

Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

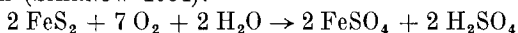
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE MIKROBEN-ASSOZIATION SAURER GRUBENWÄSSER

BRUNHILDE MARCHLEWITZ und W. SCHWARTZ

(Eingegangen am 11. August 1960)

I. Einleitung

Unter der Einwirkung von Sickerwässern aus dem Hangenden spielen sich besonders in der Oxydationszone, dem „Eisernen Hut“, der sulfidischen Erzlagerstätten Verwitterungsvorgänge ab, die z. B. zur Entstehung von Eisensulfat-Mineralien und von Schwefelsäure aus Pyrit führen (SMIRNOW 1954):



Ähnliche Vorgänge sind in Markasit-haltigen Kohlengruben und an anderen Stellen beobachtet worden. Die Grubenwässer weisen in derartigen Fällen meist eine erhebliche Azidität mit pH-Werten von 1 bis 3 auf und wirken zerstörend auf Gleisanlagen der Grubenbahn, auf Rohrleitungen und Pumpen (TEMPLE und KÖHLER 1954).

Es handelt sich entgegen früheren Ansichten meist nicht um Prozesse, die unter der Einwirkung des Luftsauerstoffes abiologisch-chemisch verlaufen. Die Oxydation wird durch die Mitwirkung von zwei Mikroben aus der Gattung *Thiobacillus* wesentlich beschleunigt (COLMER, TEMPLE und HINKLE 1950; LEATHEN und MADISON 1949).

Beteiligt sind *Thiobacillus thiooxidans*, WAKSMAN und JOFFE 1922, und *Thiobacillus ferrooxidans*, TEMPLE und COLMER 1951. Beide Organismen waren stets bei bakteriologischen Untersuchungen der sauren Grubenwässer anzutreffen (LEATHEN und MADISON 1949; TEMPLE und COLMER 1951; ASHMEAD 1955; FJERDINGSTAD 1956). Andere Bakterien sind in dem stark sauren Milieu nicht nachgewiesen worden. Unklar ist die Bedeutung der Pilze, die regelmäßig in der Biocoenose vertreten sind (COLMER und HINKLE 1947; ASHMEAD 1956). Die charakteristischen, im Grubenwasser mit der Strömung flottierenden Pilzwatten werden in der angelsächsischen Literatur als „streamer“ bezeichnet (TEMPLE und KOEHLER 1954).

Da uns eine Anzahl von Proben verschiedener Herkunft zur Verfügung stand, hatten wir die Möglichkeit, die Artzugehörigkeit der beiden Thiobakterien zu überprüfen, das Vorkommen und die Bedeutung der Pilze und die Frage der Schwermetalltoleranz auf breiterer Basis zu untersuchen, als es bisher geschehen ist.

II. Material und Methoden

Proben von oxydierten sulfidischen Erzen, von Braunkohlen und Grubenwässern (Tabelle 1) wurden in den Gruben soweit wie möglich unter aseptischen Bedingungen entnommen. Bei der Entnahme der Grubenwässer haben wir zunächst mit Universal-Indical-Papier J 100 (Berlin-Chemie, Berlin-Adlershof) den Säuregrad festgestellt. Nur Wässer, deren pH-Wert unter 3,5 bis 4 lag, wurden gesammelt.

Es war bemerkenswert, daß gelegentlich bei einigen nicht weit voneinander entfernten Wasserlachen oder Tropfstellen recht verschiedene pH-Werte gefunden wurden. Trotz

gleicher geologischer Bedingungen fanden wir z. B. in der Grube Einheit/Elbingerode auf der 170-m-Sohle/Südstrecke eine Tropfstelle mit einem pH-Wert von 2 und in etwa 10 m Entfernung eine zweite Tropfstelle mit einem pH-Wert von 8,4. Die erstgenannte Probe enthielt nahezu 2×10^4 Thiobakterien pro ml, während im zweiten Fall diese Mikroben fehlten.

Tabelle 1
Art und Herkunft der untersuchten Proben

Herkunft	Standort	Probenbezeichnung ¹⁾
Bingham Canyon/Utah	sulfid. Erzlagerst.	Bing
Bisbee/Arizona	sulfid. Erzlagerst.	Bi 1, Bi 2, Bi 6, Bi 7
Boliden/Schweden	sulfid. Erzlagerst.	Bol 1, Bol 3, Bol 4, Bol 5
Elbingerode/Harz	sulfid. Erzlagerst.	Elb 1 bis 14
Emmerstedt	Braunkohlentagebau	Em
Falun/Schweden	sulfid. Erzlagerst.	Fa 4, Fa 5
Freiberg/Sachsen	sulfid. Erzlagerst.	Freib. 1, Freib. 3, Freib. 4
Grünewalde, Lauchh.	Braunkohlentagebau	G 1 bis G 4
Helmstedt	Braunkohlentagebau	H 4, H 6
Kristineberg/Schweden	sulfid. Erzlagerst.	K ₀ , K 1, K 2, K 4, K 5
Meggen/Westfalen	sulfid. Erzlagerst.	Meg 4, Meg 5
Mexiko	sulfid. Erzlagerst.	M
Rammelsberg/Goslar	sulfid. Erzlagerst.	Ram 2b, Ram 2c
Borok, Bezirk Jarovslav, UdSSR ²⁾	Wassergraben mit reichlich Fe(OH) ₃ bei einem Wald- teich	Ryb 3 bis 6
Schottland	Kohlengrube	Scot
Schwandorf/Oberpfalz	Humboldt (Eisen-Oxalat) aus dem Braunkohlentage- bau	Schwa

Prof. Dr. STARKEY/New Brunswick hat uns freundlicherweise drei Kulturen von *Th. thiooxidans* überlassen. Dr. BECK/Provo, Utah, verdanken wir eine *Th. ferrooxidans*-Reinkultur und eine Wasserprobe aus dem Bingham Canyon.

Zahlreichen Kollegen, die uns bei der Beschaffung von Untersuchungsmaterial unterstützt haben, sprechen wir auch an dieser Stelle unseren Dank aus, insbesondere den Grubenverwaltungen in Bisbee (Arizona), in Boliden, Falun, Kristineberg (Schweden), in Goslar (Rammelsberg), Freiberg, Helmstedt und Elbingerode (Grube Einheit).

Für die Kultur von Thiobakterien sind etwa 30 verschiedene Medien bekannt geworden. Davon haben wir 10 auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Wir benutzten eine Nährlösung nach STARKEY (1925), die im folgenden als STA/S bezeichnet wird:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2—0,4 g
KH ₂ PO ₄	3,0—4,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,25 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
Aqua dest.	1000 ml
Schwefelblüte	10 g
pH-Wert	4,5

Die Nährlösung ohne Schwefel wurde im Autoklaven 30 min bei 1 atü sterilisiert. Wir haben Schwefel in entsprechenden Mengen in Reagenzgläsern 3mal 30 min feucht im Dampftopf sterilisiert und nach Rücktrocknung bei 60 bis 80° C der Nährlösung aseptisch in möglichst feiner Verteilung zugesetzt.

¹⁾ Die arabischen Ziffern und kleinen Buchstaben hinter den Abkürzungen dienen der Bezeichnung der Standorte und der betreffenden Stämme.

²⁾ Einzige Probe von einem Standort außerhalb einer Erz- oder Kohlenlagerstätte. Einen Hinweis auf dieses Vorkommen verdanken wir Prof. Dr. KUSNEZOV.

Thiobacillus ferrooxidans wurde in dem von LEATHEN u. a. (1951) angegebenen Medium LE kultiviert:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,15 g
KCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,50 g
K_2HPO_4	0,05 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01 g
Aqua dest.	1000 ml

Sterilisation erfolgte 30 min bei 1 atü im Autoklaven. Je 1 ml keimfrei filtrierte 10%ige $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung wurde nach dem Erkalten auf 100 ml LE-Lösung aseptisch zugefügt¹⁾. Der pH-Wert liegt zwischen 3,5 und 4. Zur Kultur der Pilze haben wir meist Malz-Agar oder CZAPEK-Agar verwendet. Soweit nicht anders angegeben, standen die Kulturen bei 25° C im Brutraum.

Als Kulturgefäße für Thiobakterien dienten in der Regel 100-ml-Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Gerätéglass mit jeweils 50 ml Nährlösung. Sollten tägliche pH-Messungen über längere Zeit ausgeführt werden, so benutzten wir 750 ml-Erlenmeyer-Kolben mit je 350 ml Nährlösung.

Messungen der pH-Werte wurden mit einer mittelohmigen Mikro-Glaselektrode Typ GA 60 des Forschungsinstitutes Meinsberg/Sachsen in Verbindung mit dem pH-Meßverstärker MV 11 der Firma Küstner/Dresden (CLAMANN u. GRAHNERT) ausgeführt.

Nephelometrische Messungen erfolgten mit dem Pulfrich-Photometer unter Verwendung des Spezialaufsatzes für Trübungs- und Fluoreszenzmessungen.

III. Gewinnung von Reinkulturen

Als Ausgangsmaterial dienten meist die in den Gruben aseptisch entnommenen Wasserproben. Etwa 0,2 ml wurden in die Nährlösung STA/S bzw. LE geimpft. Nach 10 bis 14 Tagen war in den meisten Fällen eine Entwicklung der Thiobakterien an folgenden Merkmalen nachweisbar: *Th. thiooxidans* trübt die Nährlösung stark und bildet Schwefelsäure, der pH-Wert fällt infolgedessen auf etwa 1 bis 2. *Th. ferrooxidans* oxydiert FeSO_4 zu rostbraunem $\text{Fe}(\text{OH})_3$ und zu Ferrisulfat, das besonders um die als Aufwuchs am Glas gebildeten Kolonien abgesetzt wird (Abb. 1). Die Säuerung erreicht hier nur pH-Werte von etwa 2,5.

In einigen Fällen erhält man auf diese Weise sofort Reinkulturen. Als ständige Begleiter treten jedoch in den meisten Kulturen Pilze auf, die auch bei einer raschen Folge von Subkulturen, wie es LIPMAN u. a. (1921) empfehlen, nur schwer zu entfernen sind. Eine Verunreinigung der Kulturen mit heterotrophen Bakterien ist dagegen bei pH-Werten unter 5 nicht zu befürchten. Zur Kontrolle

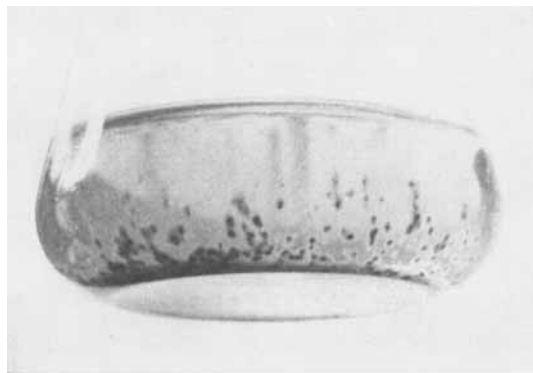


Abb. 1. Kolonien von *Th. ferrooxidans*, Stamm Meg 5 als Aufwuchs an der Wand eines Erlenmeyer-Kolbens

haben wir Fleischbouillon mit H_2SO_4 auf pH 2, 3, 5, 6 und 7 eingestellt, mit Grubenwasser beimpft und nach 4 bis 6 Wochen mikroskopisch untersucht. In den Kulturen unter pH 5 entwickelten sich häufig Pilze, während bei pH 5 bis 7 neben den Pilzen in vereinzelteren Fällen auch nicht zu den Thiobakterien gehörende Stäbchen wuchsen.

Zur Isolierung von *Th. thiooxidans* mittels des Kochschen Plattengußverfahrens eignete sich die oben zitierte Nährlösung nach STARKEY mit einem Zusatz von 3% Agar und 0,5% Natriumthiosulfat an Stelle von Schwefel.

¹⁾ Ein weißer Niederschlag stört nicht die Entwicklung der Kultur.

Schwieriger war die Gewinnung von *Th. ferrooxidans*-Reinkulturen, da dieser Organismus auf Agarsubstraten nicht wächst¹⁾. Es mußte auf dem Wege der Flüssigkeitskultur die Isolierung versucht werden. In einigen Fällen haben wir mit flüssigen Medien bei Anwendung des Titerverfahrens Reinkulturen gewonnen. Günstig erwies sich eine zehntägige Vorkultur auf der Schüttelmaschine, da durch die ständige Flüssigkeitsbewegung die Konidienbildung der begleitenden Pilze unterdrückt wird. In der Biocoenose vorhandene Hefepilze ließen sich auf diese Weise nicht abtrennen. In der Annahme, daß *Th. ferrooxidans* und Hefen gegenüber Schwefelsäure verschieden anfällig sind, haben wir Kolonien der Mischkulturen mit Schwefelsäure verschiedener Konzentration behandelt. Jedoch ließen sich die Hefen durch Schwefelsäurelösungen bis zu 5% nicht abtöten und bei 6, 8 und 10% H_2SO_4 waren auch die *ferrooxidans*-Zellen nicht mehr entwicklungsfähig. So konnten von den Proben Freib 1, G 1 bis G 4, M und Ryb 3 bis 6 bisher keine *ferrooxidans*-Reinkulturen erzielt werden.

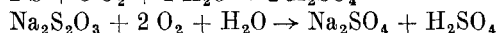
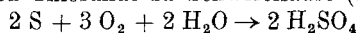
Von der Einzelkultur haben wir abgesehen, da schon von anderer Seite festgestellt worden ist, daß zum Anwachsen von Thiobakterien stets größere Zellenzahlen notwendig sind. Aus diesem Grunde impften wir auch nicht mit der Öse, sondern stets mit Pipetten, 0,4 bis 0,5 ml auf je 50 ml Nährlösung. Beim Übertragen einer Öse der alten Kultur ist die Latenzphase erheblich länger.

Die Reinkultur der Pilze über das KOCHSche Plattengußverfahren bereitete keine Schwierigkeiten. Hefen bestimmten wir nach LODDER und KREGER-VAN-RIJ (1952), *Fungi imperfecti* nach GILMAN (1957) und BARNETT (1954), Penicillien nach RAPER und THOM (1949) und Aspergilli nach THOM und RAPER (1945).

IV. Vergleichende Untersuchungen an *Th. thiooxidans* und *Th. ferrooxidans*

1. *Thiobacillus thiooxidans*

Es standen 12 Stämme verschiedener Herkunft zur Verfügung. *Th. thiooxidans* oxydiert Schwefel und Thiosulfat zu Schwefelsäure (STARKEY 1925):



Gleichzeitig sinkt der pH-Wert in den Kulturen zum Teil bis auf Werte unter 1 und die Kulturlösung trübt sich. Trübungsgrad und Abfall der pH-Werte verhalten sich annähernd umgekehrt proportional. Die Intensität der Säuerung ist bei den einzelnen Stämmen verschieden stark (Abb. 2).

QUISPEL u. a. (1953) nehmen an, daß die Oxydation von Schwefel und Schwefelverbindungen an die Zelle gebunden ist. Wir haben zellfreie Filtrate von gut entwickelten *thiooxidans*-Kulturen hergestellt, den Filtraten erneut Schwefelblüte zugesetzt und ebenfalls festgestellt, daß die Säureproduktion im Filtrat nicht fortschreitet (Abb. 3).

Da die Ansichten über die Stickstoff-Ernährung von *Th. thiooxidans* auseinandergehen (MCLEAN 1918; LIPMAN, WAKSMAN und JOFFE 1921; WAKSMAN und JOFFE 1922 und ALLISON 1923), hat STARKEY (1925) eingehendere Untersuchungen ausgeführt und festgestellt, daß 0,04% $(NH_4)_2$ für Wachstum und Schwefeloxydation am günstigsten sind, daß dagegen 0,05% KNO_3 die Säurebildung negativ beeinflussen und 1,25% KNO_3 toxisch wirken.

¹⁾ Die Herstellung eines Silicagels mittels Ionenaustauscher (LEATHEN 1955 und 1956) war nicht möglich, da Amberlit IR-120 nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand und ein geeignetes Metasilikat fehlte. Wir haben mit dem Ionenaustauscher KPS 200 p. a. der Farbenfabrik Wolfen (Bitterfeld) und einem Natriummetasilikat der Firma Dr. Th. Schuchardt/München gearbeitet. Die Austauschersäule lieferte die gewünschte Kieselsäure (pH-Wert etwa 2), aber diese ergab kurz nach der Herstellung ein Gel, ohne daß eine Sterilisation und Mischung mit den gewünschten Salzen möglich war, wie es nach der Vorschrift von LEATHEN erforderlich ist. Auch SILVERMAN und LUNDGREN (1959) hatten mit der von LEATHEN angegebenen Methode keinen Erfolg.

Wir sind bei Versuchen mit 8 *thiooxidans*-Stämmen zu abweichenden Resultaten gekommen. Als BasalmEDIUM diente STA/S ohne Stickstoffverbindung (Tabelle 2).

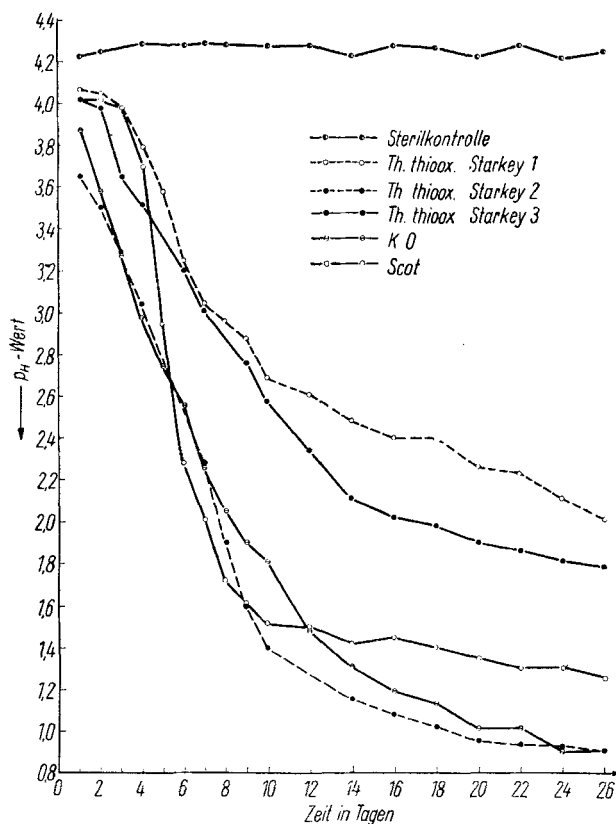
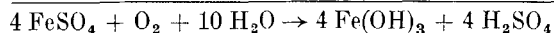
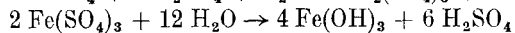
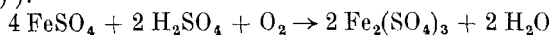
Die Gefäße für diese Versuche wurden nach folgender Methode gereinigt:

- 3 Tage in gesättigter Kalilauge —
- 2 Tage in konzentrierter Salzsäure —
- 2 Tage in 60%igem Äthanol —
- 1 Tag in verdünnter Salzsäure —
- mit Aqua dest. gespült und mindestens 3 Tage in Aqua dest. gewässert. Das Wasser wurde täglich erneuert und schließlich auf Cl-Freiheit geprüft.

Alle von uns untersuchten *thiooxidans*-Stämme können NH_4 , NO_3 und auch etwas Alanin verwerten, jedoch wirken höhere Gaben anorganischer Stickstoffverbindungen ungünstig. Dabei hemmt NO_3 in den meisten Fällen stärker, jedoch war noch bei 1,25% KNO_3 Entwicklung möglich.

2. *Thiobacillus ferrooxidans*

Aus Eisensulfat wird unter Oxydation des Eisens Schwefelsäure gebildet (SILVERMAN und LUNDGREN 1959)¹⁾:



Der pH-Wert in LE-Lösung sinkt selbst bei langer Kulturdauer nur auf etwa 2,4–2,6.

Die Eisentoleranz ist erheblich; auch die doppelte und zehnfache, ja sogar sechzigfache Menge der für Medium LE vorgeschriebenen Eisensulfatkonzentration (6% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) werden vertragen. Selbst bei diesen Bedingungen sinkt der pH-Wert nicht unter 2,2.

Auch bei *ferrooxidans* sind Säurebildung und Zellvermehrung miteinander verbunden (Tabelle 3). Erst in alten Kulturen, die nicht mehr säuern, geht die Keimzahl zurück.

BRYNER u. a. (1958) geben für die stationäre Phase ihrer Kulturen, bei Ermittlung der Keimzahlen über Silicagelplatten, 3×10^7 Zellen/ml an;

Abb. 2. Säureproduktion bei fünf verschiedenen *Th. thiooxidans*-Stämmen

¹⁾ TEMPLE und KOEHLER (1954) haben versucht, den gesamten Verlauf der Umsetzungen unter Mitwirkung von Thiobakterien zu formulieren.

Tabelle 2

Verwertung von Stickstoff-Verbindungen durch verschiedene *thiooxidans*-Stämme

Verhalten in der 6. Subkultur. Versuchsdauer je Subkultur 45 Tage

Zeichenerklärung: ++ + sehr gutes Wachstum und Säurebildung mit pH-Werten unter 1
 ++ + gutes Wachstum und Säurebildung mit pH-Werten von 1—1,5
 + mäßiges Wachstum und Säurebildung mit pH-Werten 1,5—3

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$(\text{G}^{\circ}\text{ON}^{\circ}\text{HN}$		KNO_3				$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$					Alanin	
	0,04 %	0,5 %	1 %	0,024 %	0,06 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,25 %	0,07 %	0,1 %	0,2 %	0,5- %	1,25 %	0,05 %	0,1 %
Bol 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bol 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bol 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K ₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Scot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starkey 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starkey 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starkey 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ 0,04 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entsprechen 0,024% NH_4NO_3 bzw. 0,06% KNO_3 oder 0,07% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ oder 0,05% Alanin in bezug auf Stickstoffgehalt.

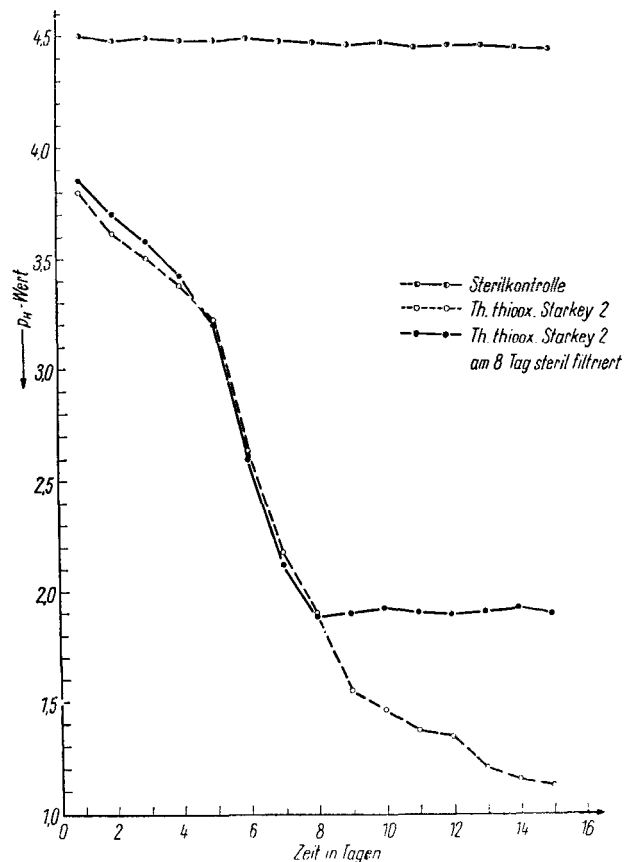


Abb. 3. Säureproduktion einer *Th. thiooxidans*-Kultur und eines zellfreien Filtrates

das entspricht etwa dem hundertfachen Wert unserer Untersuchungen. FJERDINGSTAD (1956) kam mit dem Titerverfahren zu Ergebnissen, die unseren Werten entsprechen.

Nach 10tägiger Kultur ist die Säuerung im wesentlichen abgeschlossen. Das gilt allerdings nur für Stämme, die besonders aktiv sind. Andere Stämme erreichten stets erst nach 20 bzw. 40 Tagen den End-pH-Wert von 2,6 (Abb. 4).

In vier Fällen gelang es, *ferrooxidans*-Stämme aus Braunkohle zu isolieren, die am natürlichen Standort Temperaturen von 50 bis 60° C entwickelt hatte. Eine Prüfung der Thermo-

Tabelle 3
Säurebildung und Keimgehalt in *ferrooxidans*-Kulturen, Stamm Meg 5. (Der Keimgehalt wurde nach dem Titerverfahren ermittelt)

	ph-Wert	Keimzahl/ml
Versuchsbeginn	3,85	22×10^2
nach 10 Tagen	2,65	22×10^4
nach 50 Tagen	2,58	3×10^4
nach 140 Tagen	2,60	11×10^3

toleranz ergab, daß diese Stämme bei 45° C gut wachsen, während die aus Grubenwässern isolierten Stämme zum größten Teil schon bei 37° C das Wachstum einstellen (Tabelle 4), bei 45° C aber absterben, wie es auch durch die Untersuchungen von SILVERMAN und LUNDGREN (1959) bekannt geworden ist. Keiner der von uns geprüften Stämme wuchs bei 50° C. Es zeigte sich, daß Stamm Ram 2c relativ hohe Temperatursprüche stellt (30—35° C) und deshalb bei der gewöhnlichen Kulturtemperatur von 25° C langsamer wächst (vgl. Abb. 4).

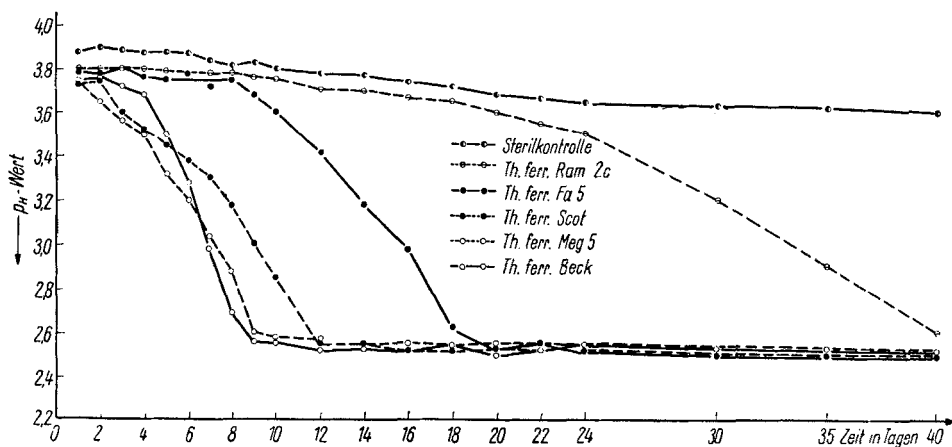


Abb. 4. Säureproduktion bei fünf verschiedenen *Th. ferrooxidans*-Stämmen

Wir haben das Temperaturverhalten einiger unserer *thiooxidans*-Stämme geprüft. Sie verhielten sich durchweg mesophil. Durch EMOTO (1928 und 1929) und BAUDISCH (1935) ist bekannt geworden, daß *Thiobacillus thiooxidans* in Schwefelthermen vorkommt. Auch bei dieser Art gibt es offenbar thermophile Rassen; an den von uns untersuchten Standorten fehlten sie.

Zur anaeroben Lebensweise, verbunden mit Denitrifikation, scheinen beide *Thiobacillus*-Arten nicht befähigt zu sein. *Th. ferrooxidans* entwickelte sich verzögert in 20—30 Tagen bei herabgesetzter Sauerstoffversorgung in vollständig gefüllten, mit Wachs abgedichteten Glasstopfen-Flaschen in LE-Medium. Nach der 5.—6. Subkultur unter diesen Bedingungen hatten sämtliche Stämme das Wachstum eingestellt¹⁾.

3. Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung *Thiobacillus* BEIJ.

Auf das Irreführende von Gattungsbezeichnungen wie *Thiobacillus*, *Ferrobacillus* usw. für nicht sporenbildende Gattungen ist mehrfach hingewiesen worden. Wir behalten trotzdem die in BERGEY's Manual benutzten Bezeichnungen der besseren Verständigung wegen hier bei.

KRASSILNIKOV (1959) unterscheidet eine Gattung *Thiobacterium* LEHM. und NEUM. — (nicht identisch mit *Thiobacterium* JANKE, das in BERGEY's Manual anerkannt ist) — und eine Gattung *Sulfomonas* BEIJ. ORLA-JENSEN nov. comp. (Syn. *Thiobacillus* BEIJ.), von denen die erste peritrich, die zweite polar begeißelt ist. Beide Gattungen sind im Manual unter *Thiobacillus* BEIJ. zusammengefaßt.

¹⁾ Beobachtungsdauer 70 Tage

Tabelle 4

Thermotoleranz von *Th. ferrooxidans* und *thiooxidans*

Versuchsdauer 30 Tage

Zeichenerklärung: +++ sehr gutes Wachstum

++ gutes Wachstum

+ mäßiges Wachstum

— kein Wachstum

Stamm	25° C	31° C	35° C	37° C	45° C	50° C
<i>ferrooxidans</i> Beck	+++	+++	++	—	—	—
Bi 6	+++	+++	++	+	—	—
Bol 3	+++	+++	+	—	—	—
Elb 4	+++	+++	+	+	—	—
Fa 5	+++	+++	+	—	—	—
G 1	+++	+++	+++	+++	+++	—
G 2	+++	+++	+++	+++	++	—
G 3	+++	+++	+++	+++	+++	—
G 4	+++	+++	+++	+++	+++	—
K 2	+++	+++	+	—	—	—
Meg 5	+++	+++	+	—	—	—
Ram 2c	++	+++	+++	+++	—	—
Scot	+++	+++	++	+	—	—
<i>thiooxidans</i> Bol 5	+++	+++	+	—	—	—
K ₀	+++	+++	+	—	—	—
Starkey 1	+++	+++	+	—	—	—
Starkey 2	+++	+++	+	—	—	—

LEATHEN und BRALEY (1954) sind der Ansicht, daß der von ihnen als einziger Vertreter der neuen Gattung *Ferrobacillus* L. u. BR. beschriebene *Ferrobac. ferrooxidans* nicht mit *Thiobac. ferrooxidans* COLMER u. TEMPLE identisch ist. Beide sollen sich vor allem dadurch unterscheiden, daß *Ferrobac. ferroox.* Thiosulfat nicht oxydiert. Unsere *ferrooxidans*-Stämme vermögen sämtlich neben Fe^{II} auch Schwefel zu oxydieren. Selbst wenn Stämme vorkommen, denen Thiosulfat und Schwefel nicht zugänglich sind, würden wir bei der sonstigen weitgehenden Übereinstimmung die Aufstellung einer besonderen Gattung *Ferrobacillus* nicht für notwendig halten.

PARKER und TEMPLE haben in BERGEY's Manual (BREED usw. 1957) neben *Thiobacillus thiooxidans* eine von PARKER (1945) beschriebene Art *Th. concretivorus* beibehalten, die sich von *thiooxidans* im wesentlichen nur durch das Verhalten gegenüber Stickstoffverbindungen unterscheidet. Danach wären unsere sämtlichen Stämme, darunter auch die Originalstämme von STARKEY, zu *concretivorus* zu stellen. Wir sind jedoch mit VISHNIAC (1957) der Meinung, daß die unterscheidenden Merkmale nicht ausreichen und daß *concretivorus* entbehrlich ist.

V. Die Pilzflora der sauren Grubenwässer

Der Pilzflora dieser Standorte wurde bisher wenig Beachtung geschenkt, Einige Autoren (COLMER und HINKLE 1947; ASHMEAD 1955) erwähnten lediglich das Vorkommen von Pilzen, ohne die Biocoenose zu analysieren. Wir haben die uns zur Verfügung stehenden Wasserproben auf ihren Pilzbestand untersucht und fanden eine Fülle verschiedener Pilze, besonders aus der Gruppe der *Fungi imperfecti*. Einige erwiesen sich allerdings als ephemere Luftkeime, die bei ständiger Mischkultur mit Thiobakterien nicht mehr zur Entwicklung kamen. Sie vertragen also ein dem Grubenwasser entsprechendes Biotop nicht auf die Dauer. Ihre Sporen gelangen vermutlich durch die Wetterführung der Gruben oder durch den Menschen an die betreffenden Standorte. In diese Gruppe gehören z. B. *Aspergillus*

awamori, *Spicaria simplicissima* und einige *Mucoraceen*. Bei Keimgehaltsbestimmungen waren sie jeweils nur in 2—3 Proben in geringer Zahl im Grubenwasser vorhanden. Die zur Biocoenose gehörenden Arten (Tabelle 5) waren meist in größeren Mengen und oft auch an mehreren weit voneinander entfernten Standorten im Grubenwasser vertreten. Auch bei ständiger Mischkultur mit Thiobakterien zeigten sie gute Entwicklung.

Pullularia pullulans war in der Mehrzahl der Proben enthalten; man könnte sie als eine Leitform unter den Pilzen bezeichnen. Sie trat stets auch mit großer Häufigkeit auf. Bei einer Keimgehaltsbestimmung der Probe Bi 4 fanden wir etwa 400 *Pullularia*-Keime je ml. Allerdings verursachte die Bestimmung einige Schwierigkeiten, da es sich um einen recht pleomorphen Organismus handelt. Je nach den Kulturbedingungen sind Sproßkonidien, Fadenmycel, Sproßmycel mit wechselnden Mengen von Dauerzellen und mit stärkerer oder schwächerer Schleimbildung anzutreffen. Unsere Stämme bildeten auch in der Reinkultur kaum die für die Identifizierung wichtigen Sproßkonidien. Nach BOAS und BAUER (1937) wird die Sproßkonidien-Bildung durch hohe H^+ -Konzentrationen (pH 3,6 bis 3,9) unterdrückt. Da es sich in unserem Falle um Stämme handelt, die offenbar lange Zeit hindurch einem Milieu mit hoher H^+ -Konzentration (pH 1,5 bis 3,0) ausgesetzt waren, ist es denkbar, daß sie die Fähigkeit zur Sproßkonidienentwicklung verloren haben.

Neben *Pullularia* sind auch Hefen aus der Gattung *Rhodotorula* als häufige Begleiter der Thiobakterien beachtenswert. Bei einer Keimgehaltsbestimmung des Wassers aus Grube Einheit/Elbingerode wurden 500 bis 600 *Rhodotorula rubra*-Zellen/ml gefunden. Entsprechendes gilt auch für die Proben aus Falun.

Tabelle 5
Verbreitung der Pilze in verschiedenen Gruben-Wasserproben

	Bing	Bi	Bol	Elb	Em	Fa	Freib	H	K	Meg	M	Ram	Scot
<i>Pul. pullulans</i>	—	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—
<i>Pen. turbatum</i>	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—
<i>Pen. waksmani</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—
<i>Pen. decumbens</i>	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>Pen. frequentans</i>	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
<i>Spic. divaricata</i>	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	+	—
<i>Rhod. glutinis</i>	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rhod. rubra</i>	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+

VI. Einfluß der Pilze auf die Entwicklung der Thiobakterien und die Säurebildung

Wir haben eine größere Zahl von Stämmen der beiden *Thiobacillus*-Arten mit Pilzen in Mischkultur gehalten und bei einer Versuchsdauer von 30 bis 60 Tagen täglich die pH-Werte bestimmt und mit dem Verlauf der Säuerung in der Reinkultur der Thiobakterien verglichen (Tabelle 6, 7).

Vergleicht man das Verhalten der beiden *Thiobacillus*-Arten, so zeigt sich, daß die *thiooxidans*-Stämme auf die Begleitpilze mit einer Förderung der Säurebildung bei fast der Hälfte der untersuchten Kulturen reagieren (Tabelle 6), während sich bei *ferrooxidans* Förderung und Hemmung die Waage halten und in der Mehrzahl der Fälle ein Einfluß der Begleitpilze nicht festzustellen war (Tabelle 7). Von den *thiooxidans*-Stämmen sprechen besonders die in Reinkultur schwächer wachsenden Stämme Stark. 1 und Stark. 3 (vgl. Abb. 2) an. Am häufigsten wirkten Hefestämme fördernd auf die Säurebildung (Tabelle 8).

TEMPLE und KOEHLER (1954) vermuten, daß die in der Biocoenose vorkommenden Hefen Wachsstoffe abgeben und somit Wachstum und Säureproduktion der Thiobakterien

Tabelle 6

Einfluß verschiedener Pilze auf die Säuerung des Mediums durch *Th. thiooxidans*
 Zeichenerklärung zu Tabelle 6 und 7:

- + Förderung um 2 bis 5 Tage
 — Verzögerung um 2 bis 5 Tage
 = Verzögerung um mehr als 5 Tage
 0 kein Einfluß.

Pilzstamm	<i>thiooxidans</i> -Stamm					
	Bol 1	K ₀	Scot	Stark. 1	Stark. 2	Stark. 3
<i>Pul. pullulans</i> /Bi 4	+	0	0	+	0	+
<i>Spic. divaric.</i> /Ram 2b	0	0	0	+	—	0
<i>Pen. turbatum</i> /H 6	0	0	0	+	0	+
<i>Pen. waksmani</i> /Ram 2b	0	0	0	+	0	+
<i>Rhod. glutinis</i> /Bi 6	+	0	+	+	0	+
<i>Rhod. rubra</i> /Bing	0	0	+	+	0	+
<i>Rhod. rubra</i> /Fa 3	+	0	+	0	0	+
<i>Rhod. rubra</i> /Scot	+	+	0	+	0	+

Tabelle 7

Einfluß verschiedener Pilze auf die Säuerung des Mediums durch *Th. ferrooxidans*

Pilzstamm	<i>ferrooxidans</i> -Stamm							
	Beck	Bi 6	Bol 3	Fa 5	K 2	Meg 5	Ram2c	Scot
<i>Pul. pullulans</i> /Bi 4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spic. divaric.</i> /Ram 2b	0	—	—	=	0	—	—	0
<i>Pen. turbatum</i> /H 6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pen. waksmani</i> /Ram 2b	—	0	—	—	0	=	0	0
<i>Rhod. glutinis</i> /Bi 6	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>Rhod. rubra</i> /Bing	+	+	+	0	+	0	0	0
<i>Rhod. rubra</i> /Scot	+	0	+	0	+	0	0	+

Tabelle 8

Förderung und Verzögerung der Säurebildung bei 6 *thiooxidans*- und 8 *ferrooxidans*-Stämmen
 durch die begleitenden Pilze

Es bedeuten: + Förderung, — Hemmung, 0 keine Wirkung

Pilze	Anteil der beeinflussten Stämme						
	<i>Th. thiooxidans</i>			<i>Th. ferrooxidans</i>			
	+	—	0	+	—	0	
<i>Pullularia pullulans</i> /Bi 4	3/6	—	3/6	—	—	—	8/8
<i>Spicaria divaricata</i> /Ram 2b	1/6	1/6	4/6	—	5/8	—	3/8
<i>Penicillium turbatum</i> /H 6	2/6	—	4/6	—	—	—	8/8
<i>Penicillium waksmani</i> /Ram 2b	2/6	—	4/6	—	4/8	—	4/8
<i>Rhodotorula glutinis</i> /Bi 6	4/6	—	2/6	1/8	—	—	7/8
<i>Rhodotorula rubra</i> /Bing	3/6	—	3/6	4/8	—	—	4/8
<i>Rhodotorula rubra</i> /Fa 3	4/6	—	2/6	nicht geprüft			
<i>Rhodotorula rubra</i> /Scot	3/6	—	3/6	4/8	—	—	4/8

positiv beeinflussen. O'KANE (1942) fand allerdings in Kulturfiltraten von *Th. thiooxidans* Nikotinsäure, Pantothersäure, Biotin, Riboflavin, Thiamin und Pyridoxin und aus Untersuchungen von FRANTZ, FEIGELMAN, WERNER und SMITH (1952) geht hervor, daß *Th. thiooxidans* zur Synthese von 17 Aminosäuren befähigt ist.

In unseren Versuchen hatten die Mischkulturen mit positivem Resultat in der Periode der stärksten Säurebildung und des stärksten Wachstums einen Vorsprung von 1 bis 5 Tagen. Bei Abschluß der Versuche waren die pH-Werte in den geförderten Mischkulturen nicht niedriger als in den Reinkulturen der Thiobakterienstämmen. In Reinkulturen der Pilze wird der pH-Wert des Mediums nicht oder nur unwesentlich verändert; in der Biocoenose tragen die Pilze zur Säuerung nicht bei.

Mischkulturen der *ferrooxidans*-Stämme Fa 5 bzw. Meg 5 mit den drei *Rhodotorula*-Stämmen ergaben eine Förderung der Säurebildung bis zu 3 Tagen; was in diesen Fällen beachtlich ist, da die einzelnen Hefen in Mischkultur mit *ferrooxidans* indifferent waren (vgl. Tabelle 8).

Mit *Spicaria divaricata* und *Penicillium waksmani* in der Mischkultur war die Säurebildung bei einigen Stämmen von *Th. ferrooxidans* durch Verlängerung der Latenzperiode bis zu 10 Tagen verzögert, erreichte jedoch schließlich den Endwert der Reinkulturen (Abb. 5). Mischkulturen der Stämme *thiooxidans* Starkey 1 bzw. Starkey 3 mit 6 Pilzen (*Pull. pullulans* Bi4, *Pen. turbatum* H6, *Pen. waksmani* Ram 2b, *Rhodot. glutinis* Bi6, *Rhodot. rubra* Bing und Scot), die in der zweigliedrigen Mischkultur eine Förderung bis zu 5 Tagen ergeben hatten (vgl. Tabelle 6), zeigten eine etwas stärkere Förderung der Säurebildung um 8–10 Tage im Maximum bei einem pH-Endwert von 1,26 gegenüber 1,40 nach 75 Tagen.

Bemerkenswert ist die relativ üppige Entwicklung der Pilze in den anorganischen Medien (Abb. 6), die im Habitus den im Grubenwasser flottierenden submersen Mycelien („streamer“) entspricht. Geringe Mengen organischer Verbindungen stehen aus zufälligen Verunreinigungen und aus absterbenden Bakterienzellen zur Verfügung.

Bei *Pullularia* haben wir untersucht, wie sich Stämme anderer Herkunft im Biotop der sauren Grubenwässer verhalten. Wir benutzten hierzu die Stämme M 136, M 163, β v 31, die von G. MÜLLER isoliert worden sind¹⁾. Es ergab sich, daß in aufeinander folgender jeweils nach 14 Tagen überimpfter Mischkultur mit Thiobakterien die ersten drei Stämme spätestens in der 4. Kultur bei pH-Werten zwischen 2 und 3 ausgestorben waren; sie

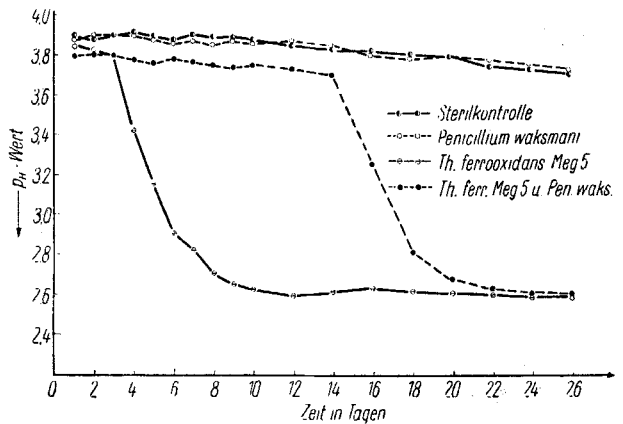


Abb. 5. Verlauf der Säurebildung in Reinkultur und Mischkultur von *Th. ferrooxidans* Fa 5 und *Spicaria divaricata*

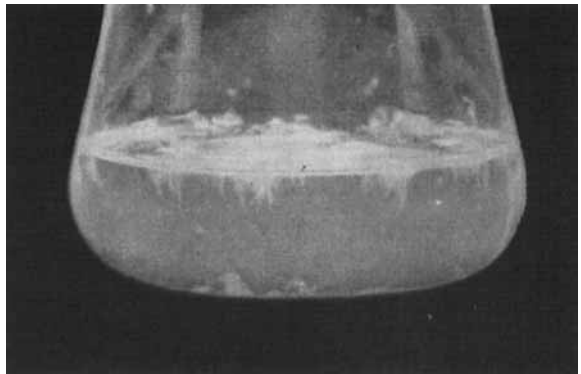


Abb. 6. *Th. thiooxidans* (Stamm Scot) + *Pen. turbatum* in Mischkultur. Mycelbildung in STA/S-Medium

¹⁾ Wir verdanken die Reinkulturen der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Dr. Koch, Institut für Mikrobiologie, Berlin O 17.

verhielten sich nicht anders als andere gelegentlich im Biotop ephemere vorkommende Pilze (Tabelle 9).

Tabelle 9

Verhalten von *Pullularia*-Stämmen fremder Herkunft in Mischkultur mit Thiobakterien. Keimzahlen je ml Medium, Mittelwerte aus gut übereinstimmenden Parallel-Kulturen; pH-Werte in Klammern¹⁾

Thiobacillus	<i>Pullularia</i> -Stamm	Einsaat bei Versuchsbeginn	Keimzahl/ml nach jeweils 14 Tagen in aufeinanderfolgenden Kulturen			
			1. Kultur	2. Kultur	3. Kultur	4. Kultur
<i>ferrooxidans</i> /Meg 5	M 136	$1,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$ (2,42)	$3,0 \times 10^3$ (2,43)	7	0
<i>ferrooxidans</i> /Meg 5	M 163	$9,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$ (2,40)	$2,3 \times 10^3$ (2,38)	$2 \cdot 10^2$	0
<i>ferrooxidans</i> /Meg 5	β v 31	$1,2 \times 10^3$	0 (2,38)	0 (2,38)	0	0
<i>ferrooxidans</i> /Beck	M 136	$1,1 \times 10^7$	$6,1 \times 10^4$ (2,44)	$7,1 \times 10^2$ (2,42)	0	0
<i>ferrooxidans</i> /Beck	M 163	$9,3 \times 10^6$	$7,7 \times 10^4$ (2,43)	$1,9 \times 10^3$ (2,44)	0	0
<i>ferrooxidans</i> /Beck	β v 31	$1,2 \times 10^3$	0 (2,45)	0 (2,44)	0	0
<i>thiooxidans</i> /Scot	M 136	$1,1 \times 10^7$	0 (1,01)	0 (1,27)	0	0
<i>thiooxidans</i> /Scot	M 163	$9,3 \times 10^6$	0 (1,03)	0 (1,03)	0	0
<i>thiooxidans</i> /Scot	β v 31	$1,2 \times 10^3$	50 (1,40)	0 (1,07)	0	0
<i>thiooxidans</i> /K ₀	M 136	$1,1 \times 10^7$	0 (1,00)	0 (1,08)	0	0
<i>thiooxidans</i> /K ₀	M 163	$9,3 \times 10^6$	0 (1,03)	0 (1,11)	0	0
<i>thiooxidans</i> /K ₀	β v 31	$1,2 \times 10^3$	0 (1,02)	0 (1,58)	0	0

VII. Diskussion

Die Biocoenose der schwefelsauren Grubenwässer ist gekennzeichnet durch das Vorkommen der beiden Thiobakterien-Arten *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans*, die an fast allen von uns untersuchten Standorten von säuretoleranten Pilzen begleitet waren. Die Pilze selbst sind nicht an der für die beiden Thiobakterien charakteristischen Säurebildung beteiligt. Bei einem Teil der Mischkulturen werden Säurebildung und damit wohl auch die Vermehrung der Bakterien durch Pilze beschleunigt oder verzögert. Im allgemeinen sprachen die *thiooxidans*-Stämme in der Mischkultur häufiger an als die *ferrooxidans*-Stämme; bei *thiooxidans* überwogen bei weitem die fördernden Einflüsse, bei *ferrooxidans* waren fördernde oder hemmende Wirkungen seltener und traten etwa in gleicher Zahl auf.

Fördernd wirkten vor allem zwei *Rhodotorula*-Arten bei beiden Thiobakterien-Arten und *Pullularia pullulans* bei *Th. thiooxidans*. Anfälliger gegenüber hemmenden Einflüssen war *Th. ferrooxidans*, bei dem besonders durch *Spicaria divaricata* und *Penicillium waksmani* die Säurebildung in der zweigliedrigen Mischkultur um 2 bis 10 Tage verzögert wurde.

Im großen und ganzen scheinen also keine engeren Bindungen zwischen Thiobakterien und Pilzen zu bestehen. Besonders bei schwachwüchsigen Stämmen (in unseren Versuchen *thiooxidans*/Stark. 1 und 3) könnte an eine von TEMPLE und KOEHLER (1954) vermutete Förderung durch Wachstumsstoffe in der Mischkultur mit auxoautotrophen Pilzen gedacht werden.

In geomikrobiologischer Beziehung verdient das Vorkommen der beiden Thiobakterien Beachtung. Ähnlich den Desulfurizierern sind sie offensichtlich weit auf der Erde verbreitet und wohl als Kosmopoliten anzusehen. Ihre Entwicklung in Verbindung mit dem Vorkommen sulfidischer Erze, besonders von Pyrit und Markasit, ist an das Vorhandensein von ausreichend Feuchtigkeit und Luft gebunden. LIALIKOVA (1960) vermutet Beziehungen zwi-

¹⁾ Versuche über das Verhalten von *Pullularia*-Stämmen in Nährlösungen, die mit H₂SO₄ angesäuert waren, laufen noch.

sehen dem Vorkommen von *Th. ferrooxidans* und der Tektonik der Lagerstätte, ferner eine Beteiligung bei den ersten Stadien der Selbsterhitzung des Erzkörpers. Im trockenen Mansfelder Kupferschiefer haben wir keine Thiobakterien gefunden. In nassen Oxydationszonen, z. B. im Rammelsberg bei Goslar und in der Grube Einheit bei Elbingerode, sind sie in erheblichen Mengen vorhanden. Ihre Ernährungsansprüche sind gering. Sie sind im großen ganzen, soweit es bis jetzt bekannt ist, auxoautotroph; sie verwerten in einem vorwiegend aeroben Stoffwechsel CO_2 und decken ihren Stickstoffbedarf aus kleinen Mengen von anorganischen Stickstoffverbindungen, besonders von NH_4 -Salzen. In bezug auf ihr Verhalten zum Sauerstoff und auf ihre Stellung im Schwefelkreislauf sind sie Antagonisten zu den Desulfurizierern. Die Annahme scheint gerechtfertigt, daß sie an den teilweise recht komplizierten sekundären Umsetzungen in sulfidischen Lagerstätten beteiligt sind, an der Mobilisierung und Wanderung der Schwermetalle; diese Prozesse müssen im einzelnen in Verbindung mit einer erneuten Reduktion und Fällung der Schwermetallsulfate durch Desulfurikation noch untersucht werden.

VIII. Zusammenfassung

1. In 50 Proben saurer Grubenwässer von 15 verschiedenen Standorten (Braunkohlen-Tagebau und Lagerstätten sulfidischer Erze) konnten Thiobakterien nachgewiesen werden.
2. Insgesamt wurden 12 Stämme von *Thiobacillus thiooxidans* und 9 von *Th. ferrooxidans* in Reinkultur gezogen. Sie unterscheiden sich innerhalb einer Art besonders in bezug auf die Intensität der Säurebildung und in den Temperatursprüchen.
3. Sämtliche 12 als *thiooxidans* bestimmte Stämme konnten sowohl NO_3 wie auch NH_4 als N-Quelle verwerten.
4. Wir halten die Trennung in die Arten *Th. thiooxidans* und *Th. concretivorus* nicht für gerechtfertigt. Desgleichen sehen wir in der Aufstellung der Gattung *Ferrobacillus* durch LEATHEN und BRALEY (1954) eine zu weitgehende Bewertung eines einzelnen physiologischen Merkmals, bei Übereinstimmung in den sonstigen wesentlichen Eigenschaften mit der Gattung *Thiobacillus*.
5. In 48 Proben waren die Thiobakterien von Pilzen in zum Teil üppiger Entwicklung begleitet. Am häufigsten traten neben *Pullularia pullulans* zwei *Rhodotorula*-Arten auf.
6. Die Pilze sind säuretolerant, jedoch nicht an der Oxydation der Sulfide beteiligt. Der Einfluß auf die Entwicklung der Bakterien war im allgemeinen gering.

Literatur

- ALLISON, R. V., 1922: A preliminary note on the effect of the nitrate radical upon biological oxidation of inorganic sulfur. N. J. Agr. Exp. Sta. Rept. 366—369.
- ASHMEAD, D., 1955: The influence of bacteria in the formation of acid mine waters. Colliery Guard. 2, 694—698.
- BARNETT, H. L., 1954: Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- BAUDISCH, O., 1935: Über ein neues Schwefelbakterium aus den Thermen von Santa Rosalia. Svensk. Kem. Tidskr. 47, 191—204.
- BECK, J. V., and ELSDEN, H., 1958: Isolation and some characteristics of an iron-oxidizing bacterium. J. Gen. Microb. 19, 223—228.
- BOAS, F., u. BAUER, R., 1937: Über das Wuchsstoffbedürfnis von *Dematium*. Protoplasma 27, 106—113.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D., 1957: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- COLMER, A. R., TEMPLE, K. L., and HINKLE, M. E., 1950: An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. J. Bact. 59, 317—328.
- EMOTO, Y., 1928: Über eine neue schwefeloxydierende Bakterie. Bot. Mg. Tokyo 42, 421—426.
- 1929: Über drei neue Arten der schwefeloxydierenden Bakterien. Proc. Imp. Acad. 5, 148—151.
- FJERDINGSTAD, E., 1956: Bacteriological investigations of mine water from lignite pits in Denmark. Schweiz. Zschr. Hyg. 18, 2.

- FRANTZ, J. D., FEIGELMANN, H., WERNER, S. A., and SMYTHE, M. P., 1952: Biosynthesis of seventeen amino acids labeled with C¹⁴. J. Biol. Chem. **195**, 423—428.
- GILMAN, J. C., 1957: A Manual of Soil Fungi. The Iowa State College Press-Ames, Iowa, U.S.A.
- KRASSILNIKOV, N. A., 1959: Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten, VEB G. Fischer, Jena.
- LEATHEN, W. W., and MADISON, K. M., 1949: The oxidation of ferrous iron by bacteria found in acid mine waters. Bact. Proc. **64**, 15.
- MCINTYRE, L. D., and BRALEY, S. A., 1951: A medium for the study of bacterial oxidation of ferrous iron. Science **114**, 280—281.
- — and BRALEY, S. A., 1952: A study of acid formation by iron oxidizing bacteria found in bituminous coal mine drainage. Bact. Proc. **67**, 15.
- BRALEY, S. A., and MCINTYRE, L. D., 1953: The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constitution. I. *Thiobacillus thiooxidans*. Appl. Microb. **1**, 61—64.
- — — 1953: The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. Appl. Microb. **1**, 65—68.
- — — 1954: A new iron-oxidizing bacterium: *Ferrobacillus ferrooxidans*. Bact. Proc. **44**.
- KINSEL, N. A., and BRALEY, S. A., 1955: A solid medium for the study of *Ferrobacillus ferrooxidans*. Bact. Proc. **46**.
- — — 1956: *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. J. Bact. **72**, 700—704.
- LIALIKOVA, N. N., 1960: Participation of *Thiobacillus ferrooxidans* in the oxidation of sulphide ores in pyrite beds of the Middle Ural (russ.). Microbiologija **29**, 382—387.
- LIPMAN, J. G., WAKSMAN, S. A., and JOFFE, J. S., 1921: The oxidation of sulfur by soil microorganisms. Soil. Sci. **12**, 475—489.
- LODDER, J., and KREGER VAN RIJ, 1952: The Yeasts North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
- O'KANE, D. J., 1942: The presence of growth factors in the cells of autotrophic sulfur bacteria. J. Bact. **43**, 7 (abstract).
- PARKER, C. D., 1945: The corrosion of concrete. 1. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide. Austr. J. Exper. Biol. and Med. Sci. **23**, 81—90.
- QUISPTEL, A., HARMSSEN, G. W., and OTZEN, D., 1953: Contribution to the chemical and biological oxidation of pyrite in soil. Plant a. Soil **4**, 43—55.
- RAPER, K. B., and THOM, C., 1949: A Manual of the Penicillia. Williams a. Wilkins Co. Baltimore.
- SILVERMAN, M. P., and LUNDGREN, D., 1959: Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. of Bact. **77**, 642—647.
- STARKEY, R. L., 1925: Concerning the physiology of *Thiobacillus thiooxidans* an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions. J. Bact. **10**, 135—163.
- 1925: Concerning the carbon and nitrogen nutrition of *Thiobacillus thiooxidans*, an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions. J. Bact. **10**, 165—195.
- and WIGHT, K. M., 1945: Anaerobic corrosion of iron in soil. American Gas Association, New York.
- TEMPLE, K. L., and COLMER, A. R., 1951: The formation of acid mine drainage. Min. Eng. **3**, 1090—1092.
- 1951: The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bact. **62**, 605—611.
- and KOEHLER, W. A., 1954: Drainage from bituminous coal mines. West Virginia University Bull. Series **54**, 4, 1—35.
- THOM, C., and RAPER, K. B., 1945: A Manual of the Aspergilli. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- VISHNIAC, W., and SANTER, M., 1957: The Thiobacilli. Bact. Rev. **21**, 195—213.
- WAKSMAN, S. A., and JOFFE, J. S., 1922: Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism. J. Bact. **7**, 239—256.