

Dissertation

**Zur chemischen Identifizierung und Visualisierung
von Uran-Spezies
in Biofilmen und *Euglena mutabilis* Zellen**

Sina Brockmann

**Zur chemischen Identifizierung und Visualisierung von
Uran-Spezies
in Biofilmen und *Euglena mutabilis* Zellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden**

von

Diplom-Chemieingenieurin (FH) Sina Brockmann
geboren am 17. Dezember 1981 in Dresden

Eingereicht am 18.06.2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Januar 2013
im Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums
Dresden-Rossendorf angefertigt

Gutachter:

Prof. Jörg Steinbach (TU-Dresden)

Prof. Rhenia Krawietz (HTW-Dresden)

Tag der Verteidigung:

14.11.2013

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
Summary	VII
Danksagung.....	X
Abkürzungen und Symbole	XII
1. Motivation und Zielstellung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Uran	3
2.1.1. Vorkommen und chemische Eigenschaften des Urans	3
2.1.2. Eintrag von Uran in die Umwelt.....	6
2.2. Biofilme	9
2.2.1. Zusammensetzung und Aufbau von Biofilmen	10
2.2.2. Vorkommen und Bildung von Biofilmen	12
2.3. Zu den Wechselwirkungen von Uran mit Mikroorganismen und Biofilmen ..	15
2.4. Spektroskopische und mikroskopische Methoden zur Bestimmung der Uranlokalisation und Uranspeziation.....	19
2.4.1. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie des Urans	21
2.4.2. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) des Urans.....	28
3. Ergebnisse und Diskussion	32
3.1. Biofilme aus Schacht 390 (Königstein, Sachsen).....	32
3.1.1. Charakterisierung der Grubenwässer	36
3.1.2. Charakterisierung der vorgefundenen Biofilme	41
3.1.3. Visualisierung und Identifizierung der Mikroorganismen und des Urans	47
3.1.4. Entwicklung säurestabiler Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung von natürlichen schwefelsauren Biofilmen	54
3.2. Biofilme von der Gessenwiese (bei Ronneburg, Thüringen).....	63
3.2.1. Charakterisierung der Wässer und Biofilme	65
3.2.2. Visualisierung und Identifizierung der Mikroorganismen und des Urans	71
3.3. Wechselwirkungen von <i>Euglena mutabilis</i> Schmitz mit Uran.....	77
3.3.1. Bioakkumulation von Uran durch <i>Euglena mutabilis</i>	80

3.3.2.	LIFS-Untersuchung der an den Zellen gebundenen Uranspezies	93
3.3.3.	CLSM/LIFS-Untersuchungen	101
3.3.4.	TEM/EDX-Untersuchungen	106
3.3.5.	Untersuchungen mittels zeitaufgelöster FT-IR Spektroskopie	109
4.	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	112
5.	Experimentelle Details.....	115
5.1.	Probenentnahme der natürlichen Biofilme	115
5.2.	Analyse der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS).....	115
5.2.1.	Abtrennungsmöglichkeiten der EPS von festen Biofilmbestandteilen.....	115
5.2.2.	Bestimmung des Proteingehaltes	117
5.2.3.	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes	118
5.2.4.	Bestimmung des Uronsäuregehaltes	118
5.2.5.	Bestimmung des Lipidgehaltes der Biofilme.....	118
5.3.	Ermittlung der mikrobiellen Diversität.....	119
5.3.1.	Bakterielle Diversität: 16S-rDNA-PCR	119
5.3.2.	Eukaryotische Diversität: 18S-rDNA-PCR.....	120
5.3.3.	Mikroskopische Analyse der Eukaryoten	120
5.3.4.	CARD-FISH	121
5.4.	Test der neuen säurestabilen Fluoreszenzfarbstoffe - Färbeprozedur.....	121
5.5.	Kultivierung von <i>Euglena mutabilis</i>	122
5.5.1.	<i>Euglena</i> -Stamm	122
5.5.2.	Kulturmedium	122
5.5.3.	Detaillierte Anzucht und Vorbereitung der <i>Euglena mutabilis</i> Kulturen.....	123
5.6.	Bioakkumulation von Uran an <i>Euglena mutabilis</i>	125
5.7.	Spektroskopische, mikroskopische Methoden und Probenvorbereitung	126
5.7.1.	LIFS/TRLFS.....	126
5.7.2.	CLSM/LIFS	127
5.7.3.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Probenvorbereitung.....	128
5.7.4.	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)	129
5.8.	Kationen-/Anionenanalysen	131
6.	Anhang.....	132
6.1.	Abbildungsverzeichnis	132

6.2.	Tabellenverzeichnis	138
7.	Referenzen.....	140

Zusammenfassung

Zur Risikoabschätzung anthropogener Uraneinträge in die Umwelt ist ein umfassendes Verständnis der ablaufenden Migrations- und Immobilisationsprozesse notwendig, da eine unkontrollierte Freisetzung von Uran z.B. beim Uranerzabbau zur Bedrohung für die Gesundheit von Mensch und Tier werden kann. Hierfür sind umfassende Studien zu den Wechselwirkungen von Uran mit verschiedenen Bestandteilen der Umwelt nötig. Dabei spielt neben geologischen Materialien besonders die Biosphäre, im Speziellen die Wechselwirkungen mit Mikroorganismen und Biofilmen, eine große Rolle.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Beschreibung natürlicher Biofilme aus realen Uran-kontaminierten Gebieten und deren Auswirkung auf die Uranmigration. Zur Untersuchung von Speziation und Lokalisation des Urans in den ausgewählten Biosystemen wurde in dieser Arbeit vorrangig ein gekoppeltes System aus konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) und laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) angewendet. Dieses System ermöglicht die räumlich aufgelöste Detektion von Fluoreszenzspektren der eingelagerten Uranakkumulationen in heterogenen biologischen Proben.

Natürliche Biofilme von zwei urankontaminierten Standorten, dem ehemaligen Uranbergwerk in Königstein (Sachsen) und dem Gebiet der ehemaligen Aufstandsfläche der Gessenhalde (Thüringen), wurden in dieser Arbeit näher untersucht. An beiden Standorten wurden Biofilme bis zu mehreren Zentimetern Dicke unter den extremen Umgebungsbedingungen in den Minenabwässern vorgefunden. Dabei repräsentieren die ausgewählten Proben typische Biofilmgemeinschaften aus sauren Minenabwässern und sind exemplarisch für potentiell auftretende Szenarien sowohl für untertage als auch über Tage gelegene Bergbauregionen. Die Wässer beider Standorte waren besonders durch sehr niedrige pH-Werte (Königstein: 2,6 – 3,1; Gessenwiese: 3,6 – 3,9), hohe Sulfat-konzentrationen (Königstein: (707 – 2520) mg/l; Gessenwiese: (3520 – 5887) mg/l), eine vorliegende Kontamination mit Uran (Königstein: (9,3 – 69,5) mg/l; Gessenwiese: (75,1 - 1450) µg/l) und eine Belastung mit zahlreichen weiteren Schwermetallen charakterisiert. An beiden Standorten konnte in den Minenwässern die hochmobile, gelöste Uranspezies Uranyl-sulfat (UO_2SO_4) als dominierend nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Biofilmstruktur sowie möglichen Uraneinlagerungen und -Ausfällungen mittels des CLSM/LIFS-Systems zeigten, besonders bei den Biofilmen aus Königstein, deren Mikroorganismen kaum Eigenfluoreszenz aufwiesen, Probleme mit der Visualisierung der Biofilmstruktur. Aufgrund der Instabilität vieler kommerzieller Fluoreszenzfarbstoffe bei niedrigen pH-Werten war eine gezielte Anfärbung der Mikroorganismen in den sauren Biofilmen nicht möglich, ohne den pH-Wert der Biofilmproben anzuheben, was die Probenchemie maßgeblich verändert. In Kooperation mit der Firma DYOMICS (Jena, Deutschland) wurden neue, kommerziell nicht erhältliche,

säurestabile Farbstoffe erstmals hinsichtlich ihrer Eignung zur Anfärbung von Mikroorganismen in sauren Biofilmen ohne Veränderung des pH-Wertes sowie der sonstigen Probenchemie getestet. Die neuen Farbstoffe DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613 zeigten eine Eignung für solche Färbungen, da sie eine intensive Anfärbung der Mikroorganismen bei niedrigen pH-Werten unter pH 3 – 4 herbeiführen und außerhalb des Emissionsbereiches von Uran fluoreszieren.

Die Strukturen der phototrophen Biofilme der Gessenwiese, welche viele autofluoreszierende Mikroorganismen enthielten, konnten mittels CLSM/LIFS sehr gut dargestellt werden. Aufgrund der kontinuierlichen, ungepulsten Anregung zeigten sich starke Überlagerungen der Eigenfluoreszenzsignale der Probenbiologie mit den zu untersuchenden Uransignalen. Eine Auftrennung dieser Signale zur spezifischen Urananalytik war bei den Urankonzentrationen, wie sie in Biofilmen aus natürlichen, durch saure Minenabwässer belasteten Gebieten vorkamen, aufgrund verschiedener technischer Limitationen des gekoppelten CLSM/LIFS-Systems nicht möglich. Um den umweltrelevanten Charakter dieser Studien beizubehalten, wurden die natürlichen Biofilmprouben jedoch nicht künstlich mit erhöhten Urankonzentrationen versetzt, stattdessen wurde besonderer Wert auf die Beschreibung der realen Wechselwirkungen mit originalen, unveränderten Biofilmen gelegt.

Aufgrund der Komplexität der natürlichen Biofilmprouben sollten die Wechselwirkungen von Uran mit Monokulturen eines ausgewählten eukaryotischen Einzellers, welcher typisch in sauren Uran- und schwermetallbelasteten Wässern wie z.B. in den Biofilmen von der Gessenwiese anzutreffenden ist, detaillierter untersucht werden. Erstmals wurden hierzu in dieser Arbeit die Wechselwirkungen von Uran mit *Euglena mutabilis* Zellen untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit der *Euglena*-Zellen zur Bioakkumulation des Urans im pH-Wertbereich 3 – 6 in den Hintergrundmedien Natriumperchlorat (9 g/l) oder Natriumsulfat (3,48 g/l) an lebenden Zellen untersucht. Uran wurde hierbei in einer für saure Minenabwässer relevanten Konzentration von 0,01 mM in der Ausgangslösung vorgelegt. Unabhängig vom Medium konnte bei sauren pH-Werten um pH 3 – 4 über 90 % des vorgelegten Urans aus den Probelösungen abgetrennt werden. Vor dem Hintergrund einer möglichen Anwendung dieser Zellen zur Reinigung kontaminierter saurer Minenabwässer ist die hohe Immobilisierungsrate für Uran speziell im sauren pH-Bereich besonders attraktiv.

Lebende, metabolisch aktive Zellen zeigten sich innerhalb dieser Studie in der Lage, größere Mengen Uran zu binden als tote Zellbiomasse. So wurden in Bioakkumulationsversuchen mit erhöhten Urankonzentrationen von 0,5 mM maximale Uranakkumulationen an den *Euglena*-Zellen von $(33,16 \pm 0,2)$ mg/g für lebende Zellen und $(12,97 \pm 0,7)$ mg/g für tote Zellen gemessen. An toten Zellen findet dabei ein reiner Biosorptionsprozess des Urans an die vorhandenen Bindungsstellen der Zellen statt, welcher innerhalb weniger Minuten (< 20 min) abgeschlossen ist. Bei lebenden, metabolisch aktiven Zellen wurde deutlich mehr

Zeit benötigt bis die gleiche Uranmenge wie bei toten Zellen aufgenommen wurde. Dies ist ein Indiz für einen anfänglichen Abwehrmechanismus und einen insgesamt aktiven Umgang der lebenden Zellen mit dem Uran.

Bei Bioakkumulationsversuchen an *Euglena mutabilis* Zellen unter Verwendung von realen, sauren, urankontaminierten Wässern wurden signifikant schlechtere Immobilisationsraten für Uran detektiert ((0 – 3,6) mg U/g_{EuglenaBtm}). Ursache hierfür ist der Wettbewerb des Urans mit den vielfältigen anderen Inhaltstoffen in den natürlichen Wässern um die verfügbaren Sorptionsstellen an den Zellen. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit, Erkenntnisse aus Laborexperimenten direkt auf natürliche Prozesse anzuwenden und verdeutlicht die Notwendigkeit in zukünftigen Untersuchungen, auf eine entsprechende Umweltrelevanz der Versuchsbedingungen zu achten.

Die Speziation des an den *Euglena*-Zellen akkumulierten Urans, wurde mittels laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) untersucht. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Hintergrundmedium, Lebenszustand und pH-Wert eine vergleichbare neue Uranspezies an den Zellen gebildet wird. Die detektierten Emissionsmaxima des Uranfluoreszenzsignals, gemessen an den *Euglena*-Zellen lagen bei 478,4 nm, 495,6 nm, 517,1 nm, 540,4 nm, 565,3 nm, 590,1 nm. Durch den Vergleich der Daten aus den LIFS-Messungen mit Referenzwerten, konnte die gebildete Uranspezies auf eine Anbindung durch (organo)phosphatische und/oder carboxylische funktionelle Gruppen eingegrenzt werden. Mit Hilfe der zeitaufgelösten FT-IR-Spektroskopie wurde erstmals der Biosorptionsprozess direkt an der Grenzfläche zwischen *Euglena*-Zellen und Uranlösung untersucht. Dabei konnte die carboxylische Anbindung des Urans an toten Zellen nachgewiesen werden. Ein Ausschluss der (organo)phosphatischen Komplexierung konnte jedoch mit dieser Methode nicht geführt werden.

Untersuchungen zur Lokalisation des Urans an bzw. in den Zellen, mittels der gekoppelten CLSM/LIFS-Technik zeigten erstmals ein Indiz für die intrazelluläre Akkumulation von Uran in den lebenden Zellen. Ergänzende TEM/EDX-Messungen bestätigten die intrazelluläre Aufnahme und belegen eine Akkumulation in runden bis ovalen Zellorganellen, bei denen es sich vermutlich um Vakuolen oder Vakuolen-ähnliche Vesikel handelt. An den toten Zellen konnte mit diesen Methoden kein Uran detektiert werden. Dies lässt auf eine passive, homogen verteilte Biosorption des Urans an die verfügbaren Bindungsplätze an der Zelloberfläche der toten Biomasse schließen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zum Prozessverständnis der Wechselwirkungen von Uran mit Biofilmen und speziell mit *Euglena mutabilis* Zellen. Auf Grundlage der erhaltenen Erkenntnisse können Risiken in natürlichen kontaminierten Gebieten besser eingeschätzt werden und Vorhersagen zum Migrationsverhalten des Urans entsprechend der vorliegenden Bedingungen optimiert werden.

Summary

For risk assessment of anthropogenic uranium contaminations in the environment a detailed knowledge of the migration and immobilization behavior is required to prevent health hazards for humans and animals caused by an uncontrolled discharge of uranium. Hence, comprehensive studies on the interactions of uranium with the environment are required. Besides the influences of the geological materials, there is a huge effect of the biosphere, especially the interactions with microorganisms and biofilms, on the properties of uranium in the environment.

The aim of this study was to investigate and to describe naturally occurring biofilms from real uranium contaminated areas and their influence on the uranium migration. The investigations in this study on the localization and the speciation of the uranium in the biosystems were primarily done with a coupled system of laser scanning microscopy (CLSM) and laser induced fluorescence spectroscopy (LIFS). This system enables the detection of space-resolved fluorescence emission spectra from accumulated uranium in a heterogeneous biological sample.

Natural biofilms collected from two uranium contaminated acid mine drainage (AMD) environments, the former uranium mine in Königstein (Saxony, Germany) and the former Gessenheep near Ronneburg (Thuringia, Germany), were investigated in this study. The chosen samples represent typical biofilm communities living in AMD water and are exemplary for potentially occurring scenarios of contaminated mining water both in the underground and on the surface. Biofilms reaching up to centimeters in thickness were found at both locations and showed the ability of microorganisms to live under extreme conditions, i.e. very low pH-values (Königstein: 2,6 – 3,1; Gessenwiese: 3,6 – 3,9), high sulphate concentrations (Königstein: 707 – 2520 mg/l; Gessenwiese: 3520 – 5887 mg/l), high uranium contaminations (Königstein: 9,3 – 69,5 mg/l; Gessenwiese: 75,1 – 1450 µg/l) and significant pollution with additional heavy metals. In the water samples of both locations the highly mobile, dissolved uranium species uranyl sulfate (UO_2SO_4) was detected to be dominant.

Investigations of the biofilm structure regarding possible uranium accumulations and incorporated uranium minerals using the coupled CLSM/LIFS-system showed problems with imaging of structures, especially if the microorganisms showed no auto-fluorescence as in the case of the biofilms from Königstein. Due to the instability of commercial fluorescence dyes at low pH-values, the staining of microorganisms in the acidophilic biofilms was not successful without increasing the pH value of the samples. The increase of the pH, however, leads to a change of the sample chemistry and consequently to a transformation of the uranium species which could also cause precipitation of uranium minerals. Thus, in cooperation with DYOMICS (Jena, Germany) for the first time new, acid stable fluorescence dyes were tested on their ability to stain microorganisms of acidophilic biofilms without

changing the pH or the composition of the sample water. The new fluorescent dyes DY-601XL, V07-04118, V07-04146, and DY-613 (DYOMICS, Jena, Germany) were all able to clearly stain and microscopically visualize the microorganisms at pH-values below 3 or 4 and showed fluorescence emission out of the emission range of uranium(VI).

The imaging of the structure of the phototrophic biofilms from the Gessenwiese, which contained a lot of auto-fluorescent microorganisms, via CLSM/LIFS was rather unproblematic. The fluorescence of the organic substances in the sample, e.g. of the chlorophyll, however, covers the investigated uranium fluorescence signal due to the excitation with a non-pulsed laser (cw) and the continuous detection of the fluorescence emission. The separation of the uranium fluorescence signal from the organic fluorescence contribution was, however, not possible at AMD-relevant uranium concentrations because of the technical limitations of the system. This study emphasizes the description of the real interactions with original, unchanged biofilms. Hence, to retain the environmental relevance of the investigations the uranium concentrations of the natural biofilm samples were not artificially increased.

The investigation on the interactions between uranium and *Euglena mutabilis*, which is a typical unicellular microorganism that can be found in acidic, uranium and other heavy metal containing waters, was another important part of this study. Bioaccumulation experiments of uranium on living *Euglena mutabilis* cells depending on the pH (pH 3 – 6) and on the background media in sodium perchlorate (9 g/l) or sodium sulfate (3.48 g/l) solution containing 0.01 mM uranium show an effective immobilization of uranium. At the acidic pH-values (pH 3 – 4) over 90 % of the added uranium was removed from the solutions by the cells without any detectable influence of the background media. Regarding the using of these cells for possible treatment procedures of real contaminated acid mine water the high immobilization rate of uranium at acidic conditions is very attractive.

Living, metabolically active *Euglena* cells are able to accumulate more uranium than dead biomass as the results in this study show. In bioaccumulation experiments with higher uranium concentrations of 0.5 mM maximum uranium immobilization rates of (33.16 ± 0.2) mg/g for living cells and (12.97 ± 0.7) mg/g for dead cells were measured. The passive biosorption process of uranium at the available binding capacities of the dead *Euglena* cells occurs rapidly during the first 20 minutes after adding uranium to the cell suspensions. Living, metabolically active cells required significant longer time frames until the same amount of uranium was bound as in the case of dead biomass. This is an evidence for a self-defense mechanism and an active handling of the uranium by the *Euglena* cells.

In bioaccumulation experiments on *Euglena mutabilis* cells treated with real acidic uranium contaminated water (obtained from AMD environments) significant lower uranium immobilization rates of $(0 - 3,6 \text{ mg U/g}_{EuglenaBtm})$ were detected. The reason for this effect is

probably related to the competition of further ions in the natural water samples for available binding/sorption sites at or in the cells. This clearly shows that results obtained in laboratory experiments have to be treated with caution when they shall be used to assess processes occurring under natural conditions.

The speciation of the accumulated uranium on the *Euglena* cells was analyzed using LIFS. These investigations gave evidence for the formation of a new uranium species in or on the *Euglena* cells which was unaffected by the tested background media, the metabolic activity or the pH range. The detected emission maxima of the uranium fluorescence signal measured at the *Euglena* cells were situated at 478.4 nm, 495.6 nm, 517.1 nm, 540.4 nm, 565.3 nm, and 590.1 nm. The comparison of the measured values with reference data indicated that the bioaccumulated uranium species formed in or on *Euglena* cells was related to complexation with carboxylic and/or (organo)phosphate groups. Time-resolved FT-IR-spectroscopy was used for the first time to investigate the biosorption processes directly at the interface between *Euglena mutabilis* cells and uranium solution. The results of these measurements confirmed the complexation of uranium by carboxylic groups for the sorption process on dead cells. The binding by (organo)phosphate groups, however, could also not be completely excluded with this method.

Investigations on the localization of the immobilized uranium on or in the *Euglena* cells using the coupled CLSM/LIFS-system showed first evidence on an intra-cellular accumulation of uranium. Additional analyses using Transmission Electron Microscopy (TEM) together with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) confirmed the intra-cellular uptake of uranium and showed round to oval cell organelles where the uranium is located. These organelles are probably vacuoles or similar vesicles. With these microscopic analyses, however, no uranium could be localized and detected on the dead cells. This confirms the passive, homogenously distributed biosorption of the uranium on the available binding sites on the surface of the dead biomass without local accumulations.

The results of this study contribute to obtain a profound knowledge on the processes regarding the interactions of uranium with biofilms and in particular with *Euglena mutabilis* cells. The obtained findings help to improve the estimation of risks arising from contaminated environments and to optimize the prediction of the migration behavior of uranium.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Vergabe dieses interessanten und anspruchsvollen Themas sowie für die Übernahme der Gesamtbetreuung dieser Arbeit bei Herrn Professor Dr. Gert Bernhard bedanken.

Für die Übernahme der externen Betreuung dieser Arbeit seitens der Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens und die freundlichen hilfreichen Anmerkungen danke ich Frau Professor Rhena Krawietz.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Thuro Arnold für die Idee zu dieser interessanten Aufgabenstellung und die direkte wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Die Vielzahl an intensiven Diskussionen mit ihm und seine zahlreichen Anregungen haben diese Arbeit erst ermöglicht und mich immer angespornt und ermutigt.

Meinem Lebensgefährten und Kollegen Herrn Dr. Kay Großmann möchte ich in besonderem Maße danken. Seine Unterstützung und Hilfe haben diese Arbeit maßgeblich vorangebracht. Ich danke ihm für seine wissenschaftliche Unterstützung in unzähligen Gesprächen und die vielen anregenden Ideen und Hilfestellungen für meine Arbeit. Des Weiteren muss ich sein Verständnis und seine unerschöpfliche Geduld mit mir loben und ihm herzlich danken, dass er meine Launen während der Promotionszeit so tapfer ertragen hat und mich dennoch stets angetrieben und ermutigt hat. Auch in den stressigsten Momenten fand er Zeit für mich und meine Sorgen und schaffte es stets mich aufzubauen und mir den Rücken zu stärken. Dafür ein riesiges DANKESCHÖN!

Frau Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch und Herrn Dr. Robin Steudtner danke ich für ihre Anregungen, Unterstützung und zahlreiche gewinnbringende Diskussionen.

Für die Berechnung von Speziations-Diagrammen danke ich Herrn Dr. Frank Bok.

Frau Dr. Katharina Müller und Herrn Dr. Harald Förstendorf danke ich für die Unterstützung bei der Idee, Durchführung und Auswertung der IR-spektroskopischen Messungen sowie für die anregenden Diskussionen dazu.

Für die Durchführung von TEM/EDX-Messungen und seiner Geduld bei den ungewöhnlichen und schwierig händelbaren Proben danke ich Herrn Dr. Rene Hübner.

Frau Ines Gründig, die ich in ihrer Diplomarbeit betreute, danke ich für ihr Engagement in den ihr übertragenen Aufgaben und ihre Unterstützung im Labor, die maßgeblich auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein Dankeschön geht auch an Frau Isabel Zirnstein und Frau Claudia Meierhöfer für die Kooperation und Unterstützung hinsichtlich der mikrobiellen Diversitäts-Analysen der natürlichen Biofilmproben.

Des Weiteren danke ich den fleißigen Mitarbeiterinnen des „Analytik-Teams“ Frau U. Schäfer, Frau C. Eckardt und Frau A. Ritter sowie den Laborantinnen M. Dudek, C. Müller, H. Neubert, S. Heller, J. Seibt und S. Gürtler die mir stets unterstützend und hilfreich zur Seite standen.

Ebenso möchte ich den Herren der Wismut U. Zimmermann, R. Uebe und P. Luz danken, welche mir die Möglichkeit der Probenentnahme im ehemaligen Uranbergwerk in Königstein gaben und mich untertage tatkräftig unterstützten.

Herrn Professor G. Büchel und Frau Prof. E. Kothe der Uni Jena danke ich für den uns gewährten Zugang zum Testfeld auf der Gessenwiese zur Durchführung von Probenentnahmen und Messungen.

Mein Dank richtet sich auch an die Kolleginnen M. Vogel, L. Lütke, K. Lindner, C. Gagell, A. Heller und C. Wimmer für zahlreiche anregende Diskussionen und nette Gesprächsrunden, welche nicht nur zu neuen Ideen sondern auch zu einem angenehmen Arbeitsumfeld und einer freundschaftlichen Atmosphäre führten und somit maßgeblich zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf danke ich für die Aufnahme in ein freundliches Arbeitsumfeld und den entgegengebrachten Zuspruch und ihre Hilfe.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Besonders meinen Eltern danke ich an dieser Stelle für die anhaltende Unterstützung auf all meinen Wegen. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und haben mich ermutigt meinen Weg zu gehen, auch wenn er steinig wurde. Dafür ein ganz herzliches DANKE!

Ein weiteres Dankeschön geht an Gabi und Jürgen Großmann, welche sich als Großeltern so oft liebevoll um unsere kleine Tochter kümmern. In stressigen Zeiten haben sie mir so den Rücken freigehalten und damit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zum Schluss geht noch ein kleines Danke an meine Tochter Lilian. Sie schaffte es mich auch an den trübsten und stressigsten Tagen aufzuheitern und mir so neuen Ansporn zu geben.

Abkürzungen und Symbole

AMD	<u>A</u> cid <u>M</u> ine <u>D</u> rainage – saure Minenabwässer
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
ATR	<u>A</u> ttenuated <u>T</u> otal <u>R</u> eflection – abgeschwächte Totalreflexion
Btm	<u>B</u> io <u>t</u> rocken <u>m</u> asse
CARD-FISH	<u>C</u> atalyzed <u>R</u> eporter <u>D</u> eposition <u>F</u> luorescence <u>I</u> n- <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization – Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit katalysierter Ablagerung von Markierungen
CLSM	<u>C</u> onfocal <u>L</u> aser- <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy – Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
cw	<u>C</u> ontinuous <u>W</u> ave – kontinuierliche Anregung ohne Pulsung
DMF	<u>D</u> imethyl <u>f</u> ormamid
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
ϵ	<u>M</u> olarer <u>E</u> xtinktionskoeffizient
EDX	<u>E</u> nergy <u>D</u> ispersive <u>X</u> -ray-Spectroscopy – Energie-dispersive Röntgen-spektroskopie
EPS	<u>E</u> xtrazelluläre <u>P</u> olymere <u>S</u> ubstanzen
EXAFS	<u>E</u> xtended <u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>F</u> ine <u>S</u> tructure – Röntgenabsorptions-spektroskopie
FT-IR	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransform- <u>I</u> nfrarot-Spektrometer
ICCD	<u>I</u> ntensified <u>C</u> harge- <u>C</u> oupled <u>D</u> evice
ICP-MS	<u>I</u> nductively <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry – Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{abs}	Absorptionswellenlänge bzw. Absorptionsmaximum [nm]
λ_{em}	Emission – Emissionswellenlänge bzw. Emissionsmaximum [nm]
λ_{ex}	Excitation – Anregungswellenlänge [nm]
LIFS	<u>L</u> aser <u>i</u> nduzierte <u>F</u> luoreszenzspektroskopie
M	Molare Masse [g/mol]
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
n.d.	<u>N</u> icht <u>d</u> etektierbar
p.a.	<u>P</u> ro <u>a</u> nalyse – analysenrein
p.	<u>P</u> urum – pur
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction – Polymerase-Kettenreaktion
PMT	<u>P</u> hotomultiplier <u>T</u> ube – Fotomultiplier
ROI	<u>R</u> egion <u>O</u> f <u>I</u> nterest – Messregion

rpm	<u>R</u> evolutions <u>P</u> er <u>M</u> inute – Umdrehungen pro Minute
sa	<u>S</u> tandard <u>a</u> bweichung
SAG	<u>S</u> ammlung von <u>A</u> lgenkulturen der Universität <u>G</u> öttingen
s.p.	<u>S</u> uprapur – super rein
TEM	<u>T</u> ransmission <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscopy – Transmissionselektronenmikroskopie
TRLFS	<u>T</u> ime- <u>R</u> esolved <u>L</u> aser-induced <u>F</u> luorescence <u>S</u> pectroscopy – zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie
UV/VIS	Spektralphotometrie im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichts

1. Motivation und Zielstellung

Der anthropogene Eintrag von Uran in die Umwelt stellt ein generelles Risiko für Mensch, Tier und Pflanzenwelt dar. Der bedeutendste Eintrag an Uran findet im Zusammenhang mit dem Abbau und der Laugung von Uranerzen zum Zweck der Energiegewinnung statt. Dabei kann es zur Bildung von hoch mobilen, löslichen Uranverbindungen (z.B. in sauren Minenabwässern = Acid mine drainage, AMD) und damit zum Eintrag in Grundwasserleiter und Böden sowie Pflanzen kommen. Auch im Rahmen der Kernenergiegewinnung kann es durch mögliche Störfälle bzw. im Zusammenhang mit der Verwahrung und Lagerung der radioaktiven, uranhaltigen Abfälle zum Austritt von Uran in die Umwelt kommen. Weitere anthropogene Umwelteinträge von Uran entstehen u.a. durch die Anwendung und den Test von Kernwaffen, den Einsatz von mit Uran ummantelter Munition sowie durch die Düngung mittels uranhaltiger Phosphatdünger und die anschließende Auswaschung in die Böden.

Durch eine unkontrollierte Kontamination kann Uran bis in die Nahrungsketten von höheren Tieren und schließlich bis zum Menschen gelangen. Um detaillierte Risikoabschätzungen von kontaminierten Standorten oder möglichen Endlagerstätten vornehmen zu können, ist ein umfassendes Verständnis des Migrationsverhaltens von Uran in der Umwelt nötig. Dabei spielen neben den Wechselwirkungen von Uran mit geologischen Materialien besonders (mikro)biologische Prozesse eine wichtige Rolle, welche jedoch aufgrund der enormen Diversität in den verschiedenen Habitaten schwer abzuschätzen sind.

Bisherige Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Uran (Lovley et al., 1991, Wall und Krumholz, 2006, Reitz et al., 2011) zeigten, dass die Biologie in der Umwelt nicht nur die Migration von Uran maßgeblich beeinflusst, sondern auch einen Beitrag zur Immobilisierung von hoch mobilen, gelösten Uranspezies, durch Bindung an bzw. in der Biomasse oder durch Präzipitation als Uranminerale, aufgrund von Biomineralisation leisten kann. Daher wurde bereits ein möglicher Einsatz von speziellen Mikroorganismen oder von natürlichen Biofilmverbänden zum Eindämmen von Kontaminationen in der Umwelt oder zur Biosanierung von kontaminierten Gebieten vorgeschlagen (Lovley et al., 1991, Selenska-Pobell et al., 1999, Beyenal et al., 2004).

Die meisten bisher durchgeführten Studien zu den Wechselwirkungen von Uran mit Mikroorganismen wurden jedoch mit einfachen Monokulturen unter sterilen und genau definierten Laborbedingungen durchgeführt (Panak et al., 2002). In solchen Laborversuchen zu den Wechselwirkungen mit Uran, konnte für diverse Mikroorganismen die Fähigkeit zur Uranakkumulation nachgewiesen werden (Selenska-Pobell et al., 1999, Merroun et al., 2011). Einige der untersuchten Mikroorganismen (Yang und Volesky, 1999, Popa et al., 2003, Vogel et al., 2010) sind jedoch unter den realen Bedingungen, wie sie z.B. in sehr

sauren schwermetallbelasteten Minenabwässern (AMD) vorherrschen, nicht überlebensfähig und kommen somit leider nicht für Sanierungsstrategien solcher kontaminierten Gebiete in Frage.

Zum Einfluss von Biofilmen, bestehend aus großen Lebensverbänden von verschiedenen Organismen einer oder mehrerer Spezies, auf die Uranmigration, wurden bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt (Beyenal et al., 2004, Großmann, 2008). Meistens fanden diese Versuche jedoch mit nicht umweltrelevanten Biofilmverbänden und unter Laborbedingungen (nicht AMD-relevant) statt (Großmann et al., 2007). Um ein Verständnis der Prozesse im Zusammenhang mit der Uranmigration, in natürlichen Umgebungen zu erlangen und den Einfluss der Biofilme und Mikroorganismen auf diese Prozesse besser einschätzen zu können, ist es dagegen notwendig Untersuchungen an natürlich gewachsenen Biofilmen, unter realen Bedingungen in sauren Minenabwässern durchzuführen.

Resultierend aus der dargestellten Situation war es somit Ziel dieser Arbeit die Wechselwirkungen von Uran mit der natürlichen Umgebung eingehender zu charakterisieren. Dabei sollten speziell die Einflüsse und Wechselwirkungen von natürlich in urankontaminierten Gebieten gewachsenen Biofilmen auf die Uranmigration untersucht werden. Neben der umfassenden chemisch-physikalischen und mikrobiologischen Charakterisierung der Biofilme sollte besonders deren Eignung zur Immobilisierung von Uran überprüft werden. In diesem Zusammenhang stand die chemische Identifizierung und Visualisierung von Uranakkumulationen in den Biofilmen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Ein weiterer Schwerpunkt in dieser Arbeit stellte die Charakterisierung von Wechselwirkungen des Urans mit dem Modelorganismus *Euglena mutabilis* Schmitz dar, welcher ein typischer eukaryotischer Vertreter in oberirdischen sauren schwermetallkontaminierten Minenabwässern ist. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung der an bzw. in den Zellen gebildeten Uranspezies sowie die Aufklärung des Bindungsmechanismus.

Zur chemischen Identifizierung und Visualisierung der gebildeten Uranspezies in den natürlichen Biofilmen und in den als Monokultur untersuchten Mikroorganismen sollten neben anderen Techniken vorrangig fluoreszenzmikroskopische und –spektroskopische Methoden angewendet werden, da diese spezielle Vorteile für die Untersuchung von Uran aufweisen. Die Untersuchungen in dieser Studie sollten somit einen Einblick zum Einfluss von natürlichen Biofilmen sowie von *Euglena mutabilis* Zellen auf die Uranmigration an kontaminierten Standorten liefern.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Uran

Das Uran ist ein Element, welches der Menschheit erst seit etwas mehr als 220 Jahren bekannt ist und dennoch eine sehr bewegte Geschichte hat. Als Entdecker des Urans gilt der deutsche Chemiker und Mineraloge M. H. Klaproth, der im Jahr 1789 ein neues Element fand, welches er nach dem, zur damaligen Zeit erstmals entdeckten, Planeten Uranus benannte (Craft et al., 2004). Erst reichlich fünfzig Jahre später, im Jahr 1841 fand E. M. Péligot bei seinen Studien heraus, dass es sich bei Klaproth's Entdeckung nicht um das reine Element Uran, sondern um dessen Oxid handelte und isolierte das erste Mal elementares Uran. Die Entdeckung des Urans kam dabei der Entdeckung der Radioaktivität gegen Ende des 19. Jahrhunderts gut 100 Jahre zuvor.

2.1.1. Vorkommen und chemische Eigenschaften des Urans

Uran besitzt die Ordnungszahl 92 sowie die molare Masse 238,03 g/mol und zählt zu den Actiniden. In seiner elementaren Form ist Uran ein silbrig glänzendes Metall mit einer hohen Dichte von 19,07 g/cm³. Trotz seiner hohen Ordnungszahl ist Uran kein seltenes Element, denn es ist zu einem Anteil von etwa (2-4 mg)/kg in der Erdkruste vorhanden (Craft et al., 2004). Über 100 verschiedene Uranerze kommen natürlich vor. Die größten Uranerzvorkommen wurden in den Vereinigten Staaten, Kanada, Südafrika und Australien gefunden.

Es gibt mehr als 20 verschiedene Uranisotope, von denen nur folgende drei natürlich vorkommen: ²³⁸U (99,27%), ²³⁵U (0,72%) und ²³⁴U (0,005%). Alle Uranisotope sind radioaktiv. Die drei natürlich vorkommenden Isotope sind alle Alpha-Strahler, deren Zerfallsreihen bei den nicht-radioaktiven Isotopen des Bleis ²⁰⁶Pb (für ²³⁸U und ²³⁴U, Uran-Radium-Zerfallsreihe) bzw. ²⁰⁷Pb (²³⁵U, Uran-Actinium-Zerfallsreihe) enden. Da ²³⁵U nur in geringen Konzentrationen in den natürlichen Uranvorkommen enthalten ist, wird es für die wirtschaftliche Nutzung (z.B. für Kernspaltungsreaktionen) angereichert. Das zurückbleibende Uran wird als abgereichertes Uran bezeichnet und besitzt eine geringere Radioaktivität als das natürlich vorkommende Isotopengemisch.

Uran kann fünf Oxidationsstufen aufweisen: +II, +III, +IV, +V und +VI. Jedoch sind lediglich die Oxidationsstufen +IV und +VI in natürlichen Umgebungen stabil. Zunehmend wird auch die Oxidationsstufe +V als Übergangsstufe zwischen +IV und +VI untersucht. Diese metastabile Übergangsstufe konnte mittels Fluoreszenzanalytik bereits in verschiedenen Speziationen in wässrigen Lösungen (Steudtner et al., 2006, Großmann et

al., 2009a), Feststoffen (Großmann et al., 2009b) sowie innerhalb von Biofilmen (Großmann et al., 2007) nachgewiesen werden. Die Redoxübergänge zwischen den Oxidationsstufen (IV) und (VI) sind entscheidend für die Löslichkeit, die Mobilität und damit ebenso für die Bioverfügbarkeit des Urans für Mensch und Umwelt. Abbildung 1 zeigt einen Einblick in den schematischen Urankreislauf in der Umwelt, bezogen auf die zwei natürlich vorkommenden stabilen Oxidationsstufen (+IV) und (+VI) des Urans. Unter oxidierenden Bedingungen, wie sie z.B. in Oberflächenwässern oder auch in gut belüfteten Grundwässern vorherrschen, ist Uran(VI) als freies Uranylion (UO_2^{2+}) vorzufinden, dessen Verbindungen generell recht gut löslich sind, (Arnold et al., 2010).

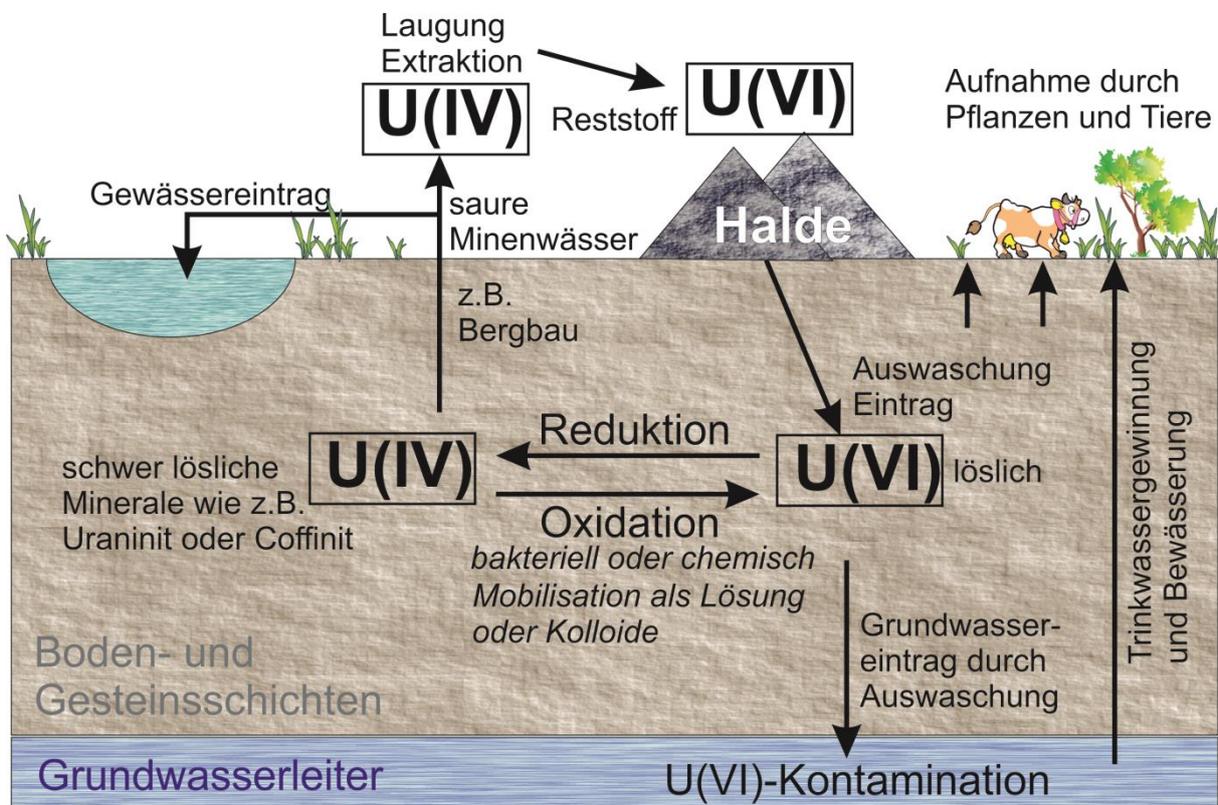


Abbildung 1: Schematische Darstellung des natürlichen Urankreislaufs bezogen auf U(IV) und U(VI)

Die gute Löslichkeit der sechswertigen Uranverbindungen sorgt für eine erhöhte Mobilität in der Umwelt. Wie in Abbildung 1 dargestellt, kann Uran dadurch vor allem über den Wasserpfad in der Umwelt stark verbreitet werden. Das gelöste aquatische Uranylion (UO_2^{2+}) koordiniert in den natürlichen Wässern in Abhängigkeit der verfügbaren Liganden zu entsprechenden Uranyl(VI)-Spezies. Dabei werden die Eigenschaften der Uranylspezies und somit auch deren Transport von einer Reihe von Parametern wie z.B. der Konzentration vorhandener Komplexbpartner, der Ionenstärke, dem pH-Wert, der Temperatur sowie dem Redoxpotential beeinflusst. In gut belüfteten Bereichen steht das aquatische Uranyl(VI)ion mit der umgebenden Atmosphäre im Gleichgewicht. Dabei bildet das in der Luft enthaltene CO_2 , zusammen mit dem vorhandenen Uranyl(VI), abhängig von den Umgebungs-

parametern, unter anderen verschiedene Uranyl(VI)-Carbonat-Komplexe. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Speziesverteilung von sechswertigem Uran in Abhängigkeit vom pH-Wert in wässriger Natriumperchloratlösung unter atmosphärischen Bedingungen ohne die Anwesenheit weiterer Liganden. An diesem beispielhaften Speziationsdiagramm ist die Dominanz des freien aquatischen Uranyl(VI)ions im sauren pH-Bereich erkennbar. Mit steigenden pH-Wert nimmt die Anzahl vorhandener Uran(VI)spezies zu und es werden zunehmend Hydrolyse- und Carbonat-Spezies gebildet. Im basischen pH-Wertbereich werden die Hydrolysespezies zunehmend verdrängt und es bildet sich eine Dominanz der Uran(VI)-Carbonat-Komplexe heraus.

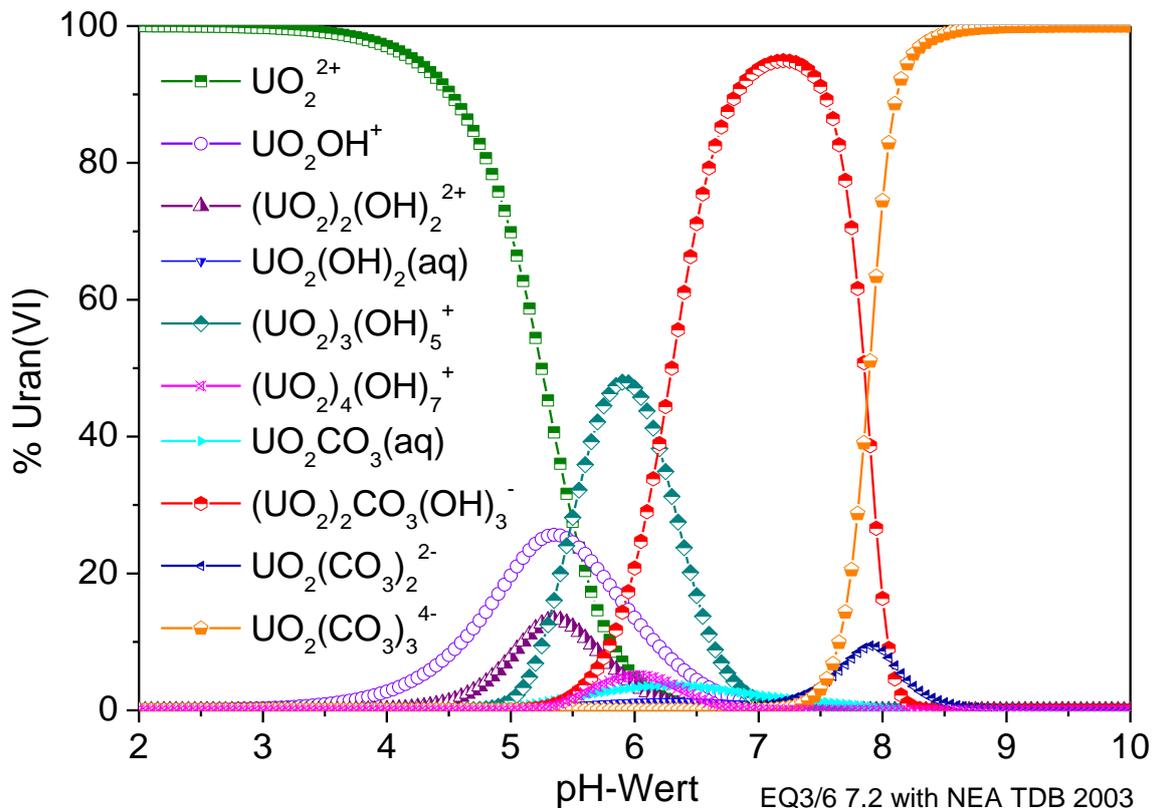


Abbildung 2: Uran(VI)-Speziationsdiagramm in Abhängigkeit des pH-Wertes als Beispiel für eine Uran(VI)konzentration von 0,01 mM in 0,1 M Natriumperchlorat-Lösung (NaClO_4) bei atmosphärischen Bedingungen und ohne Anwesenheit weiterer komplexierender Stoffe; Berechnung mittels des Speziationsdiagrammes EQ3/6 unter Verwendung der Daten von Guillaumont et al. (2003).

In natürlichen Wässern, wie z.B. Minenabwässern oder sonstigen uranhaltigen Wässern (z.B. auch Mineralwässern) ist meist noch eine Vielzahl weiterer Ionen enthalten, die als Liganden dienen können. So spielen unter natürlichen Bedingungen neben den Carbonat-Komplexen unter anderen auch Sulfat- (Geipel et al., 1996, Arnold et al., 2011), Phosphat- (Brendler et al., 1996) oder Halogen-Komplexe, z.B. mit Fluorid, eine wichtige Rolle. Nicht zu unterschätzen sind auch die Vielzahl an organischen Liganden, wie z.B. Huminstoffe (Sachs et al., 2007), die in natürlichen Wässern einen beachtlichen Anteil der Ionenkonzentrationen ausmachen können.

Unter solch atmosphärischen Bedingungen ist es dennoch möglich, dass das gelöste aquatische Uranyl(VI) immobilisiert wird. Dies ist in besonderem Maße von den Umgebungsparametern abhängig und kann in Form von Oberflächenausfällungen, Adsorption an eine Phasengrenzfläche, Ionenaustausch, Absorption durch eine Festphase oder Redoxreaktionen geschehen (Großmann, 2008).

Unter reduzierenden Bedingungen, wie sie z.B. in Untergrundwässern vorliegen, ist Uran gewöhnlich als vierwertige Oxidationsstufe (U(IV)) vorzufinden (Arnold et al., 2010). Die Uran(IV)-Spezies sind unter umweltrelevanten pH-Bedingungen (größer pH 2) generell sehr schwer löslich und neigen z.B. dazu als schwerlösliches Uraninit ($U(IV)O_2$) oder Coffinit $U(IV)[(SiO_4)_{1-x}(OH)_{4x}]$ zu präzipitieren. Dadurch kommt es zu einer Immobilisierung des Urans in der Umwelt.

2.1.2. Eintrag von Uran in die Umwelt

Als neues Element fand Uran, aufgrund seiner besonderen Eigenschaften schnell Anwendung in verschiedensten Bereichen. In einer Zeit, in welcher der Begriff „Radioaktivität“ noch nicht definiert war, wurde es aus heutiger Sicht recht sorglos in vielfältiger Weise eingesetzt. Im 19. Jahrhundert wurden Uranverbindungen zum Beispiel besonders gern für die Färbung von Glas und Keramik angewandt.

Der Bedarf an Uran wuchs besonders in den letzten 50-60 Jahren enorm an, denn mit der Entdeckung der Radioaktivität und den daraus folgenden Fortschritten auf dem Gebiet der Kernforschung Anfang des 20. Jahrhunderts zeigten sich neue, weitere Einsatzmöglichkeiten. Schnell wurde jedoch auch das Potential des Urans zum Bau von sehr effektiven Waffen und Bomben erkannt. Dabei wurde und wird Uran nicht nur für die Produktion von Kernwaffen verwendet sondern aufgrund seiner hohen Dichte auch in seiner abgereicherten Form für die Panzerung von militärischen Fahrzeugen und als Projektilkernmaterial in Geschossen eingesetzt. Die Nutzung der Kernspaltung des Urans, um Energie zu gewinnen, war hingegen angesichts eines zunehmend größer werdenden Strombedarfs, zunächst ein großer Fortschritt für die Menschheit. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erstmals in Kernkraftwerken erzeugter Strom in die Netze eingespeist. Im Jahr 1995 existierten weltweit bereits 437 Kernkraftwerke (Ewing, 1999).

Der wachsende Bedarf an Uranmineralien für die Brennstoffproduktion, die Herstellung von Waffen aber auch für die Forschung und die Industrie führte zu deren vermehrtem Abbau in Minen und Tagebauen. Die zunehmende Nutzung des Urans durch den Menschen führte zudem zu einer verstärkten Verteilung des Urans in der Umwelt. Diese Verteilung entsteht durch Kontaminationen der Umwelt bereits beim Uranerzabbau, durch Abraumhalden und saure Minenabwässer, aber auch durch den Test von nuklearen Waffen sowie durch den Einsatz uranhaltiger Geschosse. Eine weitere Kontamination von Böden,

abseits von Bergbau- und Kriegs- bzw. militärischen Gebieten, kann durch erhöhten Einsatz von Phosphatdüngern entstehen, da diese etwa 50-200 mg/kg Uran enthalten können (Bernhard, 2005), welches sich im Boden durch wiederholtes Düngen anreichert bzw. durch Auswaschen in das Grundwasser gelangen kann (Barisic et al., 1992). Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit Uran und seiner Nutzung stellt sich durch die Abfälle bzw. die abgebrannten Brennstäbe aus den Kernkraftwerken dar, welche durch ihre hohe Radioaktivität über sehr lange Zeiträume sicher verwahrt werden müssen.

Die Verteilung des Urans in der Umwelt ist nicht nur wegen seiner radioaktiven Eigenschaft problematisch, sondern auch wegen der nicht zu vernachlässigenden hohen chemischen Toxizität des Urans. Uranverbindungen können, wenn sie in Kontakt mit Mensch oder Tier kommen, entsprechende gesundheitliche Schäden verursachen. Durch Inhalation von kontaminierten Stäuben oder auch die orale Aufnahme von z.B. kontaminierten Nahrungsmitteln ist es möglich, dass Uranverbindungen in den Körper gelangen. Dies kann beispielsweise schon durch die Aufnahme von uranbelasteten Mineralwässern geschehen. Für verschiedene Mineralwässer konnten z.T. erhöhte Urangehalte von bis zu 188,8 µg/l (Bernhard, 2005) nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 1). Das meiste aufgenommene Uran verlässt den Körper durch Ausscheidungen relativ schnell (Craft et al., 2004). Von dem im Körper verbleibenden Uran werden 85 % in den Knochen abgelagert (Craft et al., 2004). Das restliche im Körper verbleibende Uran wird hauptsächlich in den Gefäßen der Nieren deponiert. Nierenkrankheiten und Nierenschäden sind daher die typischen Effekte, welche beobachtet wurden nachdem Menschen erhöhten Urankonzentrationen ausgesetzt waren und es auch zur Aufnahme in den Körper kam. Aufgrund der radiotoxischen Eigenschaft, d.h. aufgrund der Freisetzung von ionisierender Strahlung (alpha-Strahlung, bzw. beta-Strahlung der Zerfallsprodukte), können weiterhin zum Beispiel Krebserkrankungen verschiedener Art ausgelöst werden (Durakovic, 1999). Besonders häufig wurde hierbei der Lungenkrebs beobachtet, der speziell bei Minenarbeitern nachgewiesen wurde, welche uranhaltigen Stäuben ausgesetzt waren und diese ohne Schutz einatmeten (Durakovic, 1999).

Vor allem die chemisch-toxischen Eigenschaften des Urans auch schon bei geringen Konzentrationen und sein häufiges Vorkommen in vielen natürlichen Wässern (siehe Tabelle 1) veranlasste das Bundesministerium für Gesundheit im Jahr 2011 zur Festlegung eines Grenzwertes für Uran in Höhe von 0,01 mg/l in der deutschen Trinkwasserverordnung (TrinkwV). Für die Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern wird zudem ein signifikant niedrigerer Grenzwert von nur 0,002 mg Uran pro Liter durch die Verordnung über natürliches Mineralwasser, Quellwasser und Tafelwasser (Min/TafelWV) empfohlen.

Tabelle 1: natürliche Urangehaltsspannen in verschiedenen Wässern (Daten aus Bernhard (2005))

Wassertyp	Urangehaltsspanne
Mineralwasser	< 2 ng/l – 188,8 µg/l
Trinkwasser	< 1 ng/l – 73 µg/l
Ozeanwasser	1,15 µg/l – 3,5 µg/l

Die vom Uran ausgehenden Gefahren für die Gesundheit und das Leben von Mensch und Tier machen die Sanierung von kontaminierten Böden und damit die Entwicklung geeigneter Sanierungsstrategien notwendig. Die Forschung zur Entwicklung von Umweltsanierungsansätzen von mit Uran kontaminierten Böden und Gewässern erlangte in den letzten Jahrzehnten verstärktes Interesse. Dazu werden unterschiedlichste Ideen zum Entfernen des Urans aus der Umwelt verfolgt und auch zum Teil bereits erfolgreich eingesetzt. Vier grundlegende Behandlungsmethoden werden derzeit besonders eingesetzt, um Uran von kontaminierten Standorten zu entfernen: (1.) direkte chemische Methoden, (2.) elektrochemische Behandlung, (3.) Ionenaustausch- und Biosorptions-Methoden oder (4.) intrazelluläre Absonderung in den Zellen von Pflanzen, Algen oder sonstigen mikrobiellen Zellen (Kalin et al., 2005). Die (elektro-)chemischen Behandlungen zu Sanierungszwecken sind sehr teuer und müssen für sehr lange Zeiträume durchgeführt werden um das Uran aus Abraummaterialien oder Minenabwässern zu entfernen (Kalin et al., 2005). Daher ist der Wunsch nach einer wartungsarmen ökologisch selbstregulierenden Technik entstanden, was zugleich die Motivation vieler Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biosanierungsstrategien darstellt.

Die Nutzung von Mikroorganismen zur Eingrenzung der Kontamination und zur Rückhaltung von Schwermetallen, z.B. mittels chemischer Umwandlung durch Redoxreaktionen in weniger mobile und somit in weniger schädliche Verbindungen, ist der Kern der Idee. Zahlreiche Mikroorganismen wie Bakterien, Algen, Pilze sowie niedere Pflanzen und Flechten wurden von den verschiedensten Forschergruppen bereits auf ihre Fähigkeit zur Schwermetallakkumulation auch speziell hinsichtlich einer möglichen Uranakkumulation untersucht (Günther et al., 2003, Merroun et al., 2003, Günther et al., 2008). Es zeigte sich bereits durch diese Forschungen, dass die Idee für Sanierungsansätze Mikroorganismen einzusetzen, hohes Potential besitzt. In den meisten Untersuchungen werden hierbei jedoch Reinkulturen untersucht. Diese spiegeln die natürlichen Gegebenheiten nicht wieder, da in der Natur selten echte Reinkulturen vorgefunden werden. Vielmehr leben verschiedenste Mikroorganismen meist in Lebensgemeinschaften zusammen, in sogenannten Biofilmen, und profitieren dabei auch oft voneinander und sind sogar auf einander angewiesen. Der Einfluss der Biofilmverbände auf den Umwelteintrag des Urans ist ein wichtiger Aspekt in den komplexen Wechselwirkungen des Urans mit der Natur und soll hier genauer behandelt werden.

Im Folgenden Kapitel wird der Begriff Biofilm ausführlich erklärt. Des Weiteren wird ein kurzer Einblick in den aktuellen Wissenstand zu Wechselwirkungen von Uran mit Mikroorganismen bzw. Biofilmen gegeben.

2.2. Biofilme

Costerton et al. (1995) definierte Biofilme als matrix-umschlossene Bakterienpopulationen, welche aneinander und/oder an Oberflächen oder Grenzflächen anhaften. Diese Definition beinhaltet mikrobielle Aggregate und Flocken sowie anhaftende Populationen innerhalb von Porenräumen poröser Medien.

Tatsächlich stellen Biofilme eine Lebensgemeinschaft verschiedenster Mikroorganismen dar, welche in eine meist schleimige Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind. Biofilme sind ubiquitär vorkommend und daher auch in allen Bereichen unseres Lebens aufzufinden. Sie gelten als die älteste Form des Lebens auf unserer Erde und es wird angenommen, dass mehr als 99 % der Mikroorganismen auf der Erde in Biofilmen leben (Flemming, 1994).

Für die Menschheit sind Biofilme zweiteteilt zu betrachten, denn sie können sowohl einen schädlichen als auch einen nützlichen Einfluss haben. Der erwünschte Einfluss von Biofilmen auf ihre Umgebung wird zum Beispiel in verschiedener Weise technisch genutzt. In der Abwasserreinigung werden beispielsweise Biofilm-Technologien in großem Umfang eingesetzt (Flemming, 1994). Einige Beispiele hierfür sind unter anderen Tropfkörper-Reaktoren, Algenfilter oder Sandfilter. Auch zur Reinigung von Abluft und zur Beseitigung von festen Abfällen werden Biofilme oder mit Mikroorganismen besiedelte Trägermaterialien wie z.B. Torf o.ä. eingesetzt (Flemming, 1994). Biofilme werden zudem auch für die Aufbereitung von Trinkwasser genutzt indem sie als „biologische Rasen“ auf Filtermaterialien für den Abbau unerwünschter Inhaltsstoffe sorgen. Auf diese Weise werden zum Beispiel Eisen und Mangan oder auch Geruchs- und Farbstoffe aus dem Wasser entfernt (Flemming, 1994). Ein weiteres Einsatzgebiet von Biofilmen ist die mikrobielle Erzlaugung, bei der meist sulfidische Erze durch schwefeloxidierende Bakterien besiedelt werden, welche zu so starken pH-Wertabsenkungen führen, dass die Metallkationen in Lösung gehalten werden, aus welcher sie später wieder elektrolytisch abgeschieden werden können (Flemming, 1994).

Durch ihr ubiquitäres Vorkommen treten Biofilme allerdings auch häufig in Bereichen unseres Lebens auf, wo sie unerwünscht sind und auch schädliche Einflüsse haben. In Wasseraufbereitungsanlagen können sie zum Beispiel zu „Biofouling“ (unerwünschte Ablagerung und Wachstum von Mikroorganismen auf Oberflächen) führen (Flemming, 1994). Durch Verstopfen von Filtern sowie durch die Produktion von schädlichen Metaboliten und

Faulprodukten können anhaftende mikrobielle Beläge Störungen in industriellen Systemen verursachen (Costerton et al., 1987). Biofilme können auch gesundheitsschädliche Keime beherbergen, welche im Biofilmverband besser gegen Sanierungs- und Desinfektionsmaßnahmen geschützt sind (Flemming, 1994). Diese Biofilme können im Verteilungsnetz von Trinkwassersystemen für Kontaminationen mit pathogenen Keimen verantwortlich sein und stellen so ein ernstzunehmendes Problem in der Trinkwasserversorgung dar (Flemming, 1994). Ein weiteres Beispiel für den unerwünschten Effekt von Biofilmen ist der Befall von Wärmetauschern, deren Austauscheffizienz durch die Biofilmkontamination auf Werte bis zu <10 % ihrer ausgelegten Werte reduziert werden kann (Costerton et al., 1987). Biofilme können auch zur Schädigung von Materialien und Oberflächen führen z.B. durch mikrobiell induzierte Korrosion von metallischen Werkstoffen oder mikrobiell induzierte Verwitterung von mineralischen Werkstoffen und Natursteinen (Flemming, 1994, Hamilton, 2000). Dies kann unter anderem zu Schäden an technischen Großanlagen, Gebäuden und auch historischen Denkmälern führen. In der Lebensmittelindustrie stellt die Bildung von mikrobiellen Biofilmen und Mikrokolonien ein großes Problem dar (Holah und Gibson, 2000). Die Kontamination von Lebensmitteln mit pathogenen Keimen durch mikrobielle Beläge in den Verarbeitungs- und Abfüllanlagen stellt eine große Gefahr für die Gesundheit dar.

Der Bereich der Medizin ist im besonderen Maße durch Biofilmbildung beeinflusst und gefährdet. Zum Beispiel auf Oberflächen von Implantaten (z.B. Hüftgelenkersatz) oder in Venen-Kathetern besteht die Gefahr der mikrobiellen Anhaftung, was zu schweren behandlungsbedürftigen Infektionen führen kann (Bayston, 2000). Auch der menschliche Körper selbst kann von bakteriellen Belägen besiedelt werden. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Bildung von Belägen im Mundraum, z.B. in Form von „Plaques“ auf den Zähnen (Quirynen et al., 2000) oder auch als Belag auf der Zunge. Gerade bei den Zahnbelägen ist vor allem die korrodierende Eigenschaft unerwünscht, denn durch ihren Stoffwechsel greifen die Bakterien in den Belägen ihr Substratum, in diesem Fall den Zahnschmelz an und Karies kann entstehen.

2.2.1. Zusammensetzung und Aufbau von Biofilmen

Die Mikroorganismen, welche in einem Biofilm leben, können entgegen der Definition von Costerton et al. (1995) vielfältigster Art sein. Bakterien, Archaeen, Algen, Pilze und sonstige Kleinstlebewesen, wie Einzeller oder auch kleine Mehrzeller, können Bewohner eines Biofilms sein. Hauptbestandteil mit bis zu 98 % des Feuchtgewichtes eines Biofilmes ist Wasser, welches von den EPS gebunden und immobilisiert wird, indem es ähnlich wie bei den Substanzen Agar-Agar oder Gelatine als eine Art Gel verfestigt wird (Flemming, 1994). Die EPS bestimmen den organischen Anteil eines Biofilms mit bis zu 60-95 % des Trockengewichtes (Flemming, 1994). Dabei sind die Mikroorganismen, die nur einen kleinen

Teil der Biomasse ausmachen, in der EPS-Matrix immobilisiert, die sie schützt und mit Nährstoffen versorgt. Die EPS bestehen zum größten Teil aus Polysacchariden und Proteinen, aber auch weitere Bestandteile wie Glycoproteine, Lipide, Phospholipide, Glycolipide und Nucleinsäuren ebenso wie die von einigen Arten gebildeten Polysaccharide Zellulose, Dextran oder Alginat können darin vorhanden sein (Flemming und Wingender, 2002). Die EPS-Matrix hat vielfältige Funktionen. Sie hält die Biofilmgemeinschaft nicht nur zusammen und sorgt für einen ausreichenden Nährstofftransport zu den Mikroorganismen darin, sie schützt die eingebetteten Zellen auch vor schädlichen äußeren Einwirkungen, zum Beispiel vor toxischen Substanzen oder vor dem Austrocknen. Die EPS sind zudem hauptsächlich verantwortlich für die strukturelle und funktionelle Beschaffenheit von Biofilmen und bestimmen hauptsächlich die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften eines Biofilmes (Wingender et al., 1999). Ebenfalls zu den Bestandteilen eines Biofilmes gehören eingebettete Partikel abiotischen Materials und gelöste Substanzen (Flemming, 1994).

Die Struktur und Dicke von Biofilmen kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und ist besonders abhängig von den mikrobiellen Spezies, der Biofilmzusammensetzung, der Aufwuchsoberfläche sowie von Umgebungsbedingungen wie Strömungen und Scherkräften. In Abbildung 3 ist zur besseren Veranschaulichung eine schematische Zeichnung des Aufbaus eines allgemeinen Biofilmes an einer Grenzfläche zwischen fester und flüssiger Phase dargestellt.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der heterogenen Biofilmstruktur, welche geprägt ist durch in die EPS eingebettete Mikrokolonien von Mikroorganismen und einem komplexen Netz an Wasserkanälen.

Wie man auch in Abbildung 3 erkennt, sind Biofilme meist auch sehr heterogen aufgebaut. Einige Wissenschaftler vergleichen sogar den Aufbau eines Biofilmes mit dem unserer Städte (Watnick und Kolter, 2000). Sie bestehen aus dichten Mikrokolonien von Zellen eingebettet in eine dicke schleimige Matrix aus EPS und gebundenem Wasser, durchzogen von Wasserkanälen (Costerton und Lewandowski, 1997) und Porenhohlräumen (Lawrence et al., 1991). Ähnlich wie Menschen in einer Stadt sich die richtige Nachbarschaft für sich und ihre Bedürfnisse aussuchen, siedeln sich die Mikroorganismen entsprechend ihren Bedürfnissen in bestimmten Bereichen des Biofilms an. Verschiedene Parameter wie z.B. der Sauerstoffgehalt, das Redoxpotential, Ionenkonzentrationen von gelösten Stoffen oder auch der pH-Wert können in Biofilmen innerhalb weniger Mikrometer stark variieren. So haben zum Beispiel Mikrosensoruntersuchungen von De Beer et al. (1994) gezeigt, dass Mikrokolonien von Mikroorganismen tief im Inneren eines Biofilms komplett anaerob leben können, während nur wenige Mikrometer entfernt z.B. an angrenzenden Wasserkanälen andere Mikroorganismen aerob leben. Diese strukturelle Heterogenität kann zu vielen verschiedenen, speziell angepassten Mikronischen innerhalb des Biofilms führen, so dass Zellen mit ganz unterschiedlichen physiologischen Bedürfnissen zusammen in ein und demselben Biofilm „glücklich“ leben können (Costerton et al., 1994).

2.2.2. Vorkommen und Bildung von Biofilmen

Biofilme entstehen durch die Anhaftung von Mikroorganismen an Grenzflächen, welche mit Wasser in Kontakt stehen. Meist werden dabei feste Oberflächen an der Feststoff/Wasser-Grenzfläche besiedelt, aber auch nahezu alle anderen Grenzflächenarten können von Biofilmen besiedelt werden (siehe Tabelle 2). Bis heute gibt es keine bekannten Werkstoffe, die dauerhaft einer Besiedlung durch Mikroorganismen widerstehen können (Flemming, 1994).

Tabelle 2: Biofilme an Grenzflächen (nach Flemming (2001))

Grenzfläche	Beispiele
Feste Oberfläche / Flüssigkeit	Untergetauchte Steine und Felsen in Bächen und Flüssen; Plaque auf Zähnen; Ablagerungen in Rohrleitungen ...
Feste Oberfläche / Luft- bzw- Gasphase (oft zeitweise in Kontakt mit Flüssigkeiten)	biologischer Rasen in Tropfkörperanlagen, in Böden, Bakterienkolonien auf Agarnährböden, Flechten
Flüssigkeit / Luft	Aufschwimmende Biofilme und Matten auf Gewässern mit geringer Strömung und in Speicherbehältern
Flüssigkeit / Flüssigkeit	Kohlenwasserstoff abbauende Biofilme an Öl/Wasser-Grenzflächen

Generell sind bei der Biofilmbildung an festen Oberflächen drei physikalische Phasen beteiligt: die flüssige Phase (das Medium), die feste Phase (das Substratum) und die Mikroorganismen (Flemming, 1994). Jede dieser Phasen kann von etlichen Faktoren beeinflusst werden (siehe Tabelle 3), welche sich wiederum auch gegenseitig beeinflussen.

Tabelle 3: Einflussvariablen auf die Biofilmbildung (nach Flemming (1994))

Phasen	Variablen
Medium	Temperatur, pH-Wert, gelöste organische/anorganische Stoffe, Oberflächenspannung, Viskosität, Scherströmungen und Druck
Substratum	Chemische Zusammensetzung, Hydrophobizität, Oberflächenspannung, Rauigkeit, Porosität, biologische Affinität
Mikroorganismen	Spezies, Zellzahl, Ernährungszustand, Hydrophobizität, Oberflächenladung, EPS, Wachstumsphase

Die Biofilmentstehung kann in verschiedene Entwicklungsstadien unterteilt werden. Ein schematischer Überblick über diese verschiedenen Entwicklungsstufen eines Biofilms sind im Vordergrund der Abbildung 4 dargestellt. Zu Beginn der Biofilmentwicklung steht die primäre Adhäsion von Mikroorganismen und Makromolekülen an eine Grenzfläche (unten links, Abbildung 4, „Attachment of single cells“) und der nachfolgenden Vermehrung der Mikroorganismen zu Mikrokolonien (Flemming, 1994). Noch bevor die ersten Mikroorganismen die Grenzfläche erreichen, kommt es bereits meist zur Bildung eines sogenannten „Conditioning Films“. Dabei handelt es sich um die irreversible Adsorption von Makromolekülen (Flemming, 1994), welche im Wasser vorhanden sind. Diese Anhaftung eines organischen „Conditioning Films“ geschieht sehr schnell innerhalb weniger Minuten oder sogar Sekunden (Flemming, 1994) und ist damit viel schneller, verglichen mit den anderen Biofilmbildungsprozessen (Characklis und Marshall, 1990). Die primäre Adhäsion von Mikroorganismen beim ersten Kontakt mit einer Oberfläche ist zunächst reversibel, doch schon nach einigen Minuten wird die Adhäsion bei einigen Organismen durch die zunehmenden Wechselwirkungen von Bestandteilen der Zelloberfläche mit dem Substratum irreversibel (Flemming, 2001). Die Anhaftung von Bakterien bzw. Mikroorganismen an Grenzflächen wird dabei von einer ganzen Reihe von Faktoren, z.B. von der Hydrophobizität der Zelloberflächen, der Anwesenheit von Organellen der Beweglichkeit, der Rauigkeit und Benetzbarkeit der Aufwuchsoberflächen sowie der Zusammensetzung des Mediums beeinflusst (Flemming, 2001).

Nach der ersten Anhaftung von Mikroorganismen folgt die Phase der mikrobiellen Akkumulation, welche vor allem durch Vermehrung der Bakterien aber auch durch neu aus der Wasserphase hinzukommende Mikroorganismen bestimmt wird (Flemming, 2001). Die

Mikroorganismen bilden eine erste Biofilmstruktur in Pilz-ähnlicher Form (siehe Abbildung 4, „Early structure“) aus. In dieser Phase der Biofilmentstehung ist die Förderung bzw. Auslösung der EPS-Produktion charakteristisch (Flemming, 2001). Die EPS füllen den Platz zwischen den Zellen und sind verantwortlich für die Architektur und Morphologie der Matrix, in der die Zellen leben (Flemming, 2002). Flemming (2002) bezeichnet die EPS dementsprechend treffend als das „Haus“ der Mikroorganismen. Man nimmt an, dass der frühe Beginn der Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen dazu dient, die Bakterien bzw. Mikroorganismen fest im Zellverband der Mikrokolonien zu fixieren und für die stabile Aufrechterhaltung der Biofilme im Verlauf ihrer Alterung zu sorgen (Flemming, 2001).

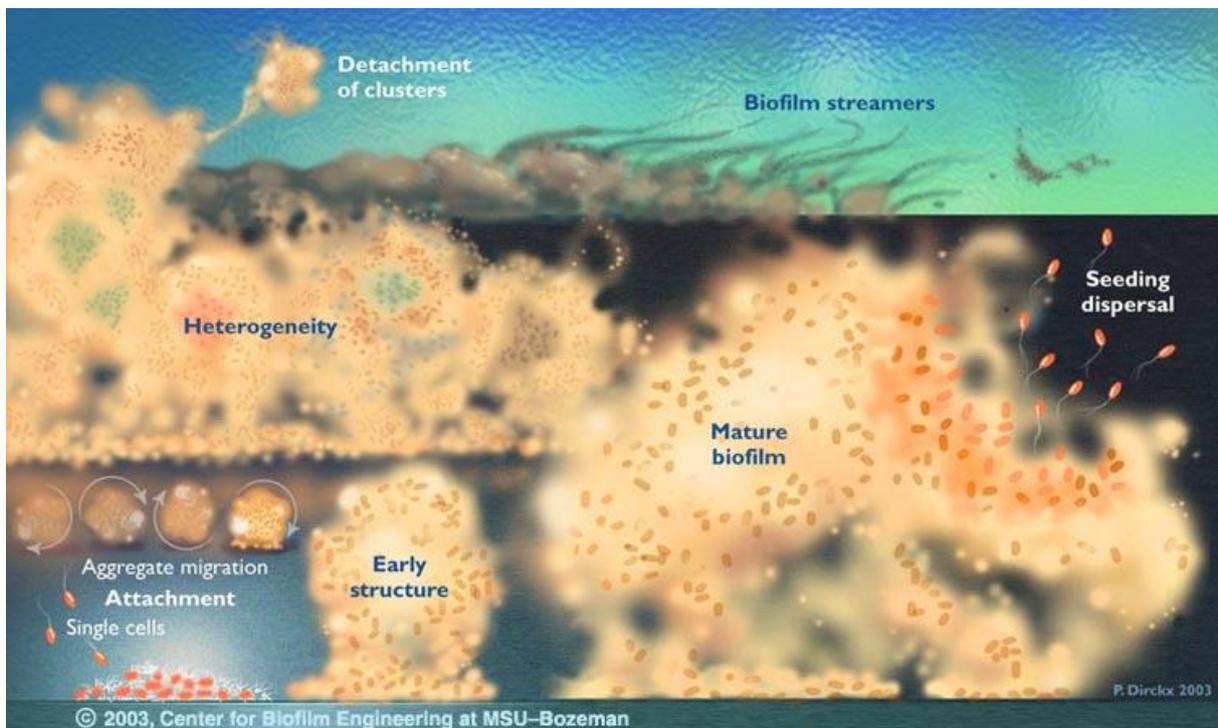


Abbildung 4: Strukturabbildung eines Biofilms (übernommen von Costerton (2007)), mit freundlicher Genehmigung des Montana State University Center for Biofilm Engineering). Im Vordergrund ist der Lebenszyklus eines Biofilmes dargestellt. Im mittleren Bereich sind die Heterogenität der bakteriellen Aktivität, chemische Mikrokosmen und die Bildung von Mikrokolonien dargestellt. Im Hintergrund erkennt man ebenfalls die heterogene Struktur zusammen mit „Biofilm-Streamern“ und dem Ablösen von kleinen Biofilmmetzen.

„Reife“ Biofilme („Mature biofilm“) zeichnen sich durch ihre sehr komplexe, heterogene Struktur aus. Diese heterogene Struktur ist im mittleren Teil der Abbildung 4 nochmals schematisch dargestellt. Die rötlich oder grünlich eingefärbten Bereiche zeigen dabei verschiedene Mikronischen auf, in denen speziell auf die dort herrschenden Bedingungen angepasste Mikroorganismen leben. Diese Mikronischen sind durch die dort herrschenden speziellen Umgebungsbedingungen charakterisiert. Dabei kann es sich z.B. um anaerobe Zonen oder spezielle pH-Bereiche im Biofilm handeln, welche besonders vor dem Hintergrund der Bioreduktion bzw. Biopräzipitation von Schwermetallen wie Uran interessant

sind. In „reifen“ Biofilmen entwickelt sich zunehmend ein Gleichgewicht zwischen der Biofilmneubildung und der Ablösung (Flemming, 2001). Einzelne Mikroorganismen werden kontinuierlich durch Strömung und Scherkräfte aus dem Biofilm herausgelöst oder es werden zum Teil auch ganze Biofilmfetzen abgetrennt (Abbildung 4, „Detachment of clusters“). Flemming (2001) fand sogar Hinweise darauf, dass einzelne Bakterienzellen eines Biofilmverbandes den Biofilm als Schwärmerzellen aktiv verlassen können, um anderswo erneut mit der Besiedlung von Oberflächen zu beginnen (Abbildung 4, „seeding dispersal“).

Die Strömung der wässrigen Phase kann weiterhin zur Ausbildung von sogenannten „Biofilm streamers“ (Hintergrund, Abbildung 4), zu Verwirbelungen der Biofilmstruktur sowie zur Migration ganzer Biofilmkolonien („Aggregate migration“) führen, wenn diese in ihrer Größe noch nicht zu komplex sind.

2.3. Zu den Wechselwirkungen von Uran mit Mikroorganismen und Biofilmen

Die Forschungen zu Wechselwirkungen von Schwermetallen mit Mikroorganismen haben in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Die Möglichkeit des Einsatzes von geeigneten Mikroorganismen zur Bioakkumulation von einzelnen Schadstoffen bzw. Schwermetallen zur Reinigung von kontaminierten Wässern und Gebieten steht dabei zunehmend im Mittelpunkt. Inzwischen sind bereits diverse Artikel über Forschungsarbeiten zu Wechselwirkungen von den verschiedensten Schwermetallen und den unterschiedlichsten Mikroorganismen veröffentlicht (Volesky und Holan, 1995). Wurden zunächst hauptsächlich verschiedene Bakterienarten hinsichtlich ihrer Eignung zur Bioakkumulation von Schwermetallen untersucht, sind seit einiger Zeit auch andere Mikroorganismen wie Hefen, Pilze, Algen und sonstige kleine Eukaryoten im Fokus solcher Studien. Auch speziell für die Wechselwirkungen von Uran mit diversen Mikroorganismen existieren inzwischen verschiedene Studien.

Bei den Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Uran unterscheidet man grundlegend vier verschiedene Prozesse, welche bei einer möglichen Immobilisierung des Urans beteiligt sein können. Diese sind die Bioakkumulation, die Biosorption, die Biokristallisation und die Bioreduktion (Francis, 1998) und sind in Abbildung 5 einmal schematisch dargestellt.

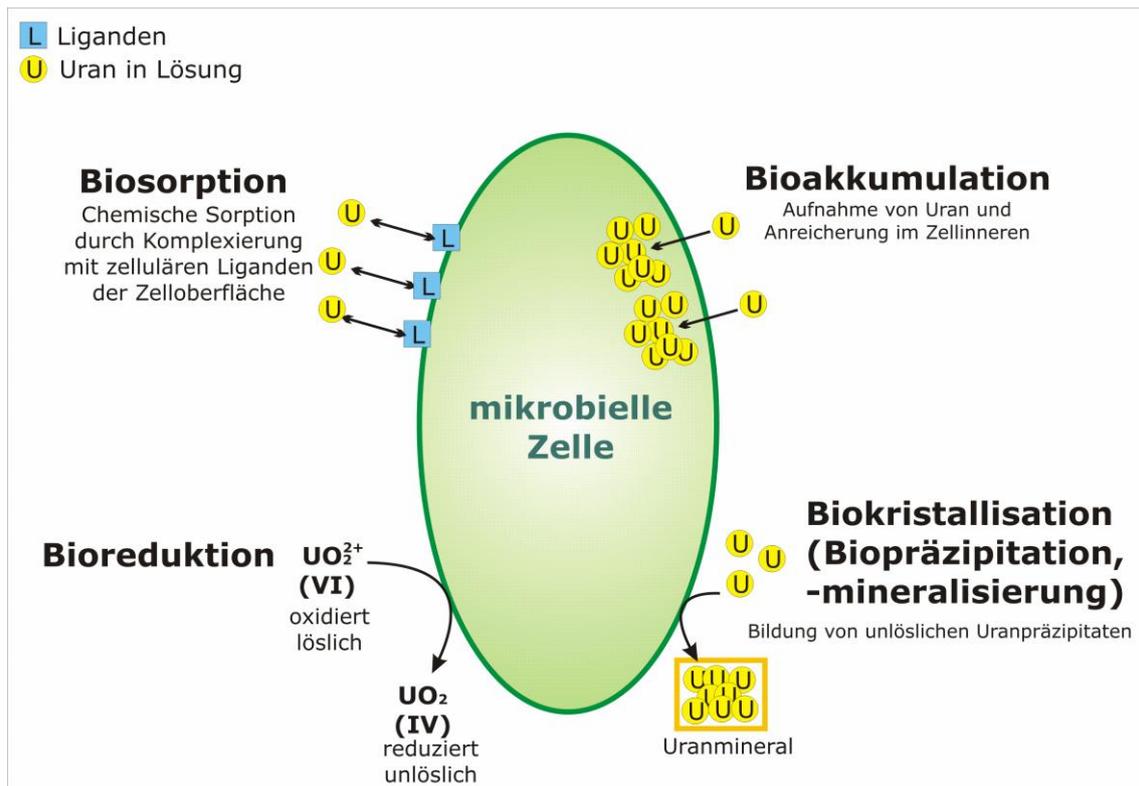


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Uran mit mikrobiellen Zellen

Die Übergänge zwischen diesen Prozessen sind fließend. Während die Bioakkumulation meist eine aktive Aufnahme in das Zellinnere von lebenden Zellen bedeutet, wie z.B. für *Sulfolobus acidocaldarius* nachgewiesen wurde (Reitz et al., 2011), findet bei der Biosorption meist nur eine passive chemische Bindung des Urans an funktionellen Gruppen der äußeren Zellmembran statt. Nakajima und Sakaguchi (1986) untersuchten 83 verschiedene Mikroorganismenspezies, darunter Bakterienarten, Pilze und Hefen, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aufnahme von Uran. Besonders hohe Uranabsorptionen fanden sie für die Bakterienspezies *Pseudomonas stutzeri*, für den Pilz *Neurospora sitophila* sowie für die zwei Aktinomyzetenarten *Streptomyces albus* und *Streptomyces viridochromogenes*. Auch für diverse Algenarten konnte bereits die Biosorption von Uran nachgewiesen werden, wie z.B. für die Spezies *Chlorella vulgaris* (Vogel et al., 2010).

Bei der Biokristallisation, welche auch Biopräzipitation oder Biomineralisierung genannt wird, handelt es sich um die Bildung von Uranpräzipitaten bzw. Mineralen ausgelöst durch mikrobiellen Stoffwechsel und Wechselwirkungen mit den Metaboliten (Francis, 1998). Diese Form der Uranimmobilisierung wurde zum Beispiel bereits für die Spezies *Bacillus sphaericus* JG7B und *Sphingomonas sp.* S15S1 (Merroun et al., 2011) sowie für *Pseudomonas aeruginosa* J007 (Choudhary und Sar, 2011) als kristalline Uranablagerungen im Bereich der Zellwände nachgewiesen.

Die Bioreduktion beruht auf der Umwandlung eines Elements von einer höheren zu einer niedrigeren Oxidationsstufe. Diese Umwandlung beeinflusst auch die Löslichkeit und kann

zur Präzipitation und somit zur Immobilisierung des Elementes führen. Die Möglichkeit der mikrobiell induzierten Reduktion von Uran(VI)-Verbindungen zu Uran(IV)-Verbindungen wird in der Literatur intensiv diskutiert und ist bereits für verschiedene Spezies untersucht und nachgewiesen. Uran(VI)-Verbindungen sind, wie bereits beschrieben, unter natürlichen Bedingungen meist sehr gut löslich und damit sehr mobil. Uran(IV)-Verbindungen sind im Gegensatz dazu unter natürlichen Bedingungen eher schwer löslich und präzipitieren. Daher wird die mikrobielle Uran(VI)-Reduktion als Möglichkeit Uran aus kontaminierten Wässern und Böden zu entfernen in Betracht gezogen (Lovley, 1993). Hierzu wurden besonders von Lovley und seinen Mitarbeitern grundlegende Studien publiziert. Sie konnten z.B. für die Spezies *Desulfovibrio desulfuricans* (Lovley und Phillips, 1992) und *Geobacter metallireducens* GS-15 (Gorby und Lovley, 1992) in Flüssigkulturversuchen die Uranreduktion zu biogenem Uraninit nachweisen.

In ersten Studien wurden vielfach nur reine im Labor angezogene Kulturen in Form von Zellsuspensionen untersucht, doch inzwischen werden zunehmend auch Biofilme der zu untersuchenden Mikroorganismen für die Experimente eingesetzt. Reinkulturen verhalten sich im Biofilmverband anders als in Flüssigkultur. Zum Beispiel die anoxischen Bereiche innerhalb von Biofilmen können eine wichtige Rolle für mögliche Bioreduktionsprozesse spielen und existieren in Zell-Suspensionen nicht. Auch die EPS-Matrix, welche den Biofilmverband zusammenhält, ist eine wichtige Komponente hinsichtlich der Biosorption von gelösten und partikulären Substanzen aus dem Medium. Partikuläres Material kann in der zähen EPS-Matrix festgehalten werden und gelöste Substanzen finden in den EPS zahlreiche funktionelle Gruppen von z.B. Proteinen und Zuckern zur Wechselwirkung. Beyenal et al. (2004) untersuchten die Uran-Immobilisierung durch Sulfat-reduzierende Biofilme der Spezies *Desulfovibrio desulfuricans* G20 und konnten dabei die enzymisch induzierte Präzipitation und die chemische Reduktion des löslichen U(VI) zu unlöslichem Uraninit nachweisen. Weiterhin existieren auch bereits einige Studien zu den Wechselwirkungen von Multispezies-Biofilmen und Uran (Großmann et al., 2007, Krawczyk-Bärsch et al., 2008). Diese sehr umweltnahen Experimente beziehen sich jedoch auf komplexe Systeme und eine genaue Aufklärung der Mechanismen ist hier sehr schwer. Zudem sind solche Multispezies-Systeme nahezu nicht vergleichbar, denn jeder Biofilm ist etwas anders aufgebaut und so einzigartig in seinem Verhalten gegenüber Schwermetallen, dass nur generelle Erkenntnisse aus diesen Versuchen abgeleitet werden konnten.

Doch trotz der Vielfalt an Studien zu Wechselwirkungen von Mikroorganismen sowie Biofilmen und Uran fehlt es noch an dem grundsätzlichen Verständnis der Abläufe. Bekannt ist, dass das Uran sehr speziesspezifisch akkumuliert, sorbiert, präzipitiert und/oder reduziert wird. Viele Studien wurden jedoch unter nicht umweltrelevanten Bedingungen durchgeführt, d.h. in Zellflüssigkulturen, im neutralen pH-Bereich und unter idealen Wachstums-

bedingungen. Die realen Vorgänge in der Natur sind jedoch meist deutlich von den Laborbedingungen verschieden und viel komplexer und sollten daher zunehmend im Fokus für die Studien von Wechselwirkungen von Uran und Mikroorganismen stehen.

Aus den bisher angeführten Grundlagen zu Uran und Biofilmen ist zu entnehmen, dass die Aufklärung der Wechselwirkungen von Uran mit Mikroorganismen und Biofilmen tiefer gehende Untersuchungen notwendig macht. Dabei sollte der Einsatz einer neuen bildgebenden, orts aufgelösten Technik zur chemischen Charakterisierung, kombiniert mit altbewährten Analysemethoden, neue Einblicke in die Abläufe der Uranakkumulation an Zellen sowie innerhalb komplexer Biofilme ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese kombinierte Analytik mittels fluoreszenzanalytischen und (elektronen)mikroskopischen Methoden durchgeführt werden. Ein kurzer theoretischer Abriss der eingesetzten Methoden ist im Folgenden dargestellt.

2.4. Spektroskopische und mikroskopische Methoden zur Bestimmung der Uranlokalisation und Uranspeziation

Für die chemische Analytik von Uran können heutzutage, in Abhängigkeit der Zielstellung der Analyse, verschiedenste Methoden eingesetzt werden. Zur Bestimmung der totalen Urankonzentration werden zum Beispiel optische Emissionsspektrometrie (ICP-OES) oder Massenspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-MS) eingesetzt. Auch die Analyse des Urans mittels Alpha-Spektrometrie ist möglich, wobei bei dieser Methode die ionisierenden Eigenschaften des Urans genutzt werden. All diese Methoden weisen eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber geringen Urankonzentrationen auf, erlauben jedoch keine Aussagen über den chemischen Zustand oder die Lokalisation des Urans in der Probe. Um auch qualitative Aussagen zur Speziation des Urans innerhalb der Probe treffen zu können, finden vor allem spektroskopische Methoden, wie UV/VIS-, Fluoreszenzemissions-, Schwingungs- sowie Röntgenadsorptionsspektroskopische Methoden verstärkter Einsatz. Diese spektroskopischen Methoden können Aufschluss über die Art der gebildeten Uranspezies sowie deren charakteristische Struktur geben.

Die UV/VIS-Spektroskopie ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse z.B. hinsichtlich der verschiedenen Oxidationsstufen des Urans. Probleme zeigt die Methode jedoch für biologische Proben, da das Spektrum stark durch die Probenbiologie beeinflusst wird. Zudem weist diese Methode generell für natürliche Proben ungünstige Nachweisgrenzen ($10^{-4} - 10^{-5}$ M Uran(VI)) auf.

Mit Hilfe von EXAFS (extended X-ray absorption fine structure; kantenferne Feinstruktur des Röntgenabsorptionsspektrums), als spezielle Technik der Röntgenadsorptionsspektroskopie, können Informationen über Bindungs- und Koordinationsverhältnisse des komplexierten Uran(VI)atoms erhalten werden. Diese Methode ist jedoch durch eine intensive Probenpräparation, eine sehr zeitaufwendige Messung und durch vergleichbar hohe Kosten geprägt.

Schwingungsspektroskopische Messmethoden des Uran(VI), wie Raman- oder Infrarotspektroskopie, basieren auf der Detektion der symmetrischen (Raman-aktiv) bzw. antisymmetrischen (IR-aktiv) Streckschwingung des Uranylions (UO_2^{2+}) bzw. auf Detektion der charakteristischen Verschiebung der Schwingungsfrequenz durch Komplexierung des Uranyl(VI)ions mit Liganden. Dabei können strukturelle Aussagen über die vorhandene Uran(VI)spezies getroffen werden. Diese schwingungsspektroskopischen Messmethoden werden jedoch ebenfalls stark von vorhandener Probenbiologie beeinflusst, da die meisten organischen Moleküle starke Schwingungen aufweisen können. Daher sind diese Messtechniken in erster Linie für Modellsysteme bekannter Zusammensetzung geeignet und

nur begrenzt für natürliche Proben.

Als eine sehr sensitive Methode zur Analyse von Uran(VI)-Spezies zeigt sich die laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) (bis $< 10^{-7}$ mol/l). Die Emissionsbanden zeichnen sich durch gut definierte, schmale, charakteristische Maxima aus, deren Bandenlagen Spezies-abhängig und –spezifisch sind. Problematisch ist auch bei der Fluoreszenzspektroskopie die Messung von stark heterogenen natürlichen oder naturnahen Mehrkomponentensystemen, da sich dabei verschiedene Fluoreszenzen der diversen Komponenten überlagern können. Durch zeitaufgelöste Aufnahme der Fluoreszenzspektren (TRLFS) ist es jedoch möglich den Einfluss der Probenbiologie auf die Detektion der Uranspektren zu mindern. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen sollen daher in dieser Arbeit die Basis der Uranspeziesanalysen bilden.

Eine Visualisierung des Urans zur Lokalisierung innerhalb einer Probe ist bisher mittels verschiedener mikroskopischer Methoden durchführbar. Elektronenmikroskopische Methoden (Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bzw. Rasterelektronenmikroskopie (REM)) bieten dabei in Kombination mit den Spektroskopie-Techniken EDX (Energie-dispersiven Röntgenspektroskopie) bzw. EELS (electron energy loss spectroscopy) gute Möglichkeiten Uran mit höchster mikroskopischer Auflösung innerhalb der Probe zu visualisieren. Nachteile sind hier jedoch, dass meist keine genauen Aussagen zur Speziation des Urans erhalten werden und dass die Messung im Hochvakuum stattfindet, was eine intensive Probenpräparation und –entwässerung voraussetzt. Diese Methoden sind daher sehr stark probeninvasive Analysetechniken.

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Urans bietet sich die Anwendung von fluoreszenzmikroskopischen Techniken an. Mit der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie ist eine dreidimensionale Einordnung der Uranakkumulationen in der Probenstruktur möglich. In Kombination mit der Fluoreszenzspektroskopie kann diese Methode weiterhin Informationen zur Speziation des Urans innerhalb von Proben liefern. Aufgrund des Vorteils einer kombinierten Messmethode aus orts aufgelöster Mikroskopie und chemischer Analytik soll der Schwerpunkt der Analysen in dieser Arbeit auf dieser Technik beruhen.

Die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenzeigenschaften des Urans sowie der fluoreszenzspektroskopischen bzw. –mikroskopischen Techniken werden im Folgenden näher erläutert.

2.4.1. Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie des Urans

Grundlagen der Fluoreszenz

Bei der Emission von Licht aus einem elektronisch angeregten Zustand spricht man von Lumineszenz. Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind zwei Erscheinungsformen der Lumineszenz, welche abhängig von den physikalischen Eigenschaften des angeregten Zustandes auftreten. Bei der Fluoreszenz wird spontan Licht emittiert, wenn ein elektronisch angeregtes System zurück in den Zustand niedriger Energie übergeht. Die Anregung eines Systems geschieht z.B. wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül trifft und dabei Photonen absorbiert werden wodurch Elektronen des Moleküls in ein energetisch höheres Orbital gehoben werden. Wenn die Elektronen anschließend wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurückfallen wird die freiwerdende Energie in Form von Wärme und Fluoreszenzlicht abgegeben. Auf Grund der Teilung der abgegebenen Energie in Wärme und Licht besitzt das ausgesandte Fluoreszenzlicht stets weniger Energie als das Anregungslicht und ist daher zu größeren Wellenlängen hin verschoben (Rotverschiebung oder Stokes-Verschiebung). Während die Aussendung von Fluoreszenzlicht nach Beendigung der Bestrahlung in Bruchteilen einer Sekunde abklingt, kommt es bei der Phosphoreszenz zu einem sehr langen Nachleuchten, welches sogar über Stunden anhalten kann. Die energetischen Abläufe bei der Anregung der Moleküle zu Fluoreszenz oder Phosphoreszenz werden am anschaulichsten in einem Jablonski-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 6). In Abbildung 6 werden die Energieübergänge zwischen dem energetischen Grundzustand S_0 und zwei verschiedenen angeregten Zustandsniveaus S_1 und S_2 dargestellt. Jeder dieser Energiezustände unterteilt sich erneut in verschiedene Schwingungsenergieniveaus ($0 \dots n$). Durch die Absorption von Lichtquanten ($h\nu_A$) wird ein Elektron vom energetischen Grundzustand S_0 (S = Singulett-Zustand) in die angeregten Zustände S_1 oder S_2 angehoben. Dieser Prozess wird durch die senkrecht nach oben zeigenden violetten (Anregung bis in S_2) und blauen (Anregung bis in S_1) Pfeile dargestellt. Das Zurückfallen der Elektronen auf niedrigere Energiezustände wird mit senkrechten nach unten zeigenden Pfeilen dargestellt. Abgesehen von einigen seltenen Ausnahmen, springen die Elektronen, welche auf höhere Schwingungsniveaus des S_1 oder S_2 Energiezustandes angeregt wurden, durch interne Umwandlung oder Schwingungsrelaxation (dargestellt als gestrichelte violette bzw. blaue senkrecht nach unten zeigende Pfeile) sehr schnell innerhalb von 10^{-12} s oder weniger auf das niedrigste Schwingungsniveau $n = 0$ des S_1 Energiezustandes (Lakowicz, 2006). Die Fluoreszenzemission findet generell von einem thermisch ausgeglichenen angeregten Zustand ($S_{1,0}$ Energiezustand) aus statt (Lakowicz, 2006). Die Rückkehr zum energetischen Grundzustand S_0 findet meist zu einem der höher angeregten Schwingungsniveaus ($S_{0,n}$) statt, und erreicht anschließend sehr schnell (10^{-12} s) das

thermische Gleichgewicht.

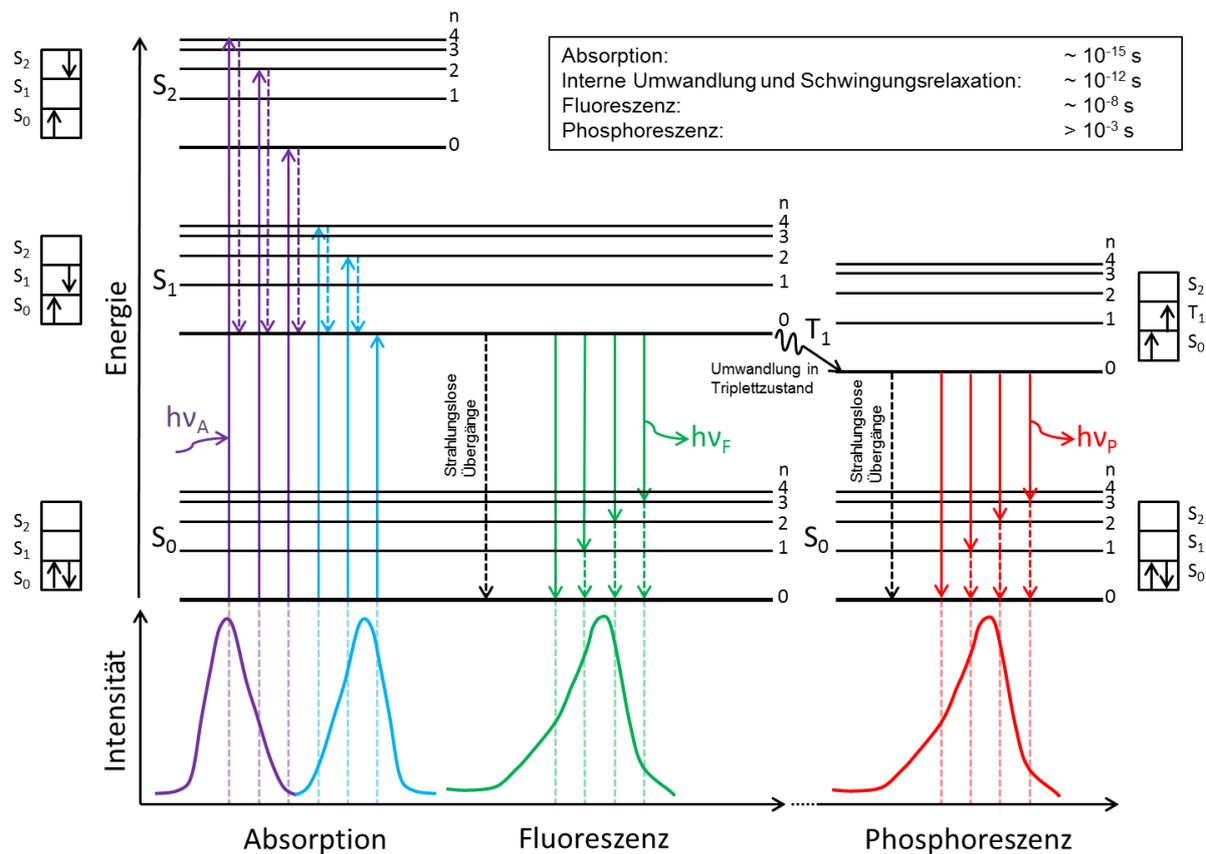


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm nach Visser und Rolinski (Download am 20.05.2013) und Lakowicz (2006)

Angeregte Moleküle im S_1 Energiezustand können auch in den angeregten Tripletzustand (T_1) umgewandelt werden. Diese Umwandlung, welche in der Literatur meist als „Intersystem crossing“ bezeichnet wird, entsteht durch Spin-Umkehr. Die Rückkehr vom Zustand T_1 zum Grundzustand S_0 ist im Vergleich zu den Abläufen bei der Fluoreszenz erschwert, da hier zunächst eine erneute Spin-Umkehr erfolgen muss. Die resultierende Lichtemission erfolgt daher zeitlich verzögert und wird als Phosphoreszenz bezeichnet (Böcker, 1997). Die Phosphoreszenz-Emission ist im Vergleich zur Fluoreszenz generell zu höheren Wellenlängen (energieärmer) verschoben (Lakowicz, 2006).

Fluoreszenzeigenschaften des Urans

Von allen Actinidenionen ist die vollständig oxidierte Form des Urans, das Uranyl(VI)-Ion (UO_2^{2+}), am detailliertesten untersucht und beschrieben (Natrajan, 2012). Da U(VI) die am häufigsten in der Natur vorkommende Oxidationsstufe des Urans darstellt, spielt diese eine sehr wichtige Rolle bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens in der Umwelt. Die fotophysikalischen Eigenschaften von Mineralien und Substanzen, welche Uranyl(VI)

enthalten sind recht außergewöhnlich. Viele U(VI)-Minerale sind leuchtend gelb, grün oder orange gefärbt (Hanchar, 1999). Diese Eigenschaft wurde schon in vielfältiger Weise genutzt, wobei die Färbung von Gläsern und Keramiken wohl die bekannteste Anwendung der fluoreszierenden Eigenschaft von Uran(VI)-haltigen Mineralen und Substanzen ist. Die Eigenschaft des Urans durch Anregung mit UV-Licht Fluoreszenzlicht zu emittieren wird auch für fluoreszenzspektroskopische und mikroskopische Analysen in der Forschung eingesetzt. Dabei werden neben den Fluoreszenzeigenschaften der sechswertigen Oxidationsstufe auch zunehmend die der vier- und fünfwertigen Oxidationsstufen untersucht. Da in der vorliegenden Arbeit vorwiegend die Wechselwirkungen mit sechswertigem Uran von Interesse sind, soll auf die U(VI)-Fluoreszenz in diesem Kapitel näher eingegangen werden. Die Fluoreszenzeigenschaften der beiden weiteren Oxidationsstufen des Urans mit fluoreszierenden Eigenschaften werden daher im Folgenden nur am Rande mitbetrachtet. Je nach Oxidationsstufe des Urans zeigen sich charakteristische Anregungs- und Emissionsmaxima. Einen Überblick über die Absorptionsbanden der vier-, fünf- und sechswertigen Oxidationsstufe gibt das Diagramm in Abbildung 7.

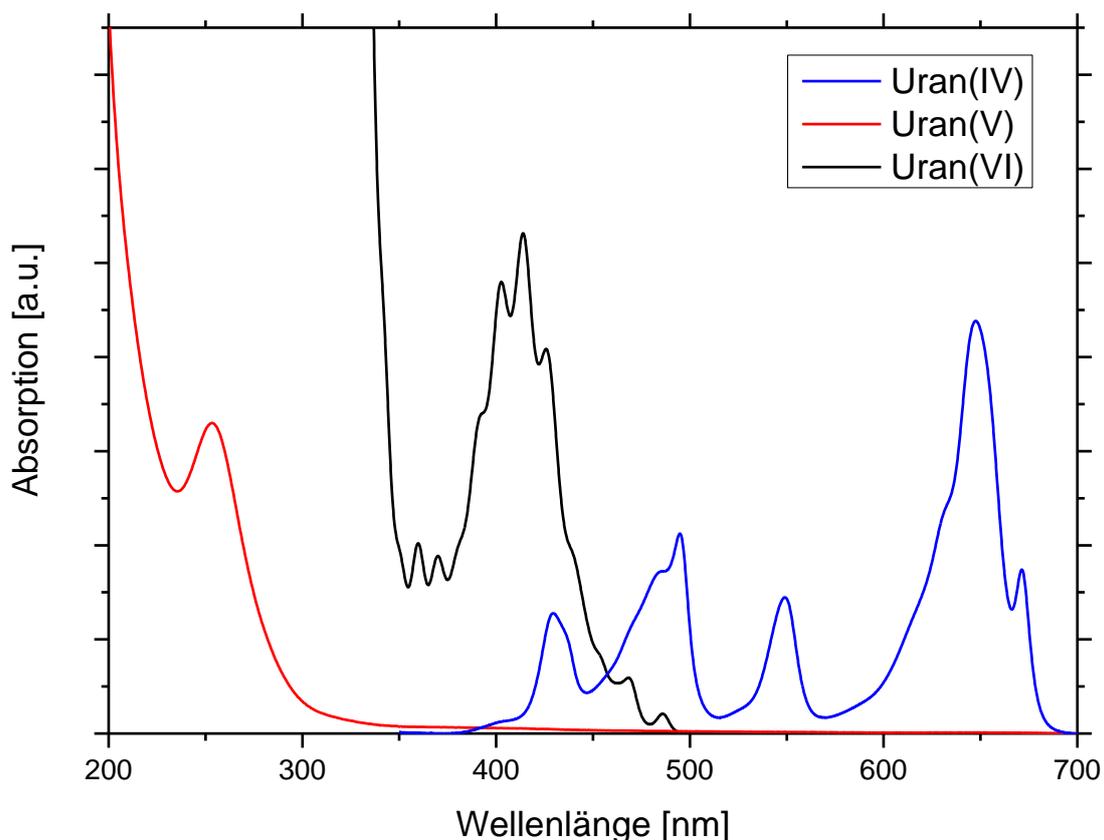


Abbildung 7: Absorptionsspektren von Uran(IV), (V) und (VI) aus Steudtner (2010)

Wie experimentelle Untersuchungen zeigten scheint die Besetzung des ersten energetisch angeregten Zustandes (S_1) häufig effizienter via Anregung höherer angeregter

Zustände und anschließender Schwingungsrelaxation bzw. interner Umwandlung als via direkter Anregung (Meinrath, 1997). Im Fall des aquatischen Uranylions ist die direkte Anregung durch Absorption von Licht im Wellenlängenbereich von (500-300) nm ein sehr langsamer Prozess verglichen zur intensiven Anregung durch Licht im UV-Wellenlängenbereich (Meinrath, 1997). Eine Zusammenstellung der bisher in fluoreszenzspektroskopischen bzw. fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen angewandten optimalen Anregungswellenlängen für die zwei stabilen Oxidationsstufen +4 und +6 sowie für die metastabile Stufe +5 ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Anregungswellenlängen für Uranverbindungen in Abhängigkeit vom Oxidationszustand

Oxidationsstufe	Anregungswellenlängen	Referenzen
+4	245 nm	(Kirishima et al., 2004)
+5	255 nm	(Steudtner et al., 2006, Großmann et al., 2009a)
	408 nm	(Großmann et al., 2009a)
+6	266 nm	(Bernhard et al., 1998, Billard et al., 2003)
	270 nm	(Geipel et al., 1996)
	407 nm	(Chisholm-Brause et al., 2001)
	415 nm	(Chang et al., 2006)
	420 nm	(Elzinga et al., 2004)
	430 nm	(Kowal-Fouchard et al., 2004)

Das Fluoreszenzemissionsspektrum des aquatischen Uranylions resultiert aus dem Zurückfallen der angeregten Elektronen ausgehend von zwei verschiedenen angeregten Energiezuständen in mindestens fünf verschiedene Schwingungsniveaus des Grundzustandes (Bell und Biggers, 1968). Abbildung 8 stellt den Absorptions- und Emissionsvorgang für das aquatische Uranyl(VI)ion in Form eines Term-Schemas anschaulich dar. Je nach Wellenlänge des anregenden Lichtes wird das Uranyl(VI)ion in unterschiedliche energetische Anregungszustände gehoben. Das sichtbare und ultraviolette Absorptionsspektrum des aquatischen Uranyl(VI)ions besteht aus 24 Einzelbanden (nicht im Einzelnen in der Abbildung dargestellt), welche wiederum in sieben Hauptbandengruppen eingeteilt werden (Bell und Biggers, 1968). Durch strahlungslose Übergänge erreicht das Uranyl(VI)ion zunächst Energieniveaus etwas niedrigerer Energie (entsprechen 21270 cm^{-1} und 20502 cm^{-1}), bevor Übergänge in den Grundzustand unter Emission von Fluoreszenzlicht erfolgen. Beim Übergang vom Energieniveau mit 21270 cm^{-1} in den Grundzustand wird nur eine Fluoreszenzlinie (470 nm) ausgesandt, was lediglich 4,66 % der insgesamt emittierten Energie ausmacht (Bell und Biggers, 1968). Vom Energieniveau mit 20502 cm^{-1} ausgehend werden durch Übergang in die fünf Schwingungsniveaus des Grundzustandes fünf verschiedene Fluoreszenzbanden (488 nm, 509 nm, 533 nm, 558 nm, 585 nm) erzeugt.

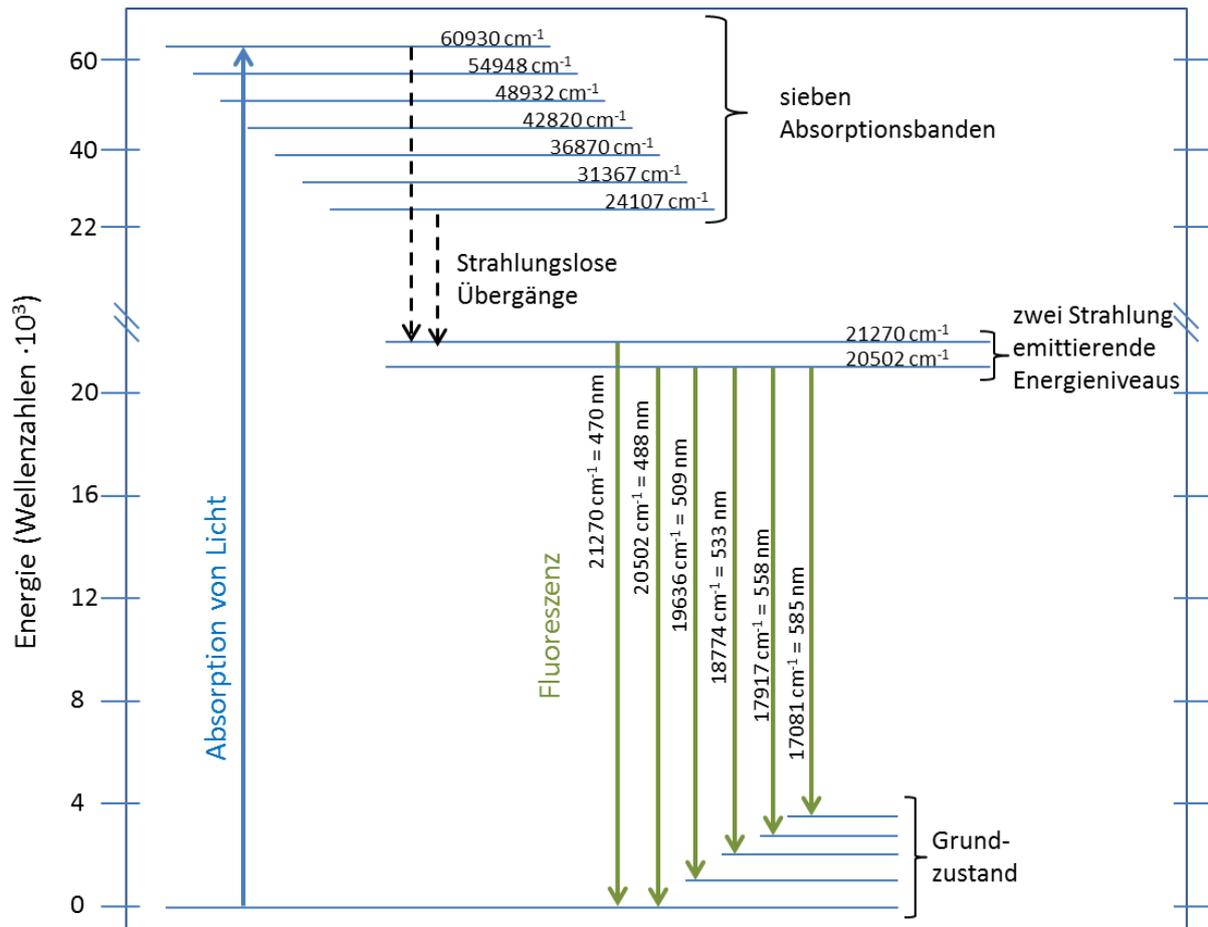


Abbildung 8: Termschema der Absorptions- und Emissionsübergänge des aquatischen Uranyl(VI)-ions nach Bell und Biggers (1968)

Das Aussehen des Emissionsspektrums sowie die Lage der Emissionsmaxima sind stark von der Oxidationsstufe des Urans abhängig. Abbildung 9 zeigt die typischen Emissionsspektren für aquatische Lösungen von Uran(IV), (V) und (VI) bei einer entsprechenden Anregung im UV-Wellenlängenbereich. Während das Fluoreszenz-emissionsspektrum von sechswertigem Uran durch die Ausprägung von sechs charakteristischen Banden beschrieben wird, zeigt die Emission von Uran (IV) mindestens 10 Emissionsbanden, welche alle vom gleichen Energieniveau ausgesendet werden (Kirishima et al., 2003). Das Emissionsspektrum von fünfwertigem Uran wird dahingegen nur von zwei charakteristischen Banden beschrieben (Stedtner et al., 2006).

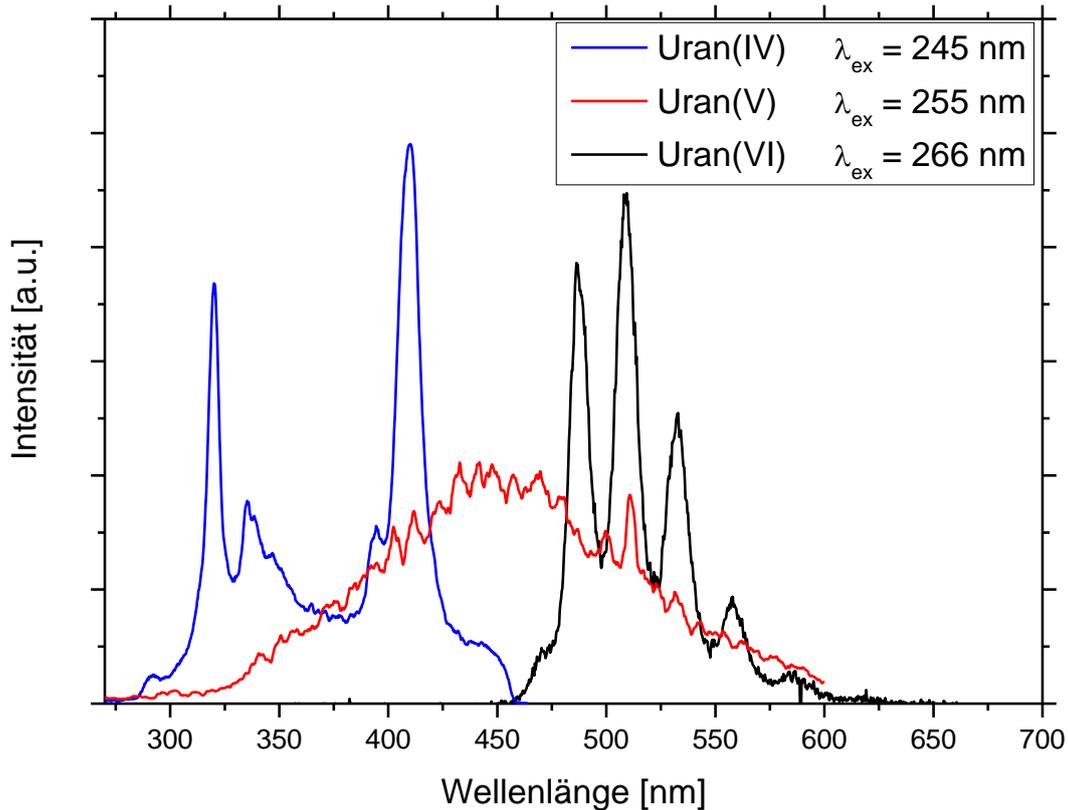


Abbildung 9: Emissionsspektren von Uran(IV), (V) und (VI) nach Steudtner (2010) und Steudtner et al. (2006)

Die Lage der Emissionsbandenmaxima wird zudem durch die chemische Umgebung des Uranylions beeinflusst und kann somit nicht als fest angesehen werden. Je nach Zusammensetzung der chemischen Umgebung können Emissionsmaxima zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen hin verschoben sein oder die Ausprägungen einzelner Banden vermindert werden. Einen kurzen Überblick über den Einfluss der chemischen Umgebung auf die Bandenmaxima gibt Tabelle 5. Diese Tabelle zeigt anhand der starken Abweichungen in den Peaklagen der Minerale im Vergleich zu denen vom aquatischen Uranyl(VI)ion den Einfluss der chemischen Umgebung auf die Fluoreszenzemission.

Neben den Emissionspeakbandenlagen ist die Fluoreszenzlebenszeit (die Abklingzeit der Fluoreszenzlichtemission nach der Anregung) ein wichtiger Parameter bei Fluoreszenzmessungen von Uranverbindungen. Die Fluoreszenzemissionen des Urans zeichnen sich, ähnlich wie bei den meisten fluoreszierenden Schwermetallen, durch sehr lange Lebensdauern aus. Diese Fluoreszenzlebensdauern liegen für Uranverbindungen im Mikrosekundenbereich. Durch zeitaufgelöste Messungen von natürlichen Systemen kann die Fluoreszenz des Uranyl-Ions (UO_2^{2+}) leicht von der Fluoreszenz von organischen Substanzen durch seine deutlich längere Fluoreszenzlebenszeit abgegrenzt werden. Im Vergleich zum Mikrosekundenbereich der Fluoreszenzlebenszeiten von Uranylverbindungen weisen die Fluoreszenzemissionen von organischen Substanzen in der Regel Lebensdauern

im ns-Bereich auf (Meinrath, 1998). Des Weiteren lassen sich aus der Messung von Fluoreszenzlebenszeiten Aussagen über die Anzahl vorhandener Uranspezies in einem System treffen.

Tabelle 5: Einfluss der chemischen Umgebung des Uranions auf die Emissionsbandenlage am Beispiel des aquatischen Uranyl(VI)ions sowie von zwei mineralischen Uranverbindungen

Uranverbindung	Emissionsmaxima [nm]						Referenz
UO ₂ ²⁺	470,1	487,8	509,3	532,7	558,1	585,4	Bell und Biggers (1965)
Boltwoodit (K,Na)[UO ₂ SiO ₃ (OH)]·1,5 H ₂ O	485,1	501,5	521,2	543,0	567,4	591,4	Arnold und Baumann (2009)
Unterschiede zu UO ₂ ²⁺	+15,0	+13,7	+11,9	+10,3	+9,3	+6,0	
Compreignacit K ₂ (UO ₂) ₆ O ₄ (OH) ₆ ·7H ₂ O		500,7	516,1	532,4	554,3	591,4	Arnold und Baumann (2009)
Unterschiede zu UO ₂ ²⁺		+12,9	+6,8	- 0,3	-3,8	+6	

Methoden der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS, Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy) ist eine sehr sensitive und selektive analytische Methode für Uran und ist besonders interessant für Komplexierungs- und Speziationsstudien (Moulin et al., 1998). Mit dieser Technik sind die Aufnahme von Emissionsspektren und die Messung von Fluoreszenzlebensdauern routinemäßig möglich. Ein besonderer Vorteil für die Urananalytik ist, dass auch Proben mit sehr geringen Urankonzentrationen vermessen und hinsichtlich ihrer Speziation untersucht werden können (Meinrath, 1997).

Eine übliche Messapparatur für Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Probe, welche wenn sie in flüssiger Form vorliegt, in einer Quarzglasküvette vorbereitet wurde, wird durch einen Laserstrahl angeregt. Das Anregungslicht ist durch eine definierte Wellenlänge von schmaler Bandbreite charakterisiert. Im 90° Winkel zum eintreffenden Laserlicht wird anschließend das emittierte Fluoreszenzlicht abgenommen und in einen Spektrographen geleitet und dort entsprechend der Wellenlängen zerlegt. Das zerlegte Licht wird von einem Detektor (CCD-Kamera oder PMT: photomultiplier tubes) aufgenommen, umgewandelt und als digitales Signal an die Auswerteeinheit weitergeleitet. Die zeitliche Abstimmung zwischen Aussendung des Laserpulses und der Aufnahme des Fluoreszenzspektrums in der Kamera wird für zeitaufgelöste Messungen durch einen Delaygenerator (Verzögerungsgenerator) gesteuert.

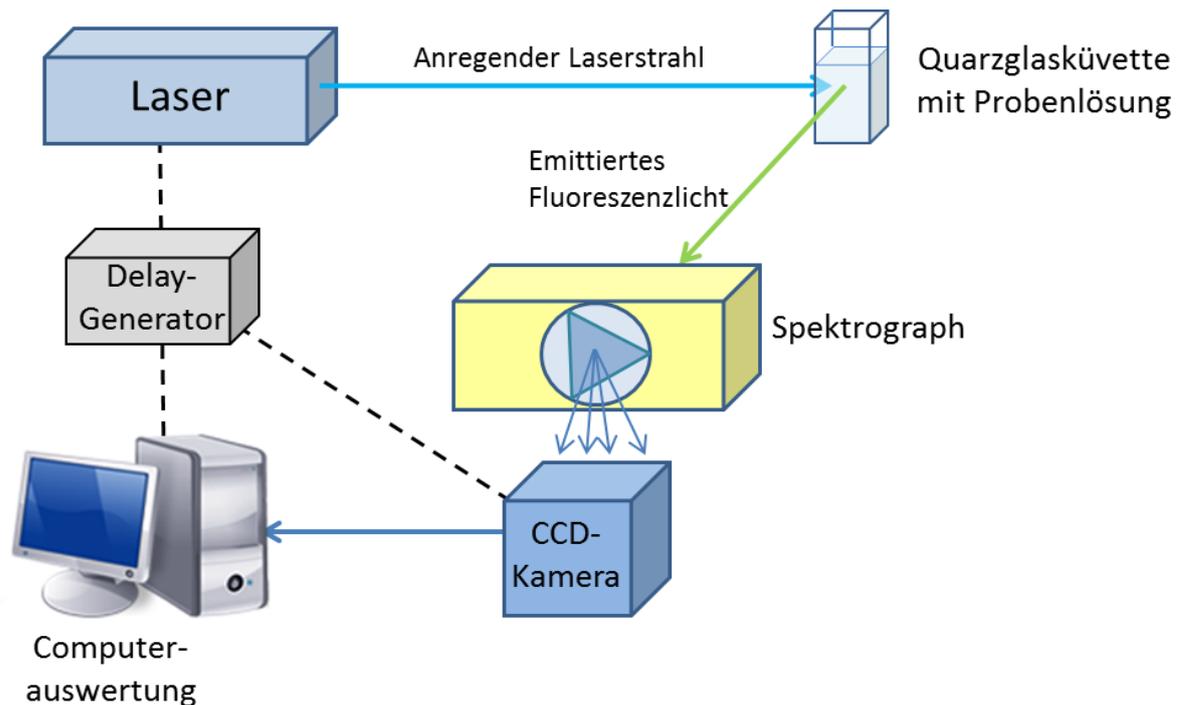


Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer fluoreszenzspektroskopischen Messanordnung für zeitaufgelöste Messungen

Ein Nachteil dieser Messtechnik ist jedoch die fehlende Ortsauflösung der Messung. Für homogene gelöste Proben stellt dies keinen Nachteil dar. Proben, die jedoch eine räumliche Heterogenität aufweisen, wie zum Beispiel immobilisierte Uranpartikel in Biofilmen, Akkumulationen in oder an mikrobiellen Zellen oder heterogen zusammengesetzte Mineralien, sind nur sehr schwierig mit dieser Messtechnik zu untersuchen. Aufgrund der fehlenden Ortsauflösung kann man nicht genau sagen, welcher Bereich der Probe gerade durch den Laser angeregt wird. Gerade bei biologischen Proben werden daher bei dieser Methode stets mehrere Zellen angeregt und man muss die Probe zunächst aufwendig im Laserstrahl ausrichten bis ein Optimum der Anregung erreicht wird. Ergebnisse dieser Messmethode sind daher stets als Mittelwert über größere Messbereiche (zum Beispiel mehrere bis zahlreiche mikrobielle Zellen) zu sehen. Eine Möglichkeit der Ortsauflösung für fluoreszenzspektroskopische Messungen ist die Kopplung mit einem handelsüblichen konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM: confocal laser scanning microscope).

2.4.2. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) des Urans

Die fluoreszierenden Eigenschaften der Uran(VI)verbindungen und –minerale können zu deren Lokalisation in Proben genutzt werden. So stellt die Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Messmethoden eine Möglichkeit dar, Uranpräzipitate und Anreicherungen in biologischen Proben wie z.B. Biofilmen zu lokalisieren und zu visualisieren. Die konfokale

Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) eignet sich hier besonders, da mit dieser Methode eine dreidimensionale Darstellung fluoreszierender Uranverbindungen in komplexen Probenstrukturen, wie sie in Biofilmen vorliegen, ermöglicht wird.

Methoden der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) kann im Gegensatz zur konventionellen optischen Mikroskopie einige besondere Vorteile aufweisen. Der wichtigste Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit optische Dünnschnitte durch eine „dicke“ Probe zu generieren. Die einzelnen optischen Schnitte, die bis zu 0,25 µm dünn sein können, stellen ausschließlich die Fokusebene dar und sind somit nicht unscharf oder gestört durch Licht aus Bereichen ober- oder unterhalb der Fokusebene (Hoppert, 2003). Durch das Zusammensetzen mehrerer optischer Dünnschnitte durch die Probe ist es möglich dreidimensionale Informationen von einer Probe zu erhalten ohne sie physikalisch bearbeiten, z.B. schneiden, zu müssen.

Ein CLSM ist generell eine Kombination aus einem traditionellen Epifluoreszenz-Mikroskop mit einer Laserlichtquelle, einer speziellen Ausstattung zum Abtasten und computergesteuerter Bildaufnahmesoftware (Lawrence und Neu, 1999). Der grundsätzliche Aufbau eines CLSM ist in Abbildung 11 dargestellt. Die meisten kommerziell erhältlichen konfokalen Laser-Scanning Mikroskope sind bereits mit einer Vielzahl von Lasern ausgestattet. Dabei sind sowohl Wellenlängen im UV-Bereich als auch im visuellen Bereich verfügbar. Diese Laserausstattung ermöglicht die Anregung eines breiten Spektrums von fluoreszierenden Substanzen und verschiedensten Fluoreszenzfarbstoffen. In den meisten Geräten sind die Laser über Glasfaserkabel mit dem Scankopf verbunden. Der Scankopf ist ein Bauteil mit galvanischen Spiegeln zum Abrastern der Probe mit dem Laserstrahl. Außerdem beinhaltet der Scankopf ein System an Spiegeln und Strahlteilern um das zurückkehrende Signal (Fluoreszenzlicht) zu den Fotomultipliern (PMT: photomultiplier tubes) zu leiten. Der Laserstrahl rastert dabei Punkt für Punkt und Linie für Linie des gewählten Bildbereiches ab und aus der detektierten Fluoreszenz wird ein Graustufenbild erzeugt. Mit der entsprechenden Software kann anschließend dem detektierten Fluoreszenzlicht eine entsprechende Darstellungsfarbe zugeordnet werden. Das Vorhandensein einer Lochblende (genannt Pinhole) im Strahlengang ermöglicht, dass ausschließlich Fluoreszenzlicht, welches von der fokussierten XY-Ebene kommt von den Fotomultipliern detektiert wird. Das Pinhole verhindert dabei, dass Fluoreszenzlicht aus einer Ebene über, unter oder neben dem fokussierten Bereich den Fotodetektor erreicht (Lawrence und Neu, 1999).

Das erzeugte Bild entsteht bei der CLSM grundsätzlich durch die Anregung von autofluoreszierenden oder fluoreszenzgefärbten Proben mittels Licht einer speziell gewählten

Wellenlänge und Detektion des ausgesandten Fluoreszenzlichtes. Das konfokale Bild ist dabei ein Abbild des reflektierten Fluoreszenzlichtes. Die Anwendung spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht in diesem Zusammenhang die Lokalisation von Strukturen, welche bei der gängigen Hellfeldmikroskopie unsichtbar bleiben (Hoppert, 2003).

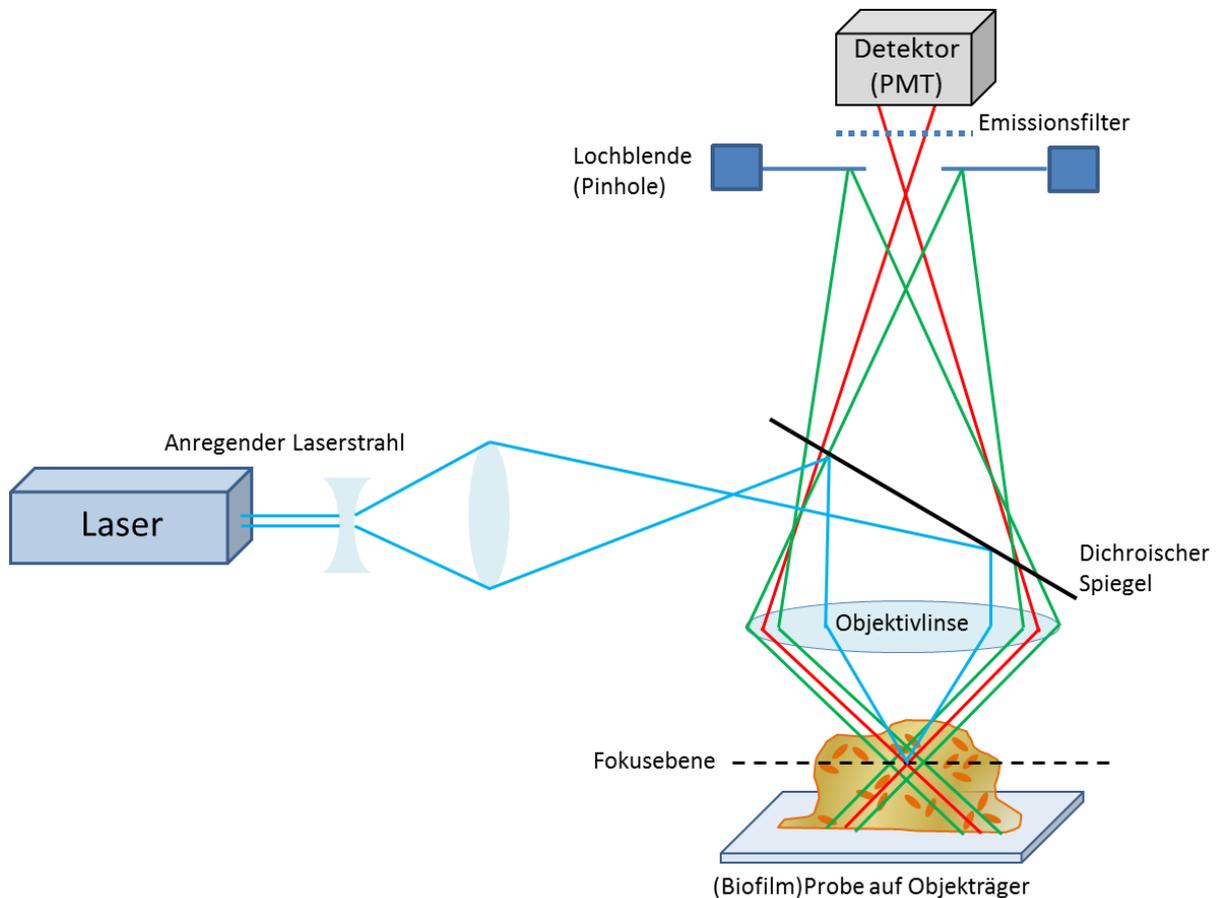


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops mit eingezeichnetem Strahlenverlauf

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Urans bedeutet diese Methode eine Möglichkeit der räumlichen Lokalisation von Präzipitaten und Akkumulationen ohne die Probenstruktur zerstören zu müssen, was speziell für die Untersuchung biologischer Proben, wie Biofilme, von Vorteil ist.

Ein Nachteil kommerzieller CLSM-Geräte ist jedoch, dass spektroskopische Daten über die Fluoreszenz der angeregten Proben nur mittels der geräteinternen Detektorsysteme aufgezeichnet werden können. Diese liefern jedoch für die spektroskopische Untersuchung von Fluoreszenzemissionen eine nur sehr geringe Auflösung sowie geringe Nachweisgrenzen und sind daher für die Untersuchung von z.B. Uran in Biosystemen nur begrenzt geeignet. Deshalb ist es sinnvoll, wenn die CLSM mit einem Messsystem der Fluoreszenzspektroskopie gekoppelt wird.

Kopplung der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) mit der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIFS)

Durch die Kopplung der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) mit der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) wie sie bei Großmann (2008) beschrieben wurde, ist es möglich Fluoreszenzen räumlich dreidimensional zu lokalisieren und zu visualisieren und gleichzeitig entsprechende fluoreszenzspektroskopische Daten zu detektieren. In Abbildung 12 wird der Aufbau des gekoppelten Messsystems gezeigt. Mit dieser Technik ist es erstmals möglich, von mikroskopisch detektierten, fluoreszierenden Bereichen räumlich aufgelöste Fluoreszenzspektren in guter Auflösung aufzunehmen. Dies ermöglicht unter anderem die Detektion von fluoreszierenden Schwermetallen wie Uran in Biosystemen. Limitierende Faktoren sind allerdings, dass nicht alle Wellenlängen verlustfrei durch die Optiken des Mikroskops gehen. Das gilt besonders für tiefe UV-Wellenlängen wie z.B. 266 nm, welche besonders für die Anregung von Uranyl(VI)-Verbindungen geeignet ist. Deshalb wird zur Anregung der Uran(VI)-Verbindungen mit diesem System eine Wellenlänge von 408 nm genutzt. Des Weiteren ist mit der derzeitigen Technik, wie sie bei Großmann (2008) beschrieben wurde, eine zeitverzögerte oder zeitaufgelöste Aufnahme von Fluoreszenzspektren nicht möglich, da ausschließlich mit ungepulsten (cw: continuous wave) Lasern angeregt wird.

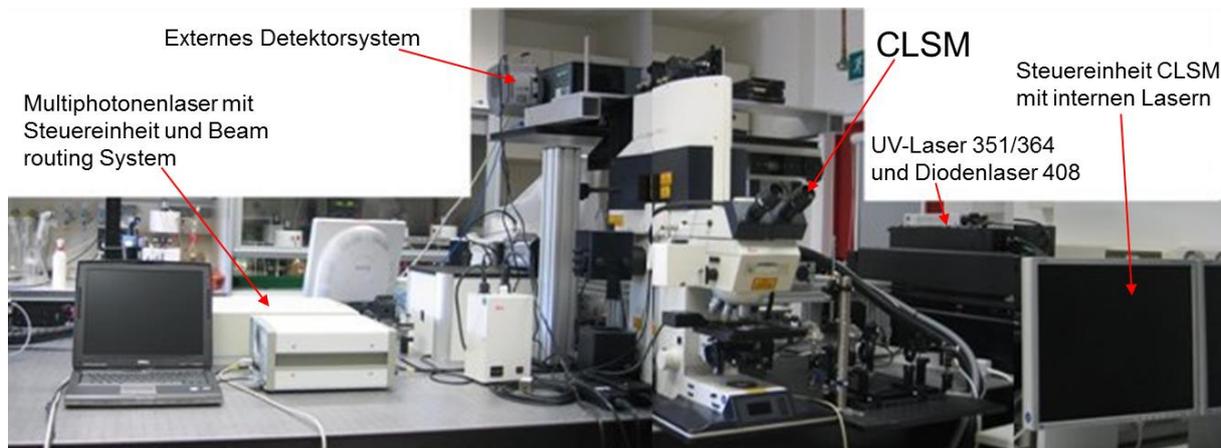


Abbildung 12: Gesamtaufbau des gekoppelten CLSM/LIFS-Messsystems (aus Großmann (2008))

3. Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit wurden für die Untersuchung von natürlichen Biofilmen aus urankontaminierten Gebieten zwei Stätten des ehemaligen Uranerzbergbaus in Ostdeutschland ausgewählt. Dabei handelte es sich um den Schacht 390 des ehemaligen Uranerzbergwerks in Königstein (Sachsen) und um die ehemalige Aufstandsfläche der Gessenhalde nahe Ronneburg (Thüringen). Beide Standorte gehören zur Wismut GmbH und wurden umfassend saniert oder befinden sich im Sanierungsprozess. An beiden Standorten konnten natürliche, in sauren Minenabwässern gebildete Biofilmformationen beobachtet werden. Die Biofilme aus Königstein bildeten sich untertage und somit unbeeinflusst vom Wetter sowie unter Ausschluss von Tageslicht. Die Biofilme von der Gessenwiese wuchsen über Tage, beeinflusst von Jahreszeitenwechsel und Lichtzyklus auf. Somit repräsentieren die ausgewählten Proben typische Biofilme aus sauren, mit Uran kontaminierten Wässern und sind beispielhaft für viele möglich auftretende Szenarien im Zusammenhang mit dem Uranerzbergbau.

Wie in den folgenden Kapiteln dargestellt wird, wurden die Biofilme und deren chemische Wachstumsumgebung zunächst genau definiert und beschrieben. Des Weiteren wurden zum ersten Mal originale, urankontaminierte Biofilmproben aus der Natur mit der gekoppelten CLSM/LIFS-Technik untersucht, welche möglichst erste Aussagen hinsichtlich der Lokalisation und Speziation des Urans in den Biofilmverbänden liefern sollte.

3.1. Biofilme aus Schacht 390 (Königstein, Sachsen)

In Königstein, im Südosten des Freistaates Sachsen (Landkreis Sächsische Schweiz), wurde inmitten eines heutigen Landschaftsschutzgebietes zu DDR-Zeiten eine Uranerzlagerstätte erschlossen. Aufgrund der geringen Urangehalte im Sandstein wurde in dieser Grube 1984 das konventionelle bergmännische Abbauverfahren vollständig auf eine chemische Laugung mittels Schwefelsäure umgestellt (Altmann et al., 2009). Bis im Jahr 1990 die Abbautätigkeiten eingestellt wurden, kamen so bis zu 55 Mio. t Gestein mit schwefelsäurehaltiger Lösung in Kontakt (Altmann et al., 2009). Durch diese extreme pH-Wert-Absenkung wurden Uran und weitere Schwermetalle mobilisiert. Nach Einstellung der Urangewinnung verblieben Teile der sauren Lösung in den Porenräumen des Gesteins. Um die Gefahr zu bannen, dass mobilisiertes Uran und sonstige Schwermetalle in die angeschnittenen Grundwasserleiter oder in die umgebende Umwelt gelangen, konnte eine zügige Flutung der Grube nicht realisiert werden (Altmann et al., 2006). Aus diesem Grund wurde im Jahr 2001 mit einer kontrollierten gesteuerten Flutung für die Sanierung der Grube

bestehend aus Biofilm. Der feste Teil dieser „Tropfsteine“ bestand aus orange-braunen Eisenpräzipitaten und konnte leicht von der Decke gebrochen werden (ähnlich dem Abbrechen eines Eiszapfens). Die weichen Biofilmmenden besaßen eine helle weißlich-gelbliche bis fast transparente Färbung.

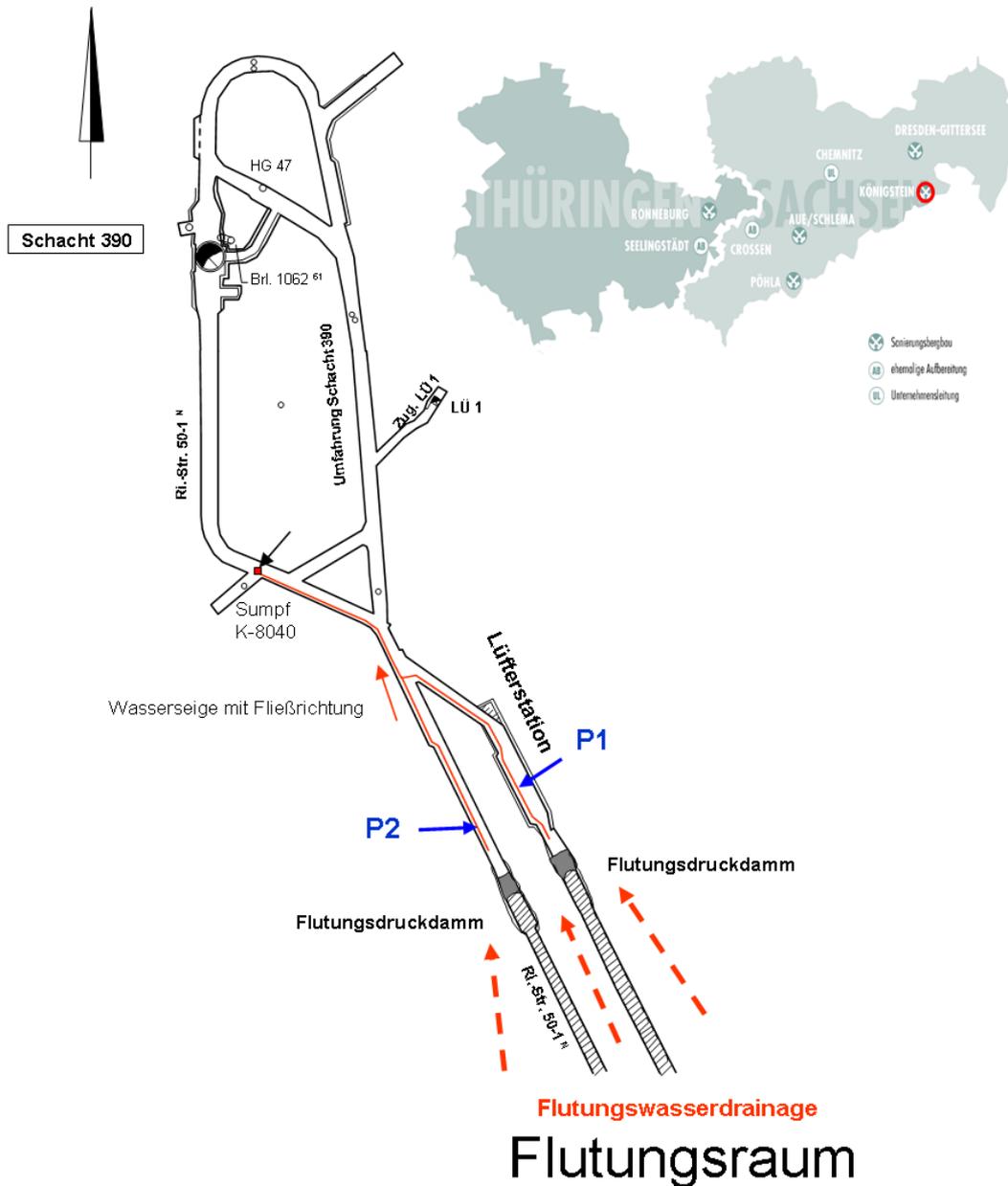


Abbildung 14: Lageskizze der 50 m Sohle von Schacht 390 in Königstein; Die Probenentnahmestellen P1 und P2 sind entsprechend vermerkt (nach Arnold et al. (2011)).

Es wurden zwei Probenentnahmestellen auf der 50 m Sohle eingerichtet, welche in Abbildung 14 eingezeichnet sind. Probenpunkt P1 nahe der Lüfterstation war eine geeignete Stelle, an der Biofilm- und Wasserproben direkt aus der Drainagerinne entnommen werden konnten. Probenpunkt P2 markiert die Stelle wo tropfsteinähnliche Biofilme vorgefunden wurden. Hier wurden Biofilmproben und Wasser, welches an diesen herabtropfte gesammelt.

Um einen Überblick über die Biofilme zu geben zeigt Abbildung 15 einige Fotos von den Probenentnahmestellen. Abbildung 15A zeigt den Gang bei der Lüfterstation. Die weißen Pfeile deuten auf die Drainagerinne am Boden. Abbildung 15B gibt eine Nahaufnahme dieser Rinne. Hier ist die filamentöse Struktur der Biofilme, die in der Strömung des Wassers verwirbelt wird, sehr gut zu erkennen. Die Bilder C und D in Abbildung 15 sind Aufnahmen vom Probenentnahmepunkt P2. Die oben beschriebene tropfsteinartige Struktur der Biofilme ist hier sehr gut erkennbar. Trotz der unterschiedlichen Struktur der beiden Biofilmtypen aus der Grube in Königstein, haben sie gemein, dass sie sich an einer festen wasserumspülten Oberfläche (Grenzfläche: fest-flüssig) ausgebildet haben.

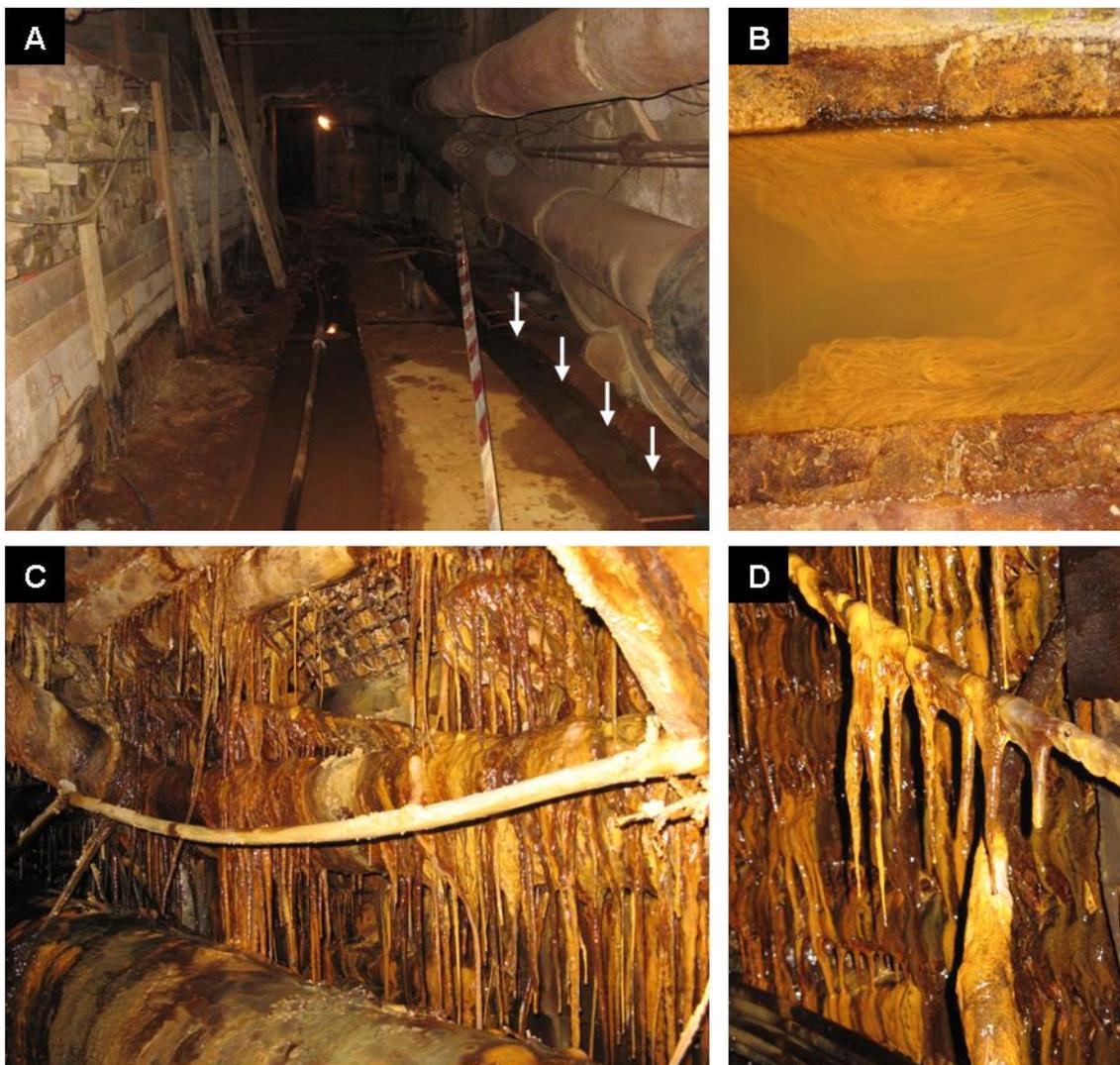


Abbildung 15: Fotos von den zwei Probenentnahmestellen P1 (Bild A + B) und P2 (Bild C + D)

3.1.1. Charakterisierung der Grubenwässer

Vor der Untersuchung der Biofilme sollten zunächst die Grubenwässer, in denen die Biofilme gewachsen sind, näher charakterisiert werden. Im Zeitraum zwischen Oktober 2008 und Juni 2010 wurden sowohl vom Grubenwasser aus der Drainagerinne (P1), als auch vom Wasser das von den tropfsteinähnlichen Biofilmen an P2 tropfte mehrere Proben genommen. Die Wasserproben wurden anschließend hinsichtlich ihrer Kationen- und Anionen-Konzentrationen sowie des pH-Wertes untersucht. Weiterhin wurden Analysen mittels der TRLFS durchgeführt, um die dominierende Uranspezies zu bestimmen. Die Ergebnisse der Anionen- und Kationenanalyse der Grubenwässer sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Da die Zusammensetzung der Wässer an den unterschiedlichen Probenahmetagen leicht schwankte, wurden zusätzlich zu den Mittelwerten aus allen Analysedaten von einer Probenentnahmestelle die minimalen und maximalen Analysenwerte angegeben. Die Grubenwässer zeichneten sich besonders durch sehr hohe Sulfat- und Eisenwerte aus. Die Sulfat-Gehalte überstiegen deutlich sowohl die durchschnittlichen Werte in deutschen Grundwässern, welche im Bereich von (13 – 249) mg/l liegen, als auch den Grenzwert der Trinkwasserverordnung, welcher bei 240 mg/l liegt (Bannick et al., 2008). Auch Schwermetalle wie Arsen, Blei, Cadmium oder Nickel waren in erhöhten Konzentrationen enthalten und überstiegen deutlich die Schwellenwerte der Grundwasserverordnung. Die Urankonzentrationen an den beiden Probenentnahmestellen waren recht verschieden. Im Grubenwasser in der Drainagerinne lagen die Urangehalte im Bereich von (9,3 – 14,2) mg/l, das entspricht etwa $(3,9 – 6,0) \cdot 10^{-5}$ mol/l. Die Wässer, die an den tropfsteinähnlichen Biofilmen gesammelt wurden wiesen wiederum deutlich höhere Urankonzentrationen im Bereich von (39,5 – 69,5) mg/l auf, entsprechend $(1,7 – 2,9) \cdot 10^{-4}$ mol/l. Die pH-Werte der Grubenwässer wurden ebenfalls für beide Probenentnahmestellen gemessen und betragen für das Drainagenwasser (P1) $(2,9 – 3,1) \pm 0,1$ und für das an den tropfsteinähnlichen Biofilmen gesammelte Grubenwasser $2,6 \pm 0,1$ (Arnold et al., 2011). Die Wässer in der Grube Königstein waren alle sehr sauer als Nachwirkung der chemischen Laugung mit Schwefelsäure. Dieser niedrige pH-Wert sorgt für die hohe Mobilität vieler Schwermetalle, im Besonderen der des Urans in diesen Wässern, was eine Flutung der Grube so schwierig macht. Unter diesen extremen pH-Bedingungen war dennoch erhebliches Biofilmwachstum zu beobachten, obwohl nur speziell angepasste Mikroorganismen unter solchen Bedingungen fähig sind zu leben und sich auszubreiten.

Tabelle 6: Mittlere Anionen- und Kationen-Zusammensetzung des Grubenwassers in Königstein inklusive Angabe von Extremmesswerten

	Drainage		Tropfsteine	
	Mittelwert	min -max	Mittelwert	min -max
mg/l				
Cl ⁻	26,56	22,4 – 29,7	43,44	41,8 – 45,8
SO ₄ ²⁻	845	707 - 946	2254	2040 - 2520
Na	120,4	16,6 – 287,0	78,7	31,9 – 455,0
Mg	10,7	8,6 – 13,6	19,0	16,8 – 20,4
Al	15,2	10,8 – 20,9	54,4	38,7 – 65,0
Si	14,5	11,5 – 18,3	24,7	20,1 – 32,7
K	49,3	<1 – 88,2	12,5	<1 – 48,5
Ca	109,5	81,8 – 153,0	175,5	159,0 – 188,0
Mn	3,9	3,1 – 4,8	9,8	9,4 – 10,0
Fe	74,3	47,1 – 100,0	330,9	225,0 – 381,0
U	11,6	9,3 – 14,2	59,9	39,5 – 69,5
Zn	6,4	4,5 – 8,1	16,8	13,3 – 18,5
µg/l				
Cr	33,2	30,0 - 38,9	185	161 - 202
Co	160	140 - 178	635	589 - 682
Ni	305	235 - 367	1049	725 - 1190
Cu	15,6	10,4 - 18,6	78,8	55,1 - 97,7
As	17,9	13,7 - 21,6	95,6	33,4 - 144
Sr	757	535 - 930	1233	1200 - 1290
Cd	61,2	56,7 - 66,1	364	324 - 386
Cs	7,01	5,83 - 7,87	13,7	12,7 - 14,3
Ba	11,8	10,6 - 12,3	6,92	1,19 - 9,23
Ce	258	202 - 318	429	383 - 459
Pr	42,1	32,4 - 50,3	71,2	63,8 - 77,1
Nd	219	173 - 267	333,5	296 - 359
Sm	73,5	55,8 - 88,4	121	110 - 131
Eu	6,55	4,77 - 8,34	7,57	6,89 - 8,35
Gd	93,1	72,3 - 114	169,5	144 - 186
Tb	14,8	11,5 - 17,7	29,3	26,6 - 31,7
Dy	76,2	59,2 - 91,5	163,2	146 - 175
Ho	12,7	9,94 - 14,9	28,6	25,9 - 31,8
Er	28,7	22,1 - 34,90	67,9	61,8 - 73,0
Tm	3,43	2,63 - 4,09	8,46	7,61 - 9,43
Yb	20,1	15,9 - 23,5	49,0	43,5 - 52,5
Lu	2,74	2,17 - 3,22	6,65	5,92 - 7,49
Th	39,6	23,8 - 47,60	174	107 - 331
Pb	293	270 - 354	187	85,7 - 326

Durch Mitarbeiter der WISMUT GmbH wurden untertage an fünf verschiedenen Stellen in der Drainagerinne im Jahr 2009 im Zeitraum von Januar bis Oktober regelmäßig chemisch/physikalische Parameter gemessen. Diese geben Aufschluss über die Wachstumsbedingungen der dort vorhandenen Biofilme. Die Mittelwerte, der an neun verschiedenen Messtagen, im Abstand von etwa je einem Monat gemessenen Daten, sind in Tabelle 7 zusammen gefasst.

Tabelle 7: Überblick über vor Ort gemessene Parameter in der Drainagerinne (Mittelwert aus Werten von 9 Messtagen an jeweils 5 verschiedenen Messstellen in der Drainagerinne)

Parameter	Mittelwert	Min - Max
pH	2,93	2,68 – 3,34
Redoxpotential E_h [mV]	708,8	683 – 741
Leitfähigkeit [mS/cm]	1,48	1,28 – 1,71
O ₂ -Gehalt [mg/l]	2,79	1,1 – 3,9
Temperatur [°C]	15,9	15,3 – 16,9

Die Messwerte schwanken relativ wenig innerhalb des beprobten Zeitraumes, dennoch wurden die Bereiche zwischen Minimal- und Maximalmesswert angegeben. Der mittlere gemessene pH-Wert in der Drainagerinne mit 2,93 bestätigt den an den entnommenen Proben im Labor gemessenen Wert. Das in der Drainagerinne vor Ort gemessene Redoxpotential entspricht ebenfalls den im Labor nachgemessenen Werten und stimmt außerdem mit den Werten für das von den tropfsteinähnlichen Biofilmen gesammelte Wasser überein, welche im Bereich (718 ± 8) mV (Krawczyk-Bärsch et al., 2011) bis $(728 \pm 9,5)$ mV (Arnold et al., 2011) liegen. Diese in den Grubenwässern vorgefundenen pH- E_h Bedingungen liegen im Bereich der Präzipitation von Jarositen und Schwertmannit und stellen oxidierende Bedingungen dar (Espana et al., 2005). Solche Bedingungen begünstigen chemolithotrophe acidophile Schwefel- und/oder Eisen-oxidierende Bakterien wie zum Beispiel *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus Thiooxidans* (Arnold et al., 2011). Die Temperatur der Grubenwässer in der Drainagerinne in Königstein lag im Mittel bei 15,9 °C und blieb über die Jahreszeiten hinweg, innerhalb geringer Schwankungen, konstant.

Die Grubenwassermesswerte für pH und E_h wurden in ein berechnetes pH- E_h -Diagramm für ein U-S-O-H-C-System eingetragen (siehe Abbildung 16, erstellt mit „Geochemist’s Workbench“ Version 8.0.8/ACT2 (Krawczyk-Bärsch et al., 2011)). Wie man in Abbildung 16 erkennen kann, liegen die eingetragenen Punkte im Bereich der aquatischen Lösung. Die thermodynamischen Berechnungen zeigen außerdem, dass unter den gegebenen Bedingungen ein aquatischer Uran(VI)sulfatkomplex vorliegt.

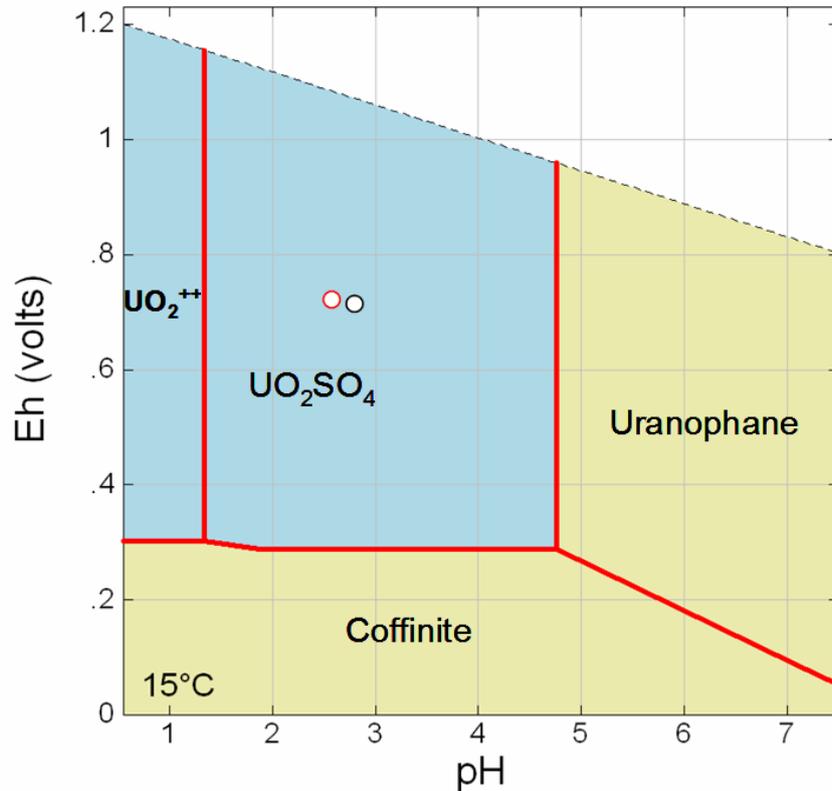


Abbildung 16: pH-Eh Diagramm für ein U-S-O-H-C System bei 15 °C. Eh- und pH-Werte, gemessen im Drainagenwasser der Grube Königstein (O) sowie in dem herabtropfenden Wasser von den tropfsteinartigen Biofilmen (O). Beide Punkte liegen im Bereich der aquatischen Uran(VI)-Sulfatkomplexierung, Diagramm nach (Krawczyk-Bärsch et al., 2011).

Um die Uranspeziation der Grubenwässer aus Königstein für Drainagerinne und Tropfsteine genauer zu analysieren wurden Untersuchungen mit der zeitaufgelösten laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren aller gemessenen Proben zeigen vergleichbare Bandenlagen der entsprechenden Emissionspeaks und sind innerhalb des analytischen Fehlers vergleichbar und reproduzierbar (Arnold et al., 2011). Abbildung 17 zeigt ein Fluoreszenzspektrum des Drainagenwassers und Abbildung 18 zeigt ein zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum des gleichen Wassers. Die Spektren sind repräsentativ für alle durchgeführten TRLFS-Messungen der Königsteingrubenwässer. Das Abklingen des Fluoreszenzsignals wird am besten durch einen mono-exponentiellen Zerfall beschrieben, was auf eine einzige vorhandene Uranspezies in den Wässern deutet. Der Vergleich der Lage der Emissionsmaxima mit den Daten von sauren Uran-Sulfat-Standardlösungen zeigt, dass die Uranspeziation in den Grubenwässern aus Königstein von einer aquatischen Uransulfat-Spezies dominiert wird (Arnold et al., 2011). Die Lage der Emissionsmaxima und die Standardabweichung (1σ) sind in Tabelle 8 gemeinsam mit den Daten für eine saure Uransulfatlösung, welche am selben Messsystem vermessen wurde, dargestellt. Die Werte des Grubenwassers aus Königstein sind dabei Mittelwerte von 19 Proben, die zu vier verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten sowohl im Drainagenwasser als auch an den

tropfsteinähnlichen Biofilmen gesammelt wurden. Es zeigt sich, dass die Lagen der Emissionsmaxima der Grubenwässer mit denen der sauren Uranyl-sulfatlösung sehr gut vergleichbar sind. Es gibt eine sehr geringe Abweichung, welche nur wenig außerhalb des analytischen Fehlerbereiches liegt.

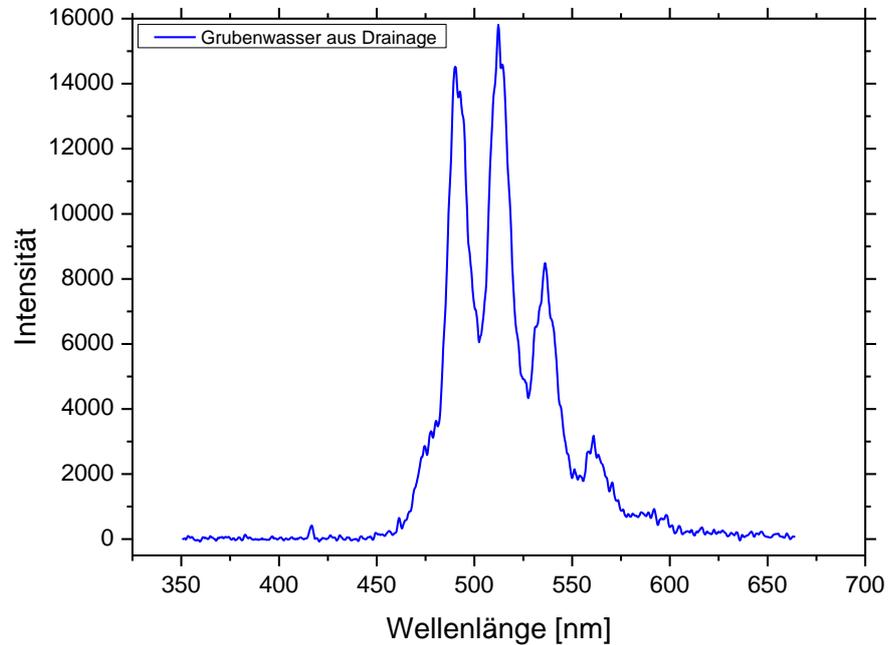


Abbildung 17: Fluoreszenzspektrum des Grubenwassers aus der Drainagerinne (P1); Anregungswellenlänge 266 nm; Verzögerungszeit 80 ns; 100 Akkumulationen

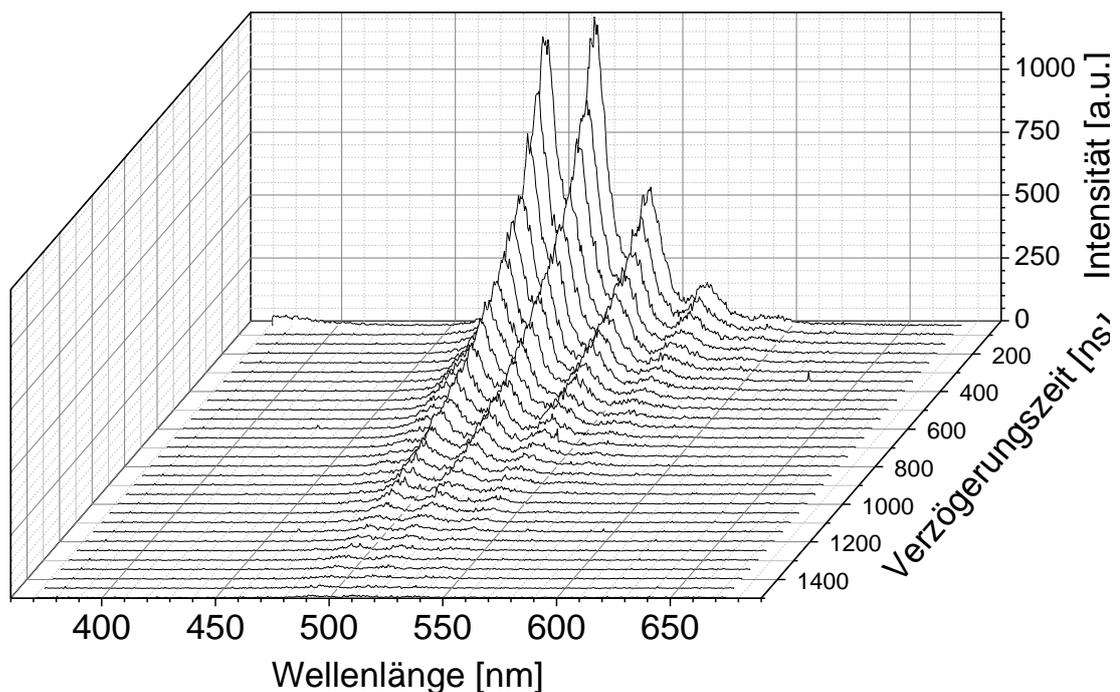


Abbildung 18: Zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum des Drainagenwassers

Tabelle 8: Vergleich der Emissionsbanden der Grubenwässer aus Königstein mit denen einer Standard-Uranyl-sulfatlösung (pH 2,55 und 2,85; 0,001 und 0,025 M); Daten übernommen aus (Arnold et al., 2011)

Probe	Emissionsbanden [nm]					
Königsteinwasser	476,5 ± 1,19	491,5 ± 0,52	513,0 ± 0,71	536,3 ± 0,76	561,6 ± 0,97	589,7 ± 1,93
U-SO ₄ Standard	477,5	492,8	514,1	537,5	563,0	590,1
Abweichung zwischen Standard und Probe [nm]	1	1,3	1,1	1,2	1,4	0,4

3.1.2. Charakterisierung der vorgefundenen Biofilme

Von den filamentösen Biofilmen in der Drainagerinne und von den Biofilmen, die tropfsteinartig an der Grubendecke wuchsen, wurden möglichst steril mehrere Proben genommen und ins Labor transportiert. Die Proben wurden zunächst umfangreich charakterisiert und analysiert. Die Bestimmung von chemisch/physikalischen Parametern für die Biofilme ist nicht einfach, da diese sehr heterogen aufgebaut sind, und jeder Biofilm im Prinzip auf seine Weise einzigartig ist. Daher ist es sehr schwer, Analysedaten von ähnlichen Biofilmen zu mitteln, da diese sehr stark schwanken. Vor allem die Wassergehalte sind sehr unterschiedlich und werden stark von der Menge der gespeicherten Feststoffe im Biofilm beeinflusst. Bei den tropfsteinartigen Biofilmen bildete sich bei den älteren Exemplaren zunehmend eine mineralische Basis aus Eisenmineralen aus. Proben mit einer solchen beginnenden mineralisierten Basis zeigten geringere Wassergehalte als Biofilme ohne diese. Daher ist es lediglich möglich einen Bereich für den Wassergehalt der Biofilme in Königstein anzugeben. Der Wassergehalt lag für die Biofilme in der Drainagerinne zwischen (86 – 98) % und für die tropfsteinähnlichen Biofilme im Bereich von (70 – 99) % bezogen auf die Masse.

In Tabelle 9 sind die Kationenkonzentrationen der Biofilmtrockenmassen zusammengestellt. Aus der Angabe der Extremwerte ist der große Schwankungsbereich der Analysenwerte zu erkennen. Da in den Biofilmen sehr heterogen verteilt verschiedenste Schwebstoffe, Mineralien und Ausfällungen in der EPS gebunden sein können, weist nahezu jede genommene Biofilmprobe andere Gehalte auf. Außerdem ist zu bedenken, dass aufgrund des sehr hohen Wassergehaltes der Biofilme auch die gelösten Ionen des umgebenden Grubenwassers in der gelartigen EPS-Matrix gespeichert sind. Auch wenn die Probe vor der Analyse getrocknet wird, verbleiben diese Ionen in der Probe. Einheitliche Tendenzen sind jedoch aufgrund des gemeinsamen Aufwuchsortes und des gleichen umgebenden Grubenwassers, in dem die Biofilme gewachsen sind, ablesbar. Auffällig sind die sehr hohen Eisen- sowie Siliziumgehalte, welche wohl durch partikuläres Material in den Biofilmen, wie Eisenausfällungen in Form von z.B. Jarositen oder Schwertmannit und Sand hervorgerufen werden. Weiterhin sind auch hohe Gehalte von z.B. Arsen und Blei zu beobachten.

Tabelle 9: Kationenkonzentrationen der Biofilmtrockenmassen

	Drainage		Tropfsteine	
	Mittelwert	min -max	Mittelwert	min -max
mg/g				
Na	1,14	0,06 – 2,26	0,99	0,40 – 1,58
Mg	0,93	0,02 – 3,20	0,57	0,11 – 1,04
Al	4,05	0,15 – 7,77	1,98	1,53 – 2,44
Si	99,80	4,27 – 166,1	77,54	2,98 – 152,1
K	4,45	0,17 – 9,45	3,72	2,51 – 4,93
Ca	3,45	0,47 – 8,60	8,21	1,80 – 14,64
Fe	321,90	250,7 – 420,2	237,68	65,75 – 427,4
µg/g				
Mn	72,75	16,91 – 144,7	186,41	15,87 – 357,0
U	271,72	63,99 – 658,5	3961	72,75 – 13362
Zn	103,66	41,55 – 178,8	358,92	57,96 – 659,88
Cr	62,14	43,08 – 100,0	43,11	13,48 – 72,75
Co	2,45	0,69 – 5,24	13,18	0,72 – 25,64
Ni	11,57	1,80 – 27,93	29,14	10,52 – 47,75
Cu	12,94	5,07 – 21,73	12,39	5,91 – 18,86
As	403,79	181,56 – 597,05	412,78	286,89 – 538,68
Cd	0,58	0,23 – 0,85	7,92	0,19 – 15,66
Cs	0,38	0,03 – 0,77	0,59	0,18 – 1,01
Ba	87,38	0,81 – 157,12	49,02	33,85 – 64,19
Th	10,15	5,02 – 15,73	23,77	18,76 – 28,79
Pb	367,14	85,46 – 551,86	1153,27	553,1 - 1753
Ce	3,11	<0,01 - 6,16	10,62	1,71 – 19,53
Pr	0,41	<0,01 – 0,77	1,74	0,29 – 3,19
Nd	1,82	<0,01 – 3,25	8,04	1,36 – 14,72
Sm	0,54	<0,01 – 0,96	2,81	0,41 – 5,21
Eu	0,09	<0,01 – 0,15	0,18	0,02 – 0,33
Gd	0,50	<0,01 – 0,99	3,35	0,37 – 6,34
Tb	0,08	<0,01 – 0,17	0,50	0,06 – 0,94
Dy	0,44	<0,01 – 0,92	3,34	0,31 – 6,36
Ho	0,10	<0,01 – 0,16	0,58	0,05 – 1,10
Er	0,19	<0,01 – 0,39	1,39	0,12 – 2,67
Tm	0,02	<0,01 – 0,05	0,17	0,01 – 0,33
Yb	0,17	<0,01 – 0,32	0,99	0,09 – 1,89
Lu	0,02	<0,01 – 0,05	0,13	0,01 – 0,25

Krawczyk-Bärsch et al. (2011) führten Mikrosensormessungen zu Redoxpotential und pH-Wert an den Biofilmen der Drainagerinne und den tropfsteinartigen Biofilmen durch. Bei diesen Messungen konnten im Vergleich zu den in den Grubenwässern nachgewiesenen Werten sehr hohe Redoxpotentiale im Innersten der Biofilme nachgewiesen werden. So wurde innerhalb der tropfsteinartigen Biofilme ein Redoxpotential von (834 ± 10) mV und innerhalb der Drainagenbiofilme ein noch höheres Potential von (921 ± 17) mV gemessen. Solche hohen Redoxpotentiale sind generell nicht ungewöhnlich in Biofilmen, welche von acidophilen Eisen(II)-oxidierenden Bakterien dominiert werden (Rawlings et al., 1999). Die pH-Werte lagen im Inneren der Biofilme noch tiefer im sauren Bereich als in den umgebenden Wässern. So wurden innerhalb der Biofilme der Drainagerinne sowie in den

tropfsteinartigen Biofilmen pH-Werte im Bereich von 1,9 – 2,2 mittels Mikrosensoren gemessen (Krawczyk-Bärsch et al., 2011). Diese abweichenden geochemischen Parameter im Vergleich zum umgebenden Wasser zeigen, dass sich innerhalb der Biofilme ein ganz eigenes Milieu gebildet hat.

Zusammensetzung der EPS-Hauptbestandteile

Da einen wesentlichen Bestandteil eines Biofilmes, neben den mikrobiellen Zellen die EPS ausmachen, welche maßgeblich die geochemischen Eigenschaften des Biofilmes beeinflussen und steuern, sollten die wichtigsten EPS-Bestandteile quantitativ ermittelt werden. Die Biofilme wurden deshalb auf ihren Gehalt an Proteinen, Kohlenhydraten, Uronsäuren und Lipiden untersucht. Dabei wurde auch der Einfluss der angewandten EPS-Extraktionsmethode auf die Analysenergebnisse geprüft. Die Arbeiten zu diesen Analysen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Gründig, 2009) durchgeführt.

Die EPS-Bestandteile der Biofilme wurden von mehreren Proben der beiden Probenentnahmestellen mittels verschiedener Extraktionsmethoden von den mikrobiellen Zellen und anderen Bestandteilen abgetrennt. Für die Extraktion der hydrophilen EPS-Bestandteile wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden basierend auf der Behandlung des Biofilms mit Dowex (einem Kationenaustauscher) bzw. mit Ultraschall durchgeführt. Beide Methoden gelten als schonende Verfahren, bei denen es nachweislich nicht zu einer Zerstörung von mikrobiellen Zellen kam. Ein entsprechend durchgeführter Test auf Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, welches ein rein intrazelluläres Enzym ist, fiel negativ aus und bestätigte, dass die Zellen während des Extraktionsprozesses intakt blieben. Im EPS-Extrakt wurden anschließend photometrisch die Gehalte an Proteinen nach Bradford (1976), die Gehalte an Kohlenhydraten nach Dubois et al. (1956) und der Uronsäuregehalt nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmt. Die Uronsäuren sind oxidierte Monosaccharide und stellen somit eine Teilmenge der Kohlenhydrate dar. Als Bestandteil der EPS sind Uronsäuren besonders vor dem Hintergrund Wechselwirkungen von Biofilmen mit Schwermetallen zu untersuchen von Interesse. Denn da die Uronsäuren Oxidationsprodukte der jeweiligen Zucker sind, kann man bei deren Vorhandensein davon ausgehen, dass Redoxprozesse stattgefunden haben müssen. Solche Redoxprozesse können z.B. zur Umwandlung der sehr gut löslichen Uran(VI)verbindungen zu Uran(IV)verbindungen und deren Präzipitation führen.

Des Weiteren wurden die Biofilme hinsichtlich ihres Lipidgehaltes untersucht. Hierzu fand eine Extraktion der hydrophoben Bestandteile der EPS mit Chloroform nach Takeda et al. (1998) statt und eine nachfolgende spektroskopische Gehaltsbestimmung nach Frings und Dunn (1970). Die entsprechenden Gehalte der Biofilme aus der Grube in Königstein sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Die Gehalte an Proteinen und Kohlenhydraten sind sehr stark

von der Extraktionsmethode abhängig. Die Bestimmung der Uronsäuren führte nur bei den Tropfsteinproben, welche mittels der Dowex-Extraktionsmethode behandelt wurden zu einem Analysenwert. Die sehr starken Schwankungen der Analysenwerte, in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode zeigen, dass es sehr schwierig ist, die EPS eines Biofilms quantitativ von den Zellen und anderen Biofilmbestandteilen abzutrennen ohne dabei Kontaminationen des Extraktes, durch zum Beispiel Zellinhalte, zu riskieren. Eine wirklich quantitative Extraktion der EPS wird daher wohl nicht erreicht. Dennoch liefern die Ergebnisse Tendenzen zur Zusammensetzung der EPS. Auffällig ist, dass die Extraktionsmethode mittels Dowex im Gegensatz zur Extraktion mittels Ultraschallbehandlung ein Vielfaches an EPS extrahiert, wodurch die Analysenwerte nach einer solchen Extraktion entsprechend höher ausfallen.

Tabelle 10: Ermittelte Gehalte verschiedener EPS-Bestandteile der Biofilmproben aus Königstein

EPS-Bestandteile	Extraktionsmethode	Drainagenbiofilm	Tropfsteinbiofilm
		$\mu\text{g/g}_{\text{Btm}}$	
Proteine	Dowex	86,2 \pm 3,7	4422 \pm 59,5
	Ultraschall	51,1 \pm 4,3	107 \pm 4,5
Kohlenhydrate	Dowex	321 \pm 8,6	2546 \pm 240
	Ultraschall	199 \pm 4,6	408 \pm 10,6
Uronsäuren	Dowex	n.d.	226 \pm 9,4
	Ultraschall	n.d.	n.d.
Lipide	mit Chloroform	5600 \pm 200	1900 \pm 100

Anhand der Analysendaten lässt sich gut erkennen, dass die ermittelten Gehalte an hydrophilen EPS-Substanzen bei den tropfsteinähnlichen Biofilmen um ein vielfaches höher sind als die entsprechenden Gehalte der Biofilme aus der Drainagerinne. Für die Versuche zur EPS-Extraktion wurden vorrangig Biofilme verwendet, die visuell eingeschätzt, möglichst wenig sedimentäre Verunreinigungen aufwiesen. Im Gegensatz zu den tropfsteinähnlichen Biofilmen waren die Biofilme in der Drainagerinne einer stetigen Strömung an Grubenwasser ausgesetzt, wodurch große Mengen an Sedimenten und Ausfällungen in den Biofilmen festgehalten wurden. Anteilig machen daher die EPS und deren einzelne Bestandteile einen geringeren Prozentsatz des Biofilmes aus.

Bei den Lipidgehalten ist allerdings eine umgekehrte Tendenz ablesbar, denn die Biofilme aus der Drainagerinne wiesen deutlich höhere Lipidwerte auf als die tropfsteinähnlichen Biofilme. Weiterhin ist auffällig, dass die Lipidgehalte insgesamt recht große Werte im Vergleich zu den anderen EPS-Bestandteilen annehmen und somit zu den Hauptbestandteilen der EPS neben den Kohlenhydraten und Proteinen gehören. Bei der Extraktion der Lipide ist allerdings darauf hinzuweisen, dass es möglich ist, dass Lipide aus

dem Zelleninneren bzw. aus der Zellmembran der Mikroorganismen in den Biofilmen mit in den EPS-Extrakt gelangen, da hier die Zellen vor der Extraktion nicht separiert werden. Daher können die Werte durch zellzugehöriges Lipid nach oben hin verfälscht sein.

Zusammensetzung der mikrobiellen Diversität der Biofilme

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der TU-Dresden in einem gemeinsamen DFG-Projekt (AR584/11, „In-situ Speziation von Uran in Biofilmen“, 01.02.2006 – 15.03.2009) wurde von Studenten der TU-Dresden im Rahmen von zwei Diplomarbeiten die mikrobielle Diversität der Biofilme in Königstein untersucht. Dabei galt es sowohl die dominierenden Bakterienarten, als auch die dominierenden Eukaryotenspezies zu identifizieren. Die Ergebnisse zur bakteriellen und eukaryotischen Diversität, die hier kurz erwähnt werden sollen, sind Teil der Diplomarbeiten von C. Meierhöfer (2009) und I. Zirnstein (2010).

Die Diversität der Eukaryoten in den Biofilmen wurde sowohl molekularbiologisch durch Analyse der 18S-rDNA bestimmt als auch durch lichtmikroskopische Beobachtungen und visuelle Abschätzung der Anteile der Gruppen zum Gesamtbild. Diese zwei Analysemethoden ergänzen sich und führen zu einem umfassenderen Bild als jede Methode einzeln für sich. Die Ergebnisse dieser kombinierten Analyse sind in Abbildung 19 dargestellt. Genauere Ausführungen zu den Ergebnissen der mikroskopischen Methoden befinden sich im nachfolgenden Kapitel.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, beschränkt sich die Vielfalt der Arten auf acht nachgewiesene phylogenetische Gruppen der Eukaryoten im sauren, eisen- und schwermetallhaltigen Milieu in den Grubenwässern in Königstein. Kleine Unterschiede in den Anteilen der einzelnen Gruppen zwischen dem Biofilm aus der Drainagerinne und dem tropfsteinähnlichen Biofilm sind jedoch erkennbar. Die Anteile an *Amoebozoa*, *Heterolobosea* und Flagellaten unterscheiden sich kaum in den beiden Biofilmarten. Ciliaten und Fungi sind ebenfalls in beiden Biofilmarten vorhanden, aber in sehr unterschiedlichen Anteilen. *Apikomplexa* und *Rotatoria* sind wiederum charakteristische Gruppen in den tropfsteinähnlichen Biofilmen. Eine Gruppe, die nur im Biofilm der Drainagerinne zu finden war, bilden die *Acari*.

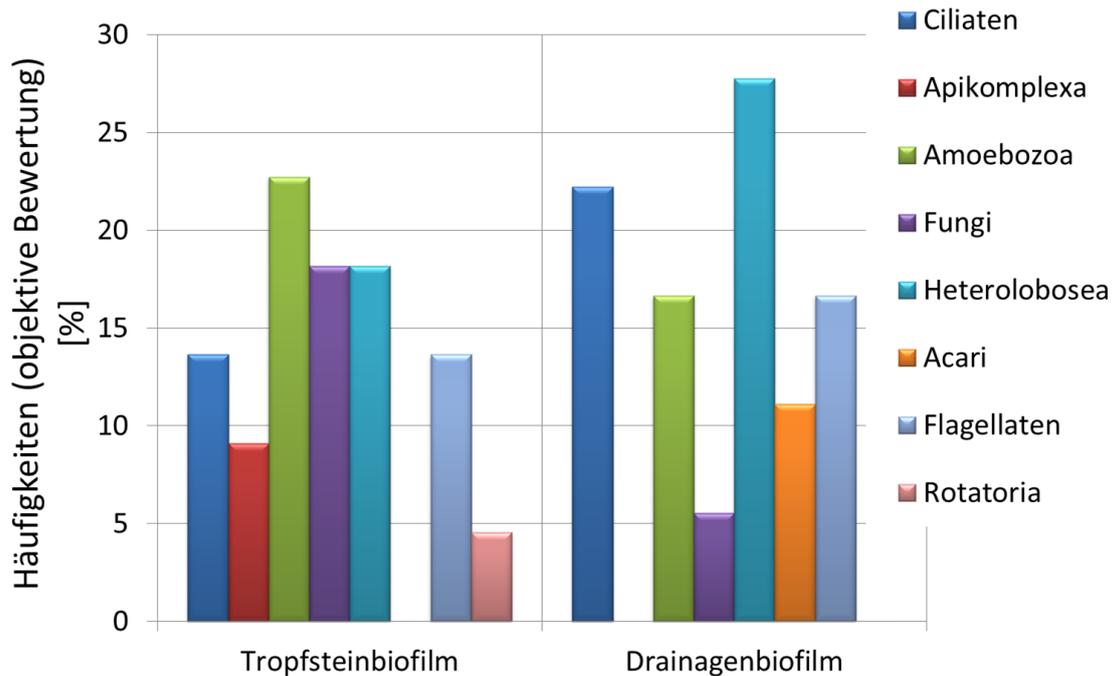


Abbildung 19: Diversität der Eukaryoten in der Grube Königstein - Zusammenfassung der mikroskopischen und molekularbiologischen Verteilung der phylogenetischen Gruppen im Biofilm (Daten übernommen von Zirnstein (2010))

Die bakterielle Diversität wurde mittels CARD-FISH Analyse bestimmt. Ein Überblick über die Ergebnisse dieser Analysen zeigt Abbildung 20. Insgesamt gibt es nur eine geringe bakterielle Diversität in den Biofilmen aus der Grube in Königstein, was durch die extremen pH-Bedingungen und die hohen Konzentrationen an Eisen, Sulfat und diversen Schwermetallen nicht unerwartet ist. In den Biofilmen von beiden Probenentnahmeorten sind die Beta-Proteobakterien mit der Art *Ferrovum myxofaciens* dominierend. Alle weiteren Vertreter sind nur in geringen Anteilen in den Biofilmen vorhanden.

Die Analysen der bakteriellen und eukaryotischen Diversitäten geben hierbei lediglich einen Überblick über die dominierenden Spezies und garantieren keines Falls die Vollständigkeit der Erwähnung der vorhandenen Mikroorganismen. In geringeren Anteilen sind weitere Spezies sowohl hinsichtlich der Eukaryoten als auch der Bakterien möglich. Eine vollständige Auflistung aller, auch der geringfügig vorhandenen Mikroorganismen in den Biofilmen bedürfte einer äußerst umfangreichen und zeitintensiven Untersuchung. Gerade die Populationen der wenig vorhandenen Spezies können dabei stärker durch geringfügige Schwankungen der Grubenwasserchemie/physik beeinflusst werden und somit in Proben von verschiedenen Entnahmestellen in der Drainagerinne und von verschiedenen Tagen variieren. Eine vollständige Bestimmung aller Mikroorganismen in den Biofilmen soll daher nicht Bestandteil dieser Arbeit sein.

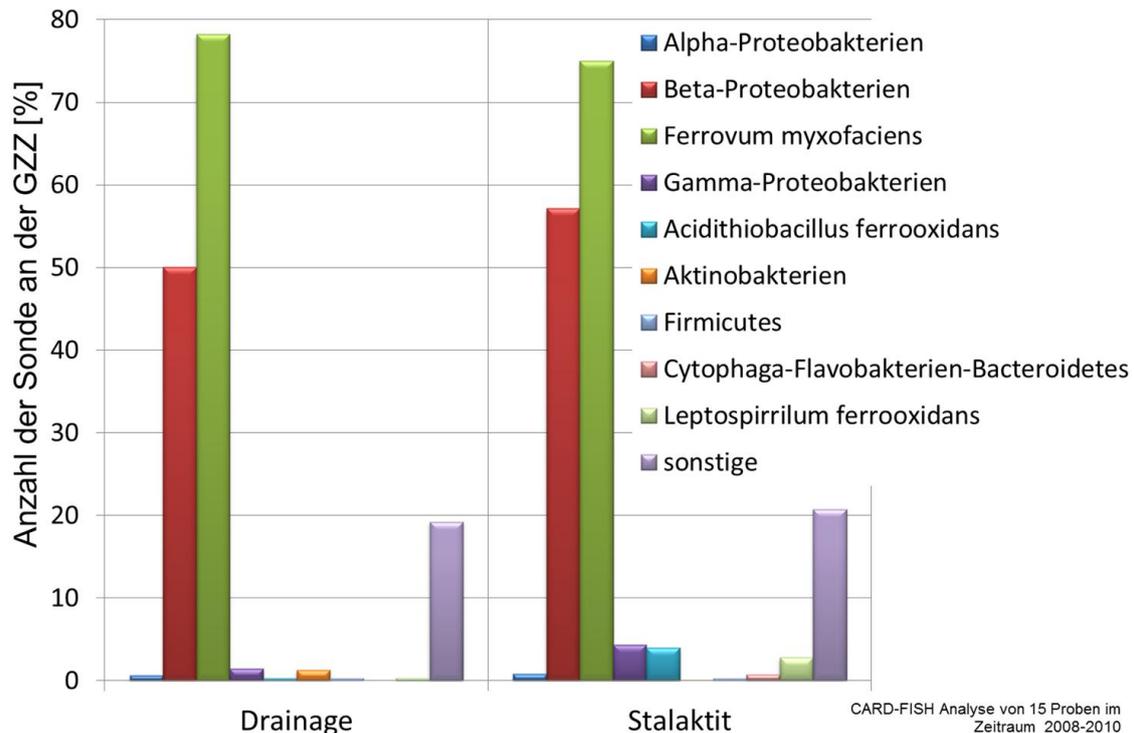


Abbildung 20: Bakterielle Diversität in den Biofilmen aus Königstein. Prozentuale Anteile der gruppenspezifisch markierten Zellen an der Gesamtzellzahl (GZZ) nach Anfärbung mit Propidium-iodid der beiden untersuchten Biofilmproben von Königstein; Die grünfarbenen Balken geben den Anteil der mit der Sonde FER440 hybridisierten Zellen wieder. Diese ist spezifisch für das Bakterium *Ferrovum myxofaciens*. (Daten übernommen von (Meierhöfer, 2009))

3.1.3. Visualisierung und Identifizierung der Mikroorganismen und des Urans

Die Biofilme aus der Grube in Königstein wurden vielfältig mikroskopisch untersucht. Zum einen sollten Analysen des Biofilmmaterials mit einfacher Lichtmikroskopie einen ersten Eindruck zur mikrobiellen Diversität liefern. Zum anderen sollten fluoreszenzmikroskopische Analysen Aufschluss über die bakterielle Diversität (FISH-Analysen) der Biofilme und der Lokalisation fluoreszierender Uranverbindungen darin bringen.

Lichtmikroskopie: Identifizierung von Mikroorganismen

Um sich einen Überblick über die Mikroorganismen in den Biofilmen zu verschaffen, wurden zunächst einfache Durchlichtuntersuchungen am Mikroskop durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass die Biofilme aus der Grube in Königstein verschiedenste Arten von Bakterien und Eukaryoten aufwiesen. In Abbildung 21 und Abbildung 22 ist eine Auswahl von Aufnahmen der mikroskopischen Untersuchung bei Durchlicht dargestellt. Vor allem verschiedene Wimperntierchen (*Ciliophora*; Bild C+D in Abbildung 21 sowie Bilder A+B+C in Abbildung 22) und Amöbenarten (Bild A+B in Abbildung 21 sowie Bild D in Abbildung 22) konnten in beiden Biofilmarten in zahlreicher Form auf diese Weise nachgewiesen werden.

Die Amöben waren etwa (10 – 20) µm groß und konnten durch Zirnstein (2010) den Gruppen *Vahlkampfia* und *Vannella* zugeordnet werden. In einigen Biofilmproben konnten außerdem Rädertierchen (*Rotatoria*) beobachtet werden (siehe Abbildung 22, Bild E). Durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden zudem verschiedene Flagellaten, darunter sehr häufig *Bodo saltans* (siehe Abbildung 21, Bild E), und diverse Pilzhyphen nachgewiesen (Zirnstein, 2010).



Abbildung 21: Durchlichtaufnahmen einiger Bewohner der tropfsteinähnlichen Biofilme



Abbildung 22: Durchlichtaufnahmen einiger Bewohner der Biofilme aus der Drainagerinne

Fluoreszenzmikroskopie: Lokalisation und Identifizierung von Uranakkumulationen

Mittels der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie gekoppelt mit laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie sollte die Uranspeziation in den Biofilmen aus Königstein unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation des Urans innerhalb des Biofilms untersucht werden. Dabei wurde in erster Linie auf fluoreszierende Partikel, Ausfällungen und Anreicherungen im Biofilm geachtet. Die Mikroorganismen zeigten hierbei lediglich eine extrem schwache bis gar keine Eigenfluoreszenz. Die Biofilme aus der Grube in Königstein wiesen sehr große Dicken im Bereich von mehreren Zentimetern auf. Aufgrund von verschiedenen sedimentären Einlagerungen und methodischen, optisch-physikalischen Beeinträchtigungen wurde die Eindringtiefe der Laseranregungen jedoch begrenzt. Mikroskopische Untersuchungen in der z-Achse waren somit nur im Bereich von mehreren Mikrometern Biofilmdicke möglich. Somit war es schwierig, die sehr dicken Biofilme aus Königstein mikroskopisch zu untersuchen, ohne die eigentliche Biofilmstruktur zu verändern oder zu zerstören. Um dennoch die Biofilme hinsichtlich ihrer Struktur und der Uranlokalisation zu untersuchen, war es notwendig diese zu schneiden. Durch

Kryoschnitten der Biofilme konnten Schnitte von ca. 50 μm Dicke erzeugt werden und mittels CLSM untersucht werden.

Bei den CLSM-Untersuchungen von Schnitten (50 μm dick) eines tropfsteinähnlichen Biofilmes konnten bei Anregung der Probe mit Laserlicht der Wellenlänge 408 nm (Dioden Laser COH 405, Coherent Inc., Santa Clara, USA) fluoreszierende Bereiche, vermutlich Partikel, beobachtet werden. Um zu klären ob es sich hierbei um Uranausfällungen/-ablagerungen im Biofilm handelt, wurde die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge in Form von Spektren aufgenommen. Zunächst wurde die Fluoreszenz mit den internen Fotomultipliern (PMT) des CLSM detektiert. Abbildung 23 zeigt das entsprechende fluoreszenzmikroskopische Abbild und die zugehörigen Spektren eines solchen fluoreszierenden Partikels. Wie erkennbar ist, zeigen die Spektren eine Auftrennung des Fluoreszenzsignals in 3-4 Hauptemissionsbanden, wobei die ersten beiden Peaks die intensivsten sind.

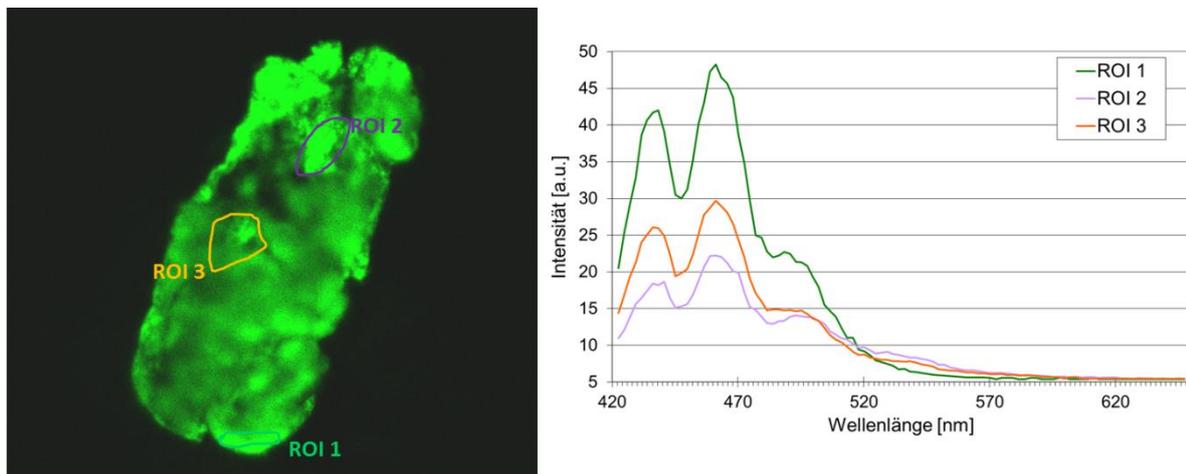


Abbildung 23: Links: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines fluoreszierenden Partikels in einem tropfsteinähnlichen Biofilm bei Anregung mit 408 nm; „Region of Interest“ (ROI) geben den Bereich für die Detektion des zugehörigen Spektrums vor; Rechts: zugehörige Spektren aufgenommen mit den internen PMT

Durch Zuordnung der dargestellten Farben im Fluoreszenzbild entsprechend der ersten beiden Emissionsmaxima (erstes Maximum = grün für Emissionen im Bereich von 415 – 445 nm; zweites Maximum = rot für Emissionen im Bereich von 445 – 550 nm) entstand ein zweifarbigenes Bild mit grün- oder rot-dominierten Bereichen. Dies ist in Abbildung 24 zusammen mit Spektren dargestellt, welche erneut mittels der internen Fotomultiplier des CLSM aufgenommen wurden. Bei den oben abgebildeten Spektren (ROI 1 und 2) handelt es sich um Fluoreszenzemissionen aus dem eher grüdominierten Bereich und bei den unteren Spektren (ROI 3 und 5) handelt es sich um Signale aus dem mehr rot-dominierten Bereich.

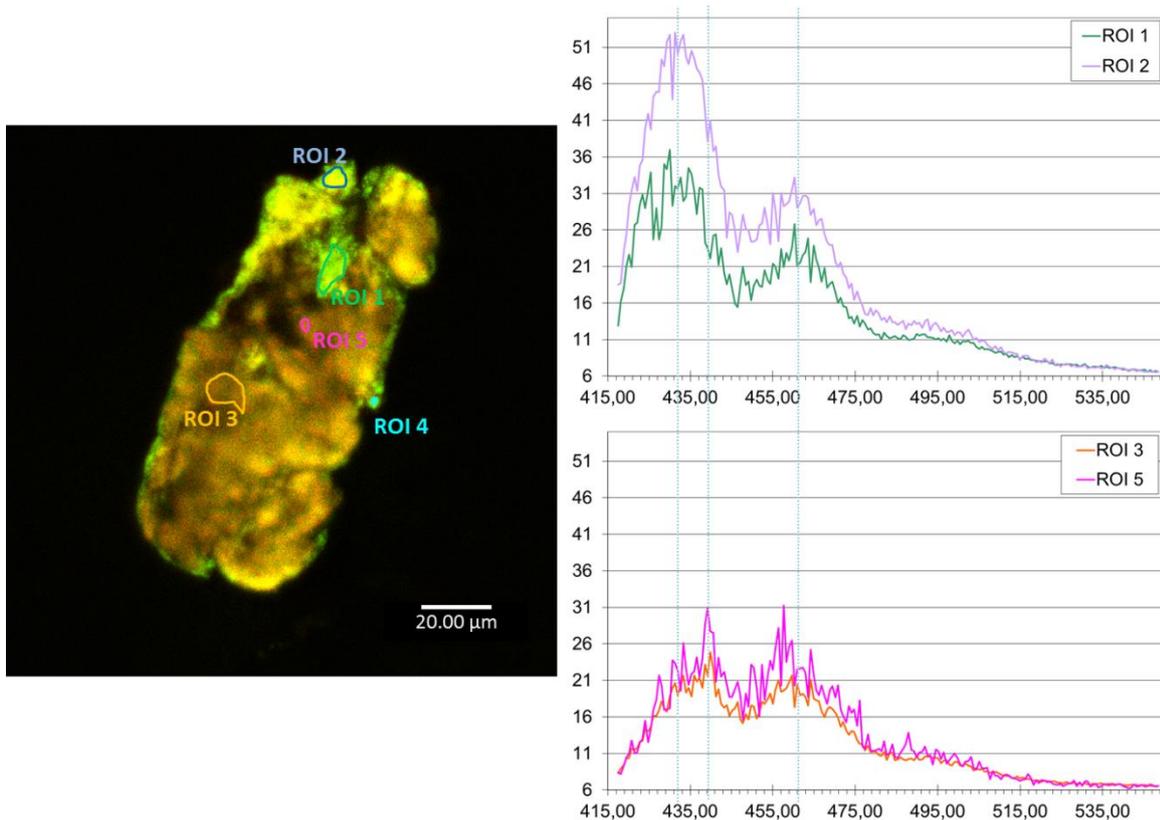


Abbildung 24: Zweifarbiges Fluoreszenzmikroskopisches Abbild entsprechend der Zuordnung grün = 415 – 445 nm und rot = 445 – 550 nm

Da die Messung mit den internen Fotomultipliern nur Spektren geringer Intensität und Auflösung generiert und eher als Überblick dient, wurden anschließend fluoreszenzspektroskopische Messungen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System durchgeführt. Eine genaue Lokalisation der „Region of Interest“ (ROI) wird hier nicht angegeben, da viele Messungen über den Partikel verteilt stets vergleichbare Spektren lieferten. Eine Veränderung des Spektrums entsprechend der rot- oder gründerdominierten dargestellten Fluoreszenzbereiche des Partikels konnte mit der gekoppelten CLSM/LIFS-Technik nicht detektiert werden. Das dabei erhaltene Spektrum ist in Abbildung 25 dargestellt. Wie man gut erkennen kann, decken sich die Spektren in ihrer Form und der Lage der Hauptemissionsbanden recht gut. Das mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System gemessene Spektrum weist jedoch deutlich höhere Intensitäten und weniger Rauschen auf. Sämtliche an dem vorgefundenen Partikel gemessene Spektren wurden wenn nötig geglättet und gefittet. Die erhaltenen Hauptemissionsmaxima der jeweiligen Spektren sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

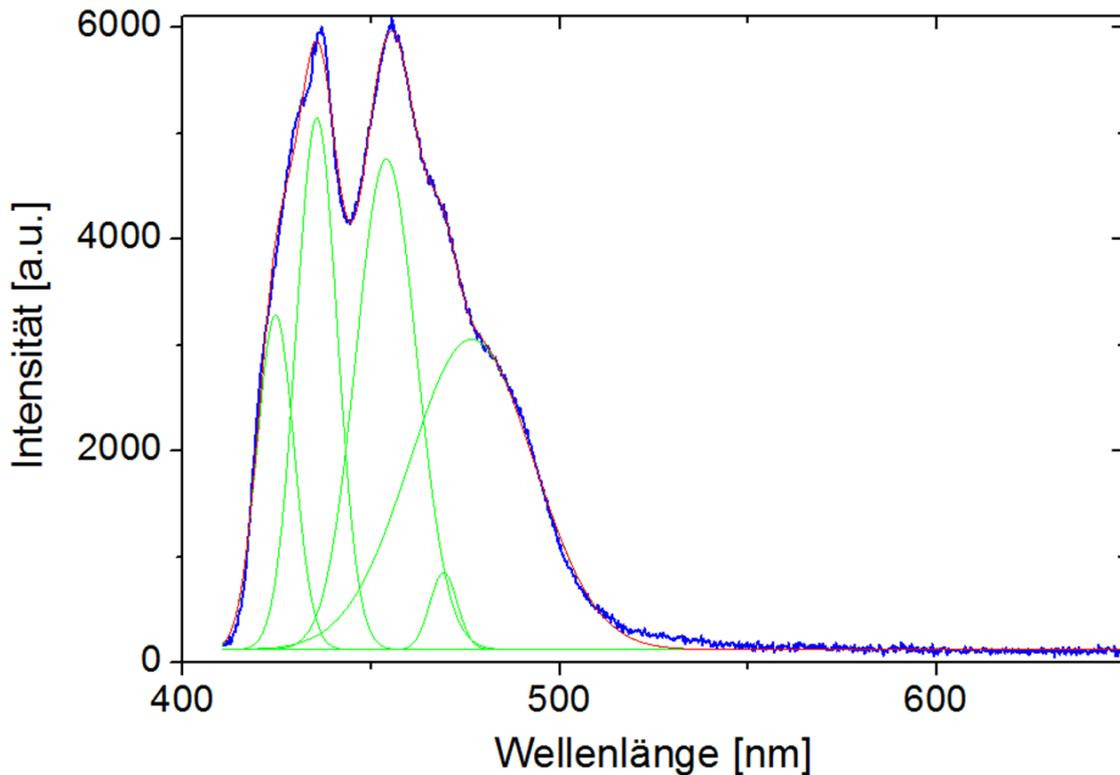


Abbildung 25: Mittels des gekoppelten CLSM/LIFS-System aufgenommenes Fluoreszenzspektrum des Partikels aus Abbildung 23

Tabelle 11: Hauptemissionsmaxima in den gemessenen Spektren des Partikels aus dem Biofilm von der Grube Königstein (Ein Fehlerbereich kann nicht angegeben werden, da es sich jeweils um Einzelmessungen handelt.)

		Emissionsmaxima [nm]					
Gekoppeltes CLSM/LIFS		424,6	435,5	454,0	469,2	476,7	
Interne Foto-multiplier	Abbildung 23	ROI 1	430,7	438,6	461,6	492,0	498,7
		ROI 2	430,8	439,1	461,4	493,4	507,6
		ROI 3	431,8	440,0	461,6	494,9	511,8
	Abbildung 24	ROI 1	422,3	433,1	459,7	490,9	
		ROI 2	422,3	433,1	459,7	490,9	
		ROI 3	434,7	439,7	458,7	471,1	487,4
		ROI 5	436,5	439,6	458,3	470,8	488,0

Die Peakabfolge des Fluoreszenzspektrums zeigt Ähnlichkeiten zu Uran(VI)-Verbindungen. Jedoch liegen die Emissionsbanden sehr weit zu niedrigen Wellenlängen hin verschoben. Eine ähnliche Verschiebung der Emissionsbanden in Richtung Blau wurde beispielsweise bei verschiedenen organischen Komplexen des Uranyls beobachtet (Günther et al., 2011). Die hier ermittelten Werte der Emissionsmaxima lassen jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einer in der Literatur zu findenden Spezies zu. Vergleichbare Peakformen konnten auch von Großmann et al. (2009b) bei der Oxidation von Uran (IV) zu Uran (VI) beobachtet werden. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal einem Mischspektrum aus einer

intermediären Uran(V)-Spezies und einer Uran(VI)-Spezies zugeordnet. Aufgrund einer möglichen Bildung von Mikronischen im Inneren des Biofilms und daraus resultierenden geochemischen Veränderungen wäre auch eine Reduktion/Oxidation des Urans denkbar. Auch eine Überlagerung des eigentlichen Uranylpektrums durch Fluoreszenzen organischer Bestandteile ist vorstellbar. Eine Extrahierung des Uransignals vom Gesamtspektrum, zum Beispiel über die unterschiedlichen Lebensdauern der Fluoreszenzemissionen von Organik und Uran, ist aber mit dem derzeitigen kombinierten CLSM/LIFS-Setup noch nicht durchführbar. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Einflussfaktoren konnte eine eindeutige Klärung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden. Dies könnte jedoch eine Aufgabenstellung für weiterführende Arbeiten sein.

Aufgrund der nicht detektierbaren Autofluoreszenz von Mikroorganismen und EPS im Biofilm ist eine Einordnung und Lokalisation der gefundenen fluoreszierenden Partikel nicht eindeutig durchführbar. Ausgehend von der Größe der Partikel ($> 100 \mu\text{m}$ in der Länge) kann jedoch angenommen werden, dass es sich hierbei nicht um eine Anreicherung innerhalb von Mikroorganismen handelt. Es ist allerdings nicht möglich Aussagen zu treffen, ob sich diese Partikel innerhalb der EPS, weit entfernt von den Mikrokolonien, oder in direkter Nähe zu den mikrobiellen Zellen im Biofilm befanden. Doch gerade diese Information würde zum Verständnis der Abläufe bei der Rückhaltung von Schwermetallen wie Uran in Biofilmen beitragen. Sind die Mikroorganismen direkt an einer Bindung des Urans beteiligt oder handelt es sich hier um eine rein physikalische Adsorption des Uranpartikels in der EPS-Matrix?

Aufgrund der räumlichen Verteilung der einzelnen fluoreszierenden Partikel in Form von lokalen Anreicherungen innerhalb des Biofilms ist ein mögliches Szenario die Bildung von Mikronischen innerhalb des Biofilms, in welchem sich optimale Konditionen für eine Anreicherung und gegebenenfalls Präzipitation des Urans ausgebildet haben. Zur Untersuchung eines solchen Szenarios ist es jedoch idealer Weise notwendig EPS und Mikroorganismen getrennt anzufärben. Während der fluoreszenzmikroskopischen Messungen konnten jedoch auch durch Anfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoffen kaum Mikroorganismen in den Biofilmen aus Königstein visualisiert werden. Alle zur Verfügung stehenden Farbstoffe, welche üblicherweise für die Anfärbung der nicht-fluoreszierenden Mikroorganismen in Biofilmen verwendet werden, führten unter den probenspezifischen Bedingungen nicht zum Erfolg. Recherchen und Nachfragen bei den Herstellern zeigten, dass gewöhnlich verwendete Farbstoffe in einem pH-Milieu unter $\text{pH} = 3$ nicht stabil sind. Um diesen Effekt zu vermeiden und dennoch wissenschaftlich vertretbar die Proben zu färben, ist es notwendig bei sehr sauren Proben zunächst den pH-Wert auf einen Wert über $\text{pH} = 3$ anzuheben, z.B. durch Zugabe von NaOH wie es beispielsweise bei Baffico et al. (2004) beschrieben ist. Eine weitere Möglichkeit ist, die Farbstoffe vor der Zugabe zur Probe

zunächst in Pufferlösungen zu verdünnen. Jedoch bedingen beide Möglichkeiten zur Anfärbung eine deutliche pH-Wert- und Ionenstärke-Änderung innerhalb der Probe und des in der Probe gespeicherten Wassers. Diese Veränderungen in der Biofilmchemie können nicht nur zu unerwünschten Effekten auf den mikrobiellen Metabolismus führen, sondern können auch besonders die Geochemie innerhalb des Biofilms beeinflussen. Dies ist besonders in Hinsicht auf die Untersuchung von pH-sensitiven Schwermetallen wichtig. Ein pH-Wert-Anstieg verursacht maßgebliche Veränderungen hinsichtlich der Löslichkeit und der Speziation von inkorporierten gelösten Metallen. Solche Veränderungen würden bei den hier zu untersuchenden sehr sauren Biofilmen, welche hohen Urankonzentrationen ausgesetzt waren, zu erheblichen Auswirkungen führen (Vgl. Kapitel 2.1.1, Abbildung 2). Bei sauren pH-Werten $\text{pH} < 4$ in aeroben Umgebungen existiert Uran hauptsächlich als mobile gelöste freie Uranyl(VI)-Spezies (UO_2^{2+}) (Guillaumont et al., 2003). Im Gegensatz dazu hat Uran(VI) bei neutraleren pH-Werten ein Löslichkeitsminimum und könnte, abhängig vom Vorhandensein geeigneter Liganden, als Uranhydroxid oder Uransilikat ausfallen. Eine Anhebung des pH-Wertes solcher Proben, um eine Fluoreszenzanfärbung der Mikroorganismen zu ermöglichen, würde damit zu starken Verfälschungen der Ergebnisse, z.B. durch Präzipitate, führen. Es bestand daher die Notwendigkeit säurestabile Fluoreszenzfarbstoffe zur Anfärbung von Mikroorganismen zu finden und ausschließlich solche Farbstoffe für Untersuchungen der Uranlokalisation und –speziation in acidophilen Biofilmen anzuwenden.

3.1.4. Entwicklung säurestabiler Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung von natürlichen schwefelsauren Biofilmen

Um die Problematik bei der Anfärbung mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu verdeutlichen wurden zwei kommerziell erhältliche und in der Forschung gebräuchliche Farbstoffe (DAPI und SYTO 59) zunächst unter verschiedenen Bedingungen an den Biofilmen aus Königstein getestet. Hierbei wurde der pH-Wert der Probe jeweils einmal original beibehalten und einmal absichtlich erhöht, in dem die Proben zweimal mit Leitungswasser gewaschen wurden. Außerdem wurden die herkömmlichen Farbstoffe DAPI und SYTO 59 jeweils entweder in steril filtriertem Drainagenwasser aus Königstein oder in steril filtriertem Leitungswasser (für die gewaschenen und so neutralisierten Biofilme) auf die empfohlene Anwendungskonzentration verdünnt. In Abbildung 26 sind die entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der, mit herkömmlichen Farbstoffen (DAPI und SYTO 59) im sauren bzw. neutralen Milieu gefärbten, Biofilme gegenübergestellt.

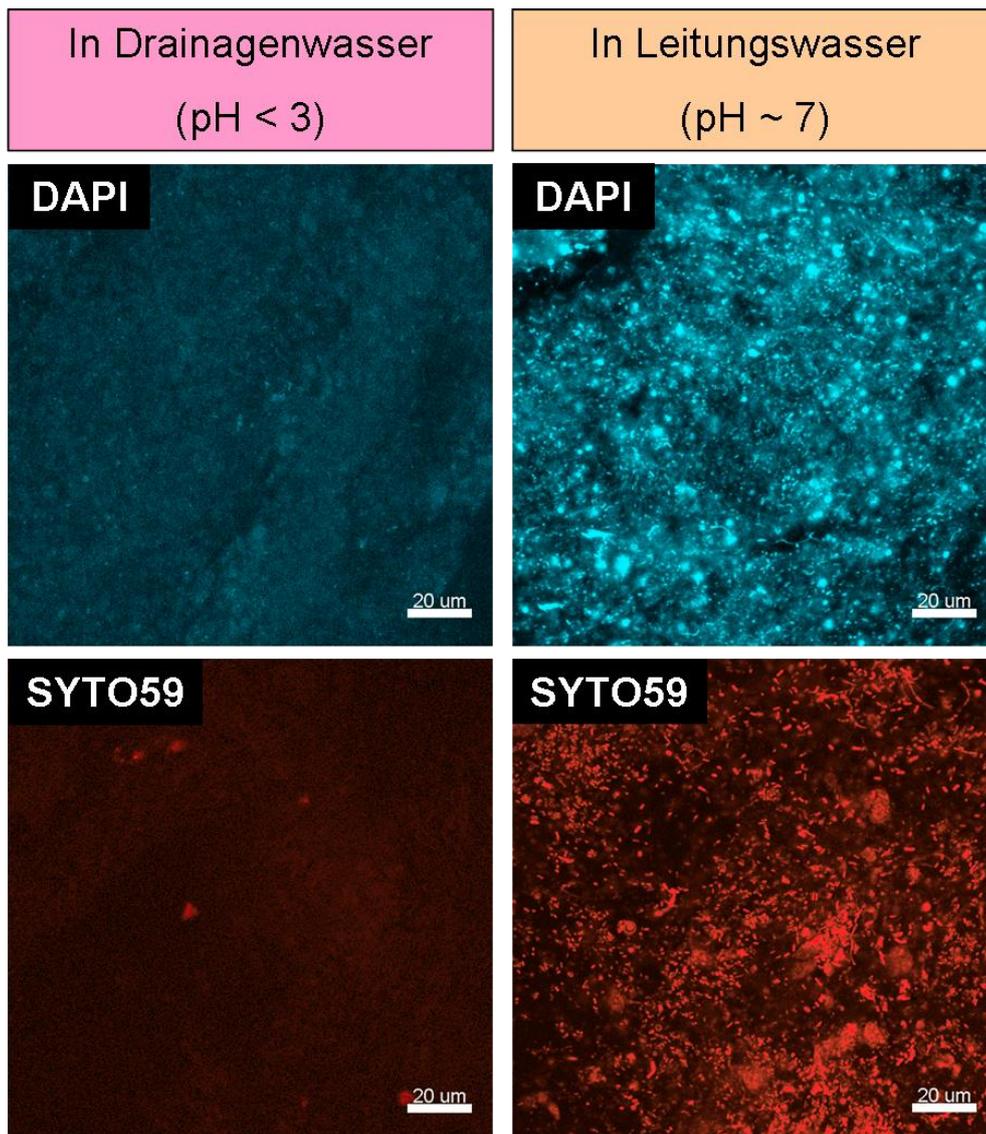


Abbildung 26: Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen der tropfsteinähnlichen Biofilmpflanzen, welche mittels der herkömmlichen Farbstoffe DAPI und SYTO 59 gefärbt wurden. Links: Probe naturbelassen, Farbstoff in steril filtriertem Grubenwasser verdünnt; Rechts: Probe zweimal mit Leitungswasser gewaschen, Farbstoff in Leitungswasser verdünnt.

Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, dass ausschließlich die neutralisierten Proben eine sehr gute Anfärbung aufweisen. Die Auflösung der Bilder von den neutralisierten Proben ist sehr gut, so dass sogar einzelne Mikroorganismen bzw. Bakterien zu erkennen sind. In den Proben bei denen die Wasserchemie bestmöglich beibehalten wurde, ist jedoch fast keine Fluoreszenz zu erkennen. Ursache dafür ist die Instabilität der Farbstoffe bei solch niedrigen pH-Werten wie sie in den Proben aus Königstein vorliegen. Das Ergebnis dieses Tests verdeutlicht sehr anschaulich das Problem, welches bei der Anwendung der herkömmlich empfohlenen Farbstoffe auf saure Proben entsteht. Eine Visualisierung der Mikroorganismen und Abbildung der Biofilmstruktur ist bei Anwendung solcher herkömmlicher Fluoreszenzfarbstoffe nur durch die Veränderung der Wasserchemie (pH-

Wert, Konzentrationen und Speziationen der enthaltenen Metallionen) der Probe zu erreichen.

Da pH-Wert-Veränderungen in Proben mit Metallkonzentrationen (z.B. Uran) zu signifikanten Modifikationen der Metallspeziation und somit zu Löslichkeitsveränderungen sowie Präzipitationen führen können, sollte eine Fluoreszenzanfärbung von Biofilmen aus schwermetallkontaminierten Wässern nur unter Beibehaltung des probenspezifischen pH-Wertes erfolgen. Die Tatsache, dass Mikroorganismen in sehr sauren Biofilmen mittels allgemeiner, kommerzieller Fluoreszenzfarbstoffe nicht für fluoreszenzmikroskopische Messungen zu markieren sind, ohne zuvor den pH-Wert zu erhöhen, bedingte die Suche nach alternativen Lösungen. In diesem Zusammenhang wurden in Kooperation mit der Firma DYOMICS (Jena, Deutschland) 19 potentiell geeignete Fluoreszenzfarbstoffe hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Anfärbung von Mikroorganismen in natürlichen, sauren Biofilmen entwickelt und ihre Anwendung getestet. Dabei wurden durch die Firma DYOMICS speziell Farbstoffe zur Verfügung gestellt, welche aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung säurestabil sein müssten und eine Fluoreszenzemission außerhalb des Emissionsbereiches von Uran aufweisen. In Tabelle 12 sind alle getesteten Farbstoffe zusammen mit Angaben u.a. zu den Anregungs- und Emissionsbereichen, den Molmassen sowie zur Löslichkeit aufgelistet. Bei allen Farbstoffen handelte es sich um neue, bisher ungetestete Substanzen, welche zum Zeitpunkt dieser Studie kommerziell noch nicht erwerbbar waren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit umfangreiche Testreihen mit diesen 19 Farbstoffen an den Biofilmen aus der Grube in Königstein durchgeführt.

Tabelle 12: Angaben zu den 19 Farbstoffen laut DYOMICS

Nr.	Name bzw. Herstellernummer	Anregung/Emission	Extinktionskoeffizient	Molare Masse	Löslich in
		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	ϵ [l/mol · cm]	M [g/mol]	
1	V02-04073	$\lambda_{ex} = 608$ $\lambda_{em} = 632$	130.000	622,74	Wasser
2	DY-601XL	$\lambda_{ex} = 608$ $\lambda_{em} = 627$	130.000	724,79	Wasser
3	V07-04116	$\lambda_{ex} = 640$ $\lambda_{em} = 670$	49.000	574,56	Methanol, DMF oder DMSO
4	V07-05018	$\lambda_{ex} = 637$ $\lambda_{em} = 672$		518,43	Methanol, DMF oder DMSO
5	V07-05017	$\lambda_{ex} = 650$ $\lambda_{em} = 667$		534,45	Methanol, DMF oder DMSO
6	V06-05038/2	$\lambda_{ex} = 642$ $\lambda_{em} = 670$		477,67	Methanol, DMF oder DMSO
7	V06-05038/1	$\lambda_{ex} = 642$ $\lambda_{em} = 668$		519,71	Methanol, DMF oder DMSO
8	BS 140A	$\lambda_{ex} = 685$ $\lambda_{em} = 715$	39.000	540,45	Methanol, DMF oder DMSO
9	BS 153B	$\lambda_{ex} = 560$ $\lambda_{em} = 622$	28.000	516,39	Methanol, DMF oder DMSO
10	V07-04118	$\lambda_{ex} = 631$ $\lambda_{em} = 643$	138.000	614,58	Methanol, DMF oder DMSO
11	V07-04140	$\lambda_{ex} = 631$ $\lambda_{em} = 649$		644,60	Methanol, DMF oder DMSO
12	V07-04146	$\lambda_{ex} = 626$ $\lambda_{em} = 652$		674,63	Methanol, DMF oder DMSO
13	V07-04144	$\lambda_{ex} = 632$ $\lambda_{em} = 653$		674,63	Methanol, DMF oder DMSO
14	BS 5	$\lambda_{ex} = 635$ $\lambda_{em} = 656$		542,47	Methanol, DMF oder DMSO
15	V02-04064	$\lambda_{ex} = 624$ $\lambda_{em} = 660$	160.000	586,52	Methanol, DMF oder DMSO
16	DY-613	$\lambda_{ex} = 610$ $\lambda_{em} = 636$		499,01	Methanol, DMF oder DMSO
17	V07-03057	$\lambda_{ex} = 530$ $\lambda_{em} = 581$	50.000	556,53	Methanol, DMF oder DMSO
18	V07-03058	$\lambda_{ex} = 550$ $\lambda_{em} = 577$		476,40	Methanol, DMF oder DMSO
19	V10-03127	$\lambda_{ex} = 596$ $\lambda_{em} = 690$	50.000	426,48	Methanol, DMF oder DMSO

Ergebnisse der Farbstofftests

Die Farbstoffe wurden sowohl an den Biofilmen aus der Drainagerinne (P1) als auch an den tropfsteinähnlichen Biofilmen (P2) getestet. Nicht alle der 19 Farbstoffe waren jedoch geeignet für die Anfärbung der sauren Biofilmprouben. In den ersten Versuchen führten viele der Farbstoffe zu keiner oder nur schwacher Fluoreszenz der Mikroorganismen. Dennoch konnten 4 Farbstoffe gefunden werden, welche besonders gut die Mikroorganismen in den Biofilmen anfärbten (Brockmann et al., 2010). Diese vier Farbstoffe sind DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613 (diese sind in Tabelle 12 „fett“ hervorgehoben). Die

Strukturformeln dieser Farbstoffe sowie die grundlegenden Eigenschaften wurden in Abbildung 27 und in Tabelle 13 dargestellt.

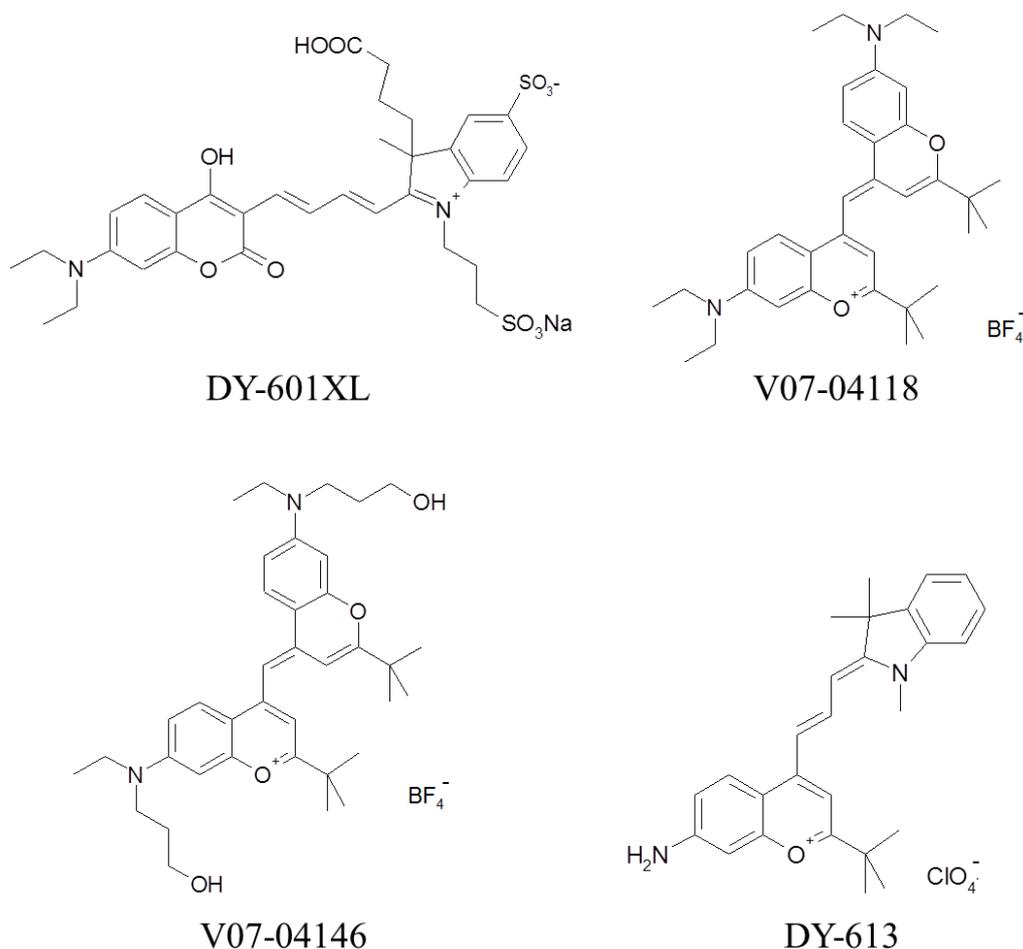


Abbildung 27: Strukturformeln der vier, zur Anfärbung im sauren Milieu geeigneten Farbstoffe DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613 (Abbildung aus (Brockmann et al., 2010))

Tabelle 13: Eigenschaften der vier Farbstoffe DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613

Farbstoff	Molekulare Formel	Molekulare Masse [g/mol]	Absorptionsmaximum ¹ λ_{abs} [nm]	Emissionsmaximum ¹ λ_{em} [nm]	Molare Absorbanz ¹ ϵ [l/mol·cm]
DY-601XL	C ₃₃ H ₃₇ N ₂ O ₁₁ S ₂ · Na	724,79	604	641	130,000
V07-04118	C ₃₅ H ₄₇ N ₂ O ₂ · BF ₄	614,58	616	650	138,000
V07-04146	C ₃₇ H ₅₁ N ₂ O ₂ · BF ₄	674,63	618	649	125,000
DY-613	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O · ClO ₄	499,01	614	639	200,000

¹ gemessen in Methanol

Bei Farbstoff DY-601XL handelt es sich um ein Hydroxy-Cumarin-Derivat mit einem hydrophoben Hydroxyl-Cumarin-Teil (mit Diethyl-Amino-Gruppe) und einem hydrophilen substituierten Molekülteil bestehend aus einer Fischerbase mit zwei Sulfonaten. Bei besonders sauren Bedingungen mit pH-Werten < 3 bildet dieser Farbstoff eine Hydroxy-

Benzopyrylium-Verbindung aus, welche sehr säurestabil ist. Von diesem Farbstoff sind ausgeprägte Proteinfärbe-Eigenschaften zu erwarten (Wenzel et al., 2006). Die anderen drei Farbstoffe V07-04118, V07-04146 und DY-613 sind alle unpolare Derivate von 1-Benzopyrylium-Verbindungen mit Substituenten wie tert-Butyl-, Diethylamino- bzw. Ethyl-(3-hydroxypropyl)amino- und Methyl-Gruppen. Wie in Abbildung 27 gut erkennbar ist, weist die Grundstruktur des Farbstoffs DY-613 eine Kombination aus einem 1-Benzopyryliumteil und einer Fischerbase auf. Die weiteren zwei Farbstoffe V07-04118, V07-04146 sind symmetrische Monomethine von 1-Benzopyryliumverbindungen. Die Stabilität bei extrem sauren Bedingungen ist eine typische Eigenschaft von 1-Benzopyryliumverbindungen (Czerney und Hartmann, 1991). Diese Eigenschaft wird noch zusätzlich durch den Einsatz der sterisch abschirmenden tert-Butyl-Gruppe in der 2-Position am Molekül verstärkt. Weiterhin ist es aufgrund der positiven Ladung der drei Farbstoffe (V07-04118, V07-04146 und DY-613) sehr wahrscheinlich, dass diese als Intercalator wirken. Es sind jedoch auch andere Bindungsarten möglich. Da alle vier beschriebenen Farbstoffe kationisch sind, sollten sie nicht in der Lage sein, intakte Zellwände zu penetrieren. Es wird daher vielmehr erwartet, dass sie lediglich an die Zellmembran binden. Diese Eigenschaft konnte aber noch nicht sicher nachgewiesen werden.

DYOMICS-Mitarbeiter haben die entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren der vier neuen Farbstoffe aufgenommen, welche in Abbildung 28 dargestellt sind. Anhand dieser Spektren ist deutlich der ideale Anregungsbereich bei Wellenlängen > 600 nm (siehe Absorptionsspektrum) zu erkennen.

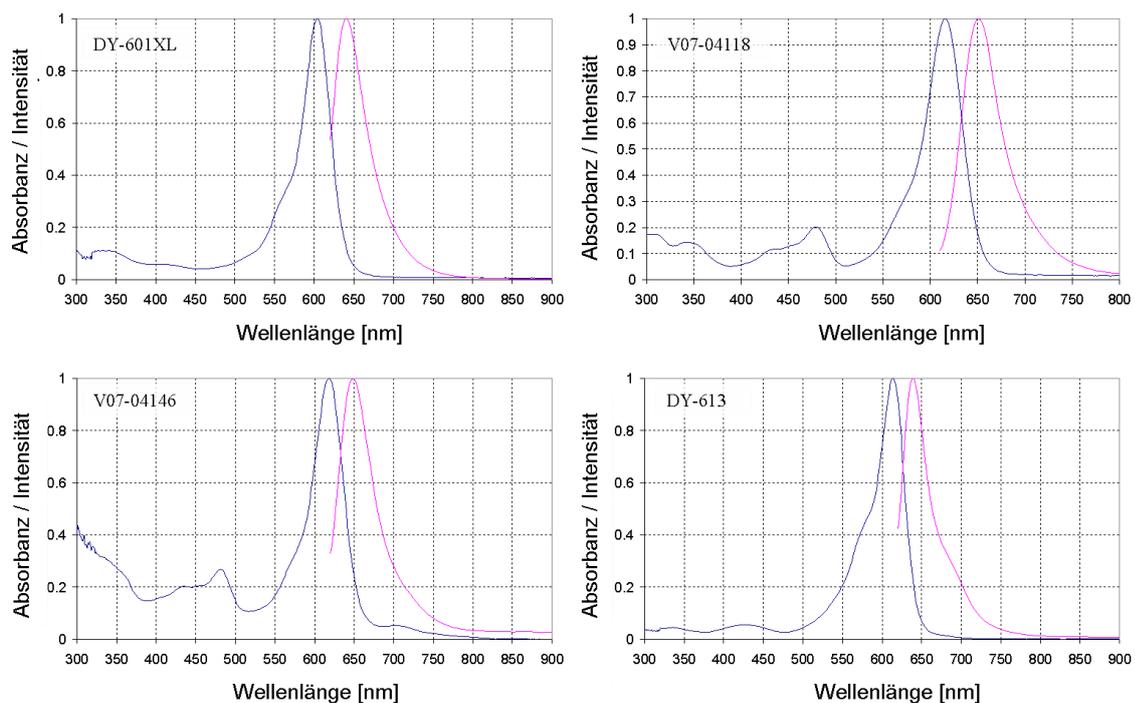


Abbildung 28: Absorptions- (blau) und Emissions- (rot) Spektren der vier neuen Farbstoffe

Die entsprechenden Emissionen aller vier geeigneten neuen Farbstoffe liegen somit weit außerhalb des Emissionsbereiches von Uran im rot-fluoreszierenden Bereich. Aufgrund dieser Eigenschaft sind diese Farbstoffe ideal für Untersuchungen von Uranakkumulationen in sauren Biosystemen.

Alle vier Farbstoffe wurden an den gleichen Biofilmen, welche in entsprechende Stücke geschnitten wurden, am selben Tag getestet, um möglichst vergleichbare Bedingungen für alle Farbstoffe zu ermöglichen. Für den Vergleichstest der vier Farbstoffe wurden sowohl der Biofilm vom Probenpunkt P1 (Drainagerinne) als auch der Biofilm von Probenpunkt P2 (tropfsteinähnliche Biofilme) verwendet. Als Vergleich wurde auch jeweils ein Teil der Biofilme mit den herkömmlich verwendeten Farbstoffen DAPI und SYTO 59 angefärbt, um die Besonderheit der neuen Farbstoffe gegenüber den bisher eingesetzten zu verdeutlichen. Alle Anfärbungen fanden ohne Veränderung des Proben-pH-Wertes statt, indem die Farbstoffe im entsprechenden (steril filtriertem) Grubenwasser auf die Anwendungskonzentration verdünnt wurden. Wie zu erwarten war zeigten die neuen vier Farbstoffe die besten Resultate, mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem eingestellten Detektionsbereich für die Emission von (645 – 750) nm. Die gleichen Einstellungen wie für die neuen Farbstoffe wurden zur Anregung der mit SYTO 59 gefärbten Biofilme verwendet. Lediglich für die Messung der mit DAPI angefärbten Proben mussten andere Einstellungen verwendet werden. Für DAPI wurde eine Anregungswellenlänge von 351 nm und ein Emissionsbereich von 400 – 531 nm gewählt. Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt.

Sowohl die Aufnahmen des gefärbten Biofilms aus der Drainagerinne, als auch die des tropfsteinähnlichen Biofilms zeigen deutlich, dass alle vier neuen Farbstoffe in der Lage sind die Mikroorganismen in den Biofilmen trotz der extrem sauren Bedingungen anzufärben. Die optische Auflösung der Bilder lässt es zu, einzelne Mikroorganismen zu differenzieren. Die Vergleichsaufnahmen mit DAPI oder auch mit SYTO 59 sind sichtbar schlechter und ermöglichen keine entsprechende Visualisierung von Mikroorganismen aufgrund der unzureichenden Anfärbung. Vor dem Hintergrund, dass bei Einsatz der neuen Farbstoffe die Umgebungsbedingungen in den Biofilmen deutlich weniger verändert werden als beim Einsatz kommerzieller Farbstoffe, zeigt sich der enorme Vorteil dieser. Dieser Vergleich verdeutlicht noch einmal die Notwendigkeit der neuen säurestabilen Farbstoffe bei der Untersuchung natürlicher saurer Proben. Durch das Beibehalten des natürlichen pH-Wertes konnten chemische Veränderungen z.B. des Löslichkeitsgleichgewichtes oder der Schwermetallspeziation verursacht durch die Anfärbung minimiert werden.

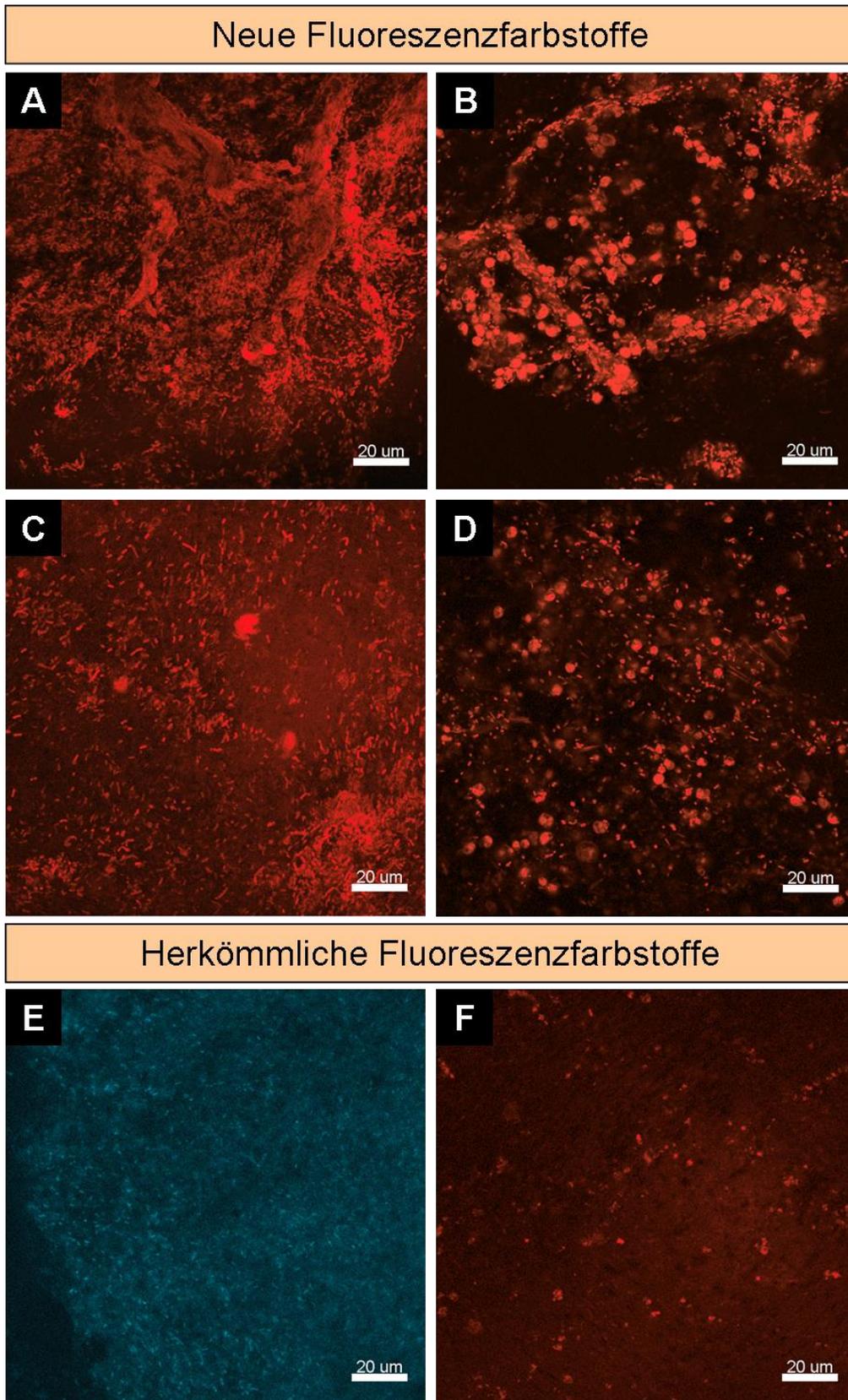


Abbildung 29: Überblick über die Resultate der Anfärbung des Biofilms aus der Drainagerinne, Vergleich der neuen Farbstoffe mit zwei herkömmlichen. A: DY-601XL; B: V07-04118; C: V07-04146; D: DY-613, E: DAPI; F: SYTO 59

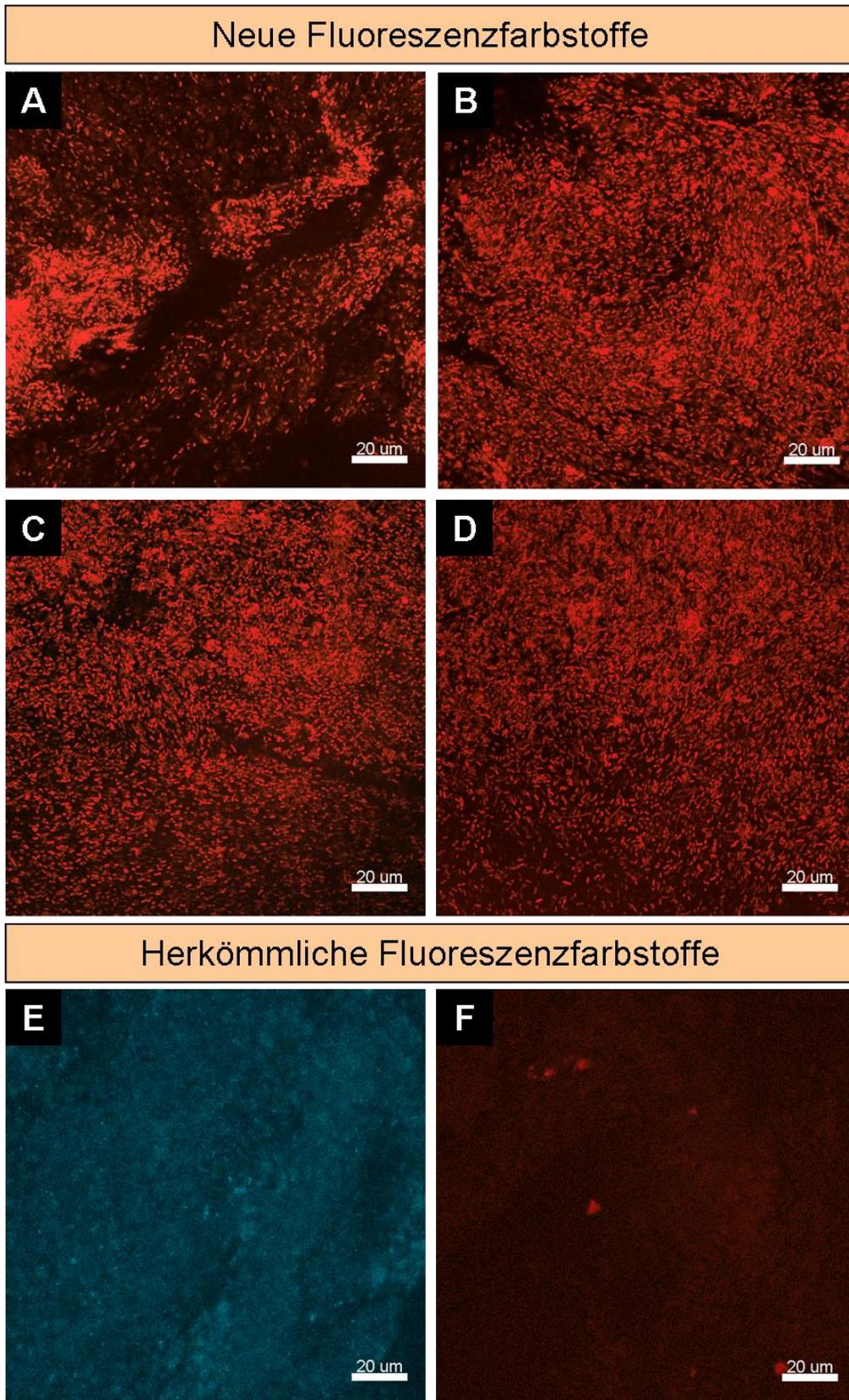


Abbildung 30: Überblick über die Resultate der Anfärbung des tropfsteinähnlichen Biofilms, Vergleich der neuen Farbstoffe mit zwei herkömmlichen. A: DY-601XL; B: V07-04118; C: V07-04146; D: DY-613, E: DAPI; F: SYTO 59

3.2. Biofilme von der Gessenwiese (bei Ronneburg, Thüringen)

In der Nähe der Stadt Ronneburg im östlichen Thüringen wurde im Rahmen des Uranerzabbaus Ende 1970 die Gessenhalde als Laugungshalde aus Armerzen in einem ehemaligen Lehmtagebau angelegt. Mittels verdünnter Schwefelsäure oder sauren Grubenwässern wurde das Uran aus dem geförderten Gestein herausgelöst und anschließend aus der Lösung abgetrennt. Im Jahr 1989 wurde dieser Prozess eingestellt. Zurück blieb die Gessenhalde, welche wegen ihres Säurebildungspotentials den höchsten Gefährdungsgrad aller Halden im Ronneburger Abbauggebiet besaß. In den Jahren von 1990 bis 1995 wurde das stark säurebildende Gestein der Gessenhalde in das Tagebautiefste umgelagert. Anschließend wurde in den Jahren 1997 bis 2000 die ehemalige Aufstandsfläche der Gessenhalde mit Mineralboden abgedeckt und somit wieder nutzbar gemacht (Wismut, Download 10.05.2013). Die Lage der Gessenhalde sowie eine Luftaufnahme aus dem Jahr 1993 ist in Abbildung 31 dargestellt.

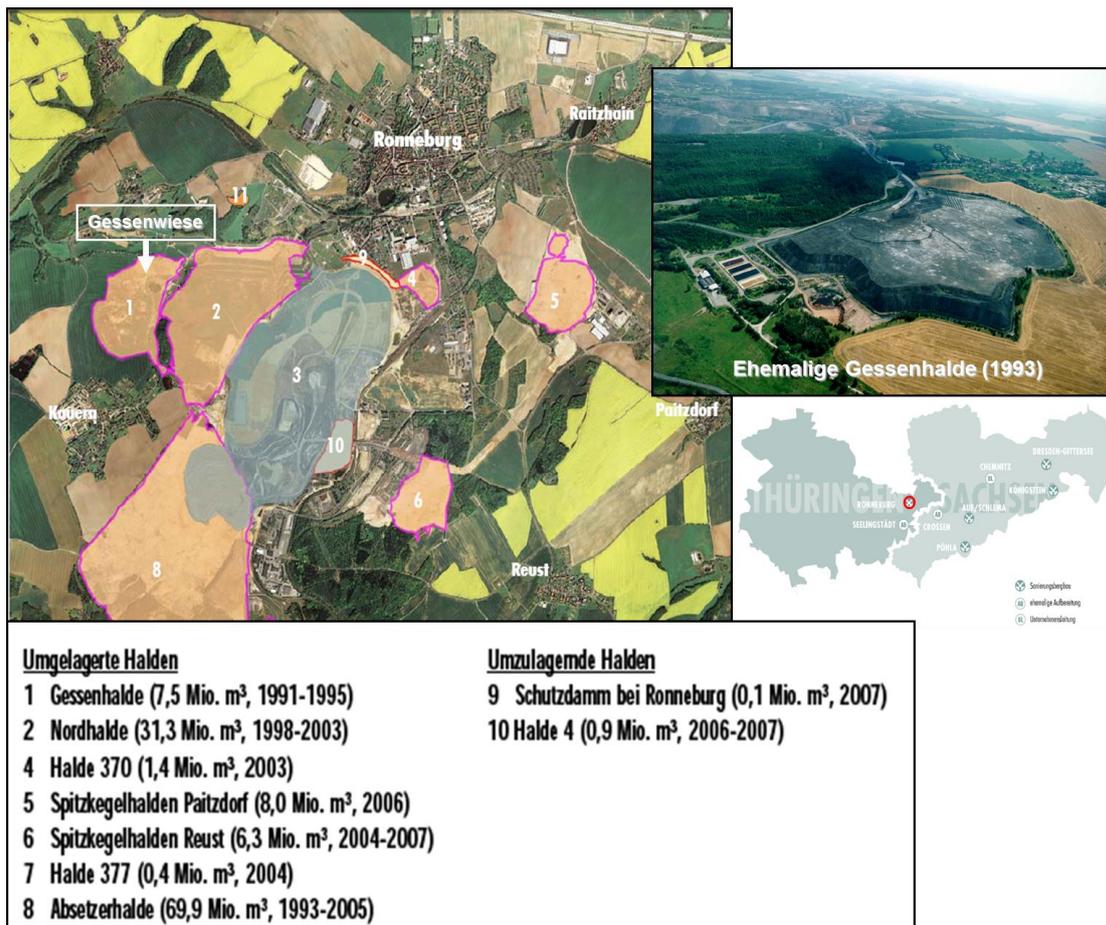


Abbildung 31: Überblick über den Standort der ehemaligen Gessenhalde; Bild links: Luftaufnahme über das Haldengebiet in der Umgebung von Ronneburg (Altmann et al., 2006); Bild rechts oben: Luftbildaufnahme der Gessenhalde vom Jahre 1993 (übernommen von der Internetseite des Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Forsten, Umwelt und Naturschutz (TMLNU, Download am 18.05.2013))

Eine ausführliche Beschreibung der Gessenhalde/-wiese und der dort durchgeführten Sanierungsarbeiten ist von Carlsson und Büchel (2005) veröffentlicht. Im ehemaligen Aufstandsgebiet der Gessenhalde, heute genannt Gessenwiese, an einem Wasserleiter, welcher austretendes Flutungswasser und Oberflächenwasser abführt, wurden im Jahr 2009 im Rahmen dieser Arbeit Biofilme beobachtet und untersucht.

Im Bereich der Gessenwiese ist bis heute die Vegetation sehr spärlich ausgeprägt. Auf den ersten Blick fallen nur einige wenig anspruchsvolle Gräserarten und einige kleine Birken auf. In einem Rinnsal aus austretenden Grubenflutungswässern und Oberflächenwasser im Bereich der Gessenwiese waren an der Wasseroberfläche dicke Matten aus Biofilm aufgewachsen. Die Wässer in diesem Rinnsal waren, typisch für AMD-Gewässer, sehr sauer und mit Schwermetallen belastet. Abbildung 32 zeigt den Wasserleiter auf der Gessenwiese mit dem großflächig aufgewachsenen Biofilm. Im Gegensatz zu den Biofilmen in Königstein, welche immer an einer festen Oberfläche angewachsen waren, sind die Biofilme auf der Gessenwiese überwiegend an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser aufgewachsen und schwimmen auf der Wasseroberfläche. Diese Biofilme unterschieden sich optisch sehr von denen aus Königstein. Wie die grünliche Farbe vermuten lässt, war hier der Algenanteil in den Biofilmen sehr hoch. Filamentöse Algen vernetzten die Biofilmgemeinschaft stark miteinander zu großen Biofilmmatten, denen auch eine gewisse Wasserströmung nichts anhaben konnte.

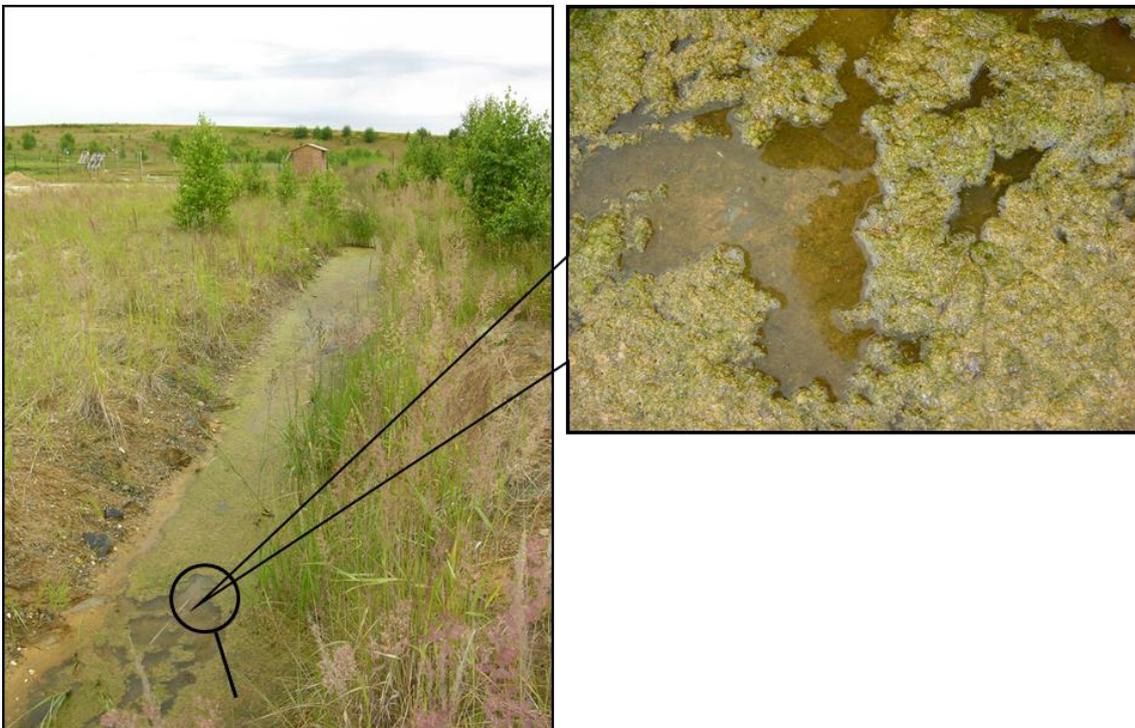


Abbildung 32: Foto des Rinnsals auf der Gessenwiese sowie Nahaufnahme des Biofilms auf der Wasseroberfläche (Aufnahmen vom 06. Juli 2009)

3.2.1. Charakterisierung der Wässer und Biofilme

Die Wässer aus dem Rinnsal von der Gessenwiese und die darauf gewachsenen Biofilme wurden zunächst auf ihre chemische Zusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse der Kationen-/Anionen-Analysen sind entsprechend in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Analysenergebnisse der Wässer und Biofilmtrockenmassen

	Wässer		Biofilme		
	Mittelwert	min - max	Mittelwert	min - max	
	mg/l		mg/g		
Cl ⁻	79,92	48,85 - 140	n.d.		
SO ₄ ²⁻	4179	3520 - 5887			
Na	10,58	7,04 - 13,83	2,09	1,39 - 3,76	
Mg	870,17	622,00 - 1066,67	10,06	6,73 - 12,22	
Al	60,45	30,10 - 81,90	40,67	26,94 - 63,29	
Si	26,85	18,60 - 32,80	144,97	88,62 - 26,23	
K	4,43	3,17 - 5,35	20,38	16,53 - 30,02	
Ca	377,60	324,00 - 446,00	8,11	6,04 - 10,96	
Mn	106,15	64,90 - 137,00	0,97	0,50 - 1,28	
Fe	4,59	0,62 - 8,07	50,80	3,64 - 61,20	
Co	3,11	2,05 - 3,98	0,045	0,030 - 0,054	
Ni	15,00	10,30 - 19,60	0,19	0,12 - 0,24	
Cu	0,85	0,054 - 1,47	0,16	0,080 - 0,20	
Zn	3,48	1,76 - 4,78	0,12	0,11 - 0,15	
	µg/l		µg/g		
Sr	672,87	482 - 856	77,36	64,45 - 109,40	
Cd	62,54	14,1 - 91,8	0,93	0,79 - 1,11	
Cs	0,04	<0,1 - 0,05	5,58	3,75 - 9,11	
Ba	11,93	9,68 - 17,2	462,52	276,71 - 768,54	
U	802,21	75,1 - 1450	102,60	20,43 - 177,93	
Ce	531,10	335 - 701	54,82	39,58 - 90,78	
Pr	39,19	18,4 - 57,2	6,04	4,03 - 10,33	
Nd	201,32	97,2 - 296	24,52	17,51 - 40,33	
Sm	74,52	33,9 - 114	5,81	4,83 - 8,30	
Eu	24,63	10,9 - 38,5	1,42	1,26 - 1,84	
Gd	125,15	60,6 - 184,67	6,39	5,56 - 8,37	
Tb	22,95	11,4 - 33,9	0,91	0,83 - 1,06	
Dy	128,85	68,2 - 185	5,04	4,64 - 5,57	
Ho	27,08	14,4 - 37,8	0,98	0,92 - 1,05	
Er	75,76	38,9 - 107	2,61	2,11 - 2,97	
Tm	10,83	4,89 - 16,3	0,38	0,36 - 0,42	
Yb	60,87	27,8 - 86,2	2,53	2,35 - 2,80	
Th	0,43	<0,1 - 0,538	40,63	4,76 - 146,00	
Pb	10,48	0,78 - 64,4	14,77	10,23 - 24,77	
Ti	<10		3266,26	2038,53 - 5822,78	

Die Analysenwerte der Wässer sind Mittelwerte von neun verschiedenen Proben, die zum Teil auch bei verschiedenen Probennahmekampagnen im Zeitraum von März bis August 2009 genommen wurden. Für die Werte der Biofilmtrockenmassen wurden die Analysen von insgesamt vier Proben aus zwei verschiedenen Probennahmen von April und August 2009 gemittelt. Für alle Gehaltsangaben wurden die minimalen bzw. maximalen Extremwerte aufgeführt, denn aufgrund der obererdigen Lage sind die Kationen-/Anionengehalte sehr jahreszeiten- und witterungsabhängig und schwanken z.T. sehr stark. So wurden besonders hohe Ionenkonzentrationen in den Proben gemessen, welche in den Sommermonaten genommen wurden, da hier deutlich weniger Niederschläge auftraten und der Wasserstand in dem kleinen Rinnsal zum Teil äußerst gering war.

Auffällig ist der sehr erhöhte Sulfatwert in den Wasserproben, welcher den Grenzwert von 240 mg/l laut Trinkwasserverordnung um etwa das 14-24fache übersteigt. Diese sehr hohen Sulfatkonzentrationen resultieren aus der chemischen Laugung des Erzes, das nach der Behandlung mit Säure im Bereich der Gessenwiese über viele Jahre gelagert wurde. Die Sulfatwerte sind bis zu doppelt so hoch wie die gemessenen Werte des Grubenwassers, welches von den tropfsteinähnlichen Biofilmen in der Grube in Königstein gesammelt wurde. Die Urangelhalte in den Wässern von der Gessenwiese liegen wiederum deutlich niedriger als in Königstein mit (75,1 – 1450) µg/l was einer Konzentration von $(3,1 \cdot 10^{-7} - 6,1 \cdot 10^{-6})$ mol/l entspricht. Von den Wasserproben wurden außerdem die pH-Werte bestimmt. Das Wasser in dem Rinnsal auf der Gessenwiese hatte im beprobten ersten Halbjahr des Jahres 2009 stets einen pH-Wert im Bereich von $(3,6 - 3,9) \pm 0,1$. Damit ist das Wasser trotz der erheblichen Sulfatwerte nicht ganz so sauer wie das Grubenwasser aus Königstein.

Wasser aus dem kleinen Rinnsal, in dem sich die Biofilme befanden, wurde bei einer Probenentnahme am 14.04.2010 in sterile Flaschen gefüllt und im Labor filtriert. Die filtrierten Wässer wurden anschließend auf die darin enthaltene Uranspeziation mittels TRIFS untersucht. Abbildung 33 zeigt das aufgenommene Fluoreszenzemissionsspektrum des Wassers von der Gessenwiese bei einer Laserlichtanregung mit 266 nm Wellenlänge (Nd-YAG Laser, Minilite, Continuum). Es ist die, für Uran(VI)verbindungen typische Aufspaltung des Signals zu erkennen. Trotz der niedrigeren Urankonzentrationen, verglichen mit den Proben aus Königstein, kann eine sehr intensive Uranfluoreszenzemission detektiert werden. Dies zeigt die sehr gute Empfindlichkeit der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie. In Tabelle 15 sind die mittleren Lagen der Emissionsmaxima zusammengetragen und verglichen mit Messungen von Baumann et al. (2012) dargestellt, welcher ebenfalls Wässer des gleichen Rinnsals auf ihre Uranspeziation untersucht hat. Weiterhin sind die Emissionsmaxima einer U-SO₄-Standardlösung eingetragen.

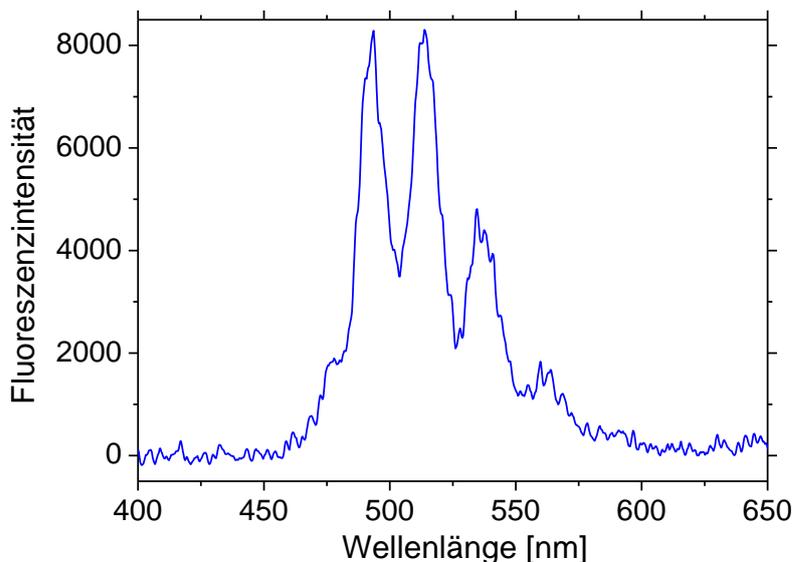


Abbildung 33: Fluoreszenzemissionsspektrum des Wassers aus dem Rinnsal von der Gessenwiese (Anregung mit 266 nm; Detektion nach 240 ns)

Tabelle 15: Vergleich der Lage der Emissionsbandenmaxima und der Lebenszeit der Wasserprobe aus dem Rinnsal auf der Gessenwiese mit einer U-SO₄-Standardprobe

Probe	Emissionsbanden [nm]						Lebenszeit [μs]	Referenz
Wasser von Gessenwiese	476,9 ± 1,0	493,2 ± 0,5	514,3 ± 0,7	537,1 ± 1,2	562,0 ± 3,5	n.d.	1,5 ± 0,1	diese Arbeit
OW1	477,2	491,5	513,3	536,8	562,1	591,3	1,6	Baumann et al. (2012)
OW2	477,7	492,0	512,7	537,6	562,5	590,1	1,0	Baumann et al. (2012)
U-SO ₄ Standard	477,5	492,8	514,1	537,5	563,0	590,1	4,72	Arnold et al. (2011)
Abweichung Probe vom Standard [nm]	- 0,6	+0,4	+0,2	-0,4	-1,0		-3,2	

Wie der direkte Vergleich zeigt, stimmen die mittleren Lagen der Emissionsmaxima der Wasserproben von der Gessenwiese mit denen der Standard-Uransulfatspezies überein. Die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzmessung zeigt einen mono-exponentiellen Zerfall, was auf eine einzige in den Proben vorhandene Uranspezies deutet. Ein Beispiel für eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung sowie für eine Abklingkurve der Fluoreszenz ist in Abbildung 34 dargestellt. Die resultierende Lebenszeit ist ebenfalls in Tabelle 15 angegeben und ist recht gut mit den Werten von Baumann et al. (2012) vergleichbar. Die kürzeren Fluoreszenzlebenszeiten bei den Wässern von der Gessenwiese, im Vergleich zu der Lebenszeit der Standardlösung, sind auf die Gegenwart diverser Lumineszenz-querchender Substanzen, wie z.B. Eisen, Mangan sowie verschiedene organische Verbindungen in den natürlichen Proben zurückzuführen (Baumann et al., 2012). Die gute Übereinstimmung der Emissionsmaxima mit denen der U-SO₄-Standardlösung und das beobachtete mono-exponentielle Abklingen des Fluoreszenzsignals mit der Zeit lassen auf eine Uran(VI)sulfat-

Spezies $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ als dominierende Spezies in den Wässern schließen (Baumann et al., 2012). Entsprechende Speziationsrechnungen (Geochemist's Workbench(TM) Version 9.0.3, Modul "React", Thermodynamische Daten von Uran nach NEA (Guillaumont et al., 2003)) von U(VI) unter Verwendung der gemessenen Ionenkonzentrationen im Wasser von der Gessenwiese bestätigen Uransulfat-Verbindungen als dominierende Spezies im vorherrschenden pH-Bereich. Wie Abbildung 35 zeigt sind die 1:1 und 1:2 Uranyl-Sulfatkomplexe die dominierenden Spezies aufgrund des sehr hohen Sulfatgehaltes in den Wässern.

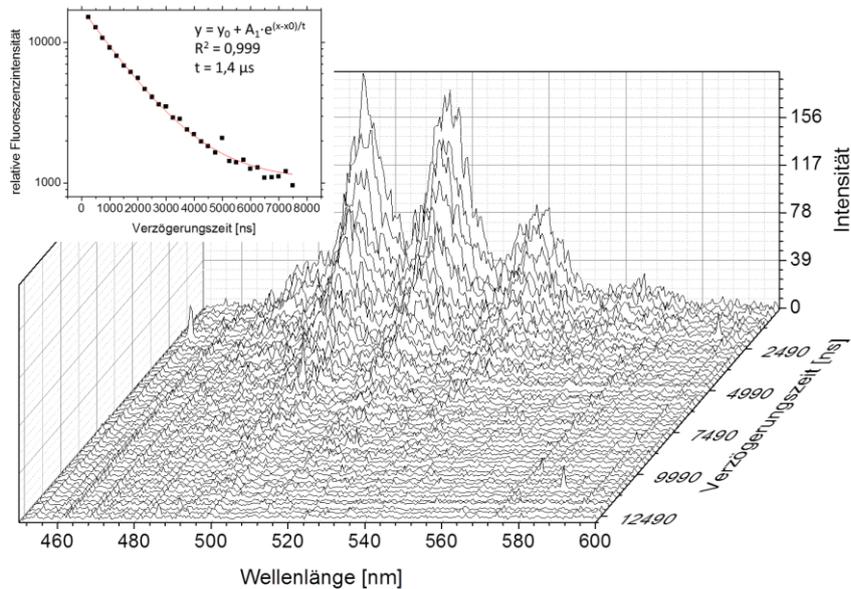


Abbildung 34: Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung und Abklingkurve des Fluoreszenzsignals

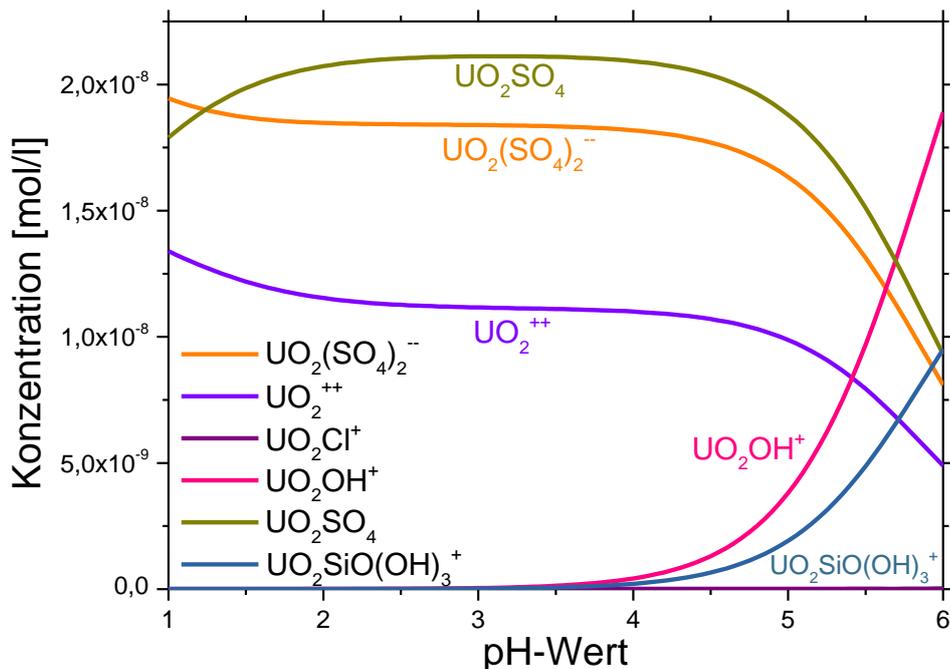


Abbildung 35: Speziationsdiagramm für U(VI) in den Wässern aus dem Rinnsal auf der Gessenwiese (Geochemist's Workbench(TM) Version 9.0.3, Modul "React", Thermodynamische Daten von Uran nach NEA (Guillaumont et al., 2003))

Zusammensetzung der EPS-Hauptbestandteile

Die Bestimmung der Hauptbestandteile der EPS der Biofilme aus dem Rinnsal der Gessenwiese fand zusammen mit der Analyse der Proben aus Königstein innerhalb einer, im Rahmen dieser Arbeit von mir betreuten Diplomarbeit von Frau Ines Gründig im Jahr 2009 statt. Die Proben wurden daher in exakt der gleichen Art und Weise präpariert und analysiert.

Der Wassergehalt der Biofilme von der Gessenwiese schwankte im Bereich von (75,0 – 91,6) %. Dies war abhängig von den Witterungsbedingungen im Zeitraum der Probenentnahme und von der Einlagerung von Sedimenten in den Biofilmen. Die Ergebnisse der EPS-Analysen für die Biofilme aus dem Rinnsal der Gessenwiese sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Es sind, ebenso wie bei den Analysen der Biofilme aus Königstein, deutlich erhöhte Werte nach der EPS-Extraktion mittels Dowex zu beobachten. Durch die Behandlung der Biofilme mit dem Kationenaustauscherharz Dowex wurden Ca^{2+} -Bindungen gelockert wodurch anschließend ein Großteil der EPS extrahiert werden konnte. Durch die Ultraschall-Behandlung wurden im Gegensatz dazu nur relativ schwache Bindungen gelöst, was zu einer geringeren EPS-Ausbeute bei der Extraktion führte. Bei den Gehalten an Proteinen und Kohlenhydraten lag der Biofilm von der Gessenwiese etwa zwischen den beiden untersuchten Biofilmen aus Königstein. Die Lipidgehalte waren allerdings nochmals höher als bisher gemessen und machten den größten Anteil der analysierten EPS aus.

Tabelle 16: Analysenergebnisse der Hauptbestandteile in den EPS des Biofilms von der Gessenwiese

EPS-Bestandteile	Extraktionsmethode	Biofilm von der Gessenwiese
		$\mu\text{g}/\text{g}_{\text{Btm}}$
Proteine	Dowex	283,7 \pm 7,0
	Ultraschall	74,3 \pm 1,3
Kohlenhydrate	Dowex	1265,7 \pm 2,8
	Ultraschall	314,2 \pm 5,1
Uronsäuren	Dowex	154,5 \pm 5,1
	Ultraschall	n.d.
Lipide	mit Chloroform	6700 \pm 800

Zusammensetzung der Mikrobiellen Diversität der Biofilme

Die mikrobielle Diversität der Biofilme von der Gessenwiese wurde ebenso wie bei den Biofilmen aus Königstein, im Rahmen von zwei Diplomarbeiten in Zusammenarbeit mit der TU-Dresden untersucht.

Die Biofilme von der Gessenwiese wurden stark von photosynthesebetreibenden Eukaryoten dominiert. Bakterien sind in den Biofilmen dennoch reichlich vorhanden. Für die Bestimmung der Biodiversität der Eukaryoten der Biofilme aus dem Rinnsal der Gessenwiese wurden die Häufigkeiten aus den Ergebnissen der 18S rDNA PCR und den lichtmikroskopischen Methoden zusammengestellt. Die Ergebnisse der Eukaryoten-Diversität zeigt Abbildung 36. Dabei handelt es sich um gemittelte Werte von drei verschiedenen Probenentnahmen, vom April, Juni und Juli 2010, von jeweils zwei verschiedenen Stellen an dem Rinnsal. Die Diversität der Eukaryoten wurde durch Grünalgen (z.B. *Microspora sp.* und *Klebsormidium sp.*) sowie von Kieselalgen (z.B. *Nitzschia sp.*) dominiert.

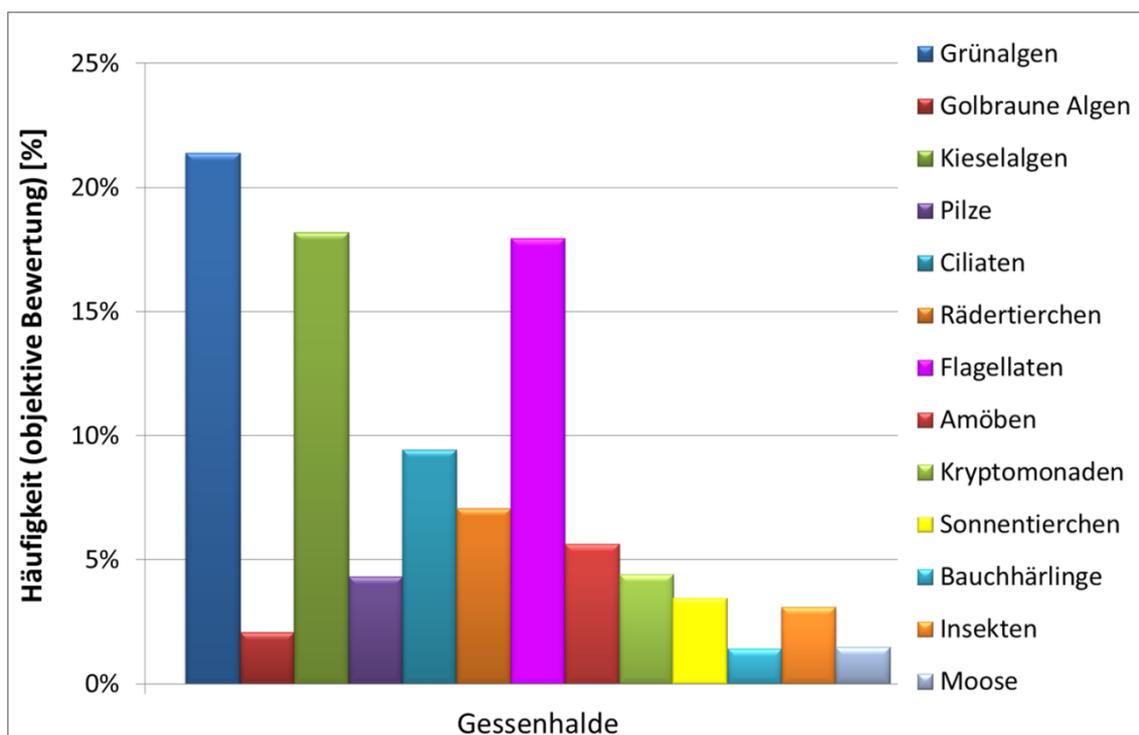


Abbildung 36: Häufigkeiten verschiedener Eukaryoten im Biofilm von der Gessenwiese; Daten übernommen von Zirnstein (2010)

Ein genereller Überblick über die bakterielle Diversität in den Biofilmen von der Gessenwiese wurde mittels CARD-FISH-Analysen von C. Meierhöfer (2009) ermittelt. Die untersuchten Biofilme waren stets dominiert von Alpha-Proteobakterien, wie die Ergebnisse in Abbildung 37 zeigen.

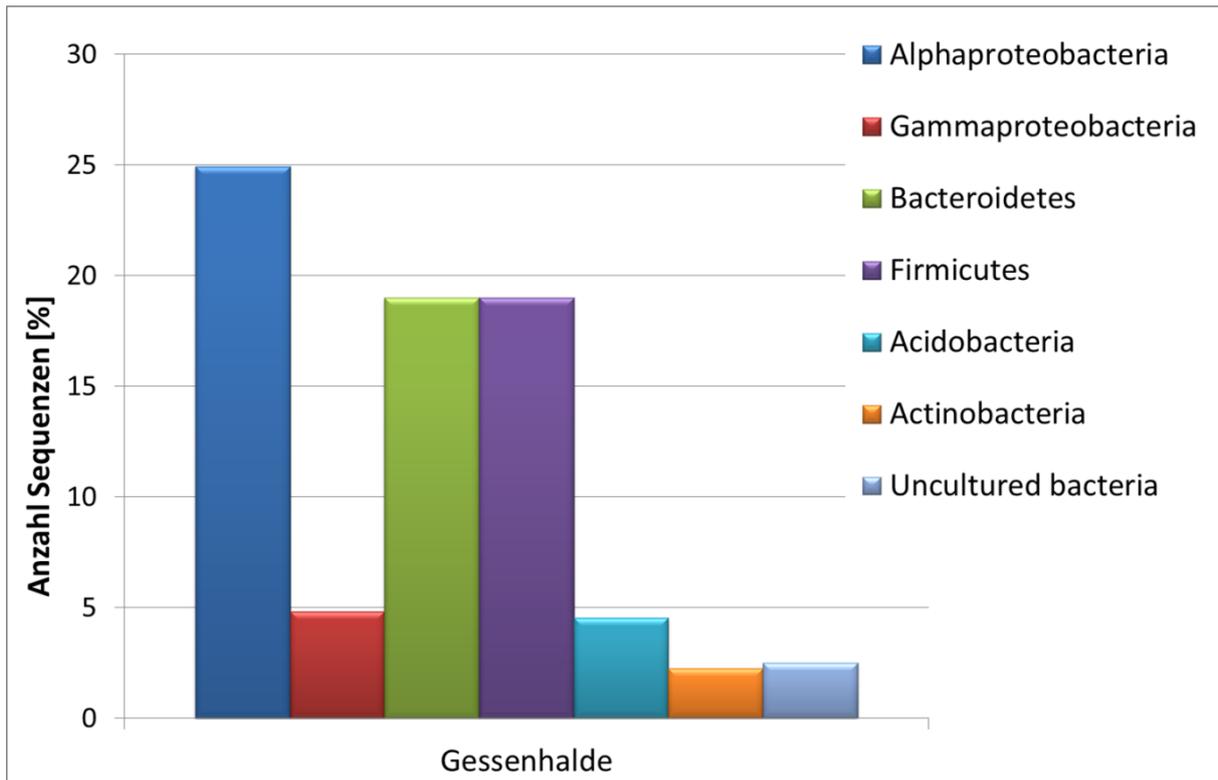


Abbildung 37: Zusammensetzung der bakteriellen Diversität der Gessenwiesenbiofilme; Daten übernommen von C. Meierhöfer (2009)

3.2.2. Visualisierung und Identifizierung der Mikroorganismen und des Urans

Lichtmikroskopie: Identifizierung von Mikroorganismen

Da die Biofilme von der Gessenwiese von Eukaryoten dominiert wurden, bot sich die einfache Lichtmikroskopie an um einen Großteil der Arten auf diese Weise zu identifizieren. Eine detaillierte Identifizierung der Eukaryoten wurde von I. Zirnstein (2010) durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen mikroskopischen Analysen der eukaryotischen Arten sind bereits in die Ergebnisse im vorangegangenen Kapitel eingeflossen. Abbildung 38 zeigt hier noch einmal die wichtigsten Vertreter.

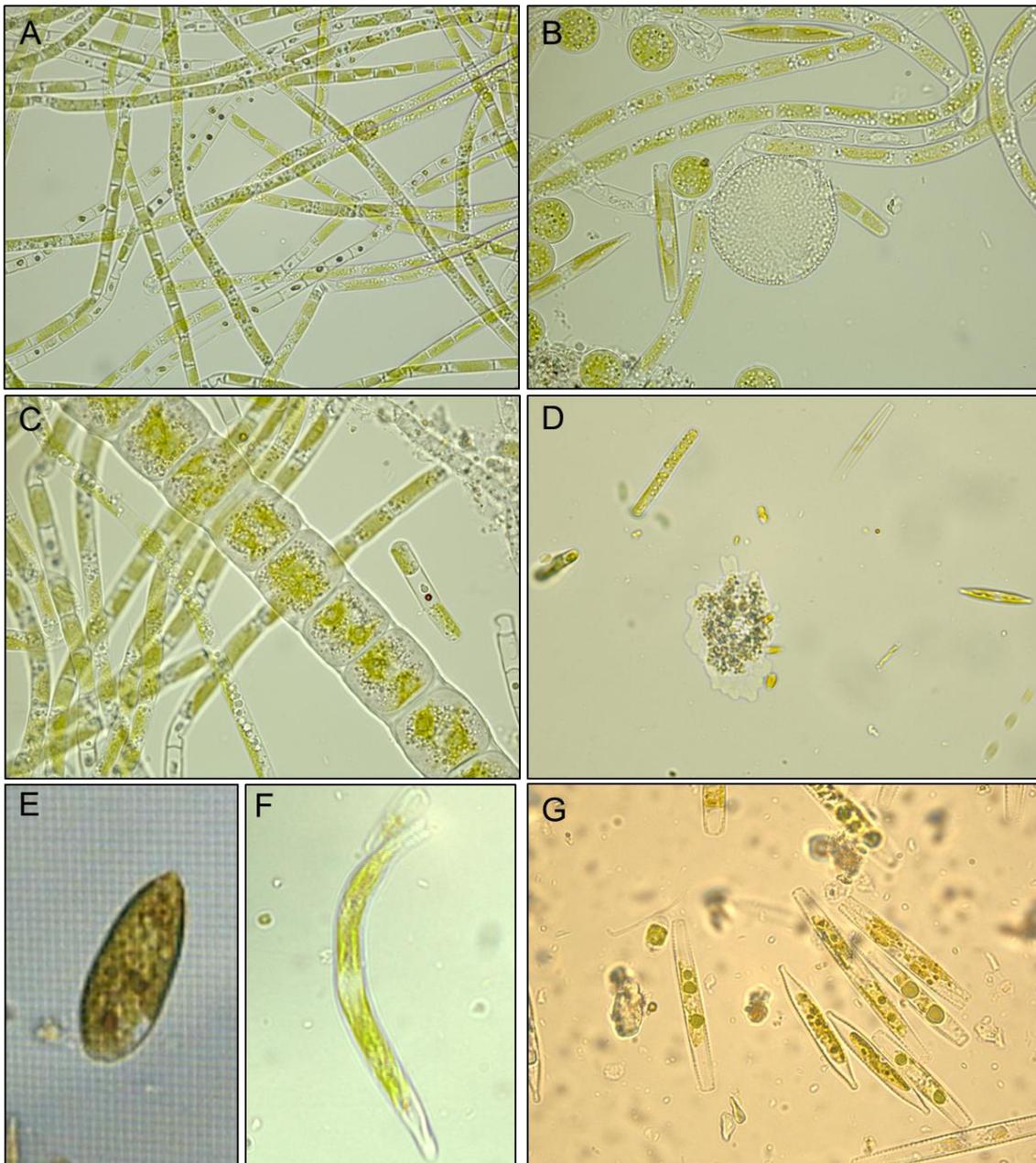


Abbildung 38: Lichtmikroskopische Aufnahmen einiger eukaryotischer Biofilmbewohner; Bild A, B und C: fadenförmige Grünalgen (*Chlorophyta*); Bild D: *Amoebzoa*; Bild E und F: verschiedene *Euglena*-Arten; Bild B und G: Kieselalgen (*Diatomeen*)

Wie gut zu erkennen ist, sind die Biofilme in erster Linie von verschiedensten Algenarten bestimmt. Vor allem fadenförmige Grünalgen (*Chlorophyta*; Abbildung 38, Bild A-C), mit den Arten *Klebsormidium sp.* und *Microspora sp.* sind in allen Proben dominierend. Sie bilden fadenförmige Strukturen und vernetzen somit den Biofilmverband. Auch die zu den Kieselalgen (*Diatomeen*) gehörenden *Nitzschia sp.* (Abbildung 38, Bild G) waren in allen Proben reichlich vertreten. Weiterhin konnten verschiedenste Wimperntierchen (*Ciliophora*) und Rädertierchen (*Rotatoria*) in diesen Biofilmen beobachtet werden. Diverse farblose Flagellaten wie z.B. *Bodo saltans* und Amöbenarten (*Amoebzoa*) (Abbildung 38, Bild D) wie z.B. *Astroamoeba radiosa* konnten ebenso in den Biofilmen nachgewiesen werden, wie

mehrere Vertreter von Augenflagellaten, u.a. mehrere verschiedene *Euglena*-Arten (siehe Abbildung 38, Bild E und F).

In den Biofilmen befanden sich des Weiteren verschiedene Insekten und Insektenlarven. Besonders fielen hierbei die roten Larven der Zuckmücken auf, welche in den im Juni genommenen Proben besonders häufig präsent waren.

Fluoreszenzmikroskopie: Lokalisation und Identifizierung von Uranakkumulationen

Die Biofilme von der Gessenwiese wurden, ebenso wie die Biofilme aus Königstein mittels der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Dabei zeigten sich sehr starke Eigenfluoreszenzen der Mikroorganismen im Biofilm. Ein Beispiel für ein solches fluoreszenzmikroskopisches Bild ist in Abbildung 39 dargestellt. In Grün sind die Fluoreszenzemissionen im Bereich von (430 – 650) nm und in Rot die Fluoreszenzemissionen im Bereich von (650 – 700) nm dargestellt. Besonders der hohe Anteil an fadenförmigen Algen führt zu vielen sehr intensiven detektierten Autofluoreszenzen. Wie die meisten Algenarten betreiben diese Photosynthese und besitzen daher Chlorophyll. Chlorophyll weist charakteristische, intensive Fluoreszenzemissionen über einen sehr breiten spektralen Anregungsbereich auf.

Die Detektion von eventuell immobilisiertem Uran mittels der gekoppelten CLSM/LIFS-Technik innerhalb der Biofilme von der Gessenwiese ist unter den gegebenen Bedingungen sehr schwer. Trotz der erhöhten Urangehalte in den Wässern müsste es zur Präzipitation in Form von Uran(VI)mineralen kommen oder sich viel Uran an einer Stelle akkumulieren um das Detektionslimit des gekoppelten CLSM/LIFS-Systems von mindestens $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L Uran (Großmann, 2008) zu überschreiten. Weiterhin könnten eventuell in den Biofilmen als Folge von Redoxreaktionen entstandene U(IV)-Verbindungen mit dem bestehenden Messsystem derzeit nicht detektiert werden, da aufgrund technischer Limitationen die bisher einzig bekannte Wellenlänge von 245 nm (Kirishima et al., 2004) zur Anregung von U(IV)-Verbindungen noch nicht in das CLSM/LIFS-System eingekoppelt wurde (Großmann, 2008). Zudem wurde von U(IV)-Festphasen bzw. -Präzipitaten, bisher eine Fluoreszenzemission noch nicht nachgewiesen.

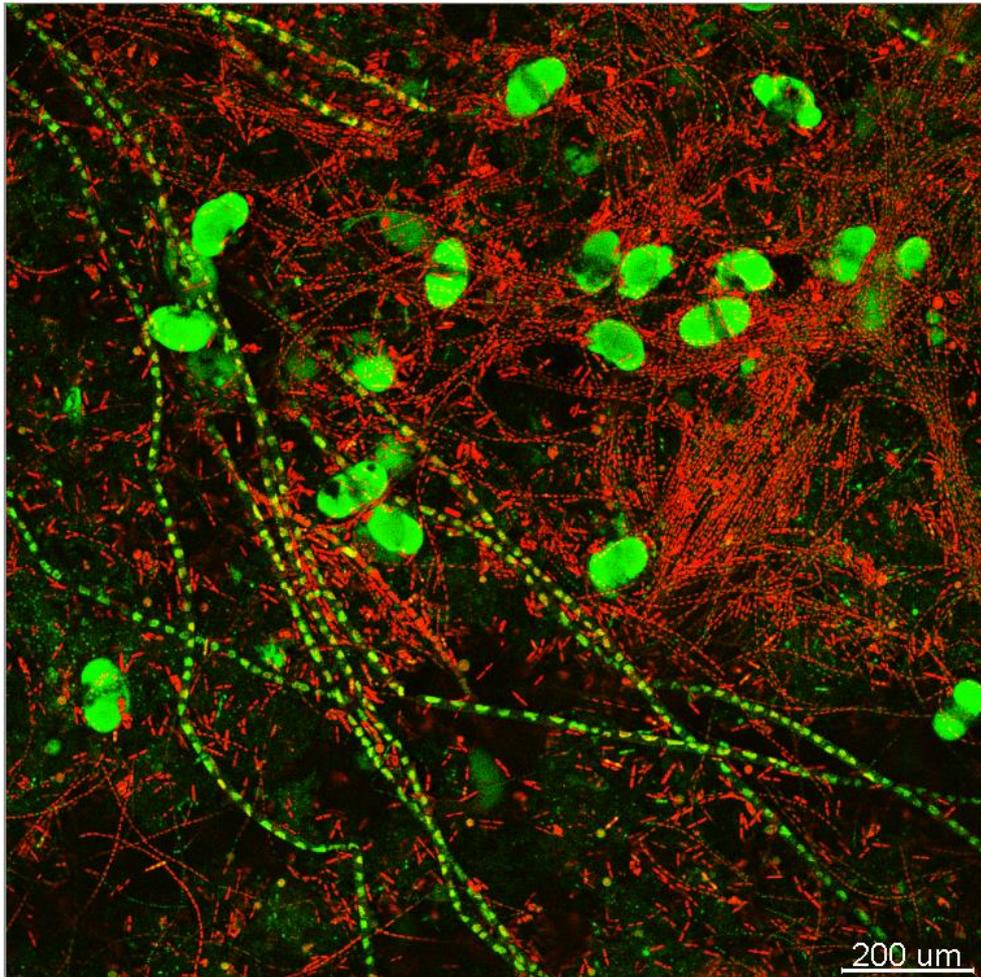


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Biofilms aus dem Rinnsal von der Gessenwiese (grün: Fluoreszenzemission im Bereich von 430 – 650 nm; rot: Fluoreszenzemission im Bereich von 650 – 700 nm)

Die beschriebene enorme Autofluoreszenz der Mikroorganismen im Biofilm stellte ein weiteres Problem dar. Vor allem die grüne Fluoreszenz des Chlorophylls im Wellenlängenbereich zwischen (400 bis 600) nm überlagert schwache Fluoreszenzsignale des Urans, welche in einem adäquaten Wellenlängenbereich zu erwarten sind.

Mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System ist momentan nur die punktuelle Aufnahme von Fluoreszenzspektren innerhalb eines fluoreszenzmikroskopischen Abbildes möglich. Die Möglichkeit eines automatisierten „Screenings“ des Gesamtbildes, bei der als zusätzliche Information die Intensitätsverteilung bezogen auf die Wellenlänge für einzelne Punkte (x,y) abgegriffen wird ist mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System noch nicht gegeben. Ein solches „Screening“ wäre nur bei der Aufnahme eines Spektrums mit Hilfe der CLSM-internen Fotomultiplier möglich, jedoch sind dann die Nachweisgrenzen für Uran um mindestens eine Größenordnung schlechter. Die punktuelle Aufnahme von Fluoreszenzspektren mittels des extern eingekoppelten LIFS-Systems zum Nachweis von Uranakkumulationen wäre hingegen durch die starke Autofluoreszenz der Mikroorganismen vergleichbar mit der „Suche der Nadel im Heuhaufen“. Des Weiteren ist mit dem gekoppelten

CLSM/LIFS-System eine zeitverzögerte Detektion des Fluoreszenzmissionssignales derzeit technisch (cw-Anregung) nicht möglich, weshalb die Fluoreszenzsignale der Organik, welche meist sehr kurze Lebenszeiten besitzen, nicht von den langlebigen Fluoreszenzsignalen des Urans getrennt werden können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen damit spezielle messtechnische Problemstellungen auf und leisten somit einen Beitrag für die zukünftige technische Weiterentwicklung der Messmethode.

Aufgrund der momentanen technischen Limitationen des gekoppelten CLSM/LIFS-Systems war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich die Fluoreszenzsignale der phototrophen Mikroorganismen in den Biofilmen von der Gessenwiese von den langlebigen Uranfluoreszenzsignalen abzutrennen. Daher war eine wissenschaftlich vertretbare Detektion der Uranlokalisation in diesen Algen-dominierten Biofilmen mit dem angewandten System noch nicht möglich. Wie die Ergebnisse zahlreicher Studien in der Literatur zu den Wechselwirkungen von verschiedenen Mikroorganismen und besonders auch verschiedenen Algenarten mit Schwermetallen bzw. im Speziellen mit Uran zeigen, ist eine Immobilisierung eines gewissen Anteils des in den Wässern vorhandenen Urans in den Biofilmen dennoch sehr wahrscheinlich.

Wie Messungen und Modelstudien in der Literatur zeigen, gibt es die Tendenz zum pH-Wertanstieg innerhalb von Algenbiofilmen (Liehr et al., 1994). Dieser erhöhte pH-Wert innerhalb von solchen Biofilmen kann z.B. zur Präzipitation des Urans oder anderer Metalle und somit zum Entfernen dieser aus dem umgebenden Wasser führen. Dabei sind verschiedene Mikroorganismen und speziell Algenarten in der Lage Uran außerhalb der Zellen zu präzipitieren. Dies geschieht z.B. in dem durch die Zellen die E_H /pH-Bedingungen im umgebenden Wasser verändert werden, was eine Biopräzipitation der enthaltenen Metalle und speziell auch des Urans verursachen kann (Kalin et al., 2005). Dabei können sich präzipitierte Metalle bzw. Uranminerale an den äußeren Zelloberflächen bzw. in der umgebenden EPS-Matrix anlagern. Ein Beispiel hierfür sind die bei Uranakkumulationsversuchen durch Mann und Fyfe (1985) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Ankistrodesmus* sp. Zellen gefundenen kubischen Uranoxidkristalle, welche die äußere Zellmembran bedeckten.

Kalin et al. (2005) diskutierten in ihrer Arbeit die wissenschaftlichen Ergebnisse einiger Studien aus der Literatur zu den Wechselwirkungen von Uran und verschiedenen Mikroorganismen besonders hinsichtlich der Wechselwirkungen mit Algen und deren Eignung zur Entfernung des Urans aus dem umgebenden Wasser. In diesem Zusammenhang stellten sie fest, dass eine Vielzahl von Algenarten in der Lage ist, Uran an den Zellen zu adsorbieren. Dabei wird durch die Bestandteile der Zellwände eine Menge an funktionellen Gruppen als mögliche Liganden zur Komplexierung von Uran zur Verfügung gestellt. Weiterhin dokumentierten Kalin et al. (2005) die Fähigkeit einiger Algenarten Metalle

durch ihre Zellmembran zu pumpen. Für essentielle Metalle ist dies nicht ungewöhnlich. Uran als nicht essentiell benötigtes Metall kann jedoch vermutlich durch die Ähnlichkeit zu einem essentiellen Metall unter Umständen ebenso ins Zellinnere transportiert werden wie es für einige Arten bereits nachgewiesen wurde. Im Zellinneren wird es dann z.B. in den Vakuolen akkumuliert und manchmal sogar präzipitiert (Kalin et al., 2005).

Um die Auswirkungen der Wechselwirkung der eukaryotischen Mikroorganismen aus diesen oberirdischen Biofilmen auf die Uranverteilung im Oberflächen- und Grundwasser und somit in der Natur detaillierter zu untersuchen und zu verstehen, bieten sich zunächst Versuche in Monokulturen an. Die Wechselwirkungen von Uran und Mikroorganismen bzw. die Möglichkeit der Uranimmobilisierung soll dabei in dieser Arbeit vor allem fluoreszenzmikroskopisch und –spektroskopisch untersucht werden. In diesem Zusammenhang lag ein besonderer Fokus auf der Detektion der Uranlokalisation an oder in den Zellen und der Bestimmung der Speziation von eventuell immobilisiertem Uran. Um die Untersuchung der Zellen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System möglichst einfach zu gestalten, sollten in erster Linie relevante eukaryotische Zellen mit einer entsprechenden Zellgröße und mit nicht zu schnellen Bewegungen herangezogen werden. Dabei fiel die Wahl auf die Art *Euglena*, da in den Biofilmen auf der Gessenwiese mehrere Vertreter dieser Art nachgewiesen werden konnten, diese eine günstige Größe für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen aufweisen und deren Kultivierung als Monokultur recht einfach durchzuführen ist. Im Besonderen wurde die Spezies *Euglena mutabilis* Schmitz ausgewählt, da diese für ihr häufiges Vorkommen in sauren Minenabwässern sowie ihre hohe Säure- und Schwermetalltoleranz bekannt ist (Brake et al., 2001b, Valente und Gomes, 2007).

3.3. Wechselwirkungen von *Euglena mutabilis* Schmitz mit Uran

Euglena mutabilis Schmitz (siehe Abbildung 40) sind Photosynthese betreibende Einzeller aus der Klasse der Euglenoida. Die verschiedenen Arten der Euglenoida werden generell den Protisten zugeordnet. Aufgrund ihres auffälligen roten Augenflecks spricht man auch häufig von Augenflagellaten oder Augentierchen. Die Euglenoida kommen nahezu ubiquitär vor und besiedeln die verschiedensten Lebensräume. Sie können in allen Gewässertypen leben, von stehenden, stark überdüngten bis hin zu Hochmooren (Linne von Berg und Melkonian, 2004). Einige Arten lassen sich auch in Lebensräumen mit extremen Bedingungen, z.B. hinsichtlich des pH-Wertes, der Temperatur, des Salz- oder Schwermetallgehaltes vorfinden. Die meisten *Euglena*-Arten leben phototroph. Einige können unter gewissen Umständen aber auch zur heterotrophen Lebensweise wechseln. Die *Euglena*-Zellen sind länglich bis oval abgeflacht und besitzen meist eine Schwimmgeißel. Die Zellgröße variiert stark zwischen (25 – 400) µm und ist von der Art abhängig (Linne von Berg und Melkonian, 2004).

Euglena-Zellen besitzen eine Pellikula anstelle einer Zellwand. Die Pellikula ist eine komplexe Zellregion, welche die Zellen nach außen hin abgrenzt und eine typisch gestreifte Struktur besitzt. Sie besteht aus der Plasmamembran sowie einer darunterliegenden epiplasmatischen Schicht aus proteinogenen Streifen (Leander und Farmer, 2000). Die größtenteils aus Proteinen bestehenden Streifen lagern sich längs entlang der Zelle und treffen an ihren beiden Enden zusammen (Leedale, 1967, Leander und Farmer, 2000). In der Pellikula befinden sich außerdem Mikrotubuli, Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums sowie in der englischsprachigen Literatur als „muciferous body“ bezeichnete Bereiche, welche wasserlösliche Mucopolysaccharide beinhalten. Einige *Euglena*-Arten weisen zusätzlich kleine Öffnungen in Form von Poren in der Pellikula auf (Leander und Farmer, 2000).

Im Gegensatz zu den meisten Arten der Gattung *Euglena* fehlt *Euglena mutabilis* Schmitz eine Schwimmgeißel, weshalb diese nur zu wurmähnlichen gleitenden Kriechbewegungen durch Kontraktion des Zellkörpers befähigt sind (Häder und Melkonian, 1983, Linne von Berg und Melkonian, 2004). Um diese Bewegungen zu ermöglichen, heftet sich die Zelle am Untergrund mittels eines Schleims fest, welcher am hinteren Ende der Zelle ausgeschieden wird (Häder und Melkonian, 1983).

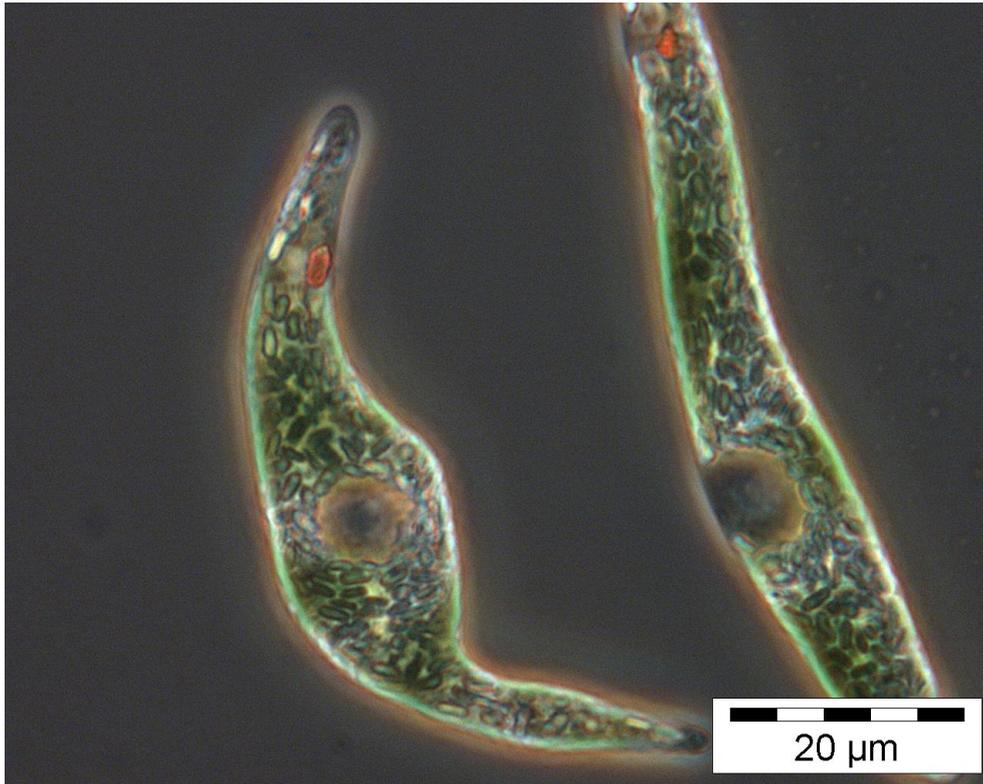


Abbildung 40: Mikroskopisches Bild zweier *Euglena mutabilis* Schmitz Zellen

Euglena mutabilis sind bekannt für ihre Resistenz hinsichtlich saurer pH-Werte in der Umwelt. Weiterhin besitzt diese Spezies eine ausgeprägte Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von gelösten Stoffen und insbesondere hohen Schwermetallkonzentrationen bei sauren pH-Werten unter $\text{pH} = 4$ (Brake et al., 2001a). In der Literatur wird *Euglena mutabilis* daher häufig im Zusammenhang mit sauren Gruben- und Minenabwässern beschrieben, wo sie auch sehr häufig in großen Populationsdichten mit mehr als 100000 Zellen pro Milliliter vorzufinden sind (Olaveson und Nalewajko, 2000, Brake et al., 2001a).

Ihr häufiges Vorkommen in den sauren und schwermetallbelasteten Drainagewässern von Kohleminen und Erzbergwerken macht diese Spezies besonders interessant für Studien hinsichtlich ihrer Säuretoleranz und Wechselwirkungen mit verschiedensten Schwermetallen. So wurde nicht nur die Fähigkeit der Spezies untersucht, niedrige pH-Werte und hohe Metallkonzentrationen zu tolerieren, sondern auch die Möglichkeit des Einflusses auf das Migrationsverhalten von Schwermetallen diskutiert.

Olaveson und Nalewajko (2000) betrachteten unter anderem in ihrer Studie den Effekt von pH-Wert und erhöhten Metallkonzentrationen von Al, Cd, Cu, Fe, Ni und Zn auf das Wachstum dieser Spezies. Sie zeigten dabei, dass *Euglena mutabilis* ein optimales Wachstum im pH-Bereich von 2,5 – 6 aufweist mit der Fähigkeit, auch bei pH-Werten unterhalb von pH 2 zu überleben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Euglena mutabilis* für alle getesteten Metalle eine vergleichsweise hohe Toleranz besitzt.

Weiterhin untersuchten z.B. Casiot et al. (2004) die Fähigkeit von *Euglena mutabilis* zur Bioakkumulation und Oxidation von Arsen in sauren Minenabwässern. Hierbei konnte eine signifikante Akkumulation des Schwermetalls Arsen intrazellulär nachgewiesen werden. Mit bis zu 10 % Effizienz zeigte sich dabei der Adsorptionsprozess an der Pellikula als der dominierende Retentionsprozess. Auch eine Oxidation von As in die As(V)-Form durch diese Zellen wurde beobachtet. Casiot et al. (2004) bezeichnen aufbauend auf ihren Ergebnissen *Euglena mutabilis* als einen geeigneten Kandidaten für die Behandlung von Arsen-reichen sauren Minenabwässern.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus den bisher publizierten Arbeiten hinsichtlich der Bioakkumulationsfähigkeiten von *Euglena mutabilis* für Schwermetalle wurden die Wechselwirkungen zwischen *Euglena mutabilis* Zellen und uranhaltigen Wässern sowie mögliche Immobilisierungsprozesse bisher noch nicht untersucht. Es existieren zwar wenige Arbeiten zu den Wechselwirkungen von anderen *Euglena*-Arten und Uran (Mann und Fyfe, 1985, Mann et al., 1988, Trenfield et al., 2012), aber eine Beschreibung der Bioakkumulation von Uran durch *Euglena*-Zellen sowie die Aufklärung dieser Prozesse und die Diskussion einer möglichen Nutzung für Reinigungsprozesse fehlt noch im Detail. Mann et al. (1988) beobachteten in der vom Uranbergbau geprägten Gegend am Elliot Lake (Ontario, Kanada) bei natürlich vorkommenden *Euglena*-Populationen in den mit Schwermetallen belasteten, sauren (pH = 2-4) Gewässern erhöhte Uranaufnahmen durch die Zellen. Die Aufnahme von weiteren Schwermetallen wie z.B. Blei, Kupfer und Nickel aus den Wässern konnte dabei ebenso dokumentiert werden. Diese Fähigkeit von *Euglena*-Arten Schwermetalle zu akkumulieren wurde jedoch nicht hinsichtlich der genauen ablaufenden Prozesse weiter untersucht. Auch eine mögliche Anwendung dieser Fähigkeiten wurde noch nicht diskutiert. Mann und Fyfe (1985) stellten lediglich eine besondere Rolle der Mikroorganismen und besonders der Algen beim Transfer gelöster Substanzen zum Sediment fest, was wiederum zur Anreicherung von Schwermetallen in den Sedimenten führt.

Trenfield et al. (2012) untersuchten in Laborversuchen den toxischen Einfluss der Urankonzentration auf das Wachstum von *Euglena gracilis* Kulturen in Gegenwart oder Abwesenheit von gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC). Sie stellten unter anderem fest, dass in den Versuchen ohne DOC-Zugabe bis zu 36 % der Ausgangskonzentration an Uran durch die Zellen aufgenommen wurde. Der Prozess der Bioakkumulation wurde aber nicht weiter tiefer gehend untersucht oder diskutiert.

An diesem Punkt sollen die weiteren Versuche in dieser Arbeit anknüpfen. Experimente zur Bioakkumulation des Urans an *Euglena mutabilis* Zellen sollten neue Erkenntnisse über die stattfindenden Prozesse an oder in den Zellen liefern. Ein genaueres Verständnis der Abläufe sollte weiterhin bei der Einschätzung helfen, ob *Euglena mutabilis*, als häufiger und meist dominierender Vertreter in Biofilmen in sauren Minenabwässern, für die Reinigung von

kontaminierten Wässern und Gebieten geeignet ist.

3.3.1. Bioakkumulation von Uran durch *Euglena mutabilis*

Eine Reinkultur von *Euglena mutabilis* Schmitz, Kulturnummer # 1224-9b, wurde aus der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) bezogen und für die Untersuchungen zur Bioakkumulation von Uran vorbereitet. Da die zahlreichen Experimente sehr große Biomassen benötigten, wurden die Zellen in Bioreaktoren in einem geeigneten Flüssignährmedium zu möglichst hohen Zelldichten herangezogen. Bei ausreichend hoher Zelldichte in den Reaktoren (Indikation: tief grüne Färbung des Mediums), wurden die Zellen durch fraktionierte Zentrifugation geerntet und die Zellpellets anschließend im entsprechenden Hintergrundmedium (NaClO_4 oder Na_2SO_4) gewaschen. Diese Zellen konnten anschließend direkt für die folgenden Bioakkumulationsversuche verwendet werden. Eine ausführliche Beschreibung der Anzucht und Vorbereitung der *Euglena*-Zellen für die Versuche wird in Kapitel 5.5 gegeben.

Abhängigkeit von pH-Wert und Hintergrundmedium

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Bioakkumulation des Urans an *Euglena mutabilis* Zellen untersucht. Dazu wurden die Versuche bei pH 3, 4, 5 und 6 durchgeführt, was den natürlich vorkommenden pH-Wertbereich von AMD-geprägten Gebieten und Wässern widerspiegelt. Des Weiteren fanden die Versuche in zwei verschiedenen Hintergrundmedien statt. Zum einen wurden die Versuche in Natriumperchlorat (NaClO_4 , 9 g/l; Ionenstärke = $7,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l) und zum anderen in Natriumsulfat-Medium (Na_2SO_4 , 3,48 g/l; Ionenstärke = $7,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l) durchgeführt. Natriumperchlorat wurde bereits häufiger in verschiedenen Studien für Bioakkumulationsexperimente von Uran an Mikroorganismen eingesetzt (Panak et al., 2000, Merroun et al., 2003, Günther et al., 2008), da Perchlorat keine Komplexe mit Uran bildet. Somit liefern diese Experimente gut mit Literaturdaten vergleichbare Ergebnisse. Da reale urankontaminierte AMD-Gewässer meist sehr hohe Sulfat-Werte aufweisen, wurde Natriumsulfat als weiteres Hintergrundmedium angewendet, um innerhalb der Bioakkumulationsexperimente naturnähere Bedingungen zu simulieren. Den Lösungen wurde Uran in einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l zugegeben, was eine für AMD-Gewässer relevante Konzentration darstellt. Die Kontaktzeit zwischen den Uranlösungen und den lebenden Zellen betrug 5 Tage. Da für die Vielzahl an Versuchen mehrere Bioreaktoren mit *Euglena*-Zellen benötigt wurden, und diese unterschiedliche Zelldichten aufwiesen, wurden auch in den Versuchen unterschiedliche Biotrockenmassen (Btm) angewendet. Die detaillierte Durchführung der Bioakkumulationsversuche wird in Kapitel 5.6 beschrieben.

Abbildung 41 veranschaulicht die Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche abhängig vom pH-Wert für beide Hintergrundmedien. In grün ist der durch die *Euglena*-Zellen aufgenommene Urangehalt prozentual zum Gehalt der Ausgangslösung dargestellt. Die blau dargestellten Werte spiegeln dieselben Ergebnisse bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse an *Euglena*-Zellen wieder und werden in Milligramm Uran pro Gramm Biotrockenmasse (Btm) angegeben.

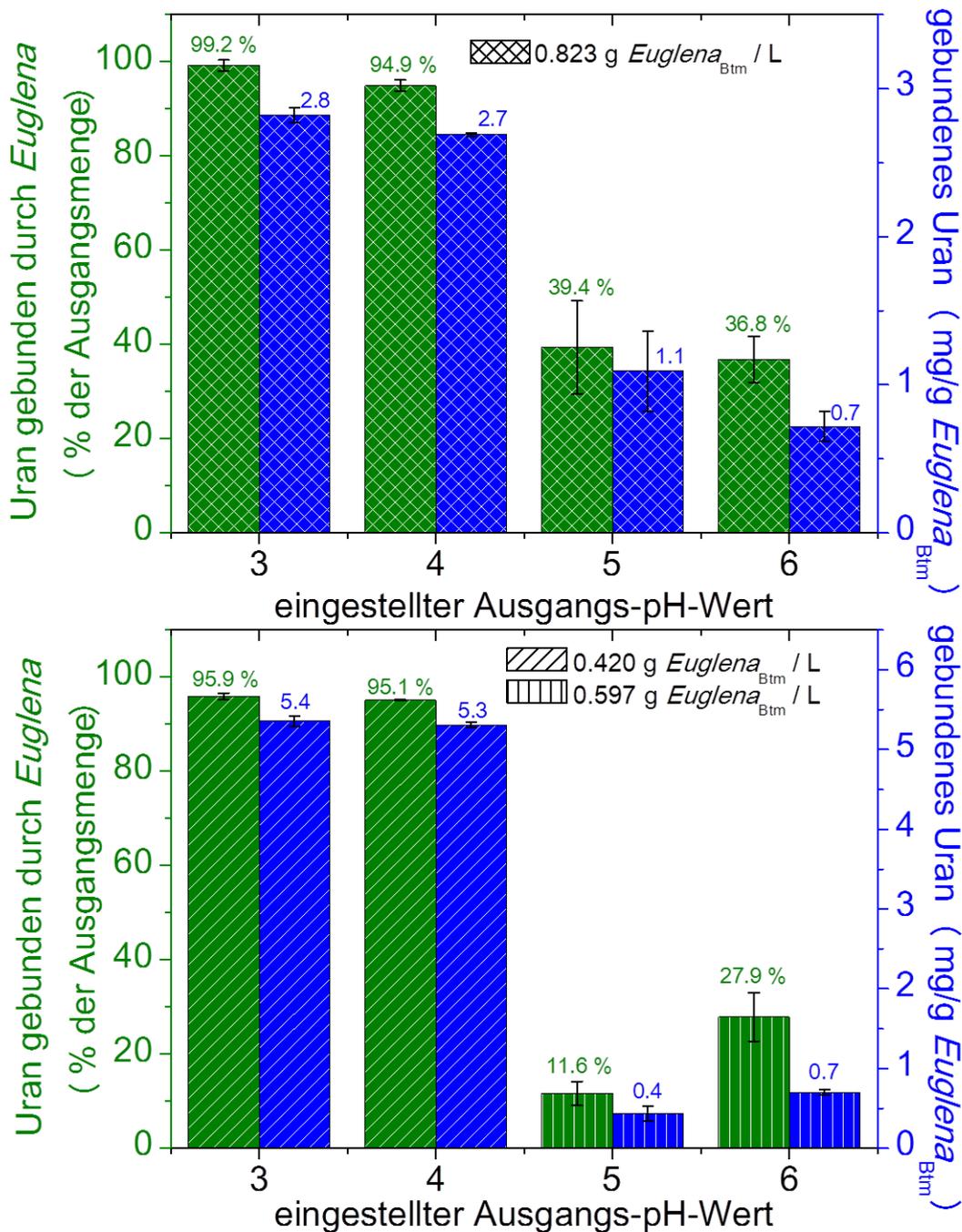


Abbildung 41: Vergleich der Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Hintergrundmedium (oben: NaClO₄; unten: Na₂SO₄); in grün: durch die *Euglena*-Zellen aufgenommenes Uran als Prozent der Ausgangsmenge; in blau: von den *Euglena*-Zellen aufgenommenes Uran angegeben in mg Uran pro g *Euglena*-Biotrockenmasse

Aufgrund der nicht einheitlichen Zelldichten in den Versuchen (angegeben als $Euglena_{\text{Btm}}/l$) sind Vergleiche der Ergebnisse (angegeben in mg Uran/g $Euglena_{\text{Btm}}$) schwierig. Bei den höheren Zelldichten und einer über 90%igen Akkumulation des Urans aus der Lösung (wie es bei pH 3 und 4 der Fall ist) kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen auch noch deutlich mehr Uran pro Gramm $Euglena_{\text{Btm}}$ hätten aufnehmen können, wenn noch mehr Uran in den Lösungen vorgelegt worden wäre. Da aber kaum noch Uran in den Lösungen vorlag, hatten die Zellen nicht die Möglichkeit noch mehr Uran aufzunehmen. Dennoch sind die Werte gut zur Visualisierung des Trends innerhalb von Versuchsreihen mit ähnlicher Zelldichte geeignet.

Bei den sauren pH-Werten 3 und 4 wurden unabhängig vom Hintergrundmedium sehr hohe Gehalte an Uran aus den Lösungen entfernt und durch die *Euglena*-Zellen aufgenommen. So wurden bei pH 3-4 etwa (94–99) % des vorgegebenen Urans ($1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) aus den Probelösungen entfernt. Bei den weniger sauren pH-Werten 5 und 6 wurde bei vergleichbaren Bedingungen deutlich weniger Uran aus den Lösungen aufgenommen. Es zeigt sich eindeutig, dass mit zunehmenden pH-Wert die Menge des aufgenommenen Urans durch die *Euglena mutabilis* Zellen abnimmt. Eine optimale Aufnahme des Urans war in diesen Versuchen im pH-Bereich um pH 3-4 zu beobachten.

In Tabelle 17 sind nochmal alle Ergebnisse dieser Versuche zusammen mit den End-pH-Werten vom fünften Tag detailliert aufgelistet. Während der 5 Tage Inkubationszeit der Zellen in der Uranlösung änderte sich der pH-Wert der Lösungen ein wenig. Die Veränderung der vor Beginn der Versuche eingestellten pH-Werte der Lösungen beruht voraussichtlich hauptsächlich in der Exkretion von Metaboliten durch die zu Beginn des Versuches lebenden Zellen. Vor allem die pH-Werte der Lösungen mit einem ursprünglichen pH-Wert von 4, 5 und 6 haben sich etwas verändert, weshalb zu Versuchsende kaum noch pH-Unterschiede zwischen diesen Proben existierten.

Tabelle 17: Zusammenstellung aller Ergebnisse aus den pH-Wert- und Hintergrundmedium-abhängigen Bioakkumulationsversuchen an *Euglena mutabilis* Zellen

pH-Wert	Aufgenommenes Uran nach ~ 5 Tagen Versuchsdauer					
	in NaClO_4			in Na_2SO_4		
	End-pH-Wert	mg/g _{<i>Euglena</i>} _{Btm}	% der Ausgangsmenge	End-pH-Wert	mg/g _{<i>Euglena</i>} _{Btm}	% der Ausgangsmenge
3	3,4	2,82 ± 0,05	99,2 ± 1,1	3,1	5,36 ± 0,07	95,9 ± 0,7
4	4,9	2,69 ± 0,01	94,9 ± 1,2	4,3	5,31 ± 0,03	95,1 ± 0,1
5	5,5	1,09 ± 0,27	39,4 ± 9,8	4,6	0,43 ± 0,1	11,6 ± 2,6
6	5,2	0,72 ± 0,1	36,8 ± 4,9	4,7	0,70 ± 0,05	27,9 ± 5,1

Eine Nachjustierung des pH-Wertes während der Versuchslaufzeit war jedoch nicht unter absolut sterilen Bedingungen möglich. Es bestand somit die Gefahr der Kontamination der

Proben bei einer eventuellen pH-Nachstellung, weshalb während des Versuches nicht in das System eingegriffen wurde. Die dennoch deutlichen Unterschiede in der Bioakkumulation lassen darauf schließen, dass der pH-Wert zu Beginn der Versuche eine maßgebliche Rolle für die Bioakkumulation spielte.

Die Tendenz mit zunehmendem pH-Wert weniger Uran aufzunehmen ist unerwartet und entgegengesetzt den Erkenntnissen aus bisher veröffentlichten Studien zur Bioakkumulation von Uran an Mikroorganismen. So wurde z.B. die Aufnahme von Uran durch die Algenzellen *Chlorella vulgaris* im pH-Bereich 3-6 untersucht (Günther et al., 2008), mit der Tendenz, dass mit zunehmenden pH-Wert mehr Uran aufgenommen wurde. Weitere Versuche zur pH-Wert-abhängigen Uranakkumulation wurden beispielsweise für die Bakterienstämme *Bacillus subtilis* im pH-Bereich 1,5 – 5 (Fowle et al., 2000), *Thiobacillus ferrooxidans* im pH-Bereich 1,5 - 4 und *Desulfovibrio desulfuricans* im pH-Bereich 3,2 – 6,1 (Panak et al., 1998), für die Bierhefeart *Saccharomyces cerevisiae* im pH-Bereich 4 - 7 (Popa et al., 2003) sowie für die Algenart *Saragassum fluitans* im Bereich von pH 2,6 – 4 (Yang und Volesky, 1999) durchgeführt. Bei all diesen Beispielen ist die Tendenz gleich: mit zunehmendem pH-Wert steigt die Aufnahme von Uran an den Zellen bzw. besitzt die Uranakkumulation durch die Zellen im neutralen Bereich ein Aufnahmemaximum.

Die Tatsache, dass *Euglena mutabilis* Zellen besonders im sauren pH-Bereich um pH 3 bis 4 Uran sehr gut aufnehmen, ist besonders hinsichtlich einer möglichen Anwendung zur Reinigung von AMD-geprägten Gebieten und Wässern von Vorteil. Auf Grundlage dieser Ergebnisse standen bei allen weiteren Experimenten in dieser Arbeit zur Bioakkumulation von Uran an *Euglena mutabilis* Zellen die Vorgänge bei den pH-Werten 3 und/oder 4 im Mittelpunkt.

Das Hintergrundmedium, bestehend aus einer Perchlorat- oder Sulfatlösung, beeinflusste die Aufnahme an den Zellen mengenmäßig nicht signifikant. Jedoch sind während des Versuches Veränderungen an den *Euglena*-Zellen aufgefallen. Diese Zellveränderungen sollen im folgenden Kapitel kurz erläutert und diskutiert werden.

Veränderungen der Zellmorphologie und –farbe während der Bioakkumulationsexperimente

In den Probenröhrchen der oben beschriebenen Bioakkumulationsexperimente war mit bloßem Auge eine farbliche Veränderung der Zellsuspensionen über den pH-Bereich von pH 3 bis 6 zu erkennen. Mikroskopische Aufnahmen der Zellen (siehe Abbildung 42) bestätigten den ersten Eindruck.

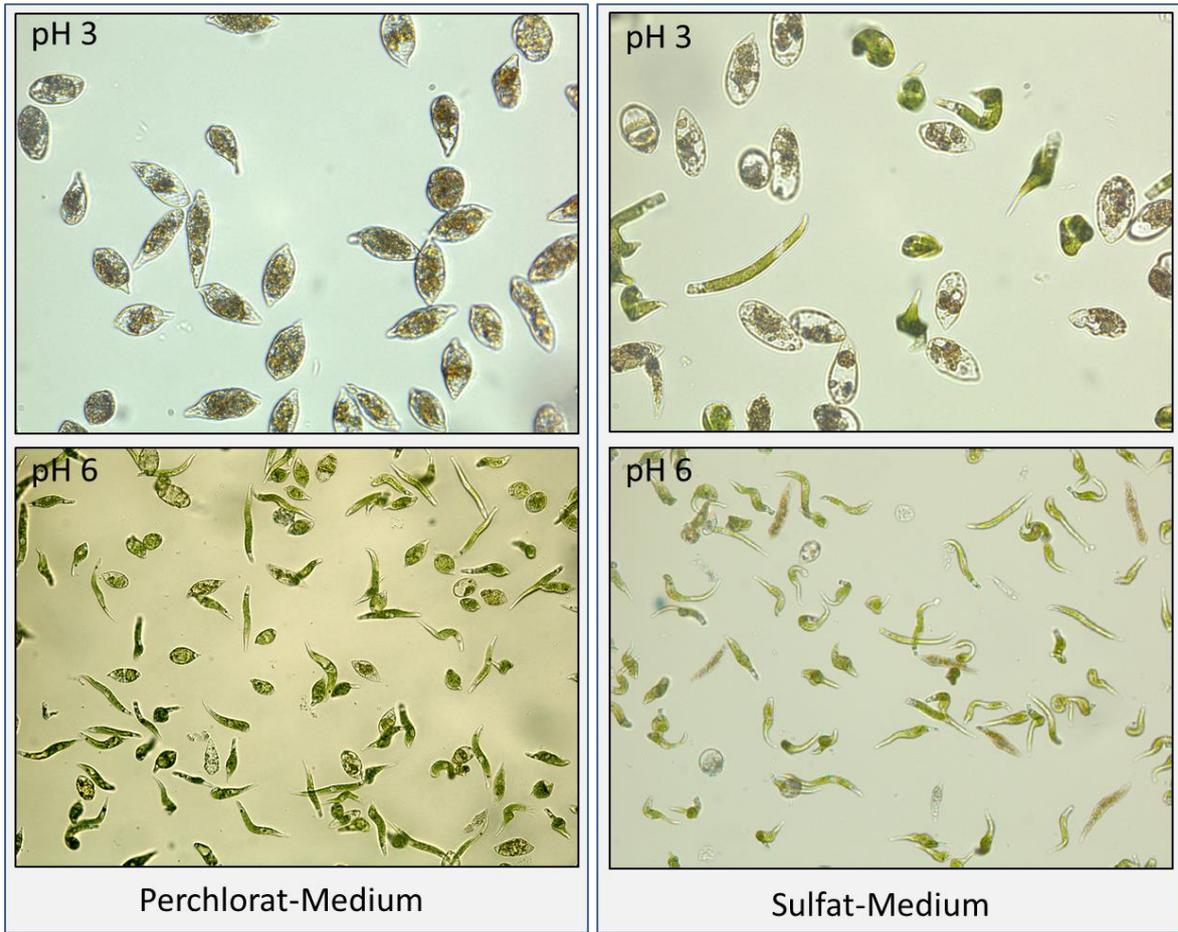


Abbildung 42: Mikroskopische Fotos (Leica Mikroskop TCS SP2) der *Euglena*-Zellen nach 5 Tagen Kontakt mit den Uranprobelösungen (0,01 mM); Vergleich der Zellen aus dem Perchlorat- und Sulfatmedium jeweils für pH 3 und pH 6 (Bilder oben: 400fache Vergrößerung; Bilder unten: 200fache Vergrößerung)

Die *Euglena*-Zellen in den Versuchen in Perchlorat-Medium, welche zu Beginn des Versuches metabolisch aktiv und intensiv grün gefärbt waren, hatten während der 5 Tage in den Uranprobelösungen bei pH 3 ihre grüne Färbung verloren und waren nun farblos bis grau-bräunlich. Die Zellen bewegten sich nicht mehr und besaßen nun eine völlig veränderte Zellmorphologie. Die *Euglena*-Zellen, welche zu Beginn des Versuches eine längliche Form aufwiesen (siehe Abbildung 40), zeigten nach Inkubation in den Probelösungen eine gestauchte rundliche Form. Es kann sich hierbei um ein Absterben der *Euglena*-Zellen aber auch um eine Art Schlafzustand handeln. Der Verlust der Beweglichkeit sowie eine Abrundung der Zellen sind in der Literatur als typische Stress-Reaktionen beschrieben, die z.B. durch extreme pH-Wert-Bedingungen oder hohe Konzentrationen an toxischen Metallen ausgelöst werden (Olaveson und Nalewajko, 2000, Trenfield et al., 2012).

Eine ähnliche Veränderung der Zellmorphologie und -farbe ist in den Versuchen im Sulfat-Medium bei den sauren pH-Werten zu beobachten. Ob die veränderten Zellen tot sind oder in einer Art Schlafstadium verharren, lässt sich ohne weiterführende Untersuchungen schwer sagen. Auffällig ist jedoch, dass nicht alle Zellen im sauren Sulfat-Medium von der

Veränderung betroffen sind. Bei den Proben mit pH 6 sind solche Zellveränderungen unabhängig vom Medium kaum beobachtet worden.

Zunehmend unbewegliche und rundliche Zellen sowie das Auftreten von sogenannten „Monster“-Zellen (Zellen welche sich nicht mehr teilen und erheblich größer sind als der Zelldurchschnitt) wurden von Hargreaves und Whitton (1976) aufgrund extremer pH-Werte im Bereich 1,3 - 1,5 in *Euglena mutabilis* Klebs Kulturen identifiziert. Trenfield et al. (2012) beobachteten für *Euglena gracilis* Zellen ab einer Urankonzentration größer 300 µg/l eine Änderung der Zellform von gesund, lang und spindelförmig zu einer tropfen- oder zystenartigen Zellform. Sie beobachteten außerdem gelegentlich eine V-förmige oder sternförmige Veränderung der Zellmorphologie. In den durchgeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde eine Urankonzentration von mindestens 0,01 mM (dies entspricht etwa 2,38 mg/l Uran) eingesetzt. Diese Konzentration liegt somit deutlich über der von Trenfield et al. (2012) angegebenen Konzentration, ab der ein Einfluss auf die Zellmorphologie zu erwarten ist.

In den in Abbildung 42 dargestellten Proben lag stets dieselbe Urankonzentration vor. Somit kann die toxische Wirkung des Schwermetalls Uran nicht der alleinige ausschlaggebende Stressfaktor für die Zellveränderung sein, da die Proben bei pH 6 kaum Zellformveränderungen aufweisen. Es ist daher anzunehmen, dass der sehr saure pH-Wert einen Hauptfaktor für die Stressreaktion der Zellen darstellte. Dies ist ein unerwarteter Effekt, da die Spezies *Euglena mutabilis* häufig in sehr sauren natürlichen Wässern oder durch Minenabwässer verunreinigten Gebieten vorgefunden wurde, welche pH-Werte um pH 3 oder sogar kleiner aufwiesen (Casiot et al., 2004, Valente und Gomes, 2007). In der Literatur sind für *Euglena mutabilis* verschiedene optimale pH-Bereiche dokumentiert. Brake et al. (2001a) berichteten z.B. über die Verteilung von *Euglena mutabilis* in sauren Kohleminenabwässern (Indiana, USA) in einem pH-Wertbereich von pH (1,7 – 4,6), mit einem besonders produktiven Wachstumsbereich der Zellen zwischen pH (3,0 – 3,5). Olaveson und Nalewajko (2000) testeten unter anderem den Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *Euglena mutabilis* Kulturen und ermittelten dabei einen Bereich von pH (2,5 – 6) für optimales Wachstum. Für Kulturversuche von *Euglena mutabilis* in schwefelsauren Medien fand Hein (1953) heraus, dass die Zellen sich am besten im pH-Bereich 4,4 – 4,7 entwickelten. Bei pH-Werten um pH 2,0 – 2,2 entwickelten sich die Kulturen jedoch nur schlecht.

Da die in dieser Arbeit verwendete *Euglena*-Kultur aus einer Zellkultursammlung stammte, ist vermutlich die Toleranz der Zellen gegen extrem niedrige pH-Werte zum Teil verloren gegangen, denn es ist anzunehmen, dass sich die Kulturen über mehrere Generationen an ihre Kultivierungsbedingungen anpassen. So können Zellenkulturen, welche aus einem ursprünglich sehr sauren Habitat isoliert wurden und anschließend unter weniger sauren bis

neutralen Bedingungen über viele Generationen in Kultur gehalten wurden (z.B. in einer Zellkultursammlung), ihre ursprüngliche Säureresistenz verlieren. In der Literatur sind vereinzelt Hinweise darauf zu finden, dass Zellen aus einer langjährigen Kultursammlung weniger resistent gegen Extrembedingungen (z.B. sehr niedrige pH-Werte oder hohe Metallkonzentrationen) sind, als Zellen welche frisch aus einer natürlichen Umgebung mit extremen Bedingungen isoliert wurden (Nakatsu und Hutchinson, 1988, Rocchetta und Kupper, 2009). Rocchetta und Kupper (2009) stellten bei ihren Versuchen z.B. fest, dass ein *Euglena gracilis* Stamm, welcher aus einem stark verunreinigten Fluss isoliert wurde, über die Jahre der Kulturhaltung in Chrom-freiem Medium seine Toleranz für hohe Gehalte an Chrom und Kupfer verloren hat.

In den Versuchen in dieser Arbeit ist aufgefallen, dass besonders die Zellen in Perchloratmedium bei sauren pH-Werten starke Stressreaktionen zeigen. Das heißt im Perchloratmedium tolerieren die *Euglena*-Zellen geringe pH-Werte weniger gut als im Sulfatmedium. Olaveson und Stokes (1989) stellten fest, dass in komplexen Medien, wie sie in natürlichen Wässern vorliegen oder auch in manchen Studien eingesetzt werden, Nährstoffe angeboten werden und toxische Metalle von Chelatbildnern komplexiert werden. Dies führt zu stärkeren Toleranzen der Zellen gegenüber extremen Bedingungen, wie niedrige pH-Werte oder hohe Metallkonzentrationen. Das Fehlen dieser Stoffe in simplen definierten Medien führt somit zum Verlust oder der Verringerung von speziellen Toleranzen. In dieser Arbeit wurden lediglich Natriumsulfat bzw. -perchlorat ohne weiteren Zusatz von z.B. Nährstoffen als Hintergrundmedien angewendet, um Wechselwirkungen des zugesetzten Urans mit dem Medium gering zu halten. Die sehr einfach zusammengesetzten Hintergrundmedien in den Versuchen sind somit auch als eine Art Stressfaktor für die Zellen zu sehen. Um die Wechselwirkungen zwischen dem Uran und den Zellen sowie mögliche Veränderungen bei der Uranspeziation zu untersuchen, war es dennoch nötig die Hintergrundmedien so einfach wie möglich zu halten.

Ein weiterer Aspekt liegt in der Präparation der Proben selbst. Um eine ausreichend hohe Zelldichte in vertretbarer Zeit zu erreichen, wurden die Zellen in einem ersten Schritt bei neutralen pH-Bedingungen kultiviert, da sie unter diesen Bedingungen auffällig besser wuchsen. Zur Inkubation der Zellen in den entsprechenden Uranlösungen wurden die Zellen anschließend sprunghaft in einen anderen pH-Bereich überführt. Der damit verbundene pH-Schock kann auch zu einer Stressreaktion auf die sprunghaft geänderten Umgebungsbedingungen beigetragen haben.

Abhängigkeit vom Zustand der Zellen, der Urankonzentration und der Zeit

In weiteren Versuchen sollte der zeitliche Verlauf der Bioakkumulation beobachtet werden. Dabei wurde der Einfluss des Zustandes der Zellen untersucht indem die

Uranakkumulation an lebenden *Euglena*-Zellen, an durch Autoklavieren getöteten Zellen sowie an getöteten (autoklavierten) und durch anschließende Ultraschallbehandlung aufgeschlossenen Zellen getestet wurde. Je ein mikroskopisches Bild der *Euglena*-Zellen vor Versuchsbeginn ist in den Bildern A, C und D der Abbildung 43 dargestellt.

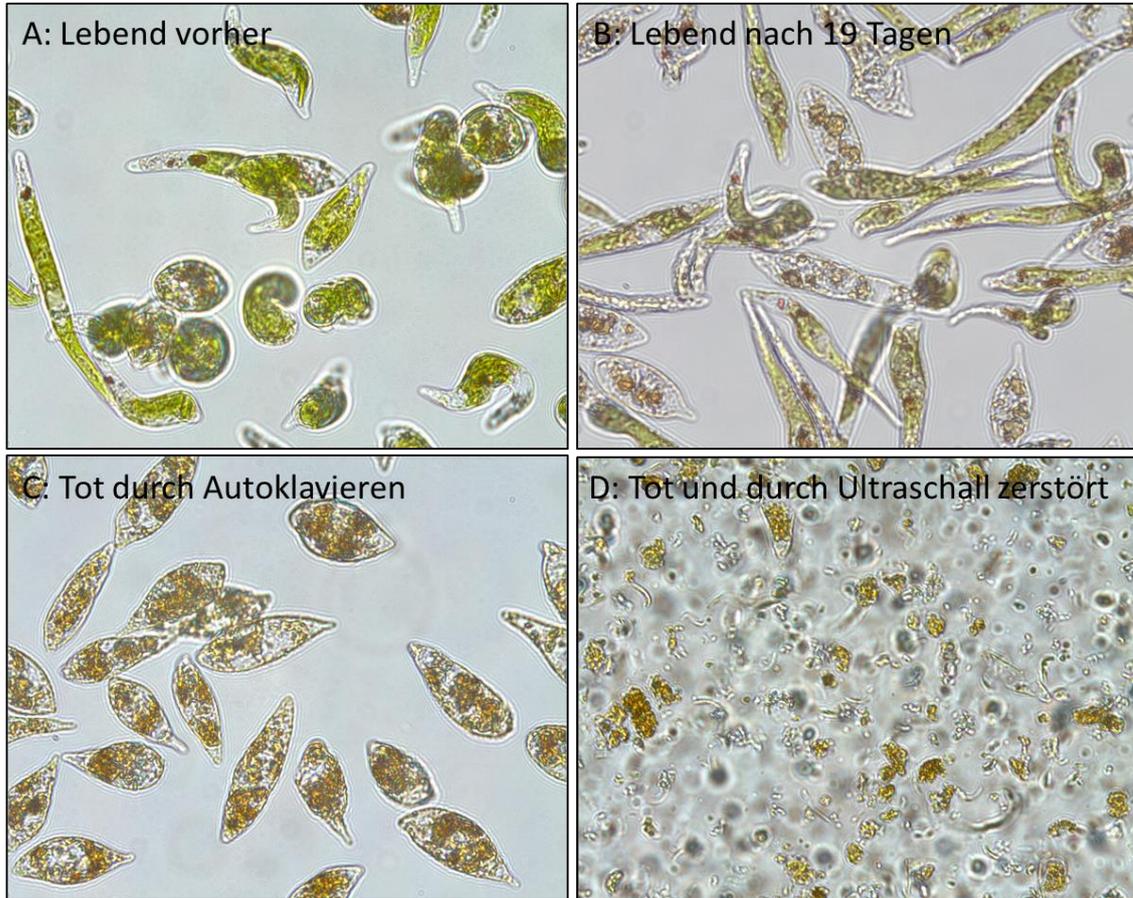


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme der Zellen bei 630-facher Vergrößerung; A+C+D: Zellen vor Versuchsbeginn; B: ursprünglich lebende Zellen, 19 Tage nach Versuchsstart in 0,01 mM Uranlösung in Sulfatmedium bei pH = 3. Etwa 1/3 der Zellen zeigte veränderte Zellmorphologie.

Die Versuche zur Abhängigkeit der Bioakkumulation vom Zellzustand und der Zeit wurden ausschließlich in Natriumsulfat-Medium und bei einem Start-pH-Wert von $3,0 \pm 0,1$ sowie einer Urankonzentration von 0,01 mM durchgeführt. Die pH-Werte nach Versuchsende blieben bei all diesen Versuchen mit einem Start-pH-Wert von $3,0 \pm 0,1$ in Sulfat-Medium innerhalb des Fehlers unverändert. Die Bioakkumulation von Uran an lebenden und toten Zellen wurde außerdem in einem weiteren Versuch bei einer höheren Uran-Startkonzentration von 0,5 mM in Sulfat-Medium (pH = 3) untersucht. Diese höhere Konzentration übersteigt AMD-relevante Urankonzentrationen leicht (die maximale gemessene Urankonzentration in Königstein lag bei 0,3 mM), ermöglichte aber im Folgenden die Untersuchung der Urananbindung auch mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden. Eine genaue Beschreibung der Durchführung der Versuche und der Vorbehandlung der Zellen ist

in Kapitel 5.6 aufgeführt.

Die detaillierten Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 zusammengefasst. Zur besseren Veranschaulichung gibt Abbildung 44 jedoch auch einen graphischen Überblick zu den erhaltenen Resultaten.

Tabelle 18: Zusammengefasste Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom Zustand der Zellen bei pH 3 in sulfatischem Medium (3,48 g/l Na₂SO₄) und 0,01 mM Uran

Zeit nach Versuchs- start [hh:mm]	Aufgenommenes Uran					
	Lebende Zellen		Tote Zellen		Zerstörte Zellen	
	Btm = 0,8 g/l		Btm = 0,7 g/l		Btm = 0,6 g/l	
	mg/g <i>Euglena</i> Btm	% Ausgangs- menge	mg/g <i>Euglena</i> Btm	% Ausgangs- menge	mg/g <i>Euglena</i> Btm	% Ausgangs- menge
0:25	0,20 ± 0,0	6,8 ± 0,2	2,04 ± 0,09	63,1 ± 1,3	2,42 ± 0,26	63,3 ± 5,4
20:06	1,10 ± 0,1	37,5 ± 3,0	2,17 ± 0,10	67,2 ± 1,5	2,53 ± 0,41	65,9 ± 2,1
92:40	1,77 ± 0,2	59,9 ± 2,0	2,06 ± 0,04	63,7 ± 0,8	2,46 ± 0,44	63,9 ± 1,0
118:10	1,86 ± 0,2	62,9 ± 2,4	2,03 ± 0,02	63,0 ± 1,5	2,41 ± 0,41	62,7 ± 1,6

Tabelle 19: Zusammengefasste Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom Zustand der Zellen bei pH 3 in sulfatischem Medium (3,48 g/l Na₂SO₄) bei einer erhöhten Urankonzentration von 0,5 mM Uran

Zeit nach Versuchsstart [hh:mm]	Aufgenommenes Uran			
	Lebende Zellen		Tote Zellen	
	Btm = 1,7 g/l		Btm = 1,5 g/l	
	mg/g <i>Euglena</i> Btm	% Ausgangsmenge	mg/g <i>Euglena</i> Btm	% Ausgangsmenge
0:20	0,84 ± 0,5	1,2 ± 0,6	11,38 ± 0,73	14,2 ± 1,3
119:45	24,75 ± 2,9	34,7 ± 4,1	11,53 ± 0,52	14,4 ± 0,7
239:45	32,17 ± 1,2	45,0 ± 1,2	11,47 ± 0,48	14,3 ± 0,4
313:45	32,27 ± n.d.	45,5 ± n.d.	12,02 ± n.d.	14,4 ± n.d.
649:23	33,16 ± 0,2	46,8 ± 0,3	12,97 ± 0,70	15,6 ± 1,0

Im oberen Diagramm der Abbildung 44 sind zunächst die aufgenommenen Uranmengen pro Gramm *Euglena*-Biotrockenmasse für ursprünglich lebende, tote und zerstörte *Euglena*-Zellen bei einer Uran-Startkonzentration von 0,01 mM (= $1 \cdot 10^{-5}$ M) aufgetragen. Die Uran-Aufnahme durch die Zellen wurde hier über einen Zeitraum von etwa 5 Tagen beobachtet. Auffällig ist, dass sowohl für die toten, intakten Zellen als auch für die toten, zerstörten Zellen bereits innerhalb von Minuten die Uraufnahme abgeschlossen ist. Bereits bei der ersten Probenentnahme nach 25 min sind etwa (2-2,5) mg Uran pro g *Euglena*_{Btm} aufgenommen, d.h. knapp über 60 % Uran wurden aus den Probenlösungen entfernt. Bei allen weiteren Beprobungen änderte sich dieser Wert nicht mehr signifikant. Das heißt hier ist von einer reinen Sorption durch chemische Anbindung an vorhandene Bindungsstellen bzw. durch physikalische Anbindung an die Zelloberflächen auszugehen. Diese Art der Anbindung passiert sehr schnell. Die in Summe höhere Aufnahmekapazität bei den zerstörten Zellen im Gegensatz zu den intakten toten Zellen, trotz vergleichbarer eingesetzter Biotrockenmasse, lässt sich durch die vergrößerte verfügbare Sorptionsoberfläche bei den zerstörten Zellen

erklären. Über den untersuchten Zeitraum von knapp 5 Tagen ist diese Anbindung stabil und es wurde kein Uran wieder abgelöst (siehe Abbildung 44).

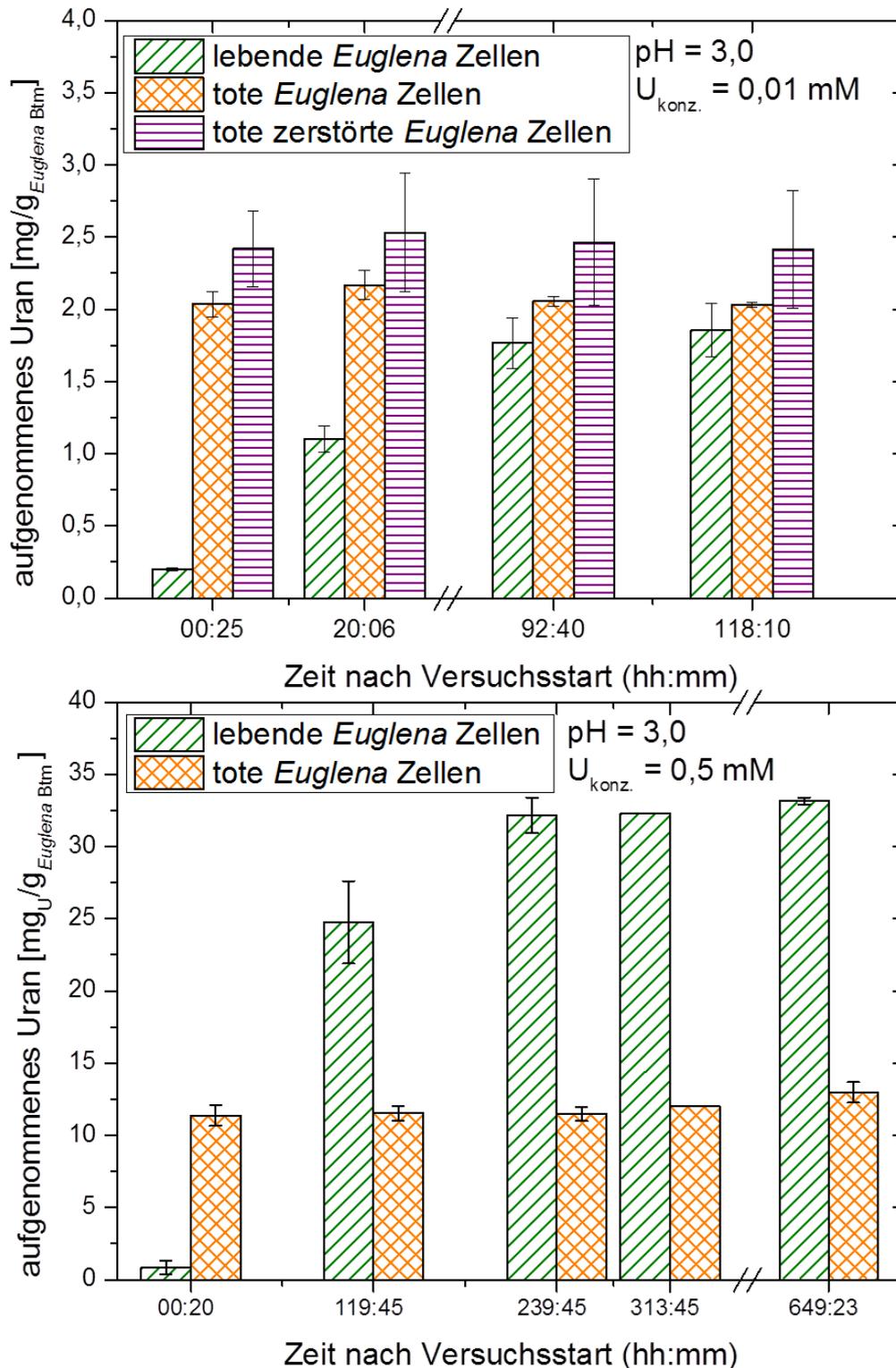


Abbildung 44: Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Sulfat-Medium bei pH 3; oben: Versuch über etwa 5 Tage bei einer AMD-relevanten Urankonzentration von 0,01 mM; unten: Versuch bei einer erhöhten Urankonzentration von 0,5 mM über etwa 27 Tage

Bei den ursprünglich lebenden Zellen im Versuch ist die Uran-Anbindung deutlich langsamer. Zum Zeitpunkt der ersten Beprobung wurden nur etwa 0,2 mg Uran pro Gramm

Biotrockenmasse aufgenommen. Über die Zeit nimmt der Betrag des an den Zellen aufgenommenen Urans langsam zu und beträgt nach etwa 5 Tagen rund 1,8 mg pro Gramm Biotrockenmasse. Mikroskopische Kontrollen nach dieser Zeit bestätigen, dass auch nach 5 Tagen in dieser uranhaltigen Lösung noch ein überwiegender Anteil an Zellen am Leben war (etwa 2/3 der Zellen waren unverändert grün gefärbt und bewegen sich intensiv), auch wenn dann zunehmend mehr tote bzw. gestresste Zellen vorhanden waren als zu Beginn des Versuches (etwa 1/3 der Zellen zeigen Stressveränderungen; siehe Abbildung 43, Bild B, Zellzustand der ursprünglich lebenden Zellen nach 19 Tagen in der Uranlösung). Sollte es sich bei der Uranbioakkumulation durch die lebenden Zellen um einen aktiven Prozess handeln, wäre somit anzunehmen, dass die Aufnahme an Uran zum Ende des Versuches eventuell noch nicht abgeschlossen war.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im folgenden Versuch bei höherer Urankonzentration von 0,5 mM Uran in Sulfatmedium (3,48 g/l Na_2SO_4 bei pH = 3) ein deutlich längerer Zeitraum von etwa 27 Tagen während der Bioakkumulation überwacht. Die Ergebnisse dieses Versuches sind im unteren Diagramm der Abbildung 44 zusammengefasst. Wie man aus dem Diagramm gut erkennen kann, ist erst nach etwa 9 – 10 Tagen die Aufnahme des Urans durch die ursprünglich lebenden Zellen nahezu abgeschlossen und der aufgenommene Gehalt an Uran bleibt von da an relativ konstant. Gründe hierfür könnten die Einstellung eines Gleichgewichtes nach dieser Zeit sein, aber auch der ansteigende Stress für die Zellen, wodurch eine aktive Uranaufnahme zunehmend gehemmt wird. Ähnlich wie im vorangegangenen Versuch bei AMD-relevanter Uran-konzentration ist die Uran-Bioakkumulation auch diesmal durch die toten Zellen bereits sehr schnell abgeschlossen. Schon bei der ersten Probenentnahme nach etwa 20 Minuten waren bereits rund 11 mg Uran pro Gramm *Euglena*-Biotrockenmasse aufgenommen worden. Dieser Wert änderte sich über den langen Versuchszeitraum von etwa 27 Tagen so gut wie nicht mehr. Das bestätigt die Annahme, dass bei den toten Zellen eine stabile Uran-anbindung an die tote *Euglena*-Biomasse in Folge eines Biosorptionsprozesses stattfindet.

Auffällig an diesen Ergebnissen ist, dass die ursprünglich lebenden Zellen hier deutlich größere Mengen an Uran aufnehmen konnten. So sind nach den 27 Tagen Versuchsdauer, trotz der annähernd gleichen Biotrockenmassegehalte in den Versuchen mit lebenden und toten Zellen, etwa 33 mg Uran pro Gramm Biotrockenmasse durch die ursprünglich lebenden Zellen aufgenommen worden, aber nur etwa 13 mg Uran pro Gramm Biotrockenmasse durch die toten Zellen. Das bestätigt die Annahme, dass es sich hierbei um einen aktiven Aufnahmeprozess des Urans durch die Zellen handelt. In den ersten Tagen scheint hierbei zunächst ein Abwehrmechanismus, Uran von der Bindung an den Zellen abzuhalten. Nach einiger Zeit aber wird zunehmend mehr und mehr Uran durch die Zellen aufgenommen und fest gebunden.

Mikroskopische Untersuchungen (siehe Abbildung 45) zeigten allerdings, dass die ursprünglich lebenden Zellen nach Versuchsende nicht mehr lebten, sondern dass nahezu alle Zellen Stressveränderungen aufwiesen und dadurch vermutlich auch abgestorben waren, ähnlich den beschriebenen Zellveränderungen im vorherigen Kapitel. Für einen Einsatz von *Euglena mutabilis* zum Abtrennen von Uran aus Wässern z.B. zu Reinigungszwecken, sollten daher möglichst Bedingungen geschaffen werden, die den Zellen ein längeres Überleben ermöglichen, um höhere Bioakkumulationswerte zu erreichen. Dies könnte z.B. durch die Zufuhr von notwendigen Nährstoffen erreicht werden.

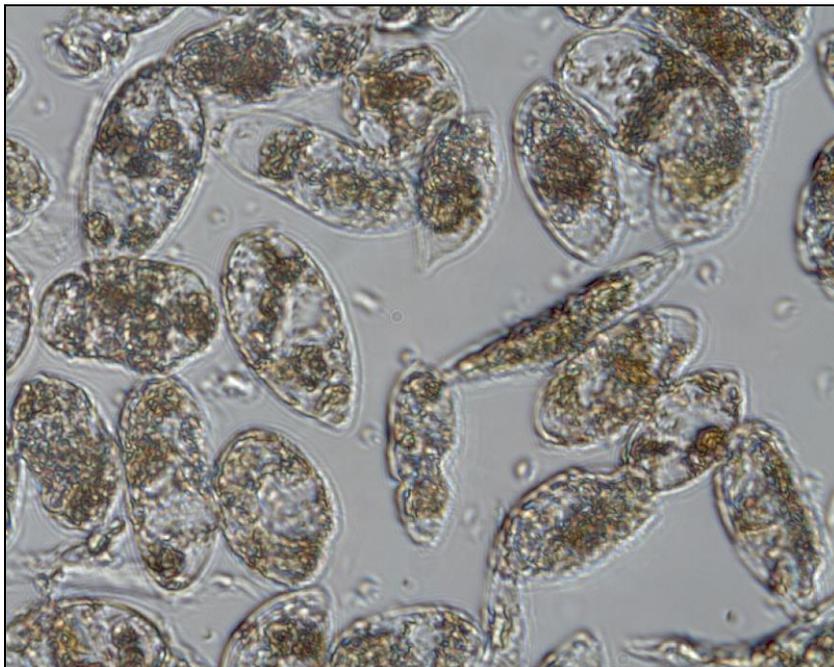


Abbildung 45: 630-fache Vergrößerung der ursprünglich lebenden Zellen nach Versuchsende (~ 27 Tage) in 0,5 mM Uranlösung (pH = 3, Natriumsulfatmedium)

Bioakkumulation von Uran aus natürlichen AMD-Gewässern

Da die Ergebnisse der vorangegangenen Bioakkumulationsversuche bei sauren pH-Werten im sulfatischen Medium sehr vielversprechend waren, sollte im nächsten Schritt die Anwendbarkeit der *Euglena*-Zellen zur Reinigung von urankontaminierten Wässern getestet werden. Dazu wurden erneut Bioakkumulationsversuche in derselben Art, wie zuvor im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, durchgeführt. Zu den gewaschenen Zellen wurden jedoch diesmal steril-filtrierte Wasserproben von den oben besprochenen Standorten Königstein und Gessenwiese zu den Zellen gegeben. Abgesehen von der Filtration der Wässer wurden diese ansonsten chemisch nicht verändert und besaßen somit die chemische Zusammensetzung und Urankonzentration wie in Abschnitt 3.1.1 und 3.2.1 angeführt. Da es aber diverse Abweichungen zwischen den Proben, abhängig vom Probeentnahmezeitpunkt gab, sind in Tabelle 20 die wichtigsten Werte speziell für die in

diesen Versuchen eingesetzten Wässer dargestellt.

Tabelle 20: Hauptkomponenten und pH-Werte der eingesetzten AMD-Wässer für Bioakkumulationsversuche an *Euglena mutabilis* Zellen

		Königstein		Gessenwiese
		Drainagenwasser	Tropfsteinwasser	Drainagenwasser
Uran	mg/l	10,4	60,6	0,35
Sulfat	mg/l	771	2040	4280
Chlorid	mg/l	27,8	43,5	84,7
pH-Wert	-	3,1	2,6	3,9

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit natürlichen AMD-Wässern sind in Tabelle 21 aufgelistet. Jeder Wert in dieser Tabelle stellt die Mittelung aus einer Dreifachbestimmung dar. In den verschiedenen Versuchsdurchläufen wurden stark schwankende Bioakkumulationen des Urans an den Zellen ermittelt. In einigen Versuchen wurden bis über 20 % des Urans aus der Lösung entfernt und in anderen Versuchen wurde wiederum nur sehr wenig oder auch gar kein Uran durch die Zellen aufgenommen und aus dem Wasser entfernt. Die sauren pH-Werte der Wässer haben sich während des Versuches nicht signifikant verändert und wurden daher nicht noch einmal angegeben.

Tabelle 21: Zusammengefasste Ergebnisse der Uran-Bioakkumulationsexperimente an *Euglena mutabilis* Zellen mit natürlichen AMD-Wässern von der Gessenwiese sowie aus der Drainagerinne und von den tropfsteinähnlichen Biofilmen aus der Grube Königstein

	Btm [g/L]	Aufgenommenes Uran	
		mg/g _{Euglena Btm}	% Ausgangsmenge
Gessenwiese	0,60	0,00 ± 0,08	2,9 ± 2,4
	0,42	0,21 ± 0,00	26,3 ± 0,5
	0,74	0,00 ± 0,01	0,0 ± 3,5
Drainagenwasser Königstein	0,82	3,59 ± 0,20	28,0 ± 1,3
	0,60	1,43 ± 0,09	8,6 ± 0,5
	0,42	0,00 ± 0,34	0,0 ± 1,4
	0,74	0,93 ± 0,32	6,7 ± 2,2
Tropfsteinwasser Königstein	0,82	2,43 ± 0,21	3,4 ± 0,3
	0,60	3,52 ± 1,23	3,6 ± 1,3
	0,74	0,00 ± 2,34	0,0 ± 2,8

Obwohl die Wässer in einem optimalen pH-Bereich für die Bioakkumulation lagen (wie aus den pH-abhängigen Modellversuchen ersichtlich) und die Urangehalte mit denen aus den vorangegangenen Modell-Versuchen vergleichbar sind, wurden generell die Erwartungen auf einen guten Reinigungserfolg der Wässer hinsichtlich der Urankontamination nicht erfüllt. Dies kann durch die große Anzahl anderer in den natürlichen Wässern enthaltener Substanzen erklärt werden. Zum einen kommt es zu einem Wettbewerb um entsprechend vorhandene Sorptions- bzw. Bindungsplätze an den Zellen und Zelloberflächen, zum

anderen sind in den Wässern auch Substanzen vorhanden, welche Komplexverbindungen mit dem enthaltenen Uran eingehen können. So können z.B. die recht hohen Gehalte an Calcium, Magnesium oder Zink in den natürlichen AMD-Wässern entsprechende Bindungsplätze an den Zellen oder Kanäle in die Zellen blockieren.

Trenfield et al. (2012) stellten z.B. bei Untersuchungen zur toxischen Wirkung des Urans auf *Euglena gracilis* fest, dass durch Anwesenheit von gelöstem organischen Kohlenstoff in Form von Fulvinsäure die Toxizität des Urans für die Zellen gesenkt wird. Sie führten diesen Effekt auf eine geringere Bioverfügbarkeit des Urans, aufgrund der Komplexierung durch die Fulvinsäure zurück. Dies zeigt eindrucksvoll, dass in Laborversuchen in vereinfachten Systemen erhaltene Ergebnisse, mit großer Vorsicht und nur unter Durchführung weiterer Kontrollexperimente zum Abschätzen natürlicher Abläufe und Wechselwirkungen geeignet sind.

In den weiteren direkt anschließenden Untersuchungen spektroskopischer und mikroskopischer Art sollte an den Zellen aus den verschiedenen Bioakkumulationsversuchen anschließend der Ort sowie die Art der Urananbindung untersucht und aufgeklärt werden. Dabei stand besonders die Speziation des gebundenen Urans sowie die Lokalisation relativ zur Zelle im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen.

3.3.2. LIFS-Untersuchung der an den Zellen gebundenen Uranspezies

Abhängigkeit von pH-Wert und Hintergrundmedium

Nach Ende der Bioakkumulationsversuche wurden die Zellsuspensionen durch Zentrifugation in Lösung und Zellpellet unterteilt. Die Lösungen wurden mittels ICP-MS analysiert. Nach Waschen und resuspendieren der Zellpellets im entsprechenden Hintergrundmedium ohne Uran erfolgte die spektroskopische sowie später auch mikroskopische Untersuchung an den Zellen.

In Abbildung 46 und Abbildung 47 sind repräsentative Beispiele für die Fluoreszenzspektren von Uran dargestellt, welches an den Zellen in Perchlorat- bzw. Sulfatmedium gebunden wurde, bei Anregung mit Laserlicht einer Wellenlänge von 266 nm (Nd-YAG Laser, Minilite, Continuum). Die LIFS-Analysen wurden an einem TRLFS-System durchgeführt, welches die Aufnahme von zeitlich verzögerten und zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren ermöglicht. Im Folgenden wird daher häufig auch von LIFS/TRLFS-Messungen die Rede sein. Aufgrund der hohen Anteile an organischen Substanzen innerhalb der Proben, die ebenfalls nach Anregung mit 266 nm zur Fluoreszenzemission neigen, wurden die Fluoreszenzspektren an den Zellen bei einer Verzögerungszeit von 80 ns gemessen. In den Diagrammen sind zusätzlich die Spektren der Ausgangsuranlösungen dargestellt, sowie die Bandenlage von entsprechenden Referenzsubstanzen (Uranyl in

Perchlorat und Uranylsulfat) aus der Literatur, welche als gestrichelte Linien eingezeichnet sind. Die Emissionsmaxima der Ausgangslösungen (präparierte Uranlösungen vor Zugabe zu den *Euglena*-Zellen) sind in sehr guter Übereinstimmung mit denen der dokumentierten Referenzsubstanzen, d.h. im Perchloratmedium mit Uranyl in Perchlorat (Bell und Biggers, 1965) bzw. im Sulfatmedium mit Uranylsulfat (UO_2SO_4) (Arnold et al., 2011).

Im Perchlorat-Hintergrundmedium (Abbildung 46) sind die Emissionsbanden von Uran, welches an *Euglena*-Zellen bei $\text{pH} = 3$ gebunden hat, im Vergleich zu den Emissionsbanden der Ausgangslösung um etwa (6 bis 8) nm (abhängig vom entsprechenden Emissionsmaximum) zu höheren Wellenlängen hin verschoben. Dies weist auf verschiedene chemische Umgebungen und somit unterschiedliche Koordinationen des Urans hin. Daraus kann geschlossen werden, dass während des Bioakkumulationsprozesses eine neue Uranspezies an oder in den *Euglena*-Zellen gebildet wurde.

Eine kleinere aber signifikante Verschiebung, ebenfalls zu höheren Wellenlängen hin, gibt es auch beim Spektrum des Urans an den *Euglena*-Zellen aus den Versuchen im Sulfatmedium (siehe Abbildung 47). Diese Verschiebung beträgt nur wenige Nanometer, ist aber dennoch signifikant und wurde bei allen Proben gemessen. Der Unterschied zwischen den Emissionsmaxima der Spektren der an den Zellen gebildeten Uranspezies und denen des Urans in der Ausgangslösung betrug nur (1,8 bis 4,1) nm.

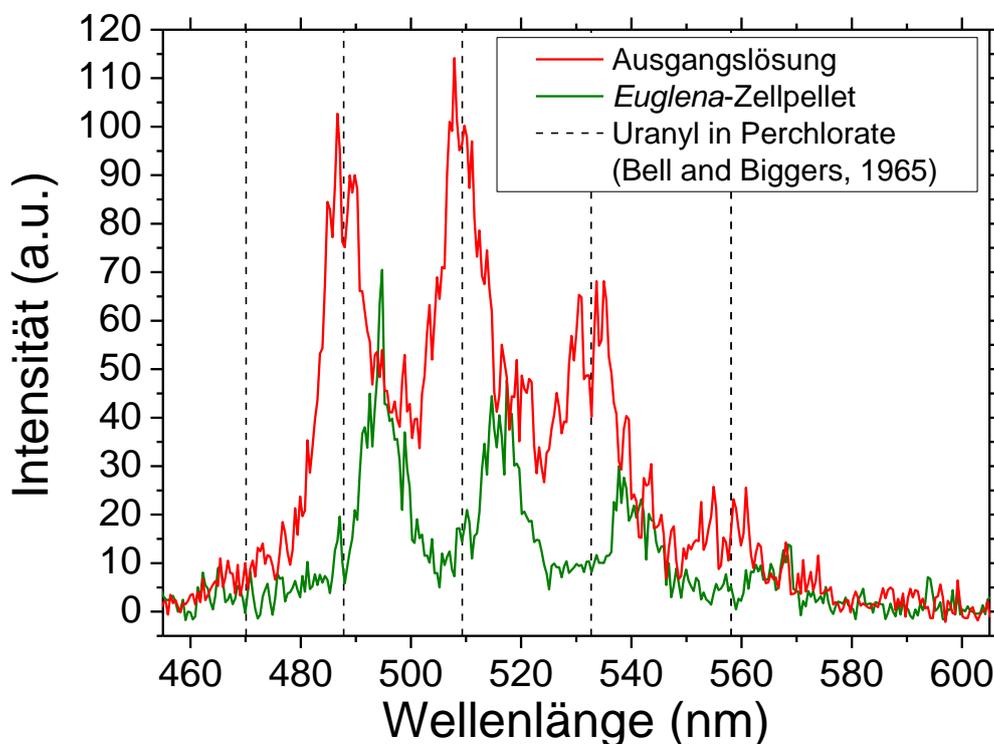


Abbildung 46: LIFS-Spektren der Ausgangslösung (rot) und des *Euglena*-Zellpellets (grün) nach 5 Tagen des Bioakkumulationsversuches in NaClO_4 ($\text{pH} = 3$; 0,01 mM Uran)

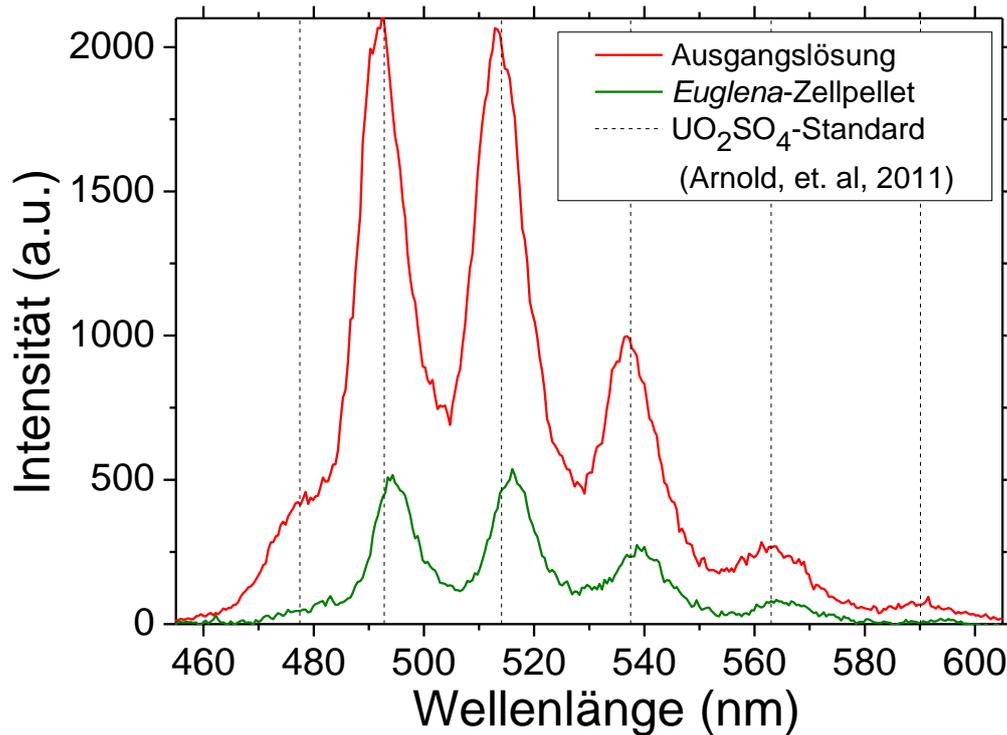


Abbildung 47: LIFS-Spektren der Ausgangslösung (rot) und des *Euglena*-Zellpellets (grün) nach 5 Tagen des Bioakkumulationsversuches in Na₂SO₄ (pH = 3; 0,01 mM Uran)

Um die Koordination des immobilisierten Urans an oder in den Zellen zu identifizieren, wurden die erhaltenen Fluoreszenzemissionsspektren mit verfügbaren Daten aus der Literatur für spezielle Referenzsubstanzen bzw. Referenzsysteme mit Uran und diversen Mikroorganismen verglichen. Hierzu sind die in dieser Arbeit gemessenen Bandenlagen der Fluoreszenzemissionsmaxima der *Euglena*-Uran-Systeme im Perchlorat- bzw. Sulfat-Medium, in Abhängigkeit vom pH-Wert in Tabelle 22 aufgelistet, vergleichend zu denen von verschiedenen Uranreferenzverbindungen aus der Literatur. Die Emissionsspektren weisen sechs deutlich erkennbare Maxima auf. Einige Spektren besitzen jedoch ein so starkes Hintergrundrauschen, dass nicht immer alle sechs Maxima durch die Fitting-Prozedur extrahiert werden konnten.

Tabelle 22: Vergleich der LIFS-Emissionsbanden der Uranylspezies der gemessenen Proben und einer Reihe an Referenzverbindungen aus der Literatur

Probe			Emissionsbanden [nm]						
			1	2	3	4	5	6	
pH 3, NaClO ₄	Ausgangslösung	MW	471,1	488,9	509,6	532,2	556,7	582,1	
		sa (1σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9	1,6	
	<i>Euglena</i> Zellen	MW		495,0	516,3	539,9	564,8		
		sa (1σ)		0,5	0,7	1,2	0,9		
pH 3, Na ₂ SO ₄	Ausgangslösung	MW	477,5	493,0	513,7	537,1	562,5	590,1	
		sa (1σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9	1,6	
	<i>Euglena</i> Zellen	MW	478,5	494,9	516,0	538,9	564,6	591,8	
		sa (1σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9	1,6	
pH 4, Na ₂ SO ₄	Ausgangslösung	MW	476,5	492,8	513,9	537,2	562,9	591,3	
		sa (1σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9	1,6	
	<i>Euglena</i> Zellen	MW	477,3	495,6	517,3	541,3	564,4		
		sa (1σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9		
pH 5, Na ₂ SO ₄	<i>Euglena</i> Zellen	MW	479,3	496,8	518,1	541,5	567,0		
		sa (1σ)	1,1	0,8	0,7	1,2	1,4		
pH 6, Na ₂ SO ₄	<i>Euglena</i> Zellen	MW		495,7	518,0	542,2	566,3		
		sa (1σ)		1,4	1,5	1,9	1,6		
Referenzen		Quelle	Emissionsbanden [nm]						
Uran-Referenzsubstanzen									
U-SO ₄ Standard*		(Arnold et al., 2011)	477,5	492,8	514,1	537,5	563,0	590,1	
Uranyl in Perchlorat*		(Bell und Biggers, 1965)	470,1	487,8	509,3	532,7	558,1	585,4	
Uranyl-phosphoryl-Komplexe									
U-ATP		(Merroun et al., 2003)	480,9	495,3	516,5	540,2	564,6	593,8	
U-AMP		(Merroun et al., 2003)		497	519	542	569		
UO ₂ (H ₂ PO ₄) ⁺ / UO ₂ (HPO ₄) ⁻ (pH3)		(Panak et al., 2000)		494	517	541	565		
U(VI)-Phosphoserin		(Koban und Bernhard, 2007)	480,9	496,9	517,6	540,5	565,0		
Uranyl-carboxyl-Komplexe									
UO ₂ (malonat)		(Brachmann et al., 2002)	477	494	515	540	564	594	
UO ₂ (malonat) ₂ ²⁻		(Brachmann et al., 2002)	479	496	517	542	566	597	
UO ₂ (glycin) ₂ ²⁺		(Günther et al., 2007)	478,7	495,3	516,7	540,6	565,0	594,4	
(R-COO) ₂ -UO ₂		(Barkleit et al., 2009)	466,0	481,6	498,1	518,0	539,0	566,0	
Mischung carboxylische + organo-phosphatische Modellssubstanzen mit Uranylperchlorat									
UO ₂ (acetat)/UO ₂ (O-phospho-L-threonin) (200:1)		(Vogel et al., 2010)	462,8	481,7	496,7	517,1	539,9	563,5	594,0
UO ₂ (Acetat)/ UO ₂ (Fructose-6-phosphat) (25:1)		(Vogel et al., 2010)	463,2	479,3	494,8	515,1	537,9	562,9	590,0
Uran gebunden an/in Mikroorganismen									
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> - UO ₂ ²⁺ -complex		(Merroun et al., 2003) ¹	(Typ I)	496,1	517,2	540,9	566,4		
			(Typ II)	495,4	516,8	540,8	566,4		
			(Typ III)	496,3	517,5	541,6	566,3		
<i>Bacillus sphaericus</i> 9602 (pH 2.8)		(Panak et al., 2000) ²		496,1	517,5	537,8	565,4		
Uranyl (5 μM) an/in <i>Chlorella vulgaris</i> pH=4.4		(Vogel et al., 2010) ³		480,5	496,8	517,6	539,9	565,4	
Uranyl (0.1 mM) an/in <i>Chlorella vulgaris</i> pH=4.4		(Vogel et al., 2010) ³		481,7	497,7	516,8	538,3	564,8	590,0

¹ in 0,01 N HClO₄² in 0,9 % NaCl³ in Mineralmedium (siehe Vogel et al. 2010)

* Standardsubstanz

In den Experimenten im sulfatischen Medium bei sauren pH-Werten von 3 bzw. 4 ist der Unterschied zwischen den Spektren, der an den Zellen gebildeten Uranspezies und des Urans in der Ausgangslösung deutlich geringer als bei den Versuchen im Perchlorat-Medium. Es zeigten sich jedoch nahezu vergleichbare Emissionsmaxima für das an den Zellen gebundene Uran in beiden Medien. Somit ist anzunehmen, dass unabhängig vom Hintergrundmedium bei sauren pH-Werten die gleiche Uranyl-Spezies an den Zellen gebildet wurde.

Das an den Zellen immobilisierte Uran bei den höheren pH-Werten 5 und 6 wurde, trotz der deutlich geringeren Bioakkumulation mittels LIFS analysiert (nur für sulfatisches Medium gemessen). Auf den ersten Blick scheinen hier die Maxima 3, 4 und 5 minimal zu höheren Wellenlängen verschoben. Im Rahmen des angegebenen Fehlers stimmen allerdings auch diese Emissionsmaxima mit denen der bei sauren pH-Werten gebildeten Spezies überein. Aufgrund der geringeren Bioakkumulation an den Zellen waren die Spektren jedoch auch stärker verrauscht, was den Fehlerbereich für einige Banden etwas erhöht. Es ist daher davon auszugehen, dass hier eine vergleichbare Uranylspeziation wie bei den sauren pH-Werten an den Zellen ausgebildet wurde.

Ein Vergleich der Emissionsbanden der an den Zellen gebildeten Uranspezies, mit denen der Referenzverbindungen zeigt, dass es mehrere Referenzsubstanzen gibt die ähnliche Bandenlagen aufweisen. Auch verschiedene dokumentierte Emissionsmaxima von Uran gebunden an diverse Mikroorganismen liegen in einem ähnlichen Bereich wie sie in dieser Arbeit gemessen wurden. Eine besonders gute Übereinstimmung gibt es zwischen den gemessenen Emissionsbanden des bei sauren pH-Werten gebundenen Urans an *Euglena*-Zellen zu denen der Referenzverbindungen U-Adenosintriphosphat (U-ATP) (Merroun et al., 2003) sowie $\text{UO}_2(\text{glycin})_2^{2+}$ (Günther et al., 2007). U-ATP steht dabei für eine typische Anbindung über organophosphatische funktionelle Gruppen. Hingegen repräsentiert $\text{UO}_2(\text{glycin})_2^{2+}$ die Anbindung über carboxylische funktionelle Gruppen.

Die Pellikula der Euglenoida bestehen hauptsächlich aus Proteinen und geringeren Gehalten an Lipiden und Kohlenhydraten (Hofmann und Bouck, 1976). Als ein Grundbaustein vieler Proteine in Zellen ist u.a. die Aminosäure Glycin bekannt. Reddy und Prasad (1990) diskutierten, dass die Metall-Bindung in Algen durch Proteine verursacht wird, die große Mengen der Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin beinhalten. Polypeptide, welche aus diesen drei Aminosäuren aufgebaut sind nennt man Phytochelatine. Diese spielen eine wichtige Rolle für höhere Pflanzen und Algen bei der Entgiftung von z.B. Schwermetallen (Gekeler et al., 1988). Auch das Tripeptid Gluthathion, das ebenfalls aus den drei Aminosäuren Cystein, Glycin und Glutaminsäure aufgebaut ist, kommt für eine mögliche Urananbindung durch carboxylische Komplexe in Frage. Die Bildung solcher immobilisierten Uranyl-Komplexe an oder in den *Euglena*-Zellen ist, wie der Vergleich der

Emissionsbandenlagen mit den $\text{UO}_2(\text{glycin})_2^{2+}$ Referenzdaten zeigt, eine mögliche Immobilisierungs-Reaktion. Uranyl-Carboxyl-Komplexe mit Glutaminsäure oder mit Cystein konnten mit den hier angewandten Laserfluoreszenz-Techniken leider nicht detektiert werden, da diese bei Raumtemperatur keine Fluoreszenz aufweisen (Günther et al., 2007, Barkleit et al., 2009).

Die Entstehung von immobilisierten Uranylspezies, gebunden durch organophosphatische Gruppen, wie sie in ATP oder in ATP-ähnlichen Verbindungen vorkommen, ist ebenso möglich. ATP ist eine Energiequelle für grundlegende sowie spezielle Prozesse in nahezu allen lebenden Organismen und wird z.B. während der Photosynthese gebildet, wenn Lichtenergie durch Chlorophyll gesammelt und in Form von ATP in den Zellen gespeichert wird. Die Chelatierung von Uranylionen durch Adenin-Nukleotide wurde bereits häufiger beschrieben und als Inhibitor für diverse metabolische Abläufe diskutiert (Feldman et al., 1967, Rich et al., 1970)

Die Emissionsbanden von Uran gebunden an *Acidithiobacillus ferrooxidans eco-type II* (Merroun et al., 2003) stimmen mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten des Urans an *Euglena*-Zellen (pH 3 und 4) gut überein. Diese Bakterienspezies teilt sich bevorzugt saure Lebensumgebungen mit Organismen wie z.B. *Euglena mutabilis*. Merroun et al. (2003) fanden eine gute Übereinstimmung ihrer LIFS Ergebnisse zu Emissionsbanden von U-ATP und U-AMP sowie zu denen der an *B. sphaericus* gebildeten Uranverbindung. Sie erklärten die Immobilisation des Urans durch *Acidithiobacillus ferrooxidans* mit der Bindung des Urans an organophosphatische Gruppen von Phospholipiden der Zellmembranen und/oder mit der Bindung an Polyphosphatkörper.

Die Emissionsbanden des bei sauren pH-Werten an die *Euglena*-Zellen gebundenen Urans sind weiterhin sehr ähnlich den publizierten Werten für Uran gebunden an *Chlorella vulgaris* (Vogel et al., 2010) und *B. sphaericus* (Panak et al., 2000). Vogel et al. (2010) fanden, dass bei lebenden Algenzellen (*Chlorella vulgaris*) sowohl carboxylische als auch organo-phosphatische Gruppen sowie bei toten Algen-Zellen zusätzlich noch anorganische Phosphat-Gruppen an der Bindung des Urans beteiligt sind. Panak et al. (2000) wiederum fanden überzeugende Hinweise dafür, dass es durch die innersphärische Koordination mit Phosphat-Gruppen der Bakterien-Zellwand zur Urankomplexierung an *Bacilli* kommt. Der an den *Euglena*-Zellen in dieser Arbeit beobachtete Urankomplex könnte somit ähnlichen Charakters sein.

Die LIFS-Ergebnisse aus den Experimenten dieser Studie zeigen, dass in einem pH-Bereich von 3 bis 4, welcher besonders für AMD-geprägte Gebiete relevant ist, die gleiche bioakkumulierte Uranspezies an den *Euglena*-Zellen detektiert werden konnte. Diese immobilisierte Uranspezies ist für eine Bindung von bis zu über 90 % der ursprünglich zugegebenen Uranmenge (0,01 mM U) verantwortlich. Die bisherigen Ergebnisse liefern

allerdings noch keinen Aufschluss über den Bindungsort und somit keine Information darüber ob es sich hier um einen intra- oder extrazellulären Bindungsmechanismus handelt. Die Ergebnisse aus den LIFS-Analysen lassen jedoch den Schluss zu, dass unter den angewandten Bedingungen das aquatische Uran sehr wahrscheinlich durch Bindung über organophosphatische und/oder carboxylische Gruppen der *Euglena*-Zellen bioakkumuliert und somit an der Biomasse immobilisiert wird. Eine direkte Unterscheidung mittels LIFS zwischen der phosphatischen bzw. carboxylischen Urananbindung ist jedoch nicht möglich, weshalb beide Spezies allein oder in Kombination möglich sind und keine von beiden ausgeschlossen werden kann.

Abhängigkeit vom Zustand der Zellen

Die Zellpellets aus den Bioakkumulationsversuchen mit Uran an lebenden, toten und zerstörten *Euglena*-Zellen (pH 3, Na₂SO₄ 3,48 g/l, 0,01 mM U) wurden hinsichtlich ihrer Uranspeziation mittels LIFS untersucht. Die Emissionsmaxima der an den Zellen gebildeten Uranspezies sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Wie anhand der Werte zu erkennen ist und der Vergleich mit den Daten aus Tabelle 22 zeigt, sind die Bandenlagen für lebende, tote und zerstörte Zellen sehr ähnlich und innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den toten und zerstörten Zellen eine vergleichbare Uranspeziation gebildet wird wie bei den lebenden Zellen. Aus den Bioakkumulationsexperimenten ist jedoch ablesbar, dass bei den lebenden Zellen von einem aktiven Prozess und somit auch mit einer aktiven Bildung der immobilisierten Uranspezies auszugehen ist. Im Gegensatz dazu steht die passive Bindung des Urans an vorhandene Bindungsplätze bei den toten und zerstörten Zellen. Die ermittelten Bandenlagen in allen drei Fällen lassen auf eine ähnliche Bindung des Urans an organophosphatische und/oder carboxylische, funktionelle Gruppen schließen. Es ist dabei aber auch möglich, dass bei den toten Zellen nur die carboxylische Anbindung und bei den lebenden Zellen nur die phosphatische Anbindung, bzw. umgekehrt, vorherrscht. Eine Unterscheidung ist jedoch fluoreszenzspektroskopisch zurzeit nicht möglich.

Tabelle 23: Vergleich der Emissionsmaxima aus den Versuchen an lebenden, toten und zerstörten *Euglena*-Zellen in sulfatischer Lösung (pH = 3, 0,01 mM Uran)

Probe		Emissionsbanden [nm]						
		1	2	3	4	5	6	
pH 3, Na ₂ SO ₄	Lebende	MW	480,5	495,9	517,5	540,4	566,2	-
	<i>Euglena</i> Zellen	sa (1σ)	4,3	0,7	0,7	0,8	2,5	
	Tote	MW	478,8	495,4	516,8	540,2	565,2	588,3
	<i>Euglena</i> Zellen	sa (1σ)	1,4	0,6	0,3	0,9	1,4	3,9
	zerstörte	MW	475,8	495,2	516,5	539,1	564,1	-
	<i>Euglena</i> Zellen	sa (1σ)	5,8	0,4	0,6	0,8	2,1	

Versuche mit natürlichem, urankontaminierten Wasser aus AMD-Gebieten

Die Zellen aus den Bioakkumulationsexperimenten mit realen AMD-Wässern wurden, trotz der nachgewiesenen signifikant geringeren Aufnahme von Uran, ebenfalls mittels LIFS untersucht. Dabei zeigten lediglich die Zellen, welche mit dem Drainagenwasser aus Königstein in Kontakt waren, auswertbare Uranspektren. Die untersuchten Proben, welche mit Drainagenwasser von der Gessenwiese in Kontakt waren, lieferten dabei nur sehr verrauschte Spektren mit geringer Intensität, so dass eine Auswertung der Emissionsmaxima nicht möglich war. Jene Zellen, die mit dem Wasser von den Tropfsteinen in Kontakt waren, lieferten ebenfalls keine auswertbaren Spektren, da hier zusätzlich zu den geringen aufgenommenen Urangehalten ein Quencheffekt für die Uranfluoreszenz durch die hohen Eisengehalte in diesem Wasser hinzukam.

Die Emissionsbanden der an den Zellen gebildeten Uranspezies nach Kontakt zum Drainagenwasser aus der Grube in Königstein sind in Tabelle 24 zusammen mit den Banden der Ausgangslösung (steril filtriertes Wasser aus der Drainagerinne Königstein) zusammengefasst.

Tabelle 24: Emissionsmaxima der LIFS-Messungen aus dem Versuch mit natürlichem AMD-Wasser aus der Drainagerinne in Königstein

Probe	Verzögerungszeit [ns]		Emissionsbanden [nm]					
			1	2	3	4	5	6
Ausgangslösung	120, 200	MW	476,9	492,6	513,3	536,3	561,7	590,3
		sa (1 σ)	1,0	0,5	0,7	1,2	0,9	1,6
Euglena-Zellen	80	MW		494,9	515,9	540,9	563,3	
		sa (1 σ)		0,5	0,7	1,2	0,9	
Abweichung zwischen Lösung und Zellen				+ 2,3	+ 2,6	+ 4,6	+ 1,6	

Die Emissionsbanden der Ausgangslösung stimmen sehr gut mit den publizierten Werten von Arnold et al. (2011) überein, welche ebenfalls die Uran-Speziation in Wasserproben aus der Mine in Königstein untersucht und diskutiert haben. Wie in diesem Artikel beschrieben wird, ist die Uran-Speziation in der AMD-geprägten Umgebung in der Grube in Königstein im pH-Bereich 2,5 bis 3,0 dominiert von der sehr mobilen aquatischen Uransulfatspezies $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$.

Die Emissionsmaxima der Spektren für das an den *Euglena*-Zellen akkumulierte Uran aus dem Drainagenwasser stimmen mit den Banden aus den modelhaften Bioakkumulationsversuchen bei sauren pH-Werten in sulfatischen oder perchloratigen Medien gut überein. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass das aus dem natürlichen AMD-Wasser aufgenommene und an den Zellen immobilisierte Uran eine vergleichbare Speziation aufweist, wie sie in den Modell-Experimenten nachgewiesen wurde. Wie bereits ausführlich diskutiert wurde, ist

somit auch hier eine Anbindung und Komplexierung des Urans durch organophosphatische bzw. carboxylische Gruppen sehr wahrscheinlich.

Die durchgeführten LIFS-Messungen konnten zwar einen Zugewinn an Informationen zur Speziation des an den Zellen immobilisierten Urans liefern, aber sie ermöglichen keine Aussagen zum Ort der Anbindung an den Zellen. Die Frage ob es zu einer externen Anbindung des Urans an Oberflächengruppen auf der äußeren Pellikula oder zum Eindringen des Urans ins Zellinnere und zur Anreicherung dort kommt bleibt weiter offen. Um Aufschluss hinsichtlich der Lokalisation des Urans an oder innerhalb der Zellen zu bekommen wurden im Folgenden weitere fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Analysemethoden eingesetzt.

3.3.3. CLSM/LIFS-Untersuchungen

Für die Analyse der *Euglena*-Zellen mittels des gekoppelten CLSM/LIFS-Systems wurden die Zellen fünfmal im entsprechenden Hintergrundmedium ohne Uran gewaschen und als Zellsuspension auf einem Objektträger aufgetragen. Die Anregung der Probe erfolgte mit Laserlicht der Wellenlänge 408 nm (Dioden Laser COH 405, Coherent Inc., Santa Clara, USA) und die Detektion der Spektren mit dem extern in den Strahlengang eingekoppeltem Spektrographen der Firma Andor verbunden mit einer nachgeschalteten ICCD-Kamera.

Die Schwierigkeit bei der Messung von Fluoreszenzspektren mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System besteht darin, dass keine zeitlich aufgelöste oder auch zeitlich verzögerte Messung möglich ist. Das heißt, die Probe wird kontinuierlich durch den Laser angeregt und die Fluoreszenz wird zeitgleich kontinuierlich detektiert. Somit ist es nicht möglich Fluoreszenzen mit sehr kurzer Fluoreszenzlebenszeit von solchen mit langer Lebenszeit zu trennen. Dies ist gerade bei Proben mit hohem Anteil an organischen Inhaltsstoffen ein Problem, da viele organische Substanzen gerade bei Anregung mit UV- oder UV-nahen Wellenlängen fluoreszieren. Die Fluoreszenzlebenszeit von organischen Inhaltsstoffen ist meist sehr kurz im Bereich von Nanosekunden und kann daher bei der Messung mit dem LIFS/TRLFS-System durch Erhöhung der Verzögerungszeit vom Fluoreszenzspektrum des Urans abgetrennt werden. Da diese zeitverzögerte Messung des Spektrums mit dem momentanen CLSM/LIFS-System nicht möglich ist, musste damit gerechnet werden, dass die Spektren durch Fluoreszenzsignale der organischen Inhaltstoffe überlagert werden. Daher ist ein intensives Uransignal nötig, damit dieses trotz der Überlagerung eindeutig detektierbar und auswertbar ist.

Die Zellen, welche im Bioakkumulationsversuch nur mit einer Konzentration von 0,01 mM Uran in Kontakt waren, überschritten das Detektionslimit des Systems nicht ausreichend, selbst wenn sie über 90 % des Urans aus der Lösung immobilisierten. Daher werden im Folgenden nur die Proben aus den Versuchen mit der erhöhten Urankonzentration von

0,5 mM Uran diskutiert. So wurden sowohl ursprünglich lebende, als auch tote *Euglena*-Zellen, aus den Versuchen im sauren (pH = 3) sulfatischen Medium (0,5 mM Uranstartkonzentration in Lösung) mittels dem gekoppelten CLSM/LIFS-System analysiert.

Mit der CLSM sind ohne jegliche Anfärbung der Zellen, allein aufgrund der vorhandenen Eigenfluoreszenz der Zellen, sehr scharfe fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen möglich, wie Abbildung 48 zeigt. Diese Aufnahme wurde unter Verwendung eines 100er Öl-Objektivs (HCX_PL_APO 100x/1,40-0,70 oil; Leica), eines Deckgläschens sowie Immersionsöl für die Fluoreszenzmikroskopie (fluoreszenzfreies Immersionöl von Applichem) gemacht. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die Zellen sehr scharf und detailliert darzustellen. Es zeigte sich aber, dass von Proben unter Deckglas und mit Immersionsöl kein Uransignal mittels des eingekoppelten LIFS-Systems gemessen werden konnte. Wahrscheinlich wird durch das Deckglas und das Öl zu viel des Signals herausgefiltert. Aus diesem Grund wurden für die Bestimmung der Lokalisation und Speziation des in/an den Zellen gebundenen Urans, mittels der gekoppelten CLSM/LIFS-Technik, ausschließlich Luftobjektive verwendet. Dabei wurde die Probe nicht abgedeckt. Die Aufnahmen der Zellen mit den Luftobjektiven führten jedoch nicht zu so scharfen intensiven Fluoreszenzbildern wie in Abbildung 48.

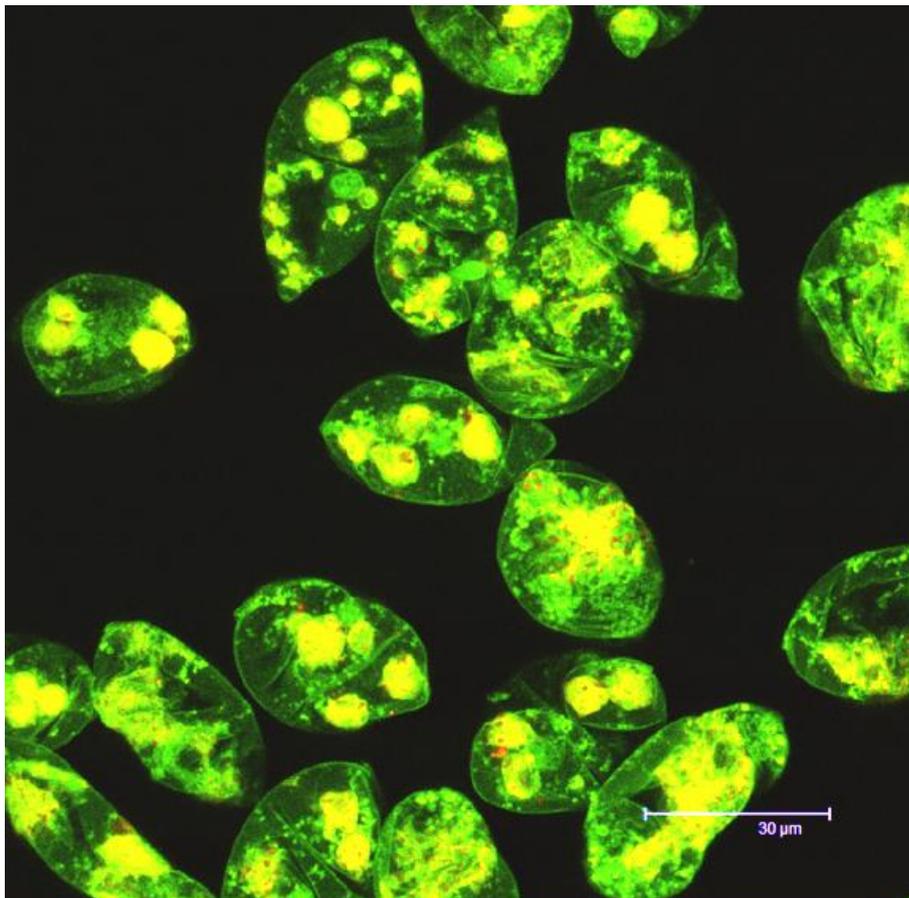


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopisches Bild von den ursprünglich lebenden Zellen nach Inkubation in 0,5 mM uranhaltiger Lösung (pH 3, Sulfatmedium), 100fache-Vergrößerung (grün: (437 – 598) nm; rot: (588 – 702) nm; gelb dargestellt werden Bereiche in denen sich rot und grün zugewiesene Fluoreszenzabbildungen überlagern)

In Abbildung 49 sind als Ergebnis für die ursprünglich lebenden Zellen zwei fluoreszenzmikroskopische Bilder mit markierter ROI („Region of Interest“, Messregion, siehe Pfeil) zusammen mit den zugehörigen Fluoreszenzemissionsspektren (blaues Spektrum) dargestellt. Diese Bilder wurden mit einem 20er Luft-Objektiv (HC_PL_Fluotar 20x/0,5; Leica) aufgenommen und sind daher etwas unscharf. Wie man in Abbildung 49 sieht, konnten deutliche Uransignale an den vermessenen *Euglena*-Zellen, welche zu Beginn des Versuches lebten, erhalten werden. Die Spektren wurden jeweils von einer Messregion im Inneren der Zellen erhalten und sind in blau dargestellt. Die grünen Spektren sind mittels LIFS/TRLFS an vergleichbaren Zellen, welche mit 0,01 mM Uranlösungen behandelt wurden (siehe Abbildung 47), gemessen und sind nur zum Vergleich eingezeichnet. Durch diesen Vergleich ist sehr schnell zu erkennen, dass die Lage der Emissionsmaxima für das in den *Euglena*-Zellen akkumulierte Uran mit den Werten aus den vorangegangenen LIFS/TRLFS-Messungen nahezu übereinstimmt.

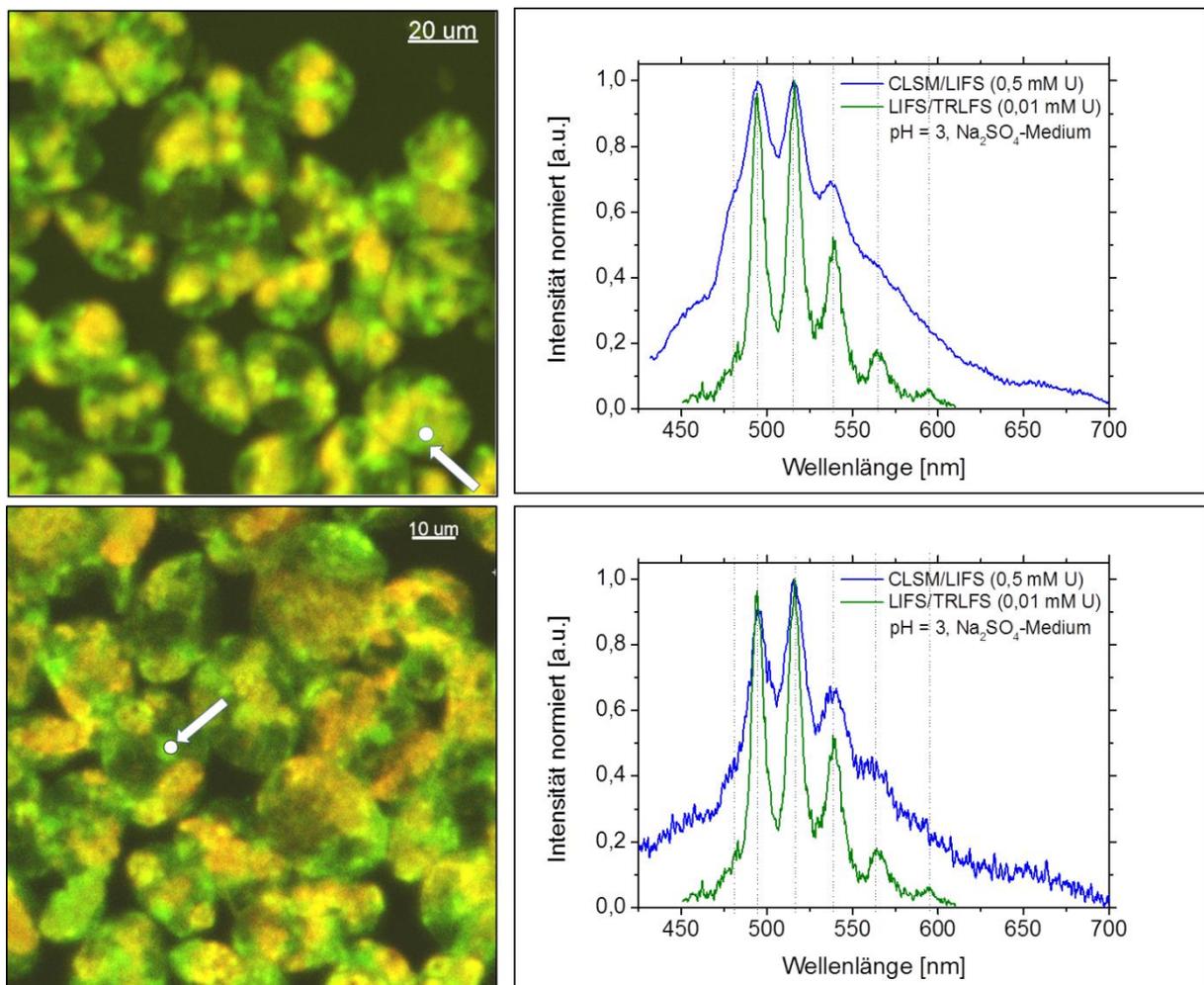


Abbildung 49: Aufnahmen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System von den ursprünglich lebenden Zellen (pH = 3, Sulfatmedium, 0,5 mM U), Links: Laserfluoreszenzmikroskopisches Bild der *Euglena*-Zellen, 200fache-Vergrößerung (grün: (437 – 598) nm, rot: (588 – 702) nm), Rechts: Zugehöriges Spektrum (blau) zu der entsprechend markierten ROI im Vergleich zu dem LIFS/TRLFS-Spektrum der Zellen nach Inkubation in 0,01 mM U.

Aus sechs an unterschiedlichen *Euglena*-Zellen mit dem CLSM/LIFS-System aufgenommenen Spektren wurde mit der Peak-Fitting-Option von Origin 8.6 die Lage der Emissionsmaxima ermittelt. Diese Daten wurden anschließend gemittelt, die Standardabweichung berechnet und in Tabelle 25 zusammengefasst. Im Rahmen der Fehler sind vor allem die Banden 1-3 sehr gut mit den vorher am LIFS/TRLFS-System gemessenen Werten vergleichbar. Die Banden 4 und 5 liegen etwas niedriger (Bande 4: -2,5 nm, Bande 5: -4,5 nm) als die zuvor für das gebundene Uran gemessenen. Diese beiden Peaks haben aber bei der CLSM/LIFS-Messung auch einen größeren Fehlerschwankungsbereich, denn wie man in Abbildung 49 im oberen blauen Spektrum sieht, sind diese Peaks aufgrund des hohen Untergrundes durch die Fluoreszenz der Organik zum Teil nur äußerst schwach ausgeprägt.

Tabelle 25: Emissionsmaxima des an den lebenden Zellen gebundenen Urans, gemessenen an einzelnen Zellen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System

Probe		Emissionsbanden [nm]					
		1	2	3	4	5	6
<i>Euglena</i> Zellen	MW	479,3	495,2	515,7	536,4	560,1	-
	sa (1 σ)	1,3	1,2	0,9	2,0	3,4	-

Bei der Aufnahme der Spektren mittels CLSM/LIFS zeigte sich, dass nur dann die typischen Uran-Banden in den Spektren detektiert wurden, wenn der Messbereich innerhalb der untersuchten Zellen platziert wurde. Wenn die ROI sehr nah an oder direkt auf dem Membranbereich gewählt wurde, konnten nur Spektren mit breiten Banden, wahrscheinlich verursacht von den fluoreszierenden Organika in der Probe, detektiert werden. Dies lässt sich als Indiz dafür werten, dass es sich bei den ursprünglich lebenden Zellen, um eine intrazelluläre Akkumulation des Urans handeln könnte. Diese könnte, wie die Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche bereits andeuteten, sogar aktiv von den Zellen gesteuert sein. Um Aussagen über die genaue Lokalisation des Urans machen zu können, reicht die Auflösung des CLSM/LIFS-Systems jedoch nicht aus. Die Fluoreszenz des Urans ist in den Aufnahmen optisch nicht von der sehr intensiven Fluoreszenz der Organik zu unterscheiden. Des Weiteren fluoreszieren auch nicht alle Zellkompartimente. Somit ist eine detaillierte Aussage über den Bindungsort des Urans innerhalb der *Euglena*-Zellen, also die Zuordnung zu einer bestimmten Zellorganelle, nicht möglich. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen sind ein erstes Indiz für eine aktive, zellinterne Akkumulation des Urans an den lebenden *Euglena*-Zellen.

Die ursprünglich bereits toten Zellen aus dem Versuch in 0,5 mM Uran (Sulfat-Medium, pH = 3) wurden anschließend ebenso mittels CLSM/LIFS untersucht. An diesen Zellen wurde zwar weniger Uran als durch die lebenden Zellen gebunden (siehe Abschnitt 3.3.1), aber mit etwa 13 mg Uran pro Gramm Biotrockenmasse noch ausreichend viel, um auch mit der

gekoppelten CLSM/LIFS-Methode detektierbare Spektren zu erwarten.

Ein Beispiel für eine Messung an toten Zellen ist in Abbildung 50 dargestellt. Links sieht man das fluoreszenzmikroskopische Bild, in dem zwei ROI markiert wurden. Rechts sind die zugehörigen Spektren (in blau und orange) abgebildet. In diesem Diagramm sind zum Vergleich das Spektrum der lebenden Zellen (0,01 mM U; pH = 3; Na₂SO₄ 3,48 g/l), welche ohne mikroskopische Unterstützung am LIFS/TRLFS-System gemessen wurden, sowie ein ebenfalls am CLSM/LIFS-System aufgenommenes Spektrum von *Euglena*-Zellen aus sulfatischem Medium bei pH 3, welche nie Kontakt zu Uran hatten (Blank-Probe), eingetragen.

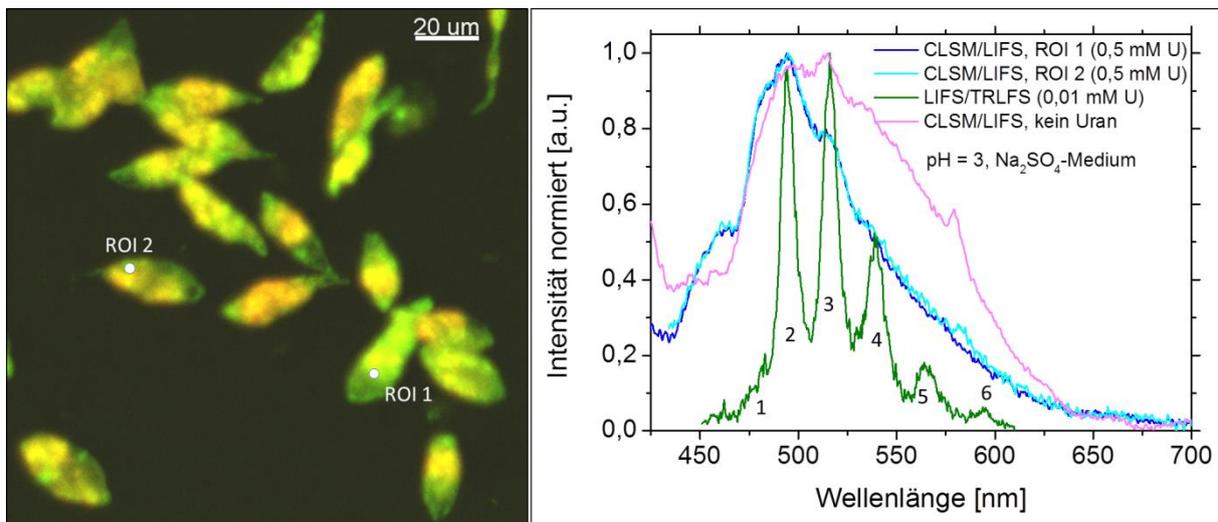


Abbildung 50: Aufnahmen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System von den toten Zellen (pH = 3, Sulfatmedium, 0,5 mM U), Links: Laserfluoreszenzmikroskopisches Bild der *Euglena*-Zellen, 200fache-Vergrößerung (grün: 430 - 599, rot: 600 - 700), Rechts: Zugehörige Spektren an den entsprechend eingezeichneten ROIs (dunkelblau und hellblau) im Vergleich zu dem LIFS/TRLFS-Spektrum des an die lebenden Zellen gebundenen Urans (0,01 mM U; grün) und zum CLSM/LIFS-Spektrum lebender Zellen ohne Uran (pink)

Aus Abbildung 50 ist zu entnehmen, dass die Spektren der beiden markierten ROI aus dieser Aufnahme (hell- und dunkelblaue Spektren) nahezu übereinstimmen. Diese sind auch repräsentativ für viele weitere an den toten Zellen aufgenommene Spektren. Auf den ersten Blick zeigen die Spektren nicht die für Uran(VI)-verbindungen typischen Ausprägungen der sechs markanten Bandenlagen. Im Vergleich zu dem am LIFS/TRLFS-System aufgenommenen Spektrum des Urans, gebunden an lebenden Zellen (in grün dargestellt) sieht man jedoch, dass möglicherweise die Ausprägung des zweiten, dritten und vierten Uran-Peaks die Form der hier an ROI 1 und 2 gemessenen Spektren beeinflusst. In wie fern dies allerdings ein ausreichender Nachweis für die Fluoreszenz des immobilisierten Urans an den Zellen ist, bleibt fraglich. Diese Zweifel haben besonders dann eine Berechtigung, wenn man das ebenfalls zum Vergleich eingezeichnete Spektrum (pink dargestellt), welches von lebenden Zellen ohne Uran (pH = 3; Na₂SO₄ 3,48 g/l) aufgenommen wurde, betrachtet.

Dieses weist ein breites Fluoreszenzspektrum mit schwach ausgeprägten Emissionsmaxima auf, die ebenfalls nahezu im gleichen Wellenlängenbereich liegen wie jene der erwarteten Uranspezies.

Die hier durchgeführten CLSM/LIFS-Analysen führten zu dem Ergebnis, dass es bei den lebenden Zellen vermutlich zu einer intra-zellulären Akkumulation des Urans gekommen ist. Leider sind die Ergebnisse für die toten Zellen nicht ausreichend deutlich, so dass eine Aussage zur Lokalisation der Uranbindung hier nicht möglich ist. Das kann zum einen an der geringeren Uranmenge liegen die durch die toten Zellen immobilisiert wurde und zum anderen an einer möglicherweise homogen verteilten Anbindung ohne lokale Akkumulationen an der Zelle. Um die Lokalisation des immobilisierten Urans detaillierter zu bestimmen, wurden im Folgenden elektronenmikroskopische Messungen an den Zellen durchgeführt.

3.3.4. TEM/EDX-Untersuchungen

Zur Analyse der *Euglena*-Zellen und des an bzw. in den Zellen akkumulierten Urans war es notwendig die Zellpellets zu fixieren und in Harz einzubetten, bevor Ultradünnschnitte (40 nm dick) angefertigt werden konnten. Diese Dünnschnitte wurden auf kohlebeschichtete Kupfernetzchen überführt und anschließend mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Aufgrund der höheren Erfolgchancen für die Lokalisierung von Uranakkumulationen an bzw. in den Zellen wurden lediglich die Zellen aus den Versuchen mit der erhöhten Urankonzentration von 0,5 mM mit dieser Technik untersucht.

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern der ursprünglich lebenden Zellen sind innerhalb der Zellen runde oder ovale Bereiche mit hohem Kontrast zu erkennen. Bereiche mit hohem Kontrast (dargestellt in weiß) markieren Elemente mit hoher Ordnungszahl. Ein Beispiel einer solchen TEM/EDX Messung ist in Abbildung 51 zu sehen. Auf der linken Seite der Abbildung ist das elektronenmikroskopische Bild einer ursprünglich lebenden *Euglena*-Zelle (d.h. beim Kontakt zur Uranlösung war die Zelle metabolisch aktiv) abgebildet. Da die *Euglena*-Zellen für das verwendete Messsystem sehr groß (Durchmesser > 30 µm) sind, war es nicht möglich die ganze Zelle in einem Bild darzustellen. Deswegen wurden hier zwei Bildaufnahmen zusammengesetzt, um zumindest den größten Teil der Zelle wiederzugeben. Von den hochkontrastierten Bereichen wurden anschließend Analysen mit der Energie-dispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) durchgeführt. Auf der rechten Seite in Abbildung 51 sind zwei, an einem Bildausschnitt der links dargestellten Zelle aufgenommene EDX-Spektren abgebildet. Die durchgeführten EDX-Messungen bestätigen hier die Annahme, dass es sich bei den hochkontrastierten Bereichen in der Zelle um Uranakkumulationen handelt. Das in den Spektren vorhandene Kupfersignal kommt nicht von der Probe sondern vielmehr vom Kupfernetzchen auf dem die Proben positioniert waren. Die Kohlenstoff- und

Phosphor-Signale sind hingegen von der Probe, wobei die Kohlenstoffbeschichtung des Netzchens ebenfalls zum C-Peak beiträgt. Der Phosphorpeak könnte hier auch ein Anzeichen für die phosphatische Anbindung des Urans sein. Da aber bei organischen Proben immer ein Kohlenstoffpeak gemessen wird und auch Phosphor aus diversen phosphatischen Verbindungen in den Zellen häufig vertreten ist, kann mit dieser Methode nicht zwischen einer möglichen phosphatischen oder carboxylischen Anbindung des Urans unterschieden werden.

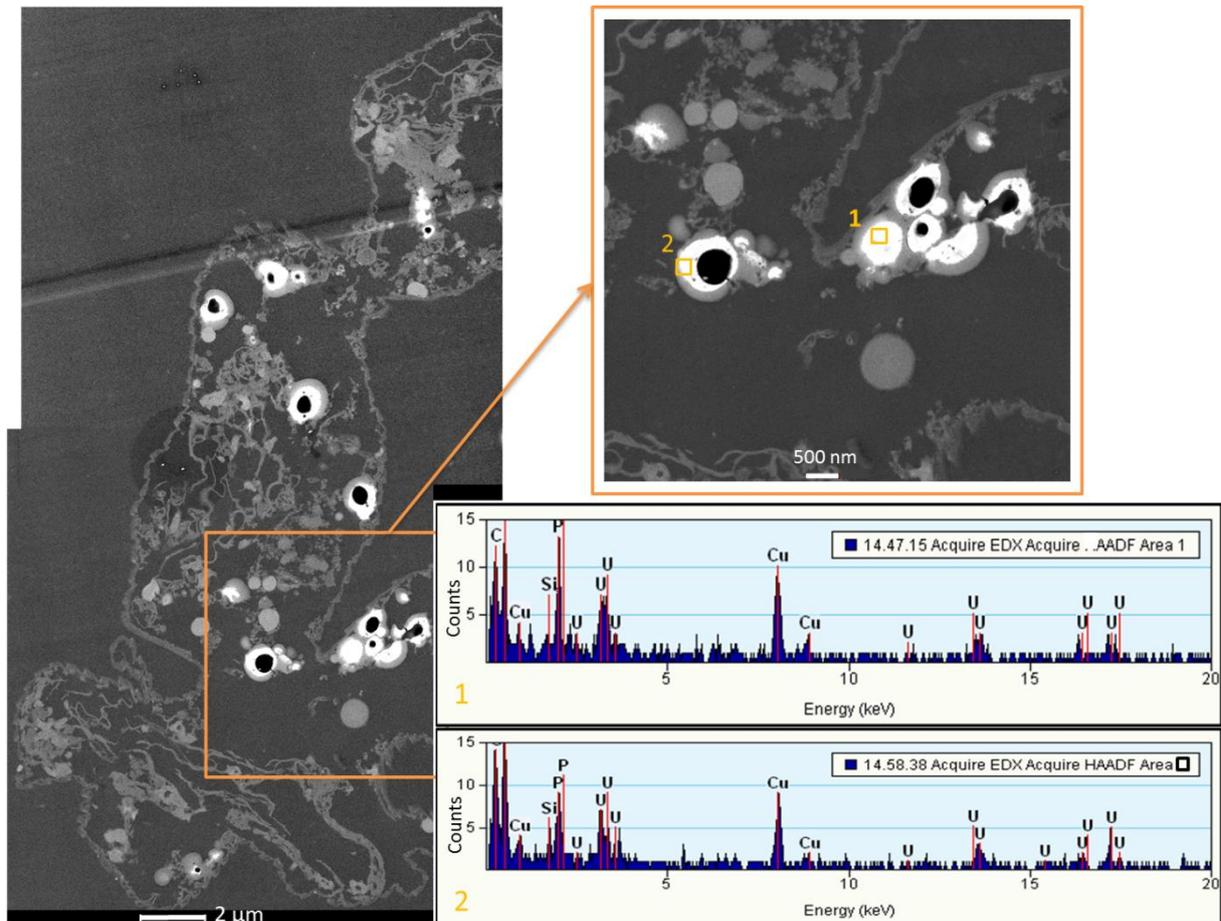


Abbildung 51: TEM-Aufnahmen einer ursprünglich lebenden Zelle (0,5 mM Uran, pH = 3, Na₂SO₄ 3,48 g/l) sowie zugehörige EDX-Spektren zweier markierter Messbereiche

An der Pellikula und Zell-Außenseite durchgeführte Messungen zeigten keine Uran-Peaks, weshalb eine lokale Akkumulation des Urans zu höheren Konzentrationen hier ausgeschlossen werden kann. Eine gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilte Anbindung ohne lokale Anreicherung von Uran ist somit wahrscheinlich, da hierbei die Uran-konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des EDX-Systems liegt.

Der mit verschiedenen Methoden gelungene Nachweis der innerhalb der Zellen lokalisierten Uran-Bioakkumulation bestärkt die Annahme, dass es sich hier um einen aktiven Umgang der Zellen mit dem Uran handelt, bei dem das Uran ins Zellinnere

transportiert wird. Die Uranakkumulationen innerhalb der Zellen findet, wie auf den mikroskopischen Bildern erkennbar, in ovalen bis runden Zellbestandteilen statt, welche einen Hohlraum in der Mitte aufweisen. Solche Zellbestandteile könnten Vakuolen oder Vakuolen-ähnliche Vesikel sein, deren Innenbereiche bei den lebenden Zellen entweder gas- oder flüssigkeitsgefüllt sind. Leedale et al. (1965) beschrieben zum Beispiel die Existenz von Phospholipid-gefüllten Vesikeln in den Zellen von *Euglena spirogyra*. Dies wäre eine Möglichkeit für die Akkumulation des Urans durch die Koordinierung zu den Phosphatgruppen in solchen Vesikeln. Metalleinlagerungen in Vakuolen wurden bereits von anderen Wissenschaftlern beobachtet. Einicker-Lamas et al. (2002) fanden z.B. bei Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von *Euglena gracilis* mit Kupfer und Zink, Kupfereinlagerungen in den Vakuolen und vermuteten eine Entgiftungsfunktion dieser Zellorganellen.

Die schon zu Beginn des Versuches toten Zellen aus dem Versuch mit erhöhter Urankonzentration von 0,5 mM wurden ebenso mittels TEM und EDX untersucht. In den Aufnahmen dieser Zellen konnten jedoch weder außerhalb noch innerhalb der Zellen Uran visualisiert oder mittels EDX detektiert werden. Da laut den Ergebnissen aus den Bioakkumulationsversuchen auch an den toten Zellen deutliche Uranmengen gebunden wurden, war es unerwartet, kein Uran an den Zellen mittels TEM/EDX nachweisen zu können. Für diese Tatsache gibt es zwei mögliche Ursachen. Erstens: Das Uran wurde an den toten Zellen nur sehr schwach gebunden und konnte so bei den vielen Waschprozessen während der sehr umfangreichen Probenpräparation für TEM von den Zellen abgelöst werden. Zweitens: Das Uran wurde homogen verteilt an den verschiedenen verfügbaren Bindungsstellen der Zellen gebunden, ohne dass es dabei zu lokalen Anreicherungen kam, weshalb das Detektionslimit des TEM/EDX-Systems an keiner Stelle überschritten wurde und somit ein Nachweis nicht möglich war.

Die in dieser Arbeit durchgeführten TEM-Untersuchungen konnten einen ersten Einblick in die intrazellulären Veränderungen der Zellen geben, nachdem sie einer Urankonzentration von 0,5 mM ausgesetzt waren. Eine intrazelluläre Anreicherung bei den lebenden Zellen konnte bestätigt werden, wobei diese vermutlich in Vakuolen oder Vakuolen-ähnlichen Vesikeln stattfand. Bei den toten Zellen konnte jedoch kein Uran mittels EDX nachgewiesen werden. Somit konnten die durch die CLSM/LIFS-Messungen erhaltenen Erkenntnisse durch die TEM/EDX-Analysen bestätigt werden.

Parallel zu den mikroskopischen Analysen der *Euglena*-Zellen aus den Bioakkumulationsversuchen wurden Untersuchungen mit der zeitaufgelösten Fouriertransformationen-Infrarot Spektroskopie (FT-IR) durchgeführt, da weitere Erkenntnisse zur chemischen Art der Anbindung des Urans durch Anwendung dieser Methode erhofft wurden.

3.3.5. Untersuchungen mittels zeitaufgelöster FT-IR Spektroskopie

Die in-situ vibrationsspektroskopischen Experimente in dieser Studie basieren auf dem Prinzip der Reaktions-induzierten Differenzspektroskopie. Spektrale Änderungen bezogen auf selektiv induzierte Änderungen der untersuchten Probe werden zeitabhängig detektiert. Einzelne IR-Spektren werden kontinuierlich von einer stationären Phase aufgenommen, während diese mit einer mobilen Phase gespült wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein dünner Film aus *Euglena*-Zellen direkt auf der Oberfläche des ATR-Kristalls als stationäre Phase aufgebracht.

Die FT-IR-Messungen in dieser Arbeit sind die ersten in-situ und zeitaufgelösten Messungen eines Sorptionsprozesses von U(VI) an *Euglena mutabilis* Zellen. Analog zu vergleichbaren publizierten Messungen an geologischen Materialien (Müller et al., 2012) war es hierbei möglich einen stabilen dünnen Film aus *Euglena*-Zellen auf der Oberfläche des ATR-Kristalls zu fixieren. Die Zellen als präparierter Film waren jedoch nicht mehr lebendig, weshalb all diese Messungen ausschließlich den passiven Sorptionsprozess an toten Zellen repräsentieren. Als Hintergrundmedium wurde in diesen Versuchen eine 0,1 M Natriumchlorid-Lösung verwendet, da diese weniger Störsignale im IR-Spektrum erzeugt.

Die zeitaufgelösten IR-Spektren (aufgetragen im Abstand von 15 min innerhalb einer Stunde) sowie die Spektren der Konditionierungs- und anschließenden Spülphasen (nach je 10 min bzw. 15 min aufgetragen) sind in Abbildung 52 dargestellt. Wie die flachen Basislinien demonstrieren, kam es während der Konditionierung des Films zu keiner Ablösung der Zellen. Die während des Kontaktes des Zell-Filmes mit einer U(VI)-Lösung (0,01 mM Uran in 0,1 M NaCl) als mobile Phase aufgenommenen IR-Spektren ermöglichten die Detektion der Uran(VI)-Akkumulation direkt an der Grenzfläche der Zellen zur umgebenden Lösung.

Die Bande bei 922 cm^{-1} wird durch die asymmetrischen Streckschwingungen des UO_2 – Moleküls verursacht. Im Vergleich zu der Bande des freien Uranyl-Ions (UO_2^{2+}), welche bei 961 cm^{-1} liegt, ist diese Bande etwas verschoben. Die 922 cm^{-1} Bande hat eine vergleichbare Position wie die hydrolysierte Spezies, welche in flüssigen Lösungen unter vergleichbaren Bedingungen vorkommt. Der Hydroxo-Komplex wäre allerdings bei so niedrigen Konzentrationen von 0,01 mM nicht detektierbar, da diese Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Der deutliche Anstieg der Intensität dieser Bande bei 922 cm^{-1} deutet daraufhin, dass diese Bande auf die Akkumulation des Uran(VI) an der *Euglena*-Film-Grenzfläche zurückzuführen ist und nicht allein von der wässrigen Spezies der mobilen Phase verursacht wird.

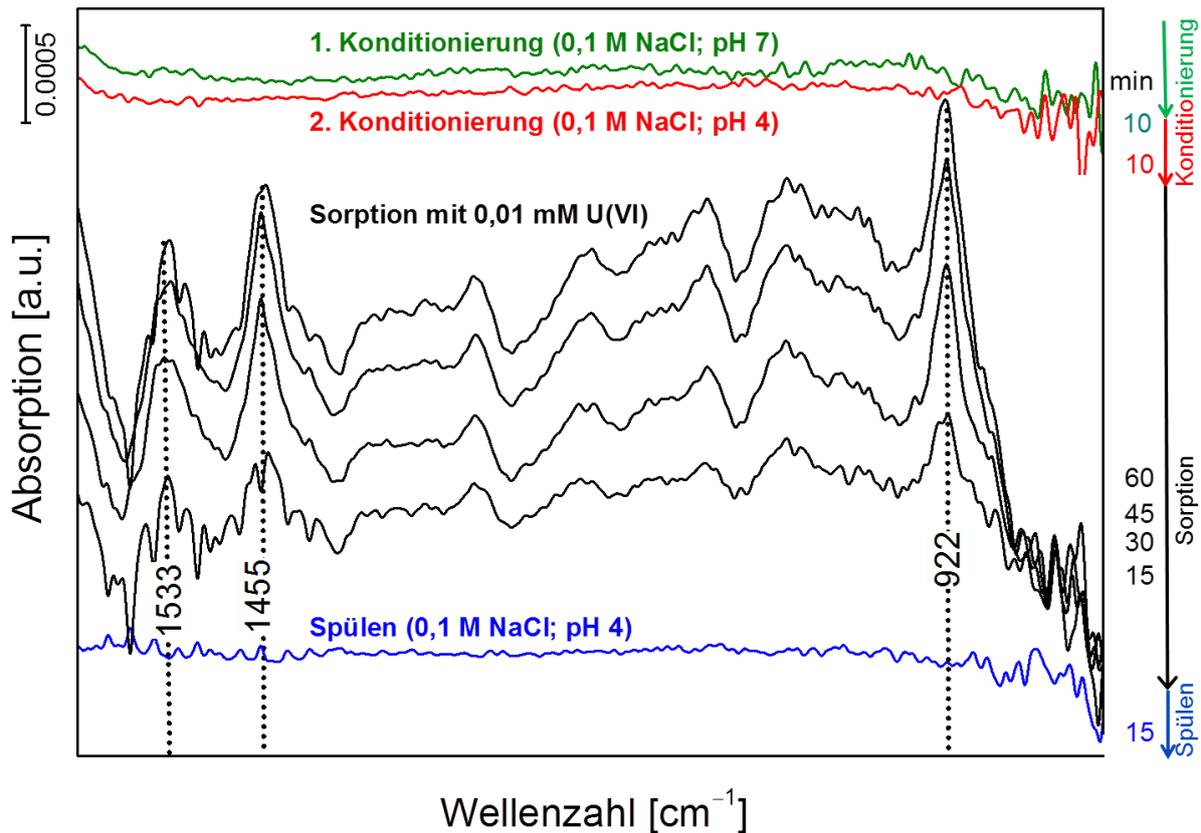


Abbildung 52: In-situ zeitaufgelöste IR-Spektren der Uran(VI)-Sorption an *Euglena*-Zellen (Zellen lebten bevor sie als Film auf der ATR-Kristalloberfläche getrocknet wurden; 0,01 mM U Ausgangskonzentration; 0,1 M NaCl als Hintergrundmedium; Flussgeschwindigkeit 0,05 ml/min).

Die Banden bei 1533 und 1455 cm^{-1} werden durch die Koordination des Uran(VI) zu carboxylischen funktionellen Gruppen verursacht. Banden, welche ein Indikator für die Koordination zu phosphatischen funktionellen Gruppen wären, würden im Bereich um 1100 cm^{-1} erwartet. In diesem Bereich werden die IR-Spektren jedoch durch starke Hintergrundsignale der *Euglena*-Zellen selbst überlagert. Somit ist es mit dieser Methode nicht möglich die Koordination zu phosphatischen Gruppen nachzuweisen. Es ist jedoch auch nicht möglich die Bindung durch Phosphatgruppen aufgrund dieser Messungen auszuschließen.

Die Spülphase des *Euglena*-Films nach dem Sorptionsexperiment ist durch eine sehr flache Basislinie charakterisiert. Dies ist ein Indiz für eine sehr feste Sorption des Uran(VI) an dem Film aus *Euglena*-Zellen, denn es konnte im untersuchten Zeitraum kein Desorptionsprozess beobachtet werden.

Die in-situ und zeitaufgelöste Messung der Sorption von U(VI) an *Euglena mutabilis* wurde an unterschiedlich vorbehandelten Zellen in gleicher Weise wiederholt. Dazu wurden (1.) frische lebende Zellen, (2.) etwa eine Woche alte lebende Zellen (vor einer Woche aus dem Reaktor geerntet und seitdem nur in 0,1 M NaCl gehalten), (3.) tote zerstörte Zellen bzw. (4.) zerstörte Zellen, die nochmals in zwei Fraktionen (grüne Lösung = flüssige

Zellanteile; weiße Partikel = feste Zellanteile wie z.B. Zellwände; durch Zentrifugation getrennt) unterteilt wurden, zur Präparation eines Zell-Filmes als stationäre Phase verwendet. Die Ergebnisse der Sorptionsexperimente nach 60 min sind in Abbildung 53 gemeinsam dargestellt. Wie man in dieser Abbildung sieht, sind die Spektren unabhängig von der Vorbehandlung der Zellen sehr ähnlich. Somit konnten anhand dieser Untersuchungen keine weiteren neuen Informationen zu den ablaufenden Prozessen erhalten werden.

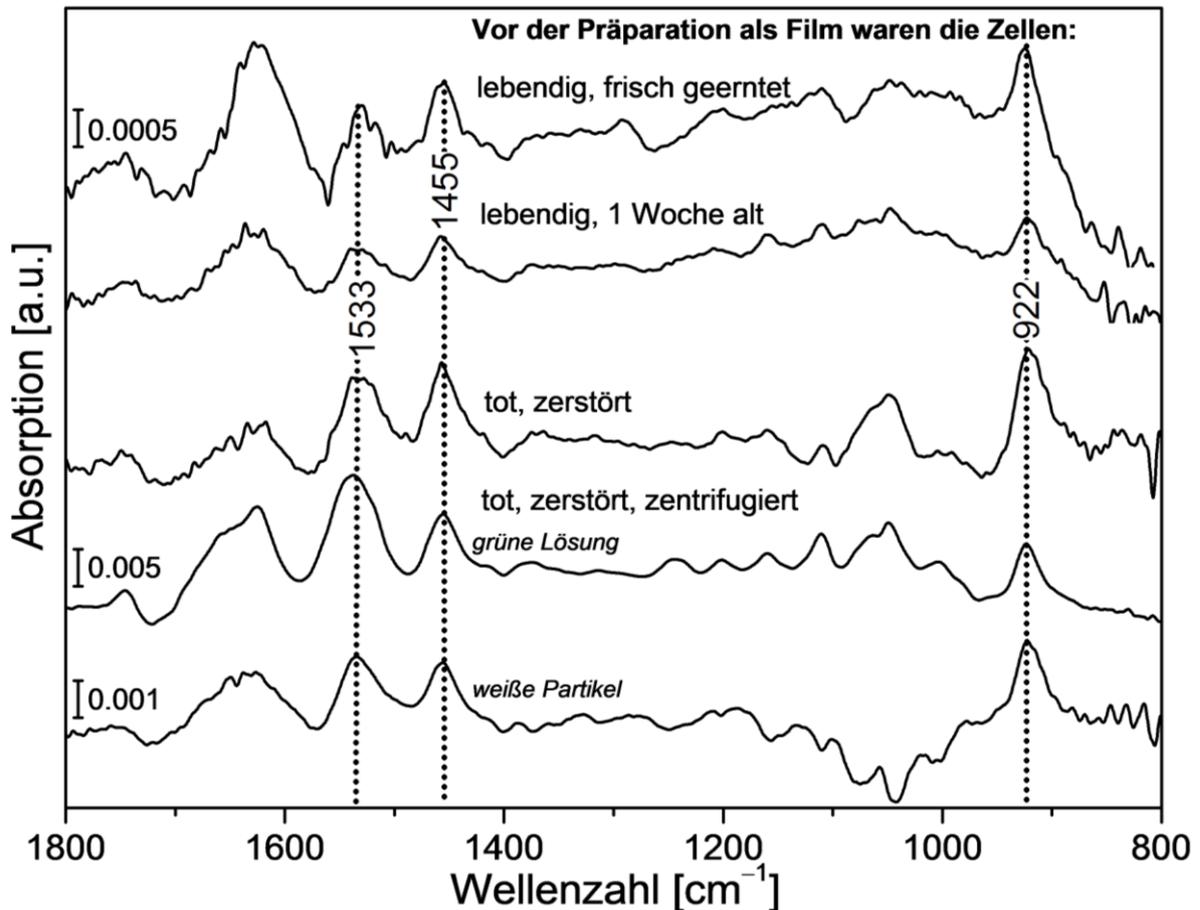


Abbildung 53: IR-Spektren der U(VI)-Sorption an Zellen, die unterschiedlich vorbehandelt wurden (0,01 mM U(VI); 0,1 M NaCl; pH = 4, 60 min nach Start des Sorptionsversuches)

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit stand die Analyse von Uranspezies hinsichtlich der chemischen Identifizierung und Lokalisierung in natürlichen biologischen Proben, mittels gekoppelter fluoreszenzmikroskopischer und –spektroskopischer Techniken (CLSM/LIFS) im Vordergrund der Untersuchungen. Im ersten Teil der Untersuchungen wurden Analysen an natürlichen Biofilmen aus urankontaminierten AMD-geprägten Gebieten mittels eines gekoppelten CLSM/LIFS-Systems durchgeführt. Die Analysen zeigten eine prinzipielle Anwendbarkeit der Methode für diese Art von Proben, vorausgesetzt die Proben werden zuvor auf Dicken von etwa 50 µm geschnitten.

Durch den Test und die erstmalige Anwendung von speziellen säureresistenten Fluoreszenzfarbstoffen zur Anfärbung der Mikroorganismen in den sehr sauren Biofilmen konnte die Struktur der Biofilme sehr gut durch die CLSM charakterisiert werden, auch wenn keine autofluoreszierenden Mikroorganismen vorhanden waren. Kommerziell erwerbbar Farbstoffe führten dabei nur unter Erhöhung des pH-Wertes zu einer räumlichen Beschreibung der Biofilmproben. Eine solche Veränderung der chemischen Umgebungsparameter beeinflusst jedoch die Probenchemie und somit die Uranspeziation in den Biofilmen maßgeblich. Die Ergebnisse zeigen, dass in zukünftigen Untersuchungen von sauren, biologischen Proben ausschließlich Farbstoffe verwendet werden sollten, die für diesen pH-Bereich angepasst sind. Beispiele hierfür sind, die in dieser Arbeit vorgestellten und erstmalig beschriebenen Farbstoffe der Firma DYOMICS (DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613; Jena, Deutschland).

Auch verschiedene Eigenfluoreszenzen von z.B. Photosynthese betreibenden Mikroorganismen konnten zur Darstellung der räumlichen Biofilmstruktur ausgenutzt werden. Eine solche Charakterisierung ist jedoch recht unspezifisch und kann bei der Analyse von im Biofilm immobilisierten Uranspezies zu enormen Behinderungen führen. Die Eigenfluoreszenz (von z.B. verschiedenen Chlorophyll-Arten) in einigen Biofilmen (vor allem in phototrophen Biofilmen) beeinflusst und überlagert die Fluoreszenzsignale des Urans in dem Maße, dass eine entsprechende Identifizierung und Lokalisation der Uranspezies innerhalb der phototrophen Biofilme nicht möglich war.

Aufgrund der Auflösungsgrenze der verwendeten CLSM/LIFS-Technik zeigte sich bei der Untersuchung der natürlichen Biofilme aus sauren Minenabwässern die Differenzierbarkeit von einzelnen Mikroorganismen (besonders von Bakterien) als recht schwierig. Vor allem eine Lokalisation von eventuell immobilisiertem Uran in oder an den bakteriellen Zellen war dadurch nicht möglich. Für weitergehende Untersuchungen an diesen natürlichen Biofilmen sollten daher zukünftig zusätzlich höher auflösende Techniken wie z.B. TEM eingesetzt werden.

Bei den Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen *Euglena mutabilis* Zellen und Uran konnten aufgrund der Größe der Zellen mit der CLSM/LIFS-Technik deutlich detaillierte Einblicke in die Zellen erzielt werden. Zum ersten Mal wurde somit ein Indiz für die intrazelluläre Akkumulation des Urans gefunden.

Bioakkumulations-Versuche von Uran an *Euglena mutabilis* Zellen zeigten, dass diese Zellen besonders unter AMD-relevanten pH-Bedingungen (pH 3-4) in der Lage sind, erhebliche Mengen an Uran aus dem umgebenden Wasser an der Biomasse zu immobilisieren. Bei diesen Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass der metabolische Zustand der Zellen von größter Wichtigkeit für die Art und Intensität der Urananbindung ist. So wurde beobachtet, dass lebende, metabolisch aktive *Euglena mutabilis* Zellen signifikant mehr Zeit benötigen bis sie eine vergleichbare Menge Uran aus der Lösung aufnehmen als tote *Euglena*-Zellen. Die passive Bindung von Uran an den toten Zellen wiederum geschieht sehr schnell innerhalb der ersten zwanzig Minuten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen für die lebenden Zellen auf einen aktiven Umgang mit dem toxischen Schwermetall Uran hin.

Die an den *Euglena*-Zellen gebildete Uranspeziation wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie am LIFS/TRLFS- und CLSM/LIFS-System untersucht. Ein Vergleich der ermittelten Emissionsbandenlagen mit Literaturdaten von Referenzverbindungen lässt auf die Komplexierung des Urans an oder in den Zellen durch (organo)phosphatische und/oder carboxylische Gruppen schließen. Die Emissionen aus den fluoreszenzspektroskopischen Messungen lassen hierbei keinen Unterschied zwischen den Uranspeziationen, gebunden an lebenden Zellen und toter Biomasse erkennen.

Die mikroskopischen Analysen mittels CLSM/LIFS und TEM/EDX erbrachten für die ursprünglich lebenden Zellen den Nachweis der intrazellulären Urananreicherung. Dabei konnte zum ersten Mal die CLSM/LIFS-Technik zur Detektion von Uranakkumulationen innerhalb von mikrobiellen Zellen erfolgreich angewendet werden. Eine genaue Lokalisation und Zuordnung des Zellkompartiments, welches für die Akkumulation des Urans innerhalb der Zelle zuständig ist, konnte jedoch aufgrund der begrenzten Auflösung mittels CLSM/LIFS nicht erfolgen. Mit den hochauflösenden TEM/EDX-Messungen konnte hingegen gezeigt werden, dass das Uran in Vakuolen oder Vakuolen-ähnlichen Vesikeln angereichert und in den Zellen somit immobilisiert wurde. Eine solche lokale Urananreicherung in lebenden Zellen stärkt die Vermutung auf einen aktiven Umgang der Zellen mit dem toxischen Schwermetall Uran. Die vergleichbaren Untersuchungen an toten Zellen aus den Bioakkumulationsversuchen mit Uran mittels CLSM/LIFS und TEM/EDX ergaben keine Abbildung oder Detektion des Urans an oder in den Zellen. Dies führt zur Vermutung, dass es bei der Bioakkumulation des Urans an den toten Zellen zu weniger intensiven lokalen Anreicherungen als bei den ursprünglich lebenden Zellen gekommen ist, und somit die

Nachweisgrenzen der angewandten mikroskopischen Methoden nicht überschritten wurden.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit ermöglichen einen ersten Schritt zum Verständnis des Bioakkumulationsprozesses von Uran an *Euglena mutabilis* Zellen und liefern somit einen Beitrag zur Beschreibung der Wechselwirkungen von Uran mit Biofilmen in sauren Umgebungen. Es zeigte sich, dass signifikante Bioakkumulationen von Uran gerade bei sauren pH-Werten an den *Euglena*-Zellen stattfinden, was diese Zellen oder bestimmte Zellbestandteile interessant für mögliche technische Anwendungen zur Reinigung saurer urankontaminierter Wässer macht. Erste in dieser Arbeit durchgeführte Versuche zur Immobilisierung von Uran aus natürlichen AMD-Wässern brachten geringere Akkumulationsraten an den Zellen als erwartet. Dies zeigt den, an dieser Stelle noch nötigen Forschungsbedarf hinsichtlich der Übertragung von in Laborexperimenten gewonnenen Erkenntnissen auf natürliche Szenarien. Deshalb wird eine weitergehende Untersuchung dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Uran aus natürlichen Wässern zu akkumulieren, empfohlen. Weiterhin sollten zusätzliche Untersuchungen zur Aufklärung des genauen Bindungsmechanismus durchgeführt werden, um anschließend diese Anbindung in der Art beeinflussen zu können, dass noch effizienter Uran aus Lösungen abgetrennt werden kann. In diesem Zusammenhang wird für zukünftige Untersuchungen weiterhin empfohlen, die genaue Aufnahmekapazität der Zellen für Uran zu ermitteln, sowie die Reversibilität der Urananbindung an die Biomasse in Desorptionsversuchen zu testen.

Um die Untersuchungen von Uran und anderen fluoreszierenden Schwermetallen in biologischen Proben zu verbessern, sollte die technische Weiterentwicklung des gekoppelten CLSM/LIFS-Systems eine wichtige Rolle für zukünftige Arbeiten spielen. Die Ermöglichung einer zeitverzögerten Aufnahme der LIFS-Messungen, um kurzlebige Fluoreszenzsignale von langlebigen zu trennen, könnte zu ganz neuen Einblicken in biologische Systeme führen und könnte auch die Nachweisgrenze dieser Methode für Uran deutlich senken, was besonders bei natürlichen Proben eine große Rolle spielt. Durch eine solche technische Verbesserung des CLSM/LIFS-Systems würden auch zeitaufgelöste Aufnahmen von Fluoreszenzspektren direkt an der visualisierten Zelle ermöglicht, was einen besseren Vergleich mit Emissionsbanden und Lebenszeiten, welche an einem TRIFS-System gemessen wurden, gestattet und detailliertere Aussagen zur gebildeten Speziation zulässt.

5. Experimentelle Details

5.1. Probenentnahme der natürlichen Biofilme

Die Biofilm- und Wasserproben wurden in sterilen Probenröhrchen mit sterilen Hilfsmitteln (Zellschaber, Löffel und Spatel) gesammelt und möglichst zeitnah zum Labor transportiert, wo sie bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden. Die grundlegenden Analysen der elementaren Zusammensetzung, der EPS-Zusammensetzung sowie der mikrobiellen Diversität wurden bereits binnen der ersten 48 h nach der Probenentnahme durchgeführt, da eine Veränderung der Biofilme durch längere Lagerung im Kühlschrank nicht ausgeschlossen werden konnte.

5.2. Analyse der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS)

5.2.1. Abtrennungsmöglichkeiten der EPS von festen Biofilmbestandteilen

In der Literatur können verschiedene Methoden für die Abtrennung der EPS von den mikrobiellen Zellen und anderen festen Bestandteilen eines Biofilmes gefunden werden. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Behandlungsmethoden getestet und verglichen. Zum einen wurden die Biofilme mit dem Kationenaustauscherharz DOWEX (Wuertz et al., 2001) behandelt und zum anderen wurden die Proben einer Ultraschallbehandlung (Azeredo et al., 1999) unterzogen. In beiden Fällen wurden anschließend die EPS über Zentrifugation von den Zellen und festen Bestandteilen der Biofilme abgetrennt.

Extraktion der EPS nach DOWEX-Behandlung

Bei der Behandlung des Biofilmes mit dem Kationenaustauscherharz DOWEX werden die spezifischen Ca^{2+} -Bindungen in den EPS destabilisiert, so dass diese anschließend schon durch geringe Scherkräfte einfacher abgetrennt werden können. Da auf diese Weise weniger mechanische Kraft auf den Biofilm angewendet werden muss, handelt es sich hier um eine sehr schonende Methode, bei der die Gefahr der Zellyse und Exkretion von Zellinhalten in den EPS-Extrakt besonders gering gehalten wird.

Das Kationenaustauscherharz DOWEX (Na^+ -Form; 20,00 – 50,00 mesh; Sigma Aldrich) wurde vor Beginn der EPS-Extraktion zunächst für eine Stunde mit einem Extraktionspuffer gewaschen.

Zusammensetzung Extraktionspuffer:	2 mM	Na ₃ PO ₄ ·12 H ₂ O (p.a., Fluka)
	4 mM	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (p., Merck)
	0,9 mM	NaCl (p.a., Merck)
	pH-Wert	7

Unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank) wurde der zu behandelnde Biofilm vorsichtig mittels eines Vortex-Schüttlers (2800 rpm, IKA, Lab dancer, Mini Vortex) homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 1 g des Biofilmes in sterile Proberöhrchen (Greiner) eingewogen. Dazu wurden dieselbe Menge DOWEX mit 20 ml Extraktionspuffer zugegeben. Im Folgenden wurden die Proben für drei Stunden im Eisbad vorsichtig auf einem Horizontalschüttler mit 150 rpm bewegt. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert, um das Harz und grobe feste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 30 min bei 10000 g (bei 4 °C) zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun der EPS-Extrakt, welcher anschließend analysiert werden konnte.

Extraktion der EPS nach Ultraschall-Behandlung

Die Extraktion der EPS mittels Ultraschall-Behandlung hat den großen Vorteil, dass die Biofilmprobe nicht mit einer Puffersalzlösung versetzt wird, wie im Fall der Extraktion mit DOWEX, was bei nachfolgenden Analysen zu Störungen und Nebeneffekten führen kann.

Die Biofilmprobe wurde auch bei dieser Methode zunächst unter sterilen Bedingungen vorsichtig homogenisiert. Anschließend wurde jeweils 1 g in ein steriles Röhrchen eingewogen. Die Probe wurde danach mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und anschließend mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier II; Firma Heinemann; 200 W) behandelt. Dabei wurden die Proben im Eisbad jeweils 30 s lang 10 % der maximalen Amplitude ausgesetzt, wodurch die Bindung der EPS an den Zellen gelockert werden sollte. Danach wurde die Probe zweimal je 30 min bei 10000 g (4 °C) zentrifugiert. Zwischen den zwei Zentrifugationsschritten wurde das entstandene Pellet mit Hilfe eines Vortexers wieder aufgewirbelt. Der nach der zweiten Zentrifugation erhaltene Überstand wurde anschließend für die Analyse der EPS-Bestandteile verwendet.

Test auf Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist ein rein intrazelluläres Enzym. Das Vorhandensein dieses Enzyms in den EPS-Extrakten wäre ein Nachweis für die Lyse der Zellen während der Extraktionsbehandlungen. Das Enzym katalysiert die Oxidation des Kohlenhydrats Glucose-6-phosphat (G6P) zu 6-Phosphogluconolacton und die Reduktion

von NADP zu NADPH. Dabei zeigt das Coenzym NADPH bei einer UV/Vis-spektroskopischen Untersuchung ein Absorptionsmaximum bei 340 nm. Bei Vorhandensein des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nimmt die Absorption bei dieser Wellenlänge über die Zeit zu. Es handelt sich also um einen indirekten Enzymnachweis. Dazu wurden zu 50 µl Probe bzw. EPS-Extrakt je 1,45 ml einer Substratlösung hinzugefügt und im Wasserbad bei 37 °C für 60 min inkubiert. Alle 15 min wurde die Absorption bei 340 nm gemessen.

Substratlösung	• 5 ml	Tris/HCl-Puffer (120 mM; pH 8,6; Duchefa p.a.)
	• 2,5 ml	NAD-Lösung (10 mM; Sigma >98%)
	• 0,9 ml	MgCl ₂ -Lösung (250 mM; Merck p.a.)
	• 3,75 ml	Glucose-6-Phosphat-Lösung (20 mM; Sigma >98%)
	• 2,35 ml	deionisiertes Wasser

5.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Der Gehalt an Proteinen in den EPS-Extrakten wurde nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode bestimmt. Dabei handelt es sich um eine photometrische Test-Methode, welche heutzutage routinemäßig angewendet wird und für die anwendungsfertige Test-Kits kommerziell zu erwerben sind. Bei der Bestimmung der Proteine wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, welcher bei 465 nm ein Absorptionsmaximum zeigt, zu den Probelösungen gegeben. Bei Anwesenheit von Proteinen kommt es durch die Komplexbildung mit dem Farbstoff zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm.

Die Proteingehalte der EPS-Extrakte in dieser Arbeit wurden unter Verwendung eines anwendungsbereiten Coomassie (Bradford) Protein Assay Kits von Thermo Scientific Pierce Biotechnology (Rockford, USA) bestimmt. Dazu wurden zu je 0,5 ml Probe 0,5 ml Coomassie Blue Reagenz gegeben und mit dem Vortexer gut vermischt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde anschließend die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Cary 50, Varian, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) gemessen. Als Standardlösung für die Erstellung einer Kalibriergerade wurde Rinderserumalbumin (BSA; Bestandteil des Analyse-Kits) in den Konzentrationen (0; 1; 2; 5; 10; 15 und 20) µg/ml eingesetzt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5.2.3. Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes in den EPS-Extrakten wurde mittels der kolorimetrischen Methode nach Dubois et al. (1956) durchgeführt. Dazu wurden zu 0,25 ml Probe, gekühlt auf einem Eisbad, jeweils 0,25 ml einer Phenollösung (5g/100ml in deionisiertem Wasser; p.a.; Merck) und 1,25 ml konzentrierte Schwefelsäure (95-97%, p.a., Roth) hinzugegeben. Nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Probenmischung anschließend weitere 10 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 720 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Cary 50, Varian, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) gemessen. Als Standards für die Erstellung einer Kalibrierkurve wurden von einer Glukoselösung (2 mg/10 ml in deionisiertem Wasser; für biochemische Zwecke, Fluka) verschiedene Verdünnungen, mit den Konzentrationen (0; 1; 2,5; 5; 7,5; und 10) µg/ml, hergestellt. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

5.2.4. Bestimmung des Uronsäuregehaltes

Die Uronsäuren sind eine Teilmenge der Kohlenhydrate und wurden durch eine photometrische Methode bestimmt. Die angewandte Bestimmungsmethode wurde erstmals von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) beschrieben. Dabei wurden jeweils 0,2 ml der Probelösung im Eisbad gekühlt mit 1,2 ml einer Natriumtetraborat-Lösung (0,0125 M Natriumtetraborat-Decahydrat (suprapur, Merck) in konzentrierter Schwefelsäure) versetzt. Nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben kräftig geschüttelt und anschließend im siedenden Wasserbad für 5 min erhitzt. Danach wurden die Proben für etwa 5 min im Eisbad abgekühlt, bevor je 20 µl einer 0,15%igen m-Hydroxybiphenyl-Lösung (99+%, Acros; in 0,5%iger NaOH (p.a., Merck)) zugegeben wurde. Nach weiteren 5 min Reaktionszeit wurde die Absorption bei 520 nm mit dem Spektralphotometer (Cary 50, Varian, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) gemessen. Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden hier Verdünnungen von je (0; 1; 2; 5; 7,5; 10; 20; 40; 50; 75 und 100) µg/ml Glucuronsäure (>97 % p., Fluka) in deionisiertem Wasser hergestellt und vermessen. Die Messwerte wurden jeweils in Dreifachbestimmung ermittelt.

5.2.5. Bestimmung des Lipidgehaltes der Biofilme

Da mit den im Vorangegangenen dargestellten EPS-Extraktionsmethoden nur hydrophile EPS-Bestandteile abgetrennt werden können, aber auch Lipide einen wichtigen und großen Anteil der EPS ausmachen, war es nötig diese separat von den Biofilmpollen zu extrahieren. Die hier angewendete Extraktionsmethode für Lipidbestandteile wurde z.B. bei Takeda et al. (1998) beschrieben. Dazu wurden jeweils 5 g Biofilm in sterile Proberöhrchen

eingewogen und mit 20 ml Chloroform (für die Spektroskopie, Merck), 10 ml Methanol (p.a., Merck) und 8 ml deionisiertem Wasser (MilliQ) versetzt. Danach wurde das Gemisch homogenisiert und im Anschluss für drei Stunden auf einem Horizontalschüttler (150 rpm) für 3 Stunden vorsichtig bewegt. Die flüssigen Phasen wurden anschließend in einen Scheidetrichter überführt und die schwerere Chloroform-Phase abgetrennt. Das Chloroform wurde im Folgenden mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers entfernt. Der Rückstand wurde ausgewogen und durch Zugabe von 1 ml Ethanol wieder gelöst.

Anschließend folgte die spektroskopische Analyse der Lipide in der Lösung nach der Methode von Frings und Dunn (1970). Dabei wurden je 500 µl konzentrierte Schwefelsäure mit je 50 µl der Probe gemischt und etwa 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der Probemischung wurden 50 µl dieser entnommen und in ein zweites Reagenzglas überführt. In dieses wurden nun 2,5 ml einer Phospho-Vanilin-Reagenz (20 ml einer 0,6%igen Vanilinlösung (>99 %, HPLC-grade, Fluka) in 80 ml konzentrierter Phosphorsäure (85 %, s.p., Merck)) zugefügt. Diese Mischung brauchte nun 15 Minuten Reaktionszeit bei einer Temperatur von 37 °C. Anschließend kühlten die Proben etwa 5 min lang auf Raumtemperatur ab, bevor diese mittels eines Spektralphotometers (Cary 50, Varian, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) bei 540 nm vermessen wurden.

Für die Ermittlung einer Eichkurve wurde Sonnenblumenöl in Ethanol (p.a., Merck) als Standard verwendet. Folgende Verdünnungen wurden hergestellt und vermessen: (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; und 10) mg/ml. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung.

5.3. Ermittlung der mikrobiellen Diversität

Die Analysen zur mikrobiellen Diversität der natürlichen Biofilme aus AMD-geprägten Gebieten wurden im Rahmen eines gemeinsamen DfG-Projektes (AR584/11, „In-situ Speziation von Uran in Biofilmen“, 01.02.2006 – 15.03.2009) durch die Kooperationspartner an der TU-Dresden, des Instituts für Mikrobiologie, durchgeführt.

5.3.1. Bakterielle Diversität: 16S-rDNA-PCR

Um die bakterielle Diversität der Biofilmproben zu ermitteln wurde zunächst die gesamte DNA mittels dem „Fast DNA Spin for Soil Kit“ (MP Biomedicals LLC, Ohio) extrahiert. Anschließend wurde eine 16S-rDNA-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt bei der die Primer TPU1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') und 1387r (5'-GGGCGGWGTG TACAAGGC-3') verwendet wurden. Die amplifizierten 16S-rDNA-Genfragmente wurden mit Hilfe eines „pMBL T/A Cloning Kits“ (Genaxxon BioScience) entsprechend der Herstellerangaben in einem E. coli Stamm (TOP 10 F') geklont. Die rekombinanten Klone wurden

mittels der Blau-Weiß-Selektionsmethode ausgesucht. Für die Sequenzierung wurden repräsentative Klone ausgewählt, um die phylogenetische Klassifikation der dominanten bakteriellen Spezies zu ermöglichen. Die Sequenzen mit hoher Qualität wurden mittels BLASTN („Basic Local Alignment Search Tool“ für Nukleotide) mit Sequenzen aus der Nukleotidbank des National Center of Biotechnology verglichen.

5.3.2. Eukaryotische Diversität: 18S-rDNA-PCR

Für die molekularbiologische Analyse der Diversität der Eukaryoten wurde zunächst die genomische DNA mit dem NucleoSpin®Soil Kit (Marchery-Nagel) extrahiert. Die 18S-rDNA-PCR wurde anschließend mit den Primern 515F (5'-GTGCCAAGCAGCCGCGGTAA-3') und 1209R (5'-GGGCATCACAGACCTG-3'), wie bei Baker et al. (2009) beschrieben, durchgeführt.

5.3.3. Mikroskopische Analyse der Eukaryoten

Die Bestimmung der Eukaryoten in den Proben mittels lichtmikroskopischer Methoden wurde unmittelbar nach der Probenentnahme durchgeführt. Hierzu wurden je 40 µl der Probe auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Analyse der Eukaryoten in den Biofilmpollen wurde ein Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss (Axioskop, Carl Zeiss, Deutschland, inklusive Bildauswertesystem AxioVision und AxioCam-Mikroskopkamera) bei 400- bis 1000-facher Vergrößerung (Plan-Neofluar 40x/0,75 bzw. 100x/1,30 Oil; Okular E-PI 10x/20) eingesetzt. Weitere lichtmikroskopische Untersuchungen wurden am CLSM der Firma Leica (Leica TCS SP2, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Bensheim, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurde eine 630-fache Vergrößerung (Objektiv: L63x/0,70 CORR PL, Fluotar; Okular: HC PLAN s 10x/25) angewendet. Zur Identifizierung der eukaryotischen Mikroorganismen wurden Vergleiche mit spezifischer Literatur durchgeführt (Doflein und Reichenow, 1953, Hänel, 1979, Mrozinska, 1985, Starmach, 1985, Canter-Lund und Lund, 1995, Sauer, 1995, Kusel-Fetzmann, 2002, Linne von Berg und Melkonian, 2004, Streble und Krauter, 2006).

Die lichtmikroskopischen Bestimmungen der Algen wurden überwiegend in der Außenstelle Neunzehnhain (Erzgebirge) der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig durchgeführt. Da hier die Proben nicht am gleichen Tag befördert werden konnten, diente essigsaurer Lugol-Reagenz zur Fixierung und Konservierung der Proben.

5.3.4. CARD-FISH

Die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung ist eine Methode zur taxonomischen Einordnung und Quantifizierung von Mikroorganismen. Dabei werden Zellen mittels rRNA-gerichteter Oligonukleotidsonden fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Zellen aus den in Paraformaldehyd oder Ethanol fixierten Biofilmproben wurden auf einen Objektträger aufgebracht und durch Lysozym/Achromopeptidase-Behandlung permeabilisiert. Für die Hybridisierung der Organismengruppen wurden die HRP (horse radish peroxidase) markierten Oligonukleotidsonden EUB I-III (Eubakterien), NONEUB (keine Bakterien), ALF968 (Alphaproteobacteria), ALF1b (Alphaproteobacteria), BET42a (Betaproteobacteria), GAM42a (Gammaproteobacteria), HGC (Actinobacteria, G+C gram-positive bacteria), LGC355 (Firmicutes, low G+C gram-positive bacteria), CF319a (Flavobacteria, einige Bacteroidetes), GNSB941 (Chloroflexi), FER440 (*Ferrovum myxofaciens*) eingesetzt. Eine Gegenfärbung der Proben mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid wurde für die Ermittlung der Gesamtzellzahl in den Proben durchgeführt.

Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss (Axioskop, Zeiss, Deutschland) bei 1000-facher Vergrößerung. Digitale Bilder der Proben wurden mit der Kamera AxioCam MRm™ aufgenommen und auf einen PC übertragen und anschließend mit der Software AxioVision Rel.4.6 der Firma Zeiss ausgewertet.

5.4. Test der neuen säurestabilen Fluoreszenzfarbstoffe - Färbeprozedur

Von allen Farbstoffen wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml im geeigneten Lösungsmittel (MilliQ-Wasser oder Methanol) hergestellt. Anschließend wurden alle Farbstoffe auf 10 µmol/l verdünnt. Hierzu wurde steril filtriertes Wasser aus der Drainagerinne von Probenpunkt P1 verwendet, um bei der Anwendung an den Biofilmen möglichst wenige Veränderungen hinsichtlich pH-Wert und Ionenstärke herbei zu führen.

Die neuen von DYOMICS (Jena) zur Verfügung gestellten Farbstoffe wurden alle an Biofilmen aus der Drainagerinne und an den tropfsteinähnlichen Biofilmen aus der Grube in Königstein getestet. Dabei wurde der Biofilm mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten, welche dann in die verschiedenen Reservoirs einer 24-well Zellkulturplatte gegeben wurden. Zu jedem Biofilmstückchen wurden 300 µl des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes gegeben. Anschließend wurden die Proben abgedeckt für 30 min im Dunkeln stehen gelassen, um dem Farbstoff Zeit für die Bindung zu geben. Danach wurde der überstehende Farbstoff mittels einer Mikroliterpipette abgesaugt. Die Proben wurden anschließend zweimal mit dem steril filtrierten Drainagenwasser für je 10 min gewaschen um

ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Die so fertig gefärbten Proben wurden auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Um ein Eintrocknen und somit Schrumpfen der Proben zu vermeiden wurden die Deckgläschen mittels transparenten Nagellacks versiegelt. Die fertigen Proben wurden anschließend mit dem CLSM untersucht. Zur Anregung der Fluoreszenz wurden Laser der Wellenlängen 543 nm bzw. 633 nm verwendet, je nach dem welcher näher an der angegebenen Anregungswellenlänge laut Tabelle 12 lag.

5.5. Kultivierung von *Euglena mutabilis*

5.5.1. *Euglena*-Stamm

Die *Euglena mutabilis* Schmitz Kultur wurde von der Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) als Reinkultur auf Schrägagar bezogen. Der ausgewählte Stamm hatte die Stamm-Nummer #1224-9b. Die Zellkultur wurde ursprünglich in der Region "Großteich nahe Hirschberg" in Böhmen (Tschechische Republik) aufgefunden und aus Proben von diesem Standort isoliert und seither in der Kultursammlung aufbewahrt.

5.5.2. Kulturmedium

Das flüssige Kulturmedium zur Anzucht der *Euglena mutabilis* Zellen wurde entsprechend dem empfohlenen Rezept (Medium Recipe Vers. 10.2008) der Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) hergestellt. Die Zusammensetzung wurde jedoch ein wenig modifiziert, indem der empfohlene Bodenextrakt weggelassen wurde und stattdessen ein Cocktail an diversen Spurenelementen hinzugefügt wurde. Diese Modifizierung wurde vorgenommen, da in Bodenextrakten diverse schwer quantifizierbare Substanzen enthalten sind, wie z.B. Huminstoffe, von denen Wechselwirkungen mit Schwermetallen wie Uran bekannt sind (Sachs et al., 2007) und die somit die Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche beeinflussen könnten. Die detaillierte Zusammensetzung des verwendeten flüssigen Kulturmediums ist in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Flüssignährmediums für die Kultivierung von *Euglena mutabilis* Schmitz

Makronährstoffe	g/L
CH ₃ COONa	1,00
KNO ₃	0,20
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,02
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,04
Fleischextrakt	1,00
Bacto-trypton	2,00
Hefeextrakt	2,00
Spurenelemente	mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,0
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
H ₃ BO ₃	0,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,5
NiSO ₄ ·6H ₂ O	1,0
Na ₂ SeO ₄ ·10H ₂ O	1,0
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,1

5.5.3. Detaillierte Anzucht und Vorbereitung der *Euglena mutabilis* Kulturen

Die Zellen wurden zunächst unter sterilen Bedingungen in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit je 40 ml Flüssignährmedium kultiviert. Wenn diese Vorkulturen eine hohe Zelldichte aufwiesen und unter dem Mikroskop die Reinheit der Kultur festgestellt wurde, wurde diese zum Beimpfen von jeweils (1600-1700) ml Nährmedium in einem Bioreaktor verwendet um so möglichst große Zellmengen für die nachfolgenden Versuche zu generieren. Die Vorkulturen in den Erlenmeyerkolben wurden auf einem Kreisschüttler vorsichtig geschwenkt und ebenso wie die Bioreaktoren während der Anzuchtphase unter Tageslichtbänken positioniert. Hier wurde mit Hilfe einer Zeitschaltuhr ein Tag/Nacht-Zyklus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit simuliert. Während dieser Zeit wurde das Medium in den Reaktoren stets mit steriler Luft gespült indem mittels einer Aquariumpumpe Raumluft durch mit steriler Glaswolle gestopfte Glasoliven und diverse Filter in den Reaktor gepumpt wurde. Außerdem wurde das Medium stets mit konstanter Geschwindigkeit gerührt. Abbildung 54 zeigt ein Foto der Tageslichtbank unter der zum Zeitpunkt der Aufnahme diverse Vorkulturen auf einem Schüttler (links) sowie zwei Bioreaktoren auf jeweils einer Rührplatte (rechts) positioniert waren.



Abbildung 54: Bioreaktoren und Vorkulturen in Erlenmeyerkolben unter der Tageslichtbank

Nach etwa 5-7 Wochen hatten die Zellkulturen in den Reaktoren eine ausreichend hohe Zelldichte erreicht, was an der intensiv grünen Färbung des Mediums im Reaktor gut zu erkennen war.

Um die Zellen für die Bioakkumulationsversuche mit Uran vorzubereiten, wurden diese zunächst durch mehrmaliges Abzentrifugieren der Zellsuspension in 50 ml Probenröhrchen geerntet. Dazu wurden je 50 ml der Zellsuspension bei 3500 rpm für jeweils 10 min abzentrifugiert. Das jeweils überstehende verbrauchte Nährmedium wurde weggegossen, die Röhrchen wieder mit neuer Zellkultursuspension aus dem Reaktor befüllt und anschließend erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde für jedes Proberöhrchen so oft wiederholt, bis die Zellen der gesamten Zellsuspension des Reaktors abgeerntet waren.

Bevor die Zellen für die Bioakkumulationsversuche weiterverwendet werden konnten, wurden diese zunächst im entsprechenden Hintergrundmedium für die nachfolgenden Versuche (NaClO_4 - bzw. in Na_2SO_4 -Lösung) gewaschen und anschließend erneut abzentrifugiert (3500 rpm, 10 min), um anhaftende Reste des Nährmediums zu entfernen. Die erhaltenen Zellpellets waren somit fertig vorbereitet für die nachfolgenden Bioakkumulationsversuche mit Uran.

In einigen Versuchen sollten unterschiedliche Zustände der Zellen getestet werden. Hierzu wurden einige vorbereitete Zellpellets im entsprechenden Hintergrundmedium (ohne Uran) suspendiert und bei leicht geöffneten Deckeln der Proberöhrchen im Autoklaven (121 °C, 30 min) abgetötet. Nach Abkühlen der Zellsuspensionen wurde ein Teil dieser abgetöteten Zellen mittels Ultraschallbehandlung zerstört. Dazu wurden die Zellsuspensionen auf einem Eisbad gekühlt und 15 Minuten lang mit gepulstem Ultraschall

(Ultraschall-Desintegrator, Sonifier II; Firma Heinemann; 200 W) behandelt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass über 95 % der Zellen in der Suspension dadurch zerstört wurden. Danach wurden die Zellsuspensionen der toten und aufgeschlossenen Zellen abzentrifugiert (3500 rpm, 10 min) und nur die festen Zellpellets wurden darauffolgend für die Durchführung von Bioakkumulationsversuchen verwendet. Im Fall der zerstörten Zellen wurden somit alle flüssigen und löslichen Zellbestandteile aus den Suspensionen entfernt.

5.6. Bioakkumulation von Uran an *Euglena mutabilis*

Vor Versuchsbeginn wurden die benötigten Uranlösungen hergestellt. Dazu wurde das Uran als Uranylnitrat (10 mM Uran in 0,1 M HClO₄) zu den vorbereiteten Hintergrundmedien gegeben. Die Versuchslösungen wurden entweder mit AMD-relevanten Konzentrationen von 0,01 mM Uran oder erhöhten Konzentrationen von 0,5 mM Uran vorbereitet. Die in der Uran-Stammlösung enthaltene Menge Perchlorat ist aufgrund der starken Verdünnung in den damit präparierten Probelösungen vernachlässigbar. Der voreingestellte pH-Wert der Lösungen wurde nach der Uranzugabe nochmals nachjustiert und auf den jeweils gewünschten pH-Wert von 3, 4, 5 oder 6 ($\pm 0,1$) eingestellt.

Als Hintergrundmedium wurde zum einen 9 g/l NaClO₄ bzw. zum anderen 3,48 g/l Na₂SO₄ verwendet. Natriumperchlorat wurde ausgesucht da in diesem Hintergrundmedium schon verschiedenste Versuche zur Bioakkumulation von Uran an Mikroorganismen durchgeführt wurden (Panak et al., 2000, Merroun et al., 2003, Günther et al., 2008) und somit die Ergebnisse der Versuche in diesem Medium besser mit Referenzdaten vergleichbar sind. Natriumperchlorat ist auch deshalb besonders für erstmalige Versuche zur Anbindung von Uran in einem bestimmten System geeignet, da es keinerlei Komplexe mit Uran bildet. Für die weiteren Versuche wurde Natriumsulfatmedium verwendet, da es die natürlichen Gegebenheiten von kontaminierten Standorten wie AMD-Gewässern, welche meist sehr hohe Sulfat-Werte aufweisen, eher repräsentiert.

Die vorbereiteten *Euglena*-Zellpellets wurden in den steril filtrierten vorbereiteten Uranlösungen suspendiert. Alle Versuche wurden mindestens als Dreifachbestimmung angesetzt bzw. die pH-Wert-abhängigen Versuche in Na₂SO₄ wurden als Vierfach-Versuche durchgeführt um eventuelle Ausreißer-Werte zu vermeiden. Außerdem wurden für jeden Versuch (jeden pH-Wert und jedes Hintergrundmedium) je zwei Proberöhrchen ohne Zellen angesetzt um eventuell auftretende Wandsorptionseffekte zu detektieren. Die Versuche wurden zum Teil bei unterschiedlichen Zelldichten durchgeführt, da Zellen aus unterschiedlichen Bioreaktoransätzen zum Einsatz kamen.

Für die Zeit der Bioakkumulation wurden die Zellen in der Uranlösung auf einem Wippschüttler in Fensternähe oder unter der Lichtbank positioniert. Nach Ende des

Versuches (nach 5 Tagen im Fall der pH-Wert- und Hintergrundmedien-abhängigen Versuche) wurden Zellen und Lösung durch Zentrifugation wieder voneinander getrennt und separat analysiert. In den Versuchen, in denen der zeitliche Bioakkumulationsverlauf untersucht werden sollte, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben aus den einzelnen Versuchsansätzen entnommen. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellsuspensionen gut aufgeschüttelt wurden, um durch die Probenentnahme nicht das Verhältnis von Probelösung zu Zell-Biomasse zu verändern. Die entnommenen Proben wurden anschließend ebenso durch Zentrifugation in Zellmasse und Lösung unterteilt.

Die Lösungen aus den Versuchen wurden anschließend mittels ICP-MS hinsichtlich ihres Urangehaltes untersucht. Die Menge an aufgenommenem Uran (durch die Zellen immobilisiert) konnte daraufhin aus den Konzentrationsunterschieden an Uran zwischen den Ausgangslösungen und den Lösungen nach Kontakt mit den Zellen berechnet werden. Bei diesen Berechnungen wurden, falls dies nötig erschien, die Ergebnisse um eventuell stattfindende Wandsorptionseffekte korrigiert. Dies war ausschließlich bei den Versuchen unter weniger sauren Bedingungen (pH 5 und 6) relevant.

5.7. Spektroskopische, mikroskopische Methoden und Probenvorbereitung

5.7.1. LIFS/TRLFS

Die laserinduzierten fluoreszenzspektroskopischen (LIFS) Messungen an den Proben in dieser Arbeit fanden an einem TRLFS-System statt, was die Aufnahme von zeitverzögerten und zeitaufgelösten Spektren ermöglicht. In dieser Arbeit werden aber hauptsächlich zeitverzögerte und keine zeitaufgelösten Messungen besprochen.

Das verwendete LIFS/TRLFS-System ist ausgestattet mit einem Nd-YAG-Laser (Minilite, Continuum) als Anregungsquelle sowie einem Spektrographen (iHR 550, HORIBA Jobin Yvon) zusammen mit einer ICCD (intensified charge coupled device) Kamera (HORIBA Jobin Yvon) für die Detektion des Fluoreszenzlichtes. Für alle Messungen in dieser Arbeit wurde eine ideale Anregungswellenlänge für Uran(VI)-verbindungen von 266 nm verwendet (Laserenergie etwa 250 μ J). Alle Spektren wurden für einen Wellenlängenbereich von 371,4 nm bis 674,3 nm aufgenommen. Dabei wurden jeweils die Signale nach je 100 Laserpulsen addiert, wobei die Detektion an der Kamera in einem Zeitfenster von 2 μ s stattfand. Die Kontrolle des gesamten Messsystems sowie die Aufnahme der Spektren erfolgte durch die Computer-Software Labspec 5 (HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA).

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden in Origin 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) importiert und mit dem darin enthaltenen Modul zum Fit von Spektren ausgewertet. Die angegebenen Fehler wurden als Standardabweichung der

Bandenlagen von den Emissionsspektren einer Standard-Uranyl-Lösung (0,05 mM, pH 2), welche vor jeder LIFS-Messung getestet wurde, ermittelt. Diese Fehler wurden als gerätespezifische Abweichung für die sechs Hauptemissionsbanden von Uran(VI) angegeben. Sollten jedoch die Standardabweichungen der mehrfach vermessenen Proben diese Fehler übersteigen, wurden stattdessen die probenspezifischen Fehler angegeben. Somit ist immer der maximale Fehler dargestellt.

Zur Messung der flüssigen Proben mittels LIFS wurden diese in eine saubere und trockene Quarzküvette überführt und in einem entsprechenden Küvettenhalter im Strahlengang des Lasers positioniert. Vor der Messung der *Euglena*-Zellpellets wurden die Zellen bzw. Zellfragmente zunächst mehrfach in dem entsprechenden Hintergrundmedium (gleicher pH-Wert wie im Bioakkumulationsversuch) ohne Uran gewaschen, um möglicherweise anhängendes nicht gebundenes Uran zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bei 10000 g (4 °C) für 5 min zentrifugiert, um ein möglichst kompaktes Zellpellet zu erhalten. Danach wurden die noch leicht feuchten Zellpellets auf einem kleinen Probenhalter mit Hilfe von zwei sterilen Spateln haufenförmig aufgebracht. Diese Probe wurde vorsichtig im Laserstrahl positioniert.

Bei der Messung von festen biologischen Proben sowie flüssigen Proben mit einem hohen Anteil organischer Inhaltsstoffe wurde die Verzögerungszeit zwischen der Anregung mit dem Laserpuls und der Öffnung der Kamera zur Detektion des Fluoreszenzsignals auf mindestens 80 ns erhöht, um Störungen der Spektren durch kurzlebige Autofluoreszenzen von organischen Substanzen zu vermeiden.

5.7.2. CLSM/LIFS

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) der Firma Leica (TCS-SP2). Dazu wurden die Proben zunächst auf einen Objektträger aufgebracht und gegebenenfalls mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Anregung der Proben erfolgte mit Laserlicht eines Dioden-Lasers der Wellenlänge 408 nm (cw; Vioflame; 408 nm/25 mW; Coherent Inc., Auburn, CA, USA), welcher über den UV-Port des CLSM in das Messsystem eingekoppelt ist (Großmann, 2008). Die resultierenden emittierten Fluoreszenz-Spektren wurden anschließend durch ein extern angeschlossenes ICCD-Kamera-Detektionssystem (Shamrock sr-303i Spektrograph verbunden mit iXonEM DU-888 ICCD-Kamera, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland) aufgenommen. Der Aufbau und die detaillierte technische Ausstattung des verwendeten gekoppelten CLSM/LIFS-Messsystems ist in der Arbeit von Großmann (2008) beschrieben.

5.7.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Probenvorbereitung

Für die Präparation der *Euglena*-Zellen für die Analyse mittels TEM/EDX wurden die Zellen anknüpfend an die Bioakkumulationsversuche zunächst durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und mindestens dreimal im entsprechenden Hintergrundmedium des gleichen pH-Wertes ohne Uran gewaschen. Danach wurden die Zellen in einer Glutaraldehyd-Lösung (2,5 %) fixiert. Dazu wurden die Zellen zunächst in einer etwa gleichen Menge 2,5%igem Glutaraldehyds suspendiert und anschließend vorsichtig abzentrifugiert. Nach Entfernen des alten und Zugabe von frischem Glutaraldehyds verblieben die Zellen für mindestens eine Stunde lang darin. Nach Entfernen der Glutaraldehyd-Lösung wurden die Zellen in etwa einem Viertel Milliliter handwarmem flüssigen Agar (4 g Agar in 100 ml destilliertem Wasser) vorsichtig suspendiert. Nach Festwerden der Agarblöcke (mindestens 1 h im Kühlschrank) wurden diese mit Hilfe einer Rasierklinge in etwa 1x1 mm große Würfel geschnitten und in kleine Probevials überführt. Die Probewürfel wurden darauf in 1%iger Osmiumtetroxidlösung für mindestens eine Stunde kontrastiert. Nach dem Waschen der Probewürfel in deionisiertem Wasser (MilliQ) wurden diese in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und anschließend in 100%igem Acetonitril dehydriert. Entsprechend der Empfehlungen der Hersteller wurden die Proben nachfolgend in geeigneten Einbettungskapseln in einem speziellem Harzgemisch (Agar Low Viscosity Resin, Plano GmbH, Deutschland) eingebettet. Die Harzblöcke wurden anschließend für 48 h bei 60 °C ausgehärtet bevor diese mit Hilfe eines Diamantmessers (Diatome AG, Schweiz) sowie eines Ultramicrotoms (EM UC7, Leica) in 40 nm dicke Schnitte überführt wurden. Die Dünnschnitte wurden vorsichtig mit Chloroform-Dämpfen geglättet und danach auf mit Kohle beschichteten Kupfernetzchen (400 mesh, Plano GmbH, Deutschland) positioniert.

Die mikroskopische Analyse der Zellen in Nanometerbereich erfolgte nach der abgeschlossenen Präparation mit einem Transmissions-Elektronen Mikroskop (TEM, Titan 80-300 (FEI)) bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV. Während die qualitative Ordnungszahl-abhängige Kontrastabbildung mit einem Dunkelfeld-Detektor (high-angle annular dark field Detektor; HAADF) durchgeführt wurde, wurde für die Analysen mittels der energie-dispersiven Röntgenspektroskopie (EDXS) ein herkömmlicher Si(Li)-Detektor (EDAX) zur Lokalisation des Urans in den Zellen angewendet.

5.7.4. Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Für die Analyse der Bioakkumulation von Uran an *Euglena*-Zellen mittels der zeitaufgelösten FT-IR-Spektroskopie wurde in einem ersten Schritt ein dünner Film aus *Euglena*-Zellen auf dem ATR-Kristall des Messsystems als stationäre Phase präpariert. Dazu wurden jeweils 2 µl einer *Euglena*-Zellsuspension auf die Oberfläche des ATR-Kristalls aufgetragen und mit einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt um einen entsprechend stabilen und dicken Film zu erhalten. Da die Zellen auf der Kristalloberfläche eingetrocknet wurden, waren diese beim anschließenden Kontakt zur Uranlösung bereits tot und nicht mehr stoffwechselaktiv. Daher konnte mit diesen Experimenten nur die Anbindung an bereits tote Zellen näher untersucht werden. Bei dem ATR-Zubehör, mit dem das Messsystem für die Untersuchungen in dieser Studie ausgestattet war, handelte es sich um ein DURA SamplIR II (Smiths Inc.) mit einem horizontalen Diamant-Kristall ($A = 12.57 \text{ mm}^2$) mit neun internen Reflexionen auf der oberen Oberfläche und einem Einfallswinkel von 45° .

Der Ablauf des Bioakkumulationsprozesses an dem *Euglena*-Film wurde mit einer zeitlichen Auflösung von unter einer Minute aufgenommen, da die Erfassung jedes Einzelspektrums nur etwa eine Zeit von 30 Sekunden benötigt. Die IR-Spektren wurden mit einem Bruker Vertex 70/v Vakuum-Spektrometer gemessen, welches mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor mit einer niedrigen Grenz-Frequenz von 600 cm^{-1} ausgestattet ist.

Um den *Euglena*-Zell-Film während der Durchführung des Experiments mit den flüssigen Lösungen für die Konditionierung und den Sorptionsschritt zu spülen, wurde eine Durchflusszelle auf dem ATR-Kristall angebracht (totales Volumen 200 µl). Ein schematischer Aufbau dieser Durchflusszelle ist in Abbildung 55 dargestellt. Eine peristaltische Pumpe produzierte eine sehr langsame Fließgeschwindigkeit von 0,05 ml/min um das Ablösen der Zellen durch die Strömung zu vermeiden. Alle diese Experimente wurden bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

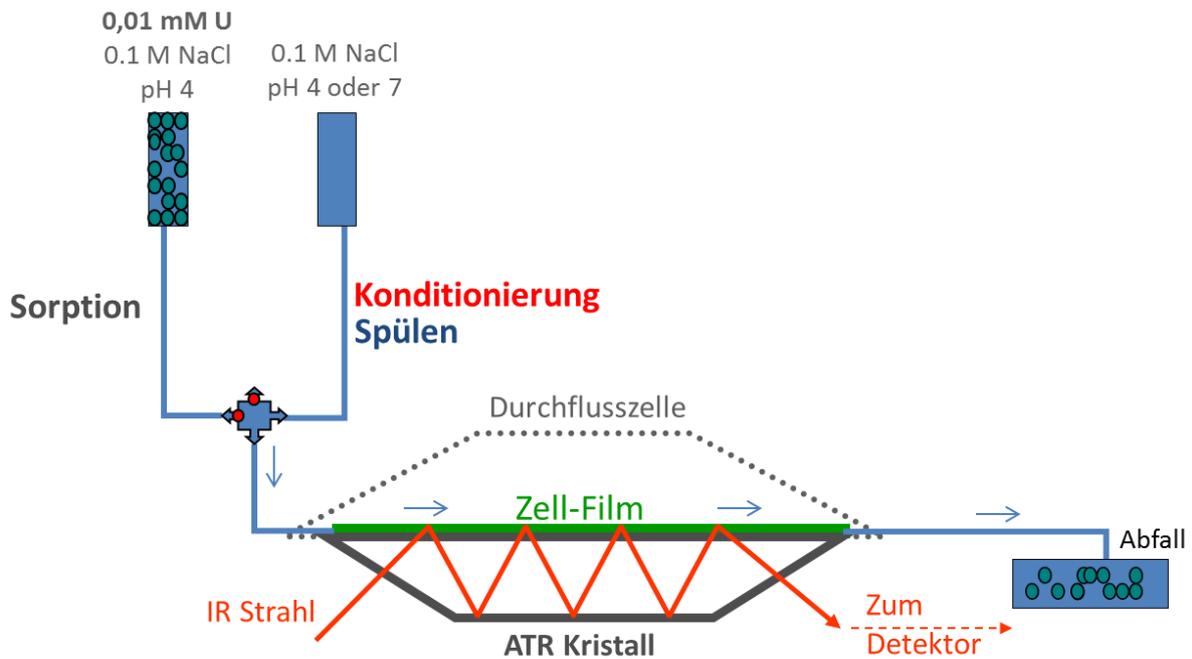


Abbildung 55: Schematischer Aufbau der Durchflusszelle auf dem ATR-Kristall (nach Müller (2009))

Die in-situ Sorptionsexperimente in dieser Arbeit wurden in vier Phasen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde der frisch präparierte *Euglena*-Zell-Film durch Spülen mit einer Natriumchlorid-Lösung (NaCl; 0,1 M; pH = 6,5) für 30 Minuten konditioniert. Anschließend folgte ein weiterer 30-minütiger Konditionierungsschritt mit einer sauren Natriumchlorid-Lösung (NaCl; 0,1 M; pH = 4). Die zwei Konditionierungs-Phasen waren notwendig um den Zell-Film auf der Kristalloberfläche zu stabilisieren, sodass möglichst wenige Zellen während der folgenden Sorptionsphase vom Film abgespült werden.

In der dritten Phase des Experimentes folgte der eigentliche U(VI)-Sorptionsprozess an dem Film aus *Euglena*-Zellen. Dazu wurde für mindestens 60 Minuten eine 0,01 mM Uran(VI)-Lösung (in 0,1 M NaCl; pH = 4) über den Zell-Film geleitet. Die Berechnung der Differenzspektren (bezeichnet als „Sorption“) erfolgte jeweils vom letzten Einzelspektrum am Ende der zweiten Konditionierungsphase und von den Spektren, welche jeweils nach definierten Zeitintervallen nach Start der Sorptionsphase aufgenommen wurden.

In einem letzten Schritt wurde der Film erneut für 30 min mit der sauren Natriumchlorid-Lösung (in 0,1 M NaCl; pH = 4) gespült („Spülen“), um die Reversibilität des Sorptionsprozesses zu testen und schwach gebundene Uranspezies zu identifizieren.

In weiteren Sorptions-Experimenten dieser Art wurde der Effekt der unterschiedlichen Vorbehandlung der *Euglena*-Zellen untersucht. Hierzu wurden getestet:

- (1) lebende Zellen, welche direkt vom Reaktor abgeerntet wurden,
- (2) lebende Zellen, welche aber bereits vor einer Woche vom Reaktor abgeerntet und seit dem in NaCl-Lösung (0,1 M; pH = 6) gehalten wurden,

- (3) durch Autoklavieren getötete und anschließend durch Ultraschallbehandlung zerstörte Zellen, und
- (4) durch Autoklavieren getötete, durch Ultraschallbehandlung zerstörte Zellen, welche in zwei Fraktionen unterteilt wurden.

Die unterschiedlich vorbereiteten Zellsuspensionen wurden anschließend zur Präparation von Filmen auf dem ATR-Kristall verwendet. Dabei wurden die unter (4.) beschriebenen zerstörten Zellen nochmals durch vorsichtiges Zentrifugieren (300 rpm, 5 min) in zwei Fraktionen unterteilt (Überstand = grüne Suspension; festen Rückstände = weißer Niederschlag), welche separat für die Präparation von Filmen für die Sorptionsuntersuchungen verwendet und analysiert worden.

5.8. Kationen-/Anionenanalysen

Die Bestimmung der Kationenkonzentrationen in wässrigen und Biomasseproben wurden mittels Massenspektrometrie (MS) mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) zur Ionisation der Probe bestimmt. Die wässrigen Proben wurden zuvor mit konzentrierter hochreiner Salpetersäure angesäuert (15 µl HNO₃ pro 1 ml Probe), um eine Sorption von Ionen an der Wandung der Probengefäße zu vermeiden. Für die Analyse der meisten Kationen wurde ein ICP-Massenspektrometer Elan 9000 der Firma Perkin Elmer (Perkin Elmer SCIEX, Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt. Die Gehalte an Natrium, Kalium und Kalzium wurden mittels Atomabsorptionschromatographie (AAS) (Perkin Elmer 4100 AAS) und die für Eisen mittels Graphitrohr-AAS (AAS-6F ZEE nit 600s, Analytik Jena, Jena, Deutschland) ermittelt.

Die Bestimmung der Anionen wie Chlorid, Sulfat, Nitrat oder Phosphat erfolgte mit der Ionenchromatographie (ICsystem 732/733, Metrohm, Filderstadt, Deutschland).

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des natürlichen Urankreislaufs bezogen auf U(IV) und U(VI).....	4
Abbildung 2: Uran(VI)-Speziationsdiagramm in Abhängigkeit des pH-Wertes als Beispiel für eine Uran(VI)konzentration von 0,01 mM in 0,1 M Natriumperchlorat-Lösung (NaClO ₄) bei atmosphärischen Bedingungen und ohne Anwesenheit weiterer komplexierender Stoffe; Berechnung mittels des Speziationsdiagrammes EQ3/6 unter Verwendung der Daten von Guillaumont et al. (2003).....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der heterogenen Biofilmstruktur, welche geprägt ist durch in die EPS eingebettete Mikrokolonien von Mikroorganismen und einem komplexen Netz an Wasserkanälen.	11
Abbildung 4: Strukturabbildung eines Biofilms (übernommen von Costerton (2007)), mit freundlicher Genehmigung des Montana State University Center for Biofilm Engineering). Im Vordergrund ist der Lebenszyklus eines Biofilmes dargestellt. Im mittleren Bereich sind die Heterogenität der bakteriellen Aktivität, chemische Mikrokosmen und die Bildung von Mikrokolonien dargestellt. Im Hintergrund erkennt man ebenfalls die heterogene Struktur zusammen mit „Biofilm-Streamern“ und dem Ablösen von kleinen Biofilmfetzen.	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Uran mit mikrobiellen Zellen.....	16
Abbildung 6: Jablonski-Diagramm nach Visser und Rolinski (Download am 20.05.2013) und Lakowicz (2006).....	22
Abbildung 7: Absorptionsspektren von Uran(IV), (V) und (VI) aus Steudtner (2010).....	23
Abbildung 8: Termschema der Absorptions- und Emissionsübergänge des aquatischen Uranyl(VI)-ions nach Bell und Biggers (1968)	25
Abbildung 9: Emissionsspektren von Uran(IV), (V) und (VI) nach Steudtner (2010) und Steudtner et al. (2006)	26
Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer fluoreszenzspektroskopischen Messanordnung für zeitaufgelöste Messungen.....	28
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops mit eingezeichnetem Strahlenverlauf.....	30

Abbildung 12: Gesamtaufbau des gekoppelten CLSM/LIFS-Messsystems (aus Großmann (2008))	31
Abbildung 13: Vertikalprofil durch die Grube in Königstein, Flutungsstand Dezember 2010, nicht maßstabsgetreu, übernommen von Becker und Ruhrmann (2011)	33
Abbildung 14: Lageskizze der 50 m Sohle von Schacht 390 in Königstein; Die Probenentnahme-punkte P1 und P2 sind entsprechend vermerkt (nach Arnold et al. (2011)).	34
Abbildung 15: Fotos von den zwei Probenentnahmestellen P1 (Bild A + B) und P2 (Bild C + D)	35
Abbildung 16: ph-Eh Diagramm für ein U-S-O-H-C System bei 15 °C. Eh- und pH-Werte, gemessen im Drainagenwasser der Grube Königstein (O) sowie in dem herabtropfenden Wasser von den tropfsteinartigen Biofilmen (O). Beide Punkte liegen im Bereich der aquatischen Uran(VI)-Sulfatkomplexierung, Diagramm nach (Krawczyk-Bärsch et al., 2011).	39
Abbildung 17: Fluoreszenzspektrum des Grubenwassers aus der Drainagerinne (P1); Anregungswellenlänge 266 nm; Verzögerungszeit 80 ns; 100 Akkumulationen	40
Abbildung 18: Zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum des Drainagenwassers.....	40
Abbildung 19: Diversität der Eukaryoten in der Grube Königstein - Zusammenfassung der mikroskopischen und molekularbiologischen Verteilung der phylogenetischen Gruppen im Biofilm (Daten übernommen von Zirnstern (2010)).....	46
Abbildung 20: Bakterielle Diversität in den Biofilmen aus Königstein. Prozentuale Anteile der gruppenspezifisch markierten Zellen an der Gesamtzellzahl (GZZ) nach Anfärbung mit Propidium-iodid der beiden untersuchten Biofilmproben von Königstein; Die grünfarbenen Balken geben den Anteil der mit der Sonde FER440 hybridisierten Zellen wieder. Diese ist spezifisch für das Bakterium <i>Ferrovum myxofaciens</i> . (Daten übernommen von (Meierhöfer, 2009))	47
Abbildung 21: Durchlichtaufnahmen einiger Bewohner der tropfsteinähnlichen Biofilme	48
Abbildung 22: Durchlichtaufnahmen einiger Bewohner der Biofilme aus der Drainagerinne	49
Abbildung 23: Links: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines fluoreszierenden Partikels in einem tropfsteinähnlichen Biofilm bei Anregung mit 408 nm; „Region of Interest“ (ROI) geben den Bereich für die Detektion des zugehörigen Spektrums vor; Rechts: zugehörige Spektren aufgenommen mit den	

internen PMT	50
Abbildung 24: Zweifarbiges Fluoreszenzmikroskopisches Abbild entsprechend der Zuordnung grün = 415 – 445 nm und rot = 445 – 550 nm	51
Abbildung 25: Mittels des gekoppelten CLSM/LIFS-System aufgenommenes Fluoreszenzspektrum des Partikels aus Abbildung 23	52
Abbildung 26: Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen der tropfsteinähnlichen Biofilmproben, welche mittels der herkömmlichen Farbstoffe DAPI und SYTO 59 gefärbt wurden. Links: Probe naturbelassen, Farbstoff in steril filtriertem Grubenwasser verdünnt; Rechts: Probe zweimal mit Leitungswasser gewaschen, Farbstoff in Leitungswasser verdünnt.	55
Abbildung 27: Strukturformeln der vier, zur Anfärbung im sauren Milieu geeigneten Farbstoffe DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613 (Abbildung aus (Brockmann et al., 2010)).....	58
Abbildung 28: Absorptions- (blau) und Emissions- (rot) Spektren der vier neuen Farbstoffe	59
Abbildung 29: Überblick über die Resultate der Anfärbung des Biofilms aus der Drainagerinne, Vergleich der neuen Farbstoffe mit zwei herkömmlichen. A: DY-601XL; B: V07-04118; C: V07-04146; D: DY-613, E: DAPI; F: SYTO 59.....	61
Abbildung 30: Überblick über die Resultate der Anfärbung des tropfsteinähnlichen Biofilms, Vergleich der neuen Farbstoffe mit zwei herkömmlichen. A: DY-601XL; B: V07-04118; C: V07-04146; D: DY-613, E: DAPI; F: SYTO 59	62
Abbildung 31: Überblick über den Standort der ehemaligen Gessenhalde; Bild links: Luftaufnahme über das Haldengebiet in der Umgebung von Ronneburg (Altmann et al., 2006); Bild rechts oben: Luftbildaufnahme der Gessenhalde vom Jahre 1993 (übernommen von der Internetseite des Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Forsten, Umwelt und Naturschutz (TMLNU, Download am 18.05.2013))	63
Abbildung 32: Foto des Rinnsals auf der Gessenwiese sowie Nahaufnahme des Biofilms auf der Wasseroberfläche (Aufnahmen vom 06. Juli 2009)	64
Abbildung 33: Fluoreszenzemissionsspektrum des Wassers aus dem Rinnsal von der Gessenwiese (Anregung mit 266 nm; Detektion nach 240 ns).....	67
Abbildung 34: Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung und Abklingkurve des Fluoreszenzsignals	68
Abbildung 35: Speziationsdiagramm für U(VI) in den Wässern aus dem Rinnsal auf der Gessenwiese (Geochemist's Workbench(TM) Version 9.0.3, Modul	

"React", Thermodynamische Daten von Uran nach NEA (Guillaumont et al., 2003))	68
Abbildung 36: Häufigkeiten verschiedener Eukaryoten im Biofilm von der Gessenwiese; Daten übernommen von Zirnstern (2010)	70
Abbildung 37: Zusammensetzung der bakteriellen Diversität der Gessenwiesenbiofilme; Daten übernommen von C. Meierhöfer (2009).....	71
Abbildung 38: Lichtmikroskopische Aufnahmen einiger eukaryotischer Biofilmbewohner; Bild A, B und C: fadenförmige Grünalgen (<i>Chlorophyta</i>); Bild D: <i>Amoebozoa</i> ; Bild E und F: verschiedene <i>Euglena</i> -Arten; Bild B und G: Kieselalgen (<i>Diatomeen</i>)	72
Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Biofilms aus dem Rinnsal von der Gessenwiese (grün: Fluoreszenzemission im Bereich von 430 – 650 nm; rot: Fluoreszenzemission im Bereich von 650 – 700 nm).....	74
Abbildung 40: Mikroskopisches Bild zweier <i>Euglena mutabilis</i> Schmitz Zellen	78
Abbildung 41: Vergleich der Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Hintergrundmedium (oben: NaClO ₄ ; unten: Na ₂ SO ₄); in grün: durch die <i>Euglena</i> -Zellen aufgenommenes Uran als Prozent der Ausgangsmenge; in blau: von den <i>Euglena</i> -Zellen aufgenommenes Uran angegeben in mg Uran pro g <i>Euglena</i> -Biotrockenmasse	81
Abbildung 42: Mikroskopische Fotos (Leica Mikroskop TCS SP2) der <i>Euglena</i> -Zellen nach 5 Tagen Kontakt mit den Uranprobelösungen (0,01 mM); Vergleich der Zellen aus dem Perchlorat- und Sulfatmedium jeweils für pH 3 und pH 6 (Bilder oben: 400fache Vergrößerung; Bilder unten: 200fache Vergrößerung)	84
Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme der Zellen bei 630-facher Vergrößerung; A+C+D: Zellen vor Versuchsbeginn; B: ursprünglich lebende Zellen, 19 Tage nach Versuchsstart in 0,01 mM Uranlösung in Sulfatmedium bei pH = 3. Etwa 1/3 der Zellen zeigte veränderte Zellmorphologie.	87
Abbildung 44: Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Sulfat-Medium bei pH 3; oben: Versuch über etwa 5 Tage bei einer AMD-relevanten Urankonzentration von 0,01 mM; unten: Versuch bei einer erhöhten Urankonzentration von 0,5 mM über etwa 27 Tage	89
Abbildung 45: 630-fache Vergrößerung der ursprünglich lebenden Zellen nach Versuchsende (~ 27 Tage) in 0,5 mM Uranlösung (pH = 3, Natriumsulfatmedium).....	91
Abbildung 46: LIFS-Spektren der Ausgangslösung (rot) und des <i>Euglena</i> -Zellpellets	

(grün) nach 5 Tagen des Bioakkumulationsversuches in NaClO ₄ (pH = 3; 0,01 mM Uran).....	94
Abbildung 47: LIFS-Spektren der Ausgangslösung (rot) und des <i>Euglena</i> -Zellpellets (grün) nach 5 Tagen des Bioakkumulationsversuches in Na ₂ SO ₄ (pH = 3; 0,01 mM Uran).....	95
Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopisches Bild von den ursprünglich lebenden Zellen nach Inkubation in 0,5 mM uranhaltiger Lösung (pH 3, Sulfatmedium), 1000fache-Vergrößerung (grün: (437 – 598) nm; rot: (588 – 702) nm; gelb dargestellt werden Bereiche in denen sich rot und grün zugewiesene Fluoreszenzabbildungen überlagern)	102
Abbildung 49: Aufnahmen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System von den ursprünglich lebenden Zellen (pH = 3, Sulfatmedium, 0,5 mM U), Links: Laserfluoreszenzmikroskopisches Bild der <i>Euglena</i> -Zellen, 200fache-Vergrößerung (grün: (437 – 598) nm, rot: (588 – 702) nm), Rechts: Zugehöriges Spektrum (blau) zu der entsprechend markierten ROI im Vergleich zu dem LIFS/TRLFS-Spektrum der Zellen nach Inkubation in 0,01 mM U.....	103
Abbildung 50: Aufnahmen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System von den toten Zellen (pH = 3, Sulfatmedium, 0,5 mM U), Links: Laserfluoreszenzmikroskopisches Bild der <i>Euglena</i> -Zellen, 200fache-Vergrößerung (grün: 430 - 599, rot: 600 - 700), Rechts: Zugehörige Spektren an den entsprechend eingezeichneten ROIs (dunkelblau und hellblau) im Vergleich zu dem LIFS/TRLFS-Spektrum des an die lebenden Zellen gebundenen Urans (0,01 mM U; grün) und zum CLSM/LIFS-Spektrum lebender Zellen ohne Uran (pink)	105
Abbildung 51: TEM-Aufnahmen einer ursprünglich lebenden Zelle (0,5 mM Uran, pH = 3, Na ₂ SO ₄ 3,48 g/l) sowie zugehörige EDX-Spektren zweier markierter Messbereiche	107
Abbildung 52: In-situ zeitaufgelöste IR-Spektren der Uran(VI)-Sorption an <i>Euglena</i> -Zellen (Zellen lebten bevor sie als Film auf der ATR-Kristalloberfläche getrocknet wurden; 0,01 mM U Ausgangskonzentration; 0,1 M NaCl als Hintergrundmedium; Flussgeschwindigkeit 0,05 ml/min).....	110
Abbildung 53: IR-Spektren der U(VI)-Sorption an Zellen, die unterschiedlich vorbehandelt wurden (0,01 mM U(VI); 0,1 M NaCl; pH = 4, 60 min nach Start des Sorptionsversuches).....	111
Abbildung 54: Bioreaktoren und Vorkulturen in Erlenmeyerkolben unter der Tageslichtbank	124

Abbildung 55: Schematischer Aufbau der Durchflusszelle auf dem ATR-Kristall (nach Müller (2009)) 130

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	natürliche Urangehaltsspannen in verschiedenen Wässern (Daten aus Bernhard (2005))	8
Tabelle 2:	Biofilme an Grenzflächen (nach Flemming (2001))	12
Tabelle 3:	Einflussvariablen auf die Biofilmbildung (nach Flemming (1994))	13
Tabelle 4:	Anregungswellenlängen für Uranverbindungen in Abhängigkeit vom Oxidationszustand	24
Tabelle 5:	Einfluss der chemischen Umgebung des Uranions auf die Emissionsbandenlage am Beispiel des aquatischen Uranyl(VI)ions sowie von zwei mineralischen Uranverbindungen.....	27
Tabelle 6:	Mittlere Anionen- und Kationen-Zusammensetzung des Grubenwassers in Königstein inklusive Angabe von Extremmesswerten	37
Tabelle 7:	Überblick über vor Ort gemessene Parameter in der Drainagerinne (Mittelwert aus Werten von 9 Messtagen an jeweils 5 verschiedenen Messstellen in der Drainagerinne)	38
Tabelle 8:	Vergleich der Emissionsbanden der Grubenwässer aus Königstein mit denen einer Standard-Uranylsulfatlösung (pH 2,55 und 2,85; 0,001 und 0,025 M); Daten übernommen aus (Arnold et al., 2011)	41
Tabelle 9:	Kationenkonzentrationen der Biofilmtrockenmassen.....	42
Tabelle 10:	Ermittelte Gehalte verschiedener EPS-Bestandteile der Biofilmprouben aus Königstein	44
Tabelle 11:	Hauptemissionsmaxima in den gemessenen Spektren des Partikels aus dem Biofilm von der Grube Königstein (Ein Fehlerbereich kann nicht angegeben werden, da es sich jeweils um Einzelmessungen handelt.)	52
Tabelle 12:	Angaben zu den 19 Farbstoffen laut DYOMICS.....	57
Tabelle 13:	Eigenschaften der vier Farbstoffe DY-601XL, V07-04118, V07-04146 und DY-613	58
Tabelle 14:	Analysenergebnisse der Wässer und Biofilmtrockenmassen	65
Tabelle 15:	Vergleich der Lage der Emissionsbandenmaxima und der Lebenszeit der Wasserprobe aus dem Rinnsal auf der Gessenwiese mit einer U-SO ₄ -Standardprobe	67
Tabelle 16:	Analysenergebnisse der Hauptbestandteile in den EPS des Biofilms von der Gessen-wiese.....	69
Tabelle 17:	Zusammenstellung aller Ergebnisse aus den pH-Wert- und Hintergrundmedium-abhängigen Bioakkumulationsversuchen an	

	<i>Euglena mutabilis</i> Zellen.....	82
Tabelle 18:	Zusammengefasste Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom Zustand der Zellen bei pH 3 in sulfatischem Medium (3,48 g/l Na ₂ SO ₄) und 0,01 mM Uran.....	88
Tabelle 19:	Zusammengefasste Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche in Abhängigkeit vom Zustand der Zellen bei pH 3 in sulfatischem Medium (3,48 g/l Na ₂ SO ₄) bei einer erhöhten Urankonzentration von 0,5 mM Uran	88
Tabelle 20:	Hauptkomponenten und pH-Werte der eingesetzten AMD-Wässer für Bioakkumulations-versuche an <i>Euglena mutabilis</i> Zellen.....	92
Tabelle 21:	Zusammengefasste Ergebnisse der Uran-Bioakkumulationsexperimente an <i>Euglena mutabilis</i> Zellen mit natürlichen AMD-Wässern von der Gessenwiese sowie aus der Drainagerinne und von den tropfsteinähnlichen Biofilmen aus der Grube Königstein	92
Tabelle 22:	Vergleich der LIFS-Emissionsbanden der Uranylspezies der gemessenen Proben und einer Reihe an Referenzverbindungen aus der Literatur	96
Tabelle 23:	Vergleich der Emissionsmaxima aus den Versuchen an lebenden, toten und zerstörten <i>Euglena</i> -Zellen in sulfatischer Lösung (pH = 3, 0,01 mM Uran)	99
Tabelle 24:	Emissionsmaxima der LIFS-Messungen aus dem Versuch mit natürlichem AMD-Wasser aus der Drainagerinne in Königstein.....	100
Tabelle 25:	Emissionsmaxima des an den lebenden Zellen gebundenen Urans, gemessenen an einzelnen Zellen mit dem gekoppelten CLSM/LIFS-System	104
Tabelle 26:	Zusammensetzung des Flüssignährmediums für die Kultivierung von <i>Euglena mutabilis</i> Schmitz.....	123

7. Referenzen

- Altmann, K., Schmidt, P., and Wolf, F. (2006) Umweltbericht 2006 der Wismut GmbH. Unternehmensleitung der Wismut GmbH.
- Altmann, K., Schmidt, P., and Wolf, F. (2009) Umweltbericht 2009 der Wismut GmbH. Unternehmensleitung der Wismut GmbH.
- Arnold, T. and Baumann, N. (2009) Boltwoodite $K(UO_2)(SiO_3OH)(H_2O)(1.5)$ and compregnacite K-2 $(UO_2)(3)O-2(OH)(3)$ (2)center dot $7H(2)O$ characterized by laser fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **71**:1964-1968.
- Arnold, T., Baumann, N., Krawczyk-Barsch, E., Brockmann, S., Zimmermann, U., Jenk, U., and Weiss, S. (2011) Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **75**:2200-2212.
- Arnold, T., Grossmann, K., and Baumann, N. (2010) Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**:1641-1653.
- Azeredo, J., Lazarova, V., and Oliveira, R. (1999) Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: A comparative study. *Water Science and Technology* **39**:243-250.
- Baffico, G. D., Diaz, M. M., Wenzel, M. T., Koschorreck, M., Schimmele, M., Neu, T. R., and Pedrozo, F. (2004) Community structure and photosynthetic activity of epilithon from a highly acidic (pH \leq 2) mountain stream in Patagonia, Argentina. *Extremophiles* **8**:463-473.
- Baker, B. J., Tyson, G. W., Goosherst, L., and Banfield, J. F. (2009) Insights into the Diversity of Eukaryotes in Acid Mine Drainage Biofilm Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:2192-2199.
- Bannick, C., Engelmann, B., Fendler, R., Frauenstein, J., Ginzky, H., Hornemann, C., Ilvonen, O., Kirschbaum, B., Penn-Bressel, G., Rechenberg, J., Richter, S., Roy, L., and Wolter, R. (2008) Grundwasser in Deutschland. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU).
- Barisic, D., Lulic, S., and Miletic, P. (1992) Radium and Uranium in Phosphate Fertilizers and their Impact on the Radioactivity of Waters. *Water Research* **26**:607-611.
- Barkleit, A., Moll, H., and Bernhard, G. (2009) Complexation of uranium(VI) with peptidoglycan. *Dalton Transactions*:5379-5385.
- Baumann, N., Arnold, T., and Lonschinski, M. (2012) TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **291**:673-679.
- Bayston, R. (2000) Biofilm Infections on Implant Surfaces. Pages 117-131 in L. V. Evans, editor. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. Harwood academic publishers.
- Becker, J. and Ruhrmann, G. (2011) 20 Jahre Wismut GmbH - Sanieren für die Zukunft. Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi).
- Bell, J. T. and Biggers, R. E. (1965) Absorption spectrum of uranyl ion in perchlorate media. I. Mathematical resolution of overlapping band structure and studies of environmental effects. *Journal of Molecular Spectroscopy* **18**:247-275.
- Bell, J. T. and Biggers, R. E. (1968) Absorption Spectrum of Uranyl Ion in Perchlorate Media. 3. Resolution of Ultraviolet Band Structure - Some Conclusions

- concerning excited State of UO_2^{2+} . *Journal of Molecular Spectroscopy* **25**:312-329.
- Bernhard, G. (2005) Speciation of uranium in environmental relevant compartments. *Landbauforschung Volkenrode* **55**:139-148.
- Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V., and Nitsche, H. (1998) Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *Journal of Alloys and Compounds*:201-205.
- Beyenal, H., Sani, R. K., Peyton, B. M., Dohnalkova, A. C., Amonette, J. E., and Lewandowski, Z. (2004) Uranium immobilization by sulfate-reducing biofilms. *Environmental Science & Technology* **38**:2067-2074.
- Billard, I., Ansoberlo, E., Apperson, K., Arpigny, S., Azenha, M. E., Birch, D., Bros, P., Burrows, H. D., Choppin, G., Couston, L., Dubois, V., Fanghanel, T., Geipel, G., Hubert, S., Kim, J. I., Kimura, T., Klenze, R., Kronenberg, A., Kumke, M., Lagarde, G., Lamarque, G., Lis, S., Madic, C., Meinrath, G., Moulin, C., Nagaishi, R., Parker, D., Plancque, G., Scherbaum, F., Simoni, E., Sinkov, S., and Viallesoubranne, C. (2003) Aqueous solutions of uranium(VI) as studied by time-resolved emission spectroscopy: A round-robin test. *Applied Spectroscopy* **57**:1027-1038.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973) New Method for Quantitative-Determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry* **54**:484-489.
- Böcker, J. (1997) *Spektroskopie*. Vogel Buchverlag.
- Brachmann, A., Geipel, G., Bernhard, G., and Nitsche, H. (2002) Study of uranyl(VI) malonate complexation by time resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta* **90**:147-153.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Brake, S. S., Dannelly, H. K., and Connors, K. A. (2001a) Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality. *Environmental Geology* **40**:458-469.
- Brake, S. S., Dannelly, H. K., Connors, K. A., and Hasiotis, S. T. (2001b) Influence of water chemistry on the distribution of an acidophilic protozoan in an acid mine drainage system at the abandoned Green Valley coal mine, Indiana, USA. *Applied Geochemistry* **16**:1641-1652.
- Brendler, V., Geipel, G., Bernhard, G., and Nitsche, H. (1996) Complexation in the system $\text{UO}_2^{2+}/\text{PO}_4^{3-}/\text{OH}^-$ (aq): Potentiometric and spectroscopic investigations at very low ionic strengths. *Radiochimica Acta* **74**:75-80.
- Brockmann, S., Arnold, T., Schweder, B., and Bernhard, G. (2010) Visualizing Acidophilic Microorganisms in Biofilm Communities Using Acid Stable Fluorescence Dyes. *Journal of Fluorescence* **20**:943 - 951.
- Canter-Lund, H. and Lund, J. (1995) *Freshwater Algae: Their Microscopic World Explored*. Biopress Ltd., Bristol.
- Carlsson, E. and Büchel, G. (2005) Screening of residual contamination at a former uranium heap leaching site, Thuringia, Germany. *Chemie Der Erde-Geochemistry* **65**:75-95.
- Casiot, C., Bruneel, O., Personne, J. C., Leblanc, M., and Elbaz-Poulichet, F. (2004) Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoules, France). *Science of the Total Environment* **320**:259-267.
- Chang, H. S., Korshin, G. V., Wang, Z. M., and Zachara, J. M. (2006) Adsorption of uranyl on gibbsite: A time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy

- study. *Environmental Science & Technology* **40**:1244-1249.
- Characklis, W. G. and Marshall, K. C. (1990) *Biofilms*. J. Wiley, New York.
- Chisholm-Brause, C. J., Berg, J. M., Matzner, R. A., and Morris, D. E. (2001) Uranium(VI) sorption complexes on montmorillonite as a function of solution chemistry. *Journal of Colloid and Interface Science* **233**:38-49.
- Choudhary, S. and Sar, P. (2011) Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. *Journal of Hazardous Materials* **186**:336-343.
- Costerton, J. W. (2007) *The Biofilm Primer*. Springer-Verlag.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987) Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* **41**:435-464.
- Costerton, J. W. and Lewandowski, Z. (1997) The Biofilm Lifestyle. *Advances in Dental Research* **11**:192-195.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappinocott, H. M. (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**:711-745.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994) Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology* **176**:2137-2142.
- Craft, E. S., Abu-Qare, A. W., Flaherty, M. M., Garofolo, M. C., Rincavage, H. L., and Abou-Donia, M. B. (2004) Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **7**:297-317.
- Czerney, P. and Hartmann, H. (1991) *Methoden der Organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., and Lewandowski, Z. (1994) Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:1131-1138.
- Doflein, F. and Reichenow, E. (1953) *Lehrbuch der Protozoenkunde*. VEB Gustav Fischer, Jena.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and related Substances. *Analytical Chemistry* **28**:350-356.
- Durakovic, A. (1999) Medical effects of internal contamination with uranium. *Croatian Medical Journal* **40**:49-66.
- Einicker-Lamas, M., Mezian, G. A., Fernandes, T. B., Silva, F. L. S., Guerra, F., Miranda, K., Attias, M., and Oliveira, M. M. (2002) *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution* **120**:779-786.
- Elzinga, E. J., Tait, C. D., Reeder, R. J., Rector, K. D., Donohoe, R. J., and Morris, D. E. (2004) Spectroscopic investigation of U(VI) sorption at the calcite-water interface. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **68**:2437-2448.
- Espana, J. S., Pamo, E. L., Santofimia, E., Aduvire, O., Reyes, J., and Baretino, D. (2005) Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): Geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Applied Geochemistry* **20**:1320-1356.
- Ewing, R. C. (1999) Radioactivity and the 20th Century. Pages 1-21 in P. C. Burns and R. Finch, editors. *Uranium: Mineralogy, Geochemistry and the Environment*. Mineralogical Society of America, Washington DC.
- Feldman, I., Jones, J., and Cross, R. (1967) Chelation of Uranyl Ions by Adenine Nucleotides. *Journal of the American Chemical Society* **89**:49-53.

- Flemming, H. C. (1994) Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, Stuttgart.
- Flemming, H. C. (2001) Biofilme-die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* **3**:169-180.
- Flemming, H. C. (2002) Extrazellulär polymeric substances (EPS): structural, ecological and technical aspects. John Wiley & Sons, New York.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2002) Was Biofilme zusammen hält. *Chemie in Unserer Zeit* **36**:30-42.
- Fowle, D. A., Fein, J. B., and Martin, A. M. (2000) Experimental study of uranyl adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environmental Science & Technology* **34**:3737-3741.
- Francis, A. J. (1998) Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes. *Journal of Alloys and Compounds* **271**:78-84.
- Frings, C. S. and Dunn, R. T. (1970) A Colorimetric Method for Determination of total Serum Lipids bases on Sulfo-Phospho-Vanillin Reaction. *American Journal of Clinical Pathology* **53**:89-91.
- Geipel, G., Brachmann, A., Brendler, V., Bernhard, G., and Nitsche, H. (1996) Uranium(VI) sulfate complexation studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta* **75**:199-204.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1988) Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology* **150**:197-202.
- Gorby, Y. A. and Lovley, D. R. (1992) Enzymatic Uranium Precipitation. *Environmental Science & Technology* **26**:205-207.
- Großmann, K. (2008) Zur Lokalisation und Bindungsform des Urans in Biofilmen. Dissertationsschrift. Technische Universität Dresden.
- Großmann, K., Arnold, T., Ikeda-Ohno, A., Steudtner, R., Geipel, G., and Bernhard, G. (2009a) Fluorescence properties of a uranyl(V)-carbonate species $[U(V)O_2(CO_3)_3]^{5-}$ at low temperature. *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **72**:449-453.
- Großmann, K., Arnold, T., Krawczyk-Barsch, E., Diessner, S., Wobus, A., Bernhard, G., and Krawietz, R. (2007) Identification of fluorescent U(V) and U(VI) microparticles in a multispecies biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence spectroscopy. *Environmental Science & Technology* **41**:6498-6504.
- Großmann, K., Arnold, T., Steudtner, R., Weiss, S., and Bernhard, G. (2009b) Visualizing different uranium oxidation states during the surface alteration of uraninite and uranium tetrachloride. *Naturwissenschaften* **96**:963-974.
- Gründig, I. (2009) Untersuchungen zur Bestimmung der EPS-Zusammensetzung in natürlichen urankontaminierten Biofilmen. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Dresden.
- Guillaumont, R., Fanghänel, T., Fuger, J., Grenthe, I., Neck, V., Palmer, D. A., and Rand, M. H. (2003) Update on the Chemical Thermodynamics of Uranium, Neptunium, Plutonium, Americium and Technetium. 978-0-444-51401-1 OECD Nuclear Energy Agency, Data Bank, Issy-les-Moulineaux (France), Elsevier.
- Günther, A., Bernhard, G., Geipel, G., Reich, T., Rossberg, A., and Nitsche, H. (2003) Uranium speciation in plants. *Radiochimica Acta* **91**:319-328.
- Günther, A., Geipel, G., and Bernhard, G. (2007) Complex formation of uranium(VI) with the amino acids L-glycine and L-cysteine: A fluorescence emission and UV-Vis absorption study. *Polyhedron* **26**:59-65.

- Günther, A., Raff, J., Geipel, G., and Bernhard, G. (2008) Spectroscopic investigations of U(VI) species sorbed by the green algae *Chlorella vulgaris*. *Biometals* **21**:333-341.
- Günther, A., Steudtner, R., Schmeide, K., and Bernhard, G. (2011) Luminescence properties of uranium(VI) citrate and uranium(VI) oxalate species and their application in the determination of complex formation constants. *Radiochimica Acta* **99**:535-541.
- Häder, D. P. and Melkonian, M. (1983) Phototaxis in the Gliding Flagellate, *Euglena-Mutabilis*. *Archives of Microbiology* **135**:25-29.
- Hamilton, W. A. (2000) Microbially Influenced Corrosion in the Context of Metal Microbe Interactions. Pages 419-434 in L. V. Evans, editor. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. harwood academic publishers.
- Hanchar, J. M. (1999) Spectroscopic Techniques Applied to Uranium in Minerals. in P. C. Burns and R. Finch, editors. *Uranium: Mineralogy, Geochemistry and the Environment*. Mineralogical Society of America, Virginia.
- Hänel, K. (1979) Systematics and Ecology of Colorless Flagellates in Sewage. *Archiv Fur Protistenkunde* **121**:73-137.
- Hargreaves, J. W. and Whitton, B. A. (1976) Effect of pH on growth of acid stream algae. *British Phycological Journal* **11**:215 - 223.
- Hein, G. (1953) Über *Euglena mutabilis* und ihr Verhalten zu sauren Medien. *Archiv für Hydrobiologie* **47**:516-525.
- Hofmann, C. and Bouck, G. B. (1976) Immunological and structural evidence for patterned intussusceptive surface growth in a unicellular organism - Postulated role for submembranous proteins and microtubules. *Journal of Cell Biology* **69**:693-715.
- Holah, J. and Gibson, H. (2000) Food Industry Biofilms. Pages 211-235 in L. V. Evans, editor. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. harwood academic publishers.
- Hoppert, M. (2003) *Microscopic Techniques in Biotechnology*. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.
- Kalin, M., Wheeler, W. N., and Meinrath, G. (2005) The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity* **78**:151-177.
- Kirishima, A., Kimura, T., Nagaishi, R., and Tochiyama, O. (2004) Luminescence properties of tetravalent uranium in aqueous solution. *Radiochimica Acta* **92**:705-710.
- Kirishima, A., Kimura, T., Tochiyama, O., and Yoshida, Z. (2003) Luminescence study of tetravalent uranium in aqueous solution. *Chemical Communications*:910-911.
- Koban, A. and Bernhard, G. (2007) Uranium(VI) complexes with phospholipid model compounds - A laser spectroscopic study. *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**:750-757.
- Kowal-Fouchard, A., Drot, R., Simoni, E., and Ehrhardt, J. J. (2004) Use of spectroscopic techniques for uranium (VI)/montmorillonite interaction modeling. *Environmental Science & Technology* **38**:1399-1407.
- Krawczyk-Bärsch, E., Großmann, K., Arnold, T., Hofmann, S., and Wobus, A. (2008) Influence of uranium (VI) on the metabolic activity of stable multispecies biofilms studied by oxygen microsensors and fluorescence microscopy. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **72**:5251-5265.
- Krawczyk-Bärsch, E., Lünsdorf, H., Arnold, T., Brendler, V., Eisbein, E., Jenk, U., and Zimmermann, U. (2011) The influence of biofilms on the migration of uranium

- in acid mine drainage (AMD) waters. *Science of the Total Environment* **409**:3059-3065.
- Kusel-Fetzmann, E. (2002) Die Euglenophytenflora des Neusiedler Sees (Burgenland, Österreich).
- Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Baltimore, Maryland, USA.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., and Caldwell, D. E. (1991) Optical Sectioning of Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology* **173**:6558-6567.
- Lawrence, J. R. and Neu, T. R. (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. Pages 131-144 *Biofilms*.
- Leander, B. S. and Farmer, M. A. (2000) Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**:469-479.
- Leedale, G. F. (1967) Euglenida/Euglenophyta. *Annual Review of Microbiology* **21**:31-48.
- Leedale, G. F., Meeuse, B. J. D., and Pringshe.Eg (1965) Structure and Physiology of *Euglena spirogyra*. I. and .2. *Archiv Fur Mikrobiologie* **50**:68-102.
- Liehr, S. K., Chen, H. J., and Lin, S. H. (1994) Metals Removal by Algal Biofilms. *Water Science and Technology* **30**:59-68.
- Linne von Berg, K.-H. and Melkonian, M. (2004) *Der Kosmos - Algenführer*. KOSMOS, Stuttgart.
- Lovley, D. R. (1993) Dissimilatory Metal Reduction. *Annual Review of Microbiology* **47**:263-290.
- Lovley, D. R. and Phillips, E. J. P. (1992) Reduction of Uranium by *Desulfovibrio-Desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:850-856.
- Lovley, D. R., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A., and Landa, E. R. (1991) Microbial Reduction of Uranium. *Nature* **350**:413-416.
- Mann, H. and Fyfe, W. S. (1985) Uranium Uptake by Algae - Experimental and Natural Environments. *Canadian Journal of Earth Sciences* **22**:1899-1903.
- Mann, H., Fyfe, W. S., and Kerrich, R. (1988) The Chemical Content of Algae and Waters - Bioconcentration. *Toxicity Assessment* **3**:1-16.
- Meierhöfer, C. (2009) Phylogenetische Analyse und In-Situ Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in Uran-kontaminierten Bodenproben. Diplomarbeit. Technische Universität Dresden.
- Meinrath, G. (1997) Uranium(VI) speciation by spectroscopy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **224**:119-126.
- Meinrath, G. (1998) Aquatic Chemistry of Uranium - A Review Focusing on Aspects of Environmental Chemistry. *On-line Geoscience* **1**.
- Merroun, M. L., Geipel, G., Nicolai, R., Heise, K. H., and Selenska-Pobell, S. (2003) Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* studied using time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *Biometals* **16**:331-339.
- Merroun, M. L., Nedelkova, M., Ojeda, J. J., Reitz, T., Fernandez, M. L., Arias, J. M., Romero-Gonzalez, M., and Selenska-Pobell, S. (2011) Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses. *Journal of Hazardous Materials* **197**:1-10.
- Moulin, C., Laszak, I., Moulin, V., and Tondre, C. (1998) Time-resolved laser-induced fluorescence as a unique tool for low-level uranium speciation. *Applied Spectroscopy* **52**:528-535.

- Mrozinska, T. (1985) Süßwasserflora von Mitteleuropa: Chlorophyta VI, Oedogoniophyceae: Oedogoniales. VEB Gustav Fischer Verlag Jena.
- Müller, K. (2009) The sorption of uranium(VI) and neptunium(V) onto surfaces of selected metal oxides and aluminosilicates studied by in situ vibrational spectroscopy. Dissertationsschrift. Technische Universität, Dresden.
- Müller, K., Foerstendorf, H., Meusel, T., Brendler, V., Lefevre, G., Comarmond, M. J., and Payne, T. E. (2012) Sorption of U(VI) at the TiO₂-water interface: An in situ vibrational spectroscopic study. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **76**:191-205.
- Nakajima, A. and Sakaguchi, T. (1986) Selective Accumulation of Heavy-Metals by Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**:59-64.
- Nakatsu, C. and Hutchinson, T. C. (1988) Extreme Metal and Acid Tolerance of *Euglena-Mutabilis* and an Associated Yeast from Smoking Hills, Northwest-Territories, and their apparent Mutualism. *Microbial Ecology* **16**:213-231.
- Natrajan, L. S. (2012) Developments in the photophysics and photochemistry of actinide ions and their coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **256**:1583-1603.
- Olaveson, M. M. and Nalewajko, C. (2000) Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia* **433**:39-56.
- Olaveson, M. M. and Stokes, P. M. (1989) Responses of the acidophilic Alga *Euglena-Mutabilis* (Euglenophyceae) to Carbon Enrichment at pH 3. *Journal of Phycology* **25**:529-539.
- Panak, P., Hard, B. C., Pietzsch, K., Kutschke, S., Roske, K., Selenska-Pobell, S., Bernhard, G., and Nitsche, H. (1998) Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U(VI). *Journal of Alloys and Compounds* **271**:262-266.
- Panak, P. J., Knopp, R., Booth, C. H., and Nitsche, H. (2002) Spectroscopic studies on the interaction of U(VI) with *Bacillus sphaericus*. *Radiochimica Acta* **90**:779-783.
- Panak, P. J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G., and Nitsche, H. (2000) Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile. *Radiochimica Acta* **88**:71-76.
- Popa, K., Cecal, A., Drochioiu, G., Pui, A., and Humelnicu, D. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* as uranium bioaccumulating material: the influence of contact time, pH and anion nature. *Nukleonika* **48**:121-125.
- Quiryneen, M., Brecx, M., and van Steenberghe, D. (2000) Biofilms in the Oral Cavity: Impact of Surface Characteristics. Pages 167-186 in L. V. Evans, editor. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. harwood academic publishers.
- Rawlings, D. E., Tributsch, H., and 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-Uk* **145**:5-13.
- Reddy, G. N. and Prasad, M. N. V. (1990) Heavy Metal-binding Proteins Peptides - Occurrence, Structure, Synthesis and Functions - A REVIEW. *Environmental and Experimental Botany* **30**:251-264.
- Reitz, T., Merroun, M. L., Rossberg, A., Steudtner, R., and Selenska-Pobell, S. (2011) Bioaccumulation of U(VI) by *Sulfolobus acidocaldarius* under moderate acidic conditions. *Radiochimica Acta* **99**:543-554.
- Rich, K. E., Agarwal, R. T., and Feldman, I. (1970) Chelation of Uranyl Ions by Adenine Nucleotides. 4. Nuclear Magnetic Resonance Investigations, Hydrogen-1 and Phosphorus-31, of Uranyl-Adenosine 5'-diphosphate and

- Uranyl-Adenosine 5'-triphosphate Systems. *Journal of the American Chemical Society* **92**:6818-6825.
- Rocchetta, I. and Kupper, H. (2009) Chromium- and copper-induced inhibition of photosynthesis in *Euglena gracilis* analysed on the single-cell level by fluorescence kinetic microscopy. *New Phytologist* **182**:405-420.
- Sachs, S., Brendler, V., and Geipel, G. (2007) Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Radiochimica Acta* **95**:103-110.
- Sauer, F. (1995) Tiere und Pflanzen im Wassertropfen nach Farbfotos erkannt.
- Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., and Nitsche, H. (1999) Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B-cereus*, *B-megaterium* and *B-sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *Fems Microbiology Ecology* **29**:59-67.
- Starmach, K. (1985) Süßwasserflora von Mitteleuropa: *Chrysophyceae* und *Haptophyceae*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Steutner, R. (2010) Zur Wechselwirkung von Uran mit den Bioliganden Citronensäure und Glucose. Dissertationsschrift. Technische Universität Dresden.
- Steutner, R., Arnold, T., Grossmann, K., Geipel, G., and Brendler, V. (2006) Luminescence spectrum of uranyl(V) in 2-propanol perchlorate solution. *Inorganic Chemistry Communications* **9**:939-941.
- Streble, H. and Krauter, D. (2006) Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers. Franckh-Kosmos-Verlags-GmbH & Co KG, Stuttgart.
- Takeda, M., Nakano, F., Nagase, T., Iohara, K., and Koizumi, J. (1998) Isolation and chemical composition of the sheath of *Sphaerotilus natans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**:1138-1143.
- TMLNU (Download am 18.05.2013) Luftbildaufnahme: Abtrag der Gessenhalde 1993. Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt (TMLNU), http://www.thueringen.de/imperia/md/images/homepagethringen/tmlnu/presse/2/luftbild_abtrag_gessenhalde_um_1993.jpg.
- Trenfield, M., Ng, J., Noller, B., Markich, S., and van Dam, R. (2012) Dissolved organic carbon reduces uranium toxicity to the unicellular eukaryote *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*:1-11.
- Valente, T. M. and Gomes, C. L. (2007) The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology* **33**:283-294.
- Visser, A. J. W. G. and Rolinski, O. J. (Download am 20.05.2013) Basic Photophysics. American Society for Photobiology, <http://www.photobiosci.info/Visser-Rolinski.html>.
- Vogel, M., Gunther, A., Rossberg, A., Li, B., Bernhard, G., and Raff, J. (2010) Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Science of the Total Environment* **409**:384-395.
- Volesky, B. and Holan, Z. R. (1995) Biosorption of Heavy-Metals. *Biotechnology Progress* **11**:235-250.
- Wall, J. D. and Krumholz, L. R. (2006) Uranium reduction. *Annual Review of Microbiology* **60**:149-166.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* **182**:2675-2679.
- Wenzel, M., Czerney, P., and Schweder, B. (2006) Verfahren zu Nachweis und

- Quantifizierung von Proteinen.
- Wingender, J., Neu, T. R., and Flemming, H. C. (1999) *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer Verlag, Berlin.
- Wismut (Download 10.05.2013) Umlagerung der Gessenhalde. Wismut GmbH, http://www.wismut.de/de/nl-ronneburg_projekte.php?id=104&back=nl-ronneburg_projekte.php%3Fyear%3D%26index%3D0.
- Wuertz, S., Spaeth, R., Hinderberger, A., Griebe, T., Flemming, H. C., and Wilderer, P. A. (2001) A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology* **43**:25-31.
- Yang, J. B. and Volesky, B. (1999) Biosorption of uranium on *Sargassum* biomass. *Water Research* **33**:3357-3363.
- Zirnstein, I. (2010) Bestimmung der mikrobiellen Diversität von Biofilmen mit Schwerpunkt des Nachweises von Eukaryonten Mikroorganismen in Uran kontaminierten Milieus. Diplomarbeit. Technical University Dresden, Dresden.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Helmholtz Zentrum Dresden-Rossendorf – Institut für Ressourcenökologie – in der Zeit von Januar 2008 bis Januar 2013 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gert Bernhard angefertigt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 23. Februar 2011 an.

Bisherige erfolgreiche Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Dresden, den 12.06.2013

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 12.06.2013

Unterschrift