebi.ac.uk>, Stoesser et al. 2000) verglichen. Die für die phylogenetische Analyse ausgewählten Datenbank-Sequenzen wurden mit den Sequenzen der Isolate in Übereinstimmung gebracht, wobei die Sequenzen aus der RDP-Datenbank *prealigned* mit der 16S rDNA-Sequenz von *E. coli* zur Verfügung standen. Die partiellen 16S rDNA-Sequenzen der Isolate wurden bei EMBL Nucleotide Sequence Database unter folgenden Accession Codes hinterlegt: AJ306698 (Stamm 48a), AJ306699 (Stamm 22), AJ306700 (Stamm 46), AJ306701 (Stamm 19), AJ306702 (Stamm 18), AJ306703 (Stamm SRB 14), AJ306704 (Stamm SRB 12), AJ306705 (Stamm SRB 3), AJ306706 (Stamm SRB 15), AJ306707 (Stamm SRB 7), AJ306708 (Stamm SRB 10) und AJ306709 (Stamm SRB 11). Die Accession Codes der verwendeten Datenbank-Sequenzen sind im Dendrogramm mit angegeben (siehe Abb. 3.12, 3.13 und 3.15).

Die phylogenetische Analyse und die Erstellung von Dendrogrammen erfolgte nach der *Maximum Likelihood*-Methode. Diese Methode beruht auf einem Modell, das den möglichen Evolutionsprozess beschreibt. Sie berechnet die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen evolutiven Schritte, welche benötigt werden, um den vorhandenen Sequenz-Datensatz auf eine gemeinsame Vorläufersequenz zurückzuführen (Felsenstein 1981, Swofford et al. 1996). Der phylogenetische Stammbaum (Evolutionsprozess) mit der höchsten Wahrscheinlichkeit wird akzeptiert. Die Berechnung nach der *Maximum Likelihood*-

Methode erfolgte mit dem Programm Puzzle 4.0.2 (Strimmer & Von Haeseler 1996, <http://member.tripod.de/korbi/puzzle>). Dabei wurden das Substitutionsmodell HKY85 (Hasegawa et al. 1985) angewendet. Weiterhin wurde die Optionen gewählt, einheitliche Substitutionsraten und 1000 *Puzzling Steps* anzuwenden sowie den Transition/Transversion-Parameter anhand des Datensatzes zu bestimmen. Der in dieser Analyse verwendete Algorithmus zur Stammbaumberechnung (*QP Quartet Puzzling*) bestimmt Werte, welche die Zuverlässigkeit der internen Verzweigungen angeben. Diese *Quartet Puzzling Support*-Werte sind in ihrer Aussage vergleichbar mit *Bootstrap*-Werten (siehe unten). Verzweigungen mit Werten von 90 - 100 % können als zuverlässig angesehen werden. Verzweigungen mit Werten kleiner als 50 % werden im Dendrogramm nicht dargestellt.

Zusätzlich wurden phylogenetische Analysen nach der *Neighbor Joining*-Methode (DNADIST und NEIGHBOR; Saitou & Nei 1987) und der *Maximum Parsimony*-Methode (DNAPARS; Eck & Dayhoff 1966, Fitch 1971, Kluge & Farris, 1969) unter Verwendung von PHYLIP (Phylogeny Inference Package, Felsenstein 1989, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>) durchgeführt. Die *Neighbor Joining*-Methode ist eine Distanz-Matrix-Methode, bei der die Sequenzen paarweise verglichen werden und aus den ermittelten Sequenzähnlichkeiten eine Matrix mit Distanzwerten erstellt wird. Bei der *Maximum Parsimony*-Methode wird der phylogenetische Stammbaum mit der kleinsten Anzahl an erforderlichen Mutationseignissen (evolutiven Schritten) angestrebt. Zur statistischen Absicherung der nach diesen Methoden berechneten phylogenetischen Stammbäume wurde die *Bootstrap*-Methode angewandt (DNABOOT, Felsenstein 1985). Dabei wird aus dem originalen Datensatz durch zufällige Deletionen, Verdopplungen und Verschiebungen von Sequenzabschnitten neue, unterschiedliche Datensätze (hier 100) der gleichen Größe hergestellt. Für jeden dieser neuen Datensätze wird eine neue Berechnung durchgeführt. Der *Bootstrap*-Wert gibt an, in wie vielen der berechneten phylogenetischen Stammbäume eine bestimmte Verzweigung identisch ist. Aus den 100 Bäumen wurde ein Konsensus-Baum erstellt (CONSENSE). Die Distanzwerte wurden nachträglich eingefügt (RETREE, FITCH).

## 2.5 Verwendete Chemikalien und Gase

Alle benötigten Chemikalien besaßen die Reinheitsgrade "zur Analyse" (per analysi, p.A.) oder "für Molekularbiologie" und wurden, sofern nicht extra angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Stammheim) oder Serva (Heidelberg)/Boehringer (Ingelheim) bezogen. Die Gase lieferte Messer Griesheim (Berlin).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der Sedimente der drei Untersuchungsgewässer

Zur Beschreibung der vier Standorte bzw. zur Charakterisierung der Sedimente wurden hauptsächlich die Ergebnisse der Probenahme im April 1997 herangezogen. Sie umfasst alle Standorte und ist für die beschriebenen Messparameter am vollständigsten. Für zusätzliche Daten sind die Probenahmetermine angegeben. Die Beschreibung der Sedimente bezieht sich weitestgehend auf die oberen 10 cm. Temperatur- und Sauerstoffverhältnisse in der Wasserschicht über dem Sediment während den Probenahmen im April 1997 sind in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Temperatur und Sauerstoff über dem Sediment im April 1997.

Standort	Probenahmedatum	Temperatur <sup>a</sup>	Sauerstoff <sup>a</sup>
RS 111 (10 m)	20.04.1997	5,5 °C	anoxisch
RS 111 (7 m)	21.04.1997	5,0 °C	3 mg l <sup>-1</sup>
RS 107	15.04.1997	7,5 °C	11 mg l <sup>-1</sup>
RS B	23.04.1997	7,1 °C	11,5 mg l <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> gemessen mit einer Multiparameter Sonde (Idronaut Srl., Brugherio, Italien) (Schimmele 1998).

##### 3.1.1 Allgemeine Sedimentbeschreibung

Die Sedimente in den Restseen waren durch hohe Eisengehalte und hohe Glühverluste (als ein Maß für den Gehalt an organischem Kohlenstoff) gekennzeichnet. Das Sediment in RS 111 (10 m) war in oberflächennahen Schichten (0 - 2 cm) bräunlich gefärbt mit zunehmendem Grauton in tieferen Schichten. Es traten schwarze Horizonte begleitet von H<sub>2</sub>S-Geruch auf. Die Schwarzfärbung (oft in feinen Lamellen) verschwand ab einer Tiefe von 8 cm und wurde abgelöst von einer grauen bis olivbraunen Färbung. Der Porenwassergehalt der oberen 10 cm betrug 88 - 91 Vol% (Volumenprozent). Die oberen 10 cm enthielten 10 - 35 TG% (Trockengewichtsanteil) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Friese 1998). In tieferen Sedimentschichten nahmen bei geringeren Gehalten von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, die Gehalte an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und SiO<sub>2</sub> zu. Der Glühverlust betrug 25 TG% an der Sedimentoberfläche und nahm auf 10 TG% in 10 cm Tiefe ab. Im RS 111 (7 m) wurden ähnliche Porenwassergehalte (84 - 96 Vol%) und Glühverluste (19 - 20 TG%) bestimmt. In der Färbung unterschied sich das Sediment jedoch deutlich von dem an der tiefsten Stelle (10 m) und war die oberen 10 cm ocker- bis braunfarben.

In RS 107 waren die Sedimente an der Probenahmestelle bedeckt von einer dichten Matte aus fadenförmigen, metaphytischen Algen. Die darunter liegende Sedimentschicht (bis 2 cm) war ocker- bis braunfarben und hatte einen geringen Porenwasseranteil (75 - 81 Vol%). Für diese Schicht wurden sehr hohe  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalte (bis zu 40 TG%) bestimmt (Friese 1998). Zwischen 2 und 6 cm Sedimenttiefe nahm der Porenwassergehalt bis auf 86 Vol% zu. In dieser Schicht wurden die höchsten Glühverlust-Werte (bis zu 40 TG%) gemessen und eine Schwarzfärbung durch viele kleine, schwarze Partikel (vermutlich Pflanzenreste oder Kohlepartikel) beobachtet. Unterhalb dieses "organischen" Horizonts war das Sediment graubraun gefärbt und die Glühverluste nahmen bis auf einen Wert von 12 TG% in 10 cm Sedimenttiefe ab. Mit zunehmender Tiefe nahmen die Anteile an  $\text{SiO}_2$  und  $\text{Al}_2\text{O}_3$  zu (Friese 1998) und die Porenwassergehalte auf 73 Vol% ab.

In RS B waren zwei sehr unterschiedliche Sedimentschichten vorhanden. Die obere mit einer Mächtigkeit von 7 - 9 cm bestand aus dunkelgrauem feinen Material. Der Porenwassergehalt lag bei 76 - 84 Vol% und die Hauptmineralkomponente neben  $\text{SiO}_2$  war  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Friese 1998). Die darunter liegende Schicht bestand fast aus reinem Quarzsand (> 90 TG%  $\text{SiO}_2$ ) und der Porenwassergehalt lag bei 54 Vol%. Der Glühverlust betrug in den oberen 10 cm zwischen 5 und 10 TG%.

### 3.1.2 pH-Wert und Redoxpotenzial

Die Tiefenprofile von pH-Wert und pH-korrigiertes Redoxpotenzial ( $E_{\text{h/pH}7}$ ) sind in Abb. 3.1 dargestellt. In RS 111 (10 m) war eine Zunahme des pH-Wertes mit zunehmender Sedimenttiefe von pH 3,9 bei 0 - 1 cm auf pH 6,4 bei 9 - 10 cm zu beobachten. Das Redoxpotenzial nahm mit zunehmender Tiefe ab und erreichte in den Sedimentschichten 3 - 4 cm und 5 - 6 cm negative Werte. In Sedimenten von RS 111 (7 m) nahm der pH-Wert nur geringfügig zu (von pH 2,5 auf pH 3,6). Der  $E_{\text{h/pH}7}$ -Wert nahm mit der Tiefe ab, blieb aber im positiven Bereich von 270 - 430 mV. In RS 107 wurden im Vergleich zu den anderen Standorten die kleinsten pH-Werte gemessen und es war nur eine sehr geringfügige Zunahme von pH 2,3 auf pH 2,5 in den oberen 10 cm des Sedimentes zu beobachten. Der  $E_{\text{h/pH}7}$ -Wert lag in den oberen 5 cm zwischen 350 und 410 mV und zeigte dann in der Sedimentschicht von 5 - 6 cm eine plötzliche Abnahme auf 100 mV. In tieferen Sedimentschichten stiegen die  $E_{\text{h/pH}7}$ -Werte wieder leicht an. Aufgrund des hohen Gehaltes an Quarzsand konnten in RS B pH- und  $E_{\text{h/pH}7}$ -Profile nur bis zu einer Tiefe von 7 cm gemessen werden. Der niedrigste pH-Wert von pH 6,9 wurde in der obersten Sedimentschicht gemessen, in tieferen Schichten lagen die Werte bei pH 7,2. Das Redoxpotenzial erreichte maximal 220 mV bei 0 - 1 cm und minimal 95 mV bei 4 - 5 cm Sedimenttiefe.

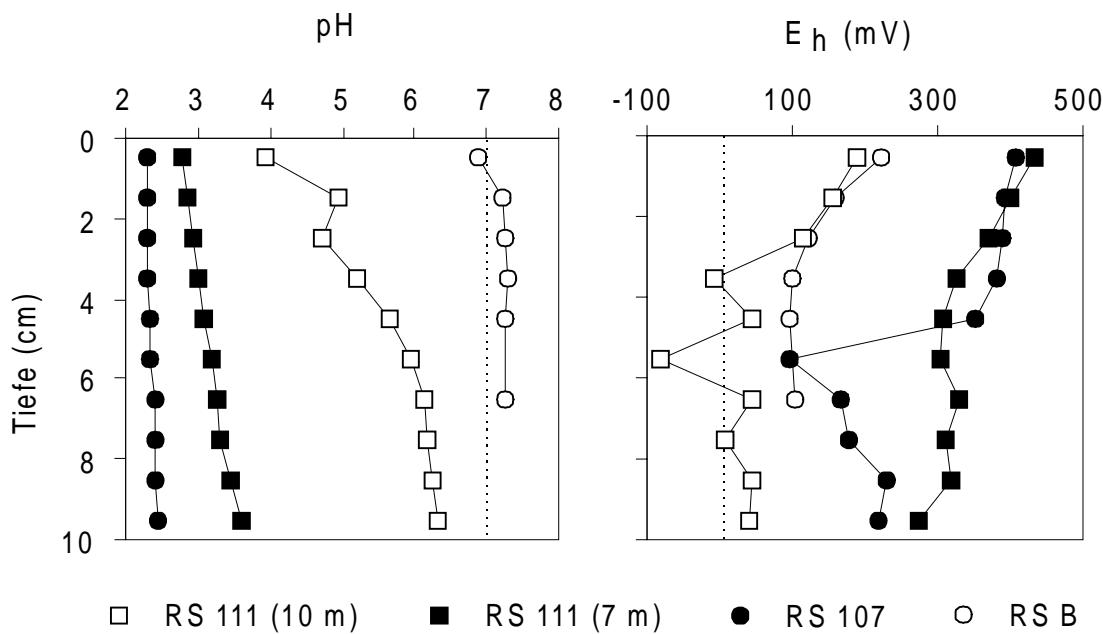


Abb. 3.1: Tiefenprofile der pH-Werte (links) und der pH-korrigierten Redoxpotenziale (rechts).

### 3.1.3 Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff im Porenwasser

Die Sulfatgehalte in den Sedimenten waren sehr hoch und insbesondere bei den sauren Restseen höher als in der Wassersäule (vergleiche Tab. 2.1). Besonders deutlich war dieser Unterschied für RS 111 (10 m). Die Profile der Sulfatkonzentrationen zeigten keine Abhängigkeit von der Sedimenttiefe (zu- oder abnehmende Tendenz mit der Tiefe) wohl aber große Konzentrationsunterschiede zwischen benachbarten Sedimentschichten. In RS 111 (10 m) lagen die Sulfatwerte bei 18 - 26 mM und in RS 111 (7 m) bei 19 - 21 mM. In RS 107 wurden die höchsten Sulfatwerte im Bereich von 25 - 32 mM gefunden. In RS B lagen die Sulfatkonzentrationen bei 4,6 - 5,3 mM.

Die Gehalte an gelöstem organischen Kohlenstoff im Porenwasser waren insbesondere in den sauren Restseen sehr hoch. In RS 111 (10 m) lagen die Werte für die oberen 10 cm bei 0,9 - 3,4 mM DOC ( $11 - 40 \text{ mg l}^{-1}$ ) und in RS 111 (7 m) bei 0,7 - 2,0 mM DOC ( $8 - 24 \text{ mg l}^{-1}$ ). In RS 107 wurden die höchsten Werte im "organischen" Horizont gemessen. Die Werte lagen im Bereich von 1,7 - 4,40 mM DOC ( $20 - 53 \text{ mg l}^{-1}$ ). In RS B wurden Werte im Bereich von 0,3 - 1,1 mM DOC ( $4 - 14 \text{ mg l}^{-1}$ ) gemessen.

### 3.1.4 Reduzierte Schwefel- und Eisenverbindungen

Die Tiefenverteilungen der reduzierten Schwefelverbindungen (säureflüchtiger Schwefel: AVS, chromreduzierbarer Schwefel: CRS bzw. elementarer Schwefel: S<sup>0</sup> und Pyritschwefel: FeS<sub>2</sub>) und der Eisenverbindungen [HCl-lösliches Eisen(II) und die Summe aus HCl-löslichem Eisen(II) und Hydroxylamin-reduzierbarem Eisen(III)] sind in Abb. 3.2 dargestellt. Die Summe von AVS und CRS ergab die Menge des gesamten reduzierten anorganischen Schwefels (TRIS).

In RS 111 (10 m) traten die höchsten Konzentrationen an reduzierten Schwefelverbindungen (18 - 47 µmol TRIS cm<sup>-3</sup>) in den Sedimenttiefen von 2 - 7 cm auf. Davon wurden 70 ± 8 % als AVS extrahiert. Nahe der Sedimentoberfläche und unterhalb des AVS-reichen Horizonts war der Gehalt an TRIS geringer und nur ein geringfügiger Teil war davon in der AVS-Fraktion enthalten. Gemittelt über die oberen 10 cm lag der AVS-Anteil bei 46 ± 27 %. Die relative Standardabweichung für die AVS-Bestimmung lag bei 36 %, wobei insbesondere in der Sedimenttiefe von 4 - 5 cm die Messwerte der Duplikate sehr stark voneinander abwichen. Die separate Extraktion von S<sup>0</sup> zeigte einen Anteil von 47 ± 21 % CRS bzw. 27 ± 18 % TRIS. Der Anteil an FeS<sub>2</sub> lag bei 28 ± 16 % TRIS. Die relative Standardabweichung für die CRS-Bestimmung lag bei 34 %. Im Gegensatz zu RS 111 (10 m) wurden in Sedimenten von RS 111 (7 m) nur sehr geringe Konzentrationen an reduzierten Schwefelverbindungen (< 2 µmol TRIS cm<sup>-3</sup>) und zwar ausschließlich in der CRS-Fraktion gefunden.

In Sedimenten von RS 107 wurden ähnlich hohe Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen (bis zu 52 µmol TRIS cm<sup>-3</sup>) wie in RS 111 (10 m) gemessen. TRIS akkumulierte hier in einem sehr schmalen Tiefenhorizont von 4 - 6 cm und bestand größtenteils (71 ± 15 %) aus FeS<sub>2</sub>. Die relativen Standardabweichungen für die Bestimmungen waren mit 77 % für AVS, 51 % für S<sup>0</sup> und 50 % für FeS<sub>2</sub> recht hoch. Große Abweichungen zwischen den Parallelen wurden insbesondere bei geringen Schwefelgehalten festgestellt.

In RS B nahm der Gehalt an reduzierten Schwefelverbindungen von der Sedimentoberfläche mit 3 µmol TRIS cm<sup>-3</sup> bis zu einer Tiefe von 5 - 6 cm auf 37 µmol TRIS cm<sup>-3</sup> zu. In den sandigen Sedimentschichten (tiefer als 7 cm) wurden nur geringe Gehalte an TRIS nachgewiesen. In TRIS-reichen Schichten lag der Anteil von AVS mit 62 ± 10 % ähnlich hoch wie in Sedimenten von RS 111 (10 m). Gemittelt über die oberen 10 cm verteilte sich TRIS auf 51 +/- 22 % AVS, 18 ± 8 % S<sup>0</sup> und 30 ± 20 % FeS<sub>2</sub>. Die relative Standardabweichung lag bei 42 % für die AVS-Bestimmung und bei 25 % für die CRS-Bestimmung.

Wie die Schwefelverbindungen, zeigten auch die Eisenverbindungen den stärker reduzierten Charakter der Sedimente in RS 111 (10 m) und RS B sowie den stärker oxidierten Charakter der Sedimente in RS 111 (7 m) und RS 107. Es ist hervorzuheben,

dass die Bestimmung von Eisen(II) und Eisen(II) + Eisen(III) an getrennten Proben durchgeführt wurde. Zur Bestimmung des amorphen bzw. mikrobiell reduzierbaren Eisen(III) wurde jeweils die Differenz zwischen den Mittelwerten gebildet. Aufgrund der Sedimentheterogenität und der dadurch bedingten hohen relativen Standardabweichungen (die jedoch kleiner als die für die Bestimmung der Schwefelverbindungen waren) führte dies unter Umständen zu negativen Werten. Daher sind absolute Werte bzw. der Nachweis von amorphen Eisen(III) bei kleinen Differenzen vorsichtig zu bewerten.

In den Sedimenten von RS 111 (10 m) wurden in den oberen 4 cm nur geringe Mengen an amorphen Eisen(III) [ $< 4 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{cm}^{-3}$ ] gefunden. Darunter folgte eine Schicht mit bis zu  $41 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{cm}^{-3}$ . Diese erhöhten Konzentrationen an amorphen Eisen(III) waren auch bei anderen Probenahmetermen (siehe Kap. 3.2.1) in dieser Sedimenttiefe zu beobachten. Für 7 - 10 cm Sedimenttiefe war kein amorphes Eisen(III) mehr nachzuweisen. Der Gesamtgehalt an extrahiertem Eisen lag an der Sedimentoberfläche bei  $12 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  und nahm bis zu einer Sedimenttiefe von 7 - 8 cm auf  $100 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  zu. In tieferen Schichten ging der Eisengehalt wieder leicht zurück. Die relative Standardabweichung lag bei 5 % für die Eisen(II)- und bei 9 % für die Eisen(II) + Eisen(III)-Bestimmung. In RS 111 (7 m) waren große Mengen an amorphen Eisen(III) [ $13 - 60 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{cm}^{-3}$ ] über die gesamten oberen 10 cm vorhanden. Der Gehalt an Eisen(II) nahm von  $11 \mu\text{mol Fe(II)} \text{cm}^{-3}$  an der Sedimentoberfläche auf  $75 \mu\text{mol Fe(II)} \text{cm}^{-3}$  in 9 - 10 cm Sedimenttiefe zu. An diesem Standort wurden die maximalen Werte für den Gesamtgehalt an extrahierten Eisen mit bis zu  $118 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  bei 9 - 10 cm gemessen. Die relative Standardabweichung lag bei 13 % für die Eisen(II)- und bei 10 % für die Eisen(II) + Eisen(III)-Bestimmung.

In den Sedimenten von RS 107 wurde ebenfalls wie in RS 111 (7 m) hohe Gehalte an amorphem Eisen(III) gefunden [ $23 - 63 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{cm}^{-3}$ ], jedoch nur bis zu einer Tiefe von 6 cm. Die Eisen(II)-Gehalte waren im Verhältnis zu den anderen Standorten mit  $8 - 24 \mu\text{mol Fe(II)} \text{cm}^{-3}$  recht gering und variierten wenig mit der Tiefe. Die relative Standardabweichung lag bei 24 % für die Eisen(II)- und bei 34 % für die Eisen(II) + Eisen(III)-Bestimmung.

In den Sedimenten von RS B wurden nur geringe Werte an amorphen Eisen(III) nachgewiesen mit maximalen Werten von  $14 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{cm}^{-3}$  an der Sedimentoberfläche. Das gesamte extrahierte Eisen lag vorwiegend als Eisen(II) vor und erreichte im Gegensatz zu den Standorten in RS 111 höchste Konzentrationen ( $79 - 99 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ ) in den oberen Sedimentschichten. Der Eisengehalt nahm mit zunehmender Tiefe ab und betrug  $28 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  in 9 - 10 cm Sedimenttiefe. Die relative Standardabweichung lag bei 11 % für die Eisen(II)- und bei 16 % für die Eisen(II) + Eisen(III)-Bestimmung.

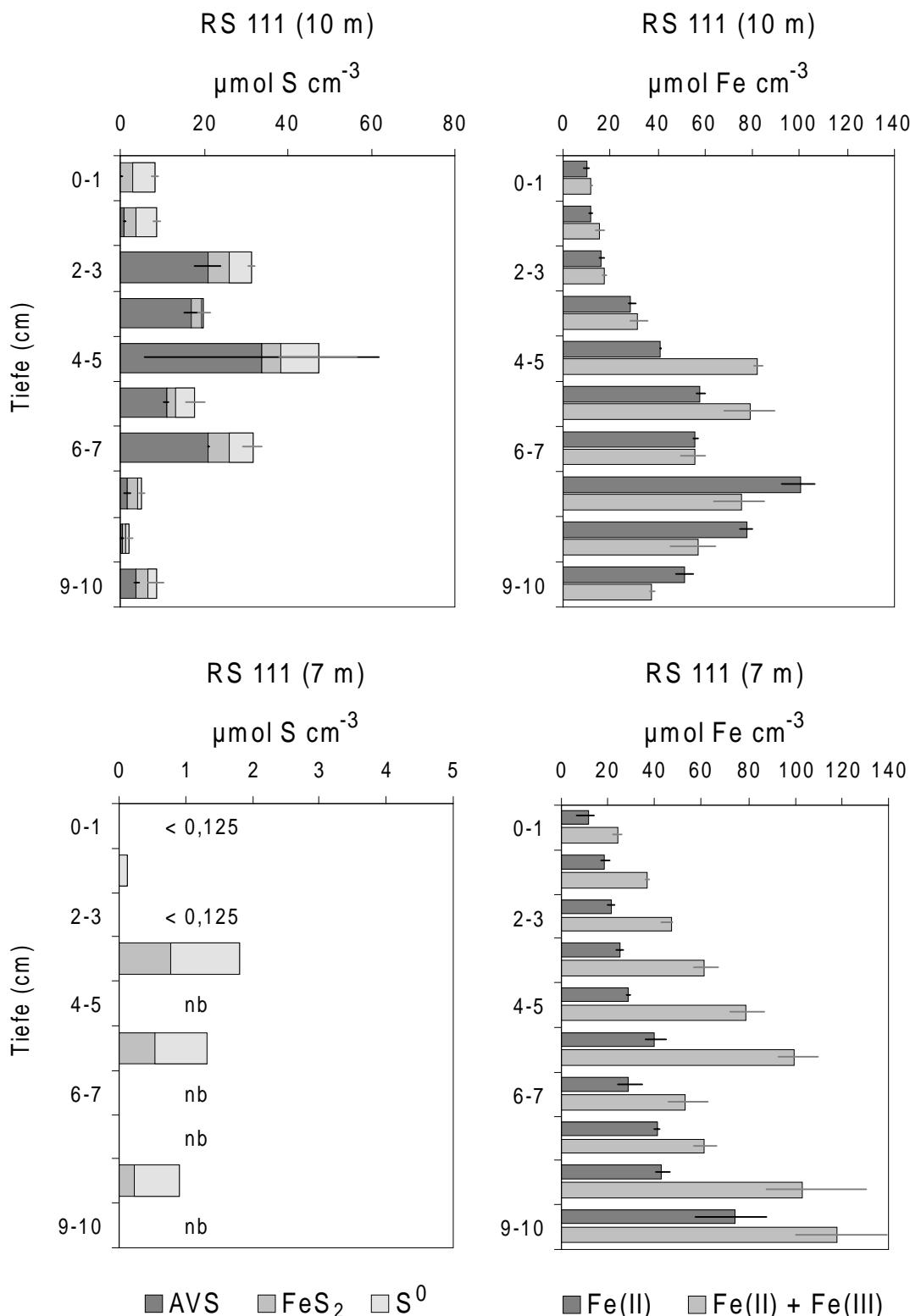


Abb. 3.2: Tiefenverteilung der reduzierten Schwefelverbindungen (links) und Eisenverbindungen (rechts). Säureflüchtiger Schwefel (AVS) und chromreduzierbarer Schwefel (CRS) wurden in zwei Parallelen [in RS 111 (7 m) einfach] bestimmt. Elementarer Schwefel (S<sup>0</sup>) wurde aus dem prozentualen Anteil (bestimmt an einer Parallelle, in RS 107 an beiden Parallelen) des gemittelten CRS-Wertes berechnet. FeS<sub>2</sub> entspricht der Differenz von CRS und S<sup>0</sup>. (Fehler)Balken geben die beiden Messwerte der AVS- und CRS-Bestimmungen an.

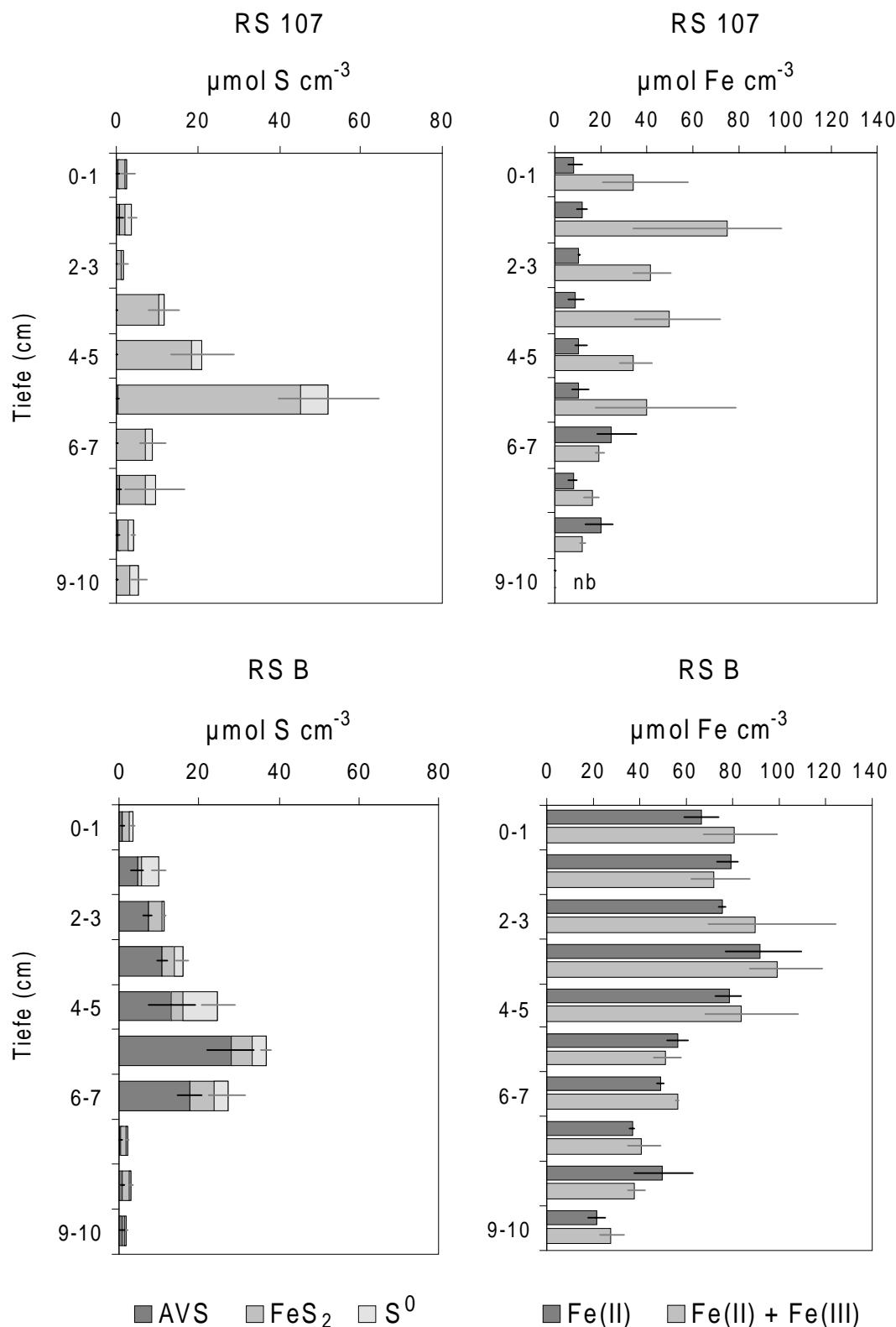


Abb. 3.2 (Fortsetzung): Eisen(II) [HCl-lösliches Fe(II)] und Eisen(II) + Eisen(III) [Summe aus HCl-löslichem Fe(II) und Hydroxylamin-reduzierbarem Fe(III)] wurden in drei Parallelen gemessen. (Fehler)Balken geben minimalen und maximalen Messwert der Eisen(II)- und Eisen(II) + Eisen(III)-Bestimmungen an. nb: nicht bestimmt.

### 3.1.5 Sulfatreduktion und der Einfluss organischer Substrate

Sulfatreduktion mittels der Radiotracer-Technik konnte nur für die Standorte RS 111 (10 m) und RS B bestimmt werden (Abb. 3.3). Auch nach Herabsetzung der Nachweisgrenze auf 0,3 nmol SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> cm<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (durch verlängerte Inkubationszeiten und erhöhte Zugaben an Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub>) konnte weder in RS 111 (7 m) noch in RS 107 eine Sulfatreduktion nachgewiesen werden. In RS 111 (10 m) lagen die Sulfatreduktionsraten (SRR) in den oberen 10 cm des Sediments unter 10 nmol SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> cm<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> und zeigten bezüglich ihrer absoluten Werte keine Abhängigkeit mit der Sedimenttiefe. In TRIS-reichen Horizonten (vergleiche Abb. 3.2) wurde der reduzierte <sup>35</sup>S-Schwefel vorwiegend in der AVS-Fraktion gewonnen (Abb. 3.3). In RS B waren die SRR um den Faktor 10 höher als in RS 111 (10 m) und erreichten maximale Werte in 4 - 5 cm Sedimenttiefe. Geringere SRR wurden an der Sedimentoberfläche sowie in den sandhaltigen Schichten bei 7 - 10 cm gemessen. Der reduzierte <sup>35</sup>S-Schwefel wurde vorwiegend aus der AVS-Fraktion extrahiert. Aus oberflächennahen Schichten (0 - 2 cm) wurde der reduzierte <sup>35</sup>S-Schwefel größtenteils als elementarer Schwefel extrahiert. Weniger als 9 % wurden in der FeS<sub>2</sub>-Fraktion wiedergefunden.

In Sedimenten von RS 111 (10 m) wurde die Stimulierung der SRR durch die Zugabe von organischen Substraten getestet (Tab. 3.2). Bei der Zugabe von Pyruvat, Lactat und Acetat wurden im Vergleich zur Kontrolle (ohne Stroh und ohne Substrat) nach vier Wochen höhere SRR und höhere AVS-Gehalte bestimmt. In dem Ansatz mit Ethanol lagen die SRR unterhalb der der Kontrolle trotz höherer AVS-Gehalte. In den Ansätzen mit Glucose und Succinat lagen die SRR und die AVS-Gehalte unterhalb der der Kontrolle.

Tab. 3.2: Sulfatreduktionsraten (SRR) und Gehalte an säureflüchtigen Schwefel (AVS) in Sedimenten von RS 111 (10 m) nach vierwöchiger Inkubation mit verschiedenen organischen Substraten. Serie 1 in drei (Sedimentproben von September 1996) und Serie 2 in zwei (Sedimentproben von Oktober 1996) Parallelens. Angegeben sind die Mittelwerte (minimale und maximale Messwerte in Klammern).

	Substrat	SRR (nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	AVS (μmol S cm <sup>-3</sup> )
Serie 1	30 mM Pyruvat	1219 (889/1443)	6,25 (3,63/10,03)
	30 mM Glucose	1,2 (<</3,6)	1,28 (0,28/2,09)
	30 mM Succinat	1,7 (0,7/3,5)	0,25 (0,06/0,41)
	Kontrolle <sup>a</sup>	69,0 (61,3/82,6)	1,59 (1,38/1,78)
Serie 2	30mM Lactat	69,8 (19,2/120,4)	3,13 (1,94/3,78)
	30mM Ethanol	12,1 (6,8/17,4)	1,41 (1,00/1,81)
	30 mM Acetat	234 (197/270)	2,59 (1,59/3,50)
	Kontrolle <sup>a</sup>	27,7 (15,7/39,7)	0,04 (0,00/0,06)

<sup>a</sup> Ansatz ohne Stroh und ohne Substrat  
<< unterhalb der Nachweisgrenze

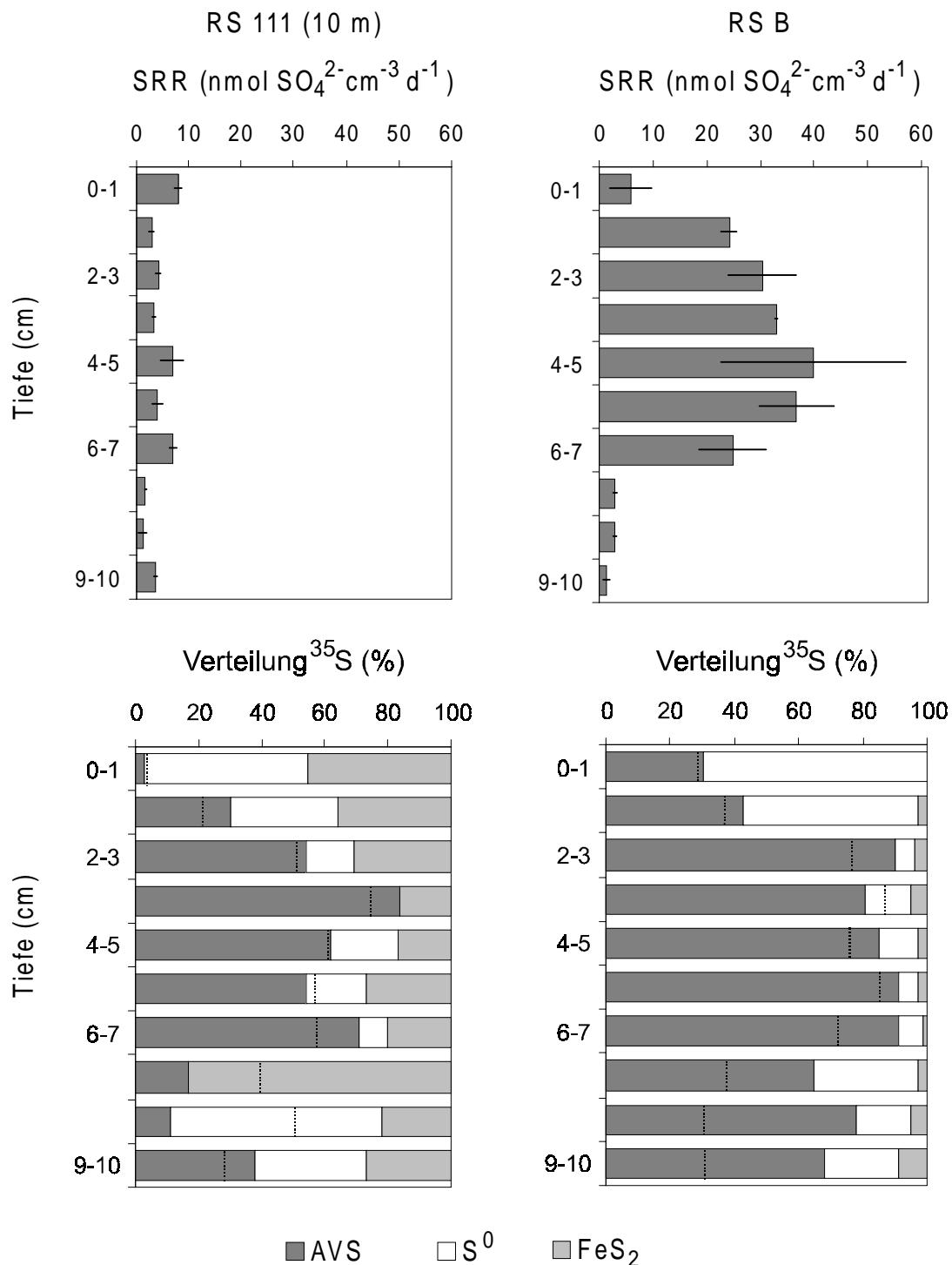


Abb. 3.3: Sulfat reduktionsraten (oben) und Verteilung des reduzierten  $^{35}\text{S}$ -Schwefels in den drei Fraktionen säureflüchtiger Schwefel (AVS), elementarer Schwefel ( $\text{S}^0$ ) und Pyrit-Schwefel (unten) in RS 111 (10 m) (links) und RS B (rechts). Für SRR sind die Mittelwerte dargestellt. (Fehler)Balken geben die beiden Messwerte an. Die Verteilung des  $^{35}\text{S}$ -Schwefels in Prozent ist nur für eine Parallelle dargestellt (gestrichelte Linie gibt Prozentanteil von AVS in der anderen Parallelle an).

### 3.1.6 Zellzahlen kultivierbarer schwefel- und eisenoxidierender und sulfatreduzierender Bakterien

Zum Vergleich von neutralen und sauren Medien zur MPN-Bestimmung von schwefeloxidierenden Bakterien (SOB) und sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) in den Sedimenten wurden Greifer-Proben von RS 111 (10 m), RS 107 und RS B genommen (Tab. 3.3). In RS 111 (10 m) und RS 107 erreichten MPN-Bestimmungen von SOB in sauren Medien um den Faktor  $10^4$  bis  $10^5$  höhere Zellzahlen als in neutralen Medien. Entsprechend wurden in Sedimenten von RS B höhere Zellzahlen im neutralen als im sauren Medium erzielt. Dahingegen wurde bei der MPN-Bestimmung von SRB an allen drei Standorten jeweils höhere Zellzahlen im neutralen Medium erreicht. Geringes Wachstum in sauren Medien wurde lediglich in Sedimenten von RS 111 (10 m) beobachtet. Zur Aufnahme von Tiefenprofilen von MPN-Werten für die verschiedenen Bakteriengruppen wurden für SOB das für den Standort jeweils optimale Medium gewählt und für SRB an allen Standorten das neutrale Medium verwendet.

Tab. 3.3: Zellzahlen in neutralen und sauren Medien von 1) schwefeloxidierende Bakterien (SOB): Thiosulfatmedium bei pH 7 und pH 4,5 (Sedimentproben von Mai 1996) und von 2) sulfatreduzierenden Bakterien (SRB): Medium mit Lactat und Acetat (je 5 mM) bei pH 7 und Medium mit Lactat und Acetat<sup>a</sup> (je 5 mM) oder Glycerin<sup>b</sup> (10 mM) bei pH 3 (Sedimentproben von Oktober/November 1995). Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben.

	SOB		SRB	
	pH <sub>Medium</sub>	MPN (Zellen cm <sup>-3</sup> )	pH <sub>Medium</sub>	MPN (Zellen cm <sup>-3</sup> )
RS B	pH 7	$1,75 (0,87/4,84) \cdot 10^6$	pH 7	$1,42 (0,75/3,06) \cdot 10^4$
	pH 4,5	$1,51 (0,72/3,92) \cdot 10^4$	pH 3	<< <sup>ab</sup>
RS 111 (10 m)	pH 7	65 (31/139)	pH 7	$0,48 (0,26/1,01) \cdot 10^4$
	pH 4,5	$2,29 (1,21/6,56) \cdot 10^6$	pH 3	$20 (4/46)^a; 72 (35/149)^b$
RS 107	pH 7	120 (64/265)	pH 7	$0,15 (0,08/0,32) \cdot 10^4$
	pH 4,5	$7,45 (2,98/16,2) \cdot 10^6$	pH 3	<< <sup>ab</sup>

<< kein Wachstum

An allen vier Standorten wurden sehr hohe MPN-Werte für SOB mit den höchsten Zellzahlen an der Sedimentoberfläche bestimmt (Abb. 3.4). In Sedimenten von RS 111 (10 m) nahmen die Zellzahlen von maximal  $1,9 \cdot 10^7$  Zellen cm<sup>-3</sup> in 0 - 2 cm auf  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen cm<sup>-3</sup> in 8 - 9 cm Sedimenttiefe ab. In RS 111 (7 m) nahmen die MPN-Werte der SOB ebenfalls mit der Tiefe ab, jedoch nicht so stark: bei einer Sedimenttiefe von 3 - 4 cm wurden noch  $1,3 \cdot 10^6$  Zellen cm<sup>-3</sup> im Vergleich zu  $2,8 \cdot 10^4$  Zellen cm<sup>-3</sup> in RS 111 (10 m) bestimmt. Dieser Unterschied war auch bei den Proben von August 1997 zu beobachten. In RS 107 waren die Zellzahlen der SOB an der Sedimentoberfläche geringer ( $1,8 \cdot 10^6$  Zellen cm<sup>-3</sup>) als in den

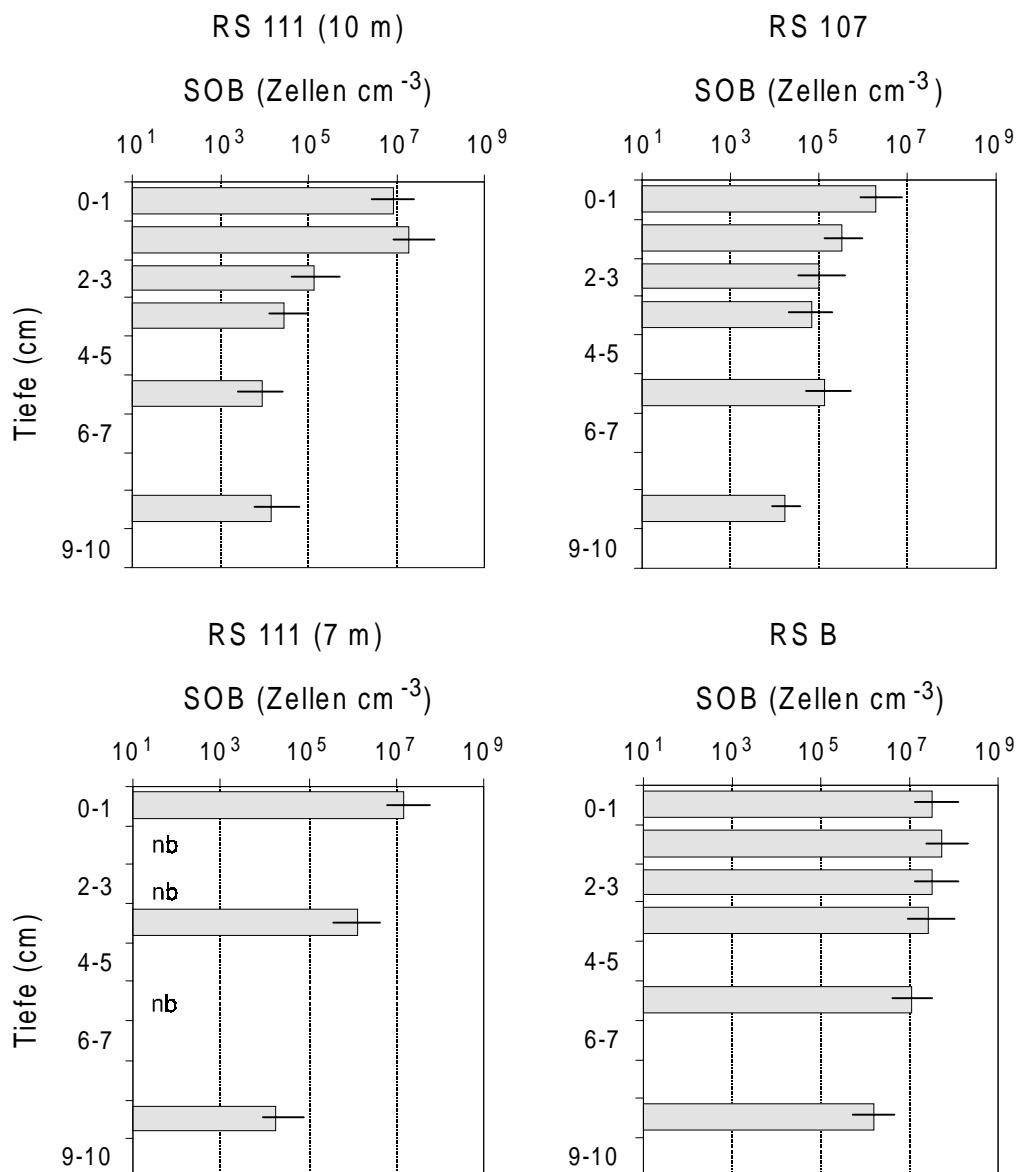


Abb. 3.4: Zellzahlen (MPN-Werte) der schwefeloxidierenden Bakterien (SOB) in Thiosulfatmedium für sechs Sedimenthorizonte. Der pH-Wert des Mediums: pH 4,5 für Sedimentproben aus RS 111 (10 m) und (7 m) sowie RS 107, und pH 7 für Sedimentproben aus RS B. Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind durch die Fehlerbalken angegeben.

Sedimenten von RS 111, nahmen jedoch ebenfalls mit zunehmender Sedimenttiefe ab. In RS B wurden die höchsten MPN-Werte für SOB bestimmt ( $5,1 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$ ). Die Zellzahlen nahmen nur geringfügig mit der Tiefe ab. In einer Sedimenttiefe von 5 - 6 cm wurden noch  $1,1 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  und bei 8 - 9 cm  $1,6 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  bestimmt. Die MPN-Werte der eisenoxidierenden Bakterien (FeOB) (Abb. 3.5) in den Sedimenten der sauren Seen ergaben hinsichtlich der Größenordnung und der Tiefenverteilung ein ähnliches Bild wie das für die MPN-Werte der SOB. In RS 111 (7 m) und RS 107 waren die Zellzahlen der FeOB etwas geringer als die der SOB. In RS B waren die Zellzahlen der FeOB (in saurem Medium) erwartungsgemäß gering ( $2,4 - 11 \cdot 10^3$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$ ).

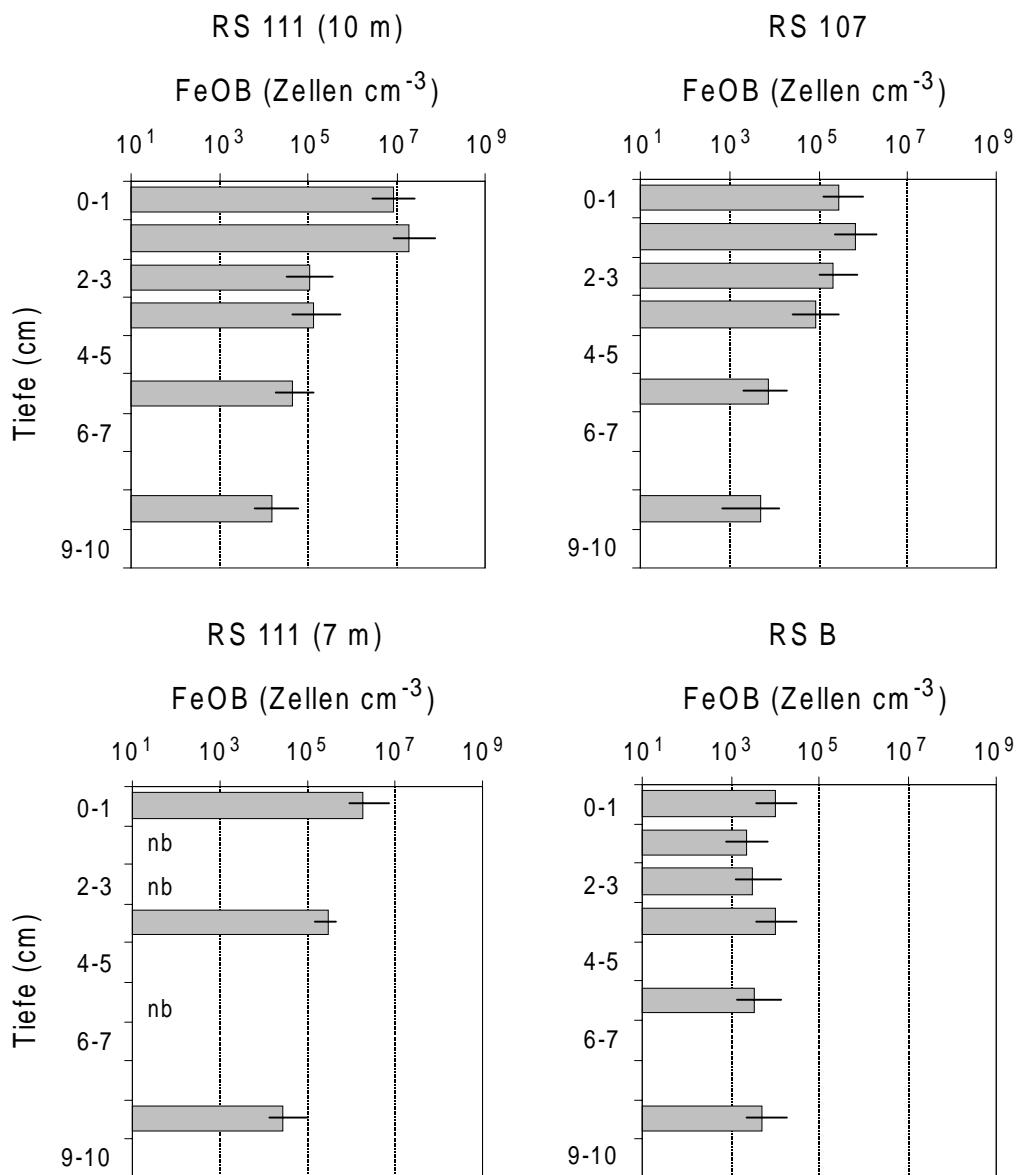


Abb. 3.5: Zellzahlen (MPN-Werte) der eisenoxidierenden Bakterien (FeOB) in saurem Medium für sechs Sedimenthorizonte. Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind durch die Fehlerbalken angegeben.

Die MPN-Zählungen der SRB (Abb. 3.6) ergaben für die gesamten oberen 10 cm des Sediments in den sauren Restseen sehr geringe Zellzahlen. In RS 111 (10 m) wurden MPN-Werte von  $1,2 - 6,2 \cdot 10^3$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  erreicht, in RS 111 (7 m) und RS 107 lagen sie unter  $10^3$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$ . In RS B wurden dagegen sehr hohe Zellzahlen für SRB gefunden mit einem Maximum von  $2,1 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  in 2 - 3 cm Sedimenttiefe. Noch weniger als bei der Tiefenverteilung der SOB zeigte sich eine abnehmende Tendenz der Zellzahl mit der Tiefe. Im August 1997 wurden nochmals für alle vier Standorte in zwei Sedimenthorizonten MPN-Bestimmungen von SRB in neutralen und in sauren ( $\text{FeSO}_4/\text{pH } 3$ ) Medien verglichen (Abb. 3.7). Wiederum zeigte sich, dass in fast allen Proben, mit Ausnahme von RS 107 in

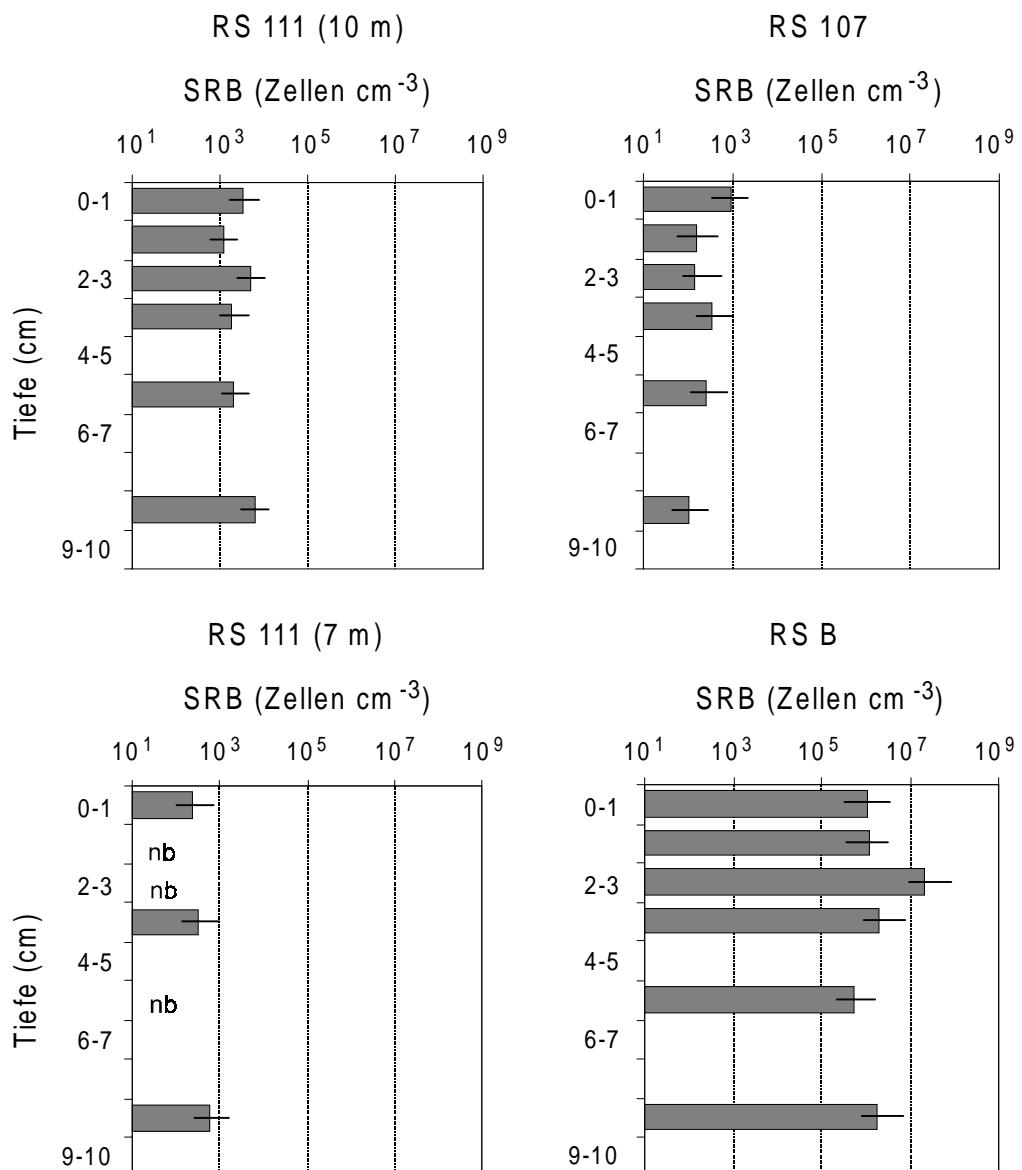


Abb. 3.6: Zellzahlen (MPN-Werte) der sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) in neutralem Medium für sechs Sedimenthorizonte. Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind durch die Fehlerbalken angegeben.

0 - 1 cm Sedimenttiefe, das neutrale Medium höhere Zellzahlen als das saure Medium erzielte. Im Gegensatz zu den anderen sauren Medien (vergleiche Tab. 3.3) wurde aber im FeSO<sub>4</sub>/pH 3-Medium Wachstum sulfatreduzierender Bakterien aus Sedimenten aller vier Standorte beobachtet. In den sauren Restseen waren zudem die Unterschiede zwischen den MPN-Werten im FeSO<sub>4</sub>/pH 3-Medium und denen im neutralen Medium sehr gering (z. B. RS 107).

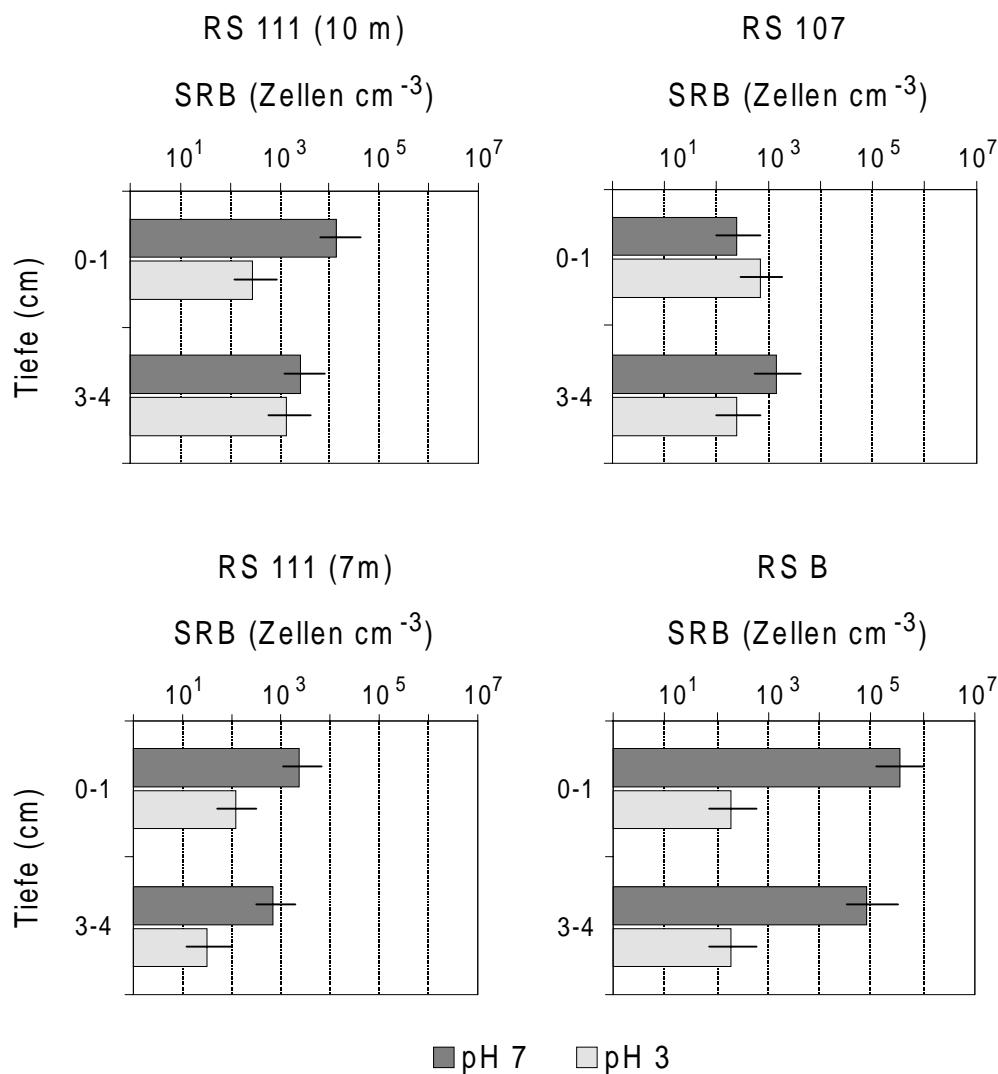


Abb. 3.7: Zellzahlen (MPN-Werte) der sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) in  $MgSO_4/\text{pH } 7$  Medium und in  $FeSO_4/\text{pH } 3$ -Medium in zwei Sedimenthorizonten (Sedimentproben von August 1997). Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind durch die Fehlerbalken angegeben.

### 3.2 Vergleich der Sedimente zu verschiedenen Probenahmetermen

Die Hauptkampagnen für Sedimentprobenahmen waren zeitlich so gewählt, dass sie im Frühjahr zur Vollzirkulation und im Spätsommer zum Ende der Sommerstagnation stattfanden. Dies war mit dem Ziel verbunden, saisonale Unterschiede (z. B. hinsichtlich der Temperatur oder des Sauerstoffgehalts) zu untersuchen. Für die Probenahmen im April 1997 und August 1997 liegen für alle vier Standorte Daten vor. Der Vergleich der Temperatur- und Sauerstoffwerte der Wasserschicht über dem Sediment ließ keine deutlichen Unterschiede zwischen den Probenahmen von April 1997 und August 1997 erkennen (siehe Tab. 3.1 und Tab. 7.1 im Anhang 7.1). Außer in RS 107, wo die Temperatur im August um 8,4 °C höher lag als im April, nahm sie an den anderen Standorten nur um 0,5 - 2,5 °C zu. Wie im April herrschten im August in RS 111 (10 m) anoxische und an den anderen Stand-

orten oxische Verhältnisse über dem Sediment. Im folgenden werden für zwei Parameter, die reduzierten anorganischen Schwefelverbindungen an allen vier Standorten (Abb. 3.8) und die Sulfatkonzentration im Porenwasser von RS B (Abb. 3.9), die Ergebnisse von verschiedenen Probenahmen in zeitlicher Reihenfolge dargestellt und die Veränderungen unter Berücksichtigung der anderen Messparameter kurz erläutert. Die hier erwähnten Daten sind im Anhang 7.1 tabellarisch zusammengefasst.

In den Sedimenten von RS 111 (10 m) liegen im Jahr 1996 die maximalen Werte für reduzierte Schwefelverbindungen bei  $16 \mu\text{mol S cm}^{-3}$  im Mai und bei  $15 \mu\text{mol S cm}^{-3}$  im August (siehe Abb. 3.8). Größenordnung und Tiefenverteilung der Schwefelverbindungen ist für die beiden Monate sehr ähnlich, außer dass im August 1996 AVS auch in den oberen 3 cm des Sediments nachgewiesen wurde. Für Mai 1996 liegen keine Daten zur SRR-Bestimmung vor und im August 1996 lagen die Raten unterhalb der Nachweisgrenze von  $5 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Im Jahr 1997 wurden im April sehr hohe Gehalte und im August sehr geringe Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen (maximal  $8 \mu\text{mol S cm}^{-3}$ ) bestimmt (siehe Abb. 3.8). Im August 1997 wurden lediglich in den Sedimenthorizonten 2 - 3 cm, 3 - 4 cm und 8 - 9 cm sulfatreduzierende Aktivitäten nachgewiesen. Die SRR lagen jedoch mit Werten von  $0,7 - 9,9 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$  in der gleichen Größenordnung wie im April 1997. Auch die  $E_h$ -Werte von August 1997 entsprachen denen von April 1997. Die pH-Werte von August 1997 waren insgesamt etwas geringer als im April 1997 und reichten von pH 2,5 bei 0 - 1 cm bis pH 5,6 bei 9 - 10 cm. Bei den Eisenverbindungen waren die Ergebnisse von August 1997 ebenfalls mit denen von April 1997 vergleichbar. Der Gesamtgehalt an extrahiertem Eisen nahm mit der Tiefe zu und erreichte einen maximalen Wert von  $112 \mu\text{mol Fe cm}^{-3}$  in einer Tiefe von 7 - 8 cm. In den oberen 4 cm war amorphes Eisen(III) nicht oder kaum nachweisbar und erreichte einen maximalen Wert von  $48 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{ cm}^{-3}$  in 5 - 6 cm. Im Gegensatz zu den Sedimenten im April 1997 wurde amorphes Eisen(III) auch unterhalb dieses Maximums in der Sedimentschicht von 6 - 10 cm gefunden. Anhand der MPN-Werte von SOB, FeOB und SRB ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Terminen im Jahr 1997 feststellen.

In den Sedimenten von RS 111 (7 m) wurden im August 1997 ähnlich wie im April 1997 sehr geringe Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen (Abb. 3.8) und keine sulfatreduzierenden Aktivitäten nachgewiesen.  $E_h$ - und pH-Werte zeigten für August 1997 den gleichen Verlauf wie im April 1997. Die Bestimmungen der Eisenverbindungen zeigten hingegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Probenahmeterminen. Die Gehalte an HCl-löslichem Eisen(II) nahmen im August 1997 wie im April 1997 mit der Tiefe zu, erreichten jedoch im August 1997 lediglich Maximalwerte von  $19 \mu\text{mol Fe (II)} \text{ cm}^{-3}$  in einer Tiefe von 8 - 10 cm. Die Gehalte an amorphen Eisen(III) erreichten im August 1997 maximale Werte von nur  $23 - 35 \mu\text{mol Fe(III)}_{\text{am}} \text{ cm}^{-3}$  in der Sedimentschicht von 0 - 3 cm und

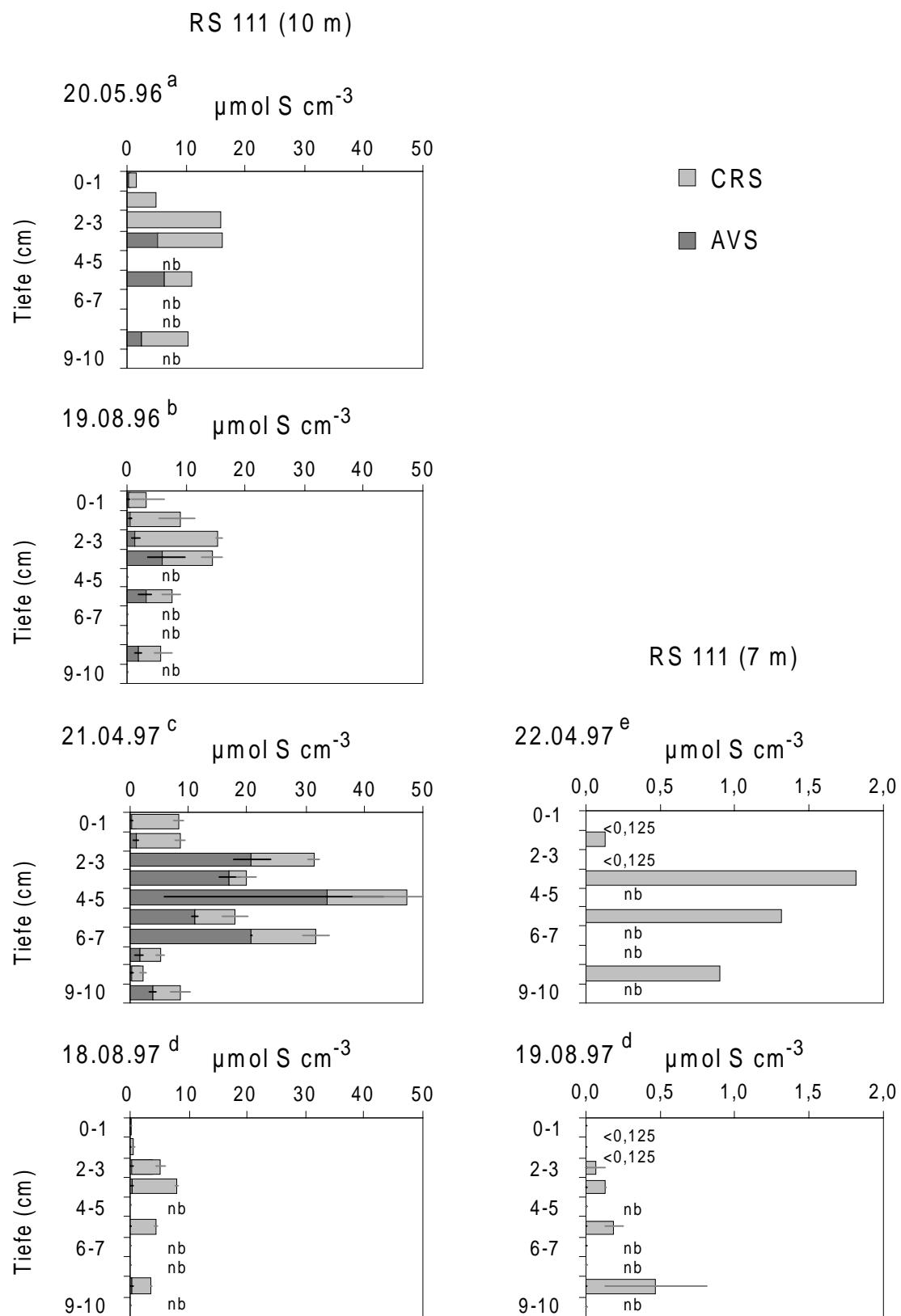


Abb. 3.8: Reduzierte Schwefelverbindungen bestimmt an verschiedenen Probenahmeterminen. Es sind jeweils die Mittelwerte von säureflüchtigem Schwefel (AVS) und chromreduzierbarem Schwefel (CRS) dargestellt. (Fehler)Balken geben minimalen und maximalen Messwert an.

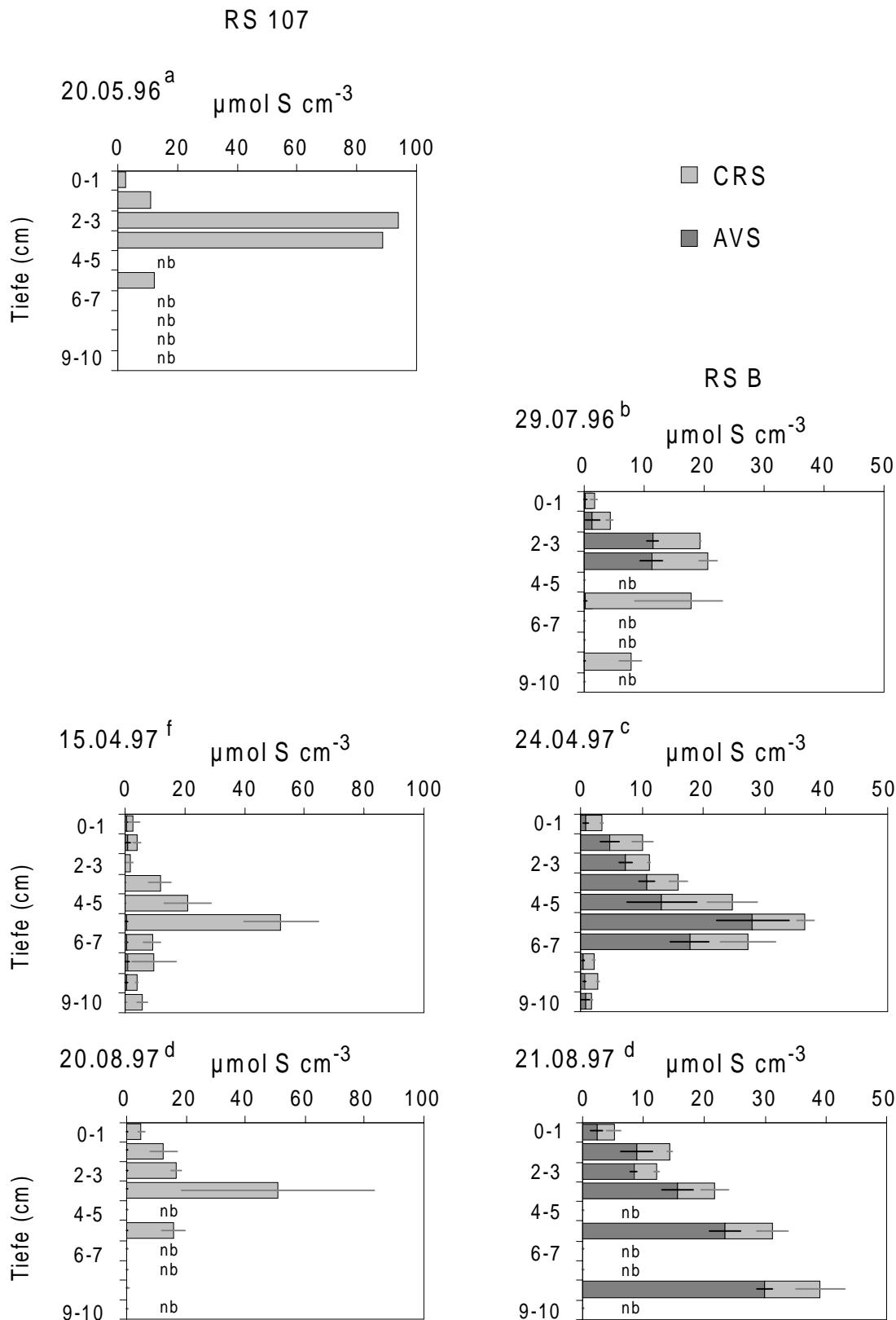


Abb. 3.8 (Fortsetzung): <sup>a</sup> ein Messwert, <sup>b</sup> drei Parallelen, <sup>c</sup> zwei Parallelen (ein CRS-Messwert setzt sich zusammen aus  $S^0$  und  $\text{FeS}_2$ ), <sup>d</sup> zwei Parallelen, <sup>e</sup> ein Messwert (CRS setzt sich zusammen aus  $S^0$  und  $\text{FeS}_2$ ), <sup>f</sup> zwei Parallelen (CRS setzt sich zusammen aus  $S^0$  und  $\text{FeS}_2$ ).

nahmen im Gegensatz zu den Werten im April 1997 mit der Tiefe ab. MPN-Werte von SOB, FeOB und SRB zeigten wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Probenahmeterminen.

Die Sedimente von RS 107 waren gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an CRS, welcher wenige Zentimeter unter der Sedimentoberfläche sein Maximum erreichte (Abb. 3.8). Dieses Maximum war bei allen drei Probenahmeterminen zu beobachten. Im Mai 1996 waren die Gehalte höher als in April 1997 und August 1997, jedoch lagen die Unterschiede bedingt durch die Heterogenität des Sediments innerhalb der Schwankungsbreite paralleler Proben (bis 51 % relative Standardabweichung bei der CRS-Bestimmung). Für die beiden Probenahmen im Jahr 1997 wurden auch hinsichtlich der anderen Parameter (SRR, E<sub>h</sub>- und pH-Werte, Eisenverbindungen, MPN-Werte) keine bemerkenswerte Unterschiede festgestellt, mit der Ausnahme dass im August 1997 bei 0 - 1 cm Sedimenttiefe sehr hohe Werte für amorphes Eisen(III) [160 µmol Fe(III)<sub>am</sub> cm<sup>-3</sup>] gemessen wurden.

In RS B wurde im Jahr 1997 im Vergleich zu Juli 1996 eine Zunahme des AVS festgestellt (Abb. 3.8). Im August 1997 nahm der Gehalt an reduzierten Schwefelverbindungen mit der Tiefe zu und erreichte bei 8 - 9 cm ein Maximum von 39 µmol S cm<sup>-3</sup>. In diesem Sedimentkern wurden in den oberen 10 cm im Gegensatz zu dem von April 1997 keine sandigen Schichten beobachtet. Die SRR für Juli 1996, April und August 1997 (und auch Juni 1998) lagen in der gleichen Größenordnung mit maximalen Werten von 50 - 100 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> nmol cm<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Die E<sub>h</sub>-Werte von August 1997 waren wie im April 1997 positiv und lagen im Bereich von 50 - 125 mV. Die pH-Werte von August 1997 lagen unter pH 7 mit den kleinsten pH-Werten von pH 6,7 bei einer Tiefe von 8 - 10 cm. Die Eisenverbindungen zeigten für die beiden Termine im Jahr 1997 ebenfalls Unterschiede. Für HCl-lösliches Eisen(II) wurden im August 1997 im Gegensatz zu April 1997 die kleinsten Werte (35 - 50 µmol Fe(II) cm<sup>-3</sup>) an der Sedimentoberfläche (0 - 2 cm) gemessen und hohe Gehalte (66 - 91 µmol Fe(II) cm<sup>-3</sup>) bis zu 10 cm Sedimenttiefe nachgewiesen. Amorphes Eisen(III) lag im August 1997 in höheren Konzentrationen (3 - 25 µmol Fe(III)<sub>am</sub> cm<sup>-3</sup>) als im April 1997 vor. Die MPN-Werte für SRB und SOB waren für die drei Termine vergleichbar bis auf den Unterschied, dass im Juli 1996 noch eine deutliche Abnahme (Faktor 100) der Zellzahl für beide Gruppen mit zunehmender Sedimenttiefe zu beobachten war.

Für RS B sind in Abb. 3.9 die Profile der Sulfatkonzentrationen im Porenwasser von vier Probenahmeterminen dargestellt. Während im Juli 1996 und im April 1997 keine und im August 1997 nur im oberen Bereich eine abnehmende Tendenz der Konzentrationen mit zunehmender Sedimenttiefe zu beobachten war, wurde im Juni 1998 eine Abnahme von 4,2 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in 0 - 1 cm auf 3,0 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in 6 - 7 cm verzeichnet. Zudem nahm insgesamt der Gehalt an Sulfat im Porenwasser über einen Zeitraum von zwei Jahren von 4,7 - 5,7 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auf 3,0 - 4,2 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ab.

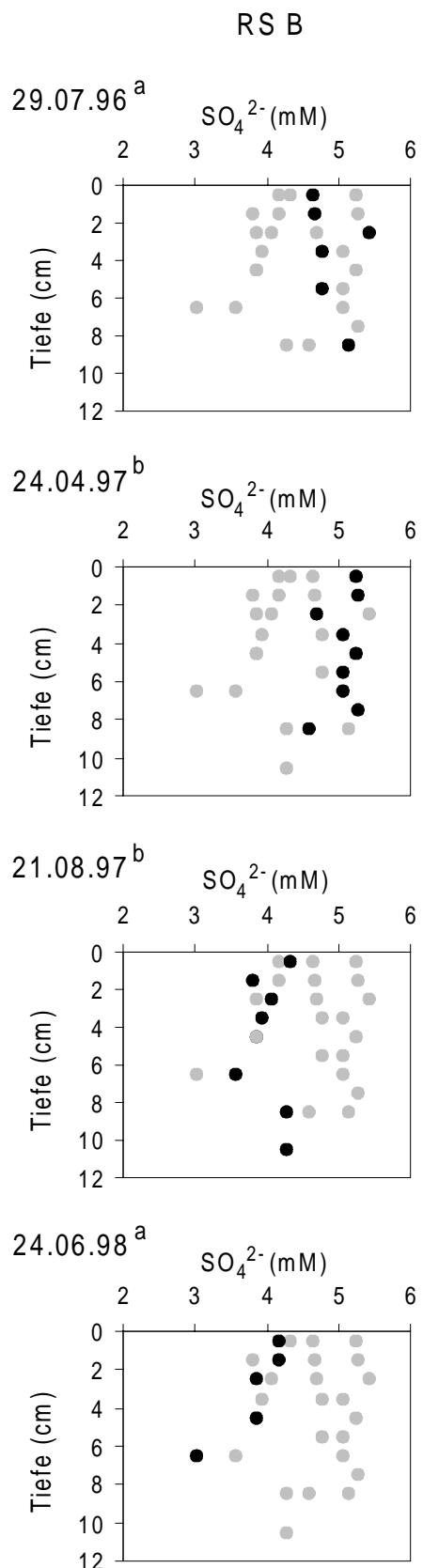


Abb. 3.9: Tiefenprofile des Sulfats im Porenwasser von Sedimenten in Restsee B an verschiedenen Probenahmeterminen. <sup>a</sup> turbidometrische Bestimmung, <sup>b</sup> ionenchromatographische Bestimmung.

### 3.3 Charakterisierung der isolierten Reinkulturen

#### 3.3.1 Schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme

Aus den Sedimenten der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, wurden auf den oxisch inkubierten Doppelschicht-Agaroseplatten bei pH 2,5 mit Eisen(II), elementaren Schwefel und Tetrathionat als Elektronendonatoren 22 Stämme isoliert und charakterisiert. Eine Übersicht über die Isolate und die Isolierungsbedingungen sind in Tab. 3.4 und Tab. 3.5 dargestellt. Während der gesamten Isolierungsversuche trat in zwei Fällen, jeweils auf Agaroseplatten mit nur Eisen(II) als Elektronendonator, eine Kontamination durch den heterotrophen Stamm "*Acidiphilum cryptum*" SJH auf.

#### Morphologie und Physiologie

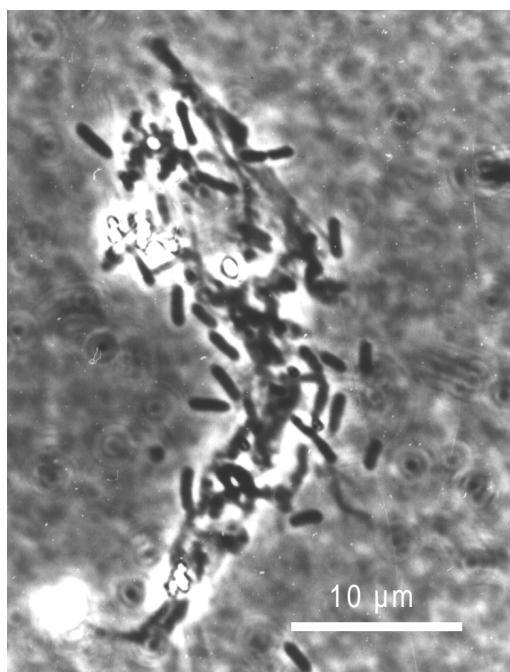


Abb. 3.10:  
Phasenkontrastaufnahme von  
Stamm 32. Autotropes schwefel-  
und eisen-oxidierendes Bakterium  
(*Acidithiobacillus ferrooxidans*-  
Gruppe).

Die Isolate ließen sich, aufgrund ihrer Eigenschaften chemolithoautotroph oder chemoorganoheterotroph zu wachsen, in zwei Gruppen unterteilen. Die sechzehn Stämme, welche chemolithoautotroph wuchsen, wurden aus verschiedenen Sedimenttiefen von RS 111 (10 m) und (7 m) sowie RS 107 isoliert (Tab. 3.4). Fast alle Stämme wuchsen sowohl auf Eisen(II) als auch auf elementarem Schwefel (*Flowable Sulfur*) in Abwesenheit einer organischen Kohlenstoffquelle. Eine Ausnahme bildete Stamm 36, der auch nach wiederholtem Überimpfen kein Wachstum mit elementarem Schwefel zeigte. Keiner der Stämme wuchs auf Glucose. Die Stämme 14, 23a, 24b, 29a und 38 wurden auf ihre Fähigkeit, Eisen(III) in Anwesenheit von Kohlendioxid und elementarem Schwefel zu reduzieren, getestet. Bei allen fünf Stämmen war das zugesetzte Eisen(III) innerhalb von wenigen Tagen reduziert.

Der Kolonietyp hing vorwiegend vom Kulturmedium ab. Auf Agaroseplatten mit reduzierten Schwefelverbindungen waren die Kolonien oft farblos und bei größerer Koloniendichte orange bis dunkelbraun. Große Kolonien zeigten ein rostfarbenes Zentrum mit einem weiß-gelben Rand. Auf Agaroseplatten mit nur Eisen(II) bildeten sich aufgrund des Niederschlags von Eisen(III) sehr feste Kolonien, welche tief in die Agarose hineinragten. In allen Stamm-

kulturen entsprach der Zelltyp einem Kurzstäbchen mit einer Länge von 1 - 3 µm. Die Zellen waren häufig assoziiert mit Eisen(III)-Kristallen (Abb. 3.10). DAPI (4',6-Diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid)-gefärzte Zellen zeigten zwei stark leuchtende Einschlüsse mit je einem an jedem Zellpol (nicht dargestellt).

Die sechs chemoorganoheterotrophen Stämme wurden vorwiegend aus tieferen Sedimentschichten von RS 111 (10 m) und nur auf Agaroseplatten mit reduzierten Schwefelverbindungen isoliert (Tab. 3.5). Diese Stämme wuchsen nicht ohne organische Kohlenstoffquelle (Hefeextrakt oder TSB) auf Eisen(II) oder elementarem Schwefel. Sie wuchsen wohl in FTY-Medium, welches neben den anorganischen Elektronendonatoren Tetraphionat und Eisen(II) lediglich 0,02 % Hefeextrakt enthielt. In den FTY-Kulturen wurde eine leichte pH-Absenkung von pH 2,5 auf pH 2,1 - 2,4 (im Gegensatz zu pH-Absenkungen unter pH 2 bei den chemolithoautotrophen Stämmen) beobachtet, die auf eine Oxidation des Tetraphionats hinwies. Nach ein- bis dreiwöchiger Inkubationszeit bildete sich mit Ausnahme von FTY-Kulturen des Stammes 19 ein Niederschlag von Eisen(III), der auf die direkte oder indirekte Eisen(II)-Oxidation zurückzuführen war. Alle sechs Stämme wuchsen auf Glucose in Abwesenheit von Eisen(II) oder reduzierten Schwefelverbindungen. Die Stämme 19 und 33 wurden auf ihre Fähigkeit, Eisen(III) in Anwesenheit von Glucose zu reduzieren, getestet. Nur in der Kultur von Stamm 33 wurde nach sechs Tagen eine geringe Zunahme von Eisen(II) nachgewiesen. Es fand jedoch innerhalb der zweimonatigen Inkubationszeit keine vollständige Reduktion des Eisen(III) statt. Als Kontrolle diente Stamm "*Acidiphilium cryptum*" SJH, welcher innerhalb von sechs Tagen das gesamte Eisen(III) reduzierte.

In der Kolonienmorphologie unterschieden sich die heterotrophen Stämme von den autotrophen Isolaten dadurch, dass ihre Kolonien meist größer und heller waren und keine Eisen(III)-Inkrustierungen aufwiesen. Die Kolonien der Stämme 19, 33 und 47 waren sich sehr ähnlich. Die Zellmorphologie der Stämme war abhängig vom Kulturmedium und Kulturalter. Es wurden sehr breite Zellen (bis 1,5 µm) und sehr lange Zellen (bis 20 µm) beobachtet. Alle Stämme zeigten Sporenbildung. In FTY-Medium waren die Zellen oft mit Eisen(III)-Kristallen bedeckt (Abb. 3.11).

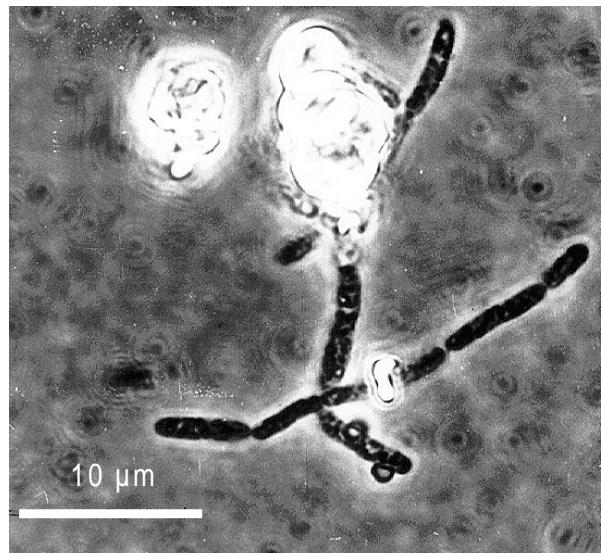


Abb. 3.11:  
Phasenkontrastaufnahme von Stamm 22.  
Heterotropes schwefel- und eisen-  
oxidierendes Bakterium (*Sulfovibacillus* sp.).

Tab. 3.4: Azidophile, autotrophe schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme.

Stamm	Herkunft	Inokulum <sup>a</sup>	Substrat <sup>b</sup>	Kolonietyp	Zelltyp <sup>c</sup>	Elektronen-Donatoren <sup>d</sup>			Fe(III)R <sup>e</sup>	EMBL-Sequenz <sup>f</sup> & Übereinstimmung in %
						Fe(II)	S <sup>0</sup>	Glu		
RS 111 (10 m)										
14	0 - 1 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weißlich-matt bis rostfarben, glänzend, Fe(III)-gefärbter Ausstrich	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 - 2 µm, oft gepaart	+	+	-	+	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> N-Fe3 X75268 99
15 <sup>g</sup>	0 - 1 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weißlich-matt bis rostfarben (oft in der Mitte), glänzend, Fe(III)-gefärbter Ausstrich	Kurzstäbchen 0,5 x 2 - 3 µm	+	+	-	nb	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 99
23a	0 - 1 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis orange (dann glatt-glänzend), rostfarben, rund, ganzer Rand	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 µm, Ketten (4 - 7 Zellen)	+	+	-	+	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 96
24b	0 - 1 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis orange (dann glatt-glänzend), rostfarben, rund, ganzer Rand	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 2 µm	+	+	-	+	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 99
10b	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup>	Fe(III)-inkrustiert kegelförmig, in die Agarose eingesunken,	Kurzstäbchen	+	+	-	nb	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 98
29a	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	kleine einheitlich rostfarben, große in der Mitte orange/rostfarben, erhoben, Rand weißlich-matt, undulierend	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 - 2 µm	+	+	-	+	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 99
32	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis rostfarben	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 3 - 4 µm	+	+	-	nb	nb <sup>h</sup>
RS 111 (7 m)										
48a <sup>g</sup>	3 - 4 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weiß-gelblich-matt bis rostfarben	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 2 - 3 µm	+	+	-	nb	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 99
48b <sup>g</sup>	3 - 4 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weiß-gelblich-matt bis rostfarben	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 3 µm	+	+	-	nb	<i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3 99

Tab. 3.4: Fortsetzung

Stamm	Herkunft	Inokulum <sup>a</sup>	Substrat <sup>b</sup>	Kolonietyp	Zelltyp <sup>c</sup>	Elektronen-Donatoren <sup>d</sup>			Fe(III)R <sup>e</sup>	EMBL-Sequenz <sup>f</sup> & Übereinstimmung in %
						Fe(II)	S <sup>0</sup>	Glu		
RS 107										
38	0 - 1 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weißlich-matt bis rostfarben, glatt-glänzend, Fe(III)- gefärbter Ausstrich	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 2 - 3 µm, Ketten (2 - 3 Zellen)	+	+	-	+	A. ferrooxidans N-Fe3 99
40	0 - 1 cm	MPN S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis orange (dann glatt-glänzend), rostfarben, rund, ganzer Rand	Kurzstäbchen	+	+	-	nb	A. ferrooxidans N-Fe3 98
41	0 - 1 cm	MPN S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis orange (dann glatt-glänzend), rostfarben, rund, ganzer Rand	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 2 - 3 µm	+	+	-	nb	A. ferrooxidans N-Fe3 98
42 <sup>g</sup>	0 - 1 cm	MPN S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	durchscheinend bis orange/rostfarben	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 - 2 µm, oft gepaart	+	+	-	nb	A. ferrooxidans N-Fe3 99
49	0 - 1 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	Mitte orange/rostfarben, erhoben, Rand weißlich-matt, undulierend	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 - 2 µm	+	+	-	nb	nb <sup>h</sup>
36	1 - 2 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	rostfarben, Fe(III)-inkrustiert	Kurzstäbchen 0,5 - 0,7 x 1 - 2 µm	+	-	-	nb	nb <sup>h</sup>
43	1 - 2 cm	MPN S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	weiß-gelblich bis rostfarben, Fe(III) gefärbter Ausstrich	Kurzstäbchen 0,7 x 1 - 2 µm	+	+	-	nb	nb <sup>h</sup>

<sup>a</sup> für den Ausstrich verwendetes Impfmaterial 1) direkt: in Mineralmedium vorverdünntes Sediment und 2) MPN: aus MPN-Verdünnungsreihen nach Inkubation

<sup>b</sup> Eisen- und Schwefelverbindungen enthalten im Deckschicht-Medium der Agaroseplatten

<sup>c</sup> autotrophe Stämme in FTY-Medium [10 mM Eisen(II)]; chemoorganoheterotrophe Stämme in FTY- und Glucose-Medium

<sup>d</sup> Eisen(II) oder elementarer Schwefel: autotroph in Abwesenheit organischer Substanzen / heterotroph: in FTY; Glucose: in Abwesenheit von Fe(II), S<sup>0</sup> oder S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>

<sup>e</sup> autotrophe Stämme: mit elementarem Schwefel; chemoorganoheterotrophe Stämme: mit Glucose

<sup>f</sup> EMBL-Sequenz mit größter Ähnlichkeit und von EMBL angegebene Übereinstimmung in %

<sup>g</sup> Sequenzierung durch die Fa. Replicon (Berlin)

<sup>h</sup> keine erfolgreiche PCR

nb nicht bestimmt

Tab. 3.5: Azidophile, chemoorganoheterotrophe schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme.

Stamm	Herkunft	Inokulum <sup>a</sup>	Substrat <sup>b</sup>	Kolonietyp	Zelltyp <sup>c</sup>	Elektronen-Donatoren <sup>d</sup>			Fe(III)R <sup>e</sup>	EMBL-Sequenz <sup>f</sup> & Übereinstimmung in %
						Fe(II)	S <sup>0</sup>	Glu		
RS 111 (10 m)										
18	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	große weiß bis creme-farben, Mitte dunkler/orange, kleine orange bis rostfarben, Fe(III) gefärbter Ausstrich	Stäbchen, 1 x 2 - 3 µm, oft paarweise, auch Zellängen von 5 - 10 µm, leicht gekrümmt, Sporen	-/+	-/(+)	+	nb	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> X51928 95
19	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weißlich bis hellbraun, flach, körnige Struktur, hebt sich kaum von Agarose ab	Stäbchen, 0,5 - 1 x 1 - 2 µm, Ketten (5 - 9 Zellen), Sporen, auch Zellängen bis 20 µm, Sporen	-/-	-/(+)	+	-	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> NAL AF050169 92
22	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	Mitte rosa-orange und erhoben, Rand weiß-gelblich, flach und undulierend	1 - 1,5 x > 10 µm, Fe(III) Kristalle an Zelloberfläche, auch schmale und kürzere Zellen, 0,7 x 3 - 6 µm, oft paarweise, kurze Ketten, Sporen	-/+	-/(+)	+	nb	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> AT-1 X91080 94
33	3 - 4 cm	direkt	Fe <sup>2+</sup> + S <sup>0</sup>	weißlich bis hellbraun, flach, körnige Struktur, hebt sich kaum von Agarose ab	Stäbchen 1 x 2 - 3 µm, Ketten, auch schmalere und längere Zellen, 0,7 x > 10 µm, gekrümmt, Sporen	-/+	-/(+)	+	(+)	<i>S. acidophilus</i> NAL AF050169 92
46	8 - 9 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	weißlich-matt, Struktur körnig, Mitte leicht erhoben, hebt sich kaum von Agarose ab, Fe(III) gefärbter Ausstrich	1 µm x > 10 µm, leicht gekrümmt, Zellfäden bis 50 µm, Sporen	-/+	-/(+)	+	nb	<i>S. thermosulfido-oxidans</i> AT-1 X91080 96
47	18 - 19 cm	MPN Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> + S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	hellbraun, flach, Struktur körnig oder glatt, hebt sich kaum von Agarose ab	Stäbchen, 0,7 x 2 - 3 µm, auch längere Zellen bis 20 µm, leicht gekrümmt, Sporen	-/+	-/(+)	+	nb	<i>S. acidophilus</i> NAL F050169 91

a, b, c, d, e, f, g, h siehe Tab. 3.4

## Phylogenie

Ein Vergleich der Sequenzen der zwölf autotrophen, schwefel- und eisenoxidierenden Isolate, deren 16S rRNA-Gene partiell sequenziert wurden, mit Sequenzen der EMBL-Datenbank erwies die Sequenz von Stamm *Acidithiobacillus ferrooxidans* N-Fe3 als die ähnlichste Sequenz (Tab. 3.4). Dieser Mikroorganismus wurde in sauren Grubenwässern von Kupfererzen nachgewiesen (Goebel & Stackebrandt 1994). Die Sequenzen der Isolate aus den Restseen waren nahezu identisch. Mit der Ausnahme von den Stämmen 23a und 41 lagen die Sequenzübereinstimmung bei über 99 % (Tab. 3.6). Isolate mit einer Sequenzübereinstimmung von über 99 % wurden als phlotypisch gleich angesehen. Dabei wurden fehlende Basen nicht als Unterschied gewertet. Im Falle der Stämme 23a und 41 wurde nur ein verhältnismäßig kurzer Abschnitt verglichen. Da diese Sequenzen jeweils im Vergleich zu den anderen Isolaten Sequenzübereinstimmungen von über 99 % zeigten, wurden auch hier angenommen, dass diese beiden Stämme den gleichen Phlotyp besitzen.

Tab. 3.6: Sequenzübereinstimmungen unter den chemolithoautotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Stämmen. Angegeben sind 1) die Anzahl unterschiedlicher Nukleotide pro Gesamtanzahl der verglichenen Nukleotide (oberhalb der Diagonalen) und 2) die Sequenzübereinstimmung in Prozent (unterhalb der Diagonalen). Fehlende Nukleotide (*gaps*) wurden nicht als Unterschied gewertet.

	14	15	23a	24b	10b	29a	48a	48b	38	40	41	42
14		1/506	3/497	0/477	1/466	0/373	1/506	1/506	0/466	0/505	3/375	1/506
15	<b>99,8</b>		2/535	1/495	1/467	0/378	0/707	0/706	0/467	1/593	3/376	0/720
23a	<b>99,4</b>	<b>99,6</b>		2/481	3/460	2/371	2/567	2/529	2/459	2/513	4/371	2/534
24b	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,6</b>		1/445	0/345	1/495	1/495	0/444	0/493	3/375	1/495
10b	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>99,3</b>	<b>99,8</b>		0/366	1/467	1/467	1/464	1/467	3/376	1/467
29a	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,5</b>	<b>100</b>	<b>100</b>		0/378	0/378	0/368	0/378	0/328	0/378
48a	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>		0/700	0/467	1/593	3/376	0/706
48b	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>100</b>		0/467	1/593	3/376	0/706
38	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>		0/467	3/376	0/467
40	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,6</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>		3/376	1/593
41	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>	98,9	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>	<b>99,1</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>		3/376
42	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>99,6</b>	<b>99,8</b>	<b>99,8</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,8</b>	<b>99,2</b>	

In das Alignment wurden zunächst alle Sequenzen, die in der RDP-Datenbank innerhalb der "*Thiobacillus ferrooxidans*-Untergruppe" verfügbar waren, aufgenommen und durch Sequenzen, welche beim Sequenzvergleich mit der EMBL-Datenbank unter die zwanzig ähnlichsten Sequenzen fielen, ergänzt. Für die Erstellung des Dendrogramms wurde die Sequenz des Isolats 48a aufgrund seiner Größe von 740 Nucleotiden genommen und jene Datenbanksequenzen, welche für diesen Abschnitt eine möglichst vollständige Sequenz

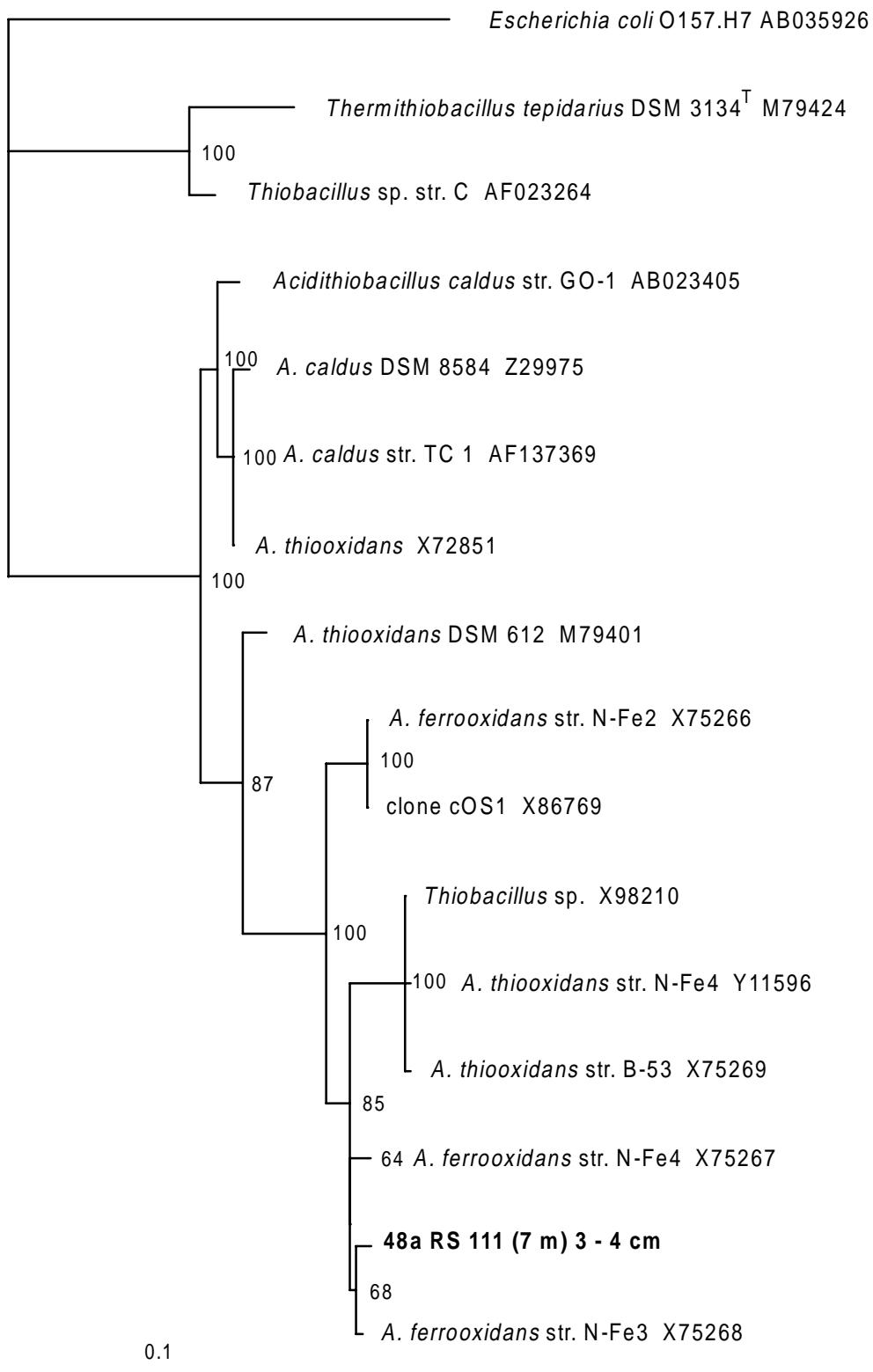


Abb. 3.12: Dendrogramm (basierend auf den partiellen 16S rDNA-Sequenzen und berechnet nach der *Maximum-Likelihood* Methode) der autotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Isolate und Vertreter der Gattungen *Acidithiobacillus* und *Thermithiobacillus*. *Escherichia coli* dient als Außengruppe. Der Maßstrich entspricht 10 Veränderungen pro 100 Nucleotidpositionen.

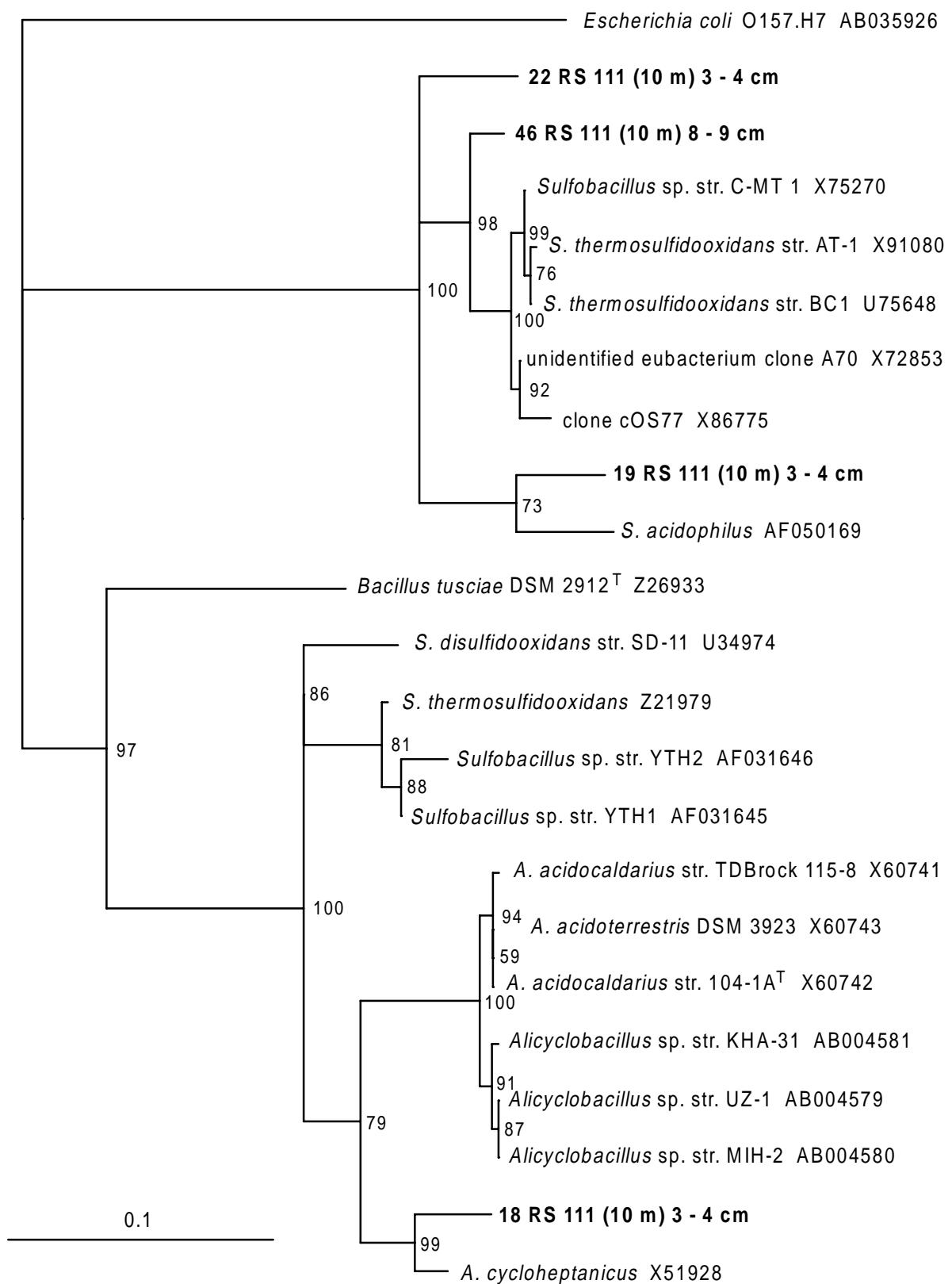


Abb. 3.13: Dendrogramm (basierend auf den partiellen 16S rDNA-Sequenzen und berechnet nach der *Maximum-Likelihood* Methode) der heterotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Isolate und Vertreter der Gattungen *Sulfovibacillus* und *Alicyclobacillus*. *Escherichia coli* dient als Außengruppe. Der Maßstrich entspricht 10 Veränderungen pro 100 Nucleotidpositionen.

aufwiesen. Unsichere Zuordnungen von Nucleotiden wurden von der Berechnung ausgeschlossen. Insgesamt wurden 570 Nucleotidpositionen verglichen. In Abb. 3.12 ist das nach der *Maximum-Likelihood* Methode berechnete Dendrogramm dargestellt. Es zeigt die nahe Verwandtschaft des Isolats 48a mit den Arten *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* aus der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobacteria. Diese Gruppe ist gegenüber Vertretern der Arten *Acidithiobacillus caldus* und *Thermithiobacillus tepidarius*, welche ebenfalls zu den  $\gamma$ -Proteobacteria gehören (Kelly & Wood 2000), deutlich abgegrenzt.

Die den partiellen 16S rDNA-Sequenzen der chemoorganoheterotrophen Stämmen ähnlichsten EMBL-Datenbank-Sequenzen gehörten zu den Gattungen *Alicyclobacillus* und *Sulfobacillus* der *Bacillus/Staphylococcus*-Gruppe innerhalb der *Firmicutes* (Tab. 3.5). Die Sequenzübereinstimmung zu den nächst ähnlichen Datenbank-Sequenzen war jedoch nicht so hoch, wie dies für die autotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Stämme der Fall war. Die Sequenz von Stamm 18 zeigte größte Ähnlichkeit mit der von *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, ein thermophiles und azidophiles Bakterium (Deinhard et al. 1987b, Wisotzkey et al. 1992). Die Sequenzen der Stämme 19, 33 und 47 besaßen die höchste Übereinstimmung mit der von *Sulfobacillus acidophilus* NAL, ein moderat thermophiles Bakterium, welches Metallsulfide oxidiert und aus Kohle-Abraumhalden isoliert wurde (Norris et al. 1996). Die Sequenzen der Stämme 22 und 46 zeigten höchste Übereinstimmung mit Vertretern der Art *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* [Stamm AT-1 und Stamm BC1 (Clark & Norris 1996), letzterer ist ebenfalls moderat thermophil und oxidiert Metallsulfide]. Die Gruppe der chemoorganoheterotrophen Isolate zeigte im Vergleich zu den autotrophen Stämmen (und ebenfalls im Vergleich zu den sulfatreduzierenden Stämmen) die größten Sequenzunterschiede untereinander (Tab. 3.7). Lediglich die Stämme 19, 33 und 47 zeigten eine Sequenzübereinstimmungen von über 99 %.

Tab. 3.7: Sequenzübereinstimmungen unter den chemoorganoheterotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Stämmen. Angegeben sind 1) die Anzahl unterschiedlicher Nukleotide pro Gesamtanzahl der verglichenen Nukleotide (oberhalb der Diagonalen) und 2) die Sequenzübereinstimmung in Prozent (unterhalb der Diagonalen). Fehlende Nukleotide (*gaps*) wurden nicht als Unterschied gewertet.

	18	19	22	33	46	47
18		95/412	90/412	94/406	95/411	94/397
19	76,9		43/726	1/559	32/631	1/405
22	78,2	94,1		43/559	28/632	34/404
33	76,8	<b>99,8</b>	92,3		34/547	1/403
46	76,9	94,9	95,6	93,8		28/404
47	76,3	<b>99,8</b>	91,6	<b>99,8</b>	93,1	

In das *Alignment* wurden zunächst alle RDP-Sequenzen der "Alicyclobacillus-Gruppe" sowie die zwanzig ähnlichsten EMBL-Sequenzen aufgenommen. Für die Erstellung des Dendrogramms wurden die Sequenzen der Isolate 18, 19 (stellvertretend für die Stämme 19, 33 und 47), 22 und 46 sowie Datenbanksequenzen mit einer möglichst vollständigen Sequenz über den gemeinsamen Abschnitt verwendet. Unsichere Zuordnungen von Nucleotiden wurden ausgeschlossen, so dass insgesamt 414 Nucleotidpositionen zur Berechnung herangezogen wurden. In Abb. 3.13 sind die Stellungen der Isolate innerhalb der *Alicyclobacillus/ Sulfovbacillus*-Gruppe dargestellt. Die Isolate fielen in zwei große Gruppen. Die Isolate 19/33/47, 22 und 46 gehörten in die Gruppe, welche mit Ausnahme der Umweltklone ausschließlich Vertreter der Gattung *Sulfovbacillus* enthielt. Für die Stämme 22 und 46 ließ sich eine genaue Zuordnung zu bekannten Organismen nicht herstellen. Stamm 19 bildete eine relativ gut abgesicherte monophyletische Gruppe mit *Sulfovbacillus acido-philus*, die Längen der endständigen Äste weisen jedoch auf größere Sequenzunterschiede hin. Stamm 18 gruppierte mit Vertretern der Gattung *Alicyclobacillus* und bildete eine sehr gut abgesicherte monophyletische Gruppe mit *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, wobei auch hier die längeren Äste größere Sequenzunterschiede bedeuten.

### 3.3.2 Sulfatreduzierende Bakterienstämme

Es wurden insgesamt zehn sulfat-reduzierende Stämme aus den Sedimenten der drei Restseen isoliert, wovon neun aus den sauren Restseen, RS 111 (10 m) und RS 107, und einer aus dem neutralen RS B (Tab. 3.8) stammen. Die Isolierung von sulfatreduzierenden Bakterien war nur in Tiefagar-Verdünnungsreihen mit neutralem Medium erfolgreich. Auf den anoxisch inkubierten Agaroseplatten mit  $\text{FeSO}_4/\text{pH } 3$ -Medium bildeten sich keine Bakterienkolonien.

#### Morphologie und Physiologie

Bei den Stämmen aus den sauren Restseen handelte es sich durchweg um Sporenbildner. Die Zellgröße war in Abhängigkeit von Kulturmedium und Kulturalter sehr variabel, insgesamt waren die Zellen der Sporenbildner sehr groß und erreichten häufig Längen über

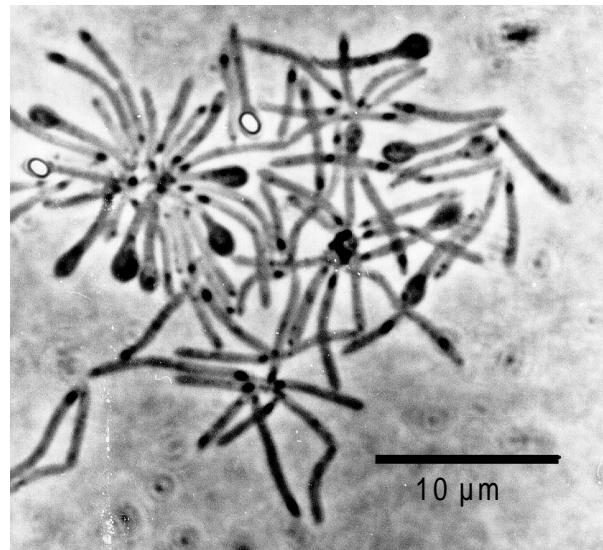


Abb. 3.14:

Phasenkontrastaufnahme von Stamm SRB 4. Sporenbildendes, sulfatreduzierendes Bakterium (*Desulfovporosinus* sp.).

10 µm (Abb. 3.14). Stamm SRB 12 aus RS B bildete keine Sporen und die Zellen waren mit einer Zelllänge von 1 - 3 µm wesentlich kleiner. Für keines der untersuchten Isolate wurde Katalase-Aktivität oder Desulfovirodin nachgewiesen.

Tab. 3.8: Sulfatreduzierende Bakterienstämme.

Stamm	Herkunft	Inokulum	Sporen	Katalase	Desulfo- viridin	EMBL-Sequenz <sup>a</sup> & Übereinstimmung in %
RS 111 (10 m)						
SRB 13 <sup>b</sup>	0 - 1 cm	MPN pH 7	+	nb	nb	<i>Desulfovibrio sp. str. 5apy</i> AF159120 97
SRB 14 <sup>b</sup>	0 - 1 cm	MPN pH 7	+	nb	nb	<i>Desulfovibrio sp. str. S8</i> AF076247 96
SRB 11	3 - 4 cm	MPN pH 7	+	-	-	SRB str. STP12 AJ006607 96
SRB 3	8 - 9 cm	MPN pH 7	+	-	-	<i>Desulfovibrio auripigmentum str. Orex</i> U85624 98
SRB 10	0 - 10 cm	FeSO <sub>4</sub> /pH 3 (Anreicherung)	+	-	-	SRB str. STP12 98
RS 107						
SRB 15 <sup>b</sup>	0 - 1 cm	MPN pH 7	+	nb	nb	<i>Desulfovibrio sp. str. S8</i> 97
SRB 4	3 - 4 cm	MPN pH 7	+	-	-	<i>Dtm. auripigmentum str. Orex</i> 96
SRB 6	3 - 4 cm	MPN pH 7	+	-	-	<i>Dtm. auripigmentum str. Orex</i> 99
SRB 7 <sup>c</sup>	0 - 10 cm	MPN pH 7	+	-	-	<i>Desulfovibrio orientis</i> DSM 765 Y11570 95
RS B						
SRB 12	0 - 1 cm	MPN pH 7	-	-	-	<i>Desulfovibrio sp. str. STP10 AJ006611</i> 98

<sup>a</sup> Sequenz mit größter Ähnlichkeit und von EMBL angegebene Übereinstimmung in %

<sup>b</sup> Sequenzierung durch die Fa. Replicon (Berlin)

<sup>c</sup> Greifproben von September 1996

nb nicht bestimmt

Weiterhin ließen sich die Stämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratnutzung charakterisieren (Tab. 3.9 und Tab. 3.10). Als Elektronendonatoren in Anwesenheit von Sulfat nutzten alle Isolate Lactat und ebenso Formiat. Auf Acetat wuchsen nur SRB 7 und 11. Von den anderen Monocarbonsäuren wurde Propionat gar nicht und Butyrat lediglich nicht von SRB 7 und 12 verwertet. Bei den Dicarbonsäuren wurde kein Wachstum auf Succinat beobachtet und auf Fumarat wuchsen nur die Stämme SRB 6, 13, 14 und 15. Von den Alkoholen war Ethanol mit der Ausnahme von SRB 14 für alle Isolate verwertbar. Glycerin wurde ebenso von der Mehrzahl der Stämme verwertet. Auf Methanol wuchsen nur die Acetat-verwertenden Stämme SRB 7 und 11. Keines der Isolate zeigte Wachstum mit der Aminosäure Alanin oder dem Aromaten Benzoat. In Abwesenheit von Sulfat wurde bei allen Stämmen Wachstum auf Lactat festgestellt. Auf Formiat wuchsen die Stämme SRB 4, 6 und 7 und auf Methanol die Stämme SRB 7 und 11. Von den alternativ zu Sulfat angebotenen

Tab. 3.9: Sulfatreduzierende Bakterienstämme: Spektrum der organischen Elektronendonatoren<sup>a</sup> in Anwesenheit von Sulfat<sup>b</sup>.

Stamm		Lactat	Acetat	Formiat <sup>c</sup>	Propionat	Butyrat	Succinat	Fumarat	Methanol	Ethanol	Glycerin	Alanin	Benzoat
SRB 13	111 0 - 1	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	+	-	-
SRB 14	111 0 - 1	(+)	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-
SRB 11	111 3 - 4	+	+	(+)	-	(+)	-	-	(+)	+	+	-	-
SRB 3	111 8 - 9	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
SRB 10	111 1 - 10 (FeSO <sub>4</sub> /pH3)	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
SRB 15	107 0 - 1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
SRB 4	107 3 - 4	+	-	(+)	-	(+)	-	-	-	+	(+)	-	-
SRB 6	107 3 - 4	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	-	-	-
SRB 7	107 1 - 10	+	(+)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SRB 12	B 0 - 1	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

<sup>a</sup> organische Elektronendonatoren in 10 mM mit der Ausnahme von Benzoat (2 mM)<sup>b</sup> 15 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O<sup>c</sup> zusätzlich 2 mM Acetat

+ Wachstum in zwei oder drei Durchgängen

+ Wachstum nur in einem Durchgang, doch dann starke Trübung oder Sulfidbildung (überprüft mit CuSO<sub>4</sub> im 2. Durchgang)

(+) Wachstum nur in einem Durchgang

- kein Wachstum oder nur schwache Trübung in einem Durchgang

Tab. 3.10: Sulfatreduzierende Bakterienstämme: Wachstum in Abwesenheit von Sulfat<sup>a</sup>.

Stamm		Lactat <sup>b</sup>	Formiat <sup>b</sup>	Succinat <sup>b</sup>	Methanol <sup>b</sup>	Thiosulfat <sup>c</sup>	Tetrathionat <sup>d</sup>	Sulfit <sup>e</sup>	S <sup>0 f</sup>	Nitrat <sup>g</sup>	Fe(III) <sup>h</sup>
SRB 13	111 0 - 1	(+)	-	-	-	+	-	+	+	-	-
SRB 14	111 0 - 1	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
SRB 11*	111 3 - 4	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-
SRB 3	111 8 - 9	+	-	-	-	+	+	+	+	+**	-
SRB 10	111 1 - 10 (FeSO <sub>4</sub> /pH3)	+	-	-	-	+	(+)	+	+	+	-
SRB 15	107 0 - 1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
SRB 4*	107 3 - 4	+	+	-	-	+	(+)	-	+	(+)	-
SRB 6	107 3 - 4	+	+	-	-	+	(+)	+	+	+**	-
SRB 7*	107 1 - 10	+	+	-	(+)	+	+	+	+	+**	-
SRB 12	B 0 - 1	(+)	-	-	-	-	-	+	+	-	-

<sup>a</sup> bei anorganischen Elektronenakzeptoren im 1. Durchlauf mit 10 mM Formiat und 2 mM Acetat, im 2. Durchlauf nur die mit <sup>\*\*</sup> versehenen Stämme mit Formiat/Acetat, die anderen und im 3. Durchlauf alle Stämme mit 10 mM Lactat

<sup>b</sup> jeweils 10 mM

<sup>c</sup> 15 mM

<sup>d</sup> 2,5 mM

<sup>e</sup> 5 mM

<sup>f</sup> 100 mM *Flowable Sulfur*

<sup>g</sup> 15 mM, Bildung von Nitrit bzw. Ammonium bei den mit <sup>\*\*</sup> versehenen Stämme

<sup>h</sup> 25 mM

<sup>+</sup> Wachstum in zwei oder drei Durchgängen

<sup>+</sup> Wachstum nur in einem Durchgang, doch dann starke Trübung oder Sulfidbildung (überprüft mit CuSO<sub>4</sub> im 2. Durchgang)

(+) Wachstum nur in einem Durchgang

- kein Wachstum oder nur schwache Trübung in einem Durchgang

anorganischen Elektronenakzeptoren wurden von der Mehrzahl der Stämme die reduzierten Schwefelverbindungen Thiosulfat, Tetrathionat, Sulfit und elementarer Schwefel genutzt. Wachstum in Anwesenheit von Nitrat wurde ebenso bei der Mehrzahl der Stämme beobachtet, jedoch konnte in diesen Fällen keine Nitratreduktion festgestellt werden. Die Nitritgehalte lagen im Bereich von 0,2 - 0,8 mM und es wurde eine maximale Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Vergleich zum Kulturmedium um 0,3 mM erreicht. Keiner der Stämme reduzierte Eisen(III).

Für die Stämme SRB 3, 4, 6 und 7 wurde Wachstum bei verschiedenen pH-Werten in phosphatgepuffertem Medium getestet. Alle Stämme wuchsen bei pH 7, Stämme SRB 3 und 6 wuchsen bei pH 6, jedoch keiner der Stämme wuchs bei pH 5, pH 4 oder pH 3. Bei 28 °C wurden folgende Wachstumsraten ( $\mu$ ) bzw. Verdopplungszeiten ( $t_d$ ) in karbonatgepufferten Medium bestimmt: SRB 3:  $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 10 \text{ h}$ ; SRB 4:  $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 13 \text{ h}$ ; SRB 6:  $\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 19 \text{ h}$ ; SRB 7:  $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 10 \text{ h}$ .

## Phylogenie

Der Vergleich der partiellen 16S rDNA-Sequenzen der sulfatreduzierenden Isolate mit Sequenzen der EMBL-Datenbank ergab eine Zugehörigkeit der Isolate aus den sauren Restseen, RS 111 (10 m) und RS 107, zu den sporenbildenden sulfatreduzierenden Bakterien der Gattung *Desulfosporosinus* der *Helio bacterium*-Gruppe innerhalb der *Firmicutes* (Tab. 3.8). Zu den von EMBL angegebenen ähnlichsten Sequenzen gehörten die von *Desulfosporosinus* sp. 5apy aus Trinkwasseranlagen (Bade 2000), *Desulfosporosinus* sp. S8 aus einem Benzol-kontaminierten Grundwasserleiter (Robertson et al. 2000), dem sulfatreduzierenden Bakterium STP12 aus einem profundalen Seesediment (Sass et al. 1997 und 1998), dem Arsen(V)-reduzierenden Bakterium *Desulfotomaculum auripigmentum* aus einem limnischen Oberflächensediment (Newman et al. 1997) und *Desulfosporosinus orientis* DSM765 ursprünglich aus einer Bodenprobe isoliert (Adams & Postgate 1959, Stackebrandt et al. 1997). Das Isolat SRB 12 aus dem neutralen RS B zeigte eine enge Verwandtschaft zu der Gattung *Desulfomicrobium* der Gruppe der  $\delta$ -Proteobacteria (Tab. 3.8). Innerhalb der Gruppe der sulfatreduzierenden, sporenbildenden Isolate zeigten jeweils SRB 3 und 6, SRB 4 und 15, und SRB 13 und 14 eine Sequenzübereinstimmung über 99 % (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Sequenzübereinstimmungen unter den sporenbildenden, sulfatreduzierenden Stämmen. Angegeben sind 1) die Anzahl unterschiedlicher Nukleotide pro Gesamtanzahl der verglichenen Nukleotide (oberhalb der Diagonalen) und 2) die Sequenzübereinstimmung in Prozent (unterhalb der Diagonalen). Fehlende Nukleotide (*gaps*) wurden nicht als Unterschied gewertet.

	SRB 13	SRB 14	SRB 11	SRB 3	SRB 10	SRB 15	SRB 4	SRB 6	SRB 7
SRB 13	1/736	25/356	13/539	19/459	24/736	14/539	12/496	20/447	
SRB 14	<b>99,9</b>		25/356	13/539	16/459	29/942	14/539	12/496	20/447
SRB 11	93,0	93,0		24/356	6/356	25/356	25/356	24/356	22/355
SRB 3	97,6	97,6	93,3		19/459	11/539	8/541	1/495	19/447
SRB 10	95,9	95,9	98,3	95,9		20/459	20/459	18/457	16/447
SRB 15	96,7	96,9	93,0	98,0	95,6		3/539	9/496	15/447
SRB 4	97,4	97,4	93,0	98,5	95,6	<b>99,4</b>		9/495	15/447
SRB 6	97,6	97,6	93,3	<b>99,8</b>	96,1	98,2	98,2		19/447
SRB 7	95,5	95,5	93,8	95,7	96,4	96,6	96,6	95,7	

Für die sulfatreduzierenden Sporenbildner aus den sauren Restseen wurden phylogenetische Analysen durchgeführt. Das *Alignment* enthielt zunächst alle RDP-Sequenzen der "*Desulfitobacterium dehalogenans*-Gruppe" ergänzt durch die zwanzig ähnlichsten EMBL-Sequenzen. Für die Erstellung der Dendrogramme wurden die Sequenzen der Isolate SRB 3 (stellvertretend für die Stämme SRB 3 und 6), SRB 7, SRB 10, SRB 11, SRB 14 (stellvertretend für die Stämme SRB 13 und 14) und SRB 15 (stellvertretend für die Stämme SRB 4 und 15) sowie Datenbanksequenzen mit einer möglichst vollständigen Sequenz über den gemeinsamen Abschnitt eingesetzt. Insgesamt wurden 358 Nucleotidpositionen zur Berechnung herangezogen. In Abb. 3.15 ist das nach der *Maximum-Likelihood*-Methode berechnete Dendrogramm dargestellt. Es ergab sich eine deutliche Zugehörigkeit der Isolate zum *Desulfosporosinus*-Cluster, welcher sich gut von Vertretern der Gattung *Desulfitobacterium* abgrenzen ließ. Die Multifurkation innerhalb des *Desulfosporosinus*-Cluster weist darauf hin, dass eine genaue Phylogenie vom vorhandenen Datensatz nicht abzuleiten war. Dieses Phänomen trat unabhängig von der Auswahl der Stämme, der Länge der Sequenzen und dem gewählten Algorithmus auf. Die Dendrogramme erstellt nach der *Neighbor Joining*- bzw. *Maximum Parsimony*-Methode sind im Anhang 7.2 dargestellt. In diesen Dendrogrammen trat immer eine Bifurkation ein, hier waren die *Bootstrap*-Werte jedoch meist kleiner als 30. Einzig die Zuordnungen von SRB 3 zu *Desulfotomaculum auripigmentum* sowie von SRB 15 zu *Desulfosporosinus* sp. Blif und die nahe Verwandtschaft von SRB 10 zu 11 ließen sich mit hoher Zuverlässigkeit aussagen.

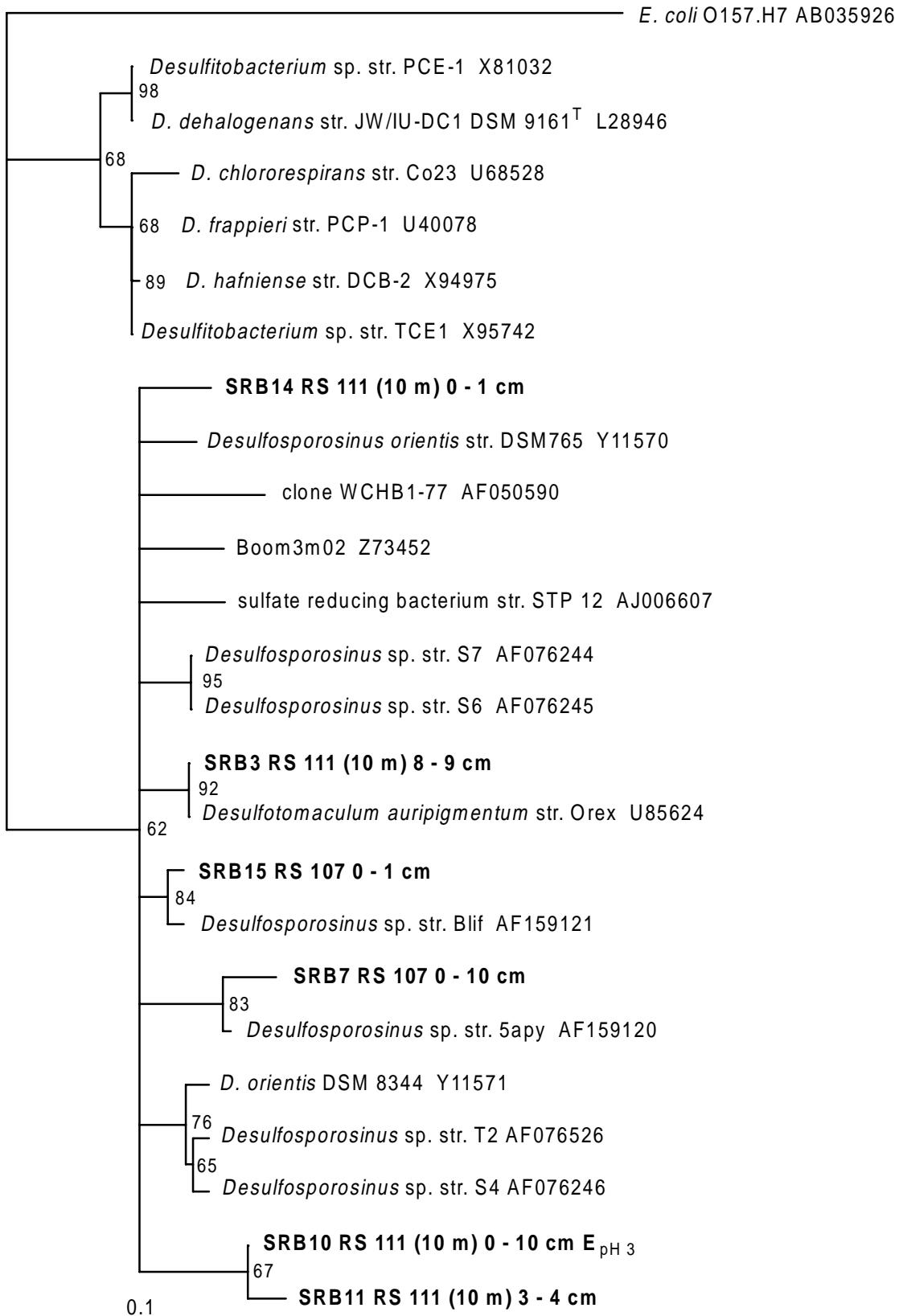
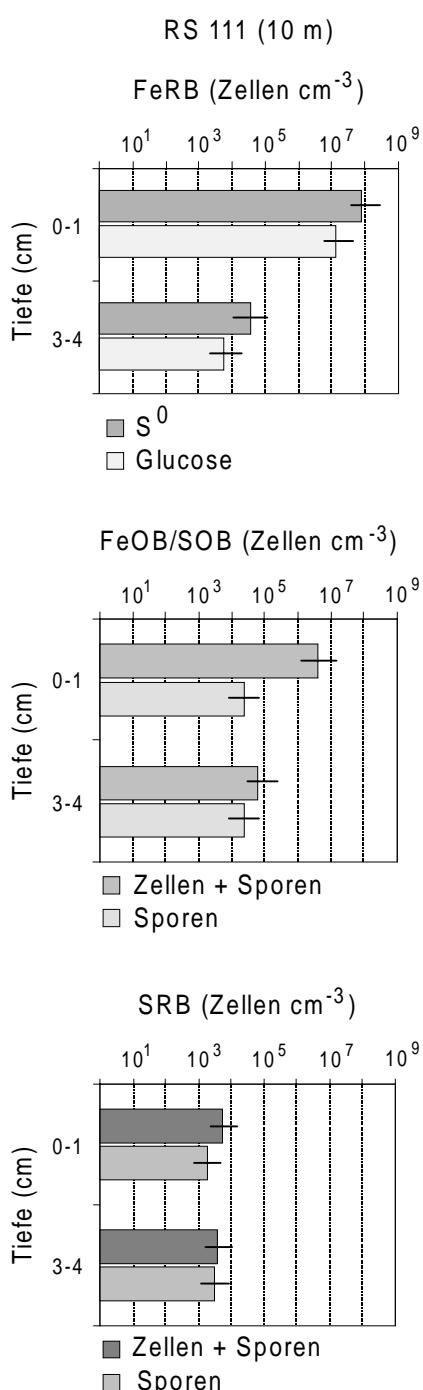


Abb. 3.15: Dendrogramm (basierend auf den partiellen 16S rDNA-Sequenzen und berechnet nach der Maximum-Likelihood Methode) der sporenbildenden sulfatreduzierenden Isolate und Vertreter der Gattungen *Desulfosporosinus* (einschließlich *Desulfotomaculum auripigmentum*) und *Desulfitobacterium*. *Escherichia coli* dient als Außengruppe. Der Maßstrich entspricht 10 Veränderungen pro 100 Nucleotidpositionen.

### 3.3.3 Zellzahlbestimmungen in Sedimenten von Restsee 111 basierend auf Eigenschaften der Isolate

Nachdem die Isolate charakterisiert und identifiziert waren, wurden nachträglich in Sedimenten von RS 111 (10 m) (Proben vom April 1999) MPN-Bestimmungen durchgeführt, welche auf bestimmte Eigenschaften der Isolate gerichtet waren (Abb. 3.16). So wurden MPN-Zählungen für Eisen(III)-reduzierende Vertreter von *Acidithiobacillus ferrooxidans* (mit elementarem Schwefel als Energiequelle) durchgeführt und mit MPN-Werten von heterotrophen Eisen(III)-reduzierenden Bakterien (mit Glucose als Energiequelle) verglichen. Die Anzahl der schwefeloxidierenden Fe(III)RB in der Sedimentschicht von 0 - 1 cm war sehr



hoch und sogar höher als die im April 1997 bestimmten Zellzahlen der FeOB und SOB (siehe Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Die Anzahl nahm bei einer Tiefe von 3 - 4 cm stark ab. Auch die MPN-Werte der Glucose-verwertenden Fe(III)RB ergaben an der Sedimentoberfläche hohe Werte, die mit der Tiefe stark abnahmen. Zudem wurde der Anteil der Sporen der schwefel- und eisenoxidierenden sowie der sulfatreduzierenden Bakterien bestimmt, um Auskunft darüber zu erhalten, ob die Sporenbildner der Gattungen *Sulfobacillus/Alicyclobacillus* und *Desulfovibriosporosinus* als vegetative oder vorwiegend als inaktive Sporen vorlagen. Die Sporenanzahl der schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien lag in der obersten Sedimentschicht weit unter der Summe von vegetativen Zellen und Sporen. Dabei ist zu beachten, dass das verwendete Medium sowohl für heterotrophe als auch autotrophe schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien geeignet ist. Dagegen wurde bei einer Sedimenttiefe von 3 - 4 cm ein Anteil der Sporen von 39 % der Gesamzellzahl festgestellt. Bei den SRB lagen bei einer Sedimenttiefe von 0 - 1 cm 34 % und von 3 - 4 cm 76 % der kultivierbaren Zellen als Sporen vor.

Abb. 3.16: MPN-Werte von azidophilen Eisen(III)-reduzierenden Bakterien (oben) und die Anteile der Sporen bei schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien (mitte) sowie sulfatreduzierenden Bakterien (unten) (April 1999). Die oberen und unteren 95 %-Konfidenzintervalle sind durch die Fehlerbalken angegeben.

## 4. Diskussion

### 4.1 Eisen- und Schwefelkreislauf in den Sedimenten der Restseen

Die Sedimente der vier Standorte in den drei Restseen, RS 111 (10 m) und (7 m), RS 107 und RS B, unterscheiden sich deutlich anhand der untersuchten Parameter voneinander. Die besonderen Eigenschaften der Standorte wurden durch die Ergebnisse mehrerer Probenahmen bestätigt. Die daraus abgeleiteten, für die vier Standorte im unterschiedlichen Maße bedeutenden Prozesse sind in Abb. 4.1 zusammenfassend dargestellt. Die einzelnen Prozesse und die Rolle der beteiligten Mikroorganismen werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

Für die Sedimente der beiden Probenahmestellen im RS 111 sind die gleichen Ausgangsbedingungen (bezüglich des Grundwassereinflusses oder der Qualität und Quantität des sedimentierenden Materials) an zu nehmen. Ihre unterschiedliche Ausprägung (Abb. 4.1) ist daher auf die unterschiedlichen Sauerstoffverhältnisse zurückzuführen. In RS 111 (10 m) war die sedimentnahe Wasserschicht ganzjährig anoxisch. Eisen(III) stellt den wichtigsten Oxidanten dar und erreicht das Sediment in Form von amorphen Fe(III)-Hydroxiden und Fe(III)-Hydroxosulfaten. Der geringe Gehalt an Eisen(III) im Sediment weist darauf hin, dass dieses umgehend zu Eisen(II) reduziert wird. Dies geschieht entweder mikrobiell gekoppelt an die Oxidation organischen Materials und reduzierter Schwefelverbindungen oder chemisch durch Schwefelwasserstoff unter Bildung von FeS. Der Schwefelwasserstoff entsteht bei der im Sediment stattfindenden Sulfatreduktion, die jedoch durch die geringe Verfügbarkeit an organischem Substrat limitiert ist. Aufgrund der geringen Reoxidation kommt es zur Akkumulation reduzierter Schwefelverbindungen. Davon lag nur ein geringer Anteil als Pyrit vor, was eine Limitierung der Pyritbildung andeutet. Dagegen waren die Sedimente in RS 111 (7 m) durch ihren stärker oxidierten Charakter geprägt. Eisen(III) wird nur teilweise zu Eisen(II) reduziert. Sulfatreduktion war nicht nachweisbar und die Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen waren sehr gering. Ähnlich wie in RS 111 (7 m) stellte sich die Situation in Sedimenten von RS 107 dar, mit dem Unterschied, dass große Mengen an Pyrit gefunden wurden (Abb. 4.1). Da keine Sulfatreduktion nachgewiesen wurde, ist die Herkunft des Pyrits unklar. Wegen der hohen Gehalte an Eisen(III) wird eine Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen angenommen.

Im neutralen RS B besaßen die Sedimente trotz oxische Verhältnisse in darüber liegenden Wasserschichten einen stärker reduzierten Charakter (Abb. 4.1). Reaktives Eisen lag vorwiegend als Eisen(II) vor, und die Sulfatreduktionsraten waren um ein zehnfaches größer als in RS 111 (10 m). Im Vergleich zu RS 111 (10 m) ist jedoch von einer stärkeren Reoxidation auszugehen. Auch hier weist der geringe Gehalt an Pyrit auf eine Limitierung

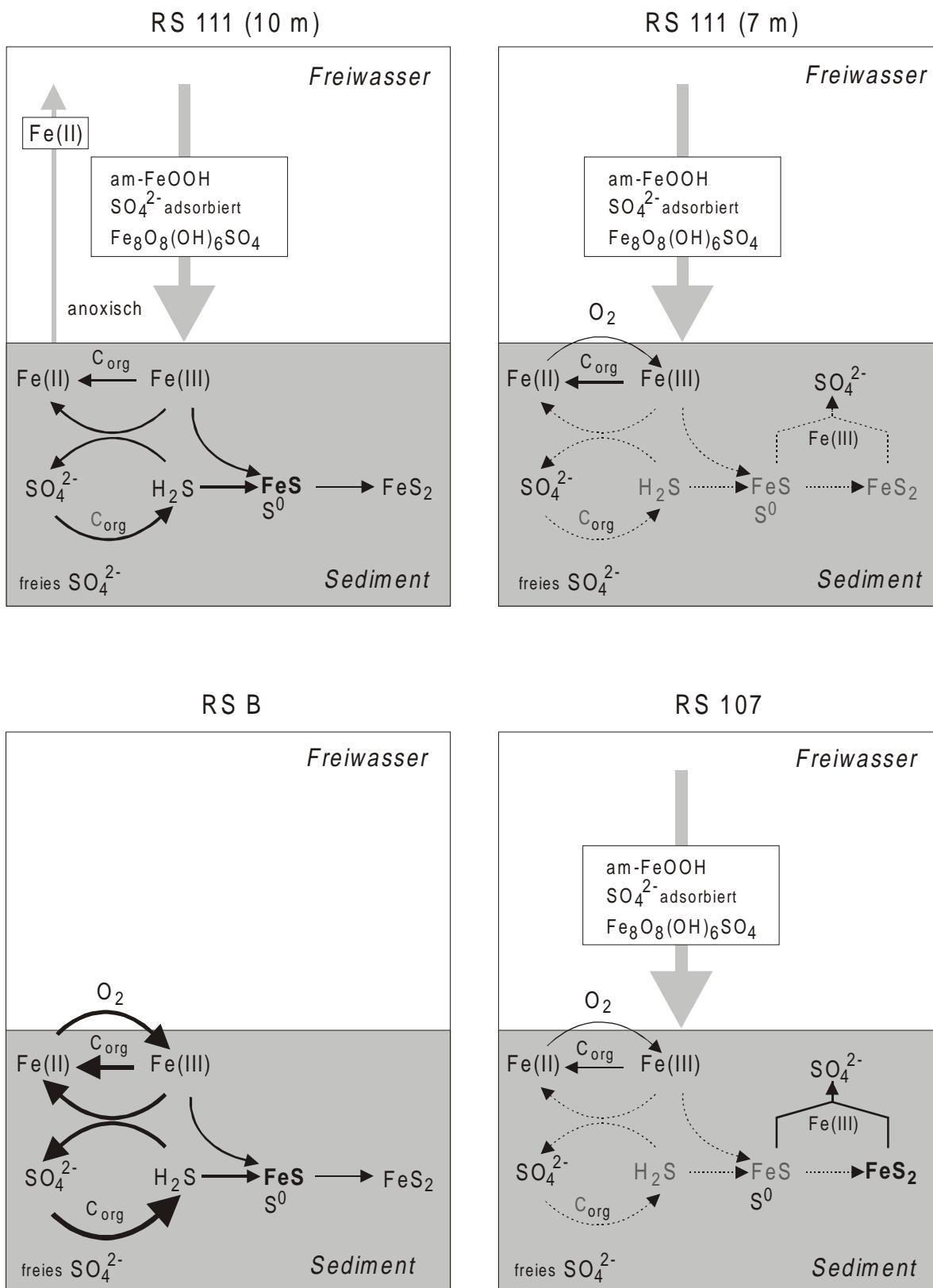


Abb. 4.1: Prozesse des Schwefel- und Eisenkreislaufs an der Sedimentoberfläche und im Sediment der Untersuchungsgewässer.

der Pyritbildung hin. Die Ergebnisse zur Zellzahlbestimmung in verschiedenen Medien sowie die Gewinnung von Reinkulturen zeigen, dass im neutralen RS B andere Mikroorganismen für die Umsetzungen der Eisen- und Schwefelverbindungen verantwortlich sind als in den sauren Restseen RS 111 und RS 107.

Die dargestellten Unterschiede (sowie Gemeinsamkeiten) der vier Standorte sind trotz einer starken Heterogenität der Sedimente in horizontaler Ausdehnung deutlich. Die heterogenen Eigenschaften der Sedimente drücken sich in den hohen prozentualen Standardabweichungen paralleler Messungen an einem Standort sowie beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Probenahmetermine aus. Die Kartierung des Oberflächensedimentes von RS 111 durch Büttner et al. (1998) zeigte eine stark heterogene horizontale Elementverteilung. Der sehr heterogene Charakter der Sedimente von RS 111 wurde in der vorliegenden Arbeit bei dem Vergleich der Probenahmestellen RS 111 (10 m) und (7 m) insgesamt (siehe Kap. 3.1) sowie der Schwefelverbindungen von RS 111 (10 m) (gemessen in April 1997 und August 1997; siehe Kap. 3.2.1) erkennbar. Da die tiefste Stelle in RS 111 eine sehr geringe horizontale Ausdehnung besitzt und die Sedimentbeprobung vom Boot aus stattfand, ist es möglich, dass manche Sedimentkerne am "Rand" dieser Vertiefung entnommen wurden und einen stärker oxidierten Charakter aufweisen. Peine et al. (2000) bestimmten ebenfalls sehr unterschiedliche Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen in neun Sedimentkernen ( $80 - 927 \text{ mmol S m}^{-2}$ ), welche alle nahe der tiefsten Stelle eines benachbarten Restsees (RS 77) entnommen wurden.

Die Sedimentbeprobungen der vier Standorte fanden im Jahr 1997 zu zwei Terminen statt, um eventuelle jahreszeitliche Unterschiede bedingt durch den Einfluss der Temperatur, der Sauerstoffverhältnisse sowie der Primärproduktion und der damit zusammenhängenden Substratverfügbarkeit im Sediment zu erfassen. Deutliche Unterschiede zwischen den Probenahmen im April 1997 und August 1997 (siehe Kap. 3.2) wurden jedoch nicht festgestellt. Dies war nicht überraschend, da die Seen auch in Hinblick auf die oben genannten Parameter keine ausgeprägte Saisonalität aufwiesen. Die Primärproduktion und die Biomasse des Phytoplanktons in den Untersuchungsgewässern ist insgesamt sehr gering (siehe auch Kap. 2.1) (Leßmann et al. 1999, Nixdorf & Hemm 2000, Nixdorf et al. 1998b, Packroff et al. 2000). Größere Temperaturunterschiede über dem Sediment im Jahresverlauf wurden nur in RS 107 gemessen, der eine geringe Wassertiefe besitzt. Änderungen der Sauerstoffverhältnisse traten in RS 111 (10 m) aufgrund der Meromixis nicht ein. An den anderen drei Standorten waren die Unterschiede im Sauerstoffgehalt des Tiefenwassers zu den beiden Probenahmeterminen nicht stark ausgeprägt. Da der Vergleich verschiedener Probenahmetermine keine starken saisonalen Einflüsse erkennen ließ, werden zur folgenden Diskussion des Eisen- und Schwefelkreislaufs vorwiegend die Ergebnisse der Probenahme im April 1997 (siehe Kap. 3.1) herangezogen.

#### 4.1.1 Eisen(III)-Minerale und Sulfattransport

Im Vergleich zu Sedimenten natürlicher Gewässer sind die Sedimente der drei Restseen reich an reaktivem Eisen und gelöstem Sulfat. Hydroxylamin-reduzierbares Eisen(III) und HCl-extrahierbares Eisen(II) gelten als sehr reaktives Eisen, da sie die Fraktion umfassen, die unmittelbar mit Schwefelwasserstoff unter Bildung von Eisensulfiden reagiert (Canfield 1989, Canfield et al. 1992, Lovley & Phillips 1987a). Bezogen auf das Sedimenttrockengewicht enthielten die Sedimente der oberen 10 cm in RS 111 (10 m) bis zu 3,7 %, in RS 111 (7 m) bis zu 5,1 %, in RS 107 bis zu 1,4 % und in RS B bis zu 1,8 % reaktives Eisen (Daten von April 1997). In Sedimenten von RS 111 wurden Werte für Gesamteisen bis zu 8 % (Friese et al. 1998b) und in Sedimenten benachbarter Restseen bis zu 35 % (Blodau et. al 1998, Friese et al. 1998a, Peine et al. 2000) bestimmt. Vergleichend dazu werden die Gehalte an reaktiven Eisen (bzw. Gesamteisen) für marine Sedimente im Bereich der Küste mit Werten von 0,06 - 0,9 % (2,2 – 4 %) (Canfield et al. 1992), für Fjorde mit Werten von 0,6 - 1,5 % (Gagnon et al. 1995), für die Tiefsee mit Werten von 0,7 - 1,6 % (4,2 - 5,6 %) (Haese et al. 1997) und für Salzmarsche mit Werten von 0,5 - 3,7 % (1,7 - 4,7 %) (Duan et al. 1996) angegeben. Die Gehalte an Gesamteisen für Sedimente eines Weichwassersees liegen bei 3,6 - 6,7 % (Cook et al. 1986). Die Sulfatgehalte im Porenwasser der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, lagen über dem mittleren Wert von 25 mM, welcher für marine Sedimente angegeben wird (Nealson 1997). Sogar im neutralen RS B erreichten die Sulfatkonzentrationen mehr als das Zehnfache der für limnische Sedimente üblichen Konzentrationen im Bereich von 100 - 200 µM (Nealson 1997).

Die hohen Gehalte an Eisen und Sulfat in den Sedimenten sind durch die Ausfällung des gelösten Eisens (z. B. aus dem eintretenden, anoxischen Grundwasser) als Fe(III)-Hydroxide und Fe(III)-Hydroxosulfate bei Sauerstoffsättigung im Wasserkörper bedingt (Büttner et al. 1998, Herzsprung et al. 1998, Peine et al. 2000). In Sedimenten von RS 111 bilden Fe(III)-Hydroxide und Fe(III)-Hydroxosulfate neben Quarz und den Tonmineralen Illit und Kaolinit die wesentlichen mineralischen Komponenten (Zachmann et al. 1998). Für den benachbarten RS 77 wurde im Oberflächensediment Schwertmannit als Hauptbestandteil der Eisen-Festphase nachgewiesen, wobei dieses in tieferen Schichten von mehr kristallinen, hauptsächlich aus Goethit bestehenden Eisen-Mineralen abgelöst wird (Peine et al. 2000). Die Bildung von sogenanntem "amorphen Fe(III)-Hydroxid" ( $\text{Fe}^{2+} + 2,5 \text{ H}_2\text{O} + 0,25 \text{ O}_2 \rightarrow \text{Fe(OH)}_3(\text{s}) + 2 \text{ H}^+$ , Bigham et al. 1990) oder "yellow boy" (Brady et al. 1986) ist typisch für AMD-belastete aquatische Systeme. Abhängig von pH-Wert und der Sulfatkonzentration bilden sich eine Reihe von Eisen(III)- und Sulfat-Minerale: Schwertmannit, Jarosit, Ferrihydrit, Goethit, Hämatit und Gips ( $\text{CaSO}_4$ ) (Bigham et al. 1990 und 1996, Brady et al. 1986, Crosby et al. 1983, Ferris et al. 1989). Bei niedrigen pH-Werten und hohen

Sulfatkonzentrationen bildet sich vorrangig Schwermannit, das aufgrund seiner schwach kristallinen Struktur und hohen Reaktivität sowie seinem Vorkommen weitestgehend dem "amorphen Fe-Hydroxid" entspricht (Bigham et al. 1990 und 1996).

Neben der Bildung und Ausfällung von Fe(III)-Hydroxosulfaten stellt die Adsorption von Sulfat an die Oberfläche der sedimentierenden Eisen(III)-Minerale einen wichtigen Mechanismus zum Transport des Sulfats aus dem Wasserkörper ins Sediment dar (Herlihy & Mills 1989). Im Sediment erfolgt die Freisetzung des adsorbierten (und auch des strukturellen, d. h. kristallbildenden) Sulfats durch reduktive Auflösung der Eisen-Minerale (Bridge & Johnson 2000, Roden & Zachara 1996) sowie durch Desorption und Auflösung der Fe(III)-Hydroxosulfate bei erhöhten pH-Werten (Baron & Palmer 1996, Rose & Ghazi 1997). Zudem tritt im Sediment ein Umwandlungsprozess ein, wobei die amorphen bzw. wenig strukturierten, thermodynamisch instabilen Eisen-Minerale (z. B. Schwermannit und Ferrihydrit) in kristallinere Formen, wie Goethit, übergehen (Bigham et al. 1990, Crosby et al. 1983, Ferris et al. 1989, Kuma et al. 1996). Aufgrund der pH- und E<sub>h</sub>- bzw. pe-Werte der Sedimente der untersuchten Restseen ist anzunehmen, dass das amorphe oder mikrobiell reduzierbare Eisen(III) neben gelösten Eisen(III) in den sauren Restseen [z. B. RS 111 (7 m)] zum Teil aus Schwermannit und im neutralen RS B größtenteils aus Ferrihydrit besteht (siehe Abb. 7.3 im Anhang, Bigham et al. 1996). In tieferen bzw. stärker reduzierten Sedimentschichten liegt vermutlich Goethit vor.

#### **4.1.2 Eisen(III)-Reduktion und Reoxidation der reduzierten Eisen(II)-Verbindungen**

In den Sedimenten aller vier Standorte wurde Eisen(II) nachgewiesen, was auf eine Reduktion von Eisen(III) hinweist. Die Reduktion von Fe(III) erfolgt enzymatisch bzw. mikrobiell (Jones 1986, Lovley 1995, Lovley & Phillips 1988, Pronk & Johnson 1992), chemisch z. B. durch Schwefelwasserstoff (Aller & Rude 1988, Canfield 1989, Pyzik & Sommer 1981) oder organische Verbindungen (Lovley et al. 1991) oder durch Photoreduktion (Collienne 1983, McKnight et al. 1988). Letzteres spielt an der Wasseroberfläche, weniger jedoch im anoxischen Bereich der Wassersäule oder im Sediment eine Rolle (Herzsprung et al. 1998). Wegen der hohen Reaktivität vieler Eisen(III)-Oxide steht die chemische Reduktion von Eisen(III) durch H<sub>2</sub>S in starker Konkurrenz zur mikrobiellen Eisen(III)-Reduktion (Canfield et al. 1992). Reduktionsraten berechnet für Ferrihydrit oder Lepidocrocit mit H<sub>2</sub>S liegen in der gleichen Größenordnung, wie die in natürlichen Sedimenten gemessenen maximalen Kohlenstoff-Oxidationsraten (Thamdrup 2000). Die chemische Reduktion von Eisen(III) durch organische Verbindungen ist in der Regel gering (Lovley et al. 1991). Die Stimulierung der Eisen(III)-Reduktion durch die Zugabe reduzierter Huminstoffe oder Huminstoffanaloge deutet jedoch auf ihre Bedeutung für den Elektronentransfer zwischen Eisen(III)-reduzierenden Mikroorganismen und Fe(III)-Oxiden hin (Nevin & Lovley 2000).

Tab. 4.1: Säurelösliches Eisen(II)<sup>a</sup>, säureflüchtiger Schwefel (AVS) und das Verhältnis von AVS zu Fe(II) in den oberen 10 cm der Sedimente von RS 111 (10 m) und RS B (April 1997).

Tiefe (cm)	RS 111 (10 m)			RS B		
	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	AVS/Fe(II)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	AVS/Fe(II)
0 - 1	10,4	0,2	0,02	66,6	0,9	1
1 - 2	11,9	1,0	0,08	79,1	4,7	6
2 - 3	16,4	20,8	> 1	75,3	7,3	10
3 - 4	28,9	16,9	0,59	91,7	10,7	12
4 - 5	41,0	33,8	0,82	78,4	13,2	17
5 - 6	57,9	10,9	0,19	56,4	28,0	50
6 - 7	55,6	20,8	0,37	48,7	17,7	36
7 - 8	100,2	1,6	0,2	36,7	0,5	1
8 - 9	77,9	0,4	0,1	49,4	0,7	1
9 - 10	51,5	3,8	0,7	21,2	0,8	4

<sup>a</sup> 0,5 M HCl-lösliches Fe(II)

In den reduzierten Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B lag der Hauptteil des extrahierten Eisens als Eisen(II) vor. An diesen Standorten ist die Reduktion des Eisen(III) durch  $\text{H}_2\text{S}$  wahrscheinlich, da für alle Horizonte Sulfatreduktion und somit  $\text{H}_2\text{S}$ -Produktion sowie hohe Konzentrationen an säureflüchtigen Schwefel (AVS) nachgewiesen wurden (Daten von April 1997). Der Vergleich der Gehalte von 0,5 M HCl-extrahierbarem Eisen(II) und AVS unter der Annahme, dass das gesamte Sulfid der AVS-Fraktion als FeS vorlag, zeigt, dass in RS 111 (10 m) der Großteil und in RS B maximal 50 % des Eisen(II) aus FeS besteht (Tab. 4.1). In RS 111 (10 m) war bei einer Sedimenttiefe von 2 - 3 cm der Gehalt an AVS größer als der an Eisen(II), folglich war freies Sulfid vorhanden, welches durch den Geruch von  $\text{H}_2\text{S}$  bei der Probenahme bestätigt wurde. Der Nachweis von elementarem Schwefel weist ebenfalls auf die Reduktion von Eisen(III) durch  $\text{H}_2\text{S}$  hin, da dieser bei der Reaktion von z. B. FeOOH mit  $\text{H}_2\text{S}$  entsteht (Pyzik & Sommer 1981).

Da in den Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B nur ein Teil des Eisen(II) als FeS vorlag und in den sauren Sedimenten von RS 111 (7 m) und RS 107 kein AVS bzw. nur in geringfügige Mengen nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass neben der chemischen Reduktion durch  $\text{H}_2\text{S}$  auch eine mikrobielle Reduktion stattfindet. Für RS 111 (10 m) und RS B wurde in Inkubationsexperimenten eine mikrobielle Eisen(III)-Reduktion nachgewiesen (Wendt-Pothoff & Meier 2000). In pH-neutralen Grundwasserleitern, marinen und limnischen Sedimenten sind vorwiegend Vertreter der Gattungen *Shewanella*, *Geobacter*, und *Geothrix* sowie die weniger häufig anzutreffenden Vertreter der Gattungen *Geovibrio*, *Pelobacter*, *Desulfuromusa* und *Desulfuromonas* für die Eisen(III)-Reduktion verantwortlich

(Coates et al. 1996, Lovley 1997, Lowe et al. 2000, Snoeyenbos-West et al. 2000). Cummings et al. (1999, 2000) isolierten aus moderat sauren, durch Grubenwässer belasteten Seesedimenten (pH 5,8 - 6,4) Eisen(III)-reduzierende Bakterien, welche phylogenetisch der *Geobacter*-Gruppe zugehören, sowie ein neues, ebenso neutrophiles Isolat, das als *Ferribacterium limneticum* beschrieben ist. Die genannten Eisen(III)-reduzierenden Bakterien spielen wohl möglich eine Rolle in den moderat sauren bis neutralen Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B. Darauf weisen MPN-Bestimmungen von neutrophilen Acetat-verwertenden Fe(III)RB hin, welche im Vergleich zu RS 111 (7 m) und RS 107 relativ hohe Zellzahlen mit bis zu  $10^5$  Zellen cm<sup>-3</sup> in RS 111 und bis zu  $10^4$  Zellen cm<sup>-3</sup> in RS B ergaben (Wendt-Potthoff & Meier 2000). Acetat ist ein verbreitetes Substrat für neutrophile Eisen(III)-reduzierende Bakterien (Lovley 1997).

Zur Eisen(III)-Reduktion sind ebenfalls manche sulfatreduzierende Bakterien z. B. der Gattung *Desulfovibrio* befähigt, sie sind jedoch häufig nicht in der Lage, Energie über diesen Prozess zu gewinnen (Coleman et al. 1993, Lovley 1995). Der Sporenbildner "*Desulfotomaculum reducens*" dagegen wächst mit Eisen(III), Mangan (IV), Uran(VI) oder Chrom (VI) als Elektronenakzeptoren (Tebo & Obstratzsova 1998). Für die Sedimente von RS B wurden sehr hohe MPN-Werte für SRB bestimmt. Das Isolat *Desulfomicrobium* sp. SRB 12 aus RS B besaß jedoch nicht die Eigenschaft, Eisen(III) zu reduzieren. Die MPN-Werte für SRB in den sauren Restseen, RS 111 und RS 107, waren sehr gering und auch hier war keines der sulfatreduzierenden Isolate in der Lage, Eisen(III) zu reduzieren. Insgesamt liefern die Ergebnisse keinen Hinweis dafür, dass die sulfatreduzierenden Bakterien maßgeblich an der direkten Eisen(III)-Reduktion in den Sedimenten der Restseen beteiligt sind.

Küsel et al. (1999) isolierten einen Eisen(III)-reduzierenden Stamm von *Acidiphilium cryptum* aus Sedimenten des benachbarten RS 77 (pH 3,0 - 6,0, Peine et al. 2000). Außerdem konnten die Autoren anhand von Inkubationsexperimenten darstellen, dass diese Bakterien bedeutend für die Fe(III)-Reduktion am Standort waren. Die hohen MPN-Werte für azidophile, glucoseverwertende Fe(III)RB in RS 111 (10 m) (Daten von April 1999) lassen vermuten, dass Eisen(III)-reduzierende Bakterien der Gattung *Acidiphilium* auch in den Sedimenten von RS 111 und RS 107 eine Rolle spielen. Die heterotrophen Isolate der Gattungen *Sulfobacillus* aus RS 111 (10 m) waren dahingegen nicht fähig, Eisen(III) zu reduzieren, obwohl dies für einige *Sulfobacillus*-Arten beschrieben ist (Bridge & Johnson 1998). Die hohen MPN-Werte für azidophile, schwefelverwertende Fe(III)RB an der Sedimentoberfläche von RS 111 (10 m) (Daten von April 1999) sowie die Fähigkeit der aus den Sedimenten von RS 111 und RS 107 isolierten *Acidithiobacillus ferrooxidans*-Stämme, Eisen(III) zu reduzieren, weisen darauf hin, dass diese Mikroorganismen ebenfalls für die Reduktion von Eisen(III) in den sauren Sedimenten verantwortlich sind. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein reduzierter Schwefelverbindungen, welche reichlich in den Sedi-

menten von RS 111 (10 m) und RS 107 vorhanden waren. Das anaerobe Wachstum von *Acidithiobacillus ferrooxidans* erklärt auch die hohen MPN-Werte von schwefel- und eisen-oxidierenden Bakterien (SOB und FeOB) in anoxischen Sedimenten von RS 111 (10 m).

Das Eisen(II) wird bei geeigneten Bindungspartnern im Sediment festgelegt oder es bleibt in Lösung und wird bei Diffusion in oxische Schichten reoxygeniert (Anderson & Schiff 1987, Schaller et al. 1997). In den Sedimenten von RS 111 (10 m) war ein Teil des Eisen(II) sulfidisch gebunden (siehe Tab. 4.1). In den oberen, schwach sauren Sedimentschichten war dieser Anteil gering und der Verlust durch Diffusion des gelösten Eisen(II) führte zu relativ geringen Eisengehalten an der Sedimentoberfläche und zu erhöhten Eisen(II)-Konzentrationen im anoxischen (sowie sauren) Wasserkörper (Büttner et al. 1998, Friese et al. 1998b, Herzsprung et al. 1998). In den Sedimenten von RS 111 (7 m) und RS 107 lag das Eisen(II) aufgrund des niedrigen pH-Wertes und geringer Konzentrationen an AVS wahrscheinlich vorwiegend in gelöster Form vor. An beiden Standorten war die über dem Sediment stehende Wasserschicht während des Jahresverlaufs meist oder zumindest zeitweilig oxisch und führte zur raschen Reoxygenation des Eisen(II). Der stärker oxidierte Charakter der Sedimente in RS 107 ist anhand des sehr geringen Eisen(II) zu Eisen(III) Verhältnisses an der Sedimentoberfläche zu erkennen. Hohe MPN-Werte von FeOB weisen auf ein hohes Reoxidationspotenzial in den Sedimenten von RS 111 (7 m) und RS 107 hin. In RS B war ein kleinerer Teil des Eisen(II) als in RS 111 (10 m) sulfidisch gebunden. Eine weitere mögliche Bindungsform des Fe(II) im pH-neutralen Bereich ist Siderit. Siderit tritt normalerweise nicht zusammen mit Eisensulfiden auf (Postma 1982, Sigg & Stumm 1996). Bei niedrigen Konzentrationen gelösten Sulfids ist jedoch die Bildung nichtsulfidischer authigener Phasen sowie Siderit möglich (Canfield 1989). Dies ist möglicherweise in Sedimenten von RS B der Fall, da hohe Konzentrationen von reaktivem Eisen die Akkumulation gelösten Sulfids im Porenwasser verhindern. Zudem führt die direkte, mikrobielle Eisen(III)-Reduktion mit paralleler CO<sub>2</sub>-Produktion und der folgenden Reaktion von Eisen(II) mit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zur Bildung von Siderit (Duan et al. 1996). Im Gegensatz zu RS 111 (10 m) war die über dem Sediment stehende Wasserschicht in RS B fast ganzjährig oxisch, so dass an der Sedimentoberfläche ein sehr viel stärkerer Eisen(II)-Gradient [erkennbar an den hohen, oberflächennahen Eisen(II)-Konzentrationen] und eine höhere Reoxidationsrate zu erwarten war.

#### 4.1.3 Sulfatreduktion und Reoxygenation der reduzierten Schwefelverbindungen

In den Sedimenten von RS 111 (7 m) und RS 107 wurde entsprechend den niedrigen pH-Werten (pH < 3,5) und stark positiven Redoxspannungen ( $E_h > 200$  mV) keine sulfatreduzierenden Aktivitäten nachgewiesen. In den Sedimenten von RS 111 (10 m) herrschten lediglich an der Sedimentoberfläche schwach saure Bedingungen und leicht positive Redox-

potenziale vor. Sulfatreduzierende Aktivitäten in diesen oberen Schichten deuteten auf eine Säuretoleranz der sulfatreduzierenden Bakterien hin, eine Eigenschaft welche die sulfat-reduzierenden Isolate jedoch nicht aufwiesen. Sowohl im neutralen als auch in den sauren Restseen wurden in neutralen Medien höhere MPN-Werte für sulfatreduzierende Bakterien als in sauren Medien erzielt. Diese Beobachtung und die neutrophilen Eigenschaften der Isolate lassen vermuten, dass auch in den sauren Restseen [hier RS 111 (10 m)] neutrophile Vertreter für die Sulfatreduktion verantwortlich sind. Es handelt sich jedoch dabei um andere Arten als im neutralen Restsee (siehe auch Kap. 4.2.2). Die Sulfatreduktionsrate in Höhe von  $0,43 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in Sedimenten von RS 111 (10 m) war im Vergleich zu  $2,02 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in Sedimenten von RS B sehr viel geringer (Daten von April 1997 integriert über die obersten 10 cm). Zudem wiesen die geringen MPN-Werte der SRB in Sedimenten von RS 111 (10 m) auf eine Limitierung der Sulfatreduktion trotz circumneutraler und anoxischer Bedingungen in Sedimenten von RS 111 (10 m) hin. Die gemessenen SRR lagen im unteren Bereich von  $0,12 - 226 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , welcher für Sedimente verschiedener limnischer Systeme angegeben wird (Roden & Tuttle 1993). Im oberen Bereich liegen Raten aus circumneutralen Sedimenten in Lake Anna (Virginia). Diese Sedimente befinden sich nahe der Mündungsstelle des AMD-belasteten Contrary Creek (Herlihy et al. 1987). SRR mariner Sedimente liegen im Bereich von  $0,001 - 712 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Skyring 1987). Für Sedimente mit pH-Werten unter pH 4 werden in der Literatur sehr geringe Raten angegeben:  $0,16 - 1,52 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in Reservoir 29 (Indiana) mit pH 3,8 (Gyure et al. 1990) und  $0,8 \pm 0,2 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in RS 77 (Niederlausitz) bei pH 3,0 - 6,0 (Peine et al. 2000).

Durch Zugabe von Pyruvat, Lactat oder Acetat, welche geeignete Kohlenstoff- und Energiequellen für sulfatreduzierende Bakterien darstellen (Hansen 1993, Widdel 1989, Widdel & Bak 1992), wurde die Sulfatreduktion in den Sedimenten von RS 111 (10 m) stimuliert. Dies weist auf eine Substratlimitierung der Sulfatreduktion bezüglich der Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren hin. In nichtsulfatlimitierten Systemen ist die Sulfat-reduktion nicht nur von der Menge sondern auch von der biologischen Abbaubarkeit des vorliegenden organischen Materials abhängig (Westrich & Berner 1984). Die niedrigen SRR in den Kontrollansätzen (ohne zugesetztes Substrat) sowie *in situ* SRR demonstrieren, dass Substrate in den Sedimenten von RS 111 (10 m) verfügbar sind, diese jedoch aus refraktären Materialien bestehen. Die hohen Glühverluste der Sedimente weisen auf hohe Gehalte an organischen Kohlenstoff hin. Zudem wurden im Porenwasser der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, sehr hohe Gehalte an gelöstem Kohlenstoff festgestellt.

Die Untersuchung des organischen Kohlenstoffs in Sedimenten benachbarter Restseen (RS 77 und RS 117) ergab, dass diese zu 50 - 90 % aus Braunkohle oder Braunkohle-verwitterungsprodukten, zu 10 - 30 % aus terrigenen und 0 - 30 % aus aquagenen Material

bestehen (Nohlen 1999). Trotz des geringen Anteils des aquagenen organischen Kohlenstoffs (AOC) zeigten Blodau et al. (2000), dass AOC in diesen Sedimenten hauptsächlich zu der an die Eisen(III)- und Sulfatreduktion gekoppelten Kohlenstoff-Oxidation beiträgt. Aufgrund der geringen Primärproduktion in den sauren Restseen der Niederlausitz ist die autochthone Bildung dieser leicht abbaubaren Kohlenstoffquelle limitiert (Kapfer 1998, Nixdorf et al. 1998a,b). Die Braunkohle selbst stellt keine geeignete Kohlenstoffquelle dar, da sie bedingt durch ihre hohe Hydrophobizität und hochpolymere Struktur nur von wenigen Mikroorganismen (meist Basidiomyceten) abgebaut werden kann. Zudem ist über den Abbau von Braunkohle unter anoxischen Bedingungen sehr wenig bekannt (Fakoussa & Hofrichter 1999). Die hohen DOC-Konzentrationen im Porenwasser sind auf Kohleverwitterungsprodukte zurückzuführen, welche hauptsächlich aus aromatischen Polycarbonsäuren bestehen (Blodau et al. 1998, Friese et al. 1998b, Nohlen 1999). Die Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren lagen im Porenwasser von RS 111 (10 m) unterhalb der Nachweisgrenze (K. Küsel, Bitök Bayreuth, pers. Mitt.). Das sehr diverse Substratspektrum der sulfatreduzierenden Bakterien umfasst aromatische Verbindungen einschließlich polycyclischer Kohlenwasserstoffe (Galushko et al. 1999, Hansen 1993, Schink et al. 2000, Widdel 1989). Es wurde jedoch bei keinem der sulfatreduzierenden Isolate aus den sauren Restseen Wachstum auf Benzoat beobachtet. Benzoat diente hier als Modellsubstanz, da eine Vielzahl von aromatischen Verbindungen über den Benzoyl-CoA-Reaktionsweg abgebaut werden (Schink et al. 2000). Blodau et al. (2000) stellten eine schwach negative Korrelation zwischen den an die Eisen(III)- bzw. Sulfatreduktion gekoppelten Kohlenstoff-Oxidationsraten und den DOC-Konzentrationen im Porenwasser fest. Sie folgerten daraus, dass der DOC nicht als Kohlenstoff- oder Energiequelle durch die Eisen(III)- oder sulfatreduzierenden Bakterien genutzt wird.

Die Substratlimitierung der Sulfatreduktion wird verstärkt durch die Konkurrenz der Eisen(III)reduzierenden Bakterien um das organische Substrat. Die Eisen(III)-Reduktion ist gegenüber der Sulfatreduktion der thermodynamisch günstigere Prozess und kann aufgrund dieses kompetitiven Mechanismus zur Inhibierung der Sulfatreduktion führen (Chapelle & Lovley 1992, King 1990, Lovley & Phillips 1987b). Der Energieertrag durch die Reduktion von amorphen Fe(III)-Hydroxid liegt höher als von kristallinen Formen wie Goethit oder Jarosit, daher ist in Anwesenheit von amorphem Eisen(III) die Eisen(III)-Reduktion gegenüber der Sulfatreduktion stets der favorisierte Prozess (Blodau et al. 1998, Postma & Jakobsen 1996, Thamdrup 2000). In den Sedimenten der untersuchten Restseen, insbesondere von RS 111 (7 m) und RS 107, lag amorphes Eisen(III) vor und die Eisen(III)-Reduktion kann daher durch den Verbrauch der ohnehin knappen Ressourcen organischer Substrate zur Limitierung der Sulfatreduktion beitragen. Dennoch fanden in den Sedimenten von RS 111 (10 m) und auch RS B Eisen(III)- und Sulfatreduktion simultan statt (Wendt-

Potthoff & Meier 2000). Es ist auch zu beachten, dass die Konkurrenz um Kohlenstoffquelle und Elektronendonatoren von den Eisen(III)-reduzierenden Bakterien und ihrem jeweiligen Substratspektrum abhängig ist. *Acidiphilium cryptum* oxidiert verschiedene Monosaccharide, Alkohole sowie H<sub>2</sub>, jedoch keine kurzkettigen Fettsäuren (Küsel et al. 1999). Im Gegensatz dazu nutzen neutrophile *Geobacter* ssp. und viele sulfatreduzierenden Bakterien, einschließlich der sulfatreduzierenden Isolate aus den untersuchten Sedimenten, seltener Monosaccharide aber häufig kurzkettige Fettsäuren als Substrat. *Acidithiobacillus thiooxidans* wächst autotroph und nutzt elementaren Schwefel als Energiequelle (Pronk et al. 1992) und stellt somit keine Konkurrenz bezüglich der Kohlenstoff- und Energiequelle dar.

Während in den Sedimenten von RS 111 (10 m), RS 107 und RS B große Mengen an reduzierten Schwefelverbindungen in den oberen 10 cm der Sedimente festgestellt wurden, waren die Gehalte reduzierter Schwefelverbindungen in RS 111 (7 m) sehr gering. Es wird angenommen, dass das sedimentierende Material sich in seiner Zusammensetzung an den beiden Standorten in RS 111 nicht grundlegend unterscheidet und dass daher die reduzierten Schwefelverbindungen in den Sedimenten von RS 111 (10 m) authigenen Ursprungs sind, d. h. durch frühdiagenetische Prozesse gebildet wurden. Isotopenuntersuchungen zeigten für die S<sup>0</sup>- und FeS<sub>2</sub>-Fraktion in manchen Sedimentschichten von RS 111 (10 m) positivere  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte als für die AVS-Fraktion (Fauville 2000, Friese et al. 1998b). Diese sind durch den Eintrag von im Kippenmaterial vorhandenen primären Pyrit sowie dessen Oxidationsprodukten zu erklären. Der überwiegende Teil der reduzierten Schwefelverbindungen wurde jedoch in der AVS-Fraktion wiedergefunden und ist folglich auf eine Neubildung im Sediment zurückzuführen. In Sedimenten von RS 107 waren die Gehalte an reduzierten Schwefelverbindungen sehr hoch, obwohl keine sulfatreduzierenden Aktivitäten festgestellt wurden. Es könnte sich hierbei ebenfalls um primären Pyrit handeln, denkbar wäre aber auch eine Neubildung durch episodisch auftretende Sulfatreduktion. Trotz seiner insgesamt geringen Tiefe stellten sich aufgrund lang anhaltender Eisbedeckung anoxische Bedingungen in den tiefsten Wasserschichten von RS 107 ein. Außerdem stellen in RS 107 die dicht wachsenden, benthischen Algen eine mögliche Quelle leicht abbaubarem, organischen Materials dar und könnten unter anoxischen Bedingungen zu hohen SRR führen. Es wurde zwar zu keinem Probenahmetermin Sulfatreduktion nachgewiesen, jedoch wurden im April 1997 geringe Konzentrationen an AVS festgestellt, wobei AVS ein Hinweis für Sulfatreduktion ist (Thode-Andersen & Jørgensen 1989). Vermutlich setzt sich der reduzierte Schwefel in den Sedimenten des RS 107 aus unterschiedlichen Anteilen primären und neugebildeten Pyrits zusammen.

Die hohen Zellzahlen von schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien (SOB und FeOB) an der Sedimentoberfläche der vier Standorte demonstrieren ein hohes Reoxidationspotenzial. Die Reoxidation in RS 111 (10 m) und RS B kann durch den Vergleich der

integrierten SRR mit den Akkumulationsraten des gesamten reduzierten anorganischen Schwefels (TRIS) abgeschätzt werden. Dabei wurde angenommen, dass die reduzierten Schwefelverbindungen authigenen Ursprungs sind. Für die oberen 10 cm des Sediments in RS B wurde ein Alter von ca. 30 Jahren, was dem Alter des Sees entspricht, angenommen. Der Untergrund des Sedimentes bzw. der Boden des Tagebaus war durch hohe Gehalte an Quarzsand charakterisiert und wurde in den meisten Sedimentkernen bei einer Tiefe von ca. 10 cm angetroffen. Dies stimmt gut mit der Datierung mittels Radioisotopen überein (Friese 1998). Danach erhält man eine Akkumulationsrate für TRIS von  $45 \text{ mmol S m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  (Daten von April 1997 integriert über die oberen 10 cm). Verglichen mit der integrierten SRR von  $738 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  ergibt sich eine Reoxidation der reduzierten Schwefelverbindungen von 94 % in Sedimenten von RS B. In RS 111 (10 m) lieferte die Datierung mit Radioisotopen keine eindeutigen Ergebnisse (Friese 1998). Friese et al. (1998b) schätzten, dass nur die oberen 14 cm des Sedimentes sich in den letzten 30 - 40 Jahren seit Einstellung bergbaulicher Aktivitäten ablagerten. Wird wie für RS B für die oberen 10 cm der Sedimente ein Alter von 30 Jahren angenommen, ergibt sich eine Akkumulationsrate für TRIS von  $60 \text{ mmol S m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  (Daten von April 1997 integriert über die oberen 10 cm). Verglichen mit der integrierten SRR von  $156 \text{ SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  erhält man eine Reoxidation der reduzierten Schwefelverbindungen von 61 % in Sedimenten von RS 111 (10 m). Dieser Wert ist sehr gering im Vergleich zu Reoxidationswerten angegeben für marine Sedimente im Bereich von 72 - 94 % (Boesen & Postma 1988, Thamdrup et al. 1994). Der Anteil wird noch geringer, wenn die oberen 10 cm des Sedimentes jüngeren Datums sind, was wahrscheinlich der Fall ist. Die geringe Reoxidation ist durch eine limitierte Zufuhr an Oxidanten als Folge des permanent anoxischen Monimolimnion bedingt. Die Hauptquelle an Oxidanten bilden sedimentierende Fe(III)-Hydroxide und Fe(III)-Hydroxosulfate.

Bei den nach der MPN-Methode bestimmten azidophilen SOB in den Sedimenten der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, handelt es sich wahrscheinlich überwiegend um *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Dieser Organismus wurde am häufigsten aus den MPN-Verdünnungsreihen isoliert und ist in der Lage, sowohl reduzierte Schwefelverbindungen als auch Eisen(II) zu oxidieren. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die MPN-Werte der SOB weitgehend deckungsgleich mit denen der FeOB waren [insbesondere in RS 111 (10 m) und (7 m)]. Die alternative Nutzung von Eisen(II) erklärt zudem die hohen Zellzahlen von SOB trotz geringer Konzentrationen von reduzierten Schwefelverbindungen in Sedimenten von RS 111 (7 m). Vertreter der Gattungen *Sulfovibacillus* und *Alicyclobacillus* wurden vorwiegend aus tieferen Sedimentschichten von RS 111 (10 m) isoliert, wo im Vergleich zur Sedimentoberfläche ein großer Teil der eisen- und schwefeloxidierenden Bakterien als Sporen vorlagen. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass diese Organismen an der Sedimentoberfläche den Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* zahlenmäßig unter-

legen sind und in tieferen Sedimentschichten weitgehend inaktiv sind, und daher eine weniger bedeutende Rolle am Standort spielen. Die Präferenz der SOB für neutrales Medium deutet daraufhin, dass in Sedimenten von RS B andere Mikroorganismen für die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen verantwortlich sind. Thiosulfat, welches als reduzierte Schwefelverbindung in den MPN-Medien für SOB eingesetzt wurde, wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen als Elektronendonator genutzt (Stubner et al. 1998, Teske et al. 2000), welche nicht alle zu den typischen schwefeloxidierenden Bakterien zählen (Kelly et al. 1997, Robertson & Kuenen 1992). Das hier verwendete Medium enthielt keine organischen Kohlenstoffquellen, d. h. insbesondere in den hohen Verdünnungsstufen waren autotrophe Organismen zu erwarten. Autotroph wachsende, thiosulfatoxidierende Bakterien besitzen meist die Eigenschaft, auch andere reduzierte Schwefelverbindungen wie z. B. S<sup>0</sup> zu oxidieren (Brinkhoff et al. 1999a und b, Stubner et al. 1998). Daher wird angenommen, dass es sich bei den Zählungen für RS B wirklich um SOB handelte und dass deren Zellzahl unter Verwendung eines thiosulfathaltigen Mediums nicht überschätzt wurde.

#### 4.1.4 Kontrolle der Pyritbildung

Auffällig in den Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B sind die geringen Gehalte an chromreduzierbaren Schwefel (CRS) bzw. Pyrit (FeS<sub>2</sub>) im Vergleich zu den sehr hohen Gehalten an AVS. Das Verhältnis von AVS zu FeS<sub>2</sub>-S, der Bildungsgrad von Pyrit (DOP) und Bildungsgrad von sulfidischem Eisen (DOS) der oberen 10 cm der Sedimente von RS 111 (10 m) und RS B sind dargestellt in Tab. 4.2. Dabei wurde angenommen, dass der gesamte reduzierte anorganische Schwefel (TRIS) authigenen Ursprungs ist. Diese Parameter wurden nicht für die Sedimente von RS 107 bestimmt, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass der Hauptteil des bestimmten TRIS-Gehaltes im Sediment neugebildet wurde. Sie wurden ebenfalls nicht für RS 111 (7 m) bestimmt, da hier nur sehr geringe TRIS-Gehalte vorlagen.

Das hohe AVS/FeS<sub>2</sub>-S Verhältnis in Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B bedeuten ein frühes Stadium der Pyritbildung (Duan et al. 1996) oder die eingeschränkte Umsetzung von FeS zu FeS<sub>2</sub> (Gagnon et al. 1995). Die maximalen Werte des AVS/FeS<sub>2</sub>-S Verhältnisses von 8,1 in RS 111 (10 m) und 5,7 in RS B liegen über oder im oberen Bereich (0,02 bis 7,2) der AVS/FeS<sub>2</sub>-S Verhältnisse mariner Küstensedimente (Gagnon et al. 1995). Die Restseen sind zwar noch relativ jung, die Wiederfindung des reduzierten <sup>35</sup>S-Schwefels in der CRS- bzw. FeS<sub>2</sub>-Fraktion nach wenigen Stunden Inkubationszeit zur Bestimmung der SRR weisen jedoch darauf hin, dass Pyrit unmittelbar als Folge der dissimilatorischen Sulfatreduktion entstehen kann. Die Bildung von Pyrit als "shortterm end product" der Sulfatreduktion in

Tab. 4.2: Reaktives Eisen<sup>a</sup>, chromreduzierbarer Schwefel (CRS)<sup>b</sup>, Anteil an elementarem Schwefel ( $S^0$ )<sup>c</sup>, das Verhältnis von säureflüchtigen Schwefel (AVS) zu Pyritschwefel ( $FeS_2$ -S), die Bildungsgrade von Pyrit (DOP) und sulfidischem Eisen (DOS) in den Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B (April 1997). (Für AVS-Gehalte vergleiche Tab. 4.1).

Tiefe (cm)	RS 111 (10 m)						RS B					
	Fe ( $\mu\text{mol Fe}$ $\text{cm}^{-3}$ )	CRS ( $\mu\text{mol S}$ $\text{cm}^{-3}$ )	$S^0$ % von CRS	AVS/ $FeS_2$ -S	DOP	DOS	Fe ( $\mu\text{mol Fe}$ $\text{cm}^{-3}$ )	CRS ( $\mu\text{mol S}$ $\text{cm}^{-3}$ )	$S^0$ % von CRS	AVS/ $FeS_2$ -S	DOP	DOS
0 - 1	12,0	8,1	64	0,1	0,11	0,12	81,0	2,5	33	0,5	0,01	0,02
1 - 2	15,6	7,6	65	0,4	0,08	0,14	71,9	5,3	81	4,7	0,01	0,07
2 - 3	17,4	10,5	51	4,1	0,13	> 1	89,4	3,8	21	2,5	0,02	0,10
3 - 4	31,7	3,1	9	6,1	0,04	0,55	98,9	5,2	42	3,6	0,02	0,12
4 - 5	82,1	13,5	69	8,1	0,03	0,42	83,4	11,5	75	4,6	0,02	0,17
5 - 6	79,0	6,9	61	4,1	0,02	0,15	51,0	8,6	43	5,7	0,05	0,60
6 - 7	55,7	10,8	55	4,2	0,04	0,40	56,2	9,5	37	2,9	0,05	0,35
7 - 8	75,4	3,5	18	0,6	0,02	0,04	40,5	1,6	29	0,5	0,01	0,03
8 - 9	57,1	1,8	31	0,3	0,01	0,02	37,6	2,2	21	0,4	0,02	0,04
9 - 10	37,6	4,7	47	1,5	0,03	0,13	27,6	1,0	34	1,2	0,01	0,04
0 - 10	463	71	45	3,5	0,03	0,26	637	51	51	3,3	0,02	0,15

<sup>a</sup> 0,5 M HCl-lösliches Fe(II) plus Hydroxylamin-reduzierbares Fe(III)

<sup>b</sup> Mittelwert von zwei Parallelten

<sup>c</sup> bestimmt an einer Parallele

Sedimenten wird häufig beobachtet und wurde zuerst durch Howarth und Mitarbeiter beschrieben (Howarth 1979, Howarth & Giblin 1983, Howarth & Jørgensen 1984, Howarth & Merkel 1984). Von daher wird angenommen, dass die geringen Gehalte an Pyrit nicht durch das junge Alter von RS 111 (10 m) und RS B bedingt sind, sondern dadurch dass die Umwandlung von FeS in FeS<sub>2</sub> eingeschränkt ist.

Die Pyritbildung in (jüngeren) Sedimenten ist abhängig von den Sulfatreduktionsraten und dem Gehalt an reaktivem Eisen (Berner 1984). Während die Verfügbarkeit an reaktivem Eisen den Gehalt an sulfidisch gebundenen Fe bestimmt, kontrolliert die Verfügbarkeit an freiem Sulfid das Verhältnis von FeS zu FeS<sub>2</sub> (Boesen & Postma 1988, Canfield et al. 1992). In den untersuchten Restseen führt der hohe Gehalt an sehr reaktivem Eisen zu einem hohen Gehalt an sulfidisch gebundenen Eisen, was durch die hohen DOS-Werte von bis zu 0,55 in RS 111 (10 m) (Sedimentschicht von 2 - 3 cm ausgenommen) und 0,60 in RS B ausgedrückt wird. Da nicht die FeS- sondern die AVS-Gehalte in den Sedimenten bestimmt wurden und letztere der Berechnung von DOS zugrunde liegen, kann das zumindest in RS 111 (10 m) zu einer leichten Überschätzung der DOS-Werte führen (siehe Sedimentschicht von 2 - 3 cm). Die berechneten maximalen DOS-Werte liegen in dem Bereich, der für marine Sedimente angegeben wird, welche von einem anoxischen teilweise sulfidischen Wasserkörper überlagert sind: 0,2 - 0,6 im Bornholm und Gotland Tief der Ostsee (Boesen & Postma 1988), bis zu 0,4 im Saguenay Fjord (Gagnon et al. 1995), bis zu 0,93 im hypersalinen Tyro und Bannock Bassin des Mittelmeeres (Henneke et al. 1997) und bis zu 0,47 im Schwarzen Meer (Lyons 1997). Im Gegensatz zu den DOS-Werten sind die maximalen DOP-Werte von 0,13 in RS 111 (10 m) und 0,05 in RS B sehr gering. In den Sedimenten von RS 111 (10 m) und RS B führt der hohe Gehalt an reaktivem Eisen zu einer begrenzten Verfügbarkeit an freiem Sulfid. Außerdem sind in RS 111 (10 m) die SRR und somit die H<sub>2</sub>S-Produktion sehr niedrig. Gagnon et al. (1995) führten ungewöhnlich hohe AVS-Gehalte in Sedimenten von Saguenay Fjord (Kanada) darauf zurück, dass ein Überschuss an Eisen die Akkumulation von freiem Sulfid im Porenwasser verhindert. Dadurch fehlen starke Konzentrationsgradienten und die Diffusion des Sulfids zur Redoxgrenze wird verlangsamt. Die Bildung intermediärer reduzierter Schwefelverbindungen ist somit eingeschränkt und führt zur Limitierung der Pyritbildung, wenn man davon ausgeht, dass Pyrit über die Reaktion von FeS mit zerovalenten Schwefel entsteht. Ebenso limitiert der Mangel an Oxidanten die Bildung intermediärer reduzierter Schwefelverbindungen und somit die Pyritbildung (Middelburg 1991). Diese Art der Limitierung ist ebenfalls denkbar für die Sedimente von RS 111 (10 m) und RS B. Dem widersprechen zunächst die relativ hohen Gehalte an elementarem Schwefel (S<sup>0</sup>) in den Sedimenten, welche auf die Reoxidation von freiem Sulfid durch Eisen(III) zurückzuführen sind. Reagiert der gebildete S<sup>0</sup> weiter mit HS<sup>-</sup>, so entstehen bei diesem Prozess außerdem Polysulfide (Pyzik & Sommer 1981), welche die eigentlichen

Reaktionspartner für FeS zur Bildung von FeS<sub>2</sub> darstellen (Luther 1991). Sind jedoch die Konzentrationen an H<sub>2</sub>S bzw. HS<sup>-</sup> gering, so ist die Bildung von Polysulfiden und folglich auch die Umsetzung des FeS in FeS<sub>2</sub> limitiert.

Für die sauren Restseen ist in Hinblick auf eine Neutralisierung die Festlegung des reduzierten Schwefels in der stabileren Form des Pyrit von großem Interesse. Nach obigen Überlegungen würde eine Steigerung der SRR (z. B. durch Zugabe von Kohlenstoffquellen) und/oder eine Abnahme des verfügbaren reaktiven Eisens [z. B. durch Unterbindung des weiteren Eintritts Eisen(II)-haltigen Grundwassers] zur verstärkten Pyritbildung führen.

#### 4.1.5 Alkalinitätsbildung und Entwicklung der Seen

Anhand der Akkumulationsraten der reduzierten Schwefelverbindungen in den Sedimenten wurden für RS 111 (10 m) und RS B eine Neutralisierungs- bzw. Alkalinitätsbildungsrates von 121 bzw. 90 mmol H<sup>+</sup> m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> (meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup>) berechnet (Daten von April 1997 integriert über die oberen 10 cm). Die ebenfalls auf Grundlage des TRIS-Gehaltes im Sediment berechneten Alkalinitätsbildungsraten lagen im Edelmann-See (Tagebau-Restsee bei Schwandorf in Bayern) bei 54 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> (Peine & Peiffer 1998) und im Scharmützelsee (Berlin) bei 32 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> (Kleeberg 1998). Schindler (1986) gibt für Alkalinitätsbildungsraten verschiedener Seen einen Bereich von 118 - 765 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> an, wobei die Berechnung auf die Massenbilanzierung von Alkalinität-Titrationswerten basiert. Schindler et al. (1986) bestimmten für einen unbehandelten See (Lake 239) des Experimental Lake Area (ELA), Ontario, aufgrund der Massenbilanzierung nicht protolytischer Ionen eine Alkalinitätsbildungsrates von 74 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup>, davon entfielen 53 % auf die Eliminierung von Sulfat. Für experimentell mit Schwefelsäure angesäuerte Seen wurden Raten von 288 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> (85 % durch Sulfat-Eliminierung, Lake 223, ELA, Cook et al. 1986) und 89 meq m<sup>-2</sup> a<sup>-1</sup> (60 % durch Sulfateliminierung, Little Rock Lake, Wisconsin, Sampson et al. 1994) bestimmt. Die Alkalinitätsbildung in RS 111 (10 m) und RS B ist somit vergleichbar mit der natürlicher sowie durch Versauerung belasteter Seen.

Die seeinterne Alkalinitätsbildung führt im Laufe der Entwicklung zur Neutralisierung. Dieser "Alterungs-" oder "Reifungsprozess" wurde für verschiedene schwefelsaure Tagebau-Restseen beobachtet (Campbell & Lind 1969, Peine & Peiffer 1998). Für den bereits neutralen RS B wurde während des Untersuchungszeitraumes von zwei Jahren eine Abnahme des Sulfats im Porenwasser insbesondere in der Sedimenttiefen größer als 6 cm beobachtet. Dieser "Trend" ist jedoch mit Vorsicht zu behandeln, da erstens nur Daten von vier Probenahmeterminen vorliegen und zweitens die Sulfatkonzentrationsprofile in sehr grober Auflösung (d. h. die Abstände zwischen den Messpunkten eines Profils sind sehr groß) aufgenommen wurden. Eine Abnahme der Sulfatkonzentration von ca. 5 mM auf ca. 3 mM (Sedimenttiefe von 6 - 10 cm) im Verlauf von zwei Jahren kann durch eine seeinterne

Sulfatreduktion mit Raten im Bereich von  $10 - 50 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$  und einer Reoxidation des Sulfids von 94 % erklärt werden. Ist dies der Fall, so müsste sich die Abnahme des Sulfats im Porenwasser in der Zunahme der reduzierten Schwefelverbindungen niederschlagen. In Anbetracht des geringen Betrages von ca.  $2 \mu\text{mol S cm}^{-3}$  und einer relativen Standardabweichung von bis zu 42 % bei der Bestimmung der reduzierten Schwefelverbindungen ist dies jedoch nicht nachvollziehbar. Der Einfluss von sulfatarmen Grundwasser ist zudem nicht auszuschließen.

Die Beobachtung eines "Trends" konnte für die anderen Messparameter sowie für die Sedimente der sauren Restseen nicht gemacht werden, wofür auch der Untersuchungszeitraum von zwei Jahren zu kurz ist. Jedoch wird auch längerfristig für die sauren Restseen keine Entwicklung in Richtung Neutralisierung, welche ausschließlich auf natürliche seeinterne Prozesse beruht, erwartet. Die Sedimente in RS 111 (7 m) und RS 107 zeigten trotz eines Alters von ca. 40 bzw. 70 Jahren einen stark oxidierten Charakter und sehr geringe pH-Werte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten weisen zwar auf ein Neutralisierungspotenzial hin (sulfatreduzierende Bakterien sind in den Sedimenten der sauren Seen vorhanden), das unter günstigen Bedingungen aktiviert werden kann [z. B. durch anoxische Verhältnisse, wie im RS 111 (10 m)], dieses ist jedoch stark durch die Verfügbarkeit von geeigneten Kohlenstoff- und Energiequellen limitiert. Der Abbau organischer Substanz im See liefert nicht nur die für die sulfatreduzierenden Bakterien notwendigen Substrate, sondern schafft zudem ein anoxisches Milieu und die Anhebung der pH-Werte über pH 4, so dass Sulfatreduktion stattfinden kann (Küsel & Dorsch 2000, Tuttle et al. 1969b, Wakao et al. 1979). Die Primärproduktion, welche für die seeinterne Produktion leicht abbaubarer organischer Substanz verantwortlich ist, ist jedoch unter den in den sauren Restseen herrschenden Bedingungen zu gering. Daher bildet die kontrollierte Zugabe geeigneter Kohlenstoffquellen die Grundlage von Sanierungsansätzen zur Stimulierung der *in situ*-Sulfatreduktion in sauren Restseen der Niederlausitz (Klapper & Schultze 1995, Frömmichen 2001). Die Bedeutung der Sulfatreduktion liegt darin, die pH-Werte im Sediment über pH 5 anzuheben und durch die Bildung von freiem Sulfid als geeigneter Bindungspartner das reduzierte Eisen im Sediment festzulegen (siehe auch Peine et al. 2000).

#### **4.2 Funktion und Diversität der isolierten Bakterienstämme**

Die Sedimente der sauren Restseen stellen bezüglich ihrer hohen Azidität und Eisengehalte sowie der Kohlenstofflimitierung Extremstandorte dar. Die Besiedlung von Extremstandorten wird bestimmt durch die physiologischen Eigenschaften der Organismen und ihren Toleranzgrenzen gegenüber den vorherrschenden Stressfaktoren. Oft handelt es sich hierbei um

wenige Spezialisten, deren Wachstum aufgrund besonderer (physiologischer) Adaptationen innerhalb einer engen Toleranzgrenze auf dieses besondere Habitat beschränkt ist. Dies geht einher mit einer geringen Diversität, wohingegen unter moderaten Bedingungen die Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Populationen die Struktur der Lebensgemeinschaft bestimmen und eine höhere Diversität ermöglichen (Atlas & Bartha 1993). Diversität kann dabei sowohl im Sinne von Artenvielfalt (*species richness*) aber auch als Vielfalt metabolischer Fähigkeiten verstanden werden (Amann 2000, Atlas 1984, Trüper 1992). Die Vielzahl an Mikroorganismen, welche bereits für schwefelsaure Habitate beschrieben sind (Johnson 1998, Robbins 2000, siehe auch Tab. 1.1), sowie die Hinweise auf neue, noch unbekannte Organismen mittels 16S rRNA Gen-Analysen mikrobieller Lebensgemeinschaften an diesen Standorten (Bond et al. 2000, Burton & Norris 2000) zeigen, dass schwefelsaure Habitate trotz extremer Bedingungen nicht unbedingt artenarm sein müssen.

Aus den Sedimenten der sauren Restseen wurden 22 schwefel- und eisenoxidierende, darunter sechzehn autotrophe und sechs heterotrophe, sowie neun sulfat-reduzierende Bakterienstämme isoliert. In Hinblick auf das Vorhandensein geeigneter physiologischen Fähigkeiten und Anpassungsstrategien sowie die Diversität ihrer Phylotypen zeigten diese drei Gruppen untereinander große Unterschiede. Insgesamt ließ sich jedoch feststellen, dass, bezogen auf die Mikroorganismen des Eisen- und Schwefelkreislaufs, die Sedimente der sauren Restseen eine geringe Artenvielfalt aufwiesen. Die allgemein geringe Artenvielfalt der sauren Tagebau-Restseen im Vergleich zu natürlichen schwefelsauren Habitaten (z. B. Vulkanseen in Argentinien, W. Geller, UFZ-Gewässerforschung, Magdeburg, pers. Mitt.) ist vielleicht auf das relativ junge Alter der Restseen zurückzuführen.

#### 4.2.1 Schwefel- und eisenoxidierende Bakterien

Die Mehrzahl der azidophilen, schwefel- und eisenoxidierenden Isolate aus den Sedimenten der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, waren autotroph und sind aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung der 16S rDNA mit bereits beschriebenen Stämmen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* dieser Art zuzuordnen. *A. ferrooxidans* ist ein Beispiel für einen hoch spezialisierten Organismus (z. B. bezüglich seiner Autotrophie: Kuenen & Bos 1989, Kelly & Harrison 1989), welcher gut an extreme Bedingungen angepasst ist (z. B. Adaptation des Elektronentransportsystems an hohe, extrazelluläre H<sup>+</sup>-Konzentrationen: Ingledew 1982, Kelly & Harrison 1989). Die Dominanz von *A. ferrooxidans* gegenüber den heterotrophen Vertretern der Gattungen *Sulfobacillus* und *Alicyclobacillus* ssp. unter den Isolaten aus den oberen Sedimentschichten gibt einen Hinweis auf die dominierende Rolle am Standort. Vermutlich ist *A. ferrooxidans* auch der einzige autotrophe Vertreter unter den schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien. Zu den ebenfalls autotrophen, an der Oxidation sulfidischer

Erze beteiligten Organismen gehören *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans*, die häufig zusammen mit *A. ferrooxidans* isoliert (z. B. Berthelot et al. 1997, Goebel & Stackebrandt 1994, Wakao et al. 1991) oder direkt mittels molekularbiologischer Methoden in Umweltproben nachgewiesen wurden (z. B. Gensonden: Edwards et al. 1999, oder Sequenzierung der 16S/23S rDNA-Spacer Region: Vasquez & Espejo 1997). Die in dieser Arbeit verwendete Isolationstechnik erfasst in der Regel auch *A. thiooxidans* und *L. ferrooxidans* (Johnson 1995). Ihre Abwesenheit auf den Agarose-Platten ist ein Hinweis, dass sie nicht oder nur in geringer Anzahl in den Sedimenten der untersuchten Restseen vorkommen.

Eine Dominanz von *A. ferrooxidans* gegenüber *A. thiooxidans* und *L. ferrooxidans* ist wahrscheinlich, betrachtet man die physiologischen Eigenschaften von *A. ferrooxidans* im Hinblick auf die in den Sedimenten herrschenden Bedingungen. *A. ferrooxidans* kann im Gegensatz zu *A. thiooxidans* auch die Oxidation von Eisen(II) zur Energiegewinnung nutzen. Während Eisen(II) sowohl im Wasserkörper als auch im Sediment der Restseen aufgrund von Grundwassereintrag und mikrobieller Eisen(III)-Reduktion zur Verfügung steht, wird reduzierter Schwefel überwiegend authigen gebildet und liegt daher nur in stärker reduzierten Sedimentschichten (mit Ausnahme von RS 107) vor. *A. ferrooxidans* ist in der Lage, unter diesen sauerstofflimitierenden oder anoxischen Bedingungen, Eisen(III) als alternativen Elektronenakzeptor zu nutzen und die reduzierten Schwefelverbindungen zu oxidieren. *A. ferrooxidans* bevorzugt im Vergleich zu *L. ferrooxidans* niedrigere Temperaturen, höhere pH-Werte und geringere Redoxspannungen (Edwards et al. 1999, Rawlings et al. 1999, Schrenk et al. 1998), wie sie in den Sedimenten der Restseen anzutreffen sind.

Die partiellen 16S rDNA-Sequenzen der isolierten *A. ferrooxidans*-Stämme aus den Restseen zeigten untereinander sehr hohe Sequenzübereinstimmungen und demonstrierten eine geringe Vielfalt bezüglich ihres Phylotyps. Da die Stämme aus zwei verschiedenen Restseen und aus verschiedenen Sedimenttiefen isoliert wurden, stellt sich die Frage, ob die Stämme besondere Eigenschaften in Anpassung an die Bedingungen der sauren Restseen besitzen. Es muss jedoch bedacht werden, dass nur wenige physiologische Eigenschaften untersucht und keine weiteren detaillierten morphologischen oder chemotaxonomischen Analysen unternommen wurden. Demnach kann keine gesicherte Aussage darüber gemacht werden, ob dem einheitlichen Phylotyp auch ein einheitlicher Phänotyp zugrunde liegt. Zudem reicht die Sequenzierung des 16S rDNA oft nicht aus, um Stämme zu differenzieren (z. B. Sass et al. 1998, Wieringa et al. 2000).

Die heterotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Isolate aus den Sedimenten von RS 111 (10 m) sind den Gattungen *Sulfobacillus* und *Alicyclobacillus* zuzuordnen. Stämme von *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* und *S. acidophilus* wurden ursprünglich aus Anreicherungskulturen zur Laugung sulfidischer Erze isoliert (Karavaiko et al. 1988, Norris et

al. 1996). *Sulfovbacillus* ssp. sind jedoch auch in anderen Habitaten häufig in Begleitung von *A. ferrooxidans* anzutreffen (z. B. Dufresne et al. 1993, Vlasceanu et al. 2000). Die mit *Sulfovbacillus thermosulfidooxidans* nahverwandten *Alicyclobacillus* spp. wurden erstmals aus Böden isoliert (Wisotzkey et al. 1992) und weitere Untersuchungen zeigen, dass diese Organismen an geothermalen, schwefelsauren Standorten weit verbreitet sind (z. B. Albuquerque et al. 2000, Hiraishi et al. 1997). Die partiellen 16S rDNA-Sequenzen der heterotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Isolate zeigten im Gegensatz zu denen der *A. ferrooxidans*-Stämme eine sehr viel höhere Variabilität. Wisotzkey et al. (1992) erörterten die Frage, ob an extremen Standorten lebende Organismen (in diesem Falle *Alicyclobacillus* spp.) durch eine höhere Evolutionsrate (*evolutionary "fast clock"*) gekennzeichnet sind. Die Autoren kommen jedoch zu dem Schluss, dass die Vertreter der Gattung *Alicyclobacillus* im Vergleich zu anderen *Bacillus* ssp. nicht einer schnelleren evolutiven Entwicklung unterworfen sind. Die heterotrophen schwefel- und eisenoxidierenden Isolate wurden vorwiegend aus tieferen Sedimentschichten isoliert, wo ein Großteil der eisen- und schwefeloxidierenden Bakterien als Sporen vorlagen und somit vermutlich inaktiv sind. Zudem zeigten die getesteten Stämme keine oder nur sehr niedrige Eisen(III)-reduzierende Aktivitäten, sodass keine Hinweise für Wachstum unter anoxischen Bedingungen vorliegen.

#### 4.2.2 Sulfatreduzierende Bakterien

Die Eigenschaft der dissimilatorischen Sulfatreduktion ist auf vier Gruppen der Prokaryoten beschränkt: Gram-negative mesophile sulfatreduzierende Eubakterien (innerhalb der  $\delta$ -Proteobakterien), Gram-positive sporenbildende sulfatreduzierende Eubakterien, thermophile sulfatreduzierende Eubakterien und thermophile sulfatreduzierende Archaeabakterien (Castro et al. 2000, Stackebrandt et al. 1995). Aus den Sedimenten der sauren Restseen, RS 111 und RS 107, wurden ausschließlich sporenbildende sulfatreduzierende Bakterienstämme isoliert. Sporenbildende Sulfatreduzierer sind an denselben Standorten anzutreffen wie die Gram-negativen mesophilen Sulfatreduzierer, doch sind letztere kompetitiv stärker (Widdel 1992) und bilden meistens den Hauptbestandteil der sulfatreduzierenden Bakteriengemeinschaft in permanent oder überwiegend anoxischen Standorten: z. B. in Sedimenten limnischer Systeme (Bak & Pfennig 1991, Fukui & Takii 1996, Sass et al. 1998), in marinen Sedimenten (Isaksen et al. 1994, Rooney-Varga et al. 1998, Sahm et al. 1999a, Wieringa et al. 2000) und in Reisfeldböden (Wind & Conrad 1995). Sporenbildende Sulfatreduzierer sind häufig dann anwesend und werden dann isoliert, wenn für die Sporenbildung selektive Bedingungen herrschen (Widdel 1992). Dies bedeutet häufig für sulfatreduzierende Bakterien ungünstige Bedingungen, z. B. längere oxische Perioden oder Trockenheit, welche nur als Sporen überdauert werden können. Beispiele für Standorte, aus denen ausschließlich oder überwiegend sporenbildende Sulfatreduzierer bzw. ihre 16S rDNA-

Sequenzen isoliert wurden, sind tief unter der Erdoberfläche liegende Erdschichten (Boivin-Jahns et al. 1996) oder Grundwasser (Ishii et al. 2000) sowie Petroleum- (Dojka et al. 1998) und Benzol-kontaminierte Grundwasserleiter (Robertson et al. 2000). Außerdem werden sporenbildende Sulfatreduzierer häufig in Ölfeldern angetroffen (z. B. Tardy-Jacquenod et al. 1996, Leu et al. 1998).

In den sauren Restseen liegt wahrscheinlich ebenfalls ein selektiver Vorteil für sporenbildende Sulfatreduzierer vor. Der Eintrag der im Sediment vorkommenden Mikroorganismen erfolgte vermutlich anfangs über oxisches Bodenmaterial des ehemaligen Tagebaus und später über Sedimentationsprozesse, wobei der oxische Wasserkörper mit einem pH-Wert unter pH 3 überwunden werden musste. Diese Bedingungen sind nur als Sporen zu überdauern. MPN-Zählungen in RS 111 (10 m) (August 1999) weisen zusätzlich darauf hin, dass ein Großteil der sulfatreduzierenden Bakterien im Sediment der sauren Seen als Sporen vorliegen und daher nicht aktiv sind. Dafür, dass die Fähigkeit der Sporenbildung ausschlaggebend für das Vorkommen der sulfatreduzierenden Bakterien in den Sedimenten der sauren Restseen ist, spricht ebenfalls, dass andere hier untersuchte physiologische Eigenschaften nicht auf eine Anpassung an den Standort hinweisen (siehe auch Kap. 4.1.2 und 4.1.3). Bislang wurde nur vereinzelt versucht, sulfatreduzierende Bakterien aus AMD-belasteten Standorten zu isolieren. Dabei wurde das Vorkommen sporenbildender sowie *Desulfovibrio*-ähnlicher Sulfatreduzierer berichtet (Fortin et al. 1996, Johnson et al. 1993, Tuttle et al. 1969a). Aus den Sedimenten des neutralen RS B wurde ein Isolat (SRB 12) der Gattung *Desulfomicrobium* gewonnen. Vertreter dieser Gattung gehören in die Gruppe der Gram-negativen mesophilen sulfatreduzierenden Bakterien (Devereux et al. 1990) und sind weit verbreitet (z. B. Leu et al. 1998, Pedersen et al. 1996, Sass et al. 1998, Wieringa et al. 2000). Die Isolierung von SRB 12 erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Isolierung der Sporenbildner, daher kann eine Selektivität des verwendeten Mediums ausgeschlossen werden. Zudem zeigt die Isolierung von SRB 12, dass die sich in den sauren Restseen ansiedelnde, sulfatreduzierende Bakteriengemeinschaft von der im neutralen Restsee unterscheidet.

Anhand der Phylogenie der sporenbildenden Sulfatreduzierer und ihrer engeren Verwandten wird deutlich, dass man nicht ohne weiteres von der Sequenz der 16S rDNA die physiologischen Eigenschaften eines Organismus ableiten kann. Die Kombination der Eigenschaften Sporenbildung und Sulfatreduktion ist nicht auf eine phylogenetisch eng zusammenhängende Gruppe beschränkt. Von Campbell & Postgate (1965) wurden die sporenbildenden Sulfatreduzierer zunächst von den nicht-sporenbildenden Sulfatreduzierern getrennt und unter dem Gattungsnamen *Desulfotomaculum* zusammengefasst. Eine umfassende phylogenetische Analyse (anhand der 16S rDNA) von Stackebrandt et al. (1997) der bis dahin beschriebenen *Desulfotomaculum*-Stämme führte u. a. zur Aus-

gliederung und Umbenennung von *Desulfotomaculum orientis* in *Desulfosporosinus orientis*. Dieser zeigte eine engere Verwandtschaft zu Vertretern der sporenbildenden Gattung *Desulfobacterium*, die nicht Sulfat wohl aber Sulfit reduzieren und durch die Eigenschaft der reduktiven Dehalogenierung von Kohlenwasserstoffen ausgezeichnet sind (Utkin et al. 1994). Zur gleichen Zeit wurde ein Arsen(V)- sowie sulfatreduzierendes Bakterium, *Desulfotomaculum auripigmentum*, beschrieben (Newman et al. 1997). Dieses Bakterium ist mit *Desulfosporosinus orientis* nahverwandt, hat jedoch bislang dessen ursprünglichen Gattungsnamen beibehalten. Hagenauer und Mitarbeiter (1997) beschrieben ein neues Isolat, *Desulfotomaculum aeronauticum*, welches als nächsten Verwandten *Desulfotomaculum ruminis* aufwies, jedoch nur die Fähigkeit zur Sulfit- jedoch nicht zur Sulfatreduktion besaß. Sass et al. (1998) isolierten hingegen sporenbildende Sulfat-reduzierer, die hohe Sequenzübereinstimmungen zu nicht-sulfatreduzierenden, homoaceto-genen Bakterien der Gattung *Sporomusa* zeigten. *Thermacetogenium phaeum* ist ebenfalls ein sporenbildender Sulfatreduzierer, dessen nächster Verwandter *Thermoterrabacterium ferrireducens* ist (Hattori et al. 2000).

Für die sporenbildenden Sulfatreduzierer aus den Sedimenten der sauren Restseen wurde anhand der 16S rDNA-Sequenz im Vergleich zu den isolierten *A. ferrooxidans*-Stämmen eine höhere und im Vergleich zu den *Sulfovibrio* und *Alicyclobacillus*-Stämmen eine geringere Diversität ihrer Phylotypen festgestellt. Die unterschiedliche Substratnutzung demonstrierte ebenfalls das Vorhandensein verschiedener physiologischer Fähigkeiten (Phänotypen), diese waren aber häufig stammspezifisch. Im Vergleich zu den nächst-verwandten, bereits beschriebenen Arten *Desulfosporosinus orientis* Stamm Singapore (Adams & Postgate 1959, Klemps et al. 1985, Widdel 1992) und *Desulfotomaculum auripigmentum* Stamm Orex (Newman et al. 1997) zeigten die Isolate aus den Restseen ebenfalls Unterschiede im Substratspektrum. Wie die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Isolate wachsen *Dsp. orientis* und *Dtm. auripigmentum* in Anwesenheit von Sulfat auf Lactat, Formiat (*Dtm. auripigmentum* nicht) und Ethanol. Die Verwertung von Acetat [häufig übereinstimmend mit der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation von organischen Substraten (Hansen 1993)] wurde im Gegensatz zu *Dsp. orientis* und *Dtm. auripigmentum* bei zwei Isolaten (SRB 7 und 11) beobachtet. Diese Isolate zeigten auch Wachstum auf Methanol. *Dsp. orientis* verwertet Methanol und Methoxygruppen über den Oxidativen-Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Weg, über den ebenfalls Acetat abgebaut werden kann (Hansen 1993). Propionat wird weder von den Isolaten noch von *Dsp. orientis* oder *Dtm. auripigmentum* verwertet, Butyrat wird dagegen von einigen Isolaten sowie *Dtm. auripigmentum* genutzt. Bei den Dicarbonsäuren wachsen weder *Dsp. orientis* noch *Dtm. auripigmentum*, im Gegensatz zu einigen Isolaten aus den sauren Restseen, mit Fumarat als Energiequelle. Wachstum auf Butyrat ist für *Dsp. orientis* nicht beschrieben, wurde

jedoch bei *Dtm. auripigmentum* und einigen Isolaten beobachtet. Wachstum auf Glycerin ist ebenfalls nur für *Dtm. auripigmentum* beschrieben und wurde bei der Mehrzahl der Isolate verzeichnet. Wie die Isolate wachsen weder *Dsp. orientis* noch *Dtm. auripigmentum* mit Benzoat. Die komplette Oxidation von aromatischen Verbindungen und ihre Nutzung als Kohlenstoff- und Energiequelle ist jedoch für verschiedene sporenbildende Vertreter der Gattung *Desulfotomaculum* beschrieben: *Dtm. thermobenzoicum* (Tasaki et al. 1991), *Dtm. sapomandens* (Cord-Ruwisch & Garcia 1985) und *Dtm. gibsoniae* (Kuever et al. 1993).

In Abwesenheit von Sulfat wachsen alle Isolate auf Lactat und einige auf Formiat (SRB 4, 6 und 7) und Methanol (SRB 7 und 11). *Dsp. orientis* wächst in Abwesenheit von Sulfat auf Lactat, Formiat, Ethanol + CO<sub>2</sub> und Methanol + CO<sub>2</sub> und führt dabei eine Homacetogenese durch. Dieser Mechanismus ist auch wahrscheinlich für die sporenbildenden, sulfatreduzierenden Isolate, selbst jene, die in Abwesenheit von Sulfat nur auf Lactat wachsen. Die Vergärung von Lactat zu Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> erfolgt nur bei geringem Wasserstoff-Partialdruck (Hansen 1993). Eine Alternative wäre die Propionatgärung (Gottschalk 1986), welche typisch für den Gram-negativen Sulfatreduzierer *Desulfobulbus propionicus* ist (Hansen 1993). Der genaue Mechanismus für die Isolate konnte nicht identifiziert werden, da die Reaktionsprodukte nicht gemessen wurden. *Dsp. orientis* und *Dtm. auripigmentum* nutzen wie die Mehrzahl der Isolate verschiedene reduzierte Schwefelverbindungen alternativ zu Sulfat als Elektronenakzeptoren. In Übereinstimmung mit den Isolaten ist *Dsp. orientis* nicht befähigt, Nitrat zu reduzieren [Angaben zur Eisen(III)-Reduktion liegen nicht vor] und *Dtm. auripigmentum* reduziert weder Nitrat noch Eisen(III). In Anlehnung an die Arbeit von Tebo & Obstratzsova (1998) wurde in der vorliegenden Arbeit Fe(III)-Citrat verwendet. Für alle Eisen(III)-reduzierenden Bakterien ist die Reduktion von gelöstem Eisen(III) komplexiert mit EDTA, NTA (Nitrilotriacetat) oder Citrat beschrieben, wobei Citrat auf manche Stämme toxisch wirken kann (Lovley et al. 1995, Lonergan et al. 1996). Dieser Effekt ist auch hier nicht auszuschließen. Die Fähigkeit gelöstes Eisen(III) zu reduzieren, besagt jedoch noch nichts darüber aus, ob und welche Eisen(III)-Oxide reduziert werden können (Thamdrup 2000).

Aufgrund des hohen Sporenanteils in den Sedimenten sowie einer geringen physiologischen Anpassung ist es fraglich, ob die isolierten Sulfatreduzierer am Standort aktiv sind. Zudem stellt sich die Frage, ob mit der angewendeten Methode alle Sulfatreduzierer erfasst wurden. Im Vergleich zu RS B und im Verhältnis zu den SRR scheinen die MPN-Werte für neutrophile SRB in RS 111 (10 m) weit unterschätzt. Zelluläre Sulfatreduktionsraten (cSRR) berechnet anhand von SRR und MPN-Werten (Daten von April 1997) ergaben 1,6 - 69 fmol SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Zelle<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in Sedimenten von RS B. Diese Werte sind relativ hoch für Umweltproben, liegen jedoch im üblichen Rahmen und beruhen auf der allgemeinen Unzulänglichkeit der MPN-Methode (Sahm et al. 1999b). Für RS 111 (10 m) wurden cSRR von 197 -

2341 fmol SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Zelle<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> berechnet. Auch wenn man bedenkt, dass die Sedimente sehr heterogen sind und zur Berechnung der cSRR recht ungenaue Werte, wie die der MPN-Bestimmung, verwendet wurden, ist der Unterschied zwischen den beiden Restseen sehr groß. Der Unterschied weist daraufhin, dass mit der hier angewendeten Kultivierungs-methode in RS 111 (10 m) ein noch kleinerer Anteil der sulfatreduzierenden Bakterien-gemeinschaft als in RS B erfasst wurde. Die Verwendung des FeSO<sub>4</sub>/pH 3-Mediums, welches in seiner Zusammensetzung dem Chemismus der Restseen eher entspricht, führte jedoch nicht zu höheren MPN-Werten.

Die Intoleranz sulfatreduzierender Bakterien gegenüber sauren pH-Werten ist u. a. auf die Toxizität des Schwefelwasserstoffs zurückzuführen (Reis et al. 1992, O'Flaherty et al. 1998). Bei pH-Werten kleiner pH 5 liegt das gesamte freie Sulfid als Schwefelwasserstoff vor, das ungehindert die Zellmembran passieren kann. Dieses Problem liegt insbesondere in geschlossene Systemen (z. B. Batch-Kulturen) vor, wo eine Akkumulation des gebildeten Schwefelwasserstoffs eintritt. Am Standort kann der Schwefelwasserstoff entweichen bzw. er wird in Anwesenheit von reaktivem Eisen oder molekularem Sauerstoff und durch die Aktivitäten schwefeloxidierender Bakterien reoxidiert. Daher wurde die Isolation von sulfat-reduzierenden Bakterien in saurem, eisenhaltigen Medium auf Platten versucht, da hier der entstehende Schwefelwasserstoff leichter entweichen oder direkt mit Fe<sup>2+</sup> reagieren kann. Einen inhibierenden Effekt bei sauren pH-Werten üben ebenfalls die häufig als Substrate eingesetzten Carbonsäuren Lactat und Acetat aus (Reis et al. 1992). Sie wirken als Entkoppler, d. h. sie wirken dem Aufbau eines Protonengradienten entgegen. Sie gelangen in protonierter Form ins Cytoplasma, wo sie aufgrund der im Cytoplasma herrschenden neutralen Bedingungen die Protonen wieder freisetzen. In den sauren Medien wurde daher Glycerin als Substrat verwendet. Sowohl die Verwendung von Platten als auch von Glycerin führten jedoch nicht zur erfolgreichen Isolierung von sulfatreduzierenden Bakterien bei pH 3. Die geringe Säuretoleranz steht vielleicht in direktem Zusammenhang mit dem sich speziell für sulfatreduzierende Bakterien darstellenden Problem, dass der Energiegewinn bei der Sulfatreduktion so gering ist (Peck 1993), dass keine zusätzliche Energie für den notwendigen Erhalt eines neutralen Cytoplasmas zur Verfügung steht (Matin 1990).

Eine zusätzliche Belastung durch Schwermetalle ist in den untersuchten Bergbau-Restseen wahrscheinlich sehr gering. Die Konzentrationen in den Sedimenten der sauren Restseen sind nicht viel höher als in den Sedimenten des neutralen RS B (Friese 1998). Der mittlere Gehalt an Kupfer von 20 mg kg<sup>-1</sup> in RS 111 ist sogar geringer als der mittlere Gehalt von 82 mg kg<sup>-1</sup> in einem natürlichen, oligotrophen Hartwassersee in Nordbrandenburg (Casper & Muntau 1994). Nimmt man die Konzentrationen im Freiwasser der sauren Restseen von 0,005 µM Cadmium, < 0,01 µM Blei, 0,2 µM Chrom, 0,2 µM Kupfer, 2 µM Kobalt, 10 µM Nickel und 40 µM Zink (K. Friese, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, pers.

Mitt.) als Richtwerte, so liegen die Gehalte in den meisten Fällen unter den Toleranzwerten, welche in der Literatur für verschiedene *Desulfovibrio*-Stämme angegeben werden (Hard et al. 1997, Poulsen et al. 1997).

#### 4.3 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass in den Sedimenten der sauren Bergbau-Restseen unter den kultivierbaren Schwefeloxidierern *Acidithiobacillus ferrooxidans* und unter den kultivierbaren Sulfatreduzierern *Desulfosporosinus* spp. dominieren. Um ihre Bedeutung für den Standort genauer analysieren zu können, sollten die vorliegenden Untersuchungen noch durch den direkten Nachweis sowie die Quantifizierung dieser Mikroorganismen mittels kulturunabhängiger Methoden ergänzt werden. Die zielstrebigste Methode dazu ist die *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonucleotid-Sonden. Hierfür stehen eine Reihe gattungs- oder artspezifischer Gensonden für sulfatreduzierende Bakterien (Daly et al. 2000) bzw. für *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Peccia et al. 2000) zur Verfügung. Die Sedimentmatrix der sauren Restseen stellt jedoch aufgrund der hohen Konzentrationen an gelöstem Eisen und folglich der Bildung von Eisenpräzipitaten sowie der starken Autofluoreszenz ein erhebliches methodisches Problem dar. Alternativ könnte daher nach dem *Dot Blot*-Verfahren vorgegangen werden (z. B. Sahm et al 1999b), jedoch ist auch die Extraktion von Nukleinsäuren aus diesen Sedimenten bedingt durch den hohen Gehalt hochmolekularer organischer Substanz problematisch (K. Wendt-Pothoff, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, pers. Mitt.). Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung stellt der Nachweis mittels Biomarker dar, wie z. B. spezifische Phospholipid-Fettsäuren für sulfatreduzierende Bakterien (Vainshtein et al. 1992) oder für *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (Wisotzkey et al. 1992). Hier besteht das Problem jedoch darin, dass die Ausbeute an Phospholipiden bedingt durch die geringen Biomassen in den Sedimenten der Restseen teilweise zu klein für die Fettsäure-Analyse ist (T. Neu, UFZ-Gewässerforschung Magdeburg, pers. Mitt.). Bis die genannten Arbeitstechniken in den Sedimenten der sauren Restseen erfolgreich angewendet werden können, muss nach bisherigen Erfahrungen noch ein erhebliches Maß an Methodenentwicklung geleistet werden. Sind diese Methoden etabliert, so können in einem weiteren Schritt die *in situ*-Aktivitäten untersucht werden z. B. mittels Microautoradiographie in Verbindung mit Oligonucleotid-Sonden (Nielsen et al. 1999) oder mittels <sup>13</sup>C-Markierung von Biomarkermolekülen (Boschker et al. 1998, Hanson et al. 1999). Der Nachweis der *in situ*-Aktivität ist insbesondere für die sulfatreduzierenden Bakterien als auch für die Vertreter der Gattung *Sulfovibrio* und *Alicyclobacillus* von Interesse.

Mittels kulturunabhängiger Methoden können auch die Mikroorganismen nachgewiesen werden, die unter den hier angewendeten Kultivierungsbedingungen nicht erfasst wurden. Insbesondere für die Sedimente von RS 111 (10 m) stellt sich die Frage, ob neben den neutrophilen Sporenbildnern auch andere sulfatreduzierende Bakterien vorkommen. Pöhler et al. (2001) führten eine Strukturanalyse der Bakteriengemeinschaft nach der *Single Strand Conformation Polymorphism*-Methode im Freiwasser von RS 111 durch. Dabei fanden sie 16S rDNA-Sequenzen, welche hohe Ähnlichkeiten mit den Sequenzen von Vertretern der Gattung *Desulfobacter* ( $\delta$ -Proteobakterien) aufwiesen. Bond et al. (2000) isolierten aus Biofilmen in Grubenwässern einer Kupfermine ebenfalls verschiedene 16S rDNA-Klone, die der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien zugehören.

Bisher ist über die Physiologie der sulfatreduzierenden Bakterien in Hinblick auf ihre pH-Toleranz wenig bekannt. Die gewonnenen Reinkulturen bieten die Möglichkeit, Überlebensstrategien bzw. Anpassungen bei niedrigen pH-Werten genauer zu untersuchen. Insbesondere der Einfluss verschiedener Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren (und somit des Energiestoffwechsels sowie der Toxizität der Substrate und Stoffwechselprodukte) auf die pH-Toleranz der Stämme sollte untersucht werden. Am Standort werden diese Faktoren maßgeblich durch die Aktivitäten anderer Mikroorganismen bestimmt. Die Bedeutung der mutualistischen Wechselwirkung zeigt sich an einer stabilen Kokultur eines Sulfatreduzierers und eines heterotrophen, azidophilen Mikroorganismus, welche aus sauren Grubenwässern isoliert wurde (A. Sen, University of Wales, UK, pers. Mitt.). Anhand der Untersuchungen zur Säuretoleranz könnten weiterhin neue Isolierungsstrategien entwickelt werden.

Das Interesse an den sulfatreduzierenden Bakterien ist deswegen so groß, da die Sulfatreduktion ein wichtiger Bestandteil der biologischen Sanierung zur Neutralisierung der sauren Bergbau-Restseen darstellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Sulfatreduktion in diesen Seen durch die geringe Verfügbarkeit an organischer Substanz limitiert ist. Über den Kohlenstoffkreislauf in diesen Seen ist bis jetzt wenig bekannt. Hohe Dunkelfixierungsraten im Hypolimnion von RS 111 weisen auf chemolithotrophe Aktivitäten hin (Mischke 1998), ihr Beitrag an der Primärproduktion wurde jedoch bislang nicht quantifiziert. Mikrobiologische Untersuchungen zeigten außerdem relativ hohe heterotrope Aktivitäten im Freiwasser der sauren Restseen (Meier & Babenzien 1998). Die Charakterisierung der heterotrophen Mikroorganismen, die am Abbau polymerer Substanzen beteiligt sind, steht jedoch noch aus. Zudem ist unbekannt, welche Substrate in den Sedimenten der Restseen letztendlich den Sulfatreduzierern als Elektronendonatoren dienen. Auch in Hinblick auf eine Sanierung der Seen durch die kontrollierte Zugabe von organischer Substanz ist die Untersuchung des Kohlenstoffkreislaufs in den sauren Restseen von großer Wichtigkeit.

## 5. Zusammenfassung

Die Wasserqualität der sauren Bergbau-Restseen im Braunkohlerevier der Niederlausitz ist durch pH-Werte unter pH 3 und hohe Konzentrationen an gelöstem Eisen (bis zu 10 mM) und Sulfat (bis zu 30 mM) gekennzeichnet. Die Entwicklung der Restseen wird durch das Gleichgewicht von aziditäts- und alkalinitätsbildenden Prozessen bestimmt. Azidität entsteht bei der Verwitterung bzw. der Oxidation der Eisensulfide im Kippmassiv, während Alkalinität bei der an die Oxidation organischer Substanz gekoppelte Reduktion von Eisen(III) und Sulfat in den Sedimenten der Seen gebildet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Sulfatreduktion und der Schwefeloxidation auf das Neutralisierungspotenzial der Sedimente der sauren Restseen untersucht sowie die an diesen Prozessen beteiligten Mikroorganismen charakterisiert und identifiziert. Vergleichende Untersuchungen wurden in zwei sauren, Restsee 111 und 107, und in einem neutralen Gewässer, Restsee B, im naturnahen Bereich der Niederlausitz durchgeführt.

Für die Sedimente der sauren Restseen wurde insgesamt nur ein geringes Neutralisierungspotenzial festgestellt. Die Zellzahlbestimmung nach der *Most Probable Number*-Methode zeigte, dass in den Sedimenten der sauren Restseen 111 und 107 neutrophile sulfatreduzierende Bakterien mit bis zu  $10^2 - 10^4$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  vorkommen. Sulfatreduzierende Aktivitäten wurden trotz Anwendung der sensitiven Radiotracer-Technik nur in Sedimenten von Restsee 111 bei einer Wassertiefe von 10 m nachgewiesen. Dort herrschten ganzjährig anoxische Bedingungen. Die integrierte Sulfatreduktionsrate betrug  $156 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ a}^{-1}$ . In den Sedimenten vom neutralen Restsee B wurden sulfatreduzierende Bakterien mit bis zu  $10^7$  Zellen  $\text{cm}^{-3}$  und eine Sulfatreduktionsrate von  $738 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  bestimmt. Im Vergleich dazu schien die Sulfatreduktion in Restsee 111 limitiert. Die Stimulierung der Sulfatreduktion durch die Zugabe geeigneter organischer Substrate wie Acetat, Lactat, Pyruvat und Ethanol, deutet auf eine Substratlimitierung der Sulfatreduktion in Sedimenten von Restsee 111 hin.

Trotz niedriger Sulfatreduktionsraten war jedoch eine Akkumulation reduzierter anorganischer Schwefelverbindungen sowie ein pH-Anstieg in Sedimenten von Restsee 111 bei einer Wassertiefe von 10 m zu beobachten. Die Reoxidation der reduzierten Schwefelverbindungen betrug lediglich 61 %, wohingegen in Sedimenten von Restsee B die Reoxidation bei 94 % lag. Für die Sedimente in Restsee 111 bei einer Wassertiefe von 10 m und in Restsee B wurden anhand der reduzierten Schwefelverbindungen Neutralisierungsraten von 121 bzw.  $90 \text{ meq m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  berechnet.

Die Untersuchungen zeigten, dass auch in den sauren Restseen unter bestimmten Voraussetzungen (hier anoxische Verhältnisse) Sulfatreduktion stattfindet und diese zur Alkalinitätsbildung führt. Obwohl die Alkalinitätsbildung vergleichbar mit der natürlicher Seen ist, ist eine Neutralisierung allein aufgrund seeinterner alkalinitätsbildender Prozesse nicht zu

erwarten. Die Sedimente der Restseen 111 (mit Ausnahme der tiefsten Stelle) und 107 sind aufgrund der geringen Wassertiefe überwiegend durch einen stärker oxidierten Charakter geprägt. Außerdem ist von einer Substratlimitierung der Sulfatreduktion bedingt durch die geringe Primärproduktion in den sauren Restseen auszugehen.

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen in verschiedenen Medien sowie die Gewinnung von Reinkulturen deuten darauf hin, dass für die Schwefeloxidation und die Sulfatreduktion in den sauren Restseen andere Bakterienpopulationen als im neutralen Restsee B verantwortlich sind. Während in Restsee B die höchsten Zellzahlen für schwefel-oxidierende Bakterien im neutralen Medium erzielt wurden, waren die Zellzahlen azidophiler schwefel- und eisenoxidierender Bakterien in den Sedimenten der sauren Restseen um den Faktor 100 - 1000 größer als in Restsee B. Aus den Sedimenten der sauren Restseen wurden 22 azidophile schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme isoliert. Davon wuchsen sechzehn Stämme autotroph, wobei die partielle Sequenzierung ihrer 16S rDNA sie als Vertreter der Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* auswies. Die auf Eisen(III)-Reduktion getesteten Stämme wuchsen mit elementarem Schwefel als Elektronendonator unter anoxischen Bedingungen. Die sechs heterotrophen schwefel- und eisenoxidierende Bakterienstämme wurden vorwiegend aus tieferen Sedimentschichten isoliert. Dabei handelte es sich um Sporenbildner, die den Gattungen *Sulfobacillus* und *Alicyclobacillus* zuzuordnen sind.

Im Gegensatz zu den schwefel- und eisenoxidierenden Bakterien wurden sowohl in den sauren Restseen als auch in Restsee B die höheren Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien im neutralen Medium erreicht. Aus den Sedimenten der sauren Restseen wurden neun sporenbildende Sulfatreduzierer isoliert, welche der Gattung *Desulfosporosinus* angehören. Sie waren neutrophil und zeigten auch in Hinblick ihres Substratspektrums keine besonderen Eigenschaften, die auf eine Anpassung an die in den sauren Restseen herrschenden Bedingungen hinweisen. Sie waren z. B. nicht in der Lage Eisen(III) als alternativen Elektronenakzeptor oder den Aromaten Benzoat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Aromatische Carbonsäuren, die aus der Verwitterung der Braunkohle hervorgehen, stellen eine mögliche Kohlenstoffquelle in den Sedimenten der Restseen dar. Das sulfatreduzierende Isolat aus den Sedimenten von Restsee B gehört zur Gattung *Desulfomicrobium*.

Aus den Isolierungsversuchen geht hervor, dass die Bedingungen in den Sedimenten der sauren Restseen selektiv für sporenbildende Sulfatreduzierer sind und dass Vertreter der Gattung *Desulfosporosinus* verantwortlich für die Sulfatreduktion an diesen Standorten sind. Außerdem wurde gezeigt, dass *Acidithiobacillus ferrooxidans* unter den kultivierbaren Schwefeloxidierern dominiert und vermutlich für die Reoxidation der reduzierten Schwefelverbindungen sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen in den Sedimenten der sauren Restseen zuständig ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, M.E. & POSTGATE, J.R. (1959) A new sulphate-reducing vibrio. *J. Gen. Microbiol.* 20: 252-257.
- ALBUQUERQUE, L., RAINY, F.A., CHUNG, A.P., SUNNA, A., NOBRE, M.F., GROTE, R., ANTRANIKIAN, G. & DA COSTA, M.S. (2000) *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 451-457.
- ALLER, R. C. & RUDE, P. D. (1988) Complete oxidation of solid phase sulfides by manganese and bacteria in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52: 751-765
- AMANN, R. (2000) Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *System. Appl. Microbiol.* 23, 1-8.
- ANDERSON, R. F. & SCHIFF, S. L. (1987) Alkalinity generation and the fate of sulfur in lake sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 188-193.
- ATLAS, R.M. (1984) Diversity of microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* 7: 1-47.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. (1993) *Microbial Ecology*. Benjamin Cummings, Redwood City, CA: S. 563.
- BAAS BECKING, L.G.M. & FERGUSON WOOD, E.J. (1955) Biological processes in the estuarine environment I. Ecology of the sulphur cycle. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetenschap., Proc., Ser. B.* 58: 160-181.
- BACELAR-NICOLAU, P. & JOHNSON, D.B. (1999) Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 585-590.
- BADE, K. (2000) Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic oligotrophic environments related to drinking water. Dissertation, Technische Universität Berlin.
- BAK, F. & PFENNIG, N. (1991) Sulfate-reducing bacteria in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85: 43-52.
- BARON, D. & PALMER, C.D. (1996) Solubility of jarosite at 4 - 35 °C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 185-195.
- BENNER, S.G., GOULD, W.D. & BLOWES, D.W. (2000) Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. *Chem. Geol.* 169: 435-448.
- BERNER, R. A. (1984) Sedimentary pyrite formation: an update. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 605-615.
- BERNER, R. A. (1970) Sedimentary pyrite formation. *Amer. J. Sci.* 268: 1-23.
- BERTHELOT, D., LEDUC, L.G. & FERRONI, G.D. (1997) Iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs from uranium mine environments. *Geomicrobiol. J.* 14: 317-324.
- BIGHAM, J.M., SCHWERTMANN, U., TRAINA, S.J., WINLAND, R.L. & WOLF, M. (1996) Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60 : 2111-2121.
- BIGHAM, J.M., SCHWERTMANN, U., CARLSON, L. & MURAD, E. (1990) A poorly crystallized oxyhydroxysulfate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54: 2743-2758.
- BLODAU, C., PEINE, A., HOFFMANN, S. & PEIFFER, S. (2000) Organic matter diagenesis in acidic mine lakes. *A. Hydrochim. Hydrobiol.* 28: 123-135.

- BLODAU, C., HOFFMANN, S., PEINE, A. & PEIFFER, S. (1998) Iron and sulfate reduction in the sediments of acidic mine lake 116 (Brandenburg, Germany): rates and geochemical evaluation. *Water Air Soil Pollution* 108: 249-270.
- BOESEN, C. & POSTMA, D. (1988) Pyrite formation in anoxic environments of the Baltic. *Amer. J. Sci.* 288: 575-603.
- BOIVIN-JAHNS, V., RUIMY, R., BIANCHI, A., DAUMAS, S. & CHRISTEN, R. (1996) Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3405-3412.
- BOND, P.L., SMRIGA, S.P. & BANFIELD, J.F. (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3842-3849.
- BOSCHKER, H.T.S., NOLD, S.C., WELLSBURY, P., Bos, D., DE GRAAF, W., PEL, R., PARKES, R.J. & CAPPENBERG, T.E. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature* 392: 801-805.
- BOSECKER, K. (1997) Bioleaching: metalsolubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 591-604.
- BOZAU, E., KNÖLLER, K. & STRAUCH, G. (1999) Are acid mine waters the unalterable fate of lignite mining? - A hydrogeological study of a mining lake. In: Rammlmair, D., Mederer, J., Oberthur, T.K.; Heimann, R.B. & Pentinghaus, H. (Hrsg.) *Applied Mineralogy in Research, Economy, Technology, Ecology and Culture*. Band 2. Balkema, Rotterdam: 475-477.
- BRADY, K.S., BIGHAM, J.M., JAYNES, W.F. & LOGAN, T.J. (1986) Influence of sulfate on Fe-oxide formation: comparisons with a stream receiving acid mine drainage. *Clays and Clay Minerals* 34: 266-274.
- BRAUNKOHLENAUSSCHUß LAND BRANDENBURG (1996) Sanierungsplan Lauchhammer Teil 2, Potsdam.
- BRAUNKOHLENAUSSCHUß LAND BRANDENBURG (1993) Sanierungsplan Schlabendorfer Felder, Potsdam.
- BRIDGE, T.A.M. & JOHNSON, D.B. (2000) Reductive dissolution of ferric iron minerals by Acidiphilium SJH. *Geomicrobiol. J.* 17: 193-206.
- BRIDGE, T.A.M. & JOHNSON, D.B. (1998) Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2181-2186.
- BRIERLEY, C. L. & BRIERLEY, J. A. (1973) A chemoautotrophic and thermophilic microorganism isolated from an acid hot spring. *Can. J. Microbiol.* 19: 183-188.
- BRINKHOFF, T., MUYZER, G., WIRSEN, C.O. & KUEVER, J. (1999a) *Thiomicrospira kuenenii* sp. nov. and *Thiomicrospira frisia* sp. nov., two mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria isolated from an intertidal mud flat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 385-392.
- BRINKHOFF, T., MUYZER, G., WIRSEN, C.O. & KUEVER, J. (1999b) *Thiomicrospira chilensis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a *Thioploca* mat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 875-879.
- BROCK, T.D. & GUSTAFSON, J. (1976) Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 567-571.
- BROCK, T. D., BROCK, K. M., BELLY, R. T. & WEISS, R. L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.* 84: 54-68.

- BROSNIUS, J., DULL, T. J., SLEETER, D. D. & NOLLER, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148: 107-127.
- BRYANT, R. D., MCGROARTY, K. M., COSTERTON, J. W. & LAISHLEY, E. J. (1983) Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Can. J. Microbiol.* 29: 1159-1170.
- BURTON, N.P. & NORRIS, P.R. (2000) Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles* 4: 315-320.
- BÜTTNER, O., BECKER, A., KELLNER, S., KUEHN, B., WENDT-POTTHOFF, K., ZACHMANN, D.W. & FRIESE, K. (1998) Geostatistical analysis of surface sediments in an acidic mining lake. *Water Air Soil Pollution* 108: 297-316.
- CAMPBELL, R.S. & LIND, O.T. (1969) Water quality and aging of strip-mine lakes. *J. Water Poll. Control Fed.* 41: 1943-1955.
- CAMPBELL, L.L. & POSTGATE, J.R. (1965) Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29: 359-363.
- CANFIELD, D. E. (1989) Reactive iron in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53: 619-632.
- CANFIELD, D. E., RAISWELL, R. & BOTTRELL, S. (1992) The reactivity of sedimentary iron minerals toward sulfide. *Amer. J. Sci.* 292: 659-683.
- CANFIELD, D.E., RAISWELL, R., WESTRICH, J.T., REAVES, C.M. & BERNER, R.A. (1986) The use of chromium reduction in the analysis of reduced inorganic sulfur in sediments and shales. *Chem. Geol.* 54: 149-155.
- CASPER, P. & MUNTAU, H. (1994) Schadstoffe in Sedimenten des Stechlinsees. Erweiterte Zusammenfassungen der DGL Jahrestagung 1993 in Coburg, Deutsche Gesellschaft für Limnologie, Krefeld 1994: S. 530-534.
- CASTRO, H.F., WILLIAMS, N.H. & OGRAM, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 1-9.
- CHAPELLE, F.H. & LOVLEY, D.R. (1992) Competitive exclusion of sulfate reduction by Fe(III)-reducing bacteria: a mechanism for producing discrete zones of high-iron ground water. *Ground Water* 30: 29-36.
- CLARK, D. A. & NORRIS, P. R. (1996) *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology* 142: 785-790.
- CLINE, J. D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14: 454-458.
- COATES, J. D., PHILLIPS, E. J. P., LONERGAN, D. J., JENTER, H. & LOVLEY, D. R. (1996) Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1531-1536.
- COCHRAN, W. G. (1950) Estimation of bacterial densities by means of the 'most probable number'. *Biometrics* 6: 105-116.
- COLEMAN, M. L., HEDRICK, D. B., LOVLEY, D. R., WHITE, D. C. & PYE, K. (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* 361: 436-438.
- COLMER, A.R. & HINKLE, M.E. (1947) The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science* 106: 253-256.
- COLMER, A.R., TEMPLE, K.L. & HINKLE, M.E. (1950) An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.* 59: 317-328.
- COLLIENNE, R.H. (1983) Photoreduction of iron in the epilimnion of acidic lakes. *Limnol. Oceanogr.* 28: 83-100.

- COOK, R. B., KELLY, C. A., SCHINDLER, D. W. & TURNER, M. A. (1986) Mechanisms of hydrogen ion neutralisation in an experimentally acidified lake. Limnol. Oceanogr. 31: 134-148.
- CORD-RUWISCH, R. & GARCIA, J.L. (1985) Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading spore-forming sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens* sp. nov. FEMS Microbiol. Let. 29: 325-330.
- CORNWELL, J.C. & MORSE, J.W. (1987) The characterization of iron sulfide minerals in anoxic marine sediments. Mar. Chem. 22: 193-206.
- CROSBY, S.A., GLASSON, D.R., CUTTLER, A.H., BUTLER, I., TURNER, D.R., WHITFIELD, M. & MILLWARD, G.E. (1983) Surface areas and porosities of Fe(III)- and Fe(II)-derived oxyhydroxides. Environ. Sci. Technol. 17: 709-713.
- CUMMINGS, D.E., MARCH, A.W., BOSTICK, B., SPRING, S., CACCAVO JR., F., FENDORF, S. & ROSENZWEIG, R.F. (2000) Evidence for microbial Fe(III) reduction in anoxic, mining-impacted lake sediments (Lake Coeur d'Alene, Idaho). Appl. Environ. Microbiol. 66: 154-162.
- CUMMINGS, D.E., CACCAVO JR., F., SPRING, S. & ROSENZWEIG, R.F. (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. Arch. Microbiol. 171: 183-188.
- DALY, K., SHARP, R.J. & McCARTHY, A.J. (2000) Development of nucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. Microbiology (UK) 146: 1693-1705.
- DARLAND, G. & BROCK, T. D. (1971) *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. J. Gen. Microbiol. 67: 9-15.
- DARLAND, G., BROCK, T. D., SAMSONOFF, W. & CONTI, S. F. (1970) A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. Science 170: 1416-1418.
- DEINHARD, G., BLANZ, P., PORALLA, K. & ALTAN, E. (1987a) *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. System. Appl. Microbiol. 10: 47-53.
- DEINHARD, G., SAAR, J., KRISCHKE, W. & PORALLA, K. (1987b) *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing Omega-cycloheptane fatty acids. System. Appl. Microbiol. 10: 68-73.
- DEUTSCHE EINHEITSVERFAHREN (DEV) ZUR WASSER, ABWASSER UND SCHLAMMUNTER-SUCHUNG (1984) Wiley-VCH, Weinheim: C6 DIN 38404.
- DEVEREUX, R., HE, S.-H., DOYLE, C.L., ORKLAND, S., STAHL, D.A., LEGALL, J. & WHITMAN, W.B. (1990) Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: Phylogenetic definition of a family. J. Bacteriol. 172: 3609-3619.
- DOJKA, M.A., HUGENHOLTZ, P., HAACK, S.K. & PACE, N.R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3869-3877.
- DROBNER, E., HUBER, H., WÄCHTERSHÄUSER, G., ROSE, D. & STETTER, K.O. (1990) Pyrite formation linked with hydrogen evolution under anaerobic conditions. Nature: 346: 742-744.
- DSM CATALOGUE (1993) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.
- DUAN, W.M., COLEMAN, M.L. & PYE, K. (1997) Determination of reduced sulphur species in sediments - an evaluation and modified technique. Chem. Geol. 141: 185-194.

- DUAN, W.M., HEDRICK, D.B., PYE, K., COLEMAN, M.L. & WHITE, D.C. (1996) A preliminary study of the geochemical and microbiological characteristics of modern sedimentary concretions. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1404-1414.
- DUFRESNE, S., BOUSQUET, J., BOISSINOT, M. & GUAY, R. (1996) *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, Gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1056-1064.
- DUFRESNE, S., BLAIS, J.F., ROY, C. & GUAY, R. (1993) Municipal waste treatment plant sludges: a source of organic carbon-tolerant, sulfur-oxidizing *Thiobacillus* and *Sulfobacillus* strains. In: Torma, A.E., Apel, M.L. & Brierley, C.L. (Hrsg.) *Biohydrometallurgical technologies*. Publ. TMS, S. 267-276.
- ECK, R.V. & DAYHOFF, M.O. (1966) Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical research Foundation, Silver Spring, Md.
- EDWARDS, K.J., BOND, P.L., GIHRING, T.M. & BANFIELD, J.F. (2000) An Archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 279: 1796-1799.
- EDWARDS, K.J., GIHRING, T.M. & BANFIELD, J.F. (1999) Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3627-3632.
- EHRLICH, H.L. (1996) Geomicobiology. 3. Aufl., Marcel Dekker, New York: 719 S.
- FAKOUSSA, R.M. & HOFRICHTER, M. (1999) Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 25-40.
- FAUQUE, G.D. (1995) Ecology of sulfate-reducing bacteria. In: Barton, L.L. (Hrsg.) *Sulfate-reducing bacteria*. Plenum Press, New York: S. 217-242.
- FAUVILLE, A. (2000) Endbericht zum Zusammenarbeitsvertrag RA-580/05.06.1996 zwischen der Ruhr-Universität Bochum & dem UFZ-Leipzig-Halle GmbH, Laufzeit 01.07.1995-31.12.1999.
- FELSENSTEIN, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2) *Cladistics* 5: 164-166.
- FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- FERRIS, F.G., TAZAKI, K. & FYFE, W.S. (1989) Iron oxides in acid mine drainage environments and their association with bacteria. *Chem. Geol.* 74: 321-330.
- FITCH, W.M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- FORTIN, D., ROY, M., RIoux, J.-P. & THIBAULT, P.-J. (2000) Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physicochemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 197-208.
- FORTIN, D., DAVIS, B. & BEVERIDGE, T. J. (1996) Role of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 11-24.
- FOSSING, H. & JØRGENSEN, B.B. (1989) Measurement of bacterial sulfate reduction in sediments: Evaluation of a single-step chromium reduction method. *Biogeochemistry* 8: 205-222.
- FRESENIUS, W., QUENTIN, K. E. & SCHNEIDER, W. (Hrsg.) (1988) *Water analysis*. Springer, Berlin: S. 39-42.

- FRIESE, K. (1998) Endbericht zum LENAB-Verbundprojekt, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Magdeburg, BMBF-Projekt Nr. 0339648, Laufzeit 01.01.1995-30.06.1998.
- FRIESE, K., HUPFER, M. & SCHULTZE, M. (1998a) Chemical characteristics of water and sediment in acid mining lakes of the Lusatian lignite district. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. Environ. Sci. Series, Springer, S. 25-45.
- FRIESE, K., WENDT-POTTHOFF, K., ZACHMANN, D.W., FAUVILLE, A., MAYER, B. & VEIZER, J. (1998b) Biogeochemistry of iron and sulfur in sediments of an acidic mining lake in Lusatia, Germany. Water Air Soil Pollution 108: 231-247.
- FRÖMMICHEN, R. (2001) *In situ*-Sanierungsstrategie zur Förderung der mikrobiellen Entsäuerung von geogen schwefelsauren Bergbaurestseen - Mesokosmenstudien. Dissertation, Technische Universität Dresden: 118 S.
- FRÖMMICHEN, R. (1997) Zwischenbericht 01.01.-31.12.1997, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Magdeburg, BMBF-Projekt Nr. FKZ 02 WB 9592/6, Laufzeit 01.01.1996-31.03.1999.
- FUKUI, M. & TAKII, S. (1996) Microdistribution of sulfate-reducing bacteria in sediments of a hypertrophic lake and their response to the addition of organic matter. Ecological Research 11: 257-267.
- GAGNON, C., MUCCI, A. & PELLETIER, E. (1995) Anomalous accumulation of acid-volatile sulphides (AVS) in a coastal marine sediment, Saguenay Fjord, Canada. Geochim. Cosmochim. Acta 59: 2663-2675.
- GALUSHKO, A., MINZ, D., SCHINK, B., & WIDDEL, F. (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. Environ. Microbiol. 1: 415-420.
- GELLER, W. & SCHULTZE, M. (1999) Tagebaurestseen der Braunkohlengebiete. Sch.-R. d. Deutschen Rates für Landespflege 70: 129-134.
- GELLER, W., KLAPPER, H. & SCHULTZE, M. (1998) Natural and anthropogenic sulfuric acidification of lakes. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. Environ. Sci. Series Springer, Berlin: S. 3-14.
- GERMIDA, J.J. (1985) Modified sulfur-containing media for studying sulfur-oxidizing microorganisms. In: Caldwell (Hrsg.) Ecology: S. 333-344.
- GOEBEL, B.M. & STACKEBRANDT, E. (1994) Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1614-1621.
- GOLOVACHEVA, R. S. & KARAVAICO, G. I. (1978) *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic sporeforming bacteria. Mikrobiologiya 47: 815-822.
- GOLOVACHEVA, R.S., GOLYCHINA, O.V., KARAVAICO, G.I., DOROFEEV, A.G. & CHERUYKH, N.A. (1992) The new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. Mikrobiologiya 61: 1113-1115.
- GOLYSHINA, O.V., PIVOVAROVA, T.A., KARAVAICO, G.I., KONDRAT'EVA, T.F., MOORE, E.R.B., ABRAHAM, W.-R., LÜNSDORF, H., TIMMIS, K.N., YAKIMOV, M.M. & GOLYSHIN, P.N. (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 997-1006.
- GOTTSCHALK, G. (1986) Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York: S. 359.

- GROGAN, D., PALM, P. & ZILLIG, W. (1990) Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaebacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov. Arch. Microbiol. 154: 594-599.
- GROSS, S. & ROBBINS, E.I. (2000) Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. Hydrobiologia 433: 91-109.
- GUAY, R. & SILVER, M. (1975) *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. Can. J. Microbiol. 21: 281-288.
- GUTELL, R. R., WEISER, B., WOESE, C. R. & NOLLER, H. F. (1985) Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 32: 155-216.
- GYURE, R. A., KONOPKA, A., BROOKS, A. & DOEMEL, W. (1990) Microbial sulfate reduction in acidic (pH 3) strip-mine lakes. FEMS Microbiol. Ecol. 73: 193-202.
- HAESE, R.R., WALLMANN, K., DAHMKE, A., KRETMANN, U., MÜLLER, P.J. & SCHULZ, H.D. (1997) Iron species determination to investigate early diagenetic reactivity in marine sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 61: 63-72.
- HAGENAUER, A., HIPPE, H. & RAINY, F.A. (1997) *Desulfotomaculum aeronauticum* sp. nov., a sporeforming, thiosulfate-reducing bacterium from corroded aluminium alloy in an aircraft. System. Appl. Microbiol. 20: 65-71.
- HALLBERG, K.B. & LINDSTRÖM, E.B. (1994) Characterization of *Thiobacillus caldus*, sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology 140: 3451-2456.
- HANSEN, T. A. (1993) Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. In: Odom, J.M. & Singleton Jr., R. (Hrsg.) The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer, New York Inc.: S. 21-40.
- HANSON, J.R., MACALADY, J.L., HARRIS, D. & SCOW, K.M. (1999) Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5403-5408.
- HARD, B.C., FRIEDRICH, S. & BABEL, W. (1997) Bioremediation of acid mine water using facultatively methylotrophic metal-tolerant sulfate-reducing bacteria. Microbiol. Res. 152: 65-73.
- HARRISON JR., A. P. (1984) The acidophilic Thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Ann. Rev. Microbiol. 38: 265-292.
- HARRISON JR., A. P. (1981) *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. Int. J. Syst. Bacteriol. 31: 327-332.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, K. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 22: 160-174.
- HATTORI, S., KAMAGATA, Y., HANADA, S. & SHOUN, H. (2000) *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1601-1609.
- HEINKELE, T., NEUMANN, RUMPEL, C., STRZYSZCZ, Z., KÖGEL-KNABNER, I. & HÜTTL, R.F. (1999): Zur Pedogenese pyrit- und kohlehaltiger Kippsubstrate im Lausitzer Braunkohlerevier. In: Hüttl, R.F., Weber, E. & Klem, D. (Hrsg.) Ökologisches Entwicklungspotential der Bergbaufolgelandschaften im Lausitzer Braunkohlerevier. Teubner-Verlag, Stuttgart.
- HENNEKE, E., LUTHER III, G.W., DE LANGE, G. & HOEFS, J. (1997) Sulphur speciation in anoxic hypersaline sediments from the Eastern Mediterranean Sea. Geochim. Cosmochim. Acta 61: 307-321.
- HENNIES (1991) Charakterisierung von Redoxzuständen in Sedimenten. Diplomarbeit, Universität Würzburg: 74 S.

- HENNINGSEN, D. & KATZUNG, G. (1992) Einführung in die Geologie Deutschlands. Ferdinand Enke, Stuttgart: 228 S.
- HERLIHY, A.T. & MILLS, A.L. (1989) Factors controlling the removal of sulfate and acidity from the waters of an acidified lake. *Water Air Soil Pollution* 45: 135-155.
- HERLIHY, A. T., MILLS, A. L., HORNBERGER, G. M. & BRUCKNER, A. E. (1987) The importance of sediment sulfate reduction to the sulfate budget of an impoundment receiving acid mine drainage. *Water Resources Research* 23: 287-292.
- HERZSPRUNG, P. (1998) Endbericht zum LENAB-Verbundprojekt, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Magdeburg, BMBF-Projekt Nr. 0339648, Laufzeit 01.01.1995-30.06.1998.
- HERZSPRUNG, P., FRIESE, K., PACKROFF, G., SCHIMMELE, M., WENDT-POTTHOFF, K. & WINKLER, M. (1998) Vertical and annual distribution of ferric and ferrous iron in acidic mining lakes. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26/5: 1-10.
- HILLIS, D. M., MABLE, B. K., LARSON, A., DAVIS, S. K. & ZIMMER, E. A. (1996) Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Hrsg.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts: S. 321-384.
- HIRAISHI, A., MATSUZAWA, Y., KANBE, T. & WAKAO, N. (2000) *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1539-1546.
- HIRAISHI, A., INAGAKI, K., TANIMOTO, Y., IWASAKI, M., KISHIMOTO, N. & TANAKA, H. (1997) Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 295-304.
- HOWARTH, R.W. (1979) Pyrite: its rapid formation in a salt marsh and its importance in ecosystem metabolism. *Science* 203: 49-51.
- HOWARTH, R.W. & GIBLIN, A. (1983) Sulfate reduction in the salt marshes at Sapelo Island, Georgia. *Limnol. Oceanogr.* 28: 70-82.
- HOWARTH, R.W. & JØRGENSEN, B.B. (1984) Formation of  $^{35}\text{S}$ -labelled elemental sulfur and pyrite in coastal marine sediments (Limfjorden and Kysing Fjord, Denmark) during short-term  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  reduction measurements. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 1807-1818.
- HOWARTH, R.W. & MERKEL, S. (1984) Pyrite formation and the measurement of sulfate reduction in salt marsh sediments. *Limnol. Oceanogr.* 29: 598-608.
- HSIEH, Y.P. & YANG, C.H. (1989) Diffusion methods for the determination of reduced inorganic sulfur species in sediments. *Limnol. Oceanogr.* 34, 1126-1130.
- HUBER, G. & STETTER, K. O. (1991) *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolithotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *System. Appl. Microbiol.* 14: 372-378.
- HUBER, G., SPINNLER, C., GAMBACORTA, A. & STETTER, K. O. (1989) *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacetophilic archaeabacteria. *System. Appl. Microbiol.* 12: 38-47.
- INGLEDEW, W. J. (1982) *Thiobacillus ferrooxidans*: the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta* 683: 89-117.
- INGVORSEN, K. (1998) Bacterial sulphate reduction in waterlogged soils measured by the  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  radiotracer technique. In: Alef, K. & Nannipieri, P. (Hrsg.) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, H. Brace & Company, London: S. 299-303.

- ISAKSEN, M.F., BAK, F. & JØRGENSEN, B.B. (1994) Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14: 1-8.
- ISHII, K., TAKII, S., FUKUNAGA, S. & AOKI, K. (2000) Characterization by denaturing gradient gel electrophoresis of bacterial communities in deep groundwater at the Kamaishi Mine, Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 85-93.
- JØRGENSEN, B.B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643-645.
- JOHNSON, D.B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 307-317.
- JOHNSON, D.B. (1995) Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. Microb. Meth.* 23: 205-218.
- JOHNSON, D. B., GHAURI, M. A. & MCGINNESS, S. (1993) Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 63-70.
- JOHNSON, D. B. & MCGINNESS, S. (1991a) Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 207-211.
- JOHNSON, D. B. & MCGINNESS, S. (1991b) A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *J. Microb. Meth.* 13: 113-122.
- JONES, J. G. (1986) Iron transformations by freshwater bacteria. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 149-185.
- KAPFER, M. (1998) Assessment of the colonization and primary production of microphytobenthos in the littoral of acidic mining lakes in Lusatia (Germany). *Water Air Soil Pollution* 108: 331-340.
- KARAVAICO, G.I., GOLYCHINA, O.V., TROITSKII, A.V., VALIEHO-ROMAN, R.S., GOLOVACHEVA, R.S. & PIVOVAROVA, T.A. (1994) *Sulfurococcus yellowstonii* sp. nov., a new species of iron- and sulfur-oxidizing thermoacidophilic archaeabacteria. *Microbiology* 63: 379-387.
- KARAVAICO, G.I., GOLOVACHEVA, R.S., PIVOVAROVA, T.A., TZAPLINA, I.A. & VARTANJAN, N.S. (1988) Thermophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. In: Norris, P.R. & Kelly, D.P. (Hrsg.) *Biohydrometallurgy*, Proc. of Inter. Symp. Warwick. STL Press: S. 29-41.
- KATZUR, J. (1998) Melioration schwefelhaltiger Kippböden. In Pflug, W. (Hrsg.) *Braunkohlentagebau und Rekultivierung - Landschaftökologie - Folgenutzung - Naturschutz*. Springer-Verlag, Berlin: S. 559-572.
- KELLY, D.P. & HARRISON, A.H. (1989) Genus *Thiobacillus*. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1. Aufl., 3. Band, Williams & Wilkins: Baltimore: S. 1842-1858.
- KELLY, D.P. & WOOD, A.P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 511-516.
- KELLY, D.P., SHERGILL, J.K., LU, W.-P. & WOOD, A.P. (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 95-107.
- KING, G. M. (1990) Effects of added manganic and ferric oxides on sulfate reduction and sulfide oxidation in intertidal sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 131-138.
- KISHIMOTO, N., KOSAKO, Y. & TANO, T. (1993) *Acidiphilium aminolytica* sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium isolated from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* 27: 131-136.

- KISHIMOTO, N., KOSAKO, Y. & TANO, T. (1991) *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* 22: 1-7.
- KLAPPER, H. (2000) Klarwasserseen in der Bergbaufolgelandschaft. *Gewässerökologie Norddeutschlands* 2000/4: 17-21.
- KLAPPER, H. & SCHULTZE, M. (1995) Geogenically acidified mining lakes - living conditions and possibilities of restoration. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 810: 639-653.
- KLEE, A.J. (1993) A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. *J. Microbiol. Meth.* 18: 91-98.
- KLEEBERG, A. (1998) The quantification of sulfate reduction in sulfate-rich freshwater lakes - a means for predicting the eutrophication process of acidic mining lakes? *Water Air Soil Pollution* 108: 365-374.
- KLEMPIS, R., CYPIONKA, H., WIDDEL, F. & PFENNIG, N. (1985) Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Arch. Microbiol.* 143: 203-208.
- KLUGE, A.G. & FARRIS, J.S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- KNÖLLER, K. & STRAUCH, G. (1999) Assessment of the flow dynamic of a mining lake by stable isotope investigations. *Isotopes Environ. Health Stud.* 35: 75-83.
- KUENEN, J.G. & BOS, P. (1989) Habitats and ecological niches of chemolitho(auto)trophic bacteria. In: Schlegel, H.G. & Bowien, B. (Hrsg.) *Autotrophic Bacteria*. Springer, Berlin: S. 53-80.
- KUEVER, J., KULMER, J., JANSEN, S., FISCHER, U. & BLOTEVOGEL, K.-H. (1993) Isolation and characterization of a new sporeforming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol. *Arch. Microbiol.* 159: 282-288.
- KUMA, K., NISHIOKA, J. & MATSUNAGA, K. (1996) Controls on iron(III) hydroxide solubility in seawater: The influence of pH and natural organic chelators. *Limnol. Oceanogr.* 41: 396-407.
- KÜSEL, K. & DORSCH, T. (2000) Effect of supplemental donors on the microbial reduction of Fe(III), sulfate, and CO<sub>2</sub> in coal-mining-impacted freshwater lake sediments. *Microb. Ecol.* 40: 238-249.
- KÜSEL, K., DORSCH, T., ACKER, G. & STACKEBRANDT, E. (1999) Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilum cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3633-3640.
- LEATHEN, W.W., BRALEY, S.A. & MCINTYRE, L.D. (1953a) The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal. I. *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Microbiol.* 1: 61-64.
- LEATHEN, W.W., BRALEY, S.A. & MCINTYRE, L.D. (1953b) The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol.* 1: 65-68.
- LEßMANN, D., FYSON, A. & NIXDORF, B. (2000) Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH ≤ 3. *Hydrobiologia* 433: 123-128.
- LEßMANN, D., DENEKE, R., ENDER, R., HEMM, M., KAPFER, M., KRUMBECK, H., WOLLMANN, K. & NIXDORF, B. (1999) Lake Plessa 107 (Lusatia, Germany) - an extremely acidic shallow mining lake. *Hydrobiologia* 408/409: 293-299.
- LEU, J.Y., MCGOVERN-TRAAS, C.P., PORTER, A.J.R., HARRIS, W.J. & HAMILTON, W.A. (1998) Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing. *Anaerobe* 4: 165-174.

- LOBOS, J. H., CHISOLM, T. E., BOPP, L. H. & HOLMES, D. S. (1986) *Acidiphilium organovorum* sp. nov., an acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus ferrooxidans* culture. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 139-144.
- LONDON, J. (1963) *Thiobacillus intermedius* nov. sp. A novel type of facultative autotroph. Arch. Mikrobiol. 46: 329-337.
- LONDON, J. & RITTENBERG, S.C. (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*. Arch. Mikrobiol. 59: 218-225.
- LONERGAN, D.J., JENTER, H.L., COATES, J.D., PHILLIPS, E.J.P., SCHMIDT, T.M. & LOVLEY, D.R. (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. J. Bacteriol. 178: 2402-2408.
- LOVLEY, D. R. (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. FEMS Microbiol. Rev. 20: 305-313.
- LOVLEY, D.R. (1995) Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. Advances in Agronomy 54: 175-231.
- LOVLEY, D. & COATES, J.D. (2000) Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. Current Opinion in Microbiology 3: 252-256.
- LOVLEY, D.R. & PHILLIPS, E.J.P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1472-1480.
- LOVLEY, DR. & PHILLIPS, E.J.P. (1987a) Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1536-1540.
- LOVLEY, D.R. & PHILLIPS, E.J.P. (1987b) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. Appl. Env. Microbiol. 53: 2636-2641.
- LOVLEY, D.R. & PHILLIPS, E.J.P. (1986) Organic matter mineralisation with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. Appl. Env. Microbiol. 51: 683-689.
- LOVLEY, D.R., PHILLIPS, E.J.P., LONERGAN, D.J. & WIDMAN, P.K. (1995) Fe(III) and S<sup>0</sup> reduction by *Pelobacter carbinolicus*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2132-2138.
- LOVLEY, D.R., PHILLIPS, E.J.P. & LONERGAN, D.J. (1991) Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. Environ. Sci. Technol. 25: 1062-1067.
- LOWE, K.L., DICHRISTINA, T.J., ROYCHOUDHURY, A.N. & VAN CAPPELLEN, P. (2000) Microbiological and geochemical characterization of microbial Fe(III) reduction in salt marsh sediments. Geomicrobiol. J. 17: 163-178.
- LUCKNER, L. & EICHHORN, D. (1996) Wasserwirtschaft Wassertechnik 4/96: 18-29.
- LUTHER III, G.W. (1991) Pyrite synthesis via polysulfide compounds. Geochim. Cosmochim. Acta 55: 2839-2849.
- LUTHER III, G.W. (1987) Pyrite oxidation and reduction: Molecular orbital theory considerations. Geochim. Cosmochim. Acta 51: 3193-3199.
- LYONS, T.W. (1997) Sulfur isotopic trends and pathways of iron sulfide formation in upper Holocene sediments of the anoxic Black Sea. Geochim. Cosmochim. Acta 61: 3367-3382.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. (2000) Brock biology of microorganisms. 9. Aufl., Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey: 991 S.
- MAIDAK, B. L., COLE, J.R., LILBURN, T.G., PARKER JR, C.T., SAXMAN, P.R., STREDWICK, J.M., GARRITY, G.M., LI, B., OLSEN, G.J., PRAMANIK, S., SCHMIDT, T.M. & TIEDJE, J.M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) continues. Nucleic Acids Res. 28:173-174.

- MARCHLEWITZ, B. & SCHWARTZ, W. (1961) Untersuchungen über die Mikroben-Assoziation saurer Grubengewässer. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 1: 193-202.
- MARKOYSAN, G. E. (1972) A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* gen. et sp. nov. Biol. Zh. Arm. 25: 2-26.
- MATIN, A. (1990) Keeping a neutral cytoplasm: the bioenergetics of obligate acidophiles. FEMS Microbiol. Rev. 75: 307-318.
- MATIN, A. (1978) Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 32: 433-469.
- McKNIGHT, D.M., KIMBALL, B.A. & BENCALA, K.E. (1988) Iron photoreduction and oxidation in an acidic mountain stream. Science 240: 637-640.
- MEIER, J. & BABENZIEN, H.-D. (1998) Abschlußbericht zum Werkvertrag UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH und IGB-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei im FV Berlin e.V. im Rahmen des BMBF-Projekts Nr. 0339648, Laufzeit 01.01.1995-30.06.1998.
- MEIER, J., VOIGT, A. & BABENZIEN, H.-D. (2000) A comparison of  $^{35}\text{S}$ - $\text{SO}_4^{2-}$  radiotracer techniques to determine sulphate reduction rates in laminated sediments. J. Microbiol. Meth. 41: 9-18.
- MIDDLEBURG, J.J. (1991) Organic carbon, sulphur, and iron in recent semi-euxinic sediments of Kau Bay, Indonesia. Geochim. Cosmochim. Acta 55: 815-828.
- MILLAR, W.N. (1973) Heterotrophic bacterial population in acid coal mine water: *Flavobacterium acidurans*, sp. n. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 435-443.
- MILLS, A.L., BELL, P.E. & HERLIHY, A.T. (1989) Microbes, sediments, and acidified water; the importance of biological buffering. In: Rao, S.S. (Hrsg.) Acid stress and aquatic microbial interactions. CRC Press, Boca Raton: S. 1-19.
- MISCHKE, U. (1998) Endbericht zum LENAB-Verbundprojekt, BTUC-Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Bad Saarow, BMBF-Projekt Nr. 0339648, Laufzeit 01.01.1995-30.06.1998.
- MÖBS, H. & MAUL, C. (1994) Sanierung der Braunkohlegebiete in Mitteldeutschland und in der Lausitz. Wasserwirtschaft Wassertechnik 3/94: 12-18.
- MOSHAGEGHI, A., GROHMANN, K., HIMMEL, M., LEIGHTON, L. & UPDEGRAFF, D. M. (1986) Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 435-443.
- MUDRO, A. & AZCUE, J. M. (1995) Manual of aquatic sediment sampling. Lewis Publishers, Boca Raton: 215 S.
- MURRAY, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucl. Acids Res. 17: 8889.
- MUYZER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE, A. & WAVER, C. (1995) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermann, A. D. L., Van Elsas, J. D. & De Bruijn, F. J. (Hrsg.) Molecular microbial ecology manual. Kluwer, Dordrecht: S. 3.4.4.1-3.4.4.22.
- NEALSON, K.H. (1997) Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? Annu. Rev. Earth Planet Sci. 25: 403-434.
- NEVIN, K.P. & LOVLEY, D.R. (2000) Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments. Environ. Sci. Technol. 34: 2472-2478.

- NEWMAN, D.K., KENNEDY, E.K., COATES, J.D., AHMANN, D., ELLIS, D.J., LOVLEY, D.R. & MOREL, F.M.M. (1997) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. Arch. Microbiol. 168: 380-388.
- NIELSEN, P.H., ANDREASEN, K., LEE, N. & WAGNER, M. (1999) Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge. Wat. Sci. Tech. 39: 1-9.
- NIXDORF, B. & HEMM, M. (2000) Besonderheiten im Stoffhaushalt künstlicher Klarwasserseen Südostbrandenburgs (Tagebauseen der Lausitz) - ein Überblick. Gewässerökologie Norddeutschlands 2000/4: 32-39.
- NIXDORF, B. & KAPFER, M. (1998) Stimulation of phototrophic pelagic and benthic metabolism close to sediments in acidic mining lakes. Water Air Soil Pollution 108: 317-330.
- NIXDORF, B., MUTZ, M., WOLLMANN, K. & WIEGLEB, G. (2000) Zur Ökologie in extrem sauren Tagebaugewässern der Bergbaufolgelandschaft - Besiedlungsmuster und Leitbilder. In: Wiegbleb, G., Bröring, U., Mrzljak, J. & Schulz, F. (Hrsg.) Naturschutz in Bergbaufolgelandschaften. Physica, Heidelberg: S. 360-381.
- NIXDORF, B., WOLLMANN, K. & DENEKE, R. (1998a) Ecological potentials for planktonic development and food web interactions in extremely acidic mining lakes in Lusatia. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. Environ. Sci. Series Springer, Berlin: S. 147-167.
- NIXDORF, B., MISCHKE, U. & LEßMANN, D. (1998b) Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes ( $\text{pH} < 3$ ) in Lusatia (Germany). Hydrobiologia 369/370: 315-327.
- NOHLEN, C. (1999) Differenzierung der partikulären organischen Substanz hinsichtlich ihrer Herkunft in sauren Restlochseen des Braunkohletagebaus der Lausitz. Diplomarbeit, Universität Bayreuth: 52 S.
- NORDSTROM, D.K. & ALPERS, C.N. (1999) Geochemistry of acid mine waters. In: Plumlee, G.S. & Logsdon, M.J. (Hrsg.) The environmental geochemistry of mineral deposits. Part A: Processes, techniques, and health issues. Society of Economic Geologists, Littleton, CO: S. 133-160.
- NORRIS, P. R., CLARK, D. A., OWEN, J. P. & WATERHOUSE, S. (1996) Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. Microbiology 142: 775-783.
- OBERZILL, W. (1967) Mikrobiologische Analytik. Hans Carl-Verlag, Nürnberg: S. 122-128.
- O'FLAHERTY, V.; MAHONY, T.; O'KENNEDY, R.; COLLERAN, E. (1998) Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. Process Biochem. 33: 555-596.
- OVERMANN, J., FISCHER, U. & PFENNIG, N. (1992) A new sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradsky* gen. nov. and sp. nov. Arch. Microbiol. 157: 329-335.
- PACKROFF, G. & WOELFL, S. (2000) A review on the occurrence and taxonomy of heterotrophic protists in extreme acidic environments of  $\text{pH}$  values  $\leq 3$ . Hydrobiologia 433: 153-156.
- PACKROFF, G., BLASCHKE, W., HERZSPRUNG, P., MEIER, J., SCHIMMELE, M. & WOLLMANN, K. (2000) Limnologie und Gewässerchemie von ausgewählten, geogen schwefelsauren Tagebaurestseen der Niederlausitz. In: Wiegbleb, G., Bröring, U., Mrzljak, J. & Schulz, F. (Hrsg.) Naturschutz in Bergbaufolgelandschaften. Physica, Heidelberg: 314-330.

- PARKER, C.D. (1957) Genus V. *Thiobacillus* Beijerinck 1904. In: Breed, R. S., Murray, E.G.D. & Smith, N. R. (Hrsg.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl. The Williams & Wilkins Co., Baltimore: S. 83-88.
- PECCIA, J., MARCHAND, E.A., SILVERSTEIN, J. & HERNANDEZ, M. (2000) Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3065-3072.
- PECK JR., D.P. (1993) Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: Odom, J.M. & Singleton Jr., R. (Hrsg.) The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer, New York Inc.: S. 41-76.
- PEDERSEN, K., ARLINGER, J., EKENDAHL, S. & HALLBECK, L. (1996) 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 249-262.
- PEINE, A. & PEIFFER, S. (1998) In-lake neutralization of acid mining lakes. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. *Environ. Sci. Series Springer*, Berlin:S. 47-63.
- PEINE, A., TRITSCHLER, A., KÜSEL, K. & PEIFFER, S. (2000) Electron flow in an iron-rich acidic sediment - evidence for an acidity-driven iron cycle. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1077-1087.
- PFENNIG, N. (1974) *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Mikrobiol.* 100: 197-206.
- PFENNIG, N. (1969) *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. *J. Bacteriol.* 99: 597-602.
- PIKER, L., SCHMALJOHANN, R. & IMHOFF, J.F. (1998) Dissimilatory sulfate reduction and methane production in Gotland Deep sediments (Baltic Sea) during a transition period from oxic to anoxic bottom water (1993-1996). *Aquat. Microb. Ecol.* 14:183-193.
- PÖHLER, I., WENDEROTH, D.F. & HÖFLE, M.G. (2001) Microbial dynamics and community structure of an acid mining lake during remediation. Biospektrum, Sonderausgabe zur VAAM-Jahrestagung in Oldenburg 25.-28.03.01: S. 35.
- POSTGATE, J.R. (1959) A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulphuricans*. *Nature* 183: 481-482.
- POSTMA, D. (1982) Pyrite and siderite formation in brackish and freshwater swamp sediments. *Amer. J. Sci.* 282: 1151-1183.
- POSTMA, D. & JAKOBSEN, R. (1996) Redox zonation: equilibrium constraints on the Fe(III)/SO<sub>4</sub>-reduction interface. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 3169-3175.
- POULSON, S.R.; COLBERG, P.J.S. & DREVER, J.I. (1997) Toxicity of heavy metals (Ni,Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Geomicrobiol. J.* 14: 41-49.
- PRONK, J. T. & JOHNSON, D. B. (1992) Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicrobiol. J.* 10: 153-171.
- PRONK, J.T., DE BRUYN, J.C., BOS, P. & KUENEN, J.G. (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2227-2230.
- PYZIK, A.J. & SOMMER, S.E. (1981) Sedimentary iron monosulfides: kinetics and mechanism of formation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45: 687-698.
- RAISWELL, R. & BERNER, R. A. (1985) Pyrite formation in euxinic and semi-euxinic sediments. *Amer. J. Sci.* 285: 710-724.

- RAWLINGS, D.E., TRIBUTSCH, H. & HANSFORD, G.S. (1999) Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145: 5-13.
- REIS, M.A.M., ALMEIDA, J.S., LEMOS, P.C. & CARRONDO, M.J.T. (1992) Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 593-600.
- RICE, C.A., TUTTLE, M.L. & REYNOLDS, R.L. (1993) The analysis of forms of sulfur in ancient sediments and sedimentary rocks: comments and cautions. *Chem. Geol.* 107, 83-95.
- ROBERTSON, L.A. & KUENEN, J.G. (1992) The colorless sulfur bacteria. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (Hrsg.) *The Prokaryotes* Springer-Verlag, Berlin: S. 385-413.
- ROBERTSON, W.J., FRANZMANN, P.D. & MEE, B.J. (2000) Spore-forming, *Desulfosporosinus*-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasoline. *J. Appl. Microbiol.* 88: 248-259.
- ROBBINS, E.I. (2000) Bacteria and Archaea in acidic environments and a key to morphological identification. *Hydrobiologia* 433: 61-89.
- RODEN, E. E. & TUTTLE, J. H. (1993) Inorganic sulfur turnover in oligohaline estuarine sediments. *Biogeochem.* 22: 81-105.
- RODEN, E.E. & ZACHARA, J.M. (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1618-1628.
- ROONEY-VARGA, J.N., SHARAK GENTHNER, B.R., DEVEREUX, R., WILLIS, S.G., FRIEDMAN, S.D. & HINES, M.E. (1998) Phylogenetic and physiological diversity of sulphate-reducing bacteria isolated from salt marsh sediment. *System. Appl. Microbiol.* 21: 557-568.
- ROSE, S. & GHAZI, M. (1997) Release of sorbed sulfate from iron oxyhydroxides precipitated from acid mine drainage associated with coal mining. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2136-2140.
- SAHM, K., KNOBLAUCH, C. & AMANN, R. (1999a) Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3976-3981.
- SAHM, K., MACGREGOR, B.J., JØRGENSEN, B.B. & STAHL, D.A. (1999b) Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ. Microbiol.* 1: 65-74.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SAMPSON, C. J., BREZONIK, P. L. & WEIR, E. P. (1994) Effects of acidification on chemical composition and chemical cycles in a seepage lake: Inferences from a whole lake experiment. In: Baker, L. A. (Hrsg.) *Environmental chemistry of lakes and reservoirs*. Adv. Chem. Ser. ACS: S. 121-159.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
- SASS, H., CYPIONKA, H. & BABENZIEN, H.-D. (1997) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 245-255.

- SASS, H., WIERINGA, E., CYPIONKA, H., BABENZIEN, H.-D. & OVERMANN, J. (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* 170: 243-251.
- SATAKE, K. (1977) Microbial sulphate reduction in a volcanic acid lake having pH 1.8 to 2.0. *Jap. J. Limnol.* 38: 33-35.
- SCHALLER, T., MOOR, H.C. & WEHRLI, B. (1997) Reconstructing the iron cycle from the horizontal distribution of metals in the sediment of Baldeggsee. *Aquat. Sci.* 59: 326-344.
- SCHIMMELE, M. (1999) Ausbildung von Meromixien durch physikalische und chemische Einflüsse am Beispiel von Bergbaurestseen. Erweiterte Zusammenfassungen der DGL Jahrestagung 1998 in Klagenfurt, Deutsche Gesellschaft für Limnologie, Tutzingen 1999: S. 234-238.
- SCHIMMELE, M. (1998) Endbericht zum LENAB-Verbundprojekt, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Magdeburg, BMBF-Projekt Nr. 0339648, Laufzeit 01.01.1995-30.06.1998.
- SCHINDLER, D.W. (1986) The significance of in-lake production of alkalinity. *Water Air Soil Pollution* 30: 931-944.
- SCHINDLER, D. W., TURNER, M. A., STAINTON, M. P. & LINSEY, G. A. (1986) Natural sources of acid neutralizing capacity in low alkalinity lakes of the Precambrian Shield. *Science* 232: 844-847.
- SCHINK, B.; PHILIPP, B. & MÜLLER, J. (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 87: 12-23.
- SCHIPPERS, A. (1998) Untersuchungen zur Schwefelchemie der biologischen Laugung von Metallsulfiden. Dissertation, Universität Hamburg. 102 S.
- SCHIPPERS, A. & SAND, W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 319-321.
- SCHIPPERS, A., ROHWERDER, T. & SAND W. (1999) Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 104-110.
- SCHLEGEL, H.G. & BOWIEN, B. (Hrsg.) (1989) Autotrophic bacteria. Springer-Verlag, Berlin: 528 S.
- SCHLEPER, C., PÜHLER, G., KLENK, H.-P. & ZILLIG, W. (1996) *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic archaea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 814-816.
- SCHRENK, M.O., EDWARDS, K.J., GOODMAN, R.M., HAMERS, R.J. & BANFIELD, J.F. (1998) Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. *Science* 279: 1519-1522.
- SCHULZ, F. & WIEGLEB, G. (2000) Die Niederlausitzer Bergbaufolgelandschaft - Probleme und Chancen. In: Wiegleb, G., Bröring, U., Mrzljak, J. & Schulz, F. (Hrsg.) *Naturschutz in Bergbaufolgelandschaften*. Physica, Heidelberg: S. 3-23.
- SCHWARTZ, W. (Hrsg.) (1977) Conference Bacterial Leaching. Schriftenreihe der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Heft 4. Verlag Chemie, Weinheim: 261 S.
- SEGERER, A. H., TRINCONE, A., GAHRITZ, M. & STETTER, K. O. (1991) *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. represents a novel genus of anaerobic, extremely thermoacidophilic archaeabacteria of the order Sulfolobales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 495-501.

- SEGERER, A., LANGWORTHY, T. A. & STETTER, K. O. (1988) *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. System. Appl. Microbiol. 10: 161-171.
- SEGERER, A., NEUNER, A., KRISTJANSSON, J. K. & STETTER, K. O. (1986) *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeabacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 559-564.
- SHIVELY, J.M. & BARTON, L.L. (Hrsg.) (1991) Variations in autotrophic life. London: Academic Press. 528 S.
- SIGG, L. & STUMM, W. (1996) Aquatische Chemie: eine Einführung in die Chemie wässriger Lösungen und natürlicher Gewässer. vdf, Hochschulverl. ETH Zürich: 498 S.
- SILVERMAN, M.P. (1967) Mechanism of bacterial pyrite oxidation. J. Bacteriol. 94: 1046-1051.
- SINGER, P.C. & STUMM, W. (1970) Acid mine drainage: the rate-determining step. Science 167: 1121-1123.
- SKERMAN, V. B. D., McGOWAN, V. & SNEATH, P. H. A. (Hrsg.) (1980) Approved Lists of Bacterial Names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420.
- SKYRING, G.W. (1987) Sulfate reduction in coastal ecosystems. Geomicrobiol. J. 5: 295-374.
- SNOEYENBOS-WEST, O.L., NEVIN, K.P., ANDERSON, R.T. & LOVLEY, D.R. (2000) Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments. Microb. Ecol. 39: 153-167.
- SØRENSEN, J. (1982) Reduction of ferric iron in anaerobic, marine sediment and interaction with reduction of nitrate and sulfate. Appl. Environ. Microbiol. 43: 319-324.
- STACKEBRANDT, E., SPROER, C., RAINY, F.A., BURGHARDT, J., PAUKER, O. & HIPPE, H. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bact. 47: 1134-1139.
- STACKEBRANDT, E., STAHL, D.A. & DEVEREUX, R. (1995) Taxonomic relationships. In: Barton, L.L. (Hrsg.) Sulfate-reducing bacteria. Plenum Press, New York, London: S. 49-88.
- STAMS, A. J. M., VEENHUIS, M., WEENK, G. H. & HANSEN, T. A. (1983) Occurrence of polyglucose as a storage polymer in *Desulfovibrio* species and *Desulfobulbus propionicus*. Arch Microbiol. 136: 54-59.
- STOESSER, G., BAKER, W., VAN DEN BROEK, A.E., CAMON, E., HINGAMP, P., STERK, P. & TULI, M.A. (2000) The EMBL Nucleotide Sequence Database. Nucleic Acids Res. 28: 19-23.
- STRIMMER, K. & VON HAESELER, A. (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Mol. Biol. Evol. 13: 964-969.
- STUBNER, S., WIND, T & CONRAD R. (1998) Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. System. Appl. Microbiol. 21: 569-578.
- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., WADDELL, P. J. & HILLIS, D. M. (1996) Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Hrsg.) Molecular systematics. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts. S. 407-514.
- TABATABAI, M. A. (1974) Determination of sulphate in water samples. Sulphur Inst. J. 10: 11-13.
- TARDY-JAQUENOD, C., CAUMETTE, P., MATHERON, R., LANAU, C., ARNAULD, O. & MAGOT, M. (1996) Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters. Can. J. Microbiol. 42: 259-266.

- TASAKI, M., KAMAGATA, Y., NAKAMURA, K. & MIKAMI, E. (1991) Isolation and characterization of a thermophilic benzoate degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. Arch. Microbiol. 155: 348-352.
- TEBO, B.M. & OBSTRATZSOVA, A.Y. (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. FEMS Microbiol. Lett. 162: 193-198.
- TEMPLE, K.L. & COLMER, A.R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 62: 605-611.
- TESKE, A., BRINKHOFF, T., MUYZER, G., MOSER, D.P., RETHMEIER, J. & JANNASCH, H.W. (2000) Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3125-3133.
- THAMDRUP, B. (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. Advances in Microbial Ecology. 16: 41-84
- THAMDRUP, B., FOSSING, H. & JØRGENSEN, B. B. (1994) Manganese, iron, and sulfur cycling in a coastal marine sediment, Aarhus Bay, Denmark. Geochim. Cosmochim. Acta 58: 5115-5129.
- THODE-ANDERSEN, S. & JØRGENSEN, B. B. (1989) Sulfate reduction and the formation of <sup>35</sup>S-labeled FeS, FeS<sub>2</sub> and S<sup>0</sup> in coastal marine sediments. Limnol. Oceanogr. 34: 793-806.
- THUM, J., WÜNSCHE, W. & FIEDLER, H.-J. (1992) Rekultivierung im Braunkohlenbergbau der östlichen Bundesländer. In: Rosencranz, D., Bachmann, G., Einsele, G. & Harreß, H.M. (Hrsg.), Bodenschutz - Ergänzbares Handbuch, 10 Lfg., II/1992, 1-38.
- TRÜPER, H.G. (1992) Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. Biodiversity and Conservation 1: 227-236.
- TUTTLE, J.H., DUGAN, P. & RANDLES, C.I. (1969a) Microbial sulfate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure. Appl. Microbiol. 17: 297-302.
- TUTTLE, J. H., DUGAN, P. R. & RANDLES, C. I. (1969b) Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. J. Bacteriol. 97: 594-602.
- TUTTLE, J. H., DUGAN, P. R. & APEL, W. A. (1977) Leakage of cellular material from *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of organic acids. Appl. Environ. Microbiol. 33: 459-469.
- UHLIG, H., KARBAUM, K. & STEUDEL, A. (1986) *Acetobacter methanolicus* sp. nov., an acidophilic facultatively methylotrophic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 317-322.
- ULRICH, G.A., KRUMHOLZ, L.R. & SUFLITA, J.M. (1997) A rapid and simple method for estimating sulfate reduction activity and quantifying inorganic sulfides. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1627-1630.
- UTKIN, I., WOESE, C. & WIEGEL, J. (1994) Isolation and characterisation of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov. an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 612-619.
- VAINSHTEIN, M., HIPPE, H. & KROPPIENSTEDT, R.M. (1992) Cellular fatty acid composition of *Desulfovibrio* species and its classification of sulfate-reducing bacteria. System. Appl. Microbiol. 15: 554-566.
- VASQUEZ, M. & ESPEJO, R.T. (1997) Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric acid concentration. Appl. Environ. Microbiol. 63: 332-334.
- VILE, M. A. & WIEDER, R. K. (1993) Alkalinity generation by Fe(III) reduction versus sulfate reduction in wetlands constructed for acid mine drainage treatment. Water Air Soil Pollution 69: 425-441.

- VISSCHER, P. T., PRINS, R. A. & VAN GEMERDEN, H. (1992) Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 283-294.
- VLASCEANU, L., SARBU, S.M., ENGEL, A.S. & KINKLE, B.K. (2000) Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.* 17: 125-139.
- WAKAO, N., HIRASHI, N., NAGASAWA, T., MATSUURA, T., MATSUMOTO, Y., SAKURAI, Y. & SHIOTA, H. (1994) *Acidiphilum multivorum* sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 143-159.
- WAKAO, N., HANADA, K., TAKAHASHI, A., SAKURAI, Y. & SHIOTA, H. (1991) Morphological, physiological, and chemotaxonomical characteristics of iron- and sulfur-oxidizing bacteria isolated from acid mine drainage waters. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37: 35-48.
- WAKAO, N., TAKAHASHI, T., SAKURAI, Y. & SHIOTA, H. (1979) A treatment of acid mine water using sulfate reducing bacteria. *J. Ferment. Technol.* 5: 445-452.
- WAKSMAN, S.A. & JOFFE, J.S. (1922) Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. *J. Bacteriol.* 7: 239-256.
- WALLMANN, K., HENNIES, K., KÖNIG, I., PETERSEN, W. & KNAUTH, H.-D. (1993) New procedure for determining reactive Fe(III) and Fe(II) minerals in sediments. *Limnol. Oceanogr.* 38 : 1803-1812.
- WEBB, J.S., McGINNESS, S. & LAPPIN-SCOTT, H.M. (1998) Metal removal by sulphate-reducing bacteria from natural and constructed wetlands. *J. Appl. Microbiol.* 84: 240-248.
- WENDT-POTTHOFF, K. & MEIER, J. (2000) Mikrobiologie von Tagebaurestseen in der Lausitz. In: Friese, K. & Von Tümpeling, W. (Hrsg.) Biologische und chemische Entwicklung von Bergbaurestseen. UFZ-Bericht 26/2000: S. 183-198.
- WESTRICH, J.T. & BERNER, R.A. (1984) The role of sedimentary organic matter in bacterial sulfate reduction: The G model tested. *Limnol. Oceanogr.* 29: 236-249.
- WICHLACZ, P. L., UNZ, R. F. & LANGWORTHY, T. A. (1986) *Acidophilum angustum* sp. nov., *Acidophilum facilis* sp. nov., and *Acidophilum rubrum* sp. nov.: acidophilic heterophilic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 197-201.
- WIDDEL, F. (1992) The Genus *Desulfotomaculum*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin: S. 1792-1798.
- WIDDEL, F. (1989) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder, A.J.B. (Hrsg.) *Biology of anaerobic microorganisms*, Wiley, New York: S. 469-585.
- WIDDEL, F. & BAK, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin: S. 3352-3389.
- WIEGLEB, G., BRÖRING, U., MRZLJAK, J. & SCHULZ, F. (Hrsg.) (2000) Naturschutz in Bergbaufolgelandschaften. Physica, Heidelberg: 381 S.
- WIERINGA, E.B.A., OVERMANN, J. & CYPIONKA, H. (2000) Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environ. Microbiol.* 2: 417-427.
- WIND, T. & CONRAD, R. (1995) Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 257-266.
- WISOTZKEY, J.D., JURTSHUK JR., P., FOX, G.E., DEINHARD G. & PORALLA, K. (1992) Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 263-269.

- WOLLMANN, K., DENEKE, R., NIXDORF, B. & PACKROFF, G. (2000) Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2 - 4). *Hydrobiologia* 433: 3-14.
- ZACHMANN, D.W.; BACHMANN, T.; BECKER, A. & FRIESE, K. (1998) Elementverteilung und Bindungsformen in Sedimenten von Bergbaurestseen des Lausitzer Braunkohlereviers (Brandenburg). Tagungsband der 4. Arbeitstagung des Bereiches Umwelt: Erdwissenschaftliche Aspekte des Umweltschutzes. Österreichisches Forschungs- und Prüfungsamt Arsenal GmbH, Wien: S. 331-336.
- ZHABINA, N. N. & VOLKOV, I. I. (1978) A method of determination of various sulfur compounds in sea sediments and rocks. In: Krumbein, W. E. (Hrsg.) Environmental biogeochemistry and geomicrobiology. Ann Arbor Science Publishers, Michigan: 735-746.
- ZILLIG, W., YEATS, S., HOLZ, J., BÖCK, A., RETTENBERGER, M., GOPP, F. & SIMON, G. (1986) *Desulfolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaeabacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur. *System. Appl. Microbiol.* 8: 197-203.
- ZILLIG, W., GIERL, A., SCHREIBER, G., WUNDERL, S., JANEKOVIC, D., STETTER, K. O. & KLENK, H. P. (1983) The archaeabacterium *Thermophilum pendens* represents a novel genus of the thermophilic, anaerobic sulfur respiring Thermoproteales. *System. Appl. Microbiol.* 4: 79-87.
- ZILLIG, W., STETTER, K. O., PRANGISHVILLI, D., SCHÄFER, W., WUNDERL, S., JANEKOVIC, D., HOLZ, I. & PALM, P. (1982) Desulfurococcaceae, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring Thermoproteales. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 3: 304-317.
- ZILLIG, W., STETTER, K. O., SCHÄFER, W., JANEKOVIC, D., WUNDERL, S., HOLZ, J. & PALM, P. (1981) Thermoproteales: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeabacteria isolated from Icelandic solfataras. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 2: 205-227.
- ZILLIG, W., STETTER, K. O., WUNDERL, S., SCHULZ, W., PRIESS, H. & SCHOLZ, J. (1980) The *Sulfolobus*-"*Caldariella*" group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch. Microbiol.* 125: 259-269.

**7. Anhang**

## 7.1 Daten der Sedimentprobenahmen

Tab. 7.1: Temperatur und Sauerstoff über dem Sediment.

Standort	Probenahme	Temperatur	Sauerstoff
RS 111 (10 m)	18.08.1997	6	anoxisch
RS 111 (7 m)	19.08.1997	7,5	4 mg l <sup>-1</sup>
RS 107	20.08.1997	15,9	5 mg l <sup>-1</sup>
RS B	21.08.1997	8,5	5 mg l <sup>-1</sup>

Tab. 7.2a: pH/Eh RS 111 (10 m) 20.04.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	3,93	190
1-2	4,93	156
2-3	4,72	114
3-4	5,21	-8
4-5	5,65	46
5-6	5,95	-80
6-7	6,14	44
7-8	6,19	6
8-9	6,23	45
9-10	6,33	39

Tab. 7.2b: pH/Eh RS 111 (10 m)  
18.08.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	2,45	147
1-2	3,39	124
2-3	3,59	112
3-4	3,8	26
4-5	4,27	-13
5-6	4,44	62
6-7	4,57	35
7-8	5,06	28
8-9	5,46	-2
9-10	5,56	

Tab. 7.2c: pH/Eh RS 111 (7 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	2,78	432
1-2	2,84	402
2-3	2,92	369
3-4	2,99	326
4-5	3,08	307
5-6	3,19	303
6-7	3,25	330
7-8	3,32	311
8-9	3,46	318
9-10	3,62	272

Tab. 7.2d: pH/Eh RS 111 (7 m) 19.08.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	2,68	402
1-2	2,74	372
2-3	2,77	349
3-4	2,82	337
4-5	2,86	301
5-6	2,92	282
6-7	2,98	303
7-8	3,02	309
8-9	3,07	272
9-10	3,11	285

Tab. 7.2e: pH/Eh RS 107 15.04.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	2,28	407
1-2	2,29	391
2-3	2,3	390
3-4	2,31	380
4-5	2,33	351
5-6	2,34	95
6-7	2,41	169
7-8	2,4	179
8-9	2,42	230
9-10	2,45	220

Tab. 7.2f: pH/Eh RS 107 20.08.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	2,32	381
1-2	2,38	370
2-3	2,42	363
3-4	2,45	342
4-5	2,46	327
5-6	2,46	238
6-7	2,51	210
7-8	2,47	243
8-9	2,5	209
9-10	2,52	229

Tab. 7.2g: pH/Eh RS B 23.04.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	6,87	222
1-2	7,2	160
2-3	7,24	120
3-4	7,28	102
4-5	7,24	95
6-7	7,24	102

Tab. 7.2h: pH/Eh RS B 21.08.97

Tiefe (cm)	pH	Eh (pH 7)
0-1	6,96	124
1-2	7	79
2-3		
3-4	6,97	89
4-5	6,88	85
5-6	6,95	58
6-7	6,86	48
7-8	6,92	58
8-9	6,74	56
9-10	6,75	54

Tab. 7.3a: Sulfat/DOC RS 111 (10 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)	DOC (mg l <sup>-1</sup> )
0-1	20,9	14,6
1-2	18,0	28,4
2-3	21,2	44,3
3-4	22,7	11,3
4-5	23,0	12,6
5-6	24,0	12,5
6-7	23,8	20,8
7-8	22,6	19,3
8-9	24,5	20,3
9-10	23,9	40,6

Tab. 7.3b: Sulfat RS 111 (10 m) 18.08.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	22,4
1-2	23,4
2-3	22,2
3-4	25,4
5-6	24,8
8-9	25,4

Tab. 7.3c: Sulfat/DOC RS 111 (7 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)	DOC (mg l <sup>-1</sup> )
0-1	20,8	15,5
3-4	19,2	8,3
8-9	20,7	24,0

Tab. 7.3d: Sulfat RS 111 (7 m) 19.08.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	17,4
1-2	18,0
2-3	18,8
3-4	19,1
4-5	19,4
5-6	19,4
6-7	17,7
7-8	14,4
8-9	20,3
9-10	20,6

Tab. 7.3e: Sulfat/DOC RS 107 15.04.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)	DOC (mg l <sup>-1</sup> )
0-1	30,5	40,4
1-2	25,1	44,0
2-3	27,8	46,1
3-4	30,2	53,1
4-5	31,6	43,4
5-6	31,3	33,8
6-7	30,6	20,0
7-8	31,0	22,9
8-9	30,8	23,0
9-10	30,0	48,4

Tab. 7.3f: Sulfat RS 107 20.08.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	32,4
1-2	35,4
2-3	37,0
3-4	37,2
4-5	37,2
5-6	35,5
8-9	31,8

Tab. 7.3g: Sulfat RS B 29.07.96

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	4,7
1-2	4,7
2-3	5,4
3-4	4,8
5-6	4,8
8-9	5,1

Tab. 7.3h: Sulfat/DOC RS B 24.04.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)	DOC (mg l <sup>-1</sup> )
0-1	5,3	3,9
1-2	5,3	6,3
2-3	4,7	8,1
3-4	5,1	5,4
4-5	5,2	8,9
5-6	5,1	10,6
6-7	5,1	11,0
7-8	5,3	13,5
8-9	4,6	0,0

Tab. 7.3i: Sulfat RS B 21.08.97

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	4,3
1-2	3,8
2-3	4,1
3-4	3,9
4-5	3,9
6-7	3,6
8-9	4,3
10-11	4,3

Tab. 7.3j: Sulfat RS B 24.06.98

Tiefe (cm)	Sulfat (mM)
0-1	4,2
1-2	4,2
2-3	3,9
4-5	3,9
6-7	3,0

Tab. 7.4a: S-Verbindungen  
RS 111 (10 m) 20.05.96

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )
	I	I
0-1	0,25	1,31
1-2	0,13	4,69
2-3	0,13	15,63
3-4	5,22	10,94
5-6	6,25	4,69
8-9	2,59	7,81

Tab. 7.4b: S-Verbindungen RS 111 (10 m) 19.08.96

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )				
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	0,13	0,13	0,25	0,17	2,34	6,25	0,66	3,09
1-2	0,53	0,66	0,25	0,48	10,94	9,91	4,94	8,59
2-3	2,09	1,44	0,91	1,48	14,56	13,53	13,53	13,88
3-4	9,91	4,69	3,66	6,08	8,84	9,91	6,50	8,41
5-6	3,91	4,16	1,81	3,29	4,69	5,72	2,59	4,34
8-9	2,59	1,69	1,31	1,86	5,72	2,88	3,13	3,91
rel. St.abw.		35 %					39 %	

Tab. 7.4c: S-Verbindungen RS 111 (10 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			$S^0$	$\text{FeS}_2$	$S^0 + \text{FeS}_2$	% $S^0$	CRS	CRS	$S^0$	$\text{FeS}_2$
	I	II	Mittelw.	I	I	I	I	II	Mittelw.	CRS-MW	CRS-MW
0-1	0,13	0,25	0,19	4,69	2,59	7,28	64,38	8,84	8,06	5,19	2,87
1-2	0,66	1,31	0,98	4,44	2,34	6,78	65,44	8,34	7,56	4,95	2,61
2-3	17,72	23,97	20,84	4,94	4,69	9,63	51,30	11,47	10,55	5,41	5,14
3-4	15,09	18,75	16,92	0,13	1,31	1,44	8,70	4,69	3,06	0,27	2,80
4-5	5,78	61,84	33,81	2,91	1,31	4,22	68,89	22,78	13,50	9,30	4,20
5-6	11,47	10,41	10,94	2,88	1,81	4,69	61,33	9,13	6,91	4,24	2,67
6-7	20,84	20,84	20,84	4,69	3,91	8,59	54,55	13,03	10,81	5,90	4,91
7-8	0,91	2,34	1,63	0,53	2,34	2,88	18,48	4,16	3,52	0,65	2,87
8-9	0,25	0,53	0,39	0,41	0,91	1,31	30,95	2,34	1,83	0,57	1,26
9-10	3,19	4,34	3,77	1,44	1,59	3,03	47,42	6,38	4,70	2,23	2,47
rel. St.abw.		36 %							34 %		

Tab. 7.4d: S-Verbindungen RS 111 (10 m) 18.08.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )		
	I	II	Mittelw.	I	II	Mittelw.
0-1	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31	0,22
1-2	0,13	0,00	0,06	0,25	0,66	0,45
2-3	0,53	0,13	0,33	4,16	5,72	4,94
3-4	0,53	0,13	0,33	7,28	7,81	7,55
5-6	< 0,13	< 0,13	< 0,13	4,16	4,69	4,42
8-9	0,53	0,25	0,39	3,13	3,13	3,13
rel. St.abw.		69 %			26 %	

Tab. 7.4e: S-Verbindungen  
RS 111 (7 m) 22.04.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	$\text{S}^0$ ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	$\text{FeS}_2$ ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )
	I	I	I
0-1	< 0,13	< 0,13	< 0,13
1-2	< 0,13	0,13	< 0,13
2-3	< 0,13	< 0,13	< 0,13
3-4	< 0,13	1,03	0,78
5-6	< 0,13	0,78	0,53
8-9	< 0,13	0,66	0,25

Tab. 7.4f: S-Verbindungen RS 111 (7 m) 19.08.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )		
	I	II	Mittelw.	I	II	Mittelw.
0-1	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13
1-2	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13	< 0,13
2-3	< 0,13	< 0,13	< 0,13	0,13	< 0,13	0,06
3-4	< 0,13	< 0,13	< 0,13	0,13	0,13	0,13
5-6	< 0,13	< 0,13	< 0,13	0,13	0,25	0,19
8-9	< 0,13	< 0,13	< 0,13	0,13	0,78	0,45
rel. St.abw.						64 %

Tab. 7.4g: S-Verbindungen  
RS 107 21.05.96

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )	CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )
	I	I
0-1	0,13	2,59
1-2	0,13	10,94
2-3	0,13	93,72
3-4	0,13	88,50
5-6	0,13	11,97

Tab. 7.4h: S-Verbindungen RS 107 15.04.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			$\text{S}^0$ ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			FeS <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )					
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	0,41	0,13	0,13	0,22	0,78	< 0,13	0,53	0,44	1,03	3,66	1,31	2,00
1-2	0,13	1,81		0,97	0,78	2,09		1,44	1,03	2,09		1,56
2-3	0,13	0,13		0,13	0,53	0,25		0,41	0,13	2,09		1,13
3-4	< 0,13	< 0,13		< 0,13	1,81	0,66		1,25	7,28	13,53		10,41
4-5	< 0,13	< 0,13		< 0,13	2,88	1,81		2,34	11,47	26,03		18,75
5-6	< 0,13	0,44		0,22	9,38	4,06		6,72	35,41	54,97		45,19
6-7	< 0,13	0,41		0,22	2,31	0,53		1,44	5,22	9,38		7,31
7-8	0,13	1,31		0,72	0,53	4,69		2,63	1,03	11,47		6,25
8-9	0,41	0,66		0,53	1,03	1,44		1,25	2,09	2,34		2,22
9-10	0,25	< 0,13		0,13	2,59	1,31		1,97	4,69	2,28		3,50
rel. St.abw.				77 %				51 %				50 %

Tab. 7.4i: S-Verbindungen RS 107 20.08.97

Tiefe (cm)	AVS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )			CRS ( $\mu\text{mol S cm}^{-3}$ )		
	I	II	Mittelw.	I	II	Mittelw.
0-1	< 0,13	< 0,13	< 0,13	3,78	6,25	5,02
1-2	< 0,13	< 0,13	< 0,13	8,06	16,91	12,48
2-3	< 0,13	< 0,13	< 0,13	15,00	18,22	16,61
3-4	0,13	< 0,13	0,06	18,22	83,31	50,77
5-6	< 0,13	< 0,13	< 0,13	19,53	11,97	15,75
8-9	0,13	0,13	0,13	0,25	0,78	0,52
rel. St.abw.				71 %		39 %

Tab. 7.4j: S-Verbindungen RS B 29.07.96

Tiefe (cm)	AVS				CRS			
	(µmol S cm⁻³)				(µmol S cm⁻³)			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	0,38	0,13		0,25	1,94	0,91		1,44
1-2	2,59	0,13		1,36	3,50	2,34		2,94
2-3	10,41	12,50		11,45	7,81	7,81		7,81
3-4	13,03	9,38		11,20	7,81	10,94		9,38
5-6	0,13	0,13	0,13	0,13	22,91	21,88	8,34	17,72
8-9	0,13	0,13	< 0,13	0,08	9,38	5,72	8,34	7,81
rel. St.abw.				52 %				26 %

Tab. 7.4k: S-Verbindungen RS B 24.04.97

Tiefe (cm)	AVS			S <sup>0</sup>	FeS <sub>2</sub>	S <sup>0</sup> +FeS <sub>2</sub>	% S <sup>0</sup>	CRS	CRS	S <sup>0</sup>	FeS <sub>2</sub>
	(µmol S cm⁻³)									CRS-MW	CRS-MW
	I	II	Mittelw.	I	I	I	I	II	Mittelw.		
0-1	0,41	1,31	0,86	0,78	1,56	2,34	33,33	2,59	2,47	0,82	1,65
1-2	6,25	3,13	4,69	5,72	1,31	7,03	81,33	3,66	5,34	4,35	1,00
2-3	6,25	8,34	7,30	0,78	2,88	3,66	21,37	3,91	3,78	0,81	2,97
3-4	11,97	9,38	10,67	2,88	3,91	6,78	42,40	3,66	5,22	2,21	3,01
4-5	18,88	7,44	13,16	11,72	3,91	15,63	75,00	7,44	11,53	8,65	2,88
5-6	33,84	22,13	27,98	3,13	4,16	7,28	42,92	9,91	8,59	3,69	4,91
6-7	14,59	20,84	17,72	1,81	3,13	4,94	36,71	14,06	9,50	3,49	6,01
7-8	0,66	0,41	0,53	0,53	1,31	1,84	28,81	1,31	1,58	0,45	1,12
8-9	0,78	0,53	0,66	0,41	1,56	1,97	20,63	2,34	2,16	0,44	1,71
9-10	1,56	< 0,13	0,78	0,41	0,78	1,19	34,21	0,88	1,03	0,35	0,68
rel. St.abw.			42 %						25 %		

Tab. 7.4l: S-Verbindungen RS B 21.08.97

Tiefe (cm)	AVS			CRS		
	(µmol S cm⁻³)			(µmol S cm⁻³)		
	I	II	Mittelw.	I	II	Mittelw.
0-1	1,41	3,13	2,27	1,72	3,91	2,81
1-2	6,25	11,47	8,86	5,81	4,94	5,38
2-3	7,81	8,84	8,34	4,16	3,38	3,77
3-4	13,03	18,22	15,63	8,34	3,91	6,13
5-6	26,03	20,81	23,44	10,41	5,22	7,81
8-9	28,63	31,25	29,94	13,03	5,22	9,13
rel. St.abw.			21 %			31 %

Tab. 7.5a: Fe-Verbindungen RS 111 (10 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	11,14	10,96	9,00	10,37	11,82	12,30	11,81	11,98
1-2	10,85	12,54	12,39	11,92	13,97	15,32	17,49	15,59
2-3	15,68	17,46	16,05	16,40	17,19	16,61	18,49	17,43
3-4	27,79	28,32	30,52	28,88	28,51	30,52	35,91	31,65
4-5	40,94	194,63	41,07	41,01	81,61	84,45	80,33	82,13
5-6	60,29	56,75	56,65	57,89	79,62	68,17	89,06	78,95
6-7	57,16	54,71	54,96	55,61	59,81	57,32	49,81	55,65
7-8	102,05	106,11	92,28	100,15	63,89	85,08	77,21	75,39
8-9	79,41	74,79	79,58	77,93	64,86	60,81	45,55	57,07
9-10	51,80	55,26	47,51	51,52	38,73	37,73	36,50	37,65
rel. St.abw.				5 %				9 %

Tab. 7.5b: Fe-Verbindungen RS 111 (10 m) 18.08.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	8,23	6,82	12,48	9,65	9,03	8,94	6,88	8,28
1-2	12,15	21,67	21,33	18,38	14,45	14,16	20,93	16,51
2-3	13,69	14,06	15,84	14,76	14,89	15,48	19,36	16,58
3-4	26,96	31,87	43,80	34,21	23,89	29,71	44,08	32,56
4-5	52,00	39,36	59,93	50,43	43,59	60,70	53,86	52,71
5-6	70,43	69,48	112,62	84,18	78,22	95,56	222,64	132,14
6-7	44,41	51,08	54,38	49,96	65,98	53,17	58,72	59,29
7-8	74,07	83,31	115,67	91,02	76,75	91,95	166,47	111,73
8-9	79,04	75,61	78,70	77,78	81,76	88,12	71,70	80,53
9-10	78,92	92,26	90,04	87,07	72,36	71,25	153,45	99,02
rel. St.abw.				18 %				26 %

Tab. 7.5c: Fe-Verbindungen RS 111 (7 m) 22.04.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	13,63	14,33	6,50	11,49	25,91	22,11	24,30	24,11
1-2	20,68	17,17	16,84	18,23	36,40	37,66	36,56	36,87
2-3	22,96	19,74	21,62	21,44	47,45	42,72	51,64	47,27
3-4	23,55	24,36	26,34	24,75	66,80	59,47	56,74	61,00
4-5	29,66	28,16	29,21	29,01	72,17	86,64	76,68	78,50
5-6	44,66	36,47	38,07	39,73	97,46	109,48	92,54	99,83
6-7	27,41	34,95	24,61	28,99	62,76	45,87	50,01	52,88
7-8	39,46	41,67	41,83	40,98	56,68	59,83	66,25	60,92
8-9	46,73	41,16	40,17	42,69	87,39	130,69	90,40	102,83
9-10	78,46	87,63	57,76	74,62	114,15	139,00	100,12	117,75
rel. St.abw.				13 %				10 %

Tab. 7.5d: Fe-Verbindungen RS 111 (7 m) 19.08.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	5,18	8,83	8,81	7,61	40,31	25,18	26,71	30,73
1-2	7,55	9,76	27,19	14,83	35,11	39,21	46,17	40,16
2-3	8,17	10,08	11,30	9,85	47,19	40,16	48,38	45,24
3-4	10,74	7,48	9,11	9,11	33,32	33,32	35,09	33,91
4-5	10,14	9,15	10,69	9,99	32,00	28,07	25,46	28,51
5-6	13,70	12,81	13,83	13,45	24,74	20,73	29,22	24,89
6-7	14,88	15,75	16,70	15,78	56,71	26,08	25,78	36,19
7-8	13,69	14,90	16,05	14,88	29,69	23,27	30,42	27,80
8-9	20,93	14,56	20,05	18,51	15,91	18,88	18,84	17,88
9-10	19,10	18,14	19,57	18,94	22,23	22,53	26,46	23,74
rel. St.abw.				22 %				17 %

Tab. 7.5e: Fe-Verbindungen RS 107 15.04.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	11,81	7,58	6,07	8,49	24,25	20,74	57,95	34,31
1-2	9,92		14,11	12,01	98,81	33,74	91,41	74,65
2-3	10,68	10,80	10,30	10,59	40,14	34,03	50,47	41,55
3-4	9,35	12,27	6,15	9,26	41,73	72,08	34,53	49,45
4-5	8,82	9,28	14,05	10,72	31,10	42,50	28,50	34,03
5-6	15,15	8,89	7,44	10,49	18,00	24,21	78,25	40,15
6-7	35,52	18,40	19,45	24,46	17,81	21,52	18,20	19,18
7-8	7,77	6,13	9,59	7,83	12,34	16,35	19,38	16,03
8-9	13,67	24,97	20,80	19,82	13,51	11,18	11,21	11,97
rel. St.abw.				24 %				34 %

Tab. 7.5f: Fe-Verbindungen RS 107 20.08.97

Tiefe (cm)	Fe(II) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )				Fe(II+III) ( $\mu\text{mol Fe cm}^{-3}$ )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	5,93	12,34	7,27	8,51	157,25	109,70	239,89	168,95
1-2	11,92	14,97	13,48	13,46	93,08	85,24	87,54	88,62
2-3	18,22	14,99	13,28	15,50	51,20	60,37	68,78	60,12
3-4	15,84	16,93	15,92	16,23	21,55	21,94	23,40	22,30
4-5	29,91	31,73	32,55	31,23	39,04	54,09	62,63	51,92
5-6	30,39	44,29	37,23	37,30	63,89	59,13	63,01	62,01
6-7	13,66	16,56	14,90	15,04	22,72	23,71	21,09	22,51
7-8	15,09	10,77	22,24	16,03	17,31	19,22	20,86	19,13
8-9	11,28	12,35	7,82	10,48	11,97	13,09	13,67	12,91
9-10	8,40	9,06	9,88	9,11	11,64	14,22	11,66	12,51
rel. St.abw.				17 %				13 %

Tab. 7.5g: Fe-Verbindungen RS B 24.04.97

Tiefe (cm)	Fe(II) (µmol Fe cm <sup>-3</sup> )				Fe(II+III) (µmol Fe cm <sup>-3</sup> )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	188,07	74,27	58,96	66,61	99,26	67,28	76,56	81,03
1-2	81,18	73,59	82,57	79,11	66,13	62,40	87,28	71,93
2-3	73,88		76,74	75,31	73,66	124,68	69,91	89,42
3-4	87,95	77,20	109,98	91,71	87,30	91,14	118,35	98,93
4-5	72,43	83,71	79,09	78,41	68,28	107,99	73,78	83,35
5-6	52,15	56,26	60,86	56,42	45,69	57,95	49,37	51,00
6-7	47,54	47,95	50,57	48,68	56,16	55,81	56,48	56,15
7-8	36,64	37,88	35,51	36,68	35,05	48,89	37,41	40,45
8-9	47,69	37,83	62,66	49,39	34,70	42,00	36,13	37,61
9-10	25,02	20,49	17,98	21,16	23,05	33,10	26,53	27,56
rel. St.abw.				11 %				16 %

Tab. 7.5h: Fe-Verbindungen RS B 21.08.97

Tiefe (cm)	Fe(II) (µmol Fe cm <sup>-3</sup> )				Fe(II+III) (µmol Fe cm <sup>-3</sup> )			
	I	II	III	Mittelw.	I	II	III	Mittelw.
0-1	26,87	38,73	38,58	34,73	40,39	39,13	46,27	41,93
1-2	61,81	45,63	43,31	52,56	59,67	74,06	56,57	63,43
2-3	60,30	62,29	76,64	66,41	68,80	79,73	76,76	75,10
3-4	71,56	78,74	75,54	75,28	101,11	100,25	89,97	97,11
4-5	77,09	76,91	79,65	77,88	87,82	103,22	87,79	92,94
5-6	90,12	68,32	68,81	75,75	79,63	76,98	79,50	78,70
6-7	71,34	102,86	97,47	90,56	87,31	89,51	89,95	88,92
7-8	68,74	66,80	97,91	77,82	87,03	82,90	88,19	86,04
8-9	69,81	91,66	75,70	79,06	109,02	120,26	82,72	104,00
9-10	77,21	71,50	72,46	73,72	78,01	86,41	96,77	87,06
rel. St.abw.				12 %				8 %

Tab. 7.6a: Sulfatreduktion RS 111 (10 m)  
21.04.97

Tiefe (cm)	SRR		
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )		
	I	II	Mittelw.
0-1	7,2	8,7	7,9
1-2	3,4	2,4	2,9
2-3	4,8	3,7	4,2
3-4	3,0	3,6	3,3
4-5	4,6	9,0	6,8
5-6	5,1	3,0	4,1
6-7	7,6	6,3	6,9
7-8	1,6	2,0	1,8
8-9	2,1	0,4	1,2
9-10	4,1	3,5	3,8

Tab. 7.6b: Sulfatreduktion RS 111  
(10 m) 18.08.97

Tiefe (cm)	SRR		
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )		
	I	II	Mittelw.
0-1	< 0,2	< 0,2	< 0,2
1-2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
2-3	5,25	6,60	5,93
3-4	13,30	6,40	9,85
5-6	< 0,2	< 0,2	< 0,2
8-9	1,05	0,25	0,65

Tab. 7.6c: Sulfatreduktion RS B 29.07.96

Tiefe (cm)	SRR			
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )			
	I	II	III	Mittelw.
0-1	78,4	44,6	55,0	59,3
1-2	160,6	76,4	46,6	94,5
2-3	138,9	267,1	108,0	171,3
3-4	106,7	118,4	14,7	79,9
5-6	33,7	15,2	22,7	23,9
8-9	5,4	9,7	2,2	5,8

Tab. 7.6d: Sulfatreduktion RS B  
24.04.97

Tiefe (cm)	SRR		
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )		
	I	II	Mittelw.
0-1	2,1	9,9	6,0
1-2	25,7	22,7	24,2
2-3	24,0	36,7	30,3
3-4	32,8	33,2	33,0
4-5	57,2	22,8	40,0
5-6	29,9	43,7	36,8
6-7	18,4	31,2	24,8
7-8	3,1	2,5	2,8
8-9	2,8	2,7	2,8
9-10	2,0	0,7	1,4

Tab. 7.6e: Sulfatreduktion RS  
B 21.08.97

Tiefe (cm)	SRR	
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	
	I	
0-1	26,6	
1-2	45,7	
2-3	53,7	
3-4	53,1	
5-6	20,9	
8-9	10,5	

Tab. 7.6f: Sulfatreduktion RS B 24.06.98

Tiefe (cm)	SRR				
	(nmol SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )				
	I	II	III	IV	Mittelw.
0-1	33,4	27,7	21,3	21,8	26,1
1-2	26,0	61,0	44,4		43,8
2-3	53,0	44,9	76,9		58,3
4-5	69,7	62,2	129,6		87,2
6-7	28,8		19,9		24,4
9-10	7,3	6,4	1,3		5,0

Tab. 7.7a: MPN-Werte RS 111 (10 m) 21.04.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5		95%-Konfidenz		FeOB		95%-Konfidenz	
		max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
0-1	3375	7414	1743	8857200	24863300	2787200	8857200	24863300	2787200		
1-2	1224	2604	583	19040800	75229500	8945700	19040800	75229500	8945700		
2-3	5057	10558	2445	135900	513100	42700	112500	368300	34000		
3-4	1936	4455	1012	28100	102100	13400	138300	528500	44200		
5-6	2026	4732	1065	8900	24900	2500	44500	132500	17700		
8-9	6232	13046	2956	14700	61000	6100	14700	61000	6100		

Tab. 7.7b: MPN-Werte RS 111 (10 m) 18.08.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5		95%-Konfidenz		FeOB		95%-Konfidenz	
		max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
0-1	14415	41512	6680	25500270	95300480	12387660	19040770	75229500	8945740		
1-2	11586	34853	5285	18370660	72082530	8458740	19040770	75229500	8945740		
2-3	4277	11405	1809	28060	102120	13390	386580	1218300	162990		
3-4	2707	7801	1252	112530	368270	33950	280620	1021160	133850		
5-6	6695	18143	2638	18371	72083	8459	62905	170473	21868		
8-9	16241	46806	7514	14757	61030	6097	13826	52854	4418		

Tab. 7.7c: MPN-Werte RS 111 (7 m) 22.04.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5		95%-Konfidenz		FeOB		95%-Konfidenz	
		max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
0-1	245	727	103	14757300	61030300	6097200	1904100	7522900	894600		
3-4	321	965	135	1266000	4143200	381900	315700	448800	150600		
8-9	569	1592	262	19000	75200	8900	28100	102100	13400		

Tab. 7.7d: MPN-Werte RS 111 (7 m) 19.08.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5		95%-Konfidenz		FeOB		95%-Konfidenz	
		max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
0-1	2436	7020	1129	5348460	15090380	1972400	11252860	36826990	3394740		
1-2	1931	5809	881	11252860	36826990	3394740	2362650	9017420	1155870		
2-3	4277	11405	1809	1475730	6103030	609720	1125290	3682700	339470		
3-4	713	1901	302	280616	1021157	133853	28062	102116	13385		
5-6	7056	21110	2663	732092	1968330	242623	53485	150904	19724		
8-9	713	1901	302	4518	13379	1783	8857	24863	2787		

Tab. 7.7e: MPN-Werte RS 107 15.04.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5		95%-Konfidenz		FeOB		95%-Konfidenz	
		max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
0-1	887	2316	357	1843600	7285300	866300	271700	988800	129600		
1-2	158	472	60	315800	990100	132400	713500	2002800	224500		
2-3	148	545	77	103700	396400	33100	210500	765900	100400		
3-4	348	1002	161	68300	191700	21500	86800	283900	26200		
5-6	258	775	118	129200	503800	52700	7100	19900	2000		
8-9	110	292	46	17600	37000	8300	5100	13900	700		

Tab. 7.7f: MPN-Werte RS 107 20.08.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 4,5	95%-Konfidenz		FeOB	95%-Konfidenz	
		max	min		max	min		max	min
0-1	245	727	103	13530410	50566500	6572890	74220	199820	24500
1-2	1471	4362	616	9747690	38247820	4488390	138260	528540	44180
2-3	916	2392	369	971630	3809800	446550	19040	75230	8950
3-4	1377	4029	546	190408	752295	89457	19041	75229	8946
5-6	1931	5809	881	74220	199819	24498	14757	61030	6097
8-9	137	365	60	2224	8679	909	22244	86795	9088

Tab. 7.7g: MPN-Werte RS B 29.07.96

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 7	95%-Konfidenz	
		max	min		max	min
0-1	1198485	3404138	371519	12844304	29944568	5753172
1-2	995353	2794084	313215	29088641	68645799	12523348
2-3	213938	683977	64614	5951564	15595287	2828512
3-4	159229	629110	74809	2210504	5280934	964928
5-6	1887	6867	900	307979	882439	163054
8-9	6383	17185	2107	227328	543092	99232

Tab. 7.7h: MPN-Werte RS B 24.04.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 7	95%-Konfidenz		FeOB	95%-Konfidenz	
		max	min		max	min		max	min
0-1	1088965	3563817	328516	31312300	122179000	12793700	10351	29206	3817
1-2	1196230	3357955	376430	51128500	200618400	23719600	2392	6716	753
2-3	20741726	81949919	9744882	32151900	132968600	13284100	3215	13297	1328
3-4	1908722	7541306	896758	27719800	105965600	8858100	10722	30253	3954
5-6	533930	1581252	210704	10678900	31625600	4214200	3488	14427	1441
8-9	1731037	6839284	813277	1610500	4520800	506800	5102	18566	2434

Tab. 7.7i: MPN-Werte RS B 21.08.97

Tiefe (cm)	SRB pH 7 (N cm <sup>-3</sup> )	95%-Konfidenz		SOB pH 7	95%-Konfidenz		FeOB	95%-Konfidenz	
		max	min		max	min		max	min
0-1	366064	984213	121316	8857240	24863290	2787200	1476	6103	610
1-2	483946	1389790	149208	14757290	61030320	6097200	1476	6103	610
2-3	95203	376146	44728	11252860	36826990	3394740	5348	15090	1972
3-4	82349	323746	34450	28061620	102115650	13385340	1904	7523	895
5-6	193292	609194	81497	28061624	102115665	13385340	1476	6103	610
8-9	56264	184136	16974	1904077	7522950	894574	1476	6103	610

## 7.2 Dendrogramme

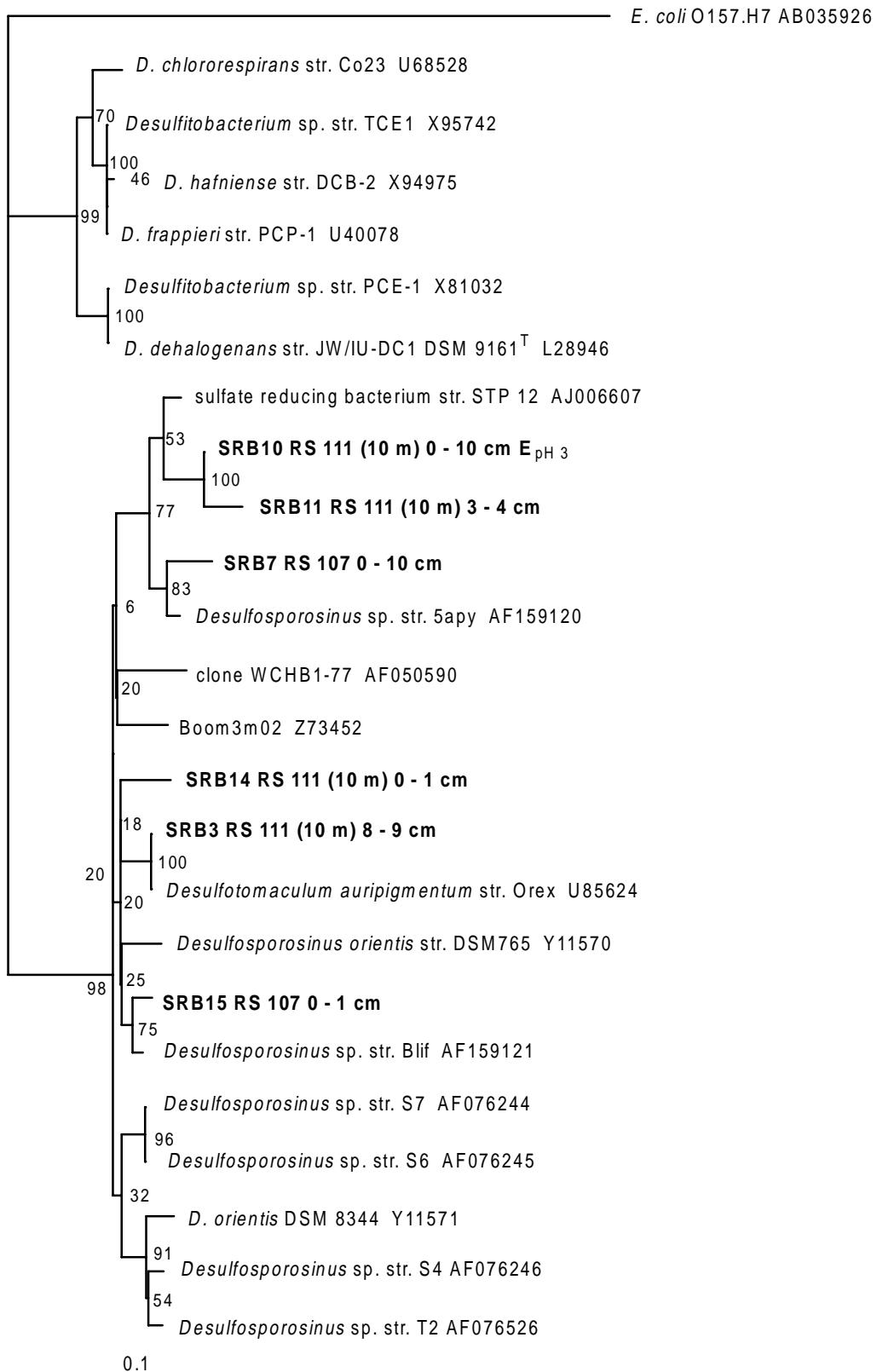


Abb. 7.1: Dendrogramm (basierend auf den partiellen 16S rDNA-Sequenzen und berechnet nach der Neighhhbor Joining Methode) der sporenbildenden sulfat-reduzierenden Isolate und Vertreter der Gattungen *Desulfosporosinus* (einschließlich *Desulfotomaculum auripigmentum*) und *Desulfitobacterium*. *Escherichia coli* als Außengruppe.

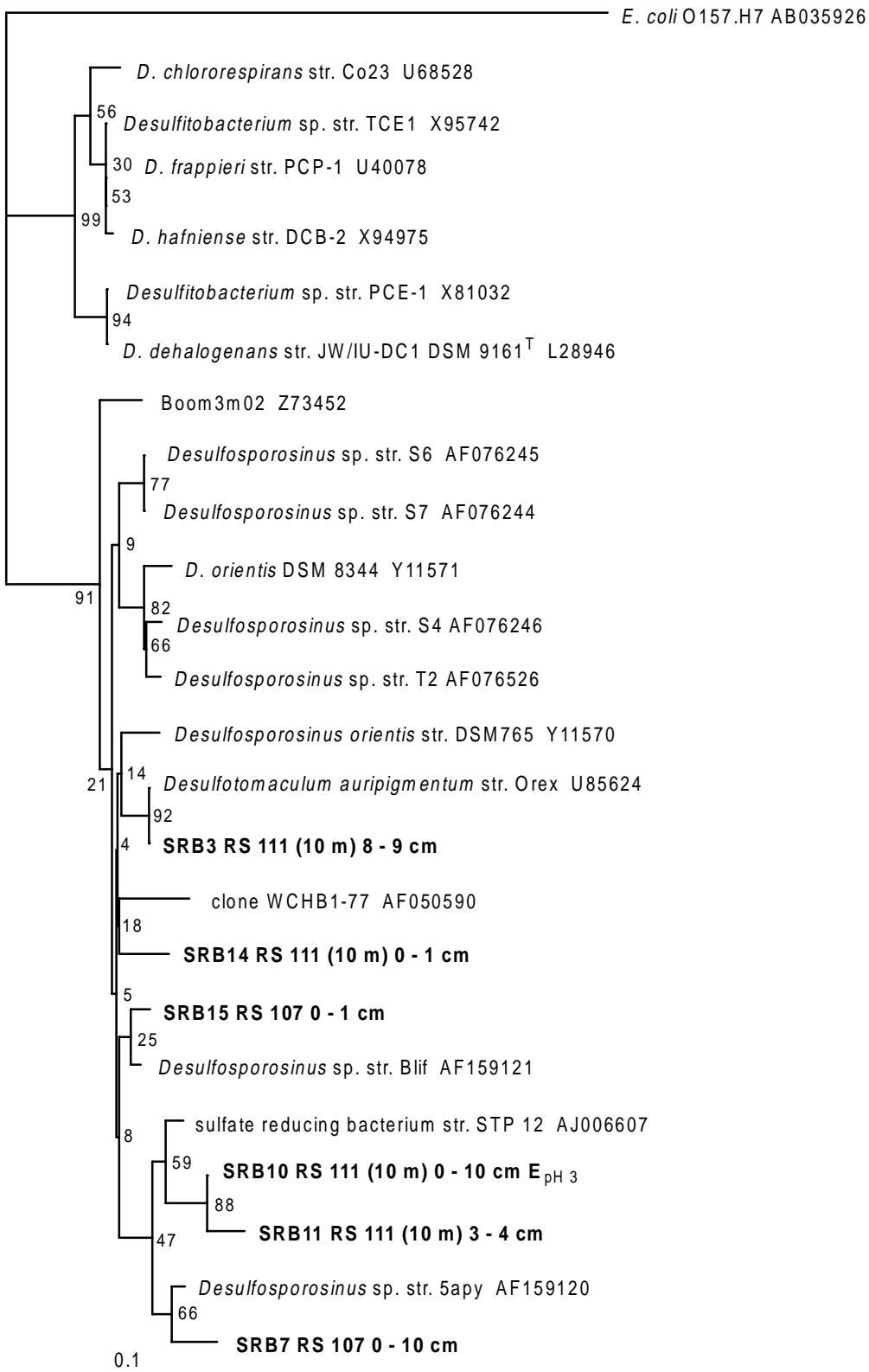


Abb. 7.2: Dendrogramm (basierend auf den partiellen 16S rDNA-Sequenzen und berechnet nach der *Maximum Parsimony* Methode) der sporenbildenden sulfat-reduzierenden Isolate und Vertreter der Gattungen *Desulfosporosinus* (einschließlich *Desulfotomaculum auripigmentum*) und *Desulfitobacterium*. *Escherichia coli* als Außengruppe.

## 7.3 pe/pH-Diagramm

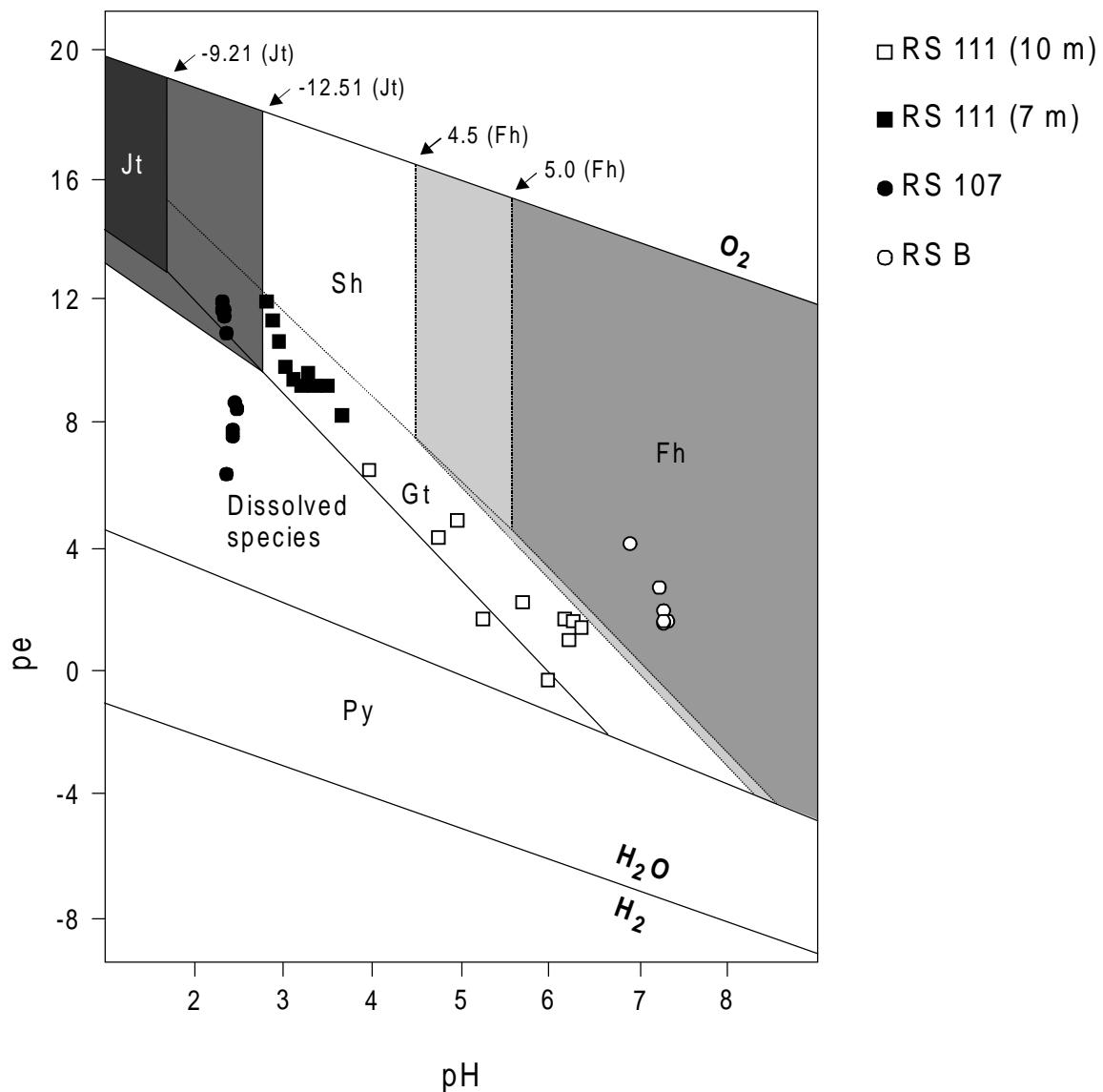


Abb. 7.3: Bigham et al. 1996: pe-pH-diagramm for Fe-S-K-O-H system at 25 °C where pe = Eh (mV)/59,2; total log activities of  $\text{Fe}^{2+}$  = -3,47;  $\text{Fe}^{3+}$  = -3,36 (or -2,27);  $\text{SO}_4^{2-}$  = -2,32;  $\text{K}^+$  = -3,78; log  $K_{\text{so}}$  values of Jt (K-jarosite) = -12,51; Sh (schwertmannite) = 18,0; Fh (ferrihydrite) = 5,0; Gt (goethite) = 1,40; Py (pyrite). Line equations are : Gt (pe = 17,9 - 3 pH); Jt (pe = 16,21 - 2 pH); Fh (pe = 21,50 - 3 pH); Sh (pe = 19,22 - 2,6 pH) and Py (pe = 5,39 - 1,14 pH).

## Danksagung

Der lange Weg vom ersten Sedimentkern, über die Reinkulturen bis hin zum ausgedruckten Exemplar der Arbeit ist geschafft. Viele Leute haben mich auf diesem Weg - zumindest streckenweise - begleitet und ohne ihr Zutun wäre das Gelingen dieser Arbeit wohl kaum möglich gewesen.

Zu allererst möchte ich Herrn PD Dr. Babenzien für die Themenstellung und die Betreuung meiner Arbeit hier in Neuglobsow danken. Er hatte immer ein offenes Ohr für Probleme, Fragen und Wünsche, wobei letztere selten unerfüllt blieben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Trüper gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferats an der Universität in Bonn und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ein dickes Dankschön an die "Lausitz-Crew" aus Magdeburg! Hier möchte ich besonders Dr. Gabi Packroff für die gute Organisation der Probenahmefahrten (auch wenn diese dann trotzdem manchmal etwas turbulent ausfielen) und Karsten Rahn für seine tatkräftige Unterstützung beim Sedimentstechen danken. Mein Dank geht auch an Dr. Katrin Wendt-Pothoff, Dr. Kurt Friese und Dr. Peter Herzsprung für die Messungen der Eisenverbindungen, des Sulfats und des gelösten Kohlenstoffs sowie für den recht unkomplizierten Datenaustausch. Für die vielen Anregungen von Katrin und Kurt bin ich sehr dankbar. Und nicht zu vergessen meine Magdeburger DoktorandenkollegInnen Constanze, Silke und René: ich hätte mir manchmal gewünscht, wir säßen im gleichen Haus, so dass die interessanten Bergbau-Restsee-Diskussionen öfters und länger hätten stattfinden können. Trotz der weiten Entfernung blieb ich Doktorandin der Sektion Gewässerforschung des UFZ und für seine Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Geller bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Neuglobsowern MitarbeiterInnen bedanken. Auf die Hilfe von Monika Degebrodt war im Labor nicht zu verzichten: vielen Dank dafür! Mein spezieller Dank geht an Dr. Dominik Hepperle für die hervorragende Anleitung im molekularbiologischen Arbeiten. Es hat selten etwas auf Anhieb so gut geklappt, wie die Sequenzierung in seinem Labor. Mein Dank geht auch an Dr. Henrik Sass für die kritische Durchsicht einer ersten Version dieser Arbeit. Bei meinen LaborkollegInnen Ulrike, Andreas, Henrik und Thomas möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit bedanken. Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Koschel dafür bedanken, dass ich als externe Doktorandin die Räumlichkeiten, Geräte und Materialien der Abteilung nutzen durfte.

Dr. Levent Piker danke ich dafür, dass er mich im Radioisotopen-Labor des Instituts für Meereskunde Kiel die "Kunst der Rückflußdestillation" lehrte.

I am very grateful to Dr. D. Barrie Johnson of the University of Bangor for teaching me the overlay-plate technique. I seldomly experienced such an openness in scientific research. Thank you for letting me be so welcome in your lab.

Elze en Anniel, wat leuk dat jullie twee ook in het onderzoek zitten en dan nog in de microbiële ecologie!

Besonders am Herzen liegt es mir, an dieser Stelle meinen Eltern und Schwestern zu danken. Leider hast du das fertige Resultat meiner Arbeit nicht mehr erlebt, Papa. Als Chemiker hättest du bestimmt das eine oder andere anzumerken gehabt. Mama, Pecki und Uti, ich danke euch, dass ihr auch in dem so schweren und traurigen letzten Jahr so viel Verständnis für mich und meine Arbeit gehabt habt.

Schließlich, aber deshalb nicht geringer gilt mein Dank meinen beiden Männern: dem Großen, Winnie, für die allzeit liebevolle Unterstützung und dem Kleinen, Jasper, für seine ansteckende Fröhlichkeit und die vielen zärtlichen "ai" s.

Die vorliegende Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie gefördert (Fkz 0339648).

## **Lebenslauf**

12. Februar 1971	geboren in Brasschaat (Belgien) Eltern: Erika Reiter und Heinz-Peter Meier
1976 - 1984	Deutsche Schule Antwerpen (Belgien)
1984 - 1988	Europaschule Mol (Belgien) - abgeschlossen mit deutschem Abitur
1988 - 1995	Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn - abgeschlossen mit Diplom
8.1992 - 9.1992	Praktikum bei der European Space Agency, Noordwijk (Niederlande)
10.1992 - 11.1992	Praktikum am Forschungszentrum Jülich
6.1993 - 7.1993	Praktikum beim Canadian Wildlife Service, Nepean Ontario (Kanada)
8.1993 - 9.1993	Praktikum beim Clayoquot Biosphere Project, Vancouver Island British Columbia (Kanada)
5.1994 - 5.1995	Anfertigung der Diplomarbeit am Biologisch Centrum der Rijksuniversiteit Groningen (Niederlande)
1995-1998	Durchführung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie geschichteter Seen
7.1995 - 10.1998	Doktorandin am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig - Halle GmbH, Gewässerforschung Magdeburg
11.1998 - 12.1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Limnologie geschichteter Seen
seit 7.1999	im Erziehungsjahr