

**UNTERSUCHUNGEN ZU DEN WECHSEL-
WIRKUNGEN ZWISCHEN UNTER TAGE LEBENDEN
MIKROORGANISMEN MIT URAN UND DEREN
EINFLUSS AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN
VON URAN IN GEFLUTETEN URANGRUBEN**

UND

**SPEKTROSKOPISCHE BESTIMMUNG
DER BINDUNGSFORM (SPEZIATION) TRIVALENTER
ACTINIDE/LANTHANIDE IN BIOFLUIDEN DES
MENSCHLICHEN GASTROINTESTINALTRAKTES
UND IM BLUT**

Thuro Arnold, Astrid Barkleit, Ulrike Gerber,
Evelyn Krawczyk-Bärsch, Claudia Wilke

Thuro Arnold, Astrid Barkleit, Ulrike Gerber,
Evelyn Krawczyk-Bärsch, Claudia Wilke

**UNTERSUCHUNGEN ZU DEN WECHSELWIRKUNGEN
ZWISCHEN UNTER TAGE LEBENDEN MIKRO-
ORGANISMEN MIT URAN UND DEREN EINFLUSS
AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN VON URAN
IN GEFLUTETEN URANGRUBEN**

UND

**SPEKTROSKOPISCHE BESTIMMUNG
DER BINDUNGSFORM (SPEZIATION) TRIVALENTER
ACTINIDE/LANTHANIDE IN BIOFLUIDEN
DES MENSCHLICHEN GASTROINTESTINALTRAKTES
UND IM BLUT**

HZDR

Druckausgabe: ISSN 2191-8708

Elektronische Ausgabe: ISSN 2191-8716

Die elektronische Ausgabe erscheint unter Creative Commons License (CC BY 4.0):

<https://www.hzdr.de/publications/Publ-27521>

<urn:nbn:de:bsz:d120-qucosa-334804>

2019

Herausgegeben vom

Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf

Bautzner Landstraße 400

01328 Dresden

Germany

Abschlussbericht

Verbundprojekt TransAqua: Strahlung und Umwelt III: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen

AP 3.2: Spektroskopische Bestimmung der Bindungsform (Speziation) trivalenter Actinide/Lanthanide in Biofluiden des menschlichen Gastrointestinaltraktes und im Blut (Teil B)

AP 4.3: Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen unter Tage lebenden Mikroorganismen mit Uran und deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in gefluteten Urangruben (Teil A)

Projektleiter: Dr. Thuro Arnold

Förderkennzeichen: 02NUK030F

Laufzeit: 01.06.2013 – 30.11.2017

Gesamtkosten: 596.288,00 €

Zuwendungsempfänger: Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V.

Projekträger: Karlsruher Institut für Technologie, Projekträger Karlsruhe, Wassertechnologie und Entsorgung (PTKA-WTE)

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02NUK030F gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

Abschlussbericht Teil A	3
I. Schlussbericht	3
1. Aufgabenstellung (Problem – Aufgabe – Ziel)	3
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	6
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
II. Eingehende Darstellung	8
1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen	8
2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	8
3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	8
4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	8
5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	9
6. Veröffentlichungen der Ergebnisse	9
III. Erfolgskontrollbericht	11
1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms	11
2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens	11
3. Fortschreibung des Verwertungsplanes	17
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	17
5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	17
6. Ausgaben- und Zeitplanung	17
Abschlussbericht Teil B	18
I. Schlussbericht	18
1. Aufgabenstellung	18
2. Voraussetzung zur Durchführung des Vorhabens	19
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	20
4. Stand von Wissenschaft und Technik, an den angeknüpft wurde	20
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	21
II. Eingehende Darstellung	21
1. der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse	21
2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	21
3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	22

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	22
5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	22
6. Veröffentlichung der Ergebnisse	22
III. Erfolgskontrollbericht	24
1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms.....	24
2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens.....	24
3. Fortschreibung des Verwertungsplans	28
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	28
5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer.....	29
6. Ausgaben- und Zeitplanung	29
IV. Kurzfassung (Berichtsblatt).....	29
V. Anhang	34

Dissertation

Gerber, U (2019). Investigations on indigenous microorganisms isolated from a former uranium mine on their interaction mechanisms with uranium – a possible bioremediation study. Dissertation, Fakultät der Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena. 147 Seiten.

Dissertation

Wilke, C (2018) Spektroskopische Untersuchungen zur Bindungsform dreiwertiger Lanthanide und Actinide in Biofluiden des menschlichen Verdauungssystems. Doktorarbeit, TU Dresden. 134 Seiten.

Abschlussbericht Teil A

Verbundprojekt: Strahlung und Umwelt III: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen - TransAqua

AP 4.3: Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen unter Tage lebenden Mikroorganismen mit Uran und deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in gefluteten Urangruben.

BMBF Förderkennzeichen: 02NUK030F

Projektleiter: Dr. Thuro Arnold und Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch

I. Schlussbericht

1. Aufgabenstellung (Problem – Aufgabe – Ziel)

In den Jahren 1960 und 1990 wurden im ehemaligen Uranbergwerk Königstein (Sachsen) rund 19.000 Tonnen Uran abgebaut. Bei den ersten Abbauprozessen wurde Uran mit konventionellen Abbaumethoden gewonnen. Aufgrund des abnehmenden Urangehalts im Sandstein wurde ab 1984 Uran durch in-situ-Auslaugung mit Schwefelsäure Uran gewonnen. Als Folge dieser in situ Auslaugung weist das Minenwasser hohe Uran-Konzentrationen und einen sauren pH-Wert auf, der zur Mobilisierung von Metallen, insbesondere von Uran führt. Das Migrationsverhalten von Uran in der Natur ist abhängig von seiner physikalisch-chemischen Speziation. In der Natur sind U(VI) und U(IV) am häufigsten vertreten. U(VI) bildet lösliche hochmobile Komplexe. U(IV) ist weniger löslich und fällt oft als Uraninit (UO_2) aus. Zudem beeinflusst der pH-Wert stark die Wechselwirkungs-mechanismen von Uran mit der Umwelt. Die Löslichkeit kann durch pH-abhängige Hydrolysereaktionen verändert werden und somit die Sorption an anorganischen Stoffen beeinflussen. Darüber hinaus spielt auch die Ionenstärke sowie die Art und Konzentration der anorganischen Liganden und das vorherrschende Redoxpotentials eine entscheidende Rolle für die Speziation von Uran in natürlichen Wassersystemen. Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, dass das Uran im Minenwasser der Uranmine Königstein bei saurem pH-Wert und unter oxidierenden Bedingungen hauptsächlich als gelöstes, mobiles Uran(VI), UO_2SO_4 und UO_2^{2+} vorkommt.

Seit 2001 wird der Untergrund der ehemaligen Uranmine durch kontrollierte Flutung von der Wismut GmbH saniert. Das Konzept des kontrollierten Flutungsprozesses wurde aufgrund der bestehenden Kontaminationsgefahr in den überlagerten Grundwasserleitern aufgrund des Vorhandenseins einer geologischen Störungszone entwickelt. Das Minenwasser wird gesammelt und an die Oberfläche gepumpt, wo es aufbereitet wird. Schätzungen der Wismut GmbH gehen davon aus, dass die Behandlung des Minenwassers für das nächste Jahrhundert notwendig sein wird. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass sich trotz sauren pHs und hohen Uran-Konzentrationen zahlreiche Mikroorganismen im Minenwasser sowohl unter Tage, als auch in dem an die Oberfläche gepumpten Minenwasser befinden. Diese indigenen mikrobiellen Gemeinschaften können auf vielfältige Weise mit Radionukliden wie Uran und anderen Metallen interagieren. Studien zeigten bereits, dass die Bindung von Radionukliden und Schwermetallen an die Oberfläche mikrobieller Zellen noch effizienter ist als die der umgebenden anorganischen Komponenten. Passive und aktive Prozesse, wie Biotransformation, Biomineralisation, Bioakkumulation und Komplexierung durch mikrobiell erzeugte Verbindungen, können mobilisierend und immobilisierend auf Uran und andere Metalle wirken. Einige Gruppen von Mikroorganismen sind sogar in der Lage, Uran(VI) zu reduzieren. Das hierbei reduzierte Uran fällt in Form von unlöslichen Verbindungen aus.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die im Minenwasser der Uranmine Königstein vorkommenden Mikroorganismen zu identifizieren und Organismen aus dem Minenwasser zu isolieren, um an ihnen verschiedene radiochemische und mikrobielle Untersuchungen durchzuführen. Hierbei sollte die Toleranz der Mikroorganismen gegenüber Schwermetallen, insbesondere Uran, im Vergleich zu vergleichbaren Bakterienstämmen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) hervorgehoben werden. Mit Hilfe von mikroskopischen, analytischen und spektroskopischen Methoden wurden Untersuchungen zu den Wechselwirkungsmechanismen ausgewählter, indigener Mikroorganismen mit Uran(VI) durchgeführt. Hierbei sollte sowohl die Lokalität des immobilisierten Urans in den Zellen, als auch die Bindung an den funktionellen Gruppen, die an dem Immobilisierungsprozess beteiligt sind, geklärt werden. Ziel war es somit, das Migrationsverhalten von Uran(VI) zu verstehen und die bislang noch unvollständigen Erkenntnisse zu den durch Mikroorganismen induzierten molekularen Mechanismen zu erweitern. In einer selbst entwickelten Pilotanlage sollte im Labor zudem die Reduktion von Uran(VI) durch Verwendung des Minenwassers und der vorkommenden Mikroorganismen im mesoskaligen Maßstab und unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Ein Monitoring des pHs und Redoxpotentials sowie die Probenahme über einen längeren Zeitraum

mit der anschließenden spektroskopischen Untersuchung sollte Aussagen zur Kinetik der Uran(VI)-Reduktion ermöglichen. Ziel war es hierbei, festzustellen, ob die erzielten Ergebnisse auf industrielle Anwendungen übertragbar und für mögliche Strategien zur in-situ Bioremediation des Minenwassers der Uranmine nutzbar sind.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Institut für Ressourcenökologie des HZDR weist viele Erfahrungen in der Untersuchung der Transportprozesse von Radionukliden in der Umwelt, in natürlichen Gewässern, im nahen und entfernteren Bereich ehemaliger Uranbergbau-Stätten (Bergwerke, Halden, Abräume) und in zukünftigen Lagern für radioaktive Abfälle auf. Zum Sorptionsverhalten von Radionukliden, insbesondere von Uran, auf Mineral- und Gesteinsoberflächen sind bereits zahlreiche wissenschaftliche Publikationen entstanden.

Seit einigen Jahren beschäftigt sich das Institut für Ressourcenökologie darüber hinaus mit dem Einfluss von Mikroorganismen auf das Migrationsverhalten von Radionukliden. In der Biosphäre sind vor allem Mikroorganismen an den Stoffkreisläufen der Elemente beteiligt und führen zur Mobilisierung oder Immobilisierung vieler radioaktiver Elemente. So bestimmt die Wechselwirkung von Mikroorganismen das Migrationsverhalten von Radionuklide in der Natur und letztlich wie sehr die Radionuklide eine Bedrohung für die menschliche Gesundheit darstellen.

Das Institut verfügt über eine sehr gute Infrastruktur in radiochemischen und biologischen (Gentechnik S1) Laboren innerhalb von Kontrollbereichen mit einem umfassenden Methodenspektrum zur Aufklärung der Speziation von Radionukliden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde in der Zeit vom 01.06.2013 bis zum 30.11.2017 durchgeführt. Frau Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch arbeitete von 01.08.2013 bis zum 31.07.2016 als Post-Doc mit einer 50%-igen Finanzierung im Projekt (Teil A). Frau Ulrike Gerber war als Doktorandin vom 01.11.2013 bis zum 31.10.2016 im Rahmen des Projektes (Teil A) eingestellt. In dieser Zeit fanden die Laborarbeiten, die Erstellung von Manuskripten und Einreichung in wissenschaftlichen Zeitschriften, die Vorstellung der Ergebnisse bei internationalen Kongressen und die Anfertigung der Doktorarbeit statt. Die Doktorarbeit wird voraussichtlich in den nächsten Monaten beim Fakultätsrat der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingereicht.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Institut für Ressourcenökologie verfügt seit einigen Jahren über Erfahrungen zur Wechselwirkung von Radionukliden und Lanthaniden auf molekularer Ebene vor allem mit Mikroorganismen. In einigen geförderten Projekten u.a. des BMBF und in EU-Projekten hat das HZDR bereits gemeinsam mit nationalen und internationalen Partnern interdisziplinär zusammengearbeitet und hierbei die mikrobiellen Einflüsse auf die Migration von Radionukliden aus sauren bergbaubeeinflussten Substraten untersucht. Die Ergebnisse wurden in internationalen Fachzeitschriften publiziert. Die gewonnenen Ergebnisse dienen der Entwicklung und Einschätzung von Sanierungsmethoden.

- Arnold, T.; Baumann, N.; Krawczyk-Bärsch, E.; Brockmann, S.; Zimmermann, U.; Jenk, U.; Stephan, W. (2011). Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 2200–2212.
- Krawczyk-Bärsch, E.; Lünsdorf, H.; Arnold, T.; Brendler, V.; Eisbein, E.; Jenk, U.; Zimmermann, U. (2011). The influence of biofilms on the migration of uranium in acid mine drainage (AMD) waters. *Sci. Total Environ.* 409: 3059-3065.
- Zirnstein, I.; Arnold, T.; Krawczyk-Bärsch, E.; Jenk, U.; Bernhard, G.; Röske, I. (2012). Eukaryotic life in Biofilms formed in a Uranium Mine. *MicrobiologyOpen* 1(2), 83-94.
- Baumann, N.; Arnold, T.; Haferburg, G. (2014). Uranium contents in plants and mushrooms grown on a uranium contaminated site near Ronneburg in Eastern Thuringia/Germany. *Envir. Sci. Poll. Res.* 21, 6921-6929.
- Brockmann, S.; Arnold, T.; Bernhard, B. (2014). Speciation of bioaccumulated uranium(VI) by *Euglena mutabilis* cells obtained by laser fluorescence spectroscopy. *Radiochimica Acta* 102(5), 441-422.
- Lederer, F. L.; Günther, T. J.; Raff, J.; Flemming, K.; Pollmann, K. (2014). Microbial ecology: Characteristics of bacteria from heavy metal contaminated mining waste piles
Eigenschaften von Bakterien aus Schwermetall-kontaminierten Halden: Mikrobielle Ökologie. *Biospektrum* 20(2), 172-175.

Des Weiteren führt das Institut für Ressourcenökologie Untersuchungen zur Abschätzung der Langzeitsicherheit von in geologischen Formationen endgelagertem nuklearem Abfall mit Hinblick auf den Einfluss biologischer Systeme durch. Dies dient der Aufklärung des Verhaltens von Radionukliden in der Umwelt und der besseren Beurteilung der die (Radio-) Toxizität der Schwermetalle bestimmenden Parameter in biologischen Systemen. In diesem Zusammenhang finden sich weitere Publikationen unter:

- Krawczyk-Bärsch, E.; Lünsdorf, H.; Arnold, T.; Bok, F.; Steudtner, R.; Pedersen, K.; Lehtinen, A.; Brendler, V. (2012). Immobilization of uranium in biofilm microorganisms exposed to groundwater seeps over granitic rock tunnel walls in Olkiluoto, Finland. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 96(2012), 94-104.
- Lütke, L.; Moll, H.; Bachvarova, V.; Selenska-Pobell, S.; Bernhard, G. (2013). The U(VI) Speciation Influenced by a Novel Paenibacillus Isolate from Mont Terri Opalinus Clay. *Dalton Transactions* 42, 6979-6988.
- Moll, H.; Lütke, L.; Geissler, A.; Selenska-Pobell, S.; Bernhard, G.; Bachvarova, V. (2014). Interactions of the Mont Terri Opalinus Clay isolate *Sporomusa* sp. MT-2.99 with curium(III) and europium(III). *Geomicrobiology Journal* 31, 682-696.
- Krawczyk-Bärsch E, Lütke L, Moll H, Bok F, Steudtner R, Rossberg A. (2015). A spectroscopic study on U(VI) biomineralization in cultivated *Pseudomonas fluorescens* biofilms isolated from granitic aquifers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 4555-4565.
- Lopez-Fernandez, M.; Cherkouk, A.; Vílchez-Vargas, R.; Sandoval, R.; Pieper, D.; Boon, N.; Sánchez-Castro, I.; Merroun, M. (2015). Bacterial diversity in bentonites, engineered barrier for deep geological disposal of radioactive wastes. *Microbial Ecology* 70(4), 922-935.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden zum einen Mikroorganismen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sowie von der Abteilung Umweltmikrobiologie des Helmholtz Zentrums für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig verwendet. Zum anderen wurden Wasserproben aus der ehemaligen Mine des Uranerzbergbau-Betriebs Königstein in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Wismut GmbH über Tage entnommen und für Untersuchungen im Labor in kleinem (1 L), als auch in mesoskaligem (100 L) Maßstab zur Verfügung gestellt. Untersuchungen mit Hilfe der Durchflussszytometrie und Transmissions-Elektronen-Mikroskopie fanden in enger Zusammenarbeit mit dem Department of Microbiology, University of Granada, statt. Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in der Abteilung Vakzinologie und angewandte Mikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig und am Institut für Ionenstrahlforschung des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

Die Zuwendung (Personal-, Material-, Reisekosten) wurde vollumfänglich für die Durchführung der Projekte verwendet. Die noch einzureichende Dissertationsschrift von Frau Ulrike Gerber befindet sich im Anhang des vorliegenden Abschlussberichtes.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Frau Ulrike Gerber wurde vom 01.11.2013 bis zum 31.10.2016, also 36 Monate, mit einer 50%-igen Stelle auf das Projekt (Teil A) angestellt. Frau Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch wurde vom 01.08.2013 bis zum 31.07.2016, also 36 Monate, als Post-Doc mit einer 50%-igen Finanzierung von den Mitteln des Projektes (Teil A) bezahlt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Bei der Ausbreitung von Radionukliden in Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern wurde der mögliche Einfluss von Mikroorganismen auf das Migrationsverhalten der Radionuklide nur unzureichend betrachtet. Durch die vorliegende Arbeit sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis des mikrobiell beeinflussten Transportes von Radionukliden in der Umwelt und deren Gefährdung geleistet und Alternativen zur herkömmlichen Aufreinigung des Minenwassers gezeigt werden.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Frau Gerber hat sich während ihrer Doktorarbeit auf dem Gebiet der Radiochemie und Strahlenforschung weiter qualifiziert und wird durch die baldige Einreichung ihrer Doktorarbeit zum Kompetenzerhalt beitragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits, bzw. werden noch durch nachfolgende Publikationen öffentlich gemacht. Im nachfolgenden Erfolgsbericht werden diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Des Weiteren tragen die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis des Einflusses der Mikrobiologie in Uran kontaminierten Sites bei und führen zur Wissenserweiterung in der Strahlenforschung, in der Industrie und in Behörden.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In den letzten Jahren wurde keine relevante Literatur zum konkreten Forschungsthema veröffentlicht.

6. Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits, bzw. werden noch in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht. Des Weiteren wurden die Ergebnisse bei internationalen Kongressen vorgestellt und diskutiert. Die Doktorarbeit von Frau Gerber befindet sich kurz vor der Einreichung.

Publikationen

Durch die finanzielle Zuwendung konnten die Ergebnisse in den folgenden internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht werden. Des Weiteren wird hier die am 07.01.2019 an der Friedrich-Schiller-Universität Jena verteidigte Doktorarbeit von Frau Gerber genannt:

Gerber, U.; Zirnstein, I.; Krawczyk-Bärsch, E.; Lünsdorf, H.; Arnold, T.; Merroun, M. L. (2016). Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI). *Journal of Hazardous Materials* 317, 127-134.

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.062

Abstract: The former uranium mine Königstein (Saxony, Germany) is currently in the process of remediation by means of controlled underground flooding. Nevertheless, the flooding water has to be cleaned up by a conventional wastewater treatment plant. In this study, the uranium(VI) removal and tolerance mechanisms of the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* were investigated by a multidisciplinary approach combining wet chemistry, flow cytometry, and microscopy. The kinetics of uranium removal and the corresponding mechanisms were investigated. The results showed a biphasic process of uranium removal characterized by a first phase where 95 % of uranium was removed within the first 8 hours followed by a second phase that reached equilibrium after 24 hours. The bacterial cells displayed a total uranium removal capacity of 130 mg U/g dry biomass. The removal of uranium was also temperature-dependent, indicating that metabolic activity heavily influenced bacterial interactions with uranium. TEM analyses showed biosorption on the cell surface and intracellular accumulation of uranium. Uranium tolerance tests showed that *A. facilis* was able to withstand concentrations up to 0.1 mM. This work demonstrates that *A. facilis* is a suitable candidate for in situ bioremediation of flooding water in Königstein as well as for other contaminated waste waters.

Krawczyk-Bärsch, E.; Gerber, U.; Müller, K.; Moll, H.; Rossberg, A.; Steudtner, R.; Merroun, M. (2017). Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* for bioremediation purposes. *Journal of Hazardous Materials* 347, 233-241.

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.12.030

Abstract: The contamination of the environment by U may affect plant life and consequently may have an impact on animal and human health. The present work describes U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* using a multidisciplinary approach combining wet chemistry, transmission electron microscopy, and spectroscopy methods (e.g. cryo-time resolved laser-induced fluorescence spectroscopy, extended X-ray absorption fine structure spectroscopy, and in-situ attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy). This bacterial strain is widely distributed in nature including U-contaminated sites. In kinetic batch experiments cells of *A. facilis* were contacted for 5 minutes to 48 hours with 0.1 mM U(VI). The results show that the local coordination of U species associated with the cells depends upon time contact. U is bound mainly to phosphate groups of lipopolysaccharide (LPS) at the outer membrane within the first hour. And, that both, phosphoryl and carboxyl functionality groups of LPS and peptidoglycan of *A. facilis* cells may effectuate the removal of high U amounts from solution at 24-48 hours of incubation. It is clearly demonstrated that *A. facilis* may play an important role in predicting the transport behaviour of U in the environment and that the results will contribute to the improvement of bioremediation methods of U-contaminated sites.

Gerber, U.; Hübner, R.; Rossberg, A.; Krawczyk-Bärsch, E.; Merroun, M. L. (2018) Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine. *PLOS ONE* 13(8): e0201903.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201903>

Abstract: Remediation of former uranium mining sites represents one of the biggest challenges worldwide that have to be solved in this century. The former uranium mine Königstein (Germany) displays one of these sites and is currently remediated by controlled flooding of the underground. The flooding water is cleaned up by a conventional chemical waste water treatment plant. During the last years, the search of alternative strategies involving environmentally sustainable treatments has started. Bioremediation, the use of microorganisms to clean up polluted sites in the environment, is considered one of the best alternative. By means of culture-dependent methods, we isolated an indigenous yeast strain, KS5 (*Rhodospiridium toruloides*), directly from the flooding water and investigated its interactions with uranium(VI). Our results highlight distinct adaptive mechanisms towards high uranium concentrations on the one hand, and complex interaction mechanisms on the other. The cells of the strain KS5 exhibit high uranium tolerance being able to grow up to 5 mM, and also high ability to accumulate this radionuclide (350 mg uranium/g dry biomass in 48 hours). The removal of uranium by KS5 displays a temperature- and cell viability-dependent process. By STEM investigations we observed that uranium was removed by two mechanisms, inactive biosorption and active bioaccumulation. EXAFS analysis revealed that the molecular speciation of uranium associated with the cells is similar to that of meta-autunite-like minerals. The present study highlights the potential of KS5 as a representative of indigenous species which might play a key role in bioremediation of uranium-contaminated sites.

Dissertation

Gerber, U. Investigations on indigenous microorganisms isolated from a former uranium mine on their interaction mechanisms with uranium – a possible bioremediation study. Dissertation, Fakultät der Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena (2019).

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Das abgeschlossene Forschungsvorhaben erfolgte im Rahmen des Förderprogramms des BMBF als Teil des KVSF (Kompetenzverbund Strahlenforschung). Durch den gezielten Einsatz junger Wissenschaftlerinnen (1 Doktorandin, 1 Post-Doktorandin) wurde ein entscheidender Beitrag zum Kompetenzerhalt geleistet. Die Ergebnisse des Teilprojektes haben wesentlich zu einem verbesserten Verständnis der Ausbreitung von Radionukliden im menschlichen Verdauungstrakt beigetragen.

Die beschriebenen Arbeiten und Untersuchungen sind Teil des Kompetenzerhalts auf radioökologischem Gebiet in Lehre und Forschung.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden zum einen Mikroorganismen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sowie von der Abteilung Umweltmikrobiologie des Helmholtz Zentrums für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig verwendet. Zum anderen wurden Wasserproben aus der ehemaligen Mine des Uranerzbergbau-Betriebs Königstein in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Wismut GmbH über Tage entnommen und für Untersuchungen im Labor in kleinem (1 L), als auch in mesoskaligem (100 L) Maßstab zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass alle untersuchten Mikroorganismen unterschiedliche Mechanismen zur Interaktion mit Uran(VI) aufweisen. Daraus folgt, dass die Fähigkeit, mit Uran(VI) zu interagieren und seine Mobilität innerhalb der umgebenden Lösungen zu verringern, vom einzelnen Organismus abhängt. Darüber hinaus wurde deutlich gezeigt, dass Mikroorganismen, die aus dem Minenwasser der Uranmine Königstein isoliert wurden, das Migrationsverhalten von Uran(VI) enorm beeinflussen.

Im Einzelnen können folgende Ergebnisse dargestellt werden:

Der untersuchte Stamm *Acidovorax facilis* stellt ein weltweit verbreitetes Bodenbakterium dar. Frühere Studien konnten zeigen, dass diese Art einen Großteil der metabolisch aktiven Mikroorganismen im Flutwasser des ehemaligen Uranabbaugebietes Königstein darstellt. Aufgrund seiner Fähigkeit, unter sauren Bedingungen (pH 2,9) und bei hohen Urankonzentrationen (8-13 mg/L) zu wachsen, wurde dieser Stamm auf seine Fähigkeit untersucht, Uran aus den umgebenden Lösungen zu entfernen. Die Ergebnisse der Batch-Sorptionsversuche zeigten, dass die Bakterienzellen in der Lage waren, 130 mg U/g Bio-trockenmasse aus der Lösung zu entfernen, was einer Sorption von fast 100% entspricht. In weiteren Experimenten wurde die Toleranz von *A. facilis* in Gegenwart von Uran untersucht. Interessanterweise wurde der Bakterienstamm zwar nicht direkt aus dem Flutwasser der ehemaligen Uranmine isoliert und somit waren die Bakterienzellen von Natur aus keinen hohen Urankonzentrationen ausgesetzt, doch weist der Stamm eine hohe Toleranz gegenüber diesem Radionuklid auf. Gegenüber der zur Zeit der Untersuchung vorliegenden Urankonzentration von 8 mg/L im Minenwasser ist der Bakterienstamm in der Lage, eine fast dreifach höhere Konzentration zu tolerieren und damit den toxischen Bedingungen am ehemaligen Uranabbauort Königstein standzuhalten. Um die Uranverträglichkeit der Bakterienzellen genauer zu untersuchen, wurden die Zellebensfähigkeit und die metabolische Aktivität von *A. facilis* in Gegenwart von Uran mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im Gegensatz zum Toleranztest an festem Medium zeigten diese Untersuchungen, dass eine Konzentration von 0,05 mM die Aktivität und Lebensfähigkeit der Zellen um fast 50% reduzierte. Außerdem waren bei der höchsten getesteten Konzentration von 0,1 mM Uran 86,3% der Gesamtzellen nicht lebensfähig und nur 6% der Zellen waren aktiv. So konnten die Zellen in flüssigem Medium nur die Hälfte der Urankonzentration tolerieren, die auf festem Medium getestet wurde. Mit beiden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Toleranz von Metallen von verschiedenen Faktoren abhängt, wie z.B. Bioverfügbarkeit, Diffusion und Komplexierung von Uran in Lösung. Mit Hilfe des Transmissions-Elektronenmikroskopes (TEM) war es möglich, die Lokalisation des Urans in den Bakterienzellen zu untersuchen. Demnach wurde Uran von *A. facilis* sowohl im Zytoplasma, als auch auf der äußeren Zellmembran sorbiert, so dass von einer aktiven Bioakkumulation und passiven Biosorption als Mechanismen der Uranentfernung aus der Lösung gesprochen werden kann. Darüber hinaus wurde Uran in der Zelle in Verbindung mit Polyphosphatgranulaten lokalisiert, die häufig im Zytoplasma von Bakterien als Speicherorte für Phosphorverbindungen existieren. Durch zeitaufgelöste Laserfluoreszenz spektroskopische Untersuchungen (TRLFS) war es zudem möglich, Strukturinformationen der

gebildeten Uranspezies zu erhalten. Innerhalb der ersten Stunden ist Uran hauptsächlich an die äußere Membran der Bakterienzellen gebunden und somit mit Lipopolysacchariden assoziiert. Innerhalb der folgenden Stunden der Inkubationszeit wird das Uran zusätzlich an Carboxylgruppen, wie Peptidoglykan, gebunden. Die Immobilisierung von Uran durch *A. facilis* stellt somit einen komplexen zeitabhängigen Prozess dar. Um Informationen über den vorherrschenden Oxidationszustand zu erhalten, wurde die XANES-Region der erhaltenen Röntgenabsorptionsspektren nach Uraninteraktionsexperimenten, die sowohl unter aeroben, als auch anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden, analysiert. Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass das immobilisierte Uran noch als Uran(VI) vorliegt und nicht zu Uran(IV) reduziert wurde. Die erzielten Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis der Wechselwirkungsmechanismen von *A. facilis* mit Uran bei. Die Fähigkeit von *A. facilis*, Uran schnell und effizient zu immobilisieren, kann nun dazu beitragen, dass dieser Bakterienstamm für in-situ Bio-Remediationsansätze verwendet werden könnte.

Der aus dem Minenwasser der Uranmine Königstein isolierte Stamm KS5, identifiziert als *Rhodospiridium toruloides*, wurde aufgrund seiner Fähigkeit, bei hoher Urankonzentration zu wachsen, für die Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Uran ausgewählt. Um die physiologischen Eigenschaften dieses Basidiomyceten im Detail zu untersuchen, wurde die Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen getestet. Darüber hinaus wurde ein Referenzstamm (DSM 10134 *R. toruloides*) untersucht, um besondere Fähigkeiten aufgrund der Umgebungsbedingungen im Flutwasser zu identifizieren. In Übereinstimmung mit früheren Studien konnten sowohl der isolierte Stamm KS5 als auch der Referenzstamm DSM 10134 die meisten der getesteten Kohlenstoffquellen nutzen. Beide Stämme zeigten jedoch ein geringeres Wachstum in Gegenwart von Galaktose. Die Xylose betreffend, zeigte KS5 ein geringes Wachstum, während DSM 10134 den Holzzucker nicht verwerten konnte. Eine Erklärung könnten die Überreste des ehemaligen Uranabbaus sein. Zur Untermuerung der Schächte wurden Holzbalken verwendet, die trotz der anhaltenden Überschwemmungen zurückgelassen wurden. Als Folge des niedrigen TOC im Flutwasser müssen Mikroorganismen Anpassungsmechanismen in Form der Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen entwickeln. So hat KS5 möglicherweise Anpassungsmechanismen entwickelt, um unter den gegenwärtigen Umweltbedingungen zu überleben, indem Xylose als alternative Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Neben den physiologischen Untersuchungen mit dem isolierten Stamm KS5 wurde seine Verträglichkeit und sein Wachstum in Gegenwart von Uran mit Hilfe der Durchflusszytometrie getestet. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der isolierte Stamm KS5 hohe Urankonzentrationen verträgt und zudem in Gegenwart von Uran wachsen kann. Der

Toleranztest an festen Agarplatten zeigte, dass KS5 im Vergleich zur vorherrschenden Urankonzentration im Minenwasser von 8 mg/L in der Lage ist, eine 175-fach höhere Urankonzentration zu tolerieren. Der Stamm KS5 zeigte zudem eine hohe Toleranz gegenüber Chrom und deutet auf eine Anpassungsfähigkeit der untersuchten Hefezelle an hohe Konzentrationen von Schwermetallen und Radionukliden hin. Schlussfolgernd konnte mit diesen ersten Ergebnissen gezeigt werden, dass KS5 ein nützlicher Mikroorganismus ist, der in vielen biotechnologischen Anwendungen zur Altlastensanierung und Bioreinigung genutzt werden kann. Um die Eignung von KS5 für eine mögliche Bioremediation von urankontaminierten Standorten zu untersuchen, wurden Sorptionsuntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Uransorption von 350 mg U/g Trockenbiomasse, die im Vergleich zu anderen Pilzstämmen sehr hoch ist. Weiterführende Untersuchungen mit TEM und Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) zeigten, dass das Uran vor allem in Form einer Bioakkumulation im Zytoplasma und an der inneren Zytoplasmamembran gebunden wurde. Darüber hinaus konnte Uran in Lipidgranulaten nachgewiesen werden. Diese Anlagerung von Uran in Lipidgranulaten von *R. toruloides* führte dazu, dass das Uran für die Zellen weniger verfügbar war. Seine Toxizität wurde dadurch minimiert. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten einen aktiven Aufnahmemechanismus von Uran im Zytoplasma der Hefezellen nachweisen. Zudem konnte durch Temperatur abhängige Experimente nachgewiesen werden, dass aktive Mechanismen bei der Aufnahme von Uran beteiligt sind und die Uranaufnahme durch die Zellen vom Stoffwechsel abhängt. Zur Untersuchung der Speziation des immobilisierten Urans auf molekularer Ebene wurde eine EXAFS-Analyse durchgeführt. Das resultierende Spektrum weist auf die Bildung von mineralähnlichen Strukturen, möglicherweise Meta-Autunit, hin. Die Bildung von Meta-Autunit-Mineralien durch Mikroorganismen ist ein wirksamer Entgiftungsmechanismus gegen Uran. Die Bildung von unlöslichen Biomineralen könnte eine vielversprechende Technik für in-situ-Bioremediationsansätze sein, insbesondere an Standorten, an denen eine Bioreduktion aufgrund des möglichen Risikos einer Reoxidation nicht möglich ist. Der Stamm KS5 ist somit ein idealer Kandidat für weitere Untersuchungen im industriellen Maßstab, da er hohe Urankonzentrationen innerhalb kurzer Zeit sorbiert und unlösliche Uranmineralien bildet.

Die Untersuchungen an anaeroben Mikroorganismen im Flutwasser der ehemaligen Uranmine Königstein konnten zeigen, dass sie Uran(VI) effizient zu Uran(IV) reduzieren können. Trotz der vorherrschenden oxidierenden Bedingungen konnten die erzielten Ergebnisse zeigen, dass anaerobe Mikroorganismen im Flutwasser überleben und sogar metabolisch aktiv sind. Durch die Zugabe von 10 mM Glycerin als Energiequelle wurde die mikrobielle Reduktion im

Minenwasser angeregt, das zuvor mit Stickstoff gespült wurde, um verbleibenden Sauerstoff zu eliminieren. Anschließend wurden die Flutwasserproben sechs Wochen lang bei 30°C inkubiert. Durch regelmäßige Messungen konnte eine Abnahme des Redoxpotentials von anfänglich 670 mV auf 230 mV festgestellt werden. Theoretische Berechnungen der vorherrschenden Uranspeziation zeigen eine Veränderung des Redoxzustandes von Uran(VI) zu Uran(IV). Um die ersten Ergebnisse zu verifizieren, wurden weitere Methoden wie XANES und UV-Vis-Messungen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den geochemischen Berechnungen wurde eine mikrobiell induzierte Reduktion von Uran(VI) nachgewiesen. Die XANES-Spektroskopie wurde zur Bestimmung des Oxidationszustandes von Uran eingesetzt. Nach sechs Wochen konnte nur noch Uran(IV) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und die der Kontrollproben ohne Mikroorganismen und Glycerin machten deutlich, dass die Zugabe von 10 mM Glycerin in Kombination mit anaeroben Bedingungen im Minaswasser zu einer vollständigen Reduktion von Uran(VI) führte, die durch aktive Mikroorganismen induziert wurde. Neben der Bestimmung der Oxidationsstufe von Uran wurden auch Eisen und Sulfat untersucht. Während der sechswöchigen Inkubationszeit konnten verschiedene anaerobe biogeochemische Prozesse nachgewiesen werden. Entsprechend der Veränderung des Redoxpotentials während sechs Wochen Inkubationszeit wurden neben einer Uranreduktion auch Eisen und Sulfat reduziert. Durch die Messung der Fe(II)-Konzentration während sechs Wochen Inkubationszeit konnte ein leichter Anstieg festgestellt werden, so dass Fe(III) im Flutwasser mikrobiell reduziert wurde. Die kinetischen Untersuchungen ergaben, dass die Fe(III)-Reduktion innerhalb der ersten drei Wochen stattfand. In den ersten Wochen und bei relativ hohen Redoxpotenzialen ist die mikrobiell induzierte Fe(III)-Reduktion der dominierende Prozess. Danach, und durch eine drastische Verringerung des Redoxpotentials, ist die dominierende Redoxreaktion die mikrobiell induzierte Reduktion von Uran(VI). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fe(II)- und Uran(VI)-Reduktion konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Sulfatkonzentration festgestellt werden. Entsprechend dem Standard-Redoxpotential ist eine mikrobielle Sulfatreduktion bei 230 mV eher unwahrscheinlich. Um die zugrundeliegenden Prozesse im Detail zu verstehen, wurde die DNA aus sechs Wochen lang inkubierten Proben isoliert und hinsichtlich der phylogenetischen Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften analysiert. Die Ergebnisse zeigen deutlich die Dominanz des IRB, die auch die anfängliche Fe(III)-Reduktion gefolgt von der Reduktion von Uran(VI) erklären. Durch die 16S rRNA Genanalyse wurden mehr als 40% der Bakterien als IRB identifiziert. In geringen Mengen (< 1%) wurden auch IOBs der Gattung *Acidithiobacillus* identifiziert, die in früheren Studien im Minaswasser gefunden wurden.

Schlussfolgernd zeigen sowohl die geochemische als auch die molekularbiologischen Ergebnisse, dass die indigenen Mikroorganismen im Minenwasser der ehemaligen Uranmine Königstein die Fähigkeit besitzen, Glycerin als Elektronendonator und Uran(VI) als Elektronenakzeptor zu nutzen. Der Zusatz von Glycerin stimuliert die mikrobielle Reduktion von Uran(VI) direkt, indem es als Elektronendonator sowohl für die Fe(III)-Reduktion als auch für die Reduktion von Uran(VI) dient. Die mikrobiell induzierte Reduktion von Uran(VI) ist möglicherweise das Ergebnis der metabolischen Aktivität des IRB.

Basierend auf der erfolgreichen Stimulation der mikrobiellen Reduktion von Uran(VI) im Labormaßstab wurde eine Pilotanlage für industrielle Anwendungen im Labor konzipiert. Dazu wurden 100 L Flutwasser verwendet. Ähnlich wie bei den Experimenten im Labormaßstab wurden die Proben auf eine mögliche Reduktion von Uran(VI) untersucht. Ein Online-Messsystem wurde eingesetzt, um in Echtzeit Informationen über pH-Wert, Redoxpotential und Temperatur zu erhalten. Während einer Inkubationszeit von sechs Wochen konnte eine deutliche Abnahme des Redoxpotentials festgestellt werden. Zusätzlich wurden UV-Vis-Messungen durchgeführt, um detaillierte Informationen über den Oxidationszustand des im Flutwasser vorhandenen Urans zu erhalten. Weiterhin wurde, ähnlich wie bei den Laborversuchen, die Fe(II)- und Sulfatkonzentration untersucht. Innerhalb der ersten 3 Wochen konnte ein leichter, aber signifikanter Anstieg von Fe(II) festgestellt werden.

Die Untersuchungen liefern neue Erkenntnisse zur Wechselwirkung von indigenen Mikroorganismen mit Uran(VI) von urankontaminierten Bereichen. Es wurde gezeigt, dass das Transportverhalten von Uran in der Umwelt und an den ehemaligen Uranabbaustätten stark von der Anwesenheit und Aktivität natürlich vorkommender Mikroorganismen abhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Stämme *A. facilis* und *R. toruloides* durch passive Biosorption und aktive Bioakkumulation hohe Urankonzentrationen aus den umgebenden Lösungen entfernen können. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen Mikroorganismen, die aus schwermetallbelasteten Standorten isoliert wurden, und ihrer Fähigkeit, hohe Schwermetallkonzentrationen zu tolerieren, aufgezeigt. Hervorzuheben sind die Ergebnisse aus Versuchen mit anaeroben Mikroorganismen und deren Potenzial zur Reduktion von Uran(VI), die für die Entwicklung einer Pilotanlage genutzt wurden. Die Ergebnisse aus den Experimenten im Labormaßstab konnten durch Experimente in größerem Maßstab übertragen und gleichzeitig bestätigt werden.

3. Fortschreibung des Verwertungsplanes

Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage zur Entwicklung von zukünftigen industriell nutzbaren Sanierungsstrategien von ehemaligen Uranabbaustätten oder -halden mit Hilfe von Mikroorganismen. Die Ergebnisse liefern zudem die Grundlage für eine nachfolgende Verbundprojektskizze, in der der Einfluss von Mikroorganismen in einer ehemaligen Abraumhalde aus der Aufbereitung von Uranerzen und der Transport von Radionukliden untersucht werden soll.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Alle geplanten Arbeiten wurden durchgeführt und erfolgreich zum Ende gebracht.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen des Projektes (Teil A) wurden bei Workshops und internationalen Konferenzen vorgestellt und in internationalen Fachzeitschriften bereits veröffentlicht oder werden in naher Zukunft noch veröffentlicht, um sie einem breiten Interessenten- und Anwenderkreis zugänglich zu machen.

6. Ausgaben- und Zeitplanung

Das Projekt wurde gemäß dem Arbeitsplan durchgeführt.

Abschlussbericht Teil B

Verbundprojekt: Strahlung und Umwelt III: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen – TransAqua

AP 3.2: Spektroskopische Bestimmung der Bindungsform (Speziation) trivalenter Actinide/Lanthanide in Biofluiden des menschlichen Gastrointestinaltraktes und im Blut

BMBF Förderkennzeichen: 02NUK030F

Projektleiter: Dr. Astrid Barkleit

I. Schlussbericht

1. Aufgabenstellung

Radionuklide stellen im Falle ihrer Inkorporation eine ernste Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. Das molekulare Verständnis der Prozesse ihrer Metabolisierung im Gastrointestinaltrakt und im Blut ist eine wichtige Grundlage zur verbesserten Abschätzung der internen Dosis und die Voraussetzung für eine effektive Dekontamination nach einer Inkorporation.

In diesem Teilprojekt soll die Metabolisierung von Cer(III) bzw. Europium(III) als Beispiele für dreiwertige Lanthanide und von Curium(III) als Beispiel für dreiwertige Actinide (An(III)) in-vitro spektroskopisch untersucht werden. Aufbauend auf erfolgreiche in-vitro-Untersuchungen unseres Institutes zur Speziation von Eu(III) und Cm(III) in menschlichem Urin sollen diese Studien die bisherigen Erkenntnisse verifizieren bzw. erweitern. Dazu sollen in diesem Projekt die Metabolisierung von Ln(III) und Cm(III) in-vitro in synthetischen Modellfluiden des Gastrointestinaltraktes (Speichel, Magen-, Gallen-, Darmsaft) sowie die Speziation von Ln(III) im Blut erstmalig spektroskopisch bestimmt werden. Der Vergleich von Ln(III) und An(III) soll zeigen, ob sich die Elemente chemisch analog verhalten und damit Rückschlüsse von inaktiven Ln(III) auf radioaktive und damit schwieriger zu handhabende An(III) zulässig sind.

2. Voraussetzung zur Durchführung des Vorhabens

Die Ziele des Verbundvorhabens beziehen sich direkt auf die in der Bekanntmachung vom 22. Juli 2011 des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) genannten grundlegenden Forschungsarbeiten in der Strahlenforschung. Im Kapitel 1.1 wird der 2007 gegründete Kompetenzverbund Strahlenforschung (KVSF) als erfolgreiches und engagiertes Vorhaben zur Stärkung der wissenschaftlichen Kompetenz hervorgehoben. Die hier zur Förderung beantragten Arbeitspakete finden sich vollumfänglich in den unter Kapitel 2.4 ausgeschriebenen Förderschwerpunkten der Disziplinen Strahlenbiologie (hier: Wirkung der Strahlung auf den Menschen) und Radioökologie (hier: Verteilung und Wirkung radioaktiver Stoffe in der Natur und der Übergang auf den Menschen) wieder. Sie tragen zur Verbesserung der Kenntnisse zur Bestimmung der Strahlenexposition des Menschen über aquatische Ökosysteme bei. Ihr Gegenstand ist die Untersuchung des Eintrages, Transportes und der möglichen Wechselwirkungen radioaktiver Stoffe in aquatischen Ökosystemen bis hin zu deren biokinetischem Verhalten im Menschen. Alle in der Bekanntmachung unter Punkt 2.4 gewünschten Aspekte zur Strahlenforschung sind mit dem Schwerpunkt auf der Charakterisierung der Strahlenexposition in den Zielstellungen der einzelnen Arbeitspakete vertreten, in dem das Ausmaß einer Strahlenexposition mit Hilfe radioökologischer und dosimetrischer Studien abgeschätzt werden soll. Durch die schwerpunktmäßige Ausbildung von Doktorand(inn)en und Nachwuchswissenschaftler(inne)n in den Arbeitspaketen sowie in einem eigens dafür beantragten Teilprojekt kommt das Vorhaben zudem dem Auftrag der wissenschaftlichen Nachwuchsförderung nach. Dazu wurden Forschungszentren und Hochschulen eng kooperieren.

Das Vorhaben „TransAqua“ sollte in vernetzten Einzelprojekten offene Fragen der Radioökologie in Bezug auf die Ressource Wasser bearbeiten, um das Wissen in der Strahlenforschung auszubauen und die Kompetenz in diesem Gebiet durch gezielte Ausbildung von wissenschaftlichem Nachwuchs zu erhalten. Um das breite Feld der Aspekte der Strahlenforschung strukturiert zu bearbeiten, wurde das Vorhaben thematisch in fünf Teilprojekte gegliedert, die sich mit unterschiedlichen Kompartimenten aquatischer Ökosysteme befassten und gezielt die Nachwuchsförderung organisierten:

1. Oberflächenwasser: Eintrag und Transport von Radionukliden in Oberflächenwasser
2. Grund- und Tiefenwasser, Trinkwasser: Freisetzung und Nachweis von Radionukliden in Grund- und Trinkwasser

3. Biokinetische Modelle: Biokinetische Stoffwechselmodelle im Menschen und deren Validierung
4. Kontaminierte Wässer: Migrationsverhalten von Radionukliden in bergbaulichen und städtischen Abwässern
5. Ausbildung und Nachwuchsförderung: Organisation von Workshops, Tagungsteilnahmen, Forschungsaufenthalten, (Labor)Austauschprojekten und einer Sommerschule

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilprojekt B konnte erst zeitlich verzögert gestartet werden aufgrund einer längeren Erkrankung der Projektleiterin im ersten Jahr des Verbundvorhabens. Deshalb wurde am Ende des Verbundvorhabens eine kostenneutrale Verlängerung um 6 Monate beantragt.

Das Projekt wurde gemäß dem Arbeitsplan, der im Antrag aufgelistet wurde, durchgeführt.

4. Stand von Wissenschaft und Technik, an den angeknüpft wurde

In-vivo-Studien zur chemischen Bindungsform von An(III) oder Ln(III) sind bisher kaum durchgeführt worden. Einige wenige Experimente an Tieren untersuchten die Speziation im Urin [1]. In-vitro-Studien sind ebenso selten. Neben eigenen Speziationsuntersuchungen von An(III) und Ln(III) im Urin [2] wurden bisher auch einige wenige Untersuchungen zur Bindungsform von An(III) im Blut veröffentlicht [3]. Dafür wurde in einigen Studien die Speziation von An(III) in synthetischen menschlichen Biofluiden (z.B. Speichel, Magensaft) thermodynamisch berechnet [4, 5]. Der experimentelle Vergleich steht allerdings noch aus. Diese Lücke sollte in diesem Projekt gefüllt werden.

Literatur:

- [1] G.N. Stradling, D.S. Popplewell, G.J. Ham (1976): Chemical form of americium and curium in urine. *Health Phys.* 31, 517-519.
- [2] A. Heller, A. Barkleit, G. Bernhard (2011): Chemical Speciation of Trivalent Actinides and Lanthanides in Biological Fluids: The Dominant in Vitro Binding Form of Curium(III) and Europium(III) in Human Urine. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 193-203.
- [3] J.R. Copper, H.S. Gowing (1981): The binding of americium and curium to human serum proteins. *Int. J. Radiat. Biol.* 40, 569-572.
- [4] L.M. Webb, D.M. Taylor, D.R. Williams (1998): Computer modelling of the chemical speciation of lanthanide and actinide elements in the human gastrointestinal tract: mouth and stomach. *Radiat. Prot. Dosim.* 79, 219-222.

[5] L.M. Webb, D.M. Taylor, D.R. Williams (1998): Computer modelling of the chemical speciation of lanthanide and actinide elements in the human gastrointestinal tract. J. Alloys Compd. 271, 112-115.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen dieses Teilprojektes erfolgte eine intensive Zusammenarbeit mit Frau Dr. V. Höllriegl vom Helmholtz-Zentrum München (HMGU). Die dem Teilprojekt 3.1 (HMGU) des Verbundvorhabens zugrunde liegenden Blutplasmaproben wurden im Rahmen unseres Teilprojektes mittels ICP-MS untersucht und die jeweiligen Ce-Gehalte quantitativ bestimmt.

Eine weitere Zusammenarbeit gab es mit der Leibniz-Universität Hannover, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz. Dort wurden ESI-MS-Experimente zur Strukturaufklärung von Modellverbindungen für Bestandteile der Biofluide des Verdauungssystems, die in unserem Teilprojekt synthetisiert wurden, durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse

Die Zuwendung (Personal-, Material-, Reisekosten) wurde vollumfänglich für die Durchführung der Projekte verwendet. Die Ergebnisse des Teilprojektes sind im Wesentlichen in der Doktorarbeit von C. Wilke und den unter II.6 aufgelisteten Publikationen ausführlich beschrieben.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Verwendungsnachweis zusammen mit den Jahresabrechnungen für die Projektlaufzeit wird dem Projektträger gesondert zugesendet.

Der Hauptanteil der Zuwendung waren Personalkosten. Sie wurden im Wesentlichen für die Doktorandin Claudia Wilke sowie die Post-Doktorandin Anne Heller aufgewendet.

Reisekosten wurden für die Teilnahme an den halbjährlichen Projekttreffen bzw. Workshops des Verbundes, für Gastaufenthalte an anderen wissenschaftlichen Einrichtungen und zum Besuch von internationalen Konferenzen aufgewendet.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Notwendigkeit der Untersuchungen resultiert aus der Aufgabe, die Gesundheitsrisiken nach der Inkorporation von Radionukliden besser einschätzen zu können und damit zur Entwicklung von geeigneten Dekontaminationstherapien beizutragen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Ein konkreter Verwertungsplan lag nicht vor. Die Ergebnisse und Erkenntnisse lassen sich jedoch in vielfältiger Weise weiter nutzen. So können die erhaltenen Ergebnisse zur Speziation der dreiwertigen Radionuklide einen Beitrag zur Entwicklung bzw. Verbesserung von Dekontaminationsstrategien beitragen. Die im Projekt ermittelten thermodynamischen Daten (Stabilitätskonstanten) von Ln(III)/An(III)-Komplexen mit Bioliganden können für Transportsimulationen und biokinetische Modelle der Radionuklide im menschlichen Körper genutzt werden.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Vorhabenszeitraum wurde keine relevante Literatur zum konkreten Forschungsthema publiziert.

6. Veröffentlichung der Ergebnisse

Die Forschungsergebnisse wurden in Publikationen, der Doktorarbeit von Claudia Wilke (Teil B), in Jahresberichten des HZDR sowie in Vorträgen und Postern auf internationalen Fachtagungen zur Diskussion gestellt.

Publikationen

Barkleit, A.; Heller, A.; Ikeda-Ohno, A.; Bernhard, G: Interaction of europium and curium with alpha-amylase. Dalton Trans., 45, 8724-8733 (2016)

DOI: 10.1039/C5DT04790K

Abstract: The complexation of Eu(III) and Cm(III) with the protein α -amylase (Amy), a major enzyme in saliva and pancreatic juice, was investigated over wide ranges of pH and concentration at both ambient and physiological temperatures. Macroscopic sorption experiments demonstrated a strong and fast binding of Eu(III) to Amy between pH 5 and 8. The protein provides three independent, non-cooperative binding sites for Eu(III). The overall association constant of these three binding sites on the protein was calculated to be $\log K = 6.4$

± 0.1 at ambient temperature. With potentiometric titration the averaged deprotonation constant of the carboxyl groups (the aspartic and glutamic acid residues) of Amy was determined to be $pK_a = 5.23 \pm 0.14$ at 25 °C and 5.11 ± 0.24 at 37 °C. Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) revealed two different species for both Eu(III) and Cm(III) with Amy. In the case of the Eu(III) species, the stability constants were determined to be $\log \beta_{11} = 4.7 \pm 0.2$ and $\log \beta_{13} = 12.0 \pm 0.4$ for Eu:Amy = 1:1 and 1:3 complexes, respectively, while the values for the respective Cm(III) species were $\log \beta_{11} = 4.8 \pm 0.1$ and $\log \beta_{13} = 12.1 \pm 0.1$. Furthermore, the obtained stability constants were extrapolated to infinite dilution to make our data compatible with the existing thermodynamic database.

Barkleit, A.; Wilke, C.; Heller, A.; Stumpf, T.; Ikeda-Ohno, A.: Trivalent f-elements in human saliva: A comprehensive speciation study by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and thermodynamic calculations. Dalton Trans., 46, 1593-1605 (2017)

DOI: 10.1039/C6DT03726G

Abstract: In the case of oral ingestion of radioactive contaminants, the first contact medium is saliva in the mouth. To gain a first insight into the interaction of radioactive contaminants in human saliva, the speciation of curium (Cm(III)) and europium (Eu(III)), i.e., trivalent f-elements, was investigated in different salivary media with time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). The results indicate that these metal cations are primarily complexed with carbonates and phosphates, forming the ternary complexes with a possible stoichiometry of 1:1:2 (M(III) : carbonate : phosphate). For charge compensation, calcium is also involved in these ternary complexes. In addition to these inorganic components, organic substances, namely α -amylase, show a significant contribution to the speciation of the trivalent f-elements in saliva. This protein is the major enzyme in saliva and catalyzes the hydrolysis of polysaccharides. In this context, the effect of Eu(III) on the activity of α -amylase was investigated to reveal the potential implication of these metal cations for the in vivo functions of saliva. The results indicate that the enzyme activity is strongly inhibited by the presence of Eu(III), which is suppressed by an excess of calcium.

Wilke, C.; Barkleit, A.; Stumpf, T.; Ikeda-Ohno, A.: Speciation of the trivalent f-elements Eu(III) and Cm(III) in digestive media. J. Inorg. Biochem., 175, 248-258 (2017)

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.020

Abstract: In case radioactive materials are released into the environment, their incorporation into our digestive system would be a significant concern. Trivalent f-elements, i.e., trivalent actinides (An(III)) and lanthanides (Ln(III)), could potentially represent a serious health risk due to their chemo- and radiotoxicity, nevertheless the biochemical behavior of these elements are mostly unknown even to date. This study, therefore, focuses on the chemical speciation of trivalent f-elements in the human gastrointestinal tract. To simulate the digestive system artificial digestive juices (saliva, gastric juice, pancreatic juice and bile fluid) were prepared. The chemical speciation of Ln(III) (as Eu(III)) and An(III) (as Cm(III)) was determined experimentally by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) and the results were compared with thermodynamic modelling. The results indicate a dominant inorganic species with phosphate/carbonate in the mouth, while the aquo ion is predominantly formed with a minor contribution of the enzyme pepsin in the stomach. In the intestinal tract the most significant species are with the protein mucin. We demonstrated the first experimental results on the chemical speciation of trivalent f-elements in the digestive media by TRLFS. The results highlight a significant gap in chemical speciation between experiments and thermodynamic modelling due to the limited availability of thermodynamic stability constants

particularly for organic species. Chemical speciation strongly influences the in vivo behavior of metal ions. Therefore, the results of this speciation study will help to enhance the assessment of health risks and to improve decorporation strategies after ingestion of these (radio-) toxic heavy metal ions.

Dissertation

Wilke, C (2018) Spektroskopische Untersuchungen zur Bindungsform dreiwertiger Lanthanide und Actinide in Biofluiden des menschlichen Verdauungssystems. Doktorarbeit, TU Dresden, 134 Seiten

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Das abgeschlossene Forschungsvorhaben erfolgte im Rahmen des Förderprogramms des BMBF als Teil des KVSF (Kompetenzverbund Strahlenforschung). Durch den gezielten Einsatz junger Wissenschaftlerinnen (1 Doktorandin, 1 Post-Doktorandin) wurde ein entscheidender Beitrag zum Kompetenzerhalt geleistet. Die Ergebnisse des Teilprojektes haben wesentlich zu einem verbesserten Verständnis der Ausbreitung von Radionukliden im menschlichen Verdauungstrakt beigetragen.

2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens

Lanthanide und Actinide stellen ein Risiko für die Gesundheit des Menschen dar. Sie können über verschiedene Expositionswege in die Umwelt gelangen und vom Menschen aufgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die chemische Speziation von dreiwertigen Lanthaniden (Eu(III)) und Actiniden (Cm(III)) im menschlichen Gastrointestinaltrakt untersucht. Hierfür wurden synthetische Biofluide (Speichel, Magensaft, Pankreassaft und Galle) nach dem UBM-Protokoll hergestellt, mit Eu(III)/Cm(III) versetzt und mittels TRLFS analysiert. Die Biofluide wurden zunächst einzeln untersucht und anschließend kombiniert, um den Magen, Dünndarm und das vollständige Verdauungssystem zu simulieren. Die aufgenommenen Lumineszenzspektren der Verdauungssäfte sowie der simulierten Verdauungsphasen wurden im Anschluss mit der linearen Kombinationsanalyse (LCF) analysiert. Das Ziel dieses spektroskopischen Screenings war die Identifizierung wichtiger Bindungspartner mit Eu(III)/Cm(III).

Als dominierende Spezies im Speichel wurde ein quaternärer Komplex aus Eu(III), Phosphat-, Carbonat- und Sulfat-Ionen mit Ca(II) als Gegenion identifiziert (Eu/Carb/Phos/Sulf + (Ca)). Die organischen Liganden haben nur einen geringen Einfluss auf die Komplexbildung.

Aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Magensafts (0,9-1,0) wird die chemische Speziation dieses Biofluids vorrangig durch das Aquoion bestimmt.

Der Pankreassaft weist hingegen einen pH-Wert zwischen 7 bis 8 auf und enthält die meisten und wichtigsten Verdauungsenzyme. In Folge dessen wird die Speziation vorwiegend durch organische Spezies beeinflusst. 60% der Speziation werden durch den Eu-Mucin-Komplex bestimmt und etwa ein Drittel von dem anorganischen, ternären Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca).

Durch die hohe Carbonatkonzentration weist die Gallenflüssigkeit einen basischen pH-Wert auf, sodass in diesem Biofluid 45% der chemischen Speziation von Carbonat-Komplexen dominiert werden. Ein weiterer, wichtiger Einflussfaktor ist der Gallenextrakt (55%). Dies ist jedoch ein komplexes System aus diversen Bestandteilen wie Gallensalzen und -alkoholen, Cholesterin, Schwermetallen und Abbauprodukten. Aufgrund dessen konnte keine Identifizierung einzelner Bindungspartner erfolgen.

Zur Simulation des Verdauungssystems wurden die einzelnen Biofluide miteinander kombiniert. Der erste Schritt der Verdauung erfolgt im Mund. Anschließend wird die Speichelmischung über die Speiseröhre in den Magen transportiert. Die entstandene Speichel-Magen-Phase weist im Vergleich zum Magensaft einen leicht erhöhten pH-Wert von 1,2-1,7 und in Folge dessen eine veränderte Speziation auf. Der Anteil des Aquoions wird von 95 auf 61% zurückgedrängt und es erfolgt eine Komplexbildung mit dem magenspezifischen Enzym, dem Pepsin.

Im Dünndarm findet durch die zwei co-existenten Biofluide (Pankreassaft und Gallenflüssigkeit) ein Großteil der Verdauung statt. Die dominierende Spezies der Pankreassaft-Gallen-Phase besteht aus dem Eu-Mucin-Komplex (66%). Auch der anorganische, ternäre Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca) hat einen moderaten Einfluss (20%) auf die chemische Speziation im Darm.

Die Vereinigung aller vier Biofluide für die Simulation des vollständigen Verdauungssystems resultiert in zwei Hauptspezies: dem Mucin und dem anorganischen, ternären Komplex.

Die experimentell mit TRIFS ermittelte Speziation wurde im Anschluss mit thermodynamischen Berechnungen verglichen. Diese Simulationen sind jedoch stark abhängig

von den zur Verfügung stehenden Stabilitätskonstanten. Da vor allem für Bio-Makromoleküle thermodynamische Daten fehlen, wird die berechnete Speziation vorwiegend durch anorganische Liganden wie Phosphat oder Carbonat bestimmt.

Dies hebt die Bedeutung von experimentellen Bestimmungen von Stabilitätskonstanten und chemischen Speziationen hervor, besonders bei Systemen, die Bio-Makromoleküle oder Mehrkomponenten-Spezies enthalten, da deren thermodynamische Daten meist unvollständig oder nicht bekannt sind.

Die starke Komplexfähigkeit von Mucin gegenüber dreiwertigen f-Elementen könnte die Absorption dieser im menschlichen Körper unterdrücken und deren Exkretion fördern. Mucin ist ein Glykoprotein mit einem hohen Molekulargewicht, welches ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Schleimhaut (Mucus) ist und ein Schutzprotein gegenüber Toxinen, Bakterien oder auch Schwermetallen darstellt.

Aus diesem Grund wurden die Wechselwirkungen des Mucins mit Eu(III)/Cm(III) genauer untersucht. Dafür wurden zunächst Konzentrations- und pH-Reihen des Glykoproteins mit TRLFS aufgenommen. Mit steigender Ligandkonzentration wurde eine erhöhte Komplexbildung mit Eu(III)/Cm(III) festgestellt. Dieser Trend kann auch bei der pH-Reihe von niedrigen zu hohen pH-Werten beobachtet werden. Ab pH 6 müssen jedoch Einflüsse von Hydroxid- und Carbonationen auf die chemische Speziation berücksichtigt werden. Zudem konnten zwei Mucin-Spezies identifiziert werden. Zwischen pH 3 bis 5 liegt vor allem die Mucin-Spezies 1 vor. Im neutralen bis basischen Bereich, was dem physiologischen pH im Mund oder Dünndarm entspricht, kommt es zur Ausbildung der Mucin-Spezies 2. Da vorrangig diese Spezies im pH-Bereich 6-8 gebildet wird, scheint die Mucin-Spezies 2 stärker an Eu(III) gebunden zu sein als die Mucin-Spezies 1. Demzufolge weist diese Spezies eine längere Lebensdauer und weniger Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Metallions auf. Die Mucin-Spezies 2 könnte somit die Absorption von dreiwertigen f-Elementen in den Blutkreislauf beeinflussen.

Weitere Untersuchungen mit der CD-Spektroskopie und der ITC ergaben, dass das Protein in einer ungeordneten Konformation vorliegt, welche durch die Zugabe von Eu(III) nicht beeinflusst wird. Zudem handelt es sich bei der Komplexbildung zwischen Mucin und Eu(III) um eine endotherme Reaktion.

Da das Glykoprotein eine unspezifische Struktur und eine hohe Anzahl an möglichen Bindungsstellen aufweist, ist die Komplexbildung mit Metallionen schwer zu untersuchen. Allerdings besteht Mucin bis zu 80% aus Carbohydrat-Ketten. Die am häufigsten

vorkommenden Zucker in diesen Ketten sind dabei N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, Galaktose, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure (NANA). Um die genauen Bindungspartner im Protein zu identifizieren, wurden zunächst diese Zucker mit TRLFS studiert. Bei allen Monosacchariden konnte jedoch nur eine schwache Komplexbildung mit Eu(III) festgestellt werden. Die am stärksten ausgeprägte Komplexbildung mit Eu(III) besitzt dabei der Zucker NANA.

Die NANA ist ein wichtiges biologisches Molekül, welches sich an der äußeren Zellmembran oder am terminalen Ende von Glykoproteinen oder -lipiden befindet. Um die Komplexbildung zwischen NANA und Eu(III)/Cm(III) genauer charakterisieren zu können, wurden Bindungsstudien mit Hilfe der TRLFS, IR, NMR, ITC und theoretischen Studien durchgeführt. Anhand der Lumineszenzspektroskopie konnten Stabilitätskonstanten für Eu(III) ($\log\beta = 3,23 \pm 0,1$) und Cm(III) ($\log\beta = 3,32 \pm 0,1$) bestimmt werden. Wie beim Mucin konnte mit steigendem pH eine verstärkte Komplexbildung zwischen Eu(III)/Cm(III) und der NANA beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem Protein ist die Abschwächung der Lumineszenzintensität durch die Ausbildung schwach lumineszierender Hydroxid-Komplexe stärker ausgeprägt. Des Weiteren konnte ein Einfluss des atmosphärischen CO₂ auf die Komplexbildung von NANA mit Eu(III) festgestellt werden, der bereits ab pH 5 in den Lumineszenzspektren sichtbar ist.

Anhand der ITC-Messung konnten ein exothermer Reaktionsverlauf sowie Enthalpie- und Entropieänderungen ($\Delta H = -460,72 \pm 58 \text{ J/mol}$, $\Delta S = 62 \text{ J/Kmol}$) für die Komplexbildungsreaktion bestimmt werden.

Für den ausgebildeten Komplex von NANA mit Eu(III)/Cm(III) sind mehrere Strukturen möglich. Theoretische Berechnungen prognostizieren eine Komplexbildung von Eu(III) über die Carboxylgruppe und die terminalen OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette der NANA. Unter Einbezug der IR-Ergebnisse kann aufgrund der Überlagerung der Amid- und Carboxylbanden eine Beteiligung der Carboxylgruppe an der Komplexbildung nur vermutet werden. Durch den Vergleich mit anderen Zuckern kann jedoch eine Beteiligung der Amid-Gruppe ausgeschlossen werden. In den NMR-Spektren ist eine Verschiebung der C1-, C2-, C8- und C9-Atome zu erkennen, was die Beteiligung der Carboxylgruppe und der Glycerol-Seitenkette an der Komplexbildung bestätigt. Des Weiteren wird ab pH 6 sowohl in den IR- als auch den NMR-Spektren eine Verbreiterung der Banden beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das Metallion Kolloide bildet und die Komplexbildung mit dem Zucker weniger stark ausgeprägt ist.

In dieser Studie wurde erstmalig die chemische Speziation von dreiwertigen Ln und An im menschlichen Verdauungssystem experimentell bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einblicke in das biochemische Verhalten dreiwertiger f-Elemente und können zudem zur Einschätzung von Gesundheitsrisiken nach der Inkorporation von Radionukliden und der Entwicklung von Dekontaminationstherapien beitragen.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Die in diesem Teilprojekt erzielten Ergebnisse bilden die Grundlage für eine nachfolgende Verbundprojektskizze. In dieser soll die Speziation weiterer Radionuklide (Radium, Uran) im Verdauungstrakt ermittelt und die Änderung der Speziation der Radionuklide unter dem Einfluss von Dekontaminationsmitteln untersucht werden. Die Arbeiten und deren Ergebnisse sollen direkt mit biokinetischen Modellen und Rechnungen verknüpft werden.

Das im Projekt entwickelte Know-how zur Bestimmung der Speziation von Radionukliden in biologisch relevanten Medien mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie kann darüber hinaus für verschiedenste Fragestellungen der Radioökologie und auch für andere Fachrichtungen (z.B. Medizin, Biologie) genutzt werden.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die geplanten Untersuchungen zur Speziation von Cer im Blut und Urin waren nicht erfolgreich, da die verwendete Methode der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS) für Cer nicht erfolgreich einsetzbar ist. Experimente in verschiedenen synthetischen und natürlichen Medien haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Proteinen in den Lösungen die Fluoreszenz komplett löscht und damit kein Messsignal detektierbar ist. Andere spektroskopische Methoden führten ebenfalls zu keinem Ergebnis. Somit konnte die Speziation von Cer in den Medien nicht bestimmt werden. Als Alternative wurde in den Blutplasmaprobe, welche von Frau Dr. Höllriegl (HMGU) im Rahmen der Zusammenarbeit mit TP 3.1 des Verbundprojektes zur Verfügung gestellt wurden, der Cer-Gehalt mittels ICP-MS quantitativ bestimmt. Diese Ergebnisse ermöglichten dem HMGU im TP 3.1 die Bestimmung von biokinetischen Ausscheidungsraten von Cer, was ausführlich im Abschlussbericht des HMGU zum Verbundprojekt „TransAqua“ dargestellt ist und in einer gemeinsamen Publikation von HZDR und HMGU (eingereicht) veröffentlicht wird.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse der Teilprojekte wurden auf internationalen Konferenzen und Workshops vorgestellt und in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert und somit einem breiten Nutzerkreis zugänglich gemacht.

6. Ausgaben- und Zeitplanung

Der abschließende ausführliche Verwendungsnachweis zusammen mit den Jahresabrechnungen für die Projektlaufzeit wurde dem Projektträger übergeben.

Aufgrund einer langfristigen Erkrankung der Projektleiterin im ersten Jahr der Projektlaufzeit konnte erst Ende 2013 mit der Ausschreibung zur Besetzung der Doktorandenstelle begonnen werden. Die Doktorandin Claudia Wilke konnte deshalb erst zum 1.2.2014 eingestellt werden, so dass zur Erfüllung aller geplanten Aufgaben eine kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit um 6 Monate bis zum 30. 11. 2017 beantragt und genehmigt wurde.

IV. Kurzfassung (Berichtsblatt)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
<p>3. Titel Verbundprojekt TransAqua: Strahlung und Umwelt III: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen</p> <p>AP 3.2: Spektroskopische Bestimmung der Bindungsform (Speziation) trivalenter Actinide/Lanthanide in Biofluiden des menschlichen Gastrointestinaltraktes und im Blut (Teil B)</p> <p>AP 4.3: Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen unter Tage lebenden Mikroorganismen mit Uran und deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in gefluteten Urangruben (Teil A)</p>	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Arnold, Thuro Barkleit, Astrid Gerber, Ulrike Krawczyk-Bärsch, Evelyn Wilke, Claudia	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.11.2017
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation HZDR-Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Ressourcenökologie Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V. Bautzner Landstr. 400 01328 Dresden	9. Ber. Nr. Durchführende Institution HZDR-091
	10. Förderkennzeichen 02NUK030F
	11. Seitenzahl 243
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 384
	14. Tabellen 40
	15. Abbildungen 80
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

Teil A:

1. Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik

Im Gegensatz zum Einfluss anorganischer Immobilisierungsprozesse auf das Ausbreitungsverhalten von Radionukliden in der Umwelt, ist der Einfluss von Mikroorganismen auf den Transport von Radionukliden und deren Immobilisierung/Mobilisierung bislang nur wenig erforscht.

2. Begründung/Zielsetzung der Untersuchung

Schwermetall- und Radionuklidkontaminationen von Böden und Gewässern sind zum Großteil das Ergebnis ehemaliger Bergbau- und Metallgewinnungsindustrien und stellen weltweit ein ernstzunehmendes Problem dar. Die Sanierung ehemaliger Minen ist oft aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. In Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, um neue Erkenntnisse zur Wechselwirkung von indigenen Mikroorganismen mit Uran(VI) von urankontaminierten Wässern zu gewinnen und alternativen Konzepte zur herkömmlichen Reinigen des Minenwassers zu erarbeiten.

3. Methode

Zur Untersuchung der Interaktion von Uran mit Mikroorganismen wurden verschiedene molekularbiologische (Durchflusszytometrie), mikroskopische (Elektronenmikroskopie) und spektroskopische Methoden (zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie) sowie UV-Vis angewendet.

4. Ergebnis

Es wurde gezeigt, dass das Transportverhalten von Uran in der Umwelt und an den ehemaligen Uranabbaustätten stark von der Anwesenheit und Aktivität natürlich vorkommender Mikroorganismen abhängt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Isolate eine hohe Toleranz gegenüber Uran aufweisen und in der Lage sind, relativ hohe Mengen an Uran zu immobilisieren und aus der umgebenden Lösung zu entfernen. Durch anaerobe Versuche konnte gezeigt werden, dass die mikrobielle Reduktion von Uran(VI) allein durch die Zugabe von 10 mM Glycerin bei zukünftigen Anwendungen als in situ Biosanierungsapplikationen genutzt werden könnte.

5. Schlussfolgerung/Anwendungsmöglichkeiten

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Wechselwirkungsmechanismen zwischen natürlich vorkommenden Mikroorganismen und Uran im Detail beschreiben und neue Zusammenhänge zwischen aktivem und inaktivem Stoffwechsel der Mikroorganismen zeigen. Zusammenfassend können diese einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung von Biosanierungsansätzen für die Behandlung von Radionuklid-kontaminierten Standorten aus der ehemaligen Bergbauindustrie leisten.

Teil B:

1. Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik

In-vitro-Studien zur chemischen Bindungsform von dreiwertigen Lanthaniden(Ln) und Actiniden (An) sind bisher nur im Urin und an einzelnen Bestandteilen des Blutes durchgeführt worden. Thermodynamische Berechnungen der Speziation wurden für Biofluide des Magen-Darm-Traktes ohne experimentellen Vergleich durchgeführt.

2. Begründung/Zielsetzung der Untersuchung

Die Speziation von Eu(III) als Vertreter für Ln und Cm(III) als Vertreter für An soll in-vitro in synthetischen Biofluiden des Magen-Darm-Traktes mittels Laserfluoreszenzspektroskopie bestimmt werden.

3. Methode

Synthetische Biofluide des Verdauungssystems wurden nach dem internationalen Protokoll UBM (Unified Bioaccessibility Method) der europäischen Forschergemeinschaft BARGE (Bioaccessibility Research Group of Europe) synthetisiert, mit Eu^{3+} bzw. Cm^{3+} versetzt und mittels zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) untersucht.

4. Ergebnis

Im Speichel dominiert neben einem kleinen Bindungsanteil an dem Enzym alpha-Amylase die Komplexierung mit anorganischen Liganden, im Magen dominiert aufgrund des sauren pH-Wertes das Eu- bzw. Cm-Aquo-Ion, und im Darm dominiert neben anorganischen Komplexen die Bindung der Metallionen an das Glycoprotein Mucin.

5. Schlussfolgerung/Anwendungsmöglichkeiten

Die starke Komplexfähigkeit von Mucin gegenüber dreiwertigen f-Elementen könnte die Absorption dieser im menschlichen Körper unterdrücken und deren Exkretion fördern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einblicke in das biochemische Verhalten dreiwertiger f-Elemente und können zudem zur Einschätzung von Gesundheitsrisiken nach der Inkorporation von Radionukliden und der Entwicklung von Dekontaminationstherapien beitragen.

19. Schlagwörter

Mikroorganismen, Uran, Immobilisierung, U(VI)-Reduktion, dreiwertige f-Elemente, Speziation, Biofluide, Verdauungssystem, Laserfluoreszenzspektroskopie,

20. Verlag
HZDR

21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. type of document (e.g. report, publication) Final report
3. title TransAqua - Transfer of radionuclides in aquatic ecosystems AP 3.2: Spectroscopic determination of the binding form (speciation) of trivalent actinides and lanthanides in biofluids of the human intestinal tract and in the blood (part B) AP 4.3: Investigations on the interactions between microorganisms living in underground mining environments and uranium (part A)	
4. author(s) (family name, first name(s)) Arnold, Thuro Barkleit, Astrid Gerber, Ulrike Krawczyk-Bärsch, Evelyn Wilke, Claudia	5. end of project 30/11/2017
	6. publication date
	7. form of publication HZDR report
8. performing organization(s) (name, address) Institute of Resource Ecology Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V. Bautzner Landstr. 400 01328 Dresden	9. originator's report no. HZDR-091
	10. reference no. 02NUK030F
	11. no. of pages 243
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 384
	14. no. of tables 40
	15. no. of figures 80
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	

18. abstract

Part A:

1. State of the art

In contrast to the influence of inorganic immobilization processes on the migration behaviour of radionuclides in the environment, the influence of microorganisms on transport of radionuclides and their respective influence on immobilization/mobilization is only barely studied.

2. Aim of the study

Heavy metal and radionuclide contamination of soil and water is largely the result of former mining and metal extraction industries and represents a serious environmental problem worldwide. The remediation of such former mine sites is often complex and expensive. In this work, investigations were carried out to gain new insights on the interaction of indigenous microorganisms with uranium(VI) from uranium-contaminated mine waters and to develop alternative concepts for the conventional remediation of mine water.

3. Methods

Various molecular biological (flow cytometry), microscopic (electron microscopy) and spectroscopic methods (time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and UV-Vis) were used to investigate the interactions of uranium with microorganisms.

4. Results

It has been shown that the transport behaviour of uranium in the environment and at former uranium mines is strongly dependent on the presence and activity of naturally occurring microorganisms. The investigations showed that the isolates have a high tolerance against uranium and are able to immobilize relatively high amounts of uranium and thus remove it from the surrounding solution. Anaerobic experiments have shown that the microbial reduction of uranium(VI) could be used as an in situ bioremediation method by simply adding 10 mM glycerin.

5. Conclusions

The results of this work describe in detail the interaction mechanisms between naturally occurring microorganisms and uranium and show new relationships between the active and inactive metabolism of microorganisms. In summary, these findings can make a valuable contribution to the development of bioremediation approaches for the treatment of radionuclide contaminated sites from former uranium mining sites.

Part B:

1. State of the art

In-vitro studies of the chemical speciation of trivalent lanthanides (Ln) and actinides (An) are only performed for urine and single blood components. The speciation of these metal ions in body fluids of the gastrointestinal tract has been thermodynamically calculated but without experimental verification.

2. Aim of the study

The speciation of Eu(III) and Cm(III) as representatives for Ln and An, respectively, should be determined in-vitro in synthetic body fluids of the digestive system with laser fluorescence spectroscopy.

3. Methods

The body fluids of the digestive system were synthesized after the UBM (Unified Bioaccessibility Method) protocol of BARGE (Bioaccessibility Research Group of Europe). After spiking with Eu^{3+} or Cm^{3+} , the solutions were measured with time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS).

4. Results

In saliva, the speciation is dominated by inorganic complexes and to a minor amount by coordination with the enzyme alpha-amylase. In gastric juice, the aquo ion of the metal ions dominates and in the small intestine the dominant species is associated with mucin beside inorganic complexes.

5. Conclusions

The strong complexation ability of mucins towards the trivalent f-elements could suppress the absorption of the heavy metal elements in the human body and would potentially facilitate their excretion. The results obtained in this study provide new insights into the biochemical behaviour of trivalent f-elements and could help to assess the health risks when these heavy metals are incorporated into the human body as well as to develop possible decontamination measures.

19. keywords

Microorganisms, uranium, immobilisation, U(VI)-reduction, trivalent f-elements, speciation, body fluids, digestive system, laser fluorescence spectroscopy

20. publisher
HZDR

21. price

V. Anhang

Dissertation

Gerber, U (2019). Investigations on indigenous microorganisms isolated from a former uranium mine and their interaction mechanisms with uranium - a possible bioremediation study. Dissertation, Fakultät der Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Zur Einreichung beabsichtigt. 147 Seiten.

Dissertation

Wilke, C (2018) Spektroskopische Untersuchungen zur Bindungsform dreiwertiger Lanthanide und Actinide in Biofluiden des menschlichen Verdauungssystems. Doktorarbeit, TU Dresden. 134 Seiten.

**Investigations on indigenous microorganisms
isolated from a former uranium mine and their
interaction mechanisms with uranium
- a possible bioremediation study**

Dissertation

To Fulfill the
Requirements for the Degree of
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

**Submitted to the Council of the Faculty
of Biological Sciences
of the Friedrich Schiller University Jena**

by Dipl.-Biol. Ulrike Gerber

born on 16.11.1986 in Suhl

Reviewer

Reviewer 1: Prof. Dr. Erika Kothe (FSU Jena)

Reviewer 2: Prof. Dr. Georg Büchel (FSU Jena)

External reviewer: Prof. Dr. Thorsten Stumpf (TU Dresden, HZDR)

Day of defense

Monday, 7 January 2019

*Beginnings are usually scary, and endings are usually sad, but its everything in between
that makes it all worth living.*

Bob Marley

Contents

Abstract	3
Kurzfassung	7
1 Introduction	11
1.1 Uranium mining activities in Germany and the former uranium mine Königstein	11
1.2 Chemical composition of the flooding water in Königstein	13
1.3 Uranium	14
1.4 Metal-microbe interactions	16
1.5 Bioremediation and field studies	19
1.6 Microbial diversity within the flooding water of Königstein	22
1.7 Aims of the study	23
2 Summary of the Manuscripts	25
2.1 Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interac- tions between the gram-negative betaproteobacterium <i>Acidovorax facilis</i> and uranium(VI)	26
2.2 Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by <i>Acidovorax</i> <i>facilis</i> for bioremediation purposes	27
2.3 Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by <i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> isolated from the flooding water of a former uranium mine	28
2.4 Microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water of a former uranium mine - a possible bioremediation approach	29
3 Manuscripts	31
3.1 Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interac- tions between the gram-negative betaproteobacterium <i>Acidovorax facilis</i> and uranium(VI)	31

3.2	Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by <i>Acidovorax facilis</i> for bioremediation purposes	45
3.3	Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by <i>Rhodospiridium toruloides</i> isolated from the flooding water of a former uranium mine	57
3.4	Microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water of a former uranium mine - a possible bioremediation approach	85
4	Discussion	113
4.1	Uranium removal capability and interaction mechanisms of the betaproteobacterium <i>A. facilis</i>	114
4.2	The isolated yeast KS5 (<i>R. toruloides</i>) and its interaction mechanisms with uranium(VI)	117
4.3	Microbial uranium(VI) reduction - most suitable capability for bioremediation approaches?	121
4.4	Possible applications for <i>in situ</i> bioremediation at the former uranium mining site Königstein	129
4.5	Conclusion and scientific relevance	131
5	Outlook	133
	Bibliography	135
	Appendix	i
	Abbreviations	v

Abstract

Heavy metal and radionuclide contaminations of soil and water, resulting from former mining and milling industries, represent a serious problem worldwide. Due to the fact that heavy metals and radionuclides, like uranium, are not biodegradable, their remediation is of great concern. Remediation of such contaminated sites is often laborious and cost-intensive, requiring the need of technical facilities and high amounts of chemicals. In this thesis, investigations were performed to find alternatives for the currently used conventional remediation and waste water treatment at the site of the former uranium mine in Königstein (Saxony, Germany). As a concept of remediation, the administrating company of the former uranium mining sites in Eastern Germany, Wismut GmbH, started a controlled flooding of the underground mine in Königstein in 2001. As a consequence of the former leaching process, started in the 1980s, with sulfuric acid to mobilize the uranium within the sandstone, the underground and flooding water displays the characteristics of an AMD (acid mine drainage) site. Despite the harsh conditions prevalent within the flooding water a high microbial diversity could be detected. Microorganisms display abilities to interact with metals or radionuclides in various ways. They are able to mobilize or immobilize them. The usage of microorganisms or plants for decontamination of metal- or radionuclide-polluted soils and waters is called bioremediation. The restoration of such highly contaminated sites using bioremediation requires vital microbial cells, which are able to survive within these harsh environmental conditions. Against this background, in this thesis indigenous microorganisms were isolated from the flooding water and investigated for their ability removing uranium from surrounding solutions and their tolerance against heavy metals, in particular uranium.

The bacterial strain *A. facilis*, identified by DNA-based methods within the flooding water, was investigated with regard to its interaction mechanisms with uranium. The results demonstrate that the gram-negative betaproteobacterium is able to remove high amounts of uranium (130 mgU/g dbm) by passive biosorption and active bioaccumulation. Uranium is either sorbed to the outer membrane or actively taken up into the cell. Inside the

cytoplasm it was observed that the removed uranium is associated with polyphosphate granules. In addition, the uranium tolerance tests displayed, that the bacterial cells are able to grow in the presence of uranium concentrations similar to those present in the flooding water (MIC 0.2 mM). In further investigations, structural information on uranium immobilized by the bacterial cells was generated. The spectroscopic analyses showed, that the uranium immobilization on functional groups at the outer membrane of *A. facilis* is dependent on the incubation time. During the first hours uranium is mainly bound on lipopolysaccharides suggesting the formation of uranyl-phosphoryl species. With increasing incubation time, uranium seemed to be bound to carboxylic groups of the peptidoglycan layer in addition to the phosphoryl groups.

One indigenous strain, directly isolated from the flooding water using culture-dependent methods, represents the yeast KS5 (*R. toruloides*). The investigations on this natural occurring isolate revealed high uranium tolerances (MIC 6 mM), indicating the development of adaption mechanisms. Furthermore, the fungal strain has demonstrated a high efficiency of uranium removal (350 mgU/gdbm). TEM studies identified both underlying interaction mechanisms, bioaccumulation and biosorption. Nevertheless, active bioaccumulation seems to be the prominent process involved in the uranium immobilization. Inside the cytoplasm, uranium is associated in lipid granules resulting in the formation of meta-autunite minerals.

Culture-independent methods could identify the presence and activity of anaerobic microorganisms within the flooding water of the former uranium mine. Sulfate (SRB) and iron reducing bacteria (IRB) are known for their ability to reduce uranium(VI) into uranium(IV). For that reason, investigations on microbial uranium(VI) reduction, using the flooding water as background medium, were performed. As carbon source and electron donor, 10 mM glycerol, were directly added to the flooding water. After six weeks of incubation at 30 °C a complete reduction to uranium(IV) was detected using XANES und UV-vis spectroscopy. By 16S rDNA gene analyses the bacterial diversity was identified. The majority of the found species are IRB (> 40 %). Thus, the microbial uranium(VI) reduction is mediated by these bacteria.

Finally, the obtained results of the microbial uranium(VI) reduction occurring directly within the flooding water could be transferred to a pilot plant with a volume of 100 L. The laboratory scale experiments were successfully repeated and verified. Thus, it was shown that the microbial reduction of uranium(VI), by adding only 10 mM glycerol to the flooding water, could be used in future applications for *in situ* for bioremediation approaches at the site of the former uranium mine Königstein.

In conclusion, this study shows the importance of investigating uranium interaction mechanisms of natural occurring microorganisms in conjunction with bioremediation of contaminated sites. This thesis contributes to the development of bioremediation approaches for the treatment of metal and radionuclide contaminated sites resulting from former mining industry.

Kurzfassung

Schwermetall- und Radionuklidkontaminationen von Böden und Gewässern sind zum Großteil das Ergebnis ehemaliger Bergbau- und Metallgewinnungsindustrien und stellen weltweit ein ernstzunehmendes Problem dar. Aufgrund der Tatsache, dass Schwermetalle und Radionuklide, wie Uran, nicht durch biologische oder andere Prozesse abbaubar sind, ist deren Sanierung von großer Bedeutung. Durch den hohen technischen Aufwand und den Einsatz großer Mengen an Chemikalien, ist die Sanierung ehemaliger Minen oft aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, um auf dem Gelände der ehemaligen Uranmine in Königstein (Sachsen, Deutschland) Alternativen für die verwendete konventionelle Flutungswasserbehandlung zu finden. Als Sanierungskonzept startete die Betreibergesellschaft der ehemaligen Uranabbaugebiete in Ostdeutschland, die Wismut GmbH, im Jahr 2001 eine kontrollierte Flutung der Mine in Königstein. Aufgrund des sinkenden Urangeltes im Sandstein wurde Mitte der 1980er Jahre zur Gewinnung von Uran mit Schwefelsäure versetztes Wasser zur Laugung eingesetzt. Auf diese Weise konnte das Uran, aber auch andere Metalle, mobilisiert und somit in Lösung gebracht werden. Noch heute weist das Flutungswasser aus diesem Grund einen niedrigen pH und hohe Metallkonzentrationen auf und ähnelt somit typischen AMD (acid mine drainage)-Standorten. Trotz der vorherrschenden harschen Bedingungen im Flutungswasser konnte eine hohe mikrobielle Diversität durch kulturunabhängige Methoden nachgewiesen werden. Durch vorangegangene Studien konnte gezeigt werden, dass Mikroorganismen verschiedene Prozesse entwickelt haben, um mit Metallen oder Radionukliden zu interagieren. Speziell angepasste Mikroorganismen können so in der Lage sein, Metalle oder auch Radionuklide zu mobilisieren, aber auch zu immobilisieren. Ein alternatives Konzept, welches Mikroorganismen oder Pflanzen zur Sanierung von Metall- oder Radionuklid-kontaminierten Böden und Gewässern verwendet, stellt die Biosanierung dar. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit natürlich vorkommende Mikroorganismen aus dem Flutwasser isoliert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Uran aus der umgebenden Lösung zu entfernen. In weiteren Experimenten wurde ihre

Toleranz gegenüber Schwermetallen, insbesondere Uran, getestet.

Das Bakterium *A. facilis*, welches mittels DNA-basierter Methoden im Flutungswasser identifiziert werden konnte, wurde zunächst auf seine Wechselwirkungen mit Uran untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses gramnegative Betaproteobakterium in der Lage ist, große Mengen an Uran durch passive Biosorption und aktive Bioakkumulation zu immobilisieren (130 mgU/g dbm). Mit Hilfe von ortsauflösenden Messmethoden, wie TEM (Transmission Elektronen Mikroskopie), wurde Uran an der äußeren Membran und innerhalb der Zelle detektiert. Im Zytoplasmas liegt Uran mit Polyphosphatkörnern assoziiert vor. Darüber hinaus konnten Toleranztests belegen, dass *A. facilis* in der Lage ist, in Gegenwart von Uran zu wachsen (MIC 0.2 mM), die denen im Flutungswasser der ehemaligen Uranmine entsprechen. Um detaillierte Informationen auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden in weiteren Untersuchungen die strukturellen Informationen, des durch die Bakterienzellen immobilisierten Urans, aufgeklärt. Mit Hilfe von spektroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Uran, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an unterschiedliche funktionelle Gruppen der äußeren Membran von *A. facilis* gebunden wird. Während der ersten Stunden ist Uran hauptsächlich an Lipopolysacchariden lokalisiert. Dies wurde durch die Identifizierung von Uranylphosphoryl-spezies nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Inkubation wurde festgestellt, dass Uran an Carboxylgruppen der Peptidoglykanschicht sorbiert ist. Ein weiterer untersuchter natürlich vorkommender Mikroorganismus, der mit kulturabhängigen Methoden direkt aus dem Flutwasser isoliert wurde, repräsentiert die Hefe KS5 (*R. toruloides*). Die Ergebnisse zeigen, dass das Isolat eine hohe Toleranz gegenüber Uran aufweist (MIC 6 mM). Darüber hinaus ist KS5 in der Lage, relativ hohe Mengen an Uran zu immobilisieren und somit aus der umgebenden Lösung zu entfernen (350 mgU/g dbm). Mit Hilfe von TEM-Studien konnten die beiden Interaktionsmechanismen, Bioakkumulation und Biosorption, identifiziert werden. Anders als bei *A. facilis* zeigen die Ergebnisse, dass bei KS5 die aktive Bioakkumulation den dominierenden Prozess bei der Uranimmobilisierung darstellt. Innerhalb des Zytoplasmas der Hefezellen ist Uran mit Lipidgranula assoziiert.

Weitere Experimente auf der Grundlage von DNA- und RNA-basierten Methoden konnten sowohl das Vorhandensein, als auch die Aktivität von anaeroben Mikroorganismen im Flutwasser der ehemaligen Uranmine nachweisen. Insbesondere die anaeroben Sulfat- (SRB) und Eisen-reduzierenden Bakterien (IRB) sind für ihre Fähigkeit bekannt, Uran(VI) zu Uran(IV) zu reduzieren. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur möglichen mikrobiellen Reduktion von Uran(VI) unter Verwendung des

Flutungswassers und der darin vorhandenen Mikroorganismen durchgeführt. Zur Induzierung der mikrobiellen Aktivität wurde als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator 10 mM Glycerin direkt in das Flutungswasser gegeben. Nach sechs Wochen Inkubation bei 30 °C wurde mittels XANES- und UV-vis-Untersuchungen eine vollständige Reduktion zu Uran(IV) nachgewiesen. Die Ermittlung der bakteriellen Diversität nach sechs Wochen Inkubation ergab, dass es sich bei der Mehrheit der identifizierten Bakterien um IRB handelt (> 40 %). Somit zeigt sich, dass die mikrobielle Uran(VI)-Reduktion hauptsächlich durch die Anwesenheit von IRB hervorgerufen wird.

Schlussendlich konnten die erhaltenden Erkenntnisse der mikrobiellen Uran(VI)-Reduktion in eine Pilotanlage mit einem Volumen von 100 L überführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Ergebnisse auf industrielle Maßstäbe übertragbar sind. Damit konnte gezeigt werden, dass die mikrobielle Reduktion von Uran(VI) allein durch die Zugabe von 10 mM Glycerin bei zukünftigen Anwendungen als *in situ* Biosanierungsapplikationen auf dem Gelände der ehemaligen Uranmine Königstein genutzt werden könnte.

Zusammenfassend ergibt sich, dass im Rahmen dieser Arbeit die Wechselwirkungsmechanismen zwischen natürlich vorkommenden Mikroorganismen und Uran im Detail beschrieben und neue Zusammenhänge zwischen aktivem und inaktivem Stoffwechsel der Mikroorganismen gezeigt werden konnten. Somit können diese einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung von Biosanierungsansätzen für die Behandlung von Metall- und Radionuklid-kontaminierten Standorten aus der ehemaligen Bergbauindustrie leisten.

1 Introduction

1.1 Uranium mining activities in Germany and the former uranium mine Königstein

Due to the industrial mining and milling of uranium ores, one big challenge of this century is the management of radioactive waste and the protection of humans and the environment from its chemical and radiological impacts. Large areas of the environment were processed for nuclear energy and weapon production since the 1940s [1]. In Eastern Germany, hundreds of millions of cubic meters waste rock materials and tailings were left behind after the cessation of uranium mining [2]. A total of 231,000 metric tons of uranium were mined, making East Germany the fourth-largest producer of uranium worldwide [3]. Since 1991 the Wismut GmbH is responsible to carry out the closure of the former uranium mining sites in Eastern Germany, including their environmental remediation and clean-up of the complete surface areas [4]. These former mining sites are Ronneburg, Schlema, Königstein, Pöhla and Dresden Gittersee, with Ronneburg in Thuringia and Schlema in Saxony being the largest and most famous uranium mining locations [4].

Between 1960 and 1990, approximately 18,000 metric tons of uranium were mined at the former uranium mine in Königstein. The former mining site is located in Saxony close to Dresden (Figure 1.1). The site covers an area of approximately 6.5 km² and comprises four mine levels. The ore body is located in the 4th aquifer of the sandstone rock formation (Figure 1.2). It is situated in an ecologically sensitive area, due to the fact that the 3rd aquifer located above the ore body serves as an important water reservoir for the surrounding cities and therefore is environmentally very sensitive. During the first two decades, uranium was recovered using conventional mining methods, by blasting operations of the underground and transport of the rocks to surface, where it was further processed [5]. From 1984 onwards, uranium was mined by underground block leaching using sulfuric acid (2-3 g/L H₂SO₄), due to the decreasing uranium content within the sandstone [6]. As a result, the decommissioned mine displays high levels of pollutants,

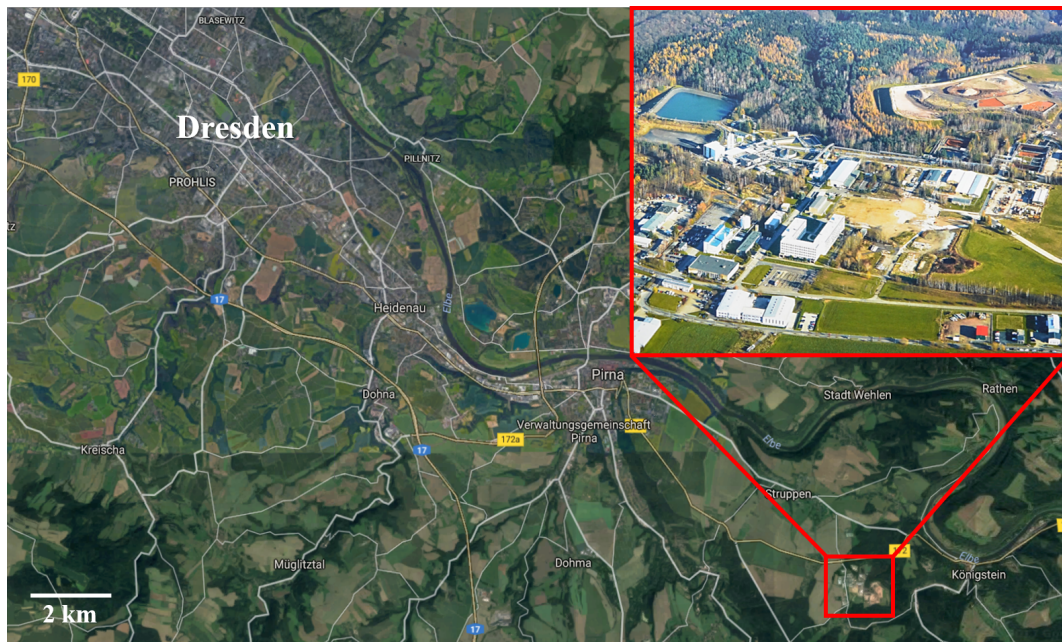


Figure 1.1: Geographic localization of the former uranium mining site Königstein (adapted after maps.google.de [access 03.11.2017 10:00]), with overview (red square) of the former mining site (picture library Wismut GmbH)

such as sulfate, heavy metals, and naturally occurring radionuclides (uranium and radium).

Since 2001, the former uranium mine is being remediated by controlled flooding up to a water level of 139.5 m above sea level [7]. The concept of the controlled flooding process was developed to avoid contamination of the overlaying aquifers, which is facilitated by the presence of the north fault (Figure 1.2 gray shaded area), a disturbance in the underground rock formation. Therefore, the flooding water is drained off, collected and pumped to the surface where it is purified in a laborious water treatment plant (Figure 1.1 overview red box) [8]. The controlled flooding will lead to a reduction of the pollutant concentrations, to the restoration of hydraulic conditions to near pre-mining settings, and finally prevent the migration of contaminations to nearby aquifers [9]. But, estimates of the Wismut GmbH suggest that, the treatment of the flooding water will be necessary for at least two to three decades from now.

1.2 Chemical composition of the flooding water in Königstein

As a consequence of the leaching with sulfuric acid, the flooding water in Königstein still displays a low pH of 2.8 to 3.0. The acidic conditions cause the mobilization of metals from the host rock, including uranium. With a uranium concentration between 8 mg/L and 13 mg/L, the flooding water displays a 10,000 times higher concentration as compared to surface waters [10] (limit for drinking water in Germany 0.01 mg/L). Not only the concentration of uranium is increased, but also the sulfate and iron contents. Together, these characteristics give rise to typical acid mine drainage (AMD) conditions. The formation of AMD is a consequence of sulfide-bearing materials, which are exposed to oxygen and water. The production often occurs in iron sulfide-aggregated rocks. However, the process of AMD formation may also occur naturally, mining industry can promote AMD generation simply through increasing the quantity of sulfides exposed [11]. AMD sites display a high risk to contaminate surface, groundwater, and soil, since some effluents generated by the metal mining industry contain large quantities of toxic substances, such as heavy metals, which have serious human health and ecological implications [12,13]. For that reason, it is an important task to remediate these contaminated former mining sites and prevent the pollution of the surrounding environment. The technical and chemical effort of conventional water treatment, associated with high costs, leads to a significant interest in alternative approaches [14]. A detailed table with all important parameters and chemical compounds within the flooding water is shown in Chapter 3.4 Table 1. Within the flooding water not only radionuclides like uranium and radium are present in high concentrations, also iron, manganese, arsenic and other metals occur in high amounts [16].

Aside from metals and ions, the total organic carbon (TOC) represents a major factor for microbial activity. Carbon compounds like humic matter, organic acids, carbohydrates or aminoamides represent important energy sources. Carbon can be present in different forms, soluble, particular, organic, or inorganic as CO_2 , HCO_3^- or CO_3^{2-} [17]. Within the flooding water a low concentration of around 1.0 mg/L TOC was detected and thus it is one of the limiting factors for microbial life and activity in the underground of the former mining site.

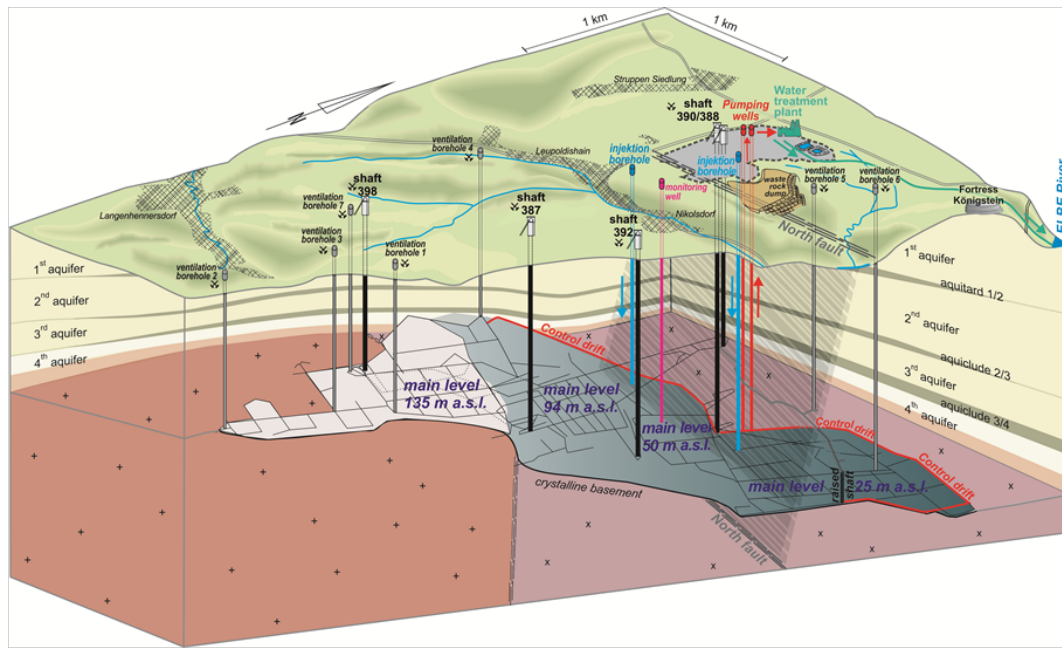


Figure 1.2: 3D geological view of the Königstein mining area (from [15]). The north fault is shown as grey shaded area.

1.3 Uranium

With the atomic number of 92 uranium belongs to the actinides, which are defined as elements with atomic number between 90 and 103. These elements subsequently fill up the 5f electron shell. The special property of actinides is their missing of stable nuclides, by meaning all isotopes of these elements are radioactive. Some isotopes occur as primordial nuclides (e.g. ^{235}U and ^{238}U). Due to their long half-life ($> 10^8$ years), they represent the composition of the earth since their evolution. Elements with an atomic number higher than uranium, transuranium elements, are not naturally occurring in the environment, they arise for example by neutron capture within reactors. Uranium is a heavy metal with the atomic mass for natural uranium of 238.03 g/mol. In nature, uranium occurs as three of its 23 known isotopes, ^{234}U (0.005 %), ^{235}U (0.72 %), and ^{238}U (99.27 %) [18]. The half-life of these uranium isotopes ranges from 2.5×10^5 to 4.5×10^9 years [19]. Due to its properties as a 'light' actinide, uranium exhibits a variety of stable oxidation states in solution. Based on the delocalization of the 5f electrons, the 5f orbital is overlapped with the 6d orbital [20]. The electron configuration of uranium is $[\text{Rn}]5f^3 6d^1 7s^2$.

The naturally occurring isotopes of uranium are α -emitters, which decay to radioactive daughters. At the end of the decay chain of ^{238}U , the non-radioactive ^{206}Pb occurs [21]. As the 49th most abundant chemical element in the Earth's crust and with a concentra-

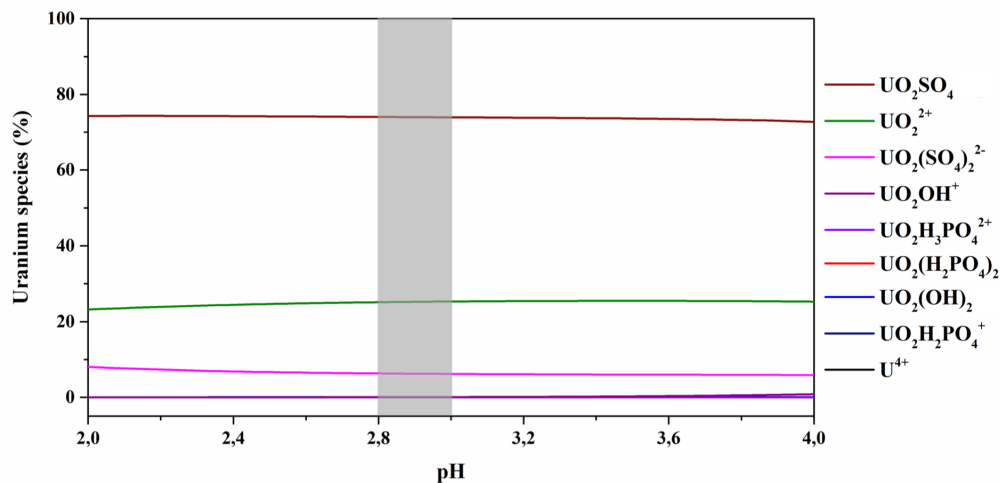


Figure 1.3: Speciation of uranium within the flooding water of the former uranium mine, under environmental conditions at a pH range of 2-4, grey area displays the prevalent pH conditions of the flooding water.

tion of 1 – 10 $\mu\text{g/g}$, uranium is not rare. By weathering processes, it can be transported to groundwater and other water systems. Nevertheless, the concentration of uranium in surface waters is low (10 $\mu\text{g/L}$) [22]. The toxicity of the heavy metal was investigated by several further studies. The chemical toxicity of soluble uranium compounds can even surpass the potential radiotoxic effects, under special circumstances [23].

The uranium transport behavior in nature is dependent on its chemical speciation. The oxidation states, in which it can occur, are +2, +3, +4, +5, and +6 [24, 25]. However, the oxidations states +2, +3, and +5 are unstable at environmental conditions. In nature, U(VI) and U(IV) are most frequent, though U(IV) is less soluble and usually forms the oxide mineral uraninite (UO_2). In contrast, U(VI) commonly forms soluble and sometimes highly mobile complexes. The oxidation states U(V) and U(VI) are able to form actinyl ions, so called uranyl ions, $[\text{O}=\text{U}=\text{O}]^{+2}$. In solution, uranium exhibits a complex redox behavior due to the different redox potential of different redox pairs (e.g. $\text{U(VI)/U(V)} = 0.088$; $\text{U(VI)/U(IV)} = 0.267$; $\text{U(IV)/U(III)} = -0.553$ at 298.15 K in water) [26, 27].

In addition, the pH value strongly influences the interaction mechanisms of uranium with the environment. The solubility can be altered by pH-dependent hydrolysis reactions, and thus can influence the sorption of uranium to inorganic matter [28]. Furthermore, the ionic strength as well as the type and concentration of inorganic ligands, and the prevalent redox potential play a crucial role for the speciation of uranium in natural aquatic systems. Besides the mentioned chemical factors, also biotic parameters

influence uranium mobility in natural environments. In particular, the bioavailability of uranium, meaning its ability to interact with indigenous microorganisms, depends on its concentration and physicochemical speciation. Evidence from previous studies suggest that UO_2^{2+} and UO_2OH^+ are the most bioavailable forms of uranium(VI) [29].

Within the flooding water of Königstein, at acidic pH value and under oxidizing conditions uranium mainly occurs as dissolved mobile uranium(VI) species, UO_2SO_4 (~73 %), UO_2^{2+} (~22 %), and $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$ (~10 %) (Figure 1.3). In addition to theoretical calculations, TRLFS studies confirmed these findings and displayed the highly mobile speciation form UO_2SO_4 [30]. However, in minor concentrations $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$ and UO_2OH^+ are present in the flooding water as well.

1.4 Metal-microbe interactions

As mentioned, indigenous microbial communities in the flooding water are able to interact with radionuclides, such as uranium, and other metals in multiple ways (Figure 1.4). For example, studies demonstrated that the binding to the surface of microbial cells may be more efficient than binding to surrounding inorganic components under specific conditions [31–33]. This ability of microbial cells to form metal complexes is primarily based on two facts: the usually high number of metal binding ligands, e.g. peptidoglycan, lipopolysaccharides, proteins and glycolipids, and the high surface-to-volume ratio. The chemical binding of metals to the surfaces of microbes will be affected by processes like ion exchange, complexation, adsorption, and electrostatic interactions [34, 35]. The present ligands on the surface of microbes include negatively charged, functional groups, like phosphate, carboxyl, hydroxyl, amino and thiol groups. The mentioned passive and rapid process, biosorption, is simply based on physical adsorption or chemical sorption [36, 37]. The process is only controlled by pH dependent protonation, and thus, is independent of the cell metabolism. Besides this well described passive biosorption, metabolism-dependent processes can also alter the migration behavior of metals and radionuclides. Active processes such as biotransformation, biomineralization, bioaccumulation, and complexation by microbially-generated compounds, can have mobilizing and immobilizing effects on uranium and other metals. The term bioaccumulation, in general, describes an interaction mechanism, whereby metals are taken up in an active process using metal transporters, located within the cell walls of the microorganisms. Compared to the fast process of biosorption, this interaction will generally be slower. So far, no specific transporters for uranium were identified which lead to the speculation For

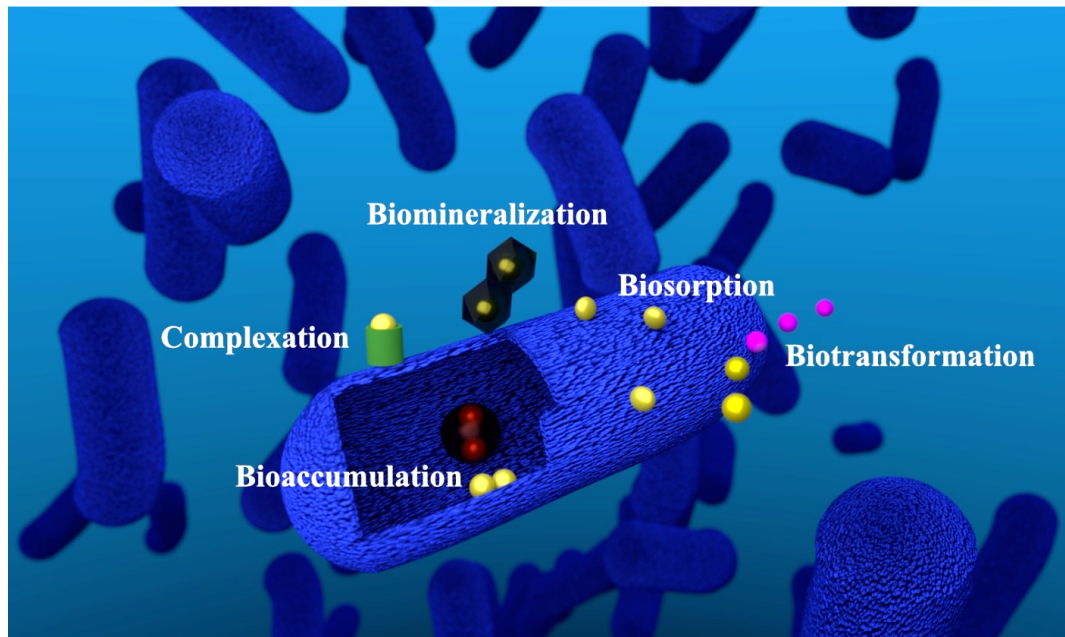


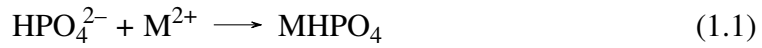
Figure 1.4: Interaction mechanisms of microorganisms and metals. Simplified model of a microbial cell interacting with uranium. Red structure within the cytoplasm shows uranium associated with polyphosphate granules.

uranium that it could be taken up faulty by other transporters, due to a mix up with essential ions like calcium [29,38]. As a consequence, the uranium uptake mechanism into cells is still not completely understood. However, recent studies assume that the uptake of uranium is metabolism-independent, and the transport occurs as a consequence of an increased permeability of the cell membrane due to a toxic stress reaction [39]. Nevertheless, the results in this thesis demonstrate, that active processes could be involved and that an active metabolism of the cells is required for uptake of uranium within the cells (Chapters 3.1 and 3.3). In addition, studies on bioaccumulation of uranium by bacterial cells have shown, that it was found associated in polyphosphate granules (Figure 1.4) [40].

Previous investigations revealed that these phosphate inclusions are important for the intracellular storage of divalent cations [37,41].

Another interaction mechanism which influences the uranium transport behavior in the environment is the mineralization of metals and radionuclides by organic or inorganic compounds released from microorganisms [42]. Biomineralization is distinguished between uranium-binding ligands that reduce its solubility and those that enhance solubility and mobility. This interaction mechanism includes the precipitation of mineral complexes, resulting from the release of microbial inorganic ligands, such as phosphates, carbonates and sulfides (Eqs. (1.1)–(1.3)) [38]. Another pathway for biologically-induced

precipitation is the release of reducing ligands. Previous studies identified microorganisms, which are able to release orthophosphate (inorganic phosphate, PO_4^{3-}) resulting from the activity of several enzymes, summarized as phosphatases. This enzyme activities are well described for a large variety of aerobic and anaerobic bacteria and for some archaea [43–50].

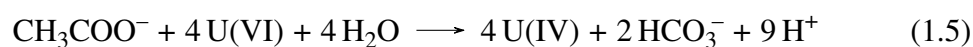
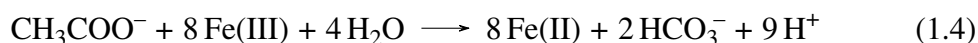


Specific microorganisms also produce organic compounds, that affect the mobility of uranium. One example is the release of humic substances resulting from the microbial degradation of complex organic matter. These complexes are very resistant to further biodegradation and consequently accumulate in nature [51]. These humic substances can be differentiated by acidity and chemical composition, resulting in humin (insoluble fraction), humic acid (soluble under alkaline conditions), and fulvic acid (soluble at all pH values) [52]. Humic and fulvic acids in particular are known to interact with uranium and thus influence its migration behavior in nature [53–59]. Nevertheless, humic substances could also be involved in the reduction of uranium(VI). They serve as terminal electron acceptors in microbial respiratory pathways and may subsequently donate these electrons to uranium(VI) [60, 61].

The production of bioligands is another interaction mechanism between microorganisms and metals. Well described compounds, which can interact with metals in highly efficient ways, are siderophores. Microorganisms usually form these chelating agents in case of iron deficiency. Siderophores increase the iron solubility due to their complexation with functional groups, in particular hydroxamate and catechol groups [62]. However, the binding of siderophores is typically not highly specific. Consequently, they can also increase the solubility of other metals and radionuclides, which leads to an increase in bioavailability. For example, the siderophores pyoverdine and desferrioxamin-B are known to enhance the mobility of uranium [63, 64].

Microbe-mediated oxidation and reduction processes, which lead to a chemical modification of metals and radionuclides caused by metabolic activity, are called biotransformation. The oxidation of uranium under aerobic conditions was demonstrated for several acidophilic microorganisms, such as the bacterial strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* [65] and the two archaeal species *Sulfolobusmetallicus*

and *Metallosphaerasedula* [66,67]. In contrast to the oxidation of uranium, the reduction takes place under anaerobic conditions. Thereby, anaerobic microorganisms transfer electrons from an electron donor to uranium(VI), and thus reduce it to uranium(IV). It is assumed that the reduction of uranium(VI) proceeds by a single-electron transfer to uranium(V), followed by disproportionation [68]. At circumneutral conditions, uranium(VI)/(IV) displays a similar redox-couple compared to Fe(III)/(II), thus iron-reducing bacteria are able to respire uranium(VI) as an alternative electron acceptor [69]. Eqs. (1.4) and (1.5) show the reaction of Fe(III) and uranium(VI) under anaerobic conditions, while acetate serves as an electron donor in the other half-cell reaction [69]:



Other groups of microorganisms are also able to reduce uranium(VI), including sulfate-reducing bacteria [70], fermentative bacteria [71], acido-tolerant bacteria [72], and myxobacteria [73]. Furthermore, a uranium reduction was demonstrated at high temperatures (about 100 °C), for *Pyrobaculumislandicum*, a hyperthermophilic archaeon [74]. Most of these microorganisms use the reduction of uranium(VI) to gain energy for growth, while others do not gain energy [75]. The speciation of the reduced uranium is frequently found to be uraninite (UO₂) [70,76]. Notably, abiotic uranium reduction by Fe(II) minerals [77–81] and additionally by biominerals [82–84] is also possible. However, under ambient environmental conditions, the majority of the studies suggest a direct enzymatic reduction as the dominant mechanism mediating uranium(VI) reduction [85,86].

In conclusion, the clear separation between the mentioned processes is not trivial and they will frequently be interconnected, e.g. in the formation of UO₂ through biotic reduction. It is, however, obvious, that microbial processes have a significant impact on the behavior of radionuclides across a wide range of environments and will be important in processing contaminated sites [87].

1.5 Bioremediation and field studies

Due to the reason, that toxic metals, in particular uranium, are not metabolic degradable, their remediation depends on an approach which decreases their bioavailability [88]. The initial step may be the increasing contaminant mobility for extraction or the im-

mobilization of the metal using sequestration, complexation, or change in speciation to reduce solubility [71]. All these mentioned mechanisms are exhibited in the microbial repertoire. To intelligently design practical applications and accurately predict long-term behavior, the mechanisms must be understood on the molecular level [88]. The need for developing bioremediation approaches is mainly due to the high costs, the technological limitations, and the lack of specificity of the present available physicochemical methods. Furthermore, the invasive physical clean-up, which includes excavation, transport, and disposal of wastes, as well as pumping and treatment of the flooding water could have drastic influences on the indigenous biodiversity and thus, could even increase human health risks [89]. For that reason, *in situ* bioremediation approaches could be advantageous, as they are expected to be cost-effective, more specific and environmental-friendly. Moreover, previous studies could demonstrate, that the recovery of metals using biological approaches is highly efficient, enabling the treatment of sites with low uranium concentrations which are not amenable to chemical methods [90].

For bioremediation approaches, it seems to be necessary to establish procedures based on metabolically active microorganisms. Therefore, industrial applications are primarily determined by the ability of the microorganisms to maintain and survive the radiation exposure and the chemical toxicity of uranium. On that account, highly tolerant strains would be beneficial. An example for a well-studied and eligible strain is *Deinococcus radiodurans*, which is able to maintain 5000 Gray [91]. The toxicity of actinides should not impede bioremediation approaches based on active and living microorganisms. The strains investigated in the present work, for example, displays high tolerances against uranium up to concentrations of 6.0 mM for *Rhodospiridium toruloides* (Chapter 3.3). Hence, it is obvious that the growth and metabolism of indigenous strains within the flooding water of Königstein is in principle possible at uranium-polluted sites.

The main focus for active microbial bioremediation applications of uranium-contaminated sites is based on uranium immobilization by precipitation caused by uranium(VI) reduction. The microbial reduction of highly soluble uranium(VI) into less soluble uranium(IV) minerals has been studied, as it promises a high potential. Encouraging microcosm experiments of polluted sediments from the inactive "Midnite mine" in Stevens County (WA, USA) and contaminated soils from "DOE NABIR field research center site" in Oak Ridge (TN, USA) were performed. The addition of organic substrates lead to the stimulation of microbial uranium(VI) reduction at both sites [92, 93]. The injection of ethanol stimulated the activity of indigenous microorganisms, as a consequence of which uranium(VI) levels were drastically reduced from about 50 mg/L to

less than 30 µg/L within two years. Subsequent studies on the microbial diversity revealed a high abundance of metal reducing bacteria such as *Geobacter*, *Shewanella* and *Desulfovibrio* [94].

Another example of successful bioremediation was conducted at a former uranium ore processing facility, "Old Rifle" (CO, USA). Here, acetate was injected into the subsurface, resulting in a decrease of uranium(VI) concentration within 50 days from initial values of 0.4 and 1.4 µM to less than 0.18 µM [95]. Also in this case, the microbial composition was determined, which displayed in particular *Geobacter* species as dominant representatives, indicating that they are key players in the uranium(VI) reduction [96].

Nevertheless, it has to be mentioned, that the successful bioremediation strongly depends on the surrounding conditions. For instance, in the presence of oxygen and rather high nitrate concentrations under highly acidic conditions, the uranium(VI) reduction was suppressed in microcosm experiments with sediments from the FRC aquifer (Oak Ridge, TN, USA) [97].

Besides the microbial uranium(VI) reduction under anoxic conditions, one alternative approach at oxygenated conditions could be the precipitation of uranium in the form of insoluble inorganic compounds. Previous studies investigated the bioprecipitation of uranium by the activity of non-specific phosphatases, which are expressed by a large variety of aerobic and anaerobic bacteria [45, 98–100]. It is well-described, that these enzymes release inorganic orthophosphate from organic phosphate compounds. The released orthophosphate interacts with uranium and causes the precipitation of inorganic uranyl phosphate minerals which are formed in the surrounding aqueous system or directly on the cell surface of the microbes. Studies on different *Pseudomonas* strains, which were able to release sufficient amounts of orthophosphate, demonstrated the applicability of this interaction mechanism as a possible bioremediation approach. The release of orthophosphate was stimulated by the addition of an organic phosphate source and simultaneous overexpression of phosphatase genes [101].

Furthermore, studies were performed to investigate the possible application of biosorption for bioremediation approaches. Their outcome suggests that the availability of uranium-binding sites may limit biosorption as use for biotechnological processes. Moreover, the insufficient stability and specificity of biosorbents resulted in little progress for industrial application [102]. For that reason, the authors concluded that the commercial application of biosorption is rather limited, and therefore is likely to be used in approaches as a supporting process [103]. However, the process of biosorption is substantially faster compared with direct bioreduction. On that account, several previous

studies on biosorption have shown their potential use within these approaches [103–105]. In conclusion, all these case studies show that the use of microorganisms for remediation applications depend on the surrounding conditions and thus, it seems to be necessary to develop adjusted solutions. Nevertheless, many field studies could prove the applicability of *in situ* bioremediation approaches.

1.6 Microbial diversity within the flooding water of Königstein

Even though AMD waters are known to be toxic the majority of microorganisms [106, 107], they can contain highly-specialized diverse microbial life [108]. Despite the harsh conditions in the flooding water of the former uranium mine Königstein, investigations on the microbial diversity displayed a high number of metabolically active microorganisms [109]. As a consequence of the controlled flooding, the diversity in the underground changes drastically. Previous investigations during the beginning of the flooding process have shown a poor biodiversity at so far unflooded shafts. In the bacterial community mainly, betaproteobacteria (> 60 %) were detected, which were dominated by the species of *Ferrovum myxofaciens*. Besides this obligate chemolithotrophic iron-oxidizing bacteria, also the sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, could be identified in lower abundances. In addition, also in minor amounts iron-reducing bacteria such as *Acidocella* spp. and *Acidiphilum* spp. were detected [109]. In addition, eukaryotes could also be identified in the microbial community. Five classes of metabolic active microorganisms were found: Heteroblosea, Fungi, Opithokonta, Cercozoa, and Ciliophora. However, the majority of the obtained sequences (88.5 %) were identified as unclassified eukaryotes [109].

In contrast, after about ten years in the ongoing flooding process the bacterial diversity was dominated by alpha-, beta-, and gammaproteobacteria, mainly by the phylogenetic groups of Nitrospira, Firmicutes, Acidobacteria, and TM7. The dominating iron oxidizing bacterium (IOB) *F. myxofaciens* could not be detected and was assumed to be displaced by *Acidithiobacillus* spp. The bacterial diversity is still dominated by iron oxidizing and reducing bacteria, as well as sulfur oxidizing bacteria. Furthermore, by culture-dependent approaches sulfate reducing bacteria were found and identified, with the major species *Desulfosporosinus* spp. In addition to bacteria, also archaea were detected. The dominating group of this domain was Thermoplasmata. In addition to bacteria and archaea, also eukaryotes were investigated. Interestingly, compared to the

conditions before the flooding process, less eukaryotic diversity and also differences in the composition was found in the flooding water [109].

Investigations on the microbial diversity within the flooding water of the former uranium mine Königstein, as well as other previous studies on AMD sites demonstrate that environmental factors influence the microbial communities tremendously. Thus, pH, temperature, concentration of dissolved metals and other solutions, total organic carbon, and dissolved oxygen shape the AMD associated microbial diversity [110]. AMD sites triggered by anthropogenic mining activities represent a significant environmental problem. The associated microbiome is restricted to almost a few abundant taxa of specialized archaea and bacteria. Such habitats comprise unique microorganisms with novel metabolic functions selected to deal with the harsh conditions [110].

1.7 Aims of the study

The challenge of this thesis was to gain new insights in the microbial interactions of natural occurring organisms with uranium(VI). In particular, the objective was to understand the impact of indigenous microorganisms within the flooding water of the former uranium mine Königstein on the migration behaviour of uranium(VI) to investigate possible strategies on *in situ* bioremediation approaches. The gained knowledge could be used to develop new setups to improve the existing waste water treatment plant and to eventually replace the conventional treatment using *in situ* bioremediation.

Therefore, investigations on natural occurring microorganisms isolated from the flooding water with uranium(VI) were performed. The existing knowledge of the interaction mechanisms between indigenous microorganisms and uranium(VI) is limited. Several investigations on well-studied model organisms were performed, but the underlying molecular mechanisms are still not completely understood. For that reason, experiments performed in this thesis should help to answer the following questions:

1. Are indigenous microorganisms adapted towards high heavy metals concentrations, compared to strains isolated from non-contaminated sites?
2. How do strains isolated from flooding water interact with uranium(VI) and which interaction mechanisms took place?
3. Are natural occurring microorganisms able to remove high amounts of uranium(VI) from surrounding solutions, and furthermore are they suitable candidates for *in situ* bioremediation approaches?

4. Is the usage of indigenous microorganisms for bioremediation strategies advantageous, and why could they be a better alternative compared to well-studied model organisms?
5. How is the metabolism of microbes involved in the uranium removal capacity and is it necessary for possible bioremediation processes to work with living microorganisms?
6. Where is the uranium located when associated with cells and which functional groups are involved on these immobilization process?
7. Despite oxidizing conditions within the flooding water, are anaerobic microorganisms active and are they able to interact with uranium by redox reactions?
8. Are the obtained results in this thesis transferable to industrial scale applications, to prove the applicability for on-site bioremediation by using indigenous microorganisms?

2 Summary of the Manuscripts

2.1 Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI)

Gerber U, Zirnstein I, Krawczyk-Bärsch E, Lünsdorf H, Arnold T, Merroun ML (2016) **J Hazard Mater 317:127-134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.062.**

In this manuscript the interaction mechanisms of the betaproteobacterium *A. facilis* with uranium(VI) were investigated. This strain was detected within the flooding water of the former uranium mine Königstein by culture-independent methods. *A. facilis* was studied to figure out the possibility of its use for *in situ* bioremediation approaches. The cells show a fast and effective capacity to remove uranium from solution and the strain has a high tolerance for uranium, withstanding concentrations of up to 0.1 mM. Thus, our results could demonstrate, that the investigated bacterial strain *A. facilis* could be a suitable candidate for *in situ* bioremediation of the flooding water in Königstein as well as for other contaminated waters.

Contribution of the authors

<u>Ulrike Gerber:</u>	concept and design of all experiments, performed all experiments, evaluation of the data, preparation of the manuscript, <u>overall own contribution: 80 %</u>
Isabel Zirnstein:	phylogenetic calculations
Evelyn Krawczyk-Blärsch:	supervision of the project, discussion of the results, corrections of the manuscript
Heinrich Lünsdorf:	TEM sample preparation and TEM analyses, corrections of the manuscript
Thuro Arnold:	co-supervision of the project, corrections of the manuscript
Mohamed L. Merroun:	discussion of the results, supervision of the project, corrections of the manuscript

2.2 Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* for bioremediation purposes

Krawczyk-Bärsch E, Gerber U, Müller K, Moll H, Rossberg A, Steudtner R, Merroun ML (2017)

J Hazard Mater 347:233–241. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.030.

By multidisciplinary characterization combining aqueous chemistry, TEM, EXAFS, TRLFS and ATR FT-IR the interaction mechanisms of *A. facilis* with uranium(VI) were studied on the molecular level. The results from kinetic batch experiments demonstrate that uranium is bound preferentially to phosphoryl and carboxyl functionally groups of the outer membrane. The findings obtained from this study contribute to a better understanding of the fate and transport of uranium within contaminated environments and improve the possibility to use this bacterial strain for future bioremediation applications.

Contribution of the authors

<u>Ulrike Gerber:</u>	concept and design of experiments, laboratory work, evaluation of the data, co-preparation of the manuscript, <u>overall own contribution: 50 %</u>
Evelyn Krawczyk-Blärsch:	supervision of the project, discussion of the results, preparation of the manuscript
Katharina Müller:	evaluation of the <i>in situ</i> ATR FT-IR data
Henry Moll:	evaluation of the EXAFS data
André Rossberg:	evaluation of the EXAFS data
Robin Steudtner:	evaluation of the TRLFS data
Mohamed L. Merroun:	performed TEM analyses, discussion of the results, supervision of the project, corrections of the manuscript

2.3 Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospidium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine

Gerber U, Hübner R, Rossberg A, Krawczyk-Bärsch E, Merroun ML
Submitted to PLOS ONE (29/03/2018), first revision (16/05/2018)

The aim of this study is to investigate the indigenous strain KS5 (*R. toruloides*) isolated from the flooding water of the former uranium mine Königstein and its interaction mechanism with uranium. Tolerance tests demonstrate that the isolated yeast exhibits high tolerance towards uranium and chromium, in contrast to a tested reference strain. These findings indicate, the strain has developed adaption mechanisms as a response to the surrounding conditions, i.e. high concentration of uranium and other heavy metals. In addition, the uranium removal capacity was studied and revealed a high uranium immobilization capacity. In temperature-dependent experiments, a metabolism-dependent uranium interaction could be demonstrated. TEM analyses identified the main interaction mechanisms of active bioaccumulation. The investigations revealed that KS5 could be used for bioremediation approaches due to its high tolerance und removal capacity of uranium.

Contribution of the authors

<u>Ulrike Gerber:</u>	concept and design of all experiments, laboratory and field work, preparation of TEM samples, evaluation of the data, preparation of the manuscript, overall own contribution: 80 %
René Hübner:	performed TEM analyses, corrections of the manuscript
André Rossberg:	evaluation of the EXAFS data
Evelyn Krawczyk-Bärsch:	supervision of the project, discussion of the results, correction of the manuscript
Mohamed L. Merroun:	performed TEM (elemental distribution) analyses, discussion of the results, co-supervision of the project, corrections of the manuscript

2.4 Microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water of a former uranium mine - a possible bioremediation approach

Gerber U, Schäfer S, Röder G, Lehmann S, Zirnstein I, Krawczyk-Bärsch E, Rossberg A

In preparation for submission

In this manuscript, the interaction mechanisms of anaerobic microorganisms with uranium(VI) directly within the flooding water were studied. To stimulate the metabolic activity of indigenous anaerobic microorganisms, glycerol as a carbon source and possible electron donor was added to the flooding water. During six weeks of incubation, reduction of uranium(VI) to uranium(IV) by microorganisms could be induced. The transformation of the highly soluble uranium(VI) into the less soluble uranium(IV) driven by microbial activity could be the basis of bioremediation processes directly on site of contaminated environments. Anaerobic microorganisms present within the flooding water of the former uranium mine Königstein showed fast and efficient reduction of uranium(VI). To verify the obtained results performed in lab scale experiments a pilot plant was designed. The results could be confirmed and show the high potential to use these specialized anaerobic microbes for *in situ* bioremediation.

Contribution of the authors

<u>Ulrike Gerber:</u>	concept and design of all experiments, laboratory and field work, evaluation of the data, preparation of the manuscript, <u>overall own contribution: 80 %</u>
Sebastian Schäfer:	laboratory and field work (pilot plant)
Grit Röder:	laboratory and field work
Susanne Lehmann:	UV-vis spectroscopy
Isabel Zirnstein:	culture-independent analyses of the microbial diversity
Evelyn Krawczyk-Bärsch:	supervision of the project, discussion of the results
André Rossberg:	XANES data evaluation, discussion of the XANES results

3 Manuscripts

3.1 Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI)

Gerber U, Zirnstein I, Krawczyk-Bärsch E, Lünsdorf H, Arnold T, Merroun ML (2016) **J Hazard Mater 347:233–241. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.030**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI)



U. Gerber^{a,*}, I. Zirnstein^b, E. Krawczyk-Bärsch^a, H. Lünsdorf^c, T. Arnold^a, M.L. Merroun^d

^a Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Resource Ecology, P.O. Box 510119, 01314 Dresden, Germany

^b Research Institute of Leather and Plastic Sheetting (FILK) gGmbH, Meissner Ring 1-5, 09599 Freiberg, Germany

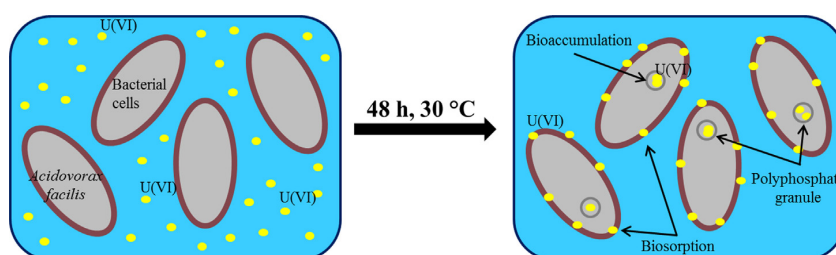
^c Helmholtz Centre for Infection Research, Central Facility for Microscopy, Inhoffenstr. 7, D-38124 Braunschweig, Germany

^d University of Granada, Department of Microbiology, Campus Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

HIGHLIGHTS

- *Acidovorax facilis* is able to remove 130 mg U/g dry biomass from solution.
- Kinetically temperature-dependent uranium removal was studied.
- Cell viability and metabolic activity was tested by flow cytometry.
- Uranium was removed by active biosorption and passive bioaccumulation.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2016

Received in revised form 17 May 2016

Accepted 19 May 2016

Available online 20 May 2016

Keywords:

Acidovorax facilis

AMD

Uranium

In situ bioremediation

Flow cytometry

Metal tolerance

ABSTRACT

The former uranium mine Königstein (Saxony, Germany) is currently in the process of remediation by means of controlled underground flooding. Nevertheless, the flooding water has to be cleaned up by a conventional wastewater treatment plant. In this study, the uranium(VI) removal and tolerance mechanisms of the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* were investigated by a multidisciplinary approach combining wet chemistry, flow cytometry, and microscopy. The kinetics of uranium removal and the corresponding mechanisms were investigated. The results showed a biphasic process of uranium removal characterized by a first phase where 95% of uranium was removed within the first 8 h followed by a second phase that reached equilibrium after 24 h. The bacterial cells displayed a total uranium removal capacity of 130 mg U/g dry biomass. The removal of uranium was also temperature-dependent, indicating that metabolic activity heavily influenced bacterial interactions with uranium. TEM analyses showed biosorption on the cell surface and intracellular accumulation of uranium. Uranium tolerance tests showed that *A. facilis* was able to withstand concentrations up to 0.1 mM. This work demonstrates that *A. facilis* is a suitable candidate for *in situ* bioremediation of flooding water in Königstein as well as for other contaminated waste waters.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: u.gerber@hzdr.de (U. Gerber).

1. Introduction

The former uranium mine of the WISMUT GmbH near Königstein (Saxony, Germany) was one of the biggest uranium mines in Eastern-Germany. Here, uranium was leached from the sand-

stone using sulfuric acid. Since 2001, controlled flooding of the mine has been implemented for remediation purposes [1]. Due to the leaching process the flooding water is characterized by a low pH of 2.9 and high concentrations of uranium (13 mg/L) and other heavy metals [2]. Because of the potential risk of uranium mobilization from the flooding waters into neighboring aquifers, particularly the aquifer utilized by the nearby city of Pirna, only half of the mine has been flooded. By doing so, the flooding water can be pumped to the surface and purified by a conventional and intensive wastewater treatment plant [3]. Notably, the flooding water also contains a high concentration of sulfate originating from the sulfuric acid leaching, which has resulted in the formation of acid mine drainage (AMD). AMD is a major problem that often occurs in the mining industry. AMD waters are characterized by high sulfate concentrations and high metal content at low pH values. Despite the fact that it is known to be toxic to aquatic organisms [4,5] uranium plays a major role in the ecosystem of the Königstein flooding water [2]. In bulk solutions, uranium predominantly occurs as aqueous species, such as highly mobile UO_2SO_4 -species that has been identified in the AMD flooding water [2]. It is an important task to remove the uranium and further associated toxic metals from AMD waters to prevent environmental pollution. The technical effort and high cost of conventional metal remediation techniques based on chemical applications [6] leads to a non-negligible interest for alternative treatments.

The transport of uranium is governed by the contrasting chemistry of U(IV) and U(VI). U(VI) generally forms mobile aqueous complexes with carbonate and hydroxide, while U(IV) precipitates as the highly insoluble mineral uraninite [7]. The highly soluble form UO_2SO_4 that is present in the flooding water in Königstein could easily migrate into the groundwater, and thus could contaminate drinking water. Nevertheless, migration processes are strongly influenced by abiotic factors such as ions, pH, and minerals [8–11]. Furthermore, microbial interactions can influence the mobility of radionuclides and their migration behavior as well.

AMD waters are known to contain abundant microbial life [12,13]. Indigenous microorganisms could be used for bioremediation purposes since they are known to interact with metals and radionuclides in a variety of ways: (i) by biosorption where the metal is passively sorbed onto functional groups of the cell surface [14,15], (ii) by bioaccumulation where the metal is actively taken up into the cell [16,17,18], (iii) by biotransformation where the metal will be reduced or oxidized by the microorganism [19,20,16], or (iiii) by biomineralization [21,22]. Hereby, microorganisms could change the speciation of radionuclides and influence their mobility.

In this study, the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* (*A. facilis*, former name *Pseudomonas facilis*) [23] was used to investigate the interactions between uranium(VI) as a representative microorganism that would be found in the flooding water of Königstein. *A. facilis* is ubiquitously distributed in the nature and a common soil microorganism. The bacterial cells are rod-shaped and at in vitro growth 2 μm long. It belongs to the family of Comamonadaceae [24] and grows aerobically. Flow cytometry studies were used to analyze the cell viability together with the metabolic activity of bacterial cells brought in contact with uranium. The multiparameter flow cytometry has become a powerful tool over the last 20 years [25]. This technique allows a fast and single-cell analysis. Furthermore, the interactions of *A. facilis* with uranium were investigated for the first time and results emphasize a significant potential of uranium removal in dependence with the metabolism. In order to obtain detailed information about local deposit of removed uranium by *A. facilis*, ultrastructural analysis by transmission electron microscopy (TEM) in combination with electron energy-loss spectroscopy (EELS) was performed. These results provide new insight on the interaction of bacterial cells with

uranium, and consequently, the potential to use bacterial cells for *in situ* bioremediation of contaminated AMD waters.

2. Methods and material

2.1. Water sampling, cultivation of acidophiles

Samples (5 L) of flooding water from the uranium mine Königstein (Germany) were taken for the cultivation of aerobic, acidophilic microorganisms. The transport took place at 4 °C and maintained at temperature until further processing (at the latest 24 h). For isolation of iron- and sulfur-oxidizing bacteria, 100 μL of the sampled mine water were streaked onto solid FeTSB medium [26] and incubated at 28 °C for up to 4 weeks. Bacterial colonies were then divided into those that were ferric iron encrusted (i.e., iron-oxidizing bacteria) and those that were not (i.e., acidophilic heterotrophs). Purification of cultures was achieved by repeated plating and single-colony isolation.

2.2. Organism and culture conditions

The strain of *Acidovorax facilis* was kindly provided by the Centre for Environmental Research – UFZ in Leipzig (Germany), Department of Environmental Microbiology (Antonis Chatzinotas). The cells were grown in Nutrient Broth medium (NB) (Peptone 5.0 g/L and Beef Extract 3.0 g/L, pH 7.0 \pm 0.2, Sifin, Berlin, Germany) at 30 °C and 120 rpm on a rotary shaker (Thermoshake, EA2, Gerhardt, Königswinter, Germany) overnight.

2.3. Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of uranium for bacterial growth

For the uranium tolerance test, cells were grown in NB overnight at 30 °C and 130 rpm in 500 mL flasks. Cells were washed twice in aqueous 0.9% NaCl. A cell suspension of 100 μL with an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.5 were plated onto solid agar plates containing NB medium 1:5 diluted with the adjusted metal concentrations from 0.01 mM to 1.0 mM uranium, which was added as $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$. The plates were incubated for 48 h at 30 °C. The minimal inhibitory concentration (MIC), which is defined as the lowest concentration to prevent bacterial growth and colony formation, was determined in triplicates.

2.4. Uranium interaction experiments – removal capacity for uranium

For uranium interaction experiments, cells were grown in NB medium overnight at 30 °C at 130 rpm till an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 2.0 was reached. The cells were washed two times with sterilized tap water with a pH adjusted to 5.0. Washed cells were diluted to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 1.0 (12.0 \pm 1.0 mg dry weight/mL) with sterilized tap water at pH 5.0. A solution of $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ (0.1 M) was added to a final concentration of 0.05 mM and 0.1 mM, respectively. For temperature dependent experiments at 4 °C and 30 °C, cells were washed and suspended in sterilized tap water pH 5.0 that was acclimated to 4 °C or 30 °C. Cell suspensions were incubated at the selected temperature for 48 h and 130 rpm. All experiments were carried out in triplicates. After distinct times (5 min, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 24 h, 30 h, 48 h), samples were taken to determine residual uranium concentrations in the supernatant. These samples were centrifuged for 5 min at 13,000 rpm at room temperature (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and the supernatant was taken for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry measurements (ICP-MS) using an ELAN 9000 type ICP-MS spectrometer (Perkin Elmer, Überlingen, Germany). Passive adsorption experiments of uranium onto dead cells were performed using cultures grown overnight that were immediately autoclaved for 20 min at 121 °C

and 1 bar. Autoclaved cells were assayed using the same method as living cells as is described above. The amount of removed uranium from the solution was normalized to the dry biomass after drying the cell pellet for 24 h at 100 °C in an oven (Mettler UE500, Schwabach, Germany).

2.5. Energy-filtered transmission electron microscopy (EF-TEM) and electron energy-loss spectroscopy (EELS)

When uranium interaction experiments were performed the supernatant was removed and the cell pellet was washed twice with 20 mM Hepes at pH 7.2 for 5 min at 6000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Subsequently, they were fixed at 1% (vol/vol) Glutaraldehyde from 50% (v/v) stock (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Sample preparation with minor modifications was done according to [27]. After immobilization in 1% (w/v) aqueous low melting agarose (Life Technologies Inc., Darmstadt, Germany), cells were dehydrated by an ethanol series (10, 30, 50, 70, 90, 100% for 2 min on ice; 100% for 15 min at room temperature) followed by ERL-resin impregnation and polymerization [28]. Ultrathin sections of 35–40 nm were cut with a diamond knife (EMS, Munich, Germany) and analyzed with an in-column energy-filter TEM (LIBRA 120plus, Zeiss, Oberkochen, Germany) at nominal magnifications of $\times 4000$ – $\times 50,000$, and an energy setting as is described in Ref. [27].

2.6. Live-dead staining

After the uranium interaction experiments, cells were harvested by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min and subsequently washed with 0.9% NaCl solution. Afterwards, the cells were stained with the LIVE/DEAD[®] BacLighlyt[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) with propidium iodide and SYTO[®]9 following the user instructions (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf>). The fluorescent dye propidium iodide can only enter cells with injured/impaired cell membranes, thus staining dead cells in red. In contrast, SYTO[®]9 can diffuse through intact cell membranes into the cells staining them green (living cells). Application of both dyes allows the discrimination of dead and living cells. To 330 μ L cell suspension, 1 μ L of the staining solution was added. After incubation at ambient temperature for 10 min in the dark, the cells were washed again to remove the unbound stains. The washed and stained cells were diluted in 330 μ L 0.9% NaCl. For the microscopically investigations, an Olympus light microscope-BX-61 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany), combined with BX-UCB (control box) and U-RFL-T (power supply for the 100 W mercury lamp) was used. Fluorescence microscopy at wavelengths between 420 and 460 nm was performed using a super-wide band filter mirror unit (U-MSWB, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany).

2.7. Flow cytometry studies

An inoculum of an overnight culture was added to 1:5 diluted NB medium either without uranium as a control or containing a uranium concentration of 0.05 mM or 0.1 mM. The cells were grown for 48 h at 30 °C and 130 rpm. All experiments were done in triplicates. After incubation, the cells were harvested by centrifugation at 8000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 10 min and washed twice with 35 °C warmed Phosphate Buffered Saline (PBS). Afterwards, the cells were immediately dissolved in PBS to approximately 10^6 cells/mL. An aliquot of the cells were incubated for 45 min at 80 °C as the 'dead' control. The cell viability test was done with propidium iodide (PI) and fluorescein diacetate (FDA). The dyes were added to a final concentration of 2 μ L/mL for PI and 20 μ L/mL FDA. To measure metabolic activity as a

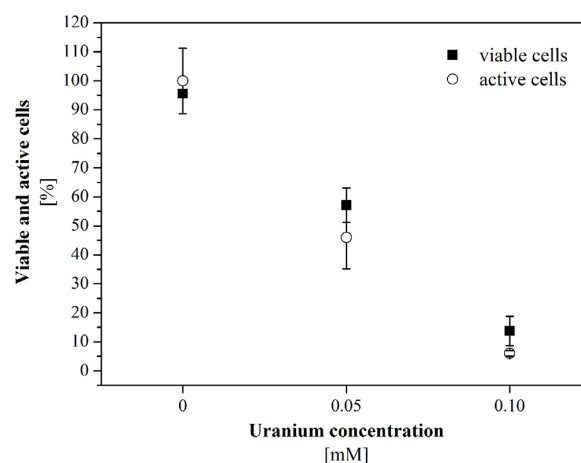


Fig. 1. Cell viability and metabolic activity. Percentage of viable cells after cell viability test (squares) stained with PI and FDA. Percentage of active cells (circles) after metabolic activity test stained with DiOC₆.

response of the membrane potential, 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆) was added with a final concentration of 10 μ M. The cell suspension with the different staining was incubated 15 min in the dark at ambient temperature. Microbial suspensions incubated in the presence of both stains (PI and FDA) simultaneously were analyzed by flow cytometry for non-viable/dead (red) and viable (green). Samples were analyzed using a FACSCantoII cytometer Becton Dickinson (San Jose Palo Alto, California), equipped with three lasers: 488 nm blue, 620 nm red, and 405 nm violet.

3. Results

3.1. Uranium tolerance of *A. facilis*

3.1.1. Determination of minimal inhibitory concentrations of uranium in solid media

To evaluate the uranium tolerance levels of *A. facilis*, solid agar plates with increasing metal concentrations were inoculated and examined for cell growth and formation of colonies. The results obtained indicated that the cells were able to grow at up to 0.1 mM uranium (maximal tolerated concentration, MTC). The Minimal inhibitory concentration (MIC) for the growth of this bacterial strain was 0.2 mM.

3.1.2. Cell viability and metabolic activity

The uranium tolerance of *A. facilis* was also studied by flow cytometry using the live-dead staining approach (cell viability); test were conducted with PI and FDA together with DiOC₆ (metabolic activity) that stains active cells. The cell viability test is based on the use of a kit containing these two stains, both, which stain nucleic acids. FDA stains viable cells, and thus is able to enter all cells, whereas PI enters only cells with damaged membranes, i.e. dead cells.

The percentages of viable and active cells of the bacterial population treated with uranium concentrations ranging from 0.05 to 0.1 mM during 48 h are displayed in Fig. 1 (histograms see Fig. 2). In absence of uranium, 95.6% of the cells were viable (Fig. 2b) and 100% of the cells were active stained. For comparison, the dead control exhibited 100% dead cells (Fig. 2a). The results of the cell viability test showed a decrease in function with increasing uranium concentration. At 0.05 mM of uranium, 57% of the cells (Fig. 2c) exhibited intact cell membranes and thus were viable. At 0.1 mM, cytotoxic concentration had been reached, as 86.3% of total cells

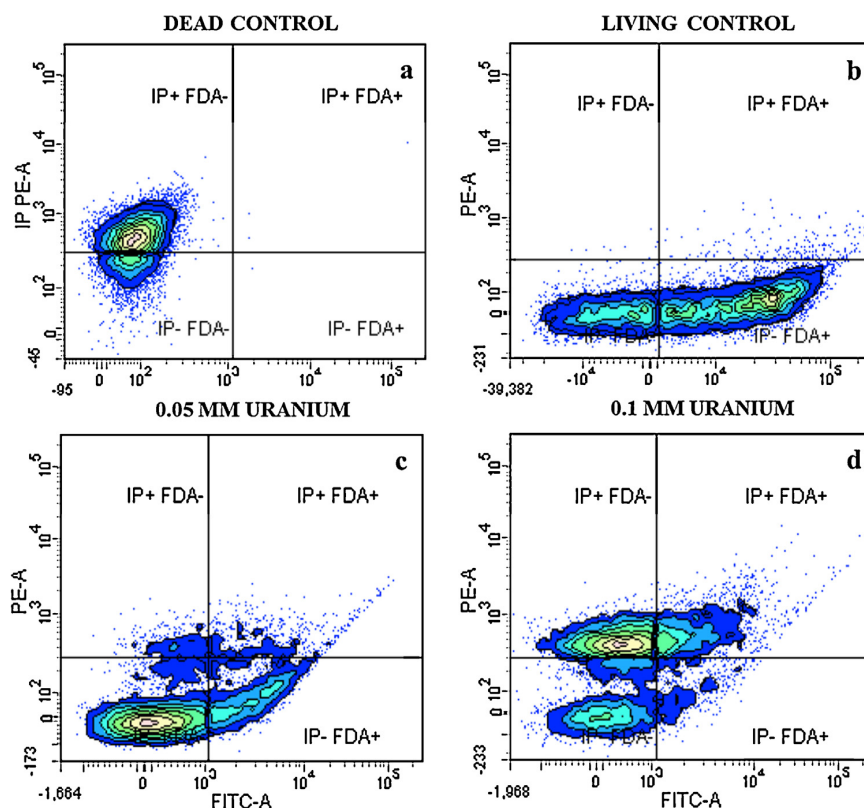


Fig. 2. Histograms of cell viability. Dead control (a), living control without uranium (b), with 0.05 mM uranium (c) and with 0.1 mM uranium (d). Cells were stained with FDA and PI. IP+ FDA- (cells positive for PI, and negative for FDA, non-viable cells), IP+ FDA+ (cells positive for both stains, non-viable cells), IP- FDA- (cells negative for both stains, unstained cells), IP- FDA+ (cells positive for FDA, viable cells).

(Fig. 2d) were not viable. To examine the effect of uranium on the metabolic activity of the bacterial cells the fluorescent dye DiOC₆ was used. This dye shows fluorescence as a function of the membrane potential and can be used as a test of metabolic activity, where only viable cells should exhibit an intact electrochemical membrane potential [29,30]. The results of the oxidative stress response (Fig. 1, circles) were comparable to the cell viability test. At a uranium concentration of 0.05 mM, 46% of the cells were active, whereas at 0.1 mM, only 6% of the cells were stained active. This indicates that with increasing uranium concentration the metabolic activity of the cells decreases.

Compared with the results of cell viability, the metabolic activity displays nearly the same results, and thus correlates significantly. The results of the flow cytometry showed *A. facilis* to be quite tolerant against a uranium concentration of 0.05 mM. At twice the uranium concentration, fewer of the total cells were viable.

3.2. Uranium interactions

3.2.1. Uranium removal by *A. facilis*

In Fig. 3a, the uranium removal capacity at 0.05 mM (filled circles) and 0.1 mM (empty squares) of living bacterial cells is presented. The equilibrium of uranium removal was reached after the first 8 h. The uranium removal occurred quite rapidly, and at both concentrations metabolically active cells were able to remove nearly 100% of the initial uranium concentration from the solution after 24 h incubation time. At an initial dry biomass (DBM) of 12 ± 1 mg, the cells of *A. facilis* removed around 45 mg and 100 mg of uranium at a metal concentration of 0.05 mM and 0.1 mM, respec-

tively. After 24 h, maximum removal capacity by bacterial cells was reached and no changes were visible.

Uranium removal within the first 8 h indicates a fast, and therefore likely passive process. In order to determine the active uptake of uranium, the removal capability was additionally tested with dead cells at initial uranium concentrations of 0.05 mM and 0.1 mM, respectively. An overnight culture was autoclaved and dead cells were subsequently tested using the same method as the living cells of *A. facilis*. Fig. 3b shows similar removal capacity of dead cells in comparison to that of living cells. However, maximum removal was reached after 5 min incubation, which was remarkably faster than observed for the removal of uranium and not the case for the living cells. Experiments with dead cells revealed no time-dependent component for the removal of uranium, which was not observed for living cells. During the 48 h period of incubation, there was no remobilization of cell-bound uranium observed.

To test the effect of temperature on the removal capacity of uranium by *A. facilis*, two different temperatures, i.e. 4 °C and 30 °C, were chosen (Fig. 3c). The results show a distinct temperature-dependence of uranium removal. At 30 °C (filled squares) after an incubation time of 48 h, cells removed about 100 mg U/g DBM, whereas at 4 °C (empty squares) only 65 mg U/g DBM were removed by the cells. At 2 h of incubation, the first noticeable differences were detectable. Cells removed higher amounts of uranium (40 mg/g DBM) at a temperature of 30 °C relative to experiments performed at 4 °C.

To determine the uranium removal capacity as a function of the dry biomass, different amounts of dry masses were tested (Fig. 3d). Results indicated that with decreasing dry mass the ura-

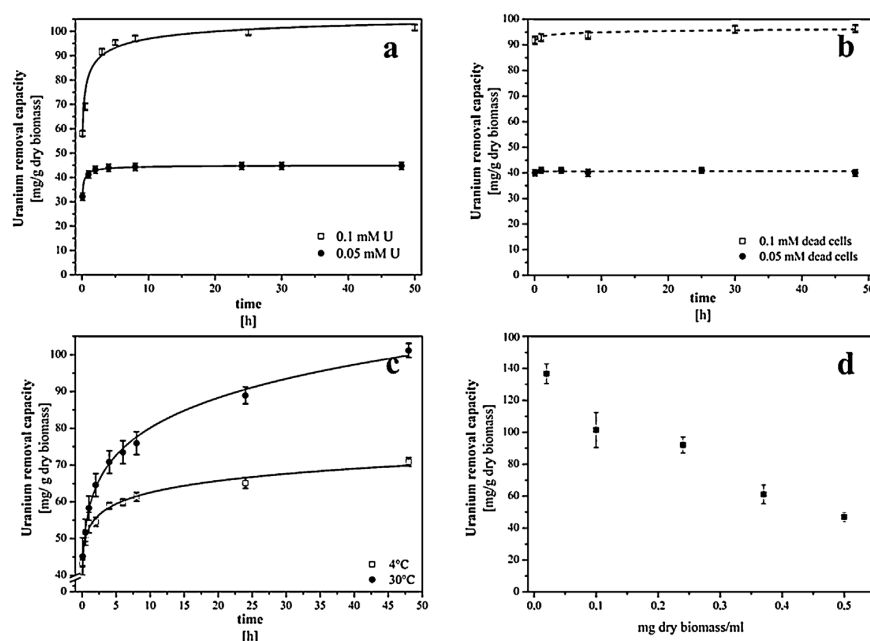


Fig. 3. Uranium removal capacity of *A. facilis*. Uranium removal capacity of living cells at 0.05 and 0.1 mM uranium (a), with dead cells at 0.05 and 0.1 mM uranium (b), and with living cells at 4 °C and 30 °C at 0.1 mM uranium (c). Uranium removal capacity as a function of the dry biomass (d) at 0.1 mM uranium.

nium removal capacity per mg DBM was increased. Maximum removal was reached at 0.02 mg DBM/mL with a uranium removal capacity of about 140 mg U/g dry biomass. These data show that the amount of uranium removed from the solution by *A. facilis* strongly depends on the dry biomass concentration.

After uranium removal experiments, the cells were tested for their cell viability by live-dead staining (staining with PI and Syto[®]9). Fluorescence light microscopy (Fig. 4) showed high numbers of viable or living cells after 48 h incubation. Compared to control samples (Fig. 4a), cells that were incubated at a uranium concentration of 0.05 mM showed nearly the same number of viable cells (Fig. 4b). At an initial uranium concentration of 0.1 mM, (Fig. 4c) fewer cells were stained non-viable. Nevertheless, the majority of cells were viable after 48 h with both 0.05 mM and 0.1 mM uranium. Finally, when extending the uranium removal period, cells remained viable and were able to tolerate both uranium concentrations.

3.2.2. In situ localization of the immobilized uranium by EF-TEM and EELS

Immediately following the immobilization experiments, cells were harvested, washed and fixed with glutaraldehyde for electron microscopic analysis in order to localize uranium at the subcellular level. Results showed uranium was accumulated within the cytoplasm and bound to the outer membrane of *A. facilis*. During the removal of uranium, two sorption sites with low elemental load were observable: (i) at polyphosphate granules within the cytoplasm, and (ii) at the cell periphery, i.e., the outer membrane (Fig. 5b, d). Parallel EELS analysis (Fig. 5c) identified uranium as a constituent element based on the U-O_{4.5} ionization edge (O_{4.5} = 93.5 eV) [31]. In addition, ionization edges of PL_{2,3} were obtained (Fig. 5c) and the corresponding energy-loss near-edge structure (ELNES) fingerprint [32] clearly indicated the presence of phosphate-phosphorus. The encircled area in Fig. 5b indicates the measuring area during wide range parallel EELS (WR-PEELS) registration (Fig. 5c). Besides the electron dense polyphosphate

inclusion, which exhibits a uranium load (Fig. 5d), the elemental map showed further electron-dense matter deposited on the cell surface, i.e., the outer membrane (Fig. 5d). In contrast to cytoplasmic PPGs, no characteristic P-L_{2,3} phosphorus could be recognized on the cell surface (Fig. 5e), which means that the phosphorus content of the outer membrane, i.e., the phospholipids, was rather low and beyond the detection limit.

4. Discussion

This work describes the interaction mechanisms between uranium and *A. facilis* using a multidisciplinary approach combining microbiological, cell biology, and microscopic techniques. *A. facilis* is a common soil bacterium spread worldwide and is not fastidious concerning a carbon source [23,33]. Based on sequence homology (99%) of isolated microorganisms from the flooding water in Königstein, *A. facilis* is closely related and belongs to the class of betaproteobacteria (Supplementary information S1). Previous results have shown that bacteria belonging to this class were the major part of metabolic active microorganisms of the flooding water [34]. Thus, members of this class are able to live and survive under these extreme environmental conditions, i.e., acidic pH of 2.9 and high uranium concentration of 13 mg/L. Because of these characteristics and the ease in handling, *A. facilis* was chosen for this study.

The ability to remove uranium from the solution was tested at two initial concentrations at a pH-value of 5.0. At both uranium concentrations 0.05 mM and 0.1 mM, *A. facilis* was able to nearly remove all soluble uranium. In total, the bacterial cells were capable to remove around 130 mg U/g DBM. This removal capacity can be compared with other microorganisms such as *Paenibacillus* sp. JG-TB8, which was recovered from a soil sample of the uranium mining waste pile "Haberland" (Johanngeorgenstadt, Saxony, Germany), that displayed a uranium removal capacity of 138 mg U/g DBM (at pH 4.5) [35]. However, *A. facilis*, a bacterium not native to uranium-contaminated environments, was able to remove nearly the same

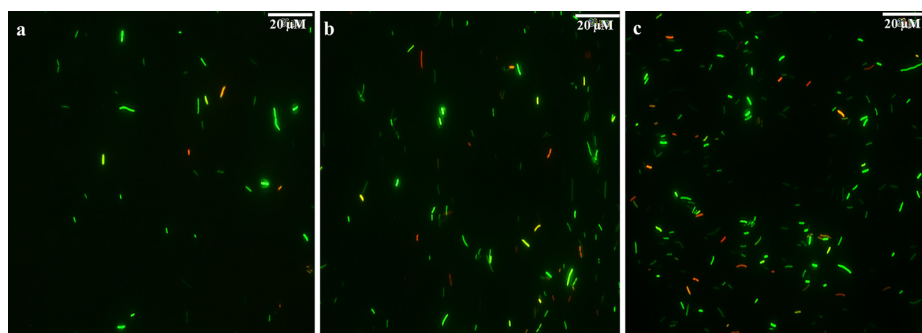


Fig. 4. Live-dead staining of *A. facilis* cells after uranium interaction experiments. Control samples without uranium, background solution tap water pH 5.0 (a), cells with 0.05 mM uranium (b), and 0.1 mM uranium (c). Washed cells were stained with PI (red fluorescence, non-viable cells) and SYTO9 (green fluorescence, viable cells).

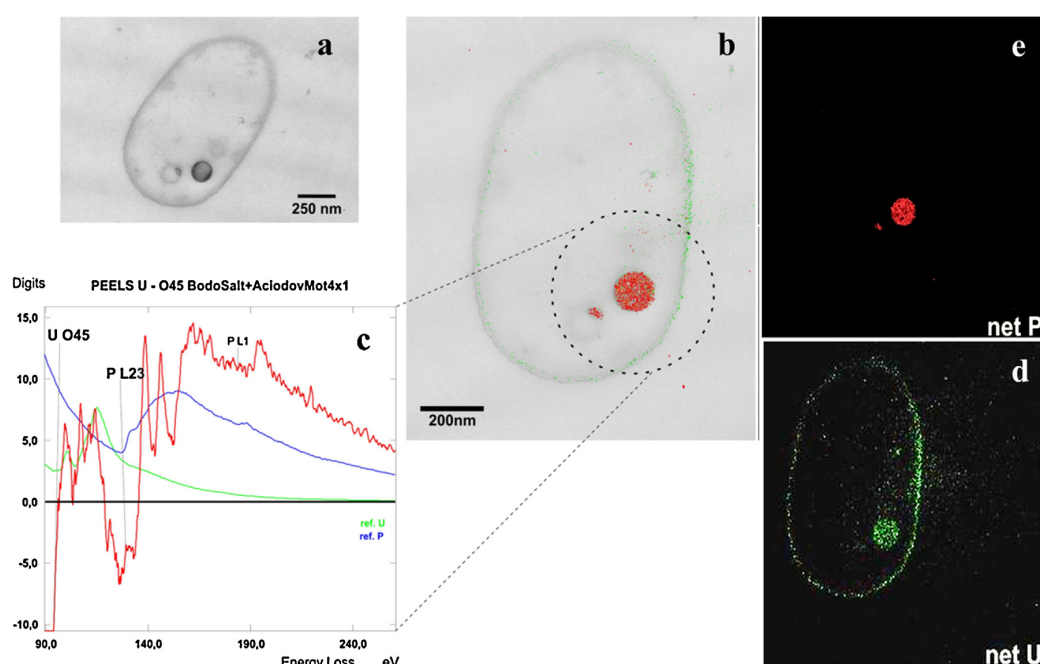


Fig. 5. EF-TEM analysis of an ultrathin-sectioned *A. facilis* sample after uranium removal. Survey view of a typical bacterial cell with an electron dense polyphosphate granule (a), superposition of phosphorous (red) and uranium (green) elemental maps on the bacterial motif (b), WR-PEELS of the measuring area (red graph) (c), encircled in (b); reference spectra of U (green graph) and P (blue graph) are shown and ionization edges are indicated. Net U-045 map (d), net P-L23 map (e).

amounts of uranium as those of the indigenous isolates. Similarly, the gram-negative bacterium *Pseudomonas fluorescens*, which was isolated from a granitic rock aquifer at the Aspö Hard Rock Laboratory (Schweden), showed a uranium binding capacity at pH 6.0 of 124 mg U/g DBM at an initial uranium concentration of 24 mg/L [36].

The kinetic studies indicated that the removal of uranium was a two-phasic process: (i) a fast phase during the first 8 h most likely associated to metabolically independent biosorption, and (ii) a slow phase where uranium was accumulated intracellularly by metabolically dependent mechanisms. The fast biosorption of uranium on the cell surface could be explained by the removal capacity of alive and dead cells, which showed no differences. Similar results have also been reported in [37]. The temperature-dependent bioaccumulation and removal capacity of uranium by *A. facilis* might be explained by differences in metabolic activity at these temperatures. The bacterial cells removed higher amounts of uranium at 30 °C compared to 4 °C. The process of

biosorption is described by a metabolism-independent sorption of uranium on carboxyl, amine, hydroxyl, phosphate, and sulfhydryl groups of the negatively charged cell membrane [38]. The process is rapid and will be not affected by temperature [39]. In contrast, the gram-negative bacterium *Citrobacter freundii* showed a fairly steady uranium adsorption capacity of 48 mg U/g DBM in temperature ranges of 25–54 °C [40]. Thus, *C. freundii* exhibit no temperature-dependent uranium removal possibly due to the high initial concentration of uranium (150 mg/L). [40] performed no investigation on the cell viability or metabolic state of the bacterial cells, which could be useful to understand the interaction mechanisms of bacterial cells and uranium. The mechanism of intracellular bioaccumulation of actinides is poorly understood. Nevertheless, previous studies assumed an active, yet metabolism-independent transport of uranium into the cell [41]. Thus, it is possible metabolically active cells are likely to remove higher amounts of uranium at lower initial concentrations by active processes like bioaccumulation.

The results of the cell viability and metabolic activity revealed in a decrease of active cells with increasing uranium concentration. This could be explained due to the chemical and radiological toxicity of uranium. Compared to copper and nickel uranium is 20–40 times more toxic [42]. Nevertheless, the toxicity of uranium is primarily derived from the chemical toxicity rather than from its radiological [43].

Flow cytometry and CFU test results revealed that *A. facilis* could tolerate concentrations up to 0.05 mM uranium in solution and 0.1 mM uranium on solid medium, respectively. Compared to indigenous microorganisms, the uranium tolerance of *A. facilis* was relatively moderate. Natural isolates from ore deposit in northeast India have displayed tolerances up to 4.0 mM [44]. Additionally, bacteria isolated from a Spanish clay deposit have shown tolerances up to 6.0 mM uranium [45]. This suggests that microorganisms that have been exposed to high uranium concentrations in the environment have become better adapted. Additionally, flow cytometry was used for the first time to investigate the uranium tolerance of *A. facilis* in liquid medium, which proved to be a fast and quantitatively reliable method for these tests. In addition, the results from live-dead staining after uranium removal experiments revealed similar findings; the majority of the cells were stained viable. Therefore, the cells were able to tolerate both uranium concentrations as well as survive in sterilized tap water with pH 5.0 without any carbon supplement. The measured amount of TOC (total organic carbon) within the flooding water of 1.1 mg/L [34] is similar to tap water with 1.7 mg/L. Despite the low content in both waters, *A. facilis* has demonstrated that it could survive, and thus remove the uranium from the contaminated water *in situ*. Therefore, *A. facilis* could be used as a biofilter to remove uranium from the contaminated water under these conditions. Similar applications were described for bacterial biofilms that were responsible for the degradation of organic contaminants [46].

The results of the TEM investigations (incubation at 30 °C) verified the two processes predicted by the temperature-dependent uranium removal experiments. The element mapping of the ultrathin section clearly showed biosorption of uranium onto the cell membrane as well as intracellular accumulation of uranium. Intracellular accumulated uranium was found at low loading concentrations within cytoplasmic polyphosphate inclusions, whereas the concentration of uranium bound to the cell membrane was much higher. Previous studies have shown that phosphorylic or carboxylic groups that compose the cell membrane bind uranium, and the immobilization at these sites seems to be species-specific [47,17,48,15,49,50,18]. However, with this study it was not possible to detect the phosphorylic groups of the cell membrane due to the detection limit of TEM/EELS studies. Further investigations should be performed in order to get detailed information about uranium binding to the cell membrane of *A. facilis*. Within the cytoplasm, uranium was found associated with polyphosphate granules, which are known to be important stores of divalent cations [51,15], that act in detoxification of intracellular uranium [18]. Previous studies showed that *Arthrobacter* only accumulated uranium intracellularly. Here TEM-EDX studies revealed that uranium was associated with polyphosphate granules similar to cells of *A. facilis* [18]. In contrast to [52], who assumed an energy-independent diffusion system, the accumulation of uranium seems to be partially energy-dependent by *A. facilis*. Formation of polyphosphate granules (PPGs) as intracellular electron-dense inclusions is generally observed in bacteria, but is also known from microorganisms isolated from uranium mine wastes piles [53]. Literature explains the formation of PPGs as the cells' response to heavy metal stress caused by the release of inorganic phosphate (H_2PO_4^-) from the cellular polyphosphate and subsequent precipitation of uranium as uranyl phosphate ($\text{UO}_2[\text{H}_2\text{PO}_4]_2$) [47]. These results clearly reveal that *A. facilis* was able to remove high amounts of uranium from solution

within 48 h by two different processes: passive biosorption and active bioaccumulation.

5. Conclusion

The present study describes the interactions of the betaproteobacterium *A. facilis* with uranium. It has been demonstrated that *A. facilis* is capable of removing high concentrations of uranium in solution (130 mg U/g dry biomass), and furthermore, able to tolerate uranium concentrations consistent with those found in the flooding water of Königstein. Flow cytometry has been used to investigate the uranium tolerance of the bacterium *A. facilis*. Compared to the CFU test on solid agar plates, *A. facilis* tolerates half of the uranium concentration in liquid medium. Nevertheless, live-dead staining after uranium removal experiments revealed that the majority of the cells were viable. Furthermore, the results of the investigations with uranium and *A. facilis* showed that removal occurred via different mechanisms. According to TEM observations, uranium was passively bound to the outer membrane of the bacterium and actively taken up into the cytoplasm. Temperature-dependent removal experiments showed that *A. facilis* removed higher amounts of uranium at higher temperatures. In conclusion, uranium removal by *A. facilis* is fast, efficient, and thus appropriate for *in situ* bioremediation of the flooding water from the former uranium mine Königstein. The chemical remediation of the Königstein flooding water is expensive and a time consuming process, which will probably have to be run the next 100 years. The *in situ* bioremediation by microorganisms could reduce the costs and efforts dramatically.

Acknowledgement

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) grand n° 02NUK030 F (TransAqua). This work was funded also by the ERDF Grants, CGL-2012-36505, CGL2014-59616-R (80% finding by FEDER) (Ministerio de Ciencia e Innovación). The authors are grateful to E. V. Johnstone for his grammatical corrections of this manuscript, the Wismut GmbH for allowing access to the sampling site, S. Röder for assistance in water sampling, S. Gurlit and S. Schubert for ICP-MS measurements. The skillful work of electron microscopic sample preparation by I. Kristen (HZI, Braunschweig) is gratefully acknowledged. We thank J. Lazuen-Alcon (Flow Cytometry Service, Centro de Instrumentación Científica University of Granada, Spain) for his help with flow cytometry measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.062>.

References

- [1] J.S.A.U. Zimmermann, On Uranium Mining and Hydrogeology II, in: B. Merkel, C. Helling (Eds.), Sven von Loga, Freiberg, Germany, 1998, pp. 140–151.
- [2] T. Arnold, N. Baumann, E. Krawczyk-Barsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk, S. Weiss, Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment, *Geochim. Cosmochim. Acta* 75 (2011) 2200–2212.
- [3] J.S.H. Märten, D. Seeliger, K. Sommer, Uranium removal from flood water at Königstein mine, in: B.P.-F.B.J. Merkel, C. Wolkersdorfer (Eds.), *Uranium in the Aquatic Environment*, Springer, 2002, pp. 763–768.
- [4] P. Barton, The acid mine drainage, sulfur in the environment, in: J.O. Nriagu (Ed.), *Ecological Impacts, Part II*, Wiley-Interscience, New York, 1987, pp. 313–358.
- [5] M. Kelly, *Mining and the Freshwater Environment*, Elsevier Applied Science, London, 1988.

- [6] J.R. Lloyd, D.R. Lovley, L.E. Macaskie, Biotechnological application of metal-reducing microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.* 53 (2003) 85–128.
- [7] J.L. Nyman, T.L. Marsh, M.A. Ginder-Vogel, M. Gentile, S. Fendorf, C. Criddle, Heterogeneous response to biostimulation for U(VI) reduction in replicated sediment microcosms, *Biodegradation* 17 (2006) 303–316.
- [8] T. Arnold, T. Zorn, H. Zanker, G. Bernhard, H. Nitsche, Sorption behavior of U(VI) on phyllite: experiments and modeling, *J. Contam. Hydrol.* 47 (2001) 219–231.
- [9] M.O. Barnett, P.M. Jardine, S.C. Brooks, H.M. Selim, Adsorption and transport of uranium(VI) in subsurface media, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64 (2000) 908–917.
- [10] M.C. Duff, J.U. Coughlin, D.B. Hunter, Uranium co-precipitation with iron oxide minerals, *Geochim. Cosmochim. Acta* 66 (2002) 3533–3547.
- [11] M.H. Baik, S.P. Hyun, W.J. Cho, P.S. Hahn, Contribution of minerals to the sorption of U(VI) on granite, *Radiochim. Acta* 92 (2004) 663–669.
- [12] D.K. Nordstrom, G. Southam, Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation, in: J.F. Banfield, K.H. Nealson (Eds.), *Geomicrobiology: Interactions Between Microbes and Minerals, Reviews in Mineralogy*, Mineralogical Society of America, Washington, D.C., 1997, pp. 361–390.
- [13] B.J. Baker, G.W. Tyson, L. Goosherst, J.F. Banfield, Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities, *App. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 2192–2199.
- [14] J.R. Lloyd, Bioremediation of radionuclide-containing wastewaters, in: D.R. Loveley (Ed.), *Environmental Microbe-Metal Interactions*, ASM Press, Washington D.C., 2000, pp. 277–327.
- [15] M.L. Merroun, J. Raff, A. Rossberg, C. Hennig, T. Reich, S. Selenska-Pobell, Complexation of uranium by cells and s-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5532–5543.
- [16] D.R. Brookshaw, R.A.D. Patrick, J.R. Lloyd, D.J. Vaughan, Microbial effects on mineral-radionuclide interactions and radionuclide solid-phase capture processes, *Mineral. Mag.* 76 (2012) 777–806.
- [17] M.L. Merroun, C. Hennig, A. Rossberg, G. Geipel, T. Reich, S. Selenska-Pobell, Molecular and atomic analysis of uranium complexes formed by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 669–672.
- [18] Y. Suzuki, J.F. Banfield, Resistance to and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site, *Geomicrobiol. J.* 21 (2004) 113–121.
- [19] D.R. Lovley, E.J.P. Phillips, Y.A. Gorby, E.R. Landa, Microbial reduction of uranium, *Nature* 350 (1991) 413–416.
- [20] D.R. Lovley, E.J. Phillips, Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 850–856.
- [21] L.E. Macaskie, K.M. Bonthron, P. Yong, D.T. Goddard, Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for extracellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation, *Microbiology-UK* 146 (2016) 1855–1867.
- [22] M.L. Merroun, M. Nedelkova, J.J. Ojeda, T. Reitz, M.L. Fernandez, J.M. Arias, M. Romero-Gonzalez, S. Selenska-Pobell, Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses, *J. Hazard. Mater.* 197 (2011) 1–10.
- [23] A. Schatz, C. Bovell, Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, *Hydrogenomonas facilis*, *J. Bacteriol.* 63 (1952) 87–98.
- [24] A. Willems, E. Falsen, B. Pot, E. Jantzen, B. Hoste, P. Vandamme, M. Gillis, K. Kersters, J. Deley, *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, *e-falsen* (ef) group 13, *ef* group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb-nov, *Acidovorax delafieldii* comb-nov, and *Acidovorax temperans* sp-nov, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (1990) 384–398.
- [25] M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H.U. Weilenmann, T. Egli, Assessment and interpretation of bacterial viability by using the live/dead bacLight kit in combination with flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 3283–3290.
- [26] D.B. Johnson, J.H.M. Macvicar, S. Rolfe, A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria, *J. Microbiol. Methods* 7 (1987) 9–18.
- [27] H. Lunsdorf, C. Strompl, A.M. Osborn, A. Bannasar, E.R. Moore, W.R. Abraham, K.N. Timmis, Approach to analyze interactions of microorganisms hydrophobic substrates, and soil colloids leading to formation of composite biofilms, and to study initial events in microbiogeological processes, *Methods Enzymol.* 336 (2001) 317–331.
- [28] A.R. Spurr, A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultra Mol. Struct. R.* 26 (1969) 31–43.
- [29] B.P. Tracy, S.M. Gaida, E.T. Papoutsakis, Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes, *Curr. Opin. Biotech.* 21 (2010) 85–99.
- [30] T.H. Nielsen, O.R. Sjöholm, J. Sørensen, Multiple physiological states of a *Pseudomonas fluorescens* dr54 biocontrol inoculant monitored by a new flow cytometry protocol, *FEMS Microbiol. Ecol.* 67 (2009) 479–490.
- [31] I. Reimer, U. Zepke, J. Moesch, S. Schulze-Hillert, M. Ross-Messemer, W. Probst, *EELSpectroscopy: A Reference Handbook of Standard Data for Identification and Interpretation of Electron Energy Loss Spectra and for Generation of Electron Spectroscopy Images*, Institute of Physics, University of Münster, Germany, and Carl Zeiss, Electron Optics Division, Oberkochen, Germany, 1992.
- [32] F. Hofer, P. Golob, New examples for near-edge fine-structures in electron-energy loss spectroscopy, *Ultramicroscopy* 21 (1987) 379–383.
- [33] J.E. Gavagan, R. DiCosimo, A. Eisenberg, S.K. Fager, P.W. Folsom, E.C. Hann, K.J. Schneider, R.D. Fallon, A gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 654–659.
- [34] I. Zirnstein, Charakterisierung der dikrobiellen biozönose im sauren grubenwasser des ehemaligen uranbergwerks königstein, in: Dresden, Institut für Ressourcenökologie, TU, Dresden, 2015.
- [35] T. Reitz, A. Rossberg, A. Barkleit, S. Selenska-Pobell, M.L. Merroun, Decrease of U(VI) immobilization capability of the facultative anaerobic strain *Paenibacillus* sp. JG-TB8 under anoxic conditions due to strongly reduced phosphatase activity, *PLoS One* 9 (8) (2014).
- [36] L. Lütke, H. Moll, G. Bernhard, Insights into the uranium(VI) speciation with *Pseudomonas fluorescens* on a molecular level, *Dalton Trans.* 41 (2012) 13370–13378.
- [37] J.R. Lloyd, L.E. Macaskie, Bioremediation of radionuclide-containing wastewaters, in: D.R. Loveley (Ed.), *Environmental Microbe-Metal Interactions*, ASM Press, Washington, D.C., 2000, pp. 277–327.
- [38] F.G. Ferris, T.J. Beveridge, Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* k-12 lipopolysaccharide, *Can. J. Microbiol.* 32 (1986) 52–55.
- [39] B. Volesky, Z.R. Holan, Biosorption of heavy metals, *Biotechnol. Progr.* 11 (3) (1995) 235–250.
- [40] S. Xie, J. Yang, C. Chen, X. Zhang, Q. Wang, C. Zhang, Study on biosorption kinetics and thermodynamics of uranium by *Citrobacter freundii*, *J. Environ. Radioact.* 99 (2008) 126–133.
- [41] Y. Suzuki, J.F. Banfield, Geomicrobiology of uranium, *Rev. Mineral.* 38 (1999) 393–432.
- [42] L.G. Leduc, G.D. Ferroni, J.T. Trevors, Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (1997) 453–455.
- [43] H.L. Ehrlich, Geomicrobiology, in: M. Dekker (Ed.), 3rd ed., New York, 1996, pp. 276–294.
- [44] R. Kumar, M. Nongkhaw, C. Acharya, S.R. Joshi, Uranium (U)-tolerant bacterial diversity from U ore deposit of domiasiat in north-east india and its prospective utilisation in bioremediation, *Microbes Environ.* 28 (2013) 33–41.
- [45] M. Lopez-Fernandez, O. Fernandez-Sanfrancisco, A. Moreno-Garcia, I. Martin-Sanchez, I. Sanchez-Castro, M.L. Merroun, Microbial communities in bentonite formations and their interactions with uranium, *Appl. Geochem.* 49 (2014) 77–86.
- [46] X.S. Huang, H. Wu, Biodegradation of styrene vapor in a biofilter, *Appl. Mechanics Mater.* 1 275–277 (Pts 1–3) (2013) 2329–2332.
- [47] A.J. Francis, J.B. Gillow, C.J. Dodge, R. Harris, T.J. Beveridge, H.W. Papenguth, Uranium association with halophilic and non-halophilic bacteria and archaea, *Radiochim. Acta* 92 (2004) 481–488.
- [48] M.L. Merroun, C. Hennig, A. Rossberg, T. Reich, S. Selenska-Pobell, Characterization of U(VI) *Acidithiobacillus ferrooxidans* complexes using EXAFS transmission electron microscopy, and energy-dispersive X-ray analysis, *Radiochim. Acta* 91 (2003) 583–591.
- [49] M.L. Merroun, S. Selenska-Pobell, Bacterial interactions with uranium: an environmental perspective, *J. Contam. Hydrol.* 102 (2008) 285–295.
- [50] N. Renninger, R. Knopp, H. Nitsche, D.S. Clark, J.D. Keasling, Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 7404–7412.
- [51] G.M. Roomans, Localization of divalent-cations in phosphate-rich cytoplasmic granules in yeast, *Physiol. Plantarum* 48 (1980) 47–50.
- [52] G.W. Strandberg, S.E. Shumate, J.R. Parrott, Microbial-cells as biosorbents for heavy-metals – accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 237–245.
- [53] M.L. Merroun, M. Nedelkova, A. Rossberg, C. Hennig, S. Selenska-Pobell, Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium, *Radiochim. Acta* 94 (2006) 723–729.

Supplementary Information

Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI)

U. Gerber¹, I. Zirnstein², E. Krawczyk-Bärsch¹, H. Lünsdorf³, T. Arnold¹, M. L. Merroun⁴

¹ Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

² Research Institute of Leather and Plastic Sheeting (FILK) gGmbH, Meissner Ring 1-5, 09599 Freiberg, Germany

³ Helmholtz Centre for Infection Research, Central Facility for Microscopy, Inhoffenstr. 7, D-38124 Braunschweig, Germany

⁴ University of Granada, Department of Microbiology, Campus Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

PCR amplification of 16S rDNA gene fragments and sequencing

To perform colony PCR, colonies grown on agar plates were picked using a sterile pipette tip and were suspended in 100 µl of nuclease-free water followed by incubation at 95 °C for 5 min. An aliquot of this colony suspension was then added to each PCR reaction. The colony suspension (1-3 µl) was used in a 25 µl amplification assay with gene-specific primers. For the amplification of the 16S rDNA, the primer combination 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') were used. A Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Promega, Mannheim, Germany) was used to catalyse the PCR using the following cycling conditions: initial denaturing at 94 °C for 12 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 54 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 90 s, finalized by a 20 min elongation at 72 °C. PCR products were purified with the innuPREP-PCR pure Kit (Analytik Jena, Jena, Germany), and eluted in double-distilled water. Purified PCR products were sequenced by GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany). The retrieved 16S rDNA sequences were compared with sequences available in the non-redundant nucleotide database of the National Center for Biotechnology database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLASTN and the ribosomal database project (RDP, http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

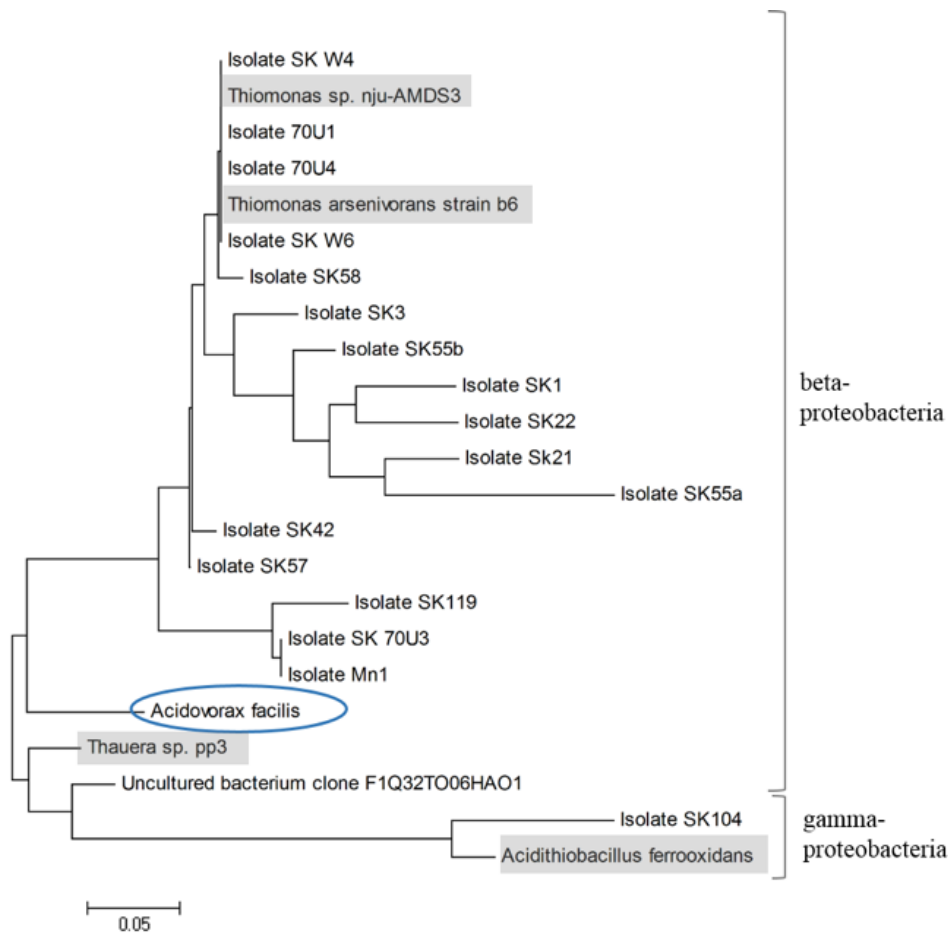


Figure 1: Phylogenetic tree based on minimum-evolution analysis of 16S ribosomal RNAs using neighbor-joining evolutionary distance model. Sequences retrieved from the acidic uranium contaminated mine water of the former uranium mine Königstein and were denoted as "Isolate". The reference organism *A. facilis* was added to compare the relationship to the isolates. The scale bar corresponds to a distance of 5 substitutions per 100 nucleotide positions.

The sequences were aligned to the closest phylogenetic relatives by using CLUSTALW version 1.7 [1]. Neighbour-joining trees were calculated by using MEGA 4 software [2].

Isolated bacteria from mining water

In this study, a high number of betaproteobacteria strains were isolated using FeTSB medium [3], a nutrient broth containing 0.25 g/L as organic carbon suitable for the cultivation and enrichment of heterotrophic and mixotrophic iron-oxidizing bacteria. The isolates (SK W4, 70U1, etc.) were phylogenetically affiliated to the genus *Thiomonas* (Fig. 1). FeTSB culture media with different potassium tetrathionate concentrations selected the growth of autotrophic iron-oxidizing bacterial strains related to *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Based on dominance of isolated betaproteobacteria from earlier Königstein uranium mine water experiments, *A. facilis* was selected for further

investigations. Although *A. facilis* was not isolated from the flooding water, it has been well studied and is closely related to the betaproteobacteria that were identified by pyrosequencing, making it an ideal reference organism. Additionally, RNA studies with following pyrosequencing showed the dominance of metabolic active betaproteobacteria in the mine water [4].

References

- [1] J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson, „*CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.*“, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673 (1994).
- [2] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei and S. Kumar, „*MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*“, *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596 (2007).
- [3] D. Johnson, J. H. Macvicar and S. Rolfe, „*A new solid medium for the isolation and enumeration of Thiobacillus ferrooxidans and acidophilic heterotrophic bacteria*“, *J. Microbiol. Methods* **7**, 9 (1987).
- [4] I. Zirnstein, „*Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein*“, PhD thesis, Technische Universität Dresden (2015).

3.2 Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* for bioremediation purposes

Krawczyk-Bärsch E, Gerber U, Müller K, Moll H, Rossberg A, Steudtner R, Merroun ML (2017)
J Hazard Mater 347: 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.030>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* for bioremediation purposes

E. Krawczyk-Bärsch^{a,*}, U. Gerber^a, K. Müller^a, H. Moll^a, A. Rossberg^a, R. Steudtner^a, M.L. Merroun^b

^a Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Bautzner Landstraße 400, D-01328 Dresden, Germany

^b University of Granada, Department of Microbiology, Campus Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain



HIGHLIGHTS

- First kinetic studies on U removal by *A. facilis*.
- U is mainly bound to phosphate groups of LPS within the first hour.
- Subsequent U removal on carboxyl groups of PGN.
- *A. facilis* as suitable candidate for bioremediation purposes.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2017

Received in revised form 4 December 2017

Accepted 10 December 2017

Available online 28 December 2017

Keywords:

Uranium

Acidovorax facilis

Spectroscopy

Bioremediation

ABSTRACT

The contamination of the environment by U may affect plant life and consequently may have an impact on animal and human health. The present work describes U(VI) sequestration by *Acidovorax facilis* using a multidisciplinary approach combining wet chemistry, transmission electron microscopy, and spectroscopy methods (e.g. cryo-time resolved laser-induced fluorescence spectroscopy, extended X-ray absorption fine structure spectroscopy, and *in-situ* attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy). This bacterial strain is widely distributed in nature including U-contaminated sites. In kinetic batch experiments cells of *A. facilis* were contacted for 5 min to 48 h with 0.1 mM U(VI). The results show that the local coordination of U species associated with the cells depends upon time contact. U is bound mainly to phosphate groups of lipopolysaccharide (LPS) at the outer membrane within the first hour. And, that both, phosphoryl and carboxyl functionality groups of LPS and peptidoglycan of *A. facilis* cells may effectuate the removal of high U amounts from solution at 24–48 h of incubation. It is clearly demonstrated that *A. facilis* may play an important role in predicting the transport behaviour of U in the environment and that the results will contribute to the improvement of bioremediation methods of U-contaminated sites.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The contamination of the environment by U-containing waste from mining and extraction as well as of reactor operation and fuel reprocessing is a world-wide problem. U is a naturally occurring radionuclide, which in enriched concentrations represents a major health hazard. It is well known that its transport behaviour strongly depends on its oxidation state. U typically occurs in nature in the oxidation state IV or VI. U(IV) is present in the precipitated form, e.g., as the highly insoluble mineral uraninite under acid and

anaerobic conditions [1]. In contrast, U(VI) is much more soluble and occurs predominantly as mobile aqueous species with carbonate, hydroxide or sulphate [2,3]. Arnold [4] reported that uranium speciation in acid mine drainage (AMD) flooding water of the former U mine Königstein (Saxony/Germany) is dominated by highly mobile, soluble and toxic UO_2SO_4 species. The conventional metal remediation of this underground U mine is realized by controlled flooding [5] and a following long-lasting water treatment. Hence, alternative treatments are needed, which may reduce the efforts. During the last decades, researchers are focusing their works on the application of bioremediation strategies to reduce the levels of inorganic contaminants, including U, in the environment. These strategies are based on the ability of microorganisms to interact with heavy metals through different mechanisms influencing

* Corresponding author.

E-mail address: E.Krawczyk-Baersch@hzdr.de (E. Krawczyk-Bärsch).

the transport and migration of radionuclides in the environment. They can be distinguished as biosorption, bioaccumulation, biotransformation, biomineralization, and redox reactions [6], with potential for the substantial retention of radionuclides. Biosorption can be summarized as the sorption and accumulation of trace elements to the surface of microbial cells [7]. Bioaccumulation is a process which requires energy. Microbes have evolved energy dependent uptake systems for physiologically important metals. Radionuclides can precipitate with microbial generated ligands, e.g. phosphate, sulphide or carbonate as biomineralization [7]. Under anaerobic conditions, many microorganisms may catalyze the microbial transformation [8,9] of U(VI) to sparingly soluble and immobile U(IV), including Fe(III)-reducing bacteria, such as *Shewanella* spp. and *Geobacter* spp. [10,11,12]; sulfate-reducing bacteria, such as *Desulfovibrio* spp. [13,14,15,16] and *Desulfosporosinus* spp. [17,18].

In the present work we focused on the gram-negative bacterium *Acidovorax facilis* [19] for interaction experiments with U(VI). Species of the genus *Acidovorax* were widely found in U-contaminated sites. For instance, *Acidovorax* spp. was identified in the sediments of a former U-mining district [20] and in U mine tailings [21]. Whereas *Acidovorax* spp. is often described as a part of a stable U(VI)-reducing microbial community in a complex anaerobic ecosystem of contaminated sediments [22,1,23], *Acidovorax facilis* is known as a facultative aerobic, chemoorganotrophic bacterium ubiquitously distributed in the nature including pristine soils [24] and U-contaminated sites [25]. Sequences closely related to the species *A. facilis* and *Dechloromonas agitata* were detected by the authors in 14% of the clone library of subsurface sediments contaminated with U(VI) and nitrate during biostimulation. A recent study [26] demonstrated that *A. facilis* is a suitable candidate for *in-situ* bioremediation of U-contaminated waste waters, e.g. AMD water. U(VI) removal and tolerance mechanisms of *A. facilis* were described by the authors by using a combination of flow cytometry and microscopy methods. The authors reported a high capacity of this bacterium to remove U from aqueous solutions up to 130 mg U/g dry mass by biosorption and bioaccumulation processes. However, no U solid state characterization studies were conducted on the association of U with this bacterial species.

Based on the results obtained by [26], the present study focuses on the molecular scale structural characterization of the uranyl species associated with the cell biomass of *A. facilis*. The results of microscopic and spectroscopic methods, i.e. high-angle annular dark field scanning transmission electron microscope (HAADF-STEM), cryo-time resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (cryo-TRLFS), extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy and *in-situ* attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy will improve our understanding of the mechanisms of microbial response to radionuclides on a molecular level.

2. Material and methods

2.1. Bacterial growth and cultivation conditions

For our studies the strain of *A. facilis* was kindly provided by the Centre for Environmental Research (UFZ in Leipzig, Germany). The cells were grown in nutrient broth medium (NB) (Peptone 5.0 g/L and Beef Extract 3.0 g/L, pH 7.0 ± 0.2, Sifin, Berlin, Germany) at 30 °C until reaching the stationary phase and 120 rpm on a rotary shaker overnight. Subsequently, the cells were washed and diluted to an OD_{600nm} of 1.0 (12.0 ± 1.0 mg dry weight/mL) with sterilized tap water at pH 5.0 and used for each experimental method.

2.2. Sample preparation for STEM/HAADF/EDX analysis

Cells of *A. facilis*, previously contacted for 20 min with UO₂(NO₃)₂ solution (0.1 mM, pH 5) under sterile conditions, were recovered by centrifugation (6000 rpm, 5 min). The supernatant was removed and the cell pellet was washed twice with 20 mM Hepes at pH 7.2. Subsequently, the pellet was fixed at 1% (vol/vol) Glutaraldehyde from 50% (vol/vol) stock solution. After immobilization in 1% (w/v) aqueous low melting agarose, cells were dehydrated by an ethanol series (10, 30, 50, 70, 90, 100% for 2 min on ice; 100% for 15 min at room temperature) followed by ERL-resin impregnation and polymerization [27]. Ultrathin sections of 35–40 nm were examined under a HAADF-STEM (FEI TITAN G2 80-300) for high resolution studies. TEM specimen holders were cleaned by plasma prior to STEM analysis to minimize contamination. The STEM is equipped with HAADF detector and EDAX energy dispersive X-ray (EDX).

2.3. cryo-TRLFS measurements

In preparation for the measurements the *A. facilis* cells were washed two times and then re-suspended in sterilized tap water with pH 5.0. A stock solution of UO₂(NO₃)₂ was added to adjust to a U(VI) concentration of 0.1 mM in the cell suspension. The experiments were performed at pH 5, under aerobic conditions and at 30 °C on a rotary shaker at 130 rpm. After 5 min, 1 h, 16 h and 24 h the samples were taken, centrifuged for 5 min at 13,200 rpm. The supernatants were used for determination of U concentration by means of inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS). The pellets were re-suspended in sterilized tap water (pH 5). Each sample was shock frozen in a plastic cuvette by N₂ and stored at –80 °C. In addition to all measurements reference blank samples of sterilized tap water (pH 5) with 0.1 mM U(VI) and the cell suspension without U(VI) was investigated. The U(VI) luminescence at 153 K was measured after excitation with laser pulses at 266 nm (Minilite high-energy solid-state laser; Continuum) and average pulse energy of 300 μJ. The emission of the samples was recorded using an iHR550 spectrograph (HORIBA Jobin Yvon) and an ICCD camera (HORIBA Jobin Yvon) in the 370.0–670.0 nm wavelength ranges by averaging 100 laser pulses and using a gate time of 2000 μs. Data were analyzed using Origin software, version 9.0 (OriginLab Corporation). For further details on the experimental cryo-TRLFS setup, see [28].

2.4. EXAFS analysis

The bacterial sample was taken after the U interaction experiments, where *A. facilis* were exposed to 0.1 mM U for 48 h (30 °C, pH 5) and ultra-centrifuged for 1 h at 187,000 × g. The pellet was filled into a polyethylene sample holder. The holder was heat sealed at 300 °C by using a soldering iron and immediately frozen in liquid nitrogen. EXAFS measurements were carried out on the Rossendorf Beamline BM20 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [29]. The bacterial sample was measured at 15 K in a closed-cycle He cryostat in fluorescence mode using a 13-element Ge solid-state detector, while the reference samples meta-autunite, Ca(UO₂)₂(PO₄)₂·6 H₂O [30], and the aqueous U(VI)-hydrate and U(VI)-tricarboxylate complex [31], were measured at room temperature in transmission mode using ionization chambers. The incident photon energy was tuned with a water-cooled Si(111) double-crystal monochromator in channel cut mode (5–35 keV). For energy calibration of the sample spectra, the K-edge spectrum of a Y metal foil (first inflection point at 17,038 eV) was recorded simultaneously. The ionization energy, E₀, of the uranium L_{III}-edge was defined as E₀ = 17,185 eV. The software package EXAFSPACK [32] was used for dead-time correction of the 13

fluorescence channels, energy calibration, averaging of the multiple sample scans, extraction of the EXAFS signal, and for the shell fitting. For the shell fit of meta-autunite theoretical backscattering phase and amplitude functions were calculated with the FEFF8 code [33] using a 128 atom cluster having the atomic positions from $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ [30]. For the shell fit of the other samples a synthetic structural model described in [34] was used. For all shell fits the 4-legged multiple scattering (MS) path $\text{U-O}_{\text{ax}1}\text{-U-O}_{\text{ax}2}$ was included in the model calculations, while the coordination number (N) was kept constant at two and the radial distance (R) and the Debye-Waller factor (σ^2) were linked to twice the R and σ^2 of the single-scattering (SS) path U-O_{ax} , respectively [35]. The phosphate interaction was modelled with a U-P SS path, the 3-legged and the 4-legged MS path $\text{U-O}_{\text{eq}}\text{-P}$ and $\text{U-O}_{\text{eq}}\text{-P-O}_{\text{eq}}$, respectively. For the 3-legged and the 4-legged MS path N was linked to twice and once the N of the U-P SS path, respectively, while the effective path length of the MS paths were linked to R of the U-P SS path according to the structural model. The σ^2 of the MS paths were linked to once the σ^2 U-P SS path. In the case of the bacterial sample for all paths which includes the phosphate interaction σ^2 was kept constant at $\sigma^2 = 0.0072 \text{ \AA}^2$ as found for m-autunite. The amplitude reduction factor, S_0^2 , was held constant at 0.9 for all fits.

We used linear-combination (LC) fit to estimate the relative fractions of interacting ligands, like water molecules, phosphate and carboxylic groups.

2.5. In-situ ATR FT-IR spectroscopy

For monitoring and complementary molecular identification of the U(VI) sorption process on *A. facilis* cells and distinct cell components, *in-situ* ATR FT-IR spectroscopy with a sub-minute time resolution was performed. *A. facilis* cells were treated to obtain cell components, *i.e.* the outer membrane containing lipopolysaccharide (LPS), proteins and phospholipids. For this purpose, the *A. facilis* cell suspension was sonicated for 5 min by room temperature. The pellet was washed three times with autoclaved H_2O and harvested by centrifugation (10,000 rpm, 10 min), respectively. For comparison, a sample with living *A. facilis* cells was used. Polyphosphate granules (PPGs), which were separated from *A. facilis* cells using the description for isolation of PPGs after [36], were incubated in tap water at pH 5. PPGs are often found within the cytoplasm of bacteria cells as a storage compartment for phosphorus compounds. They are characterized by their high content of P [39]. Infrared spectra were measured from 1800 to 800 cm^{-1} on a Bruker Vertex 80/v vacuum spectrometer equipped with a Mercury Cadmium Telluride detector. Spectral resolution was 4 cm^{-1} , and spectra were averaged over 256 scans. A horizontal diamond crystal with nine internal reflections (DURA SamplIR II, Smiths Inc.) was used. Further details on the experimental ATR FT-IR spectroscopy setup are compiled in [37]. The performance of *in-situ* sorption experiments requires a thin microbial cell film prepared directly on the surface of the ATR diamond crystal as stationary phase. This was accomplished by pipetting $5 \mu\text{L}$ of respective suspended *A. facilis* samples of living cells, outer membrane components or PPGs on the ATR crystal and subsequent drying with a gentle stream of N_2 . Flow-through measurements at a rate of $100 \mu\text{L min}^{-1}$ were performed using a flow cell ($V = 200 \mu\text{L}$). First, the film was flushed with a blank solution (sterilized tap water, pH 5) for 60 min conditioning. In a second step, a $10 \mu\text{M}$ U(VI) solution (sterilized tap water, pH 5) was rinsed for sorption during the next 120 min. Finally, the U loaded cell film was flushed again with the blank solution (120 min) in order to gain more information on the reversibility of the sorbed species.

The applied principle of reaction-induced difference spectroscopy allows the detection of very small absorption changes provoked by the sorption process in comparison to the very strong

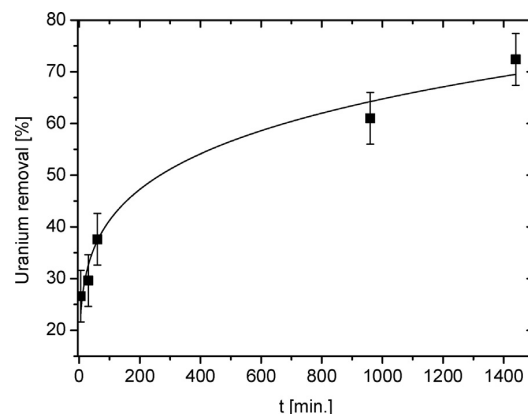


Fig. 1. U removal by living *A. facilis* cells exposed to 0.1 mM U(VI).

absorbing background, *i.e.*, water, *A. facilis* cell film. Further details on the calculation of difference spectra are given in [37,38].

3. Results and discussion

3.1. U(VI) sequestration by *A. facilis*

For cryo-TRLFS measurements the samples were centrifuged and the supernatant were analysed by ICP-MS. As shown in Fig. 1 a removal of U by *A. facilis* cells was already detectable during the first minutes. After 5 min already 26.60% of the initial U is removed from the solution. After 1 h an uptake of 37.60% was determined. The uranium removal capacity of *A. facilis* cells at 0.1 mM U was determined in mg U per g dry biomass (DBM) and showed, that 21 mg U was removed during the first 5 min of the experiments. After incubation time of 1 h the cells removed about 30 mg U/g DBM. After 24 h the equilibrium was reached and the bacterial cells displayed a total U removal capacity of 58 mg U/g DBM. In [26] the fast sequestration of U(VI) by *A. facilis* within the first 8 h was interpreted as a passive process. U was passively bound to the outer membrane of the bacterium, most likely associated to a metabolically independent biosorption process. In a later stage, after 16 h and 24 h, an uptake of 61.00% and 72.40%, respectively was determined as a result of an active process (bioaccumulation) as described in [26], where the metal is actively taken up into the cell. Analysis of the samples used for EXAFS were taken after 48 h showing a removal of U of 95.10%. Live-dead staining studies of *A. facilis* cells showed a majority of living biomass after 48 h incubation with 0.1 mM U [26]. It was shown, that living cells are responsible for the sequestration of U by passive biosorption during the first hours of incubation. Living cells are also responsible for an active bioaccumulation during a later stage. In contrast, the U sequestration by dead biomass is fast. The authors showed that the maximum of U removal was already reached after 5 min incubation by passive biosorption.

3.2. STEM/HAADF analysis

For STEM/HAADF/EDX studies several ultrathin sections of the *A. facilis* samples loaded with 0.1 mM uranium for 20 min were prepared. In Fig. 2a some *A. facilis* cells are shown with spherical inclusion bodies, which are characterized by an increased electron density. These are PPGs, which are characterized by their high content of P [39]. Elemental distribution analysis of U (Fig. 2b) and P (Fig. 2c) were performed over *A. facilis* cells and clearly indicates that uranium is entirely present in the cell membrane and only with minor amounts in the PPGs. EDX analysis clearly indicate, that, com-

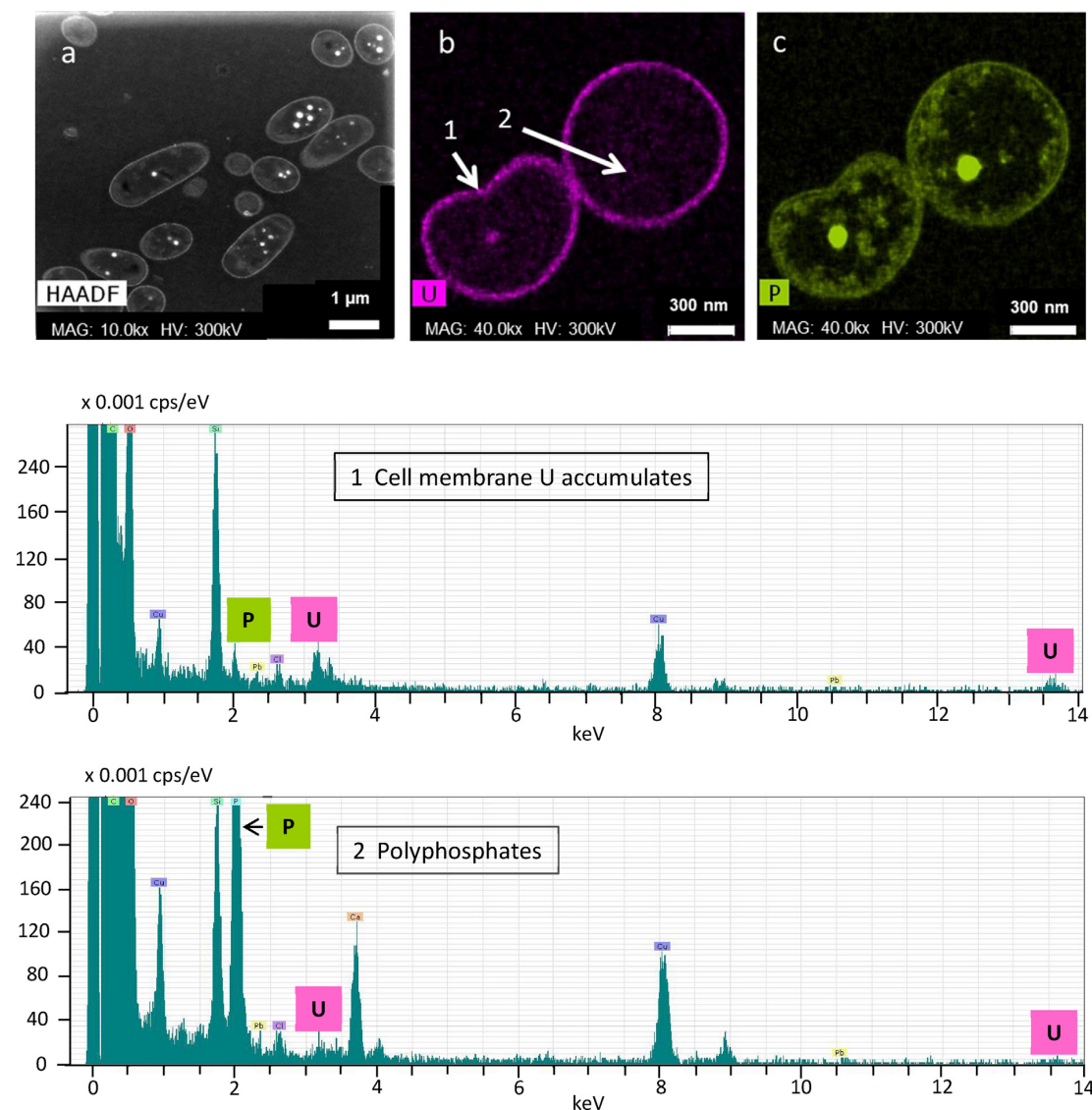


Fig. 2. STEM/HAADF images of *A. facilis* cells and PPGs with high electron density (a). EDX analysis indicate high intensity peaks of U as cell membrane U accumulates (1) compared to low peaks in PPGs (2), confirmed by distribution analysis of U (b) and P (c) in *A. facilis* cells incubated for 20 min.

pared to the cell membrane, the concentration of U is much lower or not detectable in the cytoplasmic PPGs. Consequently, the removal of U by *A. facilis* during the first 20 min of incubation is limited to the outer membrane of the cells, whereas an uptake of U into the cytoplasm and in PPGs, respectively results from a subsequent active process as described in [26].

3.3. cryo-TRLFS

The measured emission spectra of the U complexes formed by the cells of *A. facilis* at 0.1 mM U concentration and incubation time of 5 min, 1 h, 16 h and 24 h are characterized by five emission bands. As shown in the luminescence spectrum (Fig. 3A) the luminescence intensities increase with incubation time, which is correlated with the time-dependent removal of U(VI) by *A. facilis* cells as described above (3.1). In addition, a shift of the uranyl(VI) band positions to lower wavelengths ($\Delta = -2.8$ nm) is clearly indicated. This shift

can be interpreted as a change of the uranyl-speciation in *A. facilis* cells over the incubation time. In detail, the spectra of the samples which were incubated with U for 5 min and 1 h are characterized by similar peak maxima at 480.7, 499.7, 520.1 and 545.1 nm \pm 0.5 nm. Compared to the band positions of the uranyl-lipopolysaccharide-complex (R-O-PO₃-UO₂) luminescence spectrum at pH 4 [40], there is a good agreement with only small deviations (Table 1). It seems that UO₂²⁺ is bound on LPS at the beginning of the incubation. LPS is known as a major component of the outer membrane of gram-negative bacteria. The main binding sites for metal ions are carboxyl, phosphoryl, hydroxyl and amino groups, located in the LPS [41]. However, studies have shown that the LPS uranyl phosphoryl coordination is dominating with a very strong phosphoryl binding of uranyl to LPS [40]. Concerning our studies we consequently suggest a formation of uranyl-phosphoryl species on *A. facilis* cells during the first hour of incubation with U.

Table 1

Luminescence band positions of *A. facilis* cells exposed to 0.1 mM U compared to Band positions of reference spectra of Uranyl-lipopolysaccharide-complex [40] and Uranyl-peptidoglycan-complex [42].

Samples	Incubation time/h	Luminescence emission bands/nm				Ref.
<i>A. facilis</i> pH 5.0	0.01	480.7	499.7	520.1	545.1	This work
<i>A. facilis</i> pH 5.0	24	479.3	495.5	517.3	541.4	This work
LPS – R-O-PO ₃ -UO ₂ pH 4.0	24	481.5	498.1	519.6	542.9	[40]
PGN – (R-COO) ₂ -UO ₂ pH 5.6	24	481.6	498.1	518.0	539.0	[42]

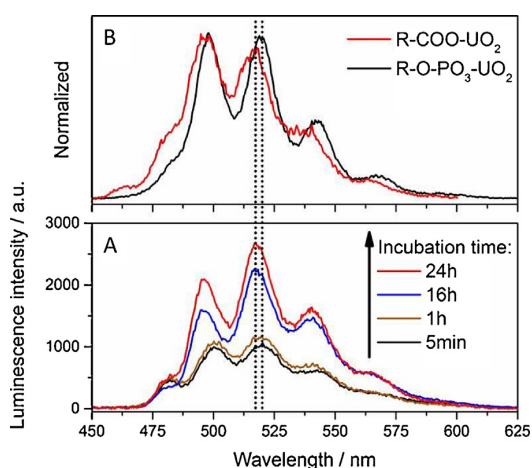


Fig. 3. Luminescence spectra of *A. facilis* cells exposed to 0.1 mM U after different incubation times (Fig. 3A) at 30 °C. The spectra are compared to reference spectra of uranyl-LPS-complex [40] and uranyl-PGN-complex [42] (Fig. 3B).

The spectra of the samples, which were measured after 16 h and 24 h of incubation time with U, are characterized by uranyl(VI) band positions, which are shifted to lower wavelengths (Fig. 3A). The peak maxima are determined at 479.3, 495.5, 517.3 and 541.4 nm \pm 0.5 nm and show similarities to reference spectra of the 1:2 uranyl carboxyl complex [(R-COO)₂-UO₂] of uranyl-peptidoglycan at pH 5.6 [42] as shown in Table 1 and in Fig. 3B. The relatively thick (20–80 nm) peptidoglycan (PGN) layer is the main component of the cell wall of gram-negative bacteria [43]. Basically the PGN can consist of two sugar derivatives, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid, which are bonded together with a short stem of four amino acids [44]. As shown in [45], the carboxylate groups of the PGN have been implicated as main sites of metal binding including U [46]. The luminescence spectra obtained by TRLFS in our studies after 16 h and 24 h of incubation with U are indicating that UO₂²⁺ was bound on carboxyl functionality groups of the PGN. However, the determined spectra and luminescence characteristics definitely refer to the formation of more than one uranyl-species. It has to be taken into account that a uranyl phosphoryl coordination is additionally formed which could be consisted of a uranyl-LPS-complex.

3.4. EXAFS analysis

Fig. 4 shows the shell fit of the raw k^3 -weighted EXAFS spectra of the bacterial sample incubated with U for 48 h and the selected reference samples, while the corresponding structural parameters are listed in Table 2. For U(VI)-hydrate and meta-autunite the determined structural parameter match well the data supplied by the literature (Table 2), hence showing that the used shell fit model is appropriate. In the case of the bacterial sample a common U-O_{ax} distance of 1.76 Å and a U-O_{eq} distance of 2.35 Å is measured which is situated between the distances of 2.28 Å and 2.40 Å as observed

for meta-autunite and U(VI)-hydrate, respectively. The coordination number of O_{eq} 3.8 which could point out that U(VI) is 4-fold coordinated. However, in consideration of the error in the determination of N (20%) in the case of U(VI) interactions with structurally complicated biological systems, coexisting structurally different U(VI) complexes might be expected which could have 4-fold, 5-fold and 6-fold coordination. The shell fit of such spectral mixtures will result in EXAFS structural parameter which reflects the average of all contributing U(VI) complexes. At 3.58 Å a U-P interaction is observed with a coordination number of N_p = 1.4 (Table 2). The U-P distance agrees within the common error in determination of interatomic distances probed by EXAFS (0.01–0.02 Å; [47]). In comparison with the U-P distance determined for meta-autunite (R_{U-P} = 3.60 Å, Table 2), it indicates that the bacterial phosphate groups are monodentately coordinated. If in average a 4-fold up to a 5-fold coordination is present, and with N_p = 1.4, at least 2–3 O_{eq} atoms must be supplied from other ligands than phosphate groups. Moreover, the U-O_{eq} distance of the additionally coordinated ligands must be much longer than the U-O_{eq} distance of 2.28 Å, as observed for coordinated phosphate groups, to reach the average U-O_{eq} distance of 2.35 Å. The presence of O_{eq} in at least two different U-O_{eq} distances is further evidenced by the high σ^2 of \sim 0.01 Å² (Table 2). Beside the phosphate groups the most probable candidates of ligands who supply U-O_{eq} distances longer than 2.28 Å are coordinated water molecules, with R_{U-O_{eq}} = 2.40 Å, and bidentately coordinated carboxylic groups with R_{U-O_{eq}} = 2.47 Å (U(VI)-hydrate and U(VI)-tricarboxylate), respectively (Table 2). Two LC fits of the EXAFS spectrum of the bacterial sample are shown in Fig. 4 by introducing all three references ((1) in Fig. 4) and by using only U(VI)-hydrate and meta-autunite ((2) in Fig. 4) as references. Obviously all spectral features as marked in the Fourier-transform (FT) in Fig. 4 (features (1)–(4)) are well reproduced by the spectral contributions from 43% U(VI)-hydrate, 37% meta-autunite and 12% of U(VI)-tricarboxylate with a standard deviation (SD) between the experimental spectrum and the LC fit of SD = 0.24. Note that the spectral feature at 2.4 Å in the FT (feature (3), Fig. 4), which is visible in all FT's of the measured EXAFS spectra (Fig. 4) is also reproduced. The origin of this feature could be explained by carbon atoms in a U-C distance of 2.9 Å stemming from bidentately coordinated carboxylic groups. In the case of the bacterial sample the shell fit results in 1.9 C at 2.90 Å. The nature of this small FT peak was extensively discussed in [48] and it was observed that a shell fit overestimates the number of C atoms by \sim 1 atom, hence pointing out that the feature is an artefact. Consequently, and by introducing only 55% U(VI)-hydrate and 36% meta-autunite (Fig. 4) as references the LC fit leads to the same good description (SD = 0.26) of all spectral features as observed by introducing all three references (SD = 0.24). In accordance with the shell fit of U(VI)-hydrate and meta-autunite an overestimation of 1.3 C–1.4 C atoms can be assumed, so that for the bacterial sample the expected number of carbon atoms would be N_C < 0.5, hence likely undetectable with a shell fit. Note that the LC fit is not influenced by the error introduced by assumptions, which are made for the calculation of the scattering functions by FEFF and for the shell fit. However, as a conservative estimate of the error in determination of the fractions by the LC fit the deviation of the total sum of the fractions from 100% can be taken. For both LC fits

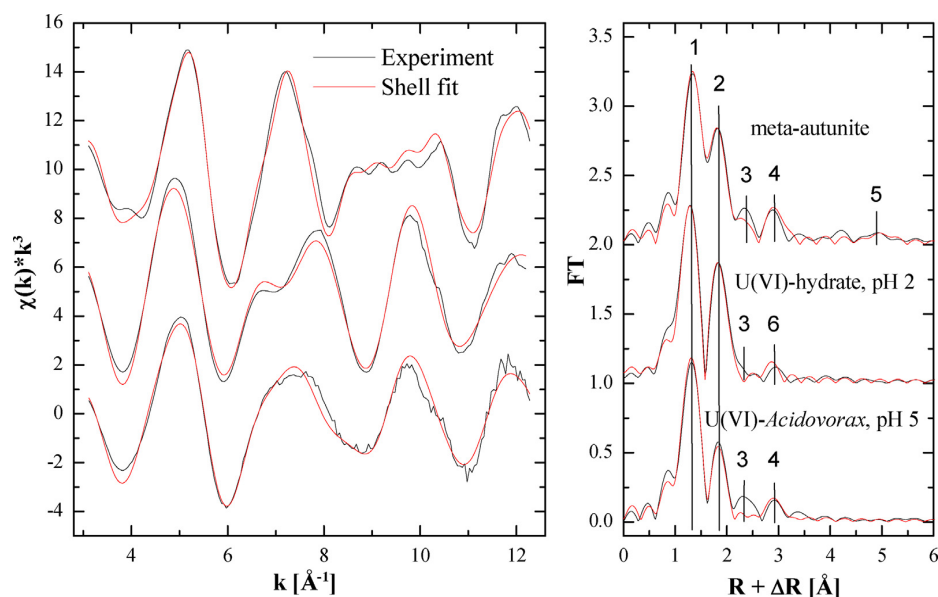


Fig. 4. U L_{III}-edge k^3 -weighted EXAFS spectra (left) and the corresponding Fourier transforms (right) of U(VI)-*A. facilis* and two reference uranyl compounds. Experimental data (black) with shell fit (red). Spectral features 1–6 correspond to: (1) – O_{ax}, (2) – O_{eq}, (3) – artefact, (4) – SS U-P, MS U-O_{ax1}-U-O_{ax2}, MS U-O_{eq}-P-O_{eq}, MS U-O_{eq}-P, (5) – S U-U, (6) – MS U-O_{ax1}-U-O_{ax2}. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Table 2

Summary of selected structural parameter based on shell fit analysis of the EXAFS data.

Sample	Shell	N ^a	R (Å) ^b	σ^2 (Å ²) ^c	ΔE_0 (eV) ^d	
U(VI)-Acidovorax pH 5.0 [U(VI)] = 0.1 mM	U = O	2 ^f	1.76	0.0016	2.9	
	U-O _{eq}	3.8	2.35	0.0105		
	U-P	1.4	3.58	0.0072 ^f		
	U-O _{eq} -P	/2.8	/3.67	0.0072 ^f		
	U-O _{eq} -P-O _{eq}	/1.4	/3.77	0.0072 ^f		
U(VI)-hydrate pH 2.0 [U(VI)] = 50 mM meta-autunite	U = O	2 ^f	1.76 (1.76) ^g	0.0016 (0.0013) ^g	2.8	
	U-O _{eq}	5 ^f (5.0) ^g	2.40 (2.40) ^g	0.0070 (0.0066) ^g		
	U = O	2 ^f	1.78 (1.78) ^g	0.0024		1.3
	U-O _{eq}	4 ^f	2.28 (2.32) ^g	0.0036		
	U-P	4 ^f	3.60 (3.59) ^g	0.0072		
U-O _{eq} -P	/8	/3.70	0.0072			
U-O _{eq} -P-O _{eq}	/4	/3.79	0.0072			
U(VI)-triscarboxylate [31]	U-U	/4	5.24 (5.23) ^g	0.0114	4.9	
	U = O	2 ^f	1.78	0.0014		
	U-O _{eq}	5.8	2.47	0.0071		
	U-C	3.3	2.88	0.0042 ^f		
	U-C _{dis}	/3.3	4.36	0.00645 ^f		
U(VI)-fructose-6-phosphate [49]	U = O	2 ^f	1.77	0.0014	1.0	
	U-O _{eq1}	5.2	2.32	0.0120		
	U-O _{eq2}	1.6	2.88	0.004		
U(VI)-lipopolysaccharide [50] U:P = 5 : 3, pH = 3.9	U = O	2 ^f	1.79	0.0034	1.8	
	U-O _{eq1}	2.7	2.33	0.0043		
	U-O _{eq2}	0.9	2.52	0.0043		

/parameter linked proportional to the parameter in the row above.

C_{dis} distal carbon atom of bidentately coordinated carboxylic group.

^a Errors in coordination numbers (N) are $\pm 25\%$.

^b Errors in radial distance (R) are ± 0.02 Å.

^c Debye-Waller factor (σ^2).

^d Shift in threshold energy (ΔE_0).

^e Bond distances based on the XRD analysis from meta-Autunite published by [30].

^f Fixed parameter.

^g Bond distances and Debye-Waller factors published by [57].

the sum of the fractions is only 90% which lead to an estimated error of 10% so that the number bidentately coordinated carboxylic groups in the bacterial sample could be given as 0.4 ± 0.3 . In consequence of the relative high error, we conclude that no or only a small fractional amount of U(VI) is bound to carboxylic groups. The

number of coordinated water molecules (N_{Owater}) determined by the LC fit with three and two references is $N_{\text{Owater}} = 2.7 \pm 0.5$ and $N_{\text{Owater}} = 2.2 \pm 0.5$, respectively, whereas in average 1.5 ± 0.4 monodentately coordinated phosphate groups are obtained for both LC fits which is in line with the shell fitted number of phosphate

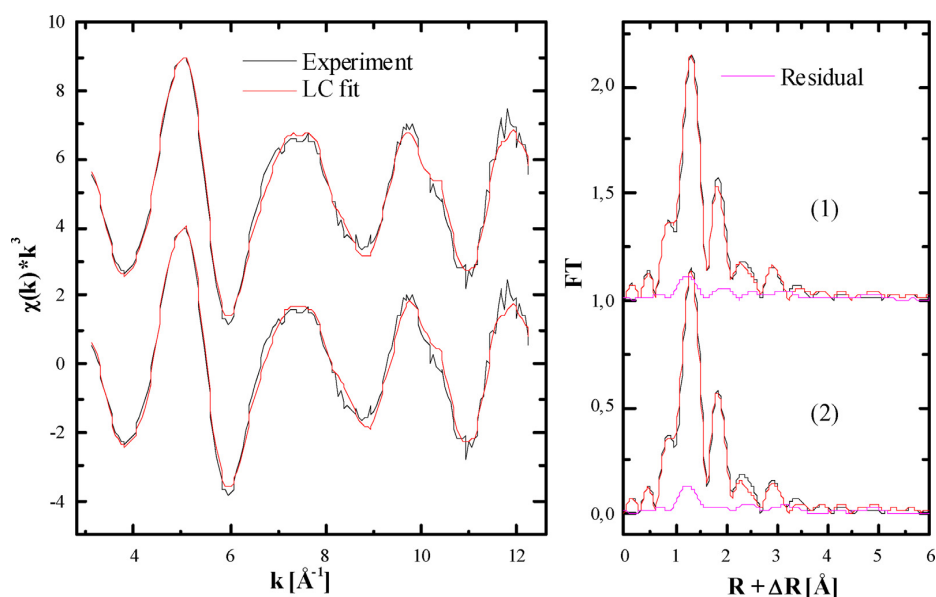


Fig. 5. U L_{III} -edge k^3 -weighted EXAFS spectra (left) and corresponding Fourier transforms (right) of U(VI)-*A. facilis*. LC fits (red) of experimental data (black) by using two different models, including reference spectra: (1) U(VI)-hydrate, meta-autunite, aqueous U(VI)-triscarboxylate complex, (2) U(VI)-hydrate and meta-autunite. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

groups of $N_p = 1.4$ (Table 2). The total coordination number of O_{eq} is $N_{Oeq} = 4.2 \pm 0.4$ and $N_{Oeq} = 4.4 \pm 0.4$ for the LC fit with two and three references, respectively.

Similar spectral features and a relative short average U- O_{eq} bond length of 2.35 Å where observed for the U(VI) interaction with sugar phosphates, like fructose-6-phosphate, and for the U(VI) interaction with lipopolysaccharide (LPS) (U:P=5:3 at pH 3.9) where a binding of the U(VI) via organic phosphate groups in a monodentate fashion was proposed [49,50] (Table 2). Moreover, the measured structural parameter of the bacterial sample (Table 2) are in close agreement with those observed in the U(VI)-*C. algae* system [34] for which also a monodentate U-P interaction was proposed.

Meta-autunite could be the result of a biomineralization process triggered by *A. facilis* cells. As described in the literature [51,52,53] microbial cells are able to induce biomineralization processes in the presence of U(VI) by secreting phosphate. By comparing the measured EXAFS oscillation of the bacterial sample with those of meta-autunite we can exclude this hypothesis (Fig. 5). Moreover, the FT shows no U-U interaction at 4.9 Å (feature (5), Fig. 5) which would be an indication for the formation of meta-autunite due to a biomineralization processes. Hence, a biosorption process of U(VI) onto functional groups of the cell envelope might dominate.

3.5. In-situ ATR FT-IR spectroscopy

For complementary molecular and kinetic information with a sub-minute time resolution the U(VI) sorption process on *A. facilis* cells, cell membrane and PPGs were investigated and selected spectra are given in Fig. 6. Two spectra are calculated for the conditioning step (Fig. 6A, red traces). Small positive bands during 30 min of conditioning likely demonstrate the adaption of surface functionalities to certain solution conditions, such as pH 5 during the equilibration of the system. The absence of any bands in the spectrum obtained at the end of prolonged conditioning reflects the stability of *A. facilis* cell film on the ATR crystal which is indispensable for the detection of sorbed species during the following sorption process. Same stabilities were found for films prepared of cell membrane and PPGs.

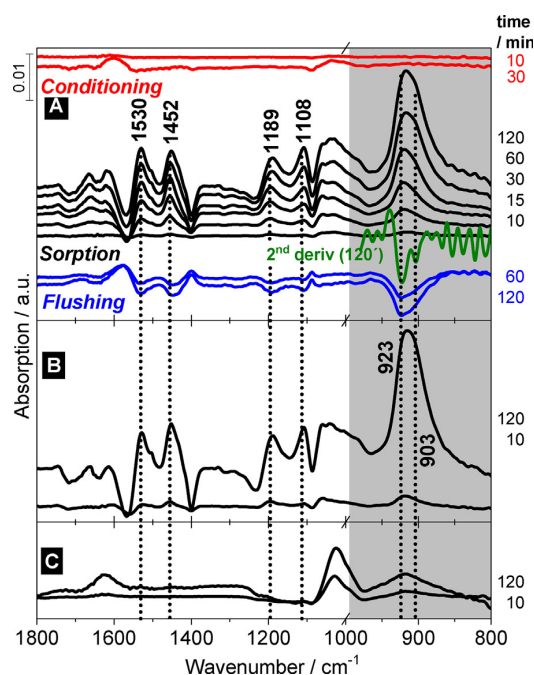


Fig. 6. In-situ ATR FT-IR difference spectra of U(VI) sorption on *A. facilis* cells and cell components. (A) Cells: stable cell film on the ATR crystal (red). Cells: recorded at different times after induction of U(VI) (black). Cells: show reversibility (blue); green trace: exact band position values, the second-derivative; (B) cell membrane; (C) PPG; in (B) and (C) only sorption spectra obtained after 10 and 120 min after induction of U(VI) are shown. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The ATR FT-IR difference spectra calculated between the conditioning and at several time steps after induction of U(VI) sorption show well resolved absorption bands from 1550 to 1400 cm^{-1} and from 1200 to 1100 cm^{-1} as well as below 950 cm^{-1} with increas-

Table 3
Tentative assignment of bands observed in difference spectra of in-situ ATR FT-IR sorption experiments.

Peak position (cm ⁻¹)	Tentative assignment to vibrational mode [54,55,50,56,58]
1530	ν_{as} (COO ⁻)
1452	ν_s (COO ⁻)
1189	ν_{as} (P-O)
1108	ν_{as} (P-O)
1022 (broad)	ν_{as} (P-O) inorganic phosphate in PPG
923	ν_3 (UO ₂) coordinated to carboxyl groups
918 (broad)	ν_3 (UO ₂) coordinated to inorganic phosphate in PPG
903	ν_3 (UO ₂) coordinated to phosphoryl groups

ing intensities upon time reflecting U(VI) accumulation on the cell surface (Fig. 6A, black traces). The band at ~914 cm⁻¹ originates from the asymmetric stretching mode of the uranyl moiety, ν_3 (UO₂). A second-derivation analysis revealed two local peak maxima at 923 and 903 cm⁻¹, suggesting the presence of two uranyl species (green: 120 min sorption spectrum). From a previous IR spectroscopic study, similar frequencies of ν_3 (UO₂) mode were observed and were assigned to a coordination of uranyl to carboxylate and phosphoryl groups, respectively. This is in perfect agreement with the spectral changes in the frequency range of carboxylate (1530–1430 cm⁻¹) and phosphoryl (1200–1110 cm⁻¹) groups (Table 3) [54,56,50]. A closer look to the ν_3 (UO₂) band exhibits slight shifting within the time-resolved data, suggesting that the ratio between carboxylate and phosphoryl bound U(VI) may change upon accumulation on the cell. The experiment was repeated using only the separated *A. facilis* cell membrane as stationary film on the ATR crystal. The spectra and derived information are equal to the experiment with *A. facilis* cells (Fig. 6B), in according to STEM/HAADF results showing that the majority of U(VI) is bound to functionalities at the cell membrane (Fig. 2). Subsequent to sorption, the U loaded cell film was flushed again with blank solution. The difference spectra obtained at 10 and 120 min (Fig. 6A, blue traces) show negative bands at equal frequencies to those observed during the sorption stage but much reduced in intensity. In addition, the band of ν_3 (UO₂) is little distorted. The spectra reflect a reversibility of the U(VI) association whereby only a low amount of U(VI) was released within 120 min, possibly to a higher extent by carboxylate functionalities. Indicating a strong interaction, most of the bound uranium presumably remained on the cells. The sorption spectra obtained from the PPG *in-situ* experiment are given in Fig. 6C, showing two broad bands at 1025 and 915 cm⁻¹ very similar to spectral data obtained from inorganic uranium-phosphate complexation in solution and as precipitate and as sorption complex on mineral interfaces [57]. To a certain proportion these features may also contribute to the sorption spectra of the *A. facilis* cell and cell membrane, explaining the broad undefined band at ~1025 cm⁻¹.

In summary, the *in-situ* ATR FT-IR spectroscopic measurements clearly show the formation of two dominating species involved in the U(VI) association reactions on *A. facilis* cells: U(VI) bound to carboxylate groups and phosphoryl groups of the outer membrane identified by spectral fingerprint of modes related to U(VI) and the functionalities. The *in-situ* ATR FT-IR studies on isolated PPGs showed bands similar to spectral data obtained from inorganic uranium-phosphate complexation, which could not be determined in ATR FT-IR spectra of living *A. facilis* cells due to the detection limit of the method. This indicates that PPGs may play a subordinated role during the early stage of U incubation by *A. facilis* cells. Even in STEM/HAAD/EDX studies it was shown that, compared to the cell membrane, the concentration of U is much lower or not detectable in the cytoplasmic PPGs.

4. Conclusions

This work characterizes the U(VI) sequestration by *A. facilis* using a multidisciplinary approach combining spectroscopic and microscopic techniques. The local coordination of U associated with the cells of *A. facilis* depends upon time incubation. U biosorption by outer membrane LPS containing phosphoryl residues was observed within the first hours of contact between the cells and U. By increasing the incubation time up to 24 h the implication of carboxyl groups within the cell wall PGN was proved by TRLFS and EXAFS analysis in addition to phosphoryl groups. In addition to these functional groups located at the cell surfaces, U is coordinated also, but with low degree, to phosphoryl groups of the intracellular PPG as was indicated by STEM analysis. This study showed that different cell compartments play a major role in the sequestration of U. Our findings contribute to a better understanding of the mechanisms of microbial response to U and demonstrate that *A. facilis* may play an important role in predicting the fate and transport of U in uranium-contaminated sites by being a suitable candidate for bioremediation purposes.

Acknowledgements

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) grand No. 02NUK030 F (TransAqua). We acknowledge the technical support of Maria del Mar Abad of the Centro de Instrumentacion Cientifica (University Granada) for STEM/HAADF analysis. Karsten Heims' skilful work on *in-situ* ATR FT-IR spectroscopy is gratefully acknowledged. Sabrina Gurlit and Stefanie Schubert are thanked for ICP-MS measurements.

References

- [1] J.L. Nyman, T.L. Marsh, M.A. Ginder-Vogel, M. Gentile, S. Fendorf, C. Criddle, Heterogeneous response to biostimulation for U(VI) reduction in replicated sediment microcosms, *Biodegradation* 17 (2006) 303–316.
- [2] S. Sachs, V. Brendler, G. Geipel, Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy, *Radiochim. Acta* 95 (2007) 103–110.
- [3] H. Moll, T. Reich, C. Hennig, A. Rossberg, Z. Szabó, I. Grenthe, Solution coordination chemistry of uranium in the binary UO₂²⁺-SO₄²⁻ and the ternary UO₂²⁺-SO₄²⁻-OH⁻-system, *Radiochim. Acta* 88 (2000) 559–566.
- [4] T. Arnold, N. Baumann, E. Krawczyk-Bärsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk, S. Weiss, Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment, *Geochim. Cosmochim. Acta* 75 (2011) 2200–2212.
- [5] Umweltbericht der Wismut GmbH, 2015, Chemnitz.
- [6] J.R. Lloyd, L.E. Macaskie, Biochemical basis of microbe-radiionuclide interactions, in: M.J. Kieth-Roach, F.R. Livens (Eds.), *Interactions of Microorganisms with Radionuclides*, Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 313–342.
- [7] K. Pedersen, Microorganisms and their influence on radionuclide migration in igneous rock environments, *J. Nucl. Radiochem. Sci.* 6 (1) (2005) 11–15.
- [8] D.R. Lovley, E.J.P. Phillips, Y. Gorby, E.R. Landa, Microbial reduction of uranium, *Nature* 350 (1991) 413–415.
- [9] R. Ganesh, K.G. Robinson, G.D. Reed, G.S. Saylor, Reduction of hexavalent uranium from organic complex by sulfate- and iron-reducing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4385–4391.
- [10] D.R. Lovley, S.J. Giovannoni, D.C. White, J.E. Champine, E.J. Phillips, Y.A. Gorby, S. Goodwin, *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals, *Arch. Microbiol.* 159 (4) (1993) 336–344.
- [11] J.K. Fredrickson, J.M. Zachara, D.W. Kennedy, M.C. Duff, Y.A. Gorby, S.W. Li, K.M. Krupka, Reduction of U(VI) in goethite (R-FeOOH) suspensions by a dissimilatory metal reducing bacterium, *Geochim. Cosmochim. Acta* 64 (2000) 3085–3098.
- [12] D.E. Holmes, K.T. Finneran, R.A. O'Neil, D.R. Lovley, Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium contaminated aquifer sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 2300–2306.
- [13] D.R. Lovley, E.J.P. Phillips, Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 850–856.
- [14] R. Ganesh, K.G. Robinson, L. Chu, D. Kucsmas, G.D. Reed, Reductive precipitation of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation of cocontaminant effects and selective removal, *Water Res.* 33 (1999) 3447–3458.

- [15] R.B. Payne, D.M. Gentry, B.J. Rapp-Giles, L. Casalot, J.D. Wall, Uranium reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 and a cytochrome c3 mutant, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3129–3132.
- [16] H. Beyenal, R.K. Sani, B.M. Peyton, A.C. Dohnalkova, J.E. Amonette, Z. Lewandowski, Uranium immobilization by sulfate-reducing biofilms, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 2067–2074.
- [17] Y. Suzuki, S.D. Kelly, K.M. Kemner, J.F. Banfield, Nanometersize products of uranium bioreduction, *Nature* 419 (2002) 134.
- [18] Y. Suzuki, S.D. Kelly, K.M. Kemner, J.F. Banfield, Microbial populations stimulated for hexavalent uranium reduction in uranium mine sediment, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1337–1346.
- [19] A. Schatz, C. Bovell, Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, *Hydrogenomonas facilis*, *J. Bacteriol.* 63 (1952) 87–98.
- [20] M. Fabisch, F. Beulig, D.M. Akob, K. Küsel, Surprising abundance of *Gallionella*-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations, *Front. Microbiol.* 4 (390) (2013) 1–12.
- [21] V.F. Bondici, J.R. Lawrence, N.H. Khan, J.E. Hill, E. Yergeau, G.M. Wolfaardt, J. Warner, D.R. Korber, Microbial communities in low permeability, high pH uranium mine tailings: characterization and potential effects, *J. Appl. Microbiol.* 114 (2013) 1671–1686.
- [22] W.-M. Wu, J. Carley, T. Gentry, M.A. Ginder-Vogel, M. Fienen, T. Mehlhorn, H. Yan, S. Carroll, M.N. Pace, J. Nyman, J. Luo, M. Gentile, M.W. Fields, R.F. Hickey, B. Gu, D. Watson, O.A. Cirpka, J. Zhou, S. Fendorf, P.K. Kitanidis, P.M. Jardine, C.S. Criddle, Pilot-scale in situ bioremediation of uranium in a highly contaminated aquifer. 2. Reduction of U(VI) and geochemical control of U(VI) bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3986–3995.
- [23] E. Cardenas, W.-M. Wu, M.B. Leigh, J. Carley, S. Carroll, T. Gentry, J. Luo, D. Watson, B. Gu, M. Ginder-Vogel, P.K. Kitanidis, P.M. Jardine, J. Zhou, C.S. Criddle, T.L. Marsh, J.M. Tiedje, Microbial communities in contaminated sediments, associated with bioremediation of uranium to submicromolar levels, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (12) (2008) 3718–3729.
- [24] A. Willems, M. Gillis, Genus M II, *Acidovorax* Willems, Falsen, Pot, Jantzen, Hoste, Vandamme, Gillis, Kersters and De Ley 1990, 394vp, in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, 2005, pp. 696–703.
- [25] N.N. North, S.L. Dollhopf, L. Petrie, J.D. Istok, D.L. Balkwill, J.E. Kostka, Change in bacterial community structure during in situ biostimulation of subsurface sediment contaminated with uranium and nitrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8) (2004) 4911–4920.
- [26] U. Gerber, I. Zirnstein, E. Krawczyk-Bärsch, H. Lünsdorf, T. Arnold, M.L. Merroun, Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium *Acidovorax facilis* and uranium(VI), *J. Hazard. Mater.* 317 (2016) 127–134.
- [27] A.R. Spurr, A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electronmicroscopy, *J. Ultrastruct. Res.* 26 (1969) 31–43.
- [28] R. Steudtner, S. Sachs, K. Schmeide, V. Brendler, G. Bernhard, Ternary uranium(VI) carbonato humate complex studied by cryo-TRLFS, *Radiochim. Acta* 99 (2011) 687–692.
- [29] W. Matz, N. Schell, G. Bernhard, F. Prokert, T. Reich, J. Claußner, W. Oehme, R. Schlenk, S. Dienel, H. Funke, F. Eichhorn, M. Betzl, D. Pröhl, U. Strauch, G. Hüttig, H. Krug, W. Neumann, V. Brendler, P. Reichel, M.A. Denecke, H. Nitsche, ROBL – a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF, *J. Synchrotron Radiat.* 6 (6) (1999) 1076–1085.
- [30] E.S. Makarov, V.I. Ivanov, The crystalline structure of $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ meta-autunite, *Doklady Akademii Nauk SSSR* 132 (3) (1960) 673–676.
- [31] C. Lucks, A. Rossberg, S. Tsushima, H. Foerstendorf, A.C. Scheinost, G. Bernhard, Aqueous uranium(VI) complexes with acetic and succinic acid: speciation and structure revisited, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 12288–12300.
- [32] G.N. George, I.J. Pickering, EXAFSPAK: A Suite of Computer Program for Analysis of X-ray Absorption Spectra, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, Stanford, CA, 1995.
- [33] A.L. Ankudinov, B. Ravel, J.J. Rehr, S.D. Conradson, Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure, *Phys. Rev. B* 58 (1998) 7565.
- [34] M. Vogel, A. Günther, A. Rossberg, B. Li, G. Bernhard, J. Raff, Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH and cell activity, *Sci. Total Environ.* 409 (2010) 384–395.
- [35] E.A. Hudson, P.G. Allen, L.J. Terminello, M.A. Denecke, T. Reich, Polarized X-ray-absorption spectroscopy of uranyl ion: comparison of experiment and theory, *Phys. Rev. B* 54 (1996) 156–165.
- [36] I.S. Kulaev, Biochemistry of inorganic polyphosphates, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 73 (1975) 131–157.
- [37] K. Müller, H. Foerstendorf, T. Meusel, V. Brendler, G. Lefèvre, M.J. Comarmond, T.E. Payne, Sorption of U(VI) at the TiO_2 -water interface: an *in-situ* vibrational spectroscopic study, *Geochim. Cosmochim. Acta* 76 (2012) 191–205.
- [38] K. Müller, H. Foerstendorf, V. Brendler, A. Rossberg, K. Stolze, A. Gröschel, The surface reactions of U(VI) on gamma- Al_2O_3 – *in-situ* spectroscopic evaluation of the transition from sorption complexation to surface precipitation, *Chem. Geol.* 357 (2013) 75–84.
- [39] R. Docampo, Acidocalcisomes and polyphosphate granules. Microbiol monogr (1), in: J.M. Shively: Inclusions in Prokaryotes, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [40] A. Barkleit, H. Moll, G. Bernhard, Interaction of uranium(VI) with lipopolysaccharide, *Dalton Trans.* (2008) 2879–2886.
- [41] T.J. Beveridge, R.J. Doyle, Metal Ion and Bacteria, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 1989.
- [42] A. Barkleit, H. Moll, G. Bernhard, Complexation of uranium(VI) with peptidoglycan, *Dalton Trans.* (2009) 5379–5385.
- [43] V.R.F. Matias, T.J. Beveridge, Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 1011–1021.
- [44] A.D. Warth, J.L. Strominger, Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* 10 (1971) 4349–4358.
- [45] B.D. Hoyle, T.J. Beveridge, Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12, *Can. J. Microbiol.* 30 (1984) 204–211.
- [46] M.L. Merroun, J. Raff, A. Rossberg, C. Hennig, T. Reich, S. Selenska-Pobell, Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5532–5543.
- [47] G.G. Li, F. Bridges, C.H. Booth, X-ray-absorption fine-structure standards: a comparison of experiment and theory, *Phys. Rev. B* 52 (9) (1995) 6332–6348.
- [48] A. Rossberg, K.-U. Ulrich, S. Weiss, S. Tsushima, T. Hiemstra, A.C. Scheinost, Identification of uranyl surface complexes on ferrihydrite: advanced EXAFS data analysis and CD-MUSIC modeling, *Environ. Sci. Technol.* 43 (5) (2009) 1400–1406.
- [49] A. Koban, G. Geipel, A. Rossberg, G. Bernhard, Uranium(VI) complexes with sugar phosphates in aqueous solution, *Radiochim. Acta* 92 (2004) 903–908.
- [50] A. Barkleit, H. Foerstendorf, B. Li, A. Rossberg, H. Moll, G. Bernhard, Coordination of uranium(VI) with functional groups of bacterial lipopolysaccharide studied by EXAFS and FT-IR spectroscopy, *Dalton Trans.* 40 (2011) 9868–9876.
- [51] M. Merroun, M. Nedelkova, A. Rossberg, C. Hennig, S. Selenska-Pobell, Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium, *Radiochim. Acta* 94 (2006) 723–729.
- [52] F. Jroundi, M.L. Merroun, J.M. Arias, A. Rossberg, S. Selenska-Pobell, M.T. Gonzalez-Munoz, Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in *Myxococcus xanthus*, *Geomicrobiol. J.* 24 (2007) 441–449.
- [53] E. Krawczyk-Bärsch, H. Lünsdorf, K. Pedersen, T. Arnold, F. Bok, R. Steudtner, A. Lehtinen, V. Brendler, Immobilization of uranium in biofilm microorganisms exposed to groundwater seeps over granitic rock tunnel walls in Olkiluoto, Finland, *Geochim. Cosmochim. Acta* 96 (2012) 94–104.
- [54] B. Li, J. Raff, A. Barkleit, G. Bernhard, H. Foerstendorf, Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitin a vibrational spectroscopic approach, *J. Inorg. Biochem.* 104 (7) (2010) 718–725.
- [55] A. Barkleit, H. Foerstendorf, K. Heim, S. Sachs, G. Bernhard, Complex formation of uranium(VI) with l-phenylalanine and 3-phenylpropionic acid studied by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 62 (7) (2008) 798–802.
- [56] M.J. Comarmond, R. Steudtner, M. Stockmann, K. Heim, K. Müller, V. Brendler, H. Foerstendorf, The sorption processes of U(VI) onto SiO_2 in the presence of phosphate: from binary surface species to precipitation, *Environ. Sci. Technol.* 50 (21) (2016) 11610–11618.
- [57] H. Moll, G. Geipel, T. Reich, G. Bernhard, T. Fanghänel, I. Grenthe, Uranyl(VI) complexes with alpha-substituted carboxylic acids in aqueous solution, *Radiochim. Acta* 91 (2003) 11–20.
- [58] W. Jiang, A. Saxena, B. Song, B.B. Ward, T.J. Beveridge, S.C.B. Myneni, *Langmuir* 20 (2004) 11433–11442.

3.3 Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine

Gerber U, Hübner R, Rossberg A, Krawczyk-Bärsch E, Merroun ML
Submitted to PLOS ONE (29/03/2018), first revision (16/05/2018)

Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine

Ulrike Gerber^{1,*,#}, René Hübner², André Rossberg^{1,3}, Evelyn Krawczyk-Bärsch¹, Mohamed L. Merroun⁴

¹ Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

² Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Ion Beam Physics and Materials Research, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

³ Rossendorf Beamline at ESRF - The European Synchrotron, CS40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France

⁴ University of Granada, Department of Microbiology, Campus Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

Present Address: Faculty of Natural Sciences, Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Universitätsplatz 1, 01968 Senftenberg, Germany

* Corresponding author

E-Mail: gerberu@b-tu.de (UG)

Telephone: +49 3573 85 974

Fax: +49 3573 85 909

Abstract

Remediation of former uranium mining sites represents one of the biggest challenges worldwide that have to be solved in this century. During the last years, the search of alternative strategies involving environmentally sustainable treatments has started. Bioremediation, the use of microorganisms to clean up polluted sites in the environment, is considered one the best alternative. By means of culture-dependent methods, we isolated an indigenous yeast strain, KS5 (*Rhodospiridium toruloides*), directly from the flooding water of a former uranium mining site and investigated its interactions with uranium. Our results highlight distinct adaptive mechanisms towards high uranium concentrations on the one hand, and complex interaction mechanisms on the other. The cells of the strain KS5 exhibited high uranium tolerance being able to grow up

to 6 mM, and also high ability to accumulate this radionuclide (350 mg uranium/g drybiomass, 48 hours). The removal of uranium by KS5 displays a temperature- and cell viability-dependent process, indicating that metabolic activity could be involved. By STEM (Scanning transmission electron microscopy) investigations we observed that uranium was removed by two mechanisms, active bioaccumulation and inactive biosorption. This study highlights the potential of KS5 as a representative of indigenous species within the flooding water of a former uranium mine which may play a key role in bioremediation of uranium contaminated sites.

Introduction

Heavy metal pollution of the environment is one of the biggest problems today due to its great impact on the surface and groundwater, and even in the catchment areas of drinking water [1]. In particular, uranium contamination is a result of former mining activities, by weathering of uranium containing minerals or by accidental release to the environment [2, 3]. In Germany, the former uranium mine Königstein was one of the smallest mining sites in Eastern-Germany. Uranium was recovered from the underground sandstone by leaching with sulfuric acid [4]. The mining activity resulted in the release of about 2 million of cubic meters of acid pore water, which contained high amounts of uranium. Due to the stop of uranium mining in Germany, the underground is actually in the process of remediation and since 2001, the mine is flooded in a controlled way. Nevertheless, the flooding water still contains relatively high concentrations of uranium (8 mg/L) and other heavy metals. Additionally, the flooding water displays a low pH (around 3) as a consequence of the leaching process [5]. For this reason, the flooding water is treated by an elaborate chemical wastewater treatment plant. In contrast to other former uranium mines in Germany, Königstein is unique in the remediation effort, due to disturbances in the underground rock formation, it is not possible to flood the mine completely, otherwise nearby aquifers would be potentially contaminated with uranium. Therefore, the flooding water is pumped to the surface (pump-and-treat technique) and is treated by chemical precipitation and ion exchange [6].

Within natural environments the mobility and bioavailability of uranium depends strongly on its speciation and physicochemical form [7]. Particularly in acidic ($\text{pH} < 5$) and non-reducing conditions the free uranyl ion (UO_2^{2+}) predominates the uranium speciation [8]. Previous studies showed that uranium mainly occurs in the bulk solution as highly soluble UO_2SO_4 -species within the flooding water of the former uranium mine [9]. Besides abiotic factors such as pH, redox potential, dissolved organic and inorganic ligands, and the presence of solid particulates [5, 10, 11] [5,10,11], biological processes could have a significant impact on the migration of radionuclides. They can affect their mobility by a variety of interaction mechanisms, such as biosorption on functional groups of the cell-surface, bioaccumulation within the cell, biotransformation (reduc-

tion or oxidation of the radionuclide), and biomineralization [2, 12–19].

Despite harsh environmental conditions generated in the mining process, such as high uranium and sulfate concentrations, and low pH, leading to acid mine drainage (AMD), microorganisms are able to survive and even display metabolic activity in these environments [20]. In addition, culture-independent studies of the microbial diversity within the flooding water of the former uranium mine Königstein revealed a diverse community of microbial life [21, 22]. Therefore, microorganisms should be taken into consideration to investigate possible interaction mechanisms which could be helpful for biological approaches concerning bioremediation.

Investigations on the influence of yeast cells on actinides, like uranium are still in its infancy [23]. Much is known about the interaction of model organisms, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, with heavy metals and radionuclides [24–26]. It seems to be important to consider microorganisms from ecological niches, like the former uranium mining site Königstein, for the use in metal bioremediation approaches, since conventional technologies, such as chemical precipitation and ion exchange, are cost-intensive and often inefficient for metals at low concentrations [27–29]. Therefore, the present study aimed to describe the possible role of microorganisms that were isolated from their natural uranium-contaminated habitats as a potential alternative to conventional chemical remediation strategies, due to their adaptive tolerances and possible immobilization ability of radionuclides. We investigated an isolated yeast, KS5, which was identified as *Rhodospiridium toruloides*. *R. toruloides* (syn. *Rhodotorula gracilis*) belongs to the division of Basidiomycota and is an oleaginous yeast [30]. Species of *Rhodospiridium* were isolated from heavy metal contaminated soil in former studies. Heavy metal tolerance tests with this strain displayed high tolerances against several metals [31]. In addition to the high tolerances, *R. toruloides* offers many other biotechnological opportunities as an alternative yeast model compared to *S. cerevisiae*, which lacks several biochemical features [30]. Furthermore, we investigated the uranium removal capacity of the indigenous yeast KS5 and its tolerance to selected heavy metals. More precisely, different influencing factors on the uranium removal capacity of KS5 were examined, such as temperature, initial dry biomass and viability of the yeast cells. To obtain a detailed and closer look on the localization of the removed uranium on the cell membrane and possibly inside the cells, high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) were performed. The structural parameters of the uranium complexes formed by the strain were studied using EXAFS (extended X-ray absorption fine structure spectroscopy) spectroscopy. In addition, we compared the metal tolerances of the isolated strain KS5 with the reference strain DSM 10134 to investigate natural adaption mechanisms against heavy metals. The results of our investigations provide new insights on the interaction of indigenous yeast cells with uranium, and consequently, a possible use of microbial cells for *in situ* bioremediation.

Methods and Materials

Water sampling, microbial isolation and cultivation conditions

Samples (1 L) of flooding water from the former uranium mine in Königstein (Saxony, Germany) were taken into sterile glass bottles. The water was stored at 4 °C until further processing. For isolation of aerobic fungal microorganisms, 500 µL of the flooding water was plated onto solid SDA (Sabouraud Dextrose Agar) medium (Peptone 5.0 g/L, Casein Peptone 5.0 g/L, Glucose 40.0 g/L, 15.0 g/L Agar-Agar, pH 6.5 ± 0.1) [32]. The plates were incubated at 30 °C for five days. After appearing of single colonies, they were picked and transferred into liquid SDA medium to obtain pure cultures. The purity of the cultures was tested by plating again onto solid plates and by PCR analysis. *R. toruloides* DSM 10134 was obtained from the DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany).

Molecular characterization, amplification of rRNA ITS gene fragments and sequencing

For molecular identification of the isolated microorganisms, cells were grown in liquid SDA medium for 48 hours at 30 °C and 130 rpm. Two mL of the solution were sampled and the DNA was extracted using alkaline lysis [33]. The rRNA ITS gene fragments which are the DNA-barcode established for fungi [34] were amplified using the primer pair ITS1 and ITS4 [35]. PCR was performed as described in White *et al.*, 1990. Before sequencing the amplified products, the DNA was purified using the innuPREP-PCR pure Kit (Analytik Jena, Jena, Germany), and eluted in double-distilled water according the instructions of the manufacturer. The purified PCR products were sequenced by GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany). The retrieved rRNA ITS sequences were compared with sequences available in the non-redundant nucleotide database of the National Center or Biotechnology database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLASTN and the ribosomal database project.

Heavy metal tolerance (determination of MIC) and use of different carbon sources

For heavy metal tolerance tests with uranium, chromium, zinc, cadmium, and copper, yeast cells (KS5 and DSM 10134) were grown for 48 hours in liquid SDA medium at 30 °C and 130 rpm. Subsequently, cells were washed twice in 0.9 % NaCl solution to remove the residual ingredient medium. The microbial suspension with an initial OD_{600nm} of 5.0 was 1:500 diluted and 100 µL were plated onto solid agar plates containing SDA 1:5 diluted with adjusted metal concentration

(cadmium, copper and chromium 0.1 - 5.0 mM; zinc and uranium 0.1 - 10.0 mM). The plates were incubated for 48 hours at 30 °C. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in triplicates. In addition, tolerance test with uranium in liquid medium was determined using the isolate KS5. SDA medium 1:5 diluted was adjusted with different uranium concentrations (0.05, 0.1, 0.2 mM) and was inoculated with 50 µL of a 48 hours old culture. After distinct time points, samples were taken to analyze the OD_{600nm}. The incubation took place at 30 °C and 130 rpm in triplicates. The resulting growth curves were plotted with logarithmic scale to calculate the growth rate $\mu = \frac{\ln x_t - \ln t_0}{t - t_0}$ and doubling time $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$ within the linear exponential phase. To investigate the use of different carbon sources, KS5 and DSM 10134 were pre-cultured in liquid SDA medium as described above and washed two times with 0.9 % NaCl solution. The washed cells were diluted to an OD_{600nm} of 0.1. 50 µL solution from the diluted and washed cell suspension was inoculated in 50 mL minimal-salt-medium (MSM, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.1 g/L MgSO₄·7 H₂O, 0.01 g/L CaCl₂, 0.005 g/L FeCl₂, 0.01 g/L MnCl₂) which was supplemented with 1 % of different carbon sources (lactate, maltose, mannose, fructose, glucose, sucrose, xylose, acetate, oxalic acid, glycerol, ethanol, galactose). The cells were incubated at 30 °C and 130 rpm for 72 hours. The experiments were carried out in triplicates. Finally, to investigate the growth with the different carbon sources, the OD_{600nm} was measured.

Determination of uranium removal capacity

To test the ability to remove uranium from the surrounding solution, yeast cells of KS5 were grown in liquid SDA medium for 48 hours at 30 °C and 130 rpm. Afterwards cells were washed three times with sterilized tap water pH 5.0. The washed yeast cells were suspended in the background solution (sterilized tap water pH 5.0) to an initial OD_{600nm} of 1.0 (6.5 mg/mL ± 0.5 mg/mL). Subsequently, uranium as UO₂(NO₃)₂ was added to reach a final concentration of 0.1 mM. To investigate the temperature-dependent uranium removal capacity, the yeast cells were washed with an acclimated background solution at 4 °C or 30 °C. The cell suspensions were incubated at selected temperatures for 48 hours. During the incubation, samples were taken at distinct time points (5 min, 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 26 h, 48 h) to determine the residual uranium concentration within the supernatant. All experiments were carried out in triplicates. The samples were centrifuged for 5 min at 13,000 rpm at RT (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and the acidified supernatant was analyzed with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry measurements (ICP-MS) using an ELAN 9000 type ICP-MS spectrometer (Perkin Elmer, Überlingen, Germany). To study the uranium removal capacity of dead cells, cultures grown for 48 h were immediately autoclaved for 30 min at 121 °C and 1 bar for 30 min. The autoclaved cells were assayed same as it is described above. The amount of removed uranium from the solution was normalized to the dry biomass after drying the cell

pellet for 24 h at 100 °C in an oven (Memmert UE500, Schwabach, Germany). To investigate the uranium removal capacity dependent on the initial dry biomass (dbm), different weights of biomass were applied. The cells were incubated with 0.1 mM uranium for 48 hours at 30 °C and 130 rpm. Afterwards the cells were harvested and dried as described above.

Effect of uranium on cellular viability using flow cytometry

To investigate the effect of uranium on the cell, uranium-treated cells were stained with fluorescent dyes and analyzed by flow cytometry techniques. Therefore, an inoculum of a pre-grown culture of KS5 and DSM 10134 was added to 1:5 diluted SDA medium either without uranium as a control or containing a uranium concentration of 0.1 mM. The cells were incubated for 24 hours at 30 °C and 130 rpm. Afterwards, the cells were harvested by centrifugation at 8,000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 10 minutes and washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS). Subsequently, the cells were dissolved in PBS to approximately 10⁶ cells/mL. As the "dead" control an aliquot of the cells were incubated for 45 min at 80 °C. The cell viability test was performed with propidium iodide (PI) (stain dead cells) and fluorescein diacetate (FDA) (stain alive cells). The fluorescent dyes were added to a final concentration of 2 µL/mL for PI and 20 µL/mL FDA. The cell suspension was incubated for 15 min in the dark at ambient temperature. After the incubation with the two dyes both strains were analyzed by flow cytometry using a FACSCantoII cytometer Becton Dickinson (San Jose Palo Alto, California) available at the "Centro de Instrumentación Científica" of the University of Granada, equipped with three lasers: 488 nm blue, 620 nm red, and 405 nm violet. All experiments were done in triplicates.

Transmission electron microscopy (TEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS)

Immediately after the uranium removal experiments, the cells were harvested by centrifugation for 10 min at 6,000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at room temperature to remove the supernatant. The cell pellet was washed twice with sterilized tap water at pH 5.0 added with 0.2 % glucose. Subsequently, the cells were fixed with 2.5 % (vol/vol) glutardialdehyde from 50 % (vol/vol) stock (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) over night at 4 celsius. After fixation, the cells were transferred in 4 % (w/v) aqueous low-melting agarose (Life Technologies Inc., Darmstadt, Germany), and after cooling, dehydrated by an ethanol series (25, 50, 75, 95 % for 10 min; 100 % for 2 h; 100 % over night at RT), followed by ERL-resin impregnation and polymerization. Sample preparation with minor modifications was done according to the user manual [36]. Ultrathin sections of 100 to 200 nm were cut with a diamond knife (EMS, Munic, Germany) and transferred onto carbon-coated Cu grids (lacey carbon on

200 mesh Cu (S166-2), Plano GmbH, Wetzlar, Germany). TEM investigations were done with an image Cs-corrected Titan 80-300 microscope (FEI) operated at an accelerating voltage of 300 kV. Qualitative atomic number contrast images were obtained by high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM). Employing a Li-drifted silicon detector (EDAX) in STEM mode, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) measurements were performed for qualitative chemical analysis. For elemental distribution analysis samples were examined in HAADF-STEM mode with Titan G2 80-300 microscope (FEI) at "Centro de Instrumentación Científica" at the University of Granada, Spain. Prior to each STEM analysis, the specimen holder was plasma-cleaned to minimize contamination.

Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy (EXAFS)

In order to obtain information about the structure of the formed uranium complexes at molecular scale, EXAFS analyses were performed. After uranium immobilization experiments with 0.1 mM uranium, contacted with the yeast cells for 48 h and at 30 °C (described above) the cells were ultra-centrifuged (Ultracentrifuge Optima XL100K, Rotor: SW 32Ti; Beckman Coulter, USA) for 1 h at $187\,000 \times g$. The supernatant was removed and the resulting cell pellet was placed into polyethylene sample holders. The sample holders were sealed, frozen, and stored in liquid nitrogen until the x-ray absorption measurements. The measurements were carried out at the Rossendorf Beamline BM20 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [37]. The yeast cells were measured at 15 K in a closed-cycle He-cryostat in order to reduce thermal noise and to avoid radiation-induced redox reactions of uranium during the measurements.

A water-cooled Si(111) double-crystal monochromator in channel cut mode (5-35 keV) was used to monochromatize the incoming synchrotron X-ray. In dependence of the uranium amount the spectra were collected in fluorescence mode or in transmission mode using ionization chambers. A reference sample, meta-autunite $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ [38], was measured at room temperature in transmission mode [39]. The K-edge spectrum of an yttrium metal foil (first inflection point at 17038 eV) was recorded simultaneously for energy calibration of the sample spectra. E_0 , the ionization energy, of the uranium L_{III} -edge was defined as the maximum of the second derivative of the averaged spectra. Eight scans in fluorescence mode were collected of the yeast cells incubated with 0.1 mM uranium. The fluorescence spectra were corrected for the detector dead time and subsequently averaged. The spectra were analyzed using the data analysis programs Sixpack/SamView (Version 0.59) (Webb 2005) and WinXAS (version 3.11) [40].

Results and discussion

Phylogenetic affiliation, morphological characterization and utilization of different carbon sources of KS5

Culture dependent methods based on the use of SDA medium resulted in the isolation of different microbial strains. SDA medium was developed and used for enrichment of fungal stains from environmental and clinical samples [31]. Single colonies obtained were used for the enrichment of pure cultures indigenous within the flooding water of Königstein. On SDA agar medium, the isolate KS5 displayed red round and shiny colonies (see Supplementary Material). The phylogenetic affiliation of the microbial isolate based on ITS rRNA gene analysis displayed high similarity to *R. toruloides* (strain JZ-9, 99 % identity and 100 % query cover). These yeast cells are known for their production of lipid related molecules, including biodiesel, adhesives, and high-value nutritional oils [41–47]. In addition, *R. toruloides* is able to utilize a wide variety of carbohydrates derived from plant biomass, including xylose and cellobiose [47–49]. To investigate the isolated strain in more detail, studies on the metabolic versatility regarding the use of different carbon sources were performed. In addition, the reference strain DSM 10134 was investigated in the same way. These experiments were performed in order to find a suitable carbon source to grow the isolated strain KS5 directly within the flooding water for *in situ* bioremediation approaches. The results (Table 3.1) displayed slight differences for the carbon sources mannose, acetate and ethanol. KS5 displays better growth on mannose and acetate, compared to DSM 10134. Notably, KS5 shows the ability to grow in the presence of xylose, in contrast to DSM 10134 which was not able to metabolize this sugar. The fermentation of xylose to ethanol by yeasts was well studied by several investigations and could be a useful process for the production of bioethanol [50–53]. Nevertheless, the results show that the uranium bioremediation potential of the isolated strain KS5 could be enhanced by the ability to use different sugars like maltose, fructose, mannose and sucrose.

Impact of uranium and selected heavy metals on microbial growth

To investigate the impact of uranium on the microbial growth, 1:5 diluted SDA medium with increasing metal concentrations was used. The growth curves of KS5 incubated with two different uranium concentrations are displayed in Fig. 1. It is clearly visible that the curves with uranium (0.05 and 0.1 mM) are clearly shifted compared to the control (without uranium). The lag-phase was longer which might originate from a possible adaption of the cells to uranium. Based on the growth curves, we calculated the growth rate μ and doubling time t_d for all three approaches (Table 3.2). Compared to the uranium-free control, a decrease of the growth rates μ with increasing metal concentrations was observed. At the highest uranium concentration of 0.1 mM, the growth

rate is more than half times smaller compared to that of the control. Furthermore, with increasing uranium concentrations also the doubling times increased. At 0.1 mM, the doubling time is more than twice higher. Nevertheless, the yeast cells are able to grow up to a uranium concentration of 0.1 mM in liquid SDA medium. Furthermore, the uranium tolerance of KS5 in comparison to the reference strain DSM 10134 was studied using flow cytometry. The cells were grown in 1:5 diluted SDA medium supplemented with 0.1 mM uranium. After an incubation time of 24 h the cells were stained with PI and FDA. The percentage distribution of viable and dead cells with and without uranium is displayed in Fig. 2. In the absence of uranium more than 80 % of the KS5 and all the DSM 10134 cells displayed viability. At a uranium concentration of 0.1 mM the two microbial strains tolerate this metal in different ways. The cell viability was reduced to 60 % and 10 % for KS5 and DSM 10134, respectively. The high uranium tolerance of KS5 could be explained by adaption of this strain to uranium in its natural habitat contaminated with uranium. To survive within the flooding water, containing high amounts of uranium, KS5 has to develop adaption mechanisms. Previous studies have shown that microorganisms, which were isolated from contaminated sites, display the ability to tolerate relatively higher concentrations of heavy metals [54–56]. These natural occurring microbes could be promising candidates for their use in the bioremediation of these inorganic contaminants [31]. In addition, Sakamoto *et al.*, 2012 [57] concluded that several genes of *S. cerevisiae* are involved in uranium tolerance. Phosphate transporter genes were observed to be responsible to contribute to uranium tolerance and furthermore, cell surface proteins contributed to the uranium accumulation [57]. Further investigations with the isolated strain KS5 should be performed to identify possible gene responsible for the high

Table 3.1: Growth on different carbon sources of KS5 and DSM 10134

Carbon source	KS5	DSM 10134
lactate	+	+
maltose	++	++
mannose	++	+
fructose	++	++
glucose	+	+
sucrose	++	++
xylose	+/-	-
acetate	+	+/-
oxalic acid	-	-
glycerol	+	+
ethanol	+/-	+
galactose	+/-	+/-

The two strains were grown in liquid mineral-salt-medium which was added with 1 % carbon source. Growth was determined by measuring of the OD_{600nm}. ++ good growth (OD > 0.4), + growth (OD 0.2-0.39), +/- less growth (OD < 0.2), - no growth (OD = 0.0), (n=3).

uranium tolerance. To evaluate the tolerance against selected heavy metals (Cr, Cu, Cd, Zn) and uranium, KS5 was grown on solid agar plates with increasing concentrations of metals. To compare possible adaptation mechanisms of the indigenous yeast KS5 the reference strain, DSM 10134, was investigated in the same way. The results of the heavy metal tolerances (Table 3.3) showed clear differences between the two strains. The investigated uranium tolerance on solid agar plates revealed a six-fold higher tolerance of the natural isolate (6.0 mM) compared to the reference strain (1.0 mM). Previous studies using other isolated yeasts from Spanish clay deposit showed similar results. Two isolated strains from bentonite samples exhibit tolerances up to 10 mM for uranium [58]. In addition, also for chromium KS5 showed a distinct higher tolerance than the reference DSM 10134. An isolated strain of *Rhodospiridium* sp. from metallurgical wastes displayed a similar high resistance to chromium [59]. However, for copper, cadmium and zinc we could not see obvious differences between the natural isolate and the reference strain. Our investigations on uranium and selected heavy metals tolerance revealed a possible evolutionary adaptation of KS5 to the surrounding environmental conditions. Compared to the reference strain, DMS 10134, the indigenous yeast exhibits tremendously high tolerances of uranium and chromium. To identify the molecular mechanisms behind these high tolerances gene expression analysis should be performed. Nevertheless, the results display the ability of KS5 to survive high concentrations of uranium as well as other heavy metals and thus, this indigenous yeast could play an important role of *in situ* bioremediation approaches of contaminated sites.

Uranium removal capacity of KS5

In order to determine the influence of KS5 on the immobilization capacity of uranium at natural conditions, uranium removal studies were performed. Uranium was removed rapidly from the surrounding solution within 24 h. After 48 h incubation, metal binding saturation by the cells was reached. The uranium removal capacity of the strain KS5 is a temperature-dependent process as was indicated in Fig. 3a. The cells were able to remove around 150 mg U/g dry biomass (dbm) from the surrounding solution at 30 °C, whereas at 4 °C the cells removed only around 75 mg U/g dbm, respectively. Experiments with heat-killed cells incubated at the same temperatures revealed that dead cells remove lower amounts of uranium compared to living yeast cells. Nevertheless, the amount of removed uranium of around 60 mg U/g dbm is almost equal to the amount for cells incubated at 4 °C. Furthermore, regarding to the percentage removal of uranium (Fig. 3b), living cells of KS5 removed nearly 100 % of soluble uranium from solution.

Table 3.2: Growth rate and doubling time of KS5 growing with different uranium concentrations

	Control	0.05 mM	0.1 mM
Growth rate μ [h ⁻¹]	0.19	0.13	0.08
Doubling time t_d [h]	3.73	5.55	8.56

In contrast, only 40 % of uranium was removed by heat killed cells. These findings imply that uranium removal by KS5 cells is metabolism-dependent. Moreover, the temperature-dependent experiments indicate that the uranium removal is based on different interaction processes, probably passive biosorption and active bioaccumulation. In addition, the less amount of removed uranium by dead cells of KS5 could prove the occurrence of metabolically-dependent processes. The process of biosorption is rapid and will be not affected by temperature due to the metabolism-independent sorption of uranium on negatively charged groups of the cell membrane [60, 61]. In contrast, the mechanism of intracellular bioaccumulation of actinides especially uranium is poorly understood. However, previous studies assumed an active transport of uranium into the cells [62]. The same temperature-dependent and thus possibly metabolism-dependent process was observed by uranium interaction experiments on *A. facilis* [63]. Similar to KS5, the bacterial cells removed lower amounts of uranium at lower temperatures. Compared to other yeast cells, like *S. cerevisiae*, KS5 could remove distinct higher amounts of uranium from the surrounding solution [64]. Although the authors used lower concentrations of the metal, the studied strain removed only 40 % of the initial concentration, which corresponds to a uranium removal capacity of 17 mgU/gdbm. In addition, they investigated the removal capacity of living and dead cells for comparison purpose. On the contrary to our findings *S. cerevisiae* accumulated higher amounts of uranium onto dead cells [64]. Indicating again that active mechanisms, such as bioaccumulation, could be responsible for the uranium removal by living cells of KS5 further to the passive process of biosorption. STEM analyses (results discussed below) support this assumption. Fig. 4 shows the effect of biomass concentration of KS5, ranging from 0.05 to 0.24 mg/mL on uranium removal capacity. The results reveal that the uranium binding capacity of the isolate KS5 decrease with increasing the biomass concentration from 0.05 to 0.1 mg/mL, accumulating up to 350 and 175 mgU/gdbm, respectively. Afterwards, the equilibrium of uranium removal capacity was reached at around 150 mgU/gdbm and almost the complete amount of dissolved uranium was removed by the yeast cells. In addition, the removal capacity dependent on dry biomass displays the same result as the kinetic studies mentioned above. The ability to remove uranium was different at two tested temperatures. Cells, which were incubated at 4 °C removed much less uranium compared to cells at 30 °C. Even at the lowest initial dry biomass only around 80 mgU/gdbm was removed by the yeast cells. Compared with other fungal strains, KS5 displays a high capacity of uranium removal. All observed *Rhizopus* strains displayed a ca-

Table 3.3: MIC (mM) for KS5 and DSM 10134 on SDA medium 1:5 diluted

	Uranium	Chromium	Copper	Cadmium	Zinc
KS5	6.0	5.0	0.4	< 0.1	1.0
DSM 10134	1.0	1.0	0.3	< 0.1	0.7

MIC: concentration at which no growth occurred; n=3.

capacity between 180 and 260 mgU/gdbm [65]. In contrast to bacterial cell such as *Paenibacillus* sp. JG-TB8, which was recovered from a soil sample of another uranium mining site (Johanngeorgenstadt, Germany) and displayed a uranium removal capacity of 138 mgU/gdbm (at pH 4.5) [66], KS5 shows a higher capacity. Compared to the model organism *S. cerevisiae*, which displayed maximum biosorption quantity of 102 mgU/gdbm [67], KS5 was able to remove more than twice. The biosorption of heavy metals especially uranium by yeast cells was shown in previous studies and confirmed our investigations of actively intracellular uptake [62, 68].

Localization of removed uranium by TEM studies

Transmission electron microscopy analyses were performed to investigate the cellular localization of uranium accumulated by the cells of KS5, and to elucidate the possible uranium interaction mechanisms with this yeast. The temperature-dependent uranium removal capacity tests, conducted at 4 °C and 30 °C, suggest the implication of two possible interaction mechanisms, namely passive biosorption and active bioaccumulation. Fig. 5a shows a STEM image of KS5 incubated at 30 °C together with two EDX spectra obtained for two regions of metal accumulates (Figs. 5b and 5c) localized within the cells. Intracellular uranium is detected in the form of phosphorous-containing needle-like structures which are localized at the plasmatic membrane, as well as at the outer membrane of the nucleolus. Additionally, uranium is associated in lipid granules localized within the cytoplasm. Several studies showed that *R. toruloides* is known for overproduction of lipids and pigments [44, 69–71] and for the formation of lipid droplets which serve as energy reservoir [72]. To investigate the possible binding sites of uranium, further element distribution analyses were performed (Figs. 6a-d). The results clearly indicated the common presence of uranium together with phosphorus (needle-like structures) (Fig. 6b). In contrast, when cells incubated at 4 °C (Fig. S2), it is clearly visible that, considerably less uranium amount was immobilized by the cells. Uranium is localized only at the outer membrane and is not taken up into the cell. Due to the fact, that only cells which were incubated at 30 °C display intracellular accumulated uranium whereas cells incubated at 4 °C showed no uranium inside the cells, it could be assumed that uranium is actively accumulated. In comparison to other yeast strains, the same needle-like fibrils were observed [64]. In contrast to our results, however, the authors could not detect any uranium accumulates inside the yeast cells. Furthermore, Strandberg *et al.* 1981 [73] suggested no metabolisms-dependent uranium interaction mechanism by *S. cerevisiae* which seems to be in disagreement with the finding reported in the present work, where the cells of the strain KS5 interact with uranium in a metabolisms-dependent way due to the temperature-dependent uranium immobilization capacity. Other studies on naturally isolated yeast cells from Spanish clay deposits confirmed a similar uranium immobilization behavior [58]. Uranium was precipitated on the outer cell surface as well as intracellularly. In addition, also needle-like structures of the immobilized uranium could be observed and were identified as uranyl-phosphate

minerals with a structure similar to H-autunite [58]. Resulting from the TEM investigations, we confirmed our previous results and our hypothesis that uranium was immobilized by two different mechanisms, by active bioaccumulation and by passive biosorption.

Speciation of removed uranium by EXAFS analysis

EXAFS measurements were performed to determine and identify the structure of uranium immobilized by the isolated strain KS5. Fig. 7 displays the k^3 -weighted EXAFS spectra and their corresponding Fourier transforms (FT) of the yeast cells contacted with 0.1 mM uranium at 30 °C for 48 h and of the meta-autunite reference. The FT signal of the uranium (U) interaction (Fig. 7, U_1) at 4.8 Å (not corrected for phase shift) was Fourier filtered in the R-interval of 4.53 Å - 5.18 Å for both samples. When comparing the signatures in the FT of the uranium solid formed upon contact with the KS5 strain (red traces) with the reference material meta-autunite (black traces), strong similarities can be seen, pointing toward the formation of a meta-autunite-like biomineral under the influence of the yeast cells. A strong indication of meta-autunite formation as a consequence of the biomineralization processes is the detected U-P interaction at $R+\Delta R = 2.9$ Å and the U-U interactions at $R+\Delta R = 4.8$ Å (U_1) and at $R+\Delta R = 6.8$ Å (U_2) (Fig. 7). Moreover, the Fourier filtered U_1 signals are in phase (Fig. 7, left), showing that the radial U- U_1 distance is the same for both samples. Though, the presence of other uranium species in minor contributions cannot completely be excluded, since the spectrum of the yeast sample does not match exactly with that of meta-autunite. According to the TEM studies, uranium was mainly removed by bioaccumulation within the cytoplasm and bonded via protonated phosphoryl containing groups. The formation of meta-autunite, as a response of uranium interaction with microorganisms, was mentioned by several further studies [19, 74, 75]. However, few studies with *R. toruloides* and meta-autunite formation are known. The removal of uranium by yeast cells and its resulting immobilization by formation of uranium minerals may play an important role in bioremediation of uranium contaminated sites due to their stability for long time periods [76].

Conclusion

Our present study describes the interaction mechanisms of KS5 with uranium(VI) and its tolerance to selected heavy metals. Uranium removal studies and TEM analyses revealed that the cells of the strain interact with uranium through a temperature-dependent process. For yeast cells incubated at 30 °C, intracellular uranium accumulates as needle-like structures were detected in the cytoplasm and also within lipid-granules, which might be a consequence of different detoxification mechanisms. Our findings confirm, that natural occurring microorganisms may play an important role in predicting the transport and fate of uranium at contaminated sites which could be used for *in situ* bioremediation.

Acknowledgments

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) grant № 02NUK030F (TransAqua). Further support took place by the ERDF-co-financed Grants CGL2012-36505 and 315 CGL2014-59616R (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain: 80 % funded by FEDER). The authors are grateful to the Wismut GmbH for allowing access to the sampling site, S. Röder for assistance in water sampling, S. Gurlit and S. Schubert for ICP-MS measurements, S. Weiß for his assistance during preparation of EXAFS samples, N. Huittinen for her support by the interpretation of the EXAFS data, and T. Schneider for his grammatical correction of this manuscript. We thank J. Lazuen-Alcon (Flow Cytometry Service, Centro de Instrumentación Científica University of Granada, Spain) for his help with flow cytometry measurements.

References

- [1] M. Gavrilescu, L. V. Pavel and I. Cretescu, „*Characterization and remediation of soils contaminated with uranium*“, *J Hazard Mater* **163**, 475 (2009).
- [2] J. R. Lloyd and L. E. Macaskie, „*Bioremediation of Radionuclide-Containing Wastewaters*“, in *Environmental Microbe-Metal Interactions*, P. 277–327 (2000).
- [3] A. Meinrath, P. Schneider and G. Meinrath, „*Uranium ores and depleted uranium in the environment, with a reference to uranium in the biosphere from the Erzgebirge/Sachsen, Germany*“, *J Environ Radioactiv* **64**, 175 (2003).
- [4] J. Schreyer and U. Zimmermann, in *Uranium, Mining and Hydrogeology II*, Ed. B. Merkel and C. Helling. Sven von Loga, Köln (1998).
- [5] T. Arnold, T. Zorn, H. Zänker, G. Bernhard and H. Nitsche, in *J. Contam. Hydrol.*, Vol. 47, P. 219–231 (2001).
- [6] K. Märten, JSH, Seeliger, D. Sommer, „*Uranium removal from flood water at Königstein mine*“, in *Uranium in the Aquatic Environment*, Ed. C. Merkel, B. Wolkersdorfer, P. 763–768, Springer (2002).
- [7] S. J. Markich, „*Uranium Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems: An Overview*“, *Sci. World J.* **2**, 707 (2002).
- [8] W. M. Murphy and E. L. Shock, „*Environmental aqueous geochemistry of actinides.*“, *Rev. Mineral. Geochem.* **38**, 221 (1999).
- [9] T. Arnold, N. Baumann, E. Krawczyk-Bärsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk and S. Weiß, „*Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment*“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 2200 (2011).
- [10] M. Barnett, P. Jardine, S. Brooks and H. Selim, „*Adsorption and Transport of Uranium(VI) in Subsurface Media*“, *Soil Sci Soc Am J* **64**, 908 (2000).
- [11] M. C. Duff, J. U. Coughlin and D. B. Hunter, „*Uranium co-precipitation with iron oxide minerals*“, *Geochim. Cosmochim. Acta* (2002).

- [12] M. L. Merroun, J. Raff, A. Rossberg, C. Hennig, T. Reich and S. Selenska-Pobell, „Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12“, *Appl Environ Microb* **71**, 5532 (2005).
- [13] D. R. Brookshaw, R. A. D. Pattrick, J. R. Lloyd and D. J. Vaughan, „Microbial effects on mineral-radionuclide interactions and radionuclide solid-phase capture processes“, *Mineral. Mag.* **76**, 777 (2012).
- [14] M. L. Merroun, C. Hennig, A. Rossberg, G. Geipel, T. Reich and S. Selenska-Pobell, „Molecular and atomic analysis of uranium complexes formed by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans*“, *Biochem Soc T* **30**, 669 (2001).
- [15] Y. Suzuki and J. F. Banfield, „Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site“, *Geomicrobiol J* **21**, 113 (2004).
- [16] D. R. Lovley, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby and E. R. Landa, „Microbial reduction of uranium“, *Nature* **350**, 413 (1991).
- [17] D. R. Lovley and E. J. P. Phillips, „Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*“, *Appl Environ Microb* **58**, 850 (1992).
- [18] L. E. Macaskie, D. T. Goddard, K. M. Bonthron and P. Yong, „Enzymically mediated bio-precipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation“, *Microbiology* **146**, 1855 (2000).
- [19] M. L. Merroun, M. Nedelkova, J. J. Ojeda, T. Reitz, M. L. Fernández, J. M. Arias, M. Romero-González and S. Selenska-Pobell, „Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses“, *J Hazard Mater* **197**, 1 (2011).
- [20] B. J. Baker and J. F. Banfield, „Microbial communities in acid mine drainage“, *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 139 (2003).
- [21] I. Zirnstein, T. Arnold, E. Krawczyk-Bärsch, U. Jenk, G. Bernhard and I. Röske, „Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine“, *MicrobiologyOpen* **1**, 83 (2012).
- [22] I. Zirnstein, „Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein“, PhD thesis, Technische Universität Dresden (2015).
- [23] C. Acharya, P. Chandwadkar and C. Nayak, „Unusual versatility of the filamentous, diazotrophic cyanobacterium *Anabaena torulosa* revealed for its survival during prolonged uranium exposure“, *Appl Environ Microb* **83** (2017).
- [24] N. B. Omar, M. L. Merroun, M. T. González-Muñoz and J. M. Arias, „Brewery yeast as a biosorbent for uranium.“, *J Appl Microbiol* **81**, 283 (1996).
- [25] T. Wang, X. Zheng, X. Wang, X. Lu and Y. Shen, „Different biosorption mechanisms of Uranium(VI) by live and heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* under environmentally relevant conditions“, *J Environ Radioactiv* **167**, 92 (2016).
- [26] S. a. Churchill, J. V. Walters and P. F. Churchill, „Sorption of Heavy Metals by Prepared Bacterial Cell Surfaces“, *J. Environ. Eng.* **121**, 706 (1995).
- [27] M. Spinti, H. Zhuang and E. M. Trujillo, „Evaluation of Immobilized Biomass Beads for Removing Heavy Metals from Wastewaters“, *Water Environ Res* **67**, 943 (1995).
- [28] J. L. Zhou, „Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi“, *Appl Microbiol Biot* **51**, 686 (1999).
- [29] S. Zafar, F. Aqil and I. Ahmad, „Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil“, *Bioresource Technol* **98**, 2557 (2007).

- [30] S. Kumar, H. Kushwaha, A. K. Bachhawat, G. P. S. Raghava and K. Ganesan, „*Genome sequence of the oleaginous red yeast Rhodosporidium toruloides MTCC 457*“, Eukaryot Cell **11**, 1083 (2012).
- [31] A. J. Muñoz, E. Ruiz, H. Abriouel, A. Gálvez, L. Ezzouhri, K. Lairini and F. Espínola, „*Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption*“, Chem Eng J **210**, 325 (2012).
- [32] N. Rijal, „*Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Principle, composition, uses and colony morphology*“, Microbeonline P. 2013–2016 (2015).
- [33] Y. L. Tsai and B. H. Olson, „*Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments*“, Appl Environ Microb **57**, 1070 (1991).
- [34] C. L. Schoch, K. a. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque and W. Chen, „*From the Cover: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*“, P Natl Acad Sci Usa **109**, 6241 (2012).
- [35] T. White, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, „*Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*“, P. 315–322, Academic Press, San Diego (1990).
- [36] Sigma Aldrich, „*Spurr Low -Viscosity Embedding Kit*“, Technical report, St. Louis MO, USA ().
- [37] W. Matz, N. Schell, G. Bernhard, F. Prokert, T. Reich, J. Claußner, W. Oehme, R. Schlenk, S. Dienel, H. Funke, F. Eichhorn, M. Betzl, D. Pröhl, U. Strauch, G. Hüttig, H. Krug, W. Neumann, V. Brendler, P. Reichel, M. a. Denecke and H. Nitsche, „*ROBL – a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF*“, J Synchrotron Radiat **6**, 1076 (1999).
- [38] E. Makarov and V. Ivanov, „*The crystalline structure of Ca(UO₂)₂(PO₄)₂ x 6H₂O meta-autunite*“, Doklady Akad. Nauk SSSR **132(3)**, 673 (1960).
- [39] C. Hennig, P. J. Panak, T. Reich, A. Roßberg, J. Raff, S. Selenska-Pobell, G. Bernhard, H. Nitsche, W. Matz, J. J. Bucher, P. J. Panak and H. Nitsche, „*EXAFS investigation of uranium(VI) complexes formed at Bacillus cereus and Bacillus sphaericus surfaces*“, Radiochim Acta **89**, 625 (2001).
- [40] T. Ressler, „*WinXAS: a program for X-ray absorption spectroscopy data analysis under MS-Windows.*“, J Synchrotron Radiat **5**, 118 (1998).
- [41] A. Beopoulos, J. Verbeke, F. Bordes, M. Guicherd, M. Bressy, A. Marty and J. M. Nicaud, „*Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*“, Appl Microbiol Biot **98**, 251 (2014).
- [42] J. Blazeck, A. Hill, L. Liu, R. Knight, J. Miller, A. Pan, P. Otoupal and H. S. Alper, „*Harnessing Yarrowia lipolytica lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production.*“, Nat Commun **5**, 3131 (2014).
- [43] F. Matthäus, M. Ketelhot, M. Gatter and G. Barth, „*Production of Lycopene in the non-carotenoid producing yeast Yarrowia lipolytica.*“, Appl Environ Microb **80**, 1660 (2013).
- [44] C. Ratledge and J. P. Wynn, „*The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*“, Adv Appl Microbiol **51**, 1 (2002).
- [45] C. D. Rutter, S. Zhang and C. V. Rao, „*Engineering Yarrowia lipolytica for production of medium-chain fatty acids*“, Appl Microbiol Biot **99**, 7359 (2015).
- [46] Z. Xue, P. L. Sharpe, S.-P. Hong, N. S. Yadav, D. Xie, D. R. Short, H. G. Damude, R. a. Rupert, J. E. Seip, J. Wang, D. W. Pollak, M. W. Bostick, M. D. Bosak, D. J. Macool, D. H. Hollerbach, H. Zhang, D. M. Arcilla, S. a. Bledsoe, K. Croker, E. F. McCord, B. D. Tyreus,

- E. N. Jackson and Q. Zhu, „*Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of Yarrowia lipolytica*“, *Nat Biotechnol* **31**, 734 (2013).
- [47] S. Zhang, J. M. Skerker, C. D. Rutter, M. J. Maurer, A. P. Arkin and C. V. Rao, „*Engineering Rhodosporidium toruloides for increased lipid production*“, *Biotechnol Bioeng* **113**, 1056 (2016).
- [48] R. R. Bommareddy, W. Sabra, G. Maheshwari and A.-P. Zeng, „*Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in Rhodosporidium toruloides grown on single and mixed substrates.*“, *Microb Cell Fact* **14**, 36 (2015).
- [49] S. Lane, S. Zhang, N. Wei, C. Rao and Y. S. Jin, „*Development and physiological characterization of cellobiose-consuming Yarrowia lipolytica*“, *Biotechnol Bioeng* **112**, 1012 (2015).
- [50] H. Schneider, P. Y. Wang, Y. K. Chan and R. Maleszka, „*Conversion of D-Xylose into Ethanol by the Yeast Pachysolen-Tannophilus*“, *Biotechnol Lett* **3**, 89 (1981).
- [51] T. W. Jeffries, „*Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by Candida tropicalis*“, *Biotechnol Lett* **3**, 213 (1981).
- [52] P. J. Slininger, R. J. Bothast, J. E. Van Cauwenberge and C. P. Kurtzman, „*Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus*“, *Biotechnol Bioeng* **24**, 371 (1982).
- [53] A. Matsushika, H. Inoue, T. Kodaki and S. Sawayama, „*Ethanol production from xylose in engineered Saccharomyces cerevisiae strains: Current state and perspectives*“, *Appl Microbiol Biot* **84**, 37 (2009).
- [54] G. Massaccesi, M. C. Romero, M. C. Cazau and A. M. Bucsinszky, „*Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina)*“, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 817 (2002).
- [55] A. Malik, „*Metal bioremediation through growing cells*“, *Environment International* **30**, 261 (2004).
- [56] L. Ezzouhri, E. Castro, M. Moya, F. Espinola and K. Lairini, „*Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco*“, *Afr J Microbiol Res* **3**, 35 (2009).
- [57] H. Sakamoto, F. Nankawa, T. Ohnuki, T. Fujii, T. Iefuji, „*Yeast Genes Involved in Uranium Tolerance and Uranium Accumulation: A Functional Screening Using the Nonessential Gene Deletion Collection*“, *Geomicrobiol J* **29**, 470 (2012).
- [58] M. López-Fernández, O. Fernández-Sanfrancisco, A. Moreno-García, I. Martín-Sánchez, I. Sánchez-Castro and M. L. Merroun, „*Microbial communities in bentonite formations and their interactions with uranium*“, *Appl. Geochem.* **49**, 77 (2014).
- [59] M. Pepi and F. Baldi, „*Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes*“, *Biometals* **5**, 179 (1992).
- [60] F. G. Ferris and T. J. Beveridge, „*Site specificity of metallic ion binding in Escherichia coli K-12 lipopolysaccharide.*“, *Can J Microbiol* **32**, 52 (1986).
- [61] B. Volesky and Z. R. Holan, „*Biosorption of heavy metals*“, *Biotechnol. Progr.* **11**, 235 (1995).
- [62] Y. Suzuki and J. F. Banfield, „*Geomicrobiology of uranium*“, *Rev. Mineral. Geochem.* **38** (1), 393 (1999).
- [63] U. Gerber, I. Zirnstein, E. Krawczyk-Bärsch, H. Lünsdorf, T. Arnold and M. L. Merroun, „*Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the*

- gram-negative betaproteobacterium Acidovorax facilis and uranium(VI)*“, J Hazard Mater **317**, 127 (2016).
- [64] X. Lu, X. jiao Zhou and T. shan Wang, „*Mechanism of uranium(VI) uptake by Saccharomyces cerevisiae under environmentally relevant conditions: Batch, HRTEM, and FTIR studies*“, J Hazard Mater **262**, 297 (2013).
- [65] M. E. Treen-Sears, B. Volesky and R. J. Neufeld, „*Ion exchange/complexation of the uranyl ion by Rhizopus biosorbent*“, Biotechnol Bioeng **26**, 1323 (1984).
- [66] B. Allard, H. Boren, C. Pettersson and G. Zhang, „*Degradation of humic substances by UV irradiation*“, Environ Int **20**, 97 (1994).
- [67] M. Liu, F. Dong, X. Yan, W. Zeng, L. Hou and X. Pang, „*Biosorption of uranium by Saccharomyces cerevisiae and surface interactions under culture conditions*“, Bioresource Technol **101**, 8573 (2010).
- [68] A. Griffiths, H.B. and Greenwood, „*The Concentric Bodies of Lichenized Fungi*“, in Arch. Mikrobiol., P. 285–302, Springer Verlag, 87. Ed. (1972).
- [69] Y. Li, Z. K. Zhao and F. Bai, „*High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*“, Enzyme Microb Tech **41**, 312 (2007).
- [70] S. Wu, C. Hu, G. Jin, X. Zhao and Z. K. Zhao, „*Phosphate-limitation mediated lipid production by Rhodosporidium toruloides*“, Bioresource Technol **101**, 6124 (2010).
- [71] P. Buzzini, M. Innocenti, B. Turchetti, D. Libkind, M. van Broock and N. Mulinacci, „*Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera Rhodotorula, Rhodosporidium, Sporobolomyces, and Sporidiobolus.*“, Can J Microbiol **53**, 1024 (2007).
- [72] Z. Zhu, Y. Ding, Z. Gong, L. Yang, S. Zhang, C. Zhang, X. Lin, H. Shen, H. Zou, Z. Xie, F. Yang, X. Zhao, P. Liu and Z. K. Zhao, „*Dynamics of the lipid droplet proteome of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*“, Eukaryot Cell **14**, 252 (2015).
- [73] G. W. Strandberg, S. E. Shumate and J. R. Parrott, „*Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa*“, Appl Environ Microb **41**, 237 (1981).
- [74] E. Krawczyk-Bärsch, L. Lütke, H. Moll, F. Bok, R. Steudtner and A. Rossberg, „*A spectroscopic study on U(VI) biomineralization in cultivated Pseudomonas fluorescens biofilms isolated from granitic aquifers*“, Environ Sci Pollut R **22**, 4555 (2015).
- [75] F. Jroundi, M. L. Merroun, J. M. Arias, A. Rossberg, S. Selenska-Pobell and M. T. González-Muñoz, „*Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in Myxococcus xanthus*“, Geomicrobiol J **24**, 441 (2007).
- [76] J. L. Jerden and A. K. Sinha, „*Phosphate based immobilization of uranium in an oxidizing bedrock aquifer*“, Appl. Geochem. **18**, 823 (2003).

Figures

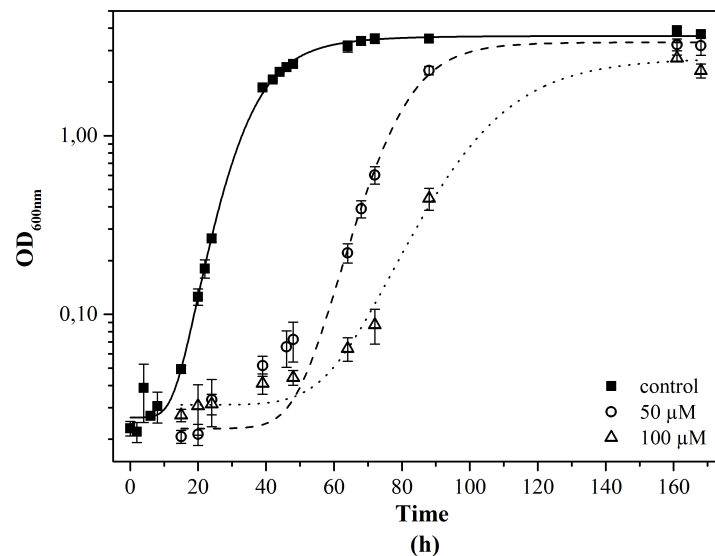


Figure 1: Growth curves of KS5 incubated with different uranium concentrations, the cells were grown in liquid SDA 1:5, uranium was added in different concentrations, squares no uranium, circles 0.05 mM uranium and triangle 0.1 mM uranium, incubation for 172 h at 30 °C; n=3, error bars indicate standard deviation.

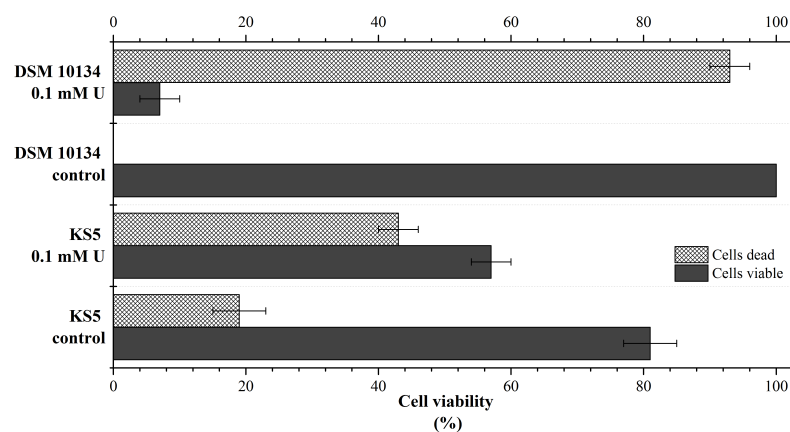


Figure 2: Percentage distribution of viable and dead cells using flow cytometry, cells of KS5 and DSM 10134 were incubated with 0.1 mM uranium or without (control) in 1:5 diluted SDA medium for 24 h at 30 °C. Cells were stained with FDA and PI for cell viability test. Viable (living cells) are displayed in dark grey and dead cells in grey pattern; n=3, error bars indicate standard deviation.

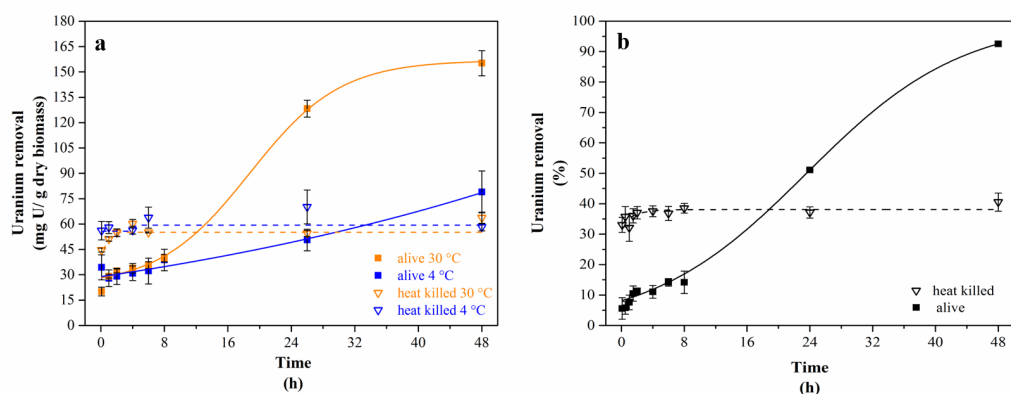


Figure 3: Temperature-dependent uranium removal capacity of KS5 (a) Uranium removal relating to dry biomass, orange curves show incubations at 30 °C and blue curves at 4 °C, filled squares display living cells (solid lines) and open triangles display heat killed cells (dashed lines); (b) Percentage uranium removal of living cell (solid line and filled squares) and heat killed cells (dashed line and open triangles) at 30 °C; initial uranium concentration 0.1 mM; background solution tap water pH 5.0; n=3, error bars indicate standard deviation.

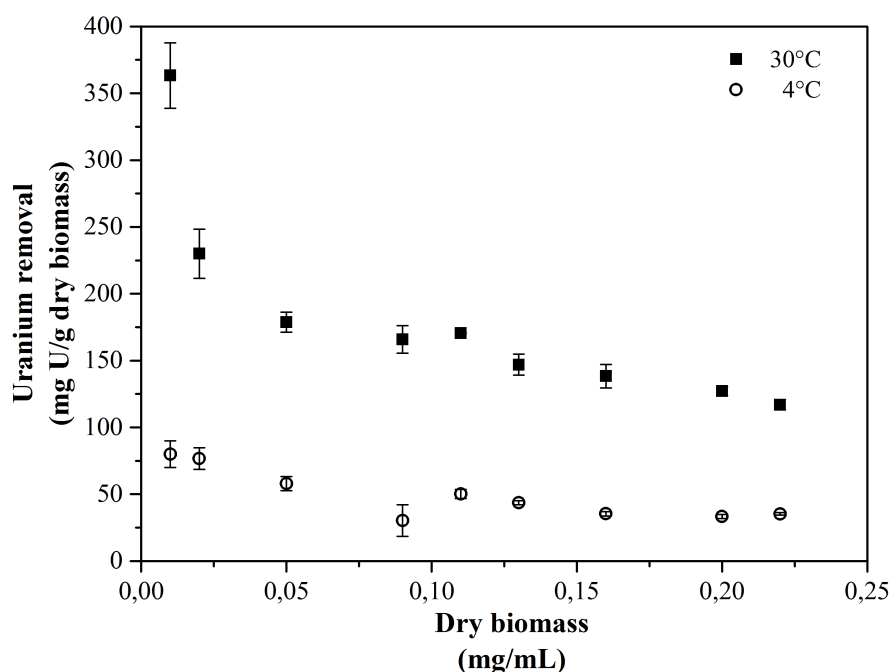


Figure 4: Uranium removal capacity by KS5 as function of the initial dry biomass, initial uranium concentration 0.1 mM, background tap water pH 5.0, incubation time 48 h at 30 °C (filled squares) and 4 °C (open circles); n=3, error bars indicate standard deviation.

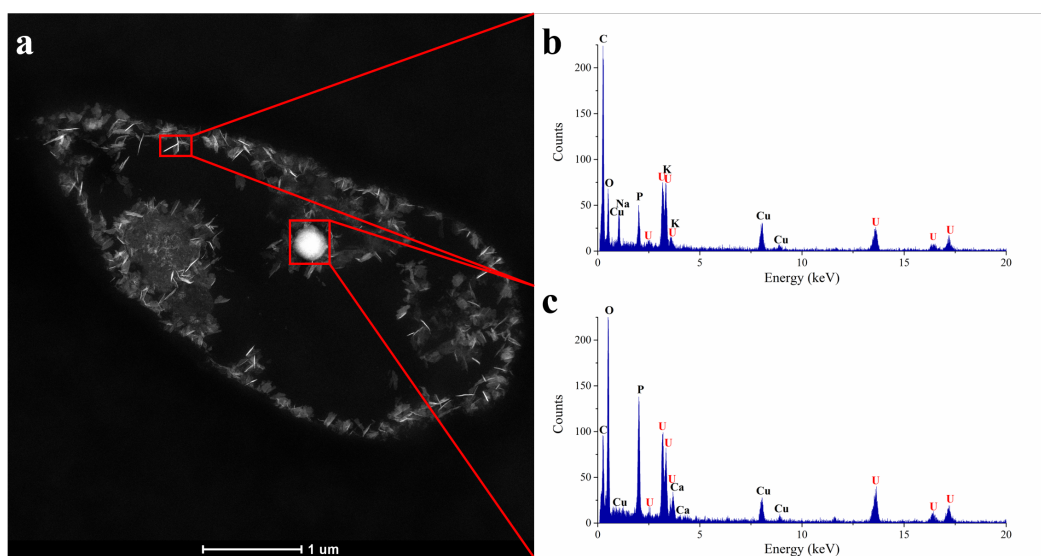


Figure 5: STEM-EDXS analysis of an ultrathin-sectioned KS5 sample after uranium removal experiments at 30 °C for 48 h (a) HAADF-STEM micrograph together with (b) EDX spectra of a needle-like structure localized at the inner cytoplasm-membrane, and (c) of immobilized uranium localized within lipid granules. The characteristic peaks of copper in the EDX spectra are caused by fluorescence excitation of the TEM support grid.

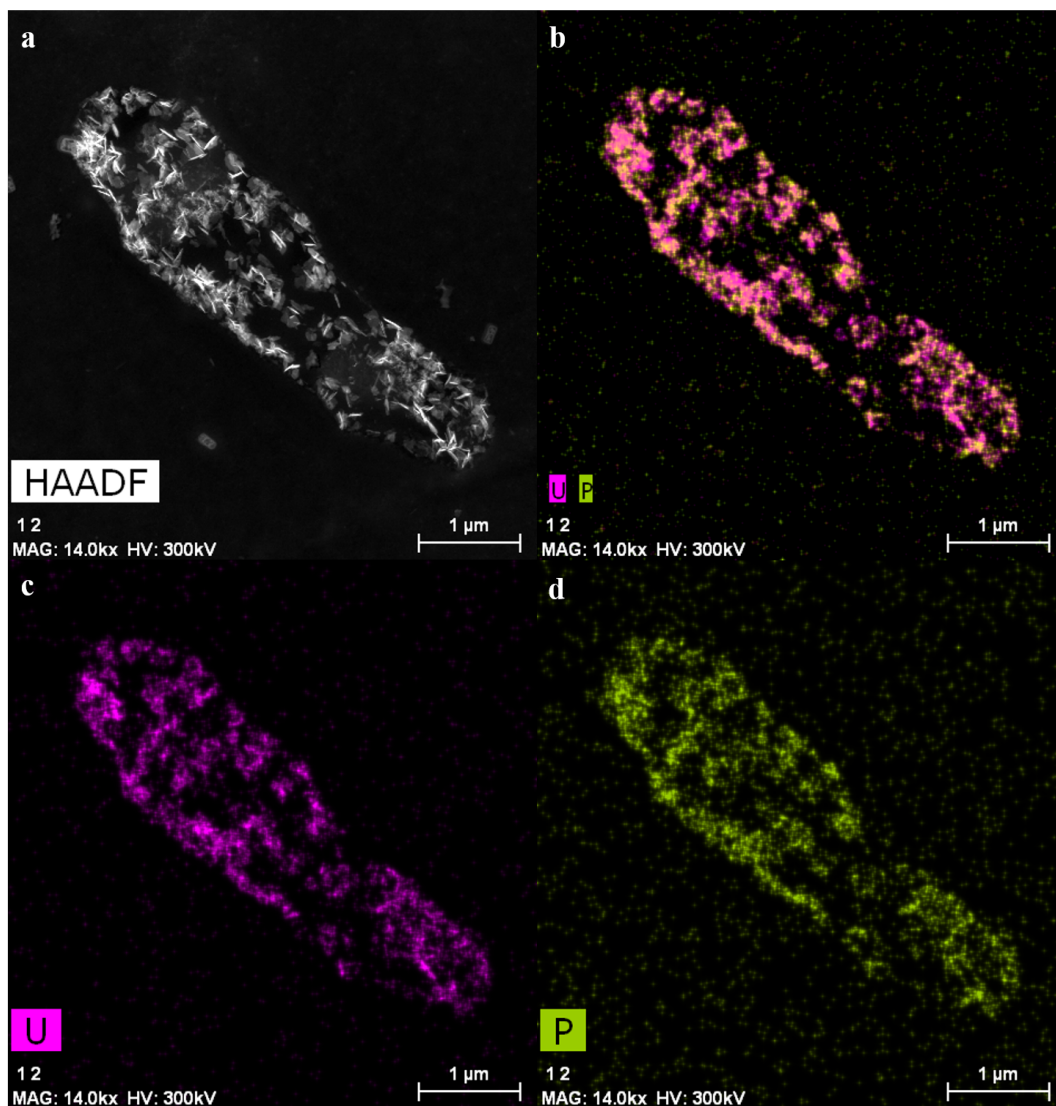


Figure 6: HAADF-STEM analysis of an ultrathin-sectioned KS5 sample after uranium removal experiments at 30 °C for 48 h (a) HAADF-STEM micrograph together with distribution analysis of (b) uranium (purple) and phosphorus (green), (c) uranium, and (d) phosphorus.

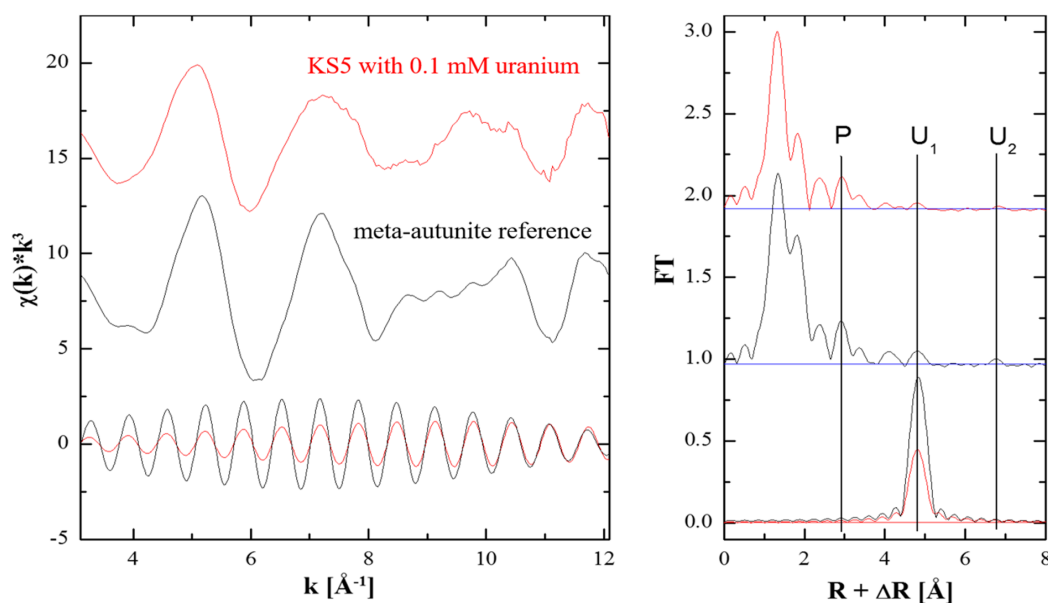


Figure 7: ULIII EXAFS spectra (left) and corresponding Fourier transform (FT) (right), KS5 was incubated with 0.1 mM uranium at 30 °C for 48 h (shown in red), The reference meta-autunite (shown in black) together with the Fourier filtered uranium interaction at 4.8 Å (bottom). The noise level (background) was determined from the FT peak magnitude in the 15-20 Å R-region, where no significant signal from the sample itself is expected (blue line).

Supplementary Information

Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine

Ulrike Gerber^{1,*,#}, René Hübner², André Rossberg^{1,3}, Evelyn Krawczyk-Bärsch¹, Mohamed L. Merroun⁴

¹ Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

² Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Ion Beam Physics and Materials Research, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

³ Rossendorf Beamline at ESRF - The European Synchrotron, CS40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France

⁴ University of Granada, Department of Microbiology, Campus Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

Present Address: Faculty of Natural Sciences, Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Universitätsplatz 1, 01968 Senftenberg, Germany

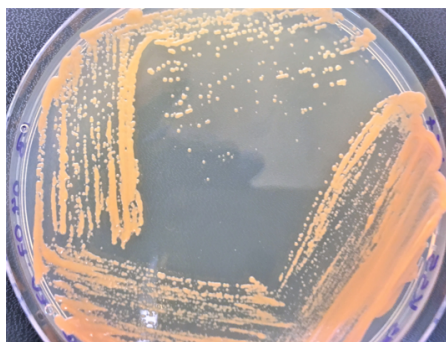


Figure S1: Red colonies of KS5, single colonies appearing on solid SDA agar plates, incubation at 30 °C for 48 hours.

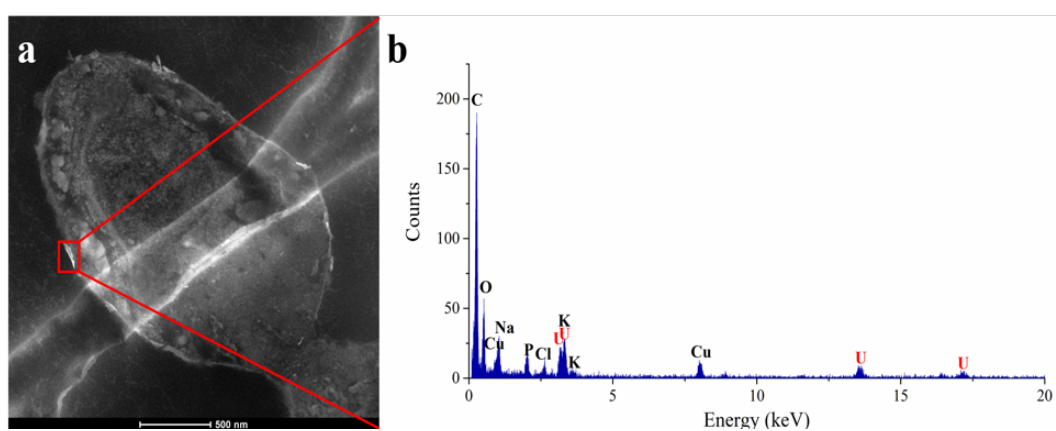


Figure S2: STEM-EDXS analysis of an ultrathin-sectioned KS5 sample after uranium removal experiments at 4 °C for 48 h (a) HAADF-STEM micrograph together with EDX spectrum (b) of a needle-like structure localized at the outer cytoplasm membrane.

3.4 Microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water of a former uranium mine - a possible bioremediation approach

Gerber U, Schäfer S, Röder G, Lehmann S, Zirnstein I, Krawczyk-Bärsch E, Rossberg A
In preparation for submission

Microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water of a former uranium mine - a possible bioremediation approach

Ulrike Gerber^{1,*,#}, Sebastian Schäfer^{1,2}, Grit Röder³, Isabel Zirnstein^{1,†}, Susanne Lehmann¹
Evelyn Krawczyk-Bärsch¹, André Rossberg¹

¹ Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Bautzner Landstraße 400, 01328 Dresden, Germany

² Technical University Dresden, Faculty of Biology, Institute of Microbiology, Chair of Molecular Biotechnology, 01062 Dresden, Germany

³ Interdisciplinary Ecological Center, TU Bergakademie Freiberg, Leipziger Strasse 29, 09599 Freiberg, Germany

Present Address: Faculty of Natural Sciences, Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Universitätsplatz 1, 01968 Senftenberg, Germany

† Present Address: Research Institute of Leather and Plastic Sheeting (FILK) gGmbH, Meissner Ring 1-5, 09599 Freiberg, Germany

* Corresponding author

E-Mail: gerberu@b-tu.de (UG)

Telephone: +49 3573 85 974

Fax: +49 3573 85 909

Abstract

This study investigated the sustainability of microbial mediated uranium(VI) reduction in the flooding water of a former uranium mining site located in Germany, for possible applications of bioremediation. Presently, the site of the former uranium mine is remediated by an intensive and time-consuming waste water treatment, due to the fact that the underground is flooded in a controlled way. The task for the next years is to find alternative approaches which combine cost efficiency, environmental friendliness and minimizing time effort. We examined the ability of anaerobic bacteria, natural occurring within the flooding water, for their uranium(VI) reduction capability. Therefore, the electron donor and carbon source glycerol was added, to stimulate microbial growth. During six weeks of incubation, analytical techniques, like measurement of

redox potential, pH, uranium redox state, and iron and sulfate concentration, were performed. A distinct decrease of the redox potential was observed after six weeks of incubation time. In combination with XANES (X-ray absorption near edge structure) a complete reduction of uranium(VI) to uranium(IV) was detected. Furthermore, the underlying molecular mechanisms of the microbial uranium(VI) reduction and the bacterial diversity after six weeks incubation were investigated. To verify the applicability for industrial scale bioremediation approaches, a pilot plant was designed and the obtained results from laboratory scale experiments were successfully repeated. We could demonstrate that the results achieved in the laboratory scale samples are transferrable to industrial scale applications and thus, could be used for potential *in situ* bioremediation approaches of former uranium mining sites.

Introduction

The presence of high levels of uranium at contaminated sites, resulting from former uranium mining activities in the last century, represent a major concern due to its potential for mobilization and dissolution in the surrounding environment. Studies demonstrated that toxic radionuclides have migrated into groundwater for decades, which leads to a serious threat to the environment and public health [1]. Consequently, the main objective in the last years is the remediation of heavy metal contaminated sites. However, clean-up approaches for these areas are projected to be expensive and to last many decades. One of numerous former uranium mining sites in Germany represents the uranium mine in Königstein, which is currently in the remediation process. Therefore, the underground of the mine is flooded in a controlled way and the flooding water is pumped to the surface. In following steps, the flooding water is treated by a conventional chemical waste water treatment plant [2]. Traditional remediation methods of groundwater by pump-and-treat, followed by ion exchange, seems to be elaborated and cost-prohibitive. For that reason, *in situ* bioremediation could be a possible alternative, by using indigenous microorganisms to clean-up contaminated sites [3]. Moreover, previous studies demonstrated that bioremediation provides an efficient, cost-effective, and environmental-friendly technology [4].

As a consequence of the leaching process with sulfuric acid in the last years of uranium mining activity, the flooding water still displays a low pH (~ 3.0) and contains high concentrations of sulfate (~ 1.0 g/L). In addition to the high uranium concentration present within the flooding water (8 mg/L), also other heavy metals display high concentration levels. Taken as a whole, these conditions characterize this site as an acid mine drainage (AMD). AMD sites often occur in the mining industry and represent a major problem, that poses an additional risk to the environment due to the fact that they contain elevated concentrations of metals and metalloids. The major cause of the development of AMD sites is the accelerated oxidation of iron pyrite (FeS_2 and sulphidic minerals through the contact with oxygen and water, as a result of the mining processes [5].

However, AMD waters are known for their abundant microbial diversity [6, 7]. The microorganisms inhabiting such harsh environments are extremophile microorganisms and known for their specific characteristics. Thus, they can be efficient in removing radioactive pollutants from the environment and therefore, could be used for industrial processes, bioremediation, and discovery of new biosorbents [8]. Microorganisms are able to interact with metals and radionuclides, like uranium, in various ways. Several studies were performed investigating immobilization of metals by biosorption and bioaccumulation [9, 10]. Biosorption is defined as a passive process, whereby the metal is bound on functional groups of the outer membrane of microorganisms. It is independent of metabolic activity and therefore, nutrients are not required [11]. In contrast, bioaccumulation is considered to be an active process. The metal is taken up into the cytoplasm of the cells. In addition, also biomineralization is a known active process. Due to enzymatically mediated mechanisms, uranium is transformed to insoluble non-oxide minerals, usually metal phosphates [12, 13]. However, uranium(VI) could additionally serve as an electron acceptor for redox reactions of certain anaerobic metal and sulfate reducing bacteria (MRB/SRB) [3, 14–16]. The reduction of uranium is defined as the process, by which microorganisms chemically reduce uranium from the highly soluble oxidation state VI by a two-electron process to the less soluble oxidation state IV. Consequently, this fact leads to the general hypothesis, that uranium reduction displays a high potential for bioremediation or immobilization strategies [17]. The stimulation of microbial activity to fix aqueous uranium(VI) into insoluble minerals *in situ* seems to provide a suitable approach, due to its relatively inexpensive and non-destructive characteristics [18]. In contrast, uranium(IV) can serve as an electron donor with nitrate as electron acceptor [19]. Both described processes are called biotransformation [3, 20, 21].

Moreover, the transport properties of uranium in natural environments are governed by contrasting chemistry behavior of the both oxidation states uranium(VI) and uranium(IV). In solutions and under oxidizing conditions uranium(VI) generally forms highly mobile complexes with carbonate and hydroxide. On the contrary, uranium(IV) precipitates in solution under anoxic conditions are highly insoluble, and thus immobile minerals, such as uraninite [21]. Nevertheless, the uranium mobility depends on other factors as well, like pH and prevalent minerals [22–25].

In this study, we investigated the capability of anaerobic microorganisms, naturally occurring within the flooding water, for the uranium(VI) reduction. Previous studies investigating the microbial diversity in the flooding water, revealed the presence of anaerobic MRB, like sulfate (SRB) and iron reducing bacteria (IRB) [26]. To stimulate the microbial activity, we added 10 mM glycerol to the flooding water and incubated the samples over six weeks. During incubation time, the redox potential was periodically measured, to investigate microbial induced redox reactions. Furthermore, samples were analyzed using XANES (X-ray absorption near edge structure) spectroscopy to determine the redox state of uranium. Beside uranium, also the reduction of iron and sulfate were investigated to obtain a detailed view of the microbial mediated redox reactions and furthermore, to understand which MRB are mediators for the microbial uranium(VI) reduc-

tion. Therefore, additional analyses based on 16S rDNA were performed to examine the bacterial diversity within the flooding water after six weeks incubation time and successful uranium(VI) reduction. We were able to induce a microbial uranium(VI) reduction within the flooding water in laboratory scale experiments (1 L) by adding the electron donor glycerol. With the obtained knowledge, a pilot plant (100 L) was designed to confirm these findings and to test the applicability of microbial mediated uranium(VI) reduction, by adding glycerol to the flooding water, in industrial scale applications. The investigated microbial uranium(VI) reduction in the flooding water of the former uranium mining site in Königstein could be used as *in situ* bioremediation to support the conventional water treatment, and in the future replace the elaborated chemical remediation techniques.

Methods and Materials

Sampling site

The Königstein mine is an inactive uranium mine located in Saxony (Germany). The investigated area represents a very special case due to its localization in an ecological sensitive and dense populated area (50°54'54.1"N 14°01'42.0"E). The ore body is located in the 4th sandstone aquifer. However, the overlaying 3rd aquifer serves as an important water reservoir for the nearby cities. A contamination of this environmental sensitive aquifer would have tremendous consequences for the drinking water in this area

Sampling campaign

Flooding water samples were sampled directly from the borehole at the Königstein site into sterile 1 L glass serum bottles. The bottles were directly sealed with butyl rubbers and aluminum caps. Immediately after the sampling campaign, the water within the sealed serum bottles was sterile gasified with N₂. Until further applications, the water samples were stored at 4 °C in the dark. For the realization of the pilot plant, 100 L flooding water were sampled into sterile 10 L plastic canisters. The samples were immediately transferred to the laboratory and were filled into the pilot plant. Afterwards the 100 L flooding water were gasified with N₂. The lid and all other vents were sealed airtight.

Uranium(VI) reduction experiments

To investigate the possible uranium(VI) reduction, 10 mM glycerol (0.92 g/L) as electron donor and carbon source was added sterile and under anoxic conditions to the flooding water samples. Afterwards the samples were incubated for six weeks at 30 °C in the dark. The control samples

were either incubated without the addition of glycerol or as sterile control, whereby the flooding water was immediately sterile filtrated through a 0.2 μm sterile filter. Subsequently, the sterile samples were treated like described above. Three times a week samples were taken within an anaerobic chamber to measure the redox potential (WTW SenTix[®] ORP Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Germany) and the pH value (WTW SenTix[®] Mic, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Germany). In addition, once a week a sample was prepared for XANES analyses, as describes below.

In addition, to examine a possible uranium(VI) reduction in field scale, 100 L flooding water within the pilot plant were treated in same way, except for the incubation temperature. The pilot plant was incubated at room temperature (20 °C) over six weeks. The monitoring of pH, temperature and redox potential took place by an on-line measurement system. The electrodes were directly installed into the lid of the pilot plant. Furthermore, samples were regularly taken, using a N₂-flushed sterile syringe, to examine the redox state of uranium with UV-vis spectroscopy (Lambda 750 Uv/vis/NIR Spectrophotometer, PerkinElmer, USA), the Fe(II) and moreover, the Fe(II) concentration and sulfate concentration.

DNA extraction, amplification, and phylogenetic analysis

For the investigation of the microbial diversity of the laboratory scale experiments (1 L), two samples were pooled, respectively. The DNA extraction, amplification and purification of the 16S rDNA gene was performed by Blue Biolabs GmbH (Germany). In addition, the sequencing and data evaluation were completed by the same company.

In comparison, to investigate the microbial diversity of the pilot plant (100 L) after six weeks incubation, the DNA was extracted and purified using the alkine lyse method [27]. Therefore, the water sample was sterile filtered (0.2 μm), and the remaining biomass from the filter was washed and suspended with 0.05 M oxalic acid. The extracted DNA was purified and concentrated with DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, USA). Subsequently, a PCR (polymerase chain reaction) was performed for 16S rDNA gene amplification. The obtained PCR product was purified using Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Cloning and transformation of the PCR product were performed using TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). By colony PCR, positives clones were selected and PCR products were sequenced by GATC Biotech AG (Eurofins Genomics, Germany). The obtained sequence information was identified by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

XANES (X-ray absorption near edge structure) measurements and data evaluation

To investigate the oxidation state of uranium within the samples, incubated for six weeks, XANES measurements were performed. Therefore, every week a sample (1 L) was centrifuged for 20 min at 20 000 rpm at room temperature. The obtained pellet was resuspended in 15 mL of the supernatant and ultra-centrifuged for 1 h at $187\,000 \times g$. The formed pellet was filled into a polyethylene sample holder. The sample holder was hot sealed and immediately frozen in liquid nitrogen. All steps were performed under anoxic conditions to avoid uranium reoxidations with oxygen. In addition, reference samples of uranium(VI) and uranium(IV) were prepared with the flooding water as background solution. XANES measurements were carried out at the Rossendorf Beamline BM20 located at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [28]. The samples were measured at 15 K in a closed-cycle helium cryostat in fluorescence mode using a 13-element germanium solid-state detector. The X-ray beam was monochromatized by a silicon (111) double-crystal monochromator in channel cut mode (5-35 keV). For energy calibration of the sample spectra, the K-edge spectrum of an yttrium metal foil (first inflection point at 17038 eV) was recorded simultaneously. The ionization energy, E_0 , of the uranium L_{III}-edge was defined as $E_0 = 17185$ eV [28].

The average oxidation state of uranium in the flooding water samples was determined by fitting the XANES region by a linear combination of standard spectra, obtained from the two references samples of uranium(IV) and uranium(VI) using ITFA (iterative target factor analyses) [29].

Analytical techniques

After determination of the pH, the samples were acidified and investigated regarding their chemical composition. For inorganic elements, inductively coupled plasma spectroscopy (ICP-MS) (ELAN 9000 type ICP-MS spectrometer, Perkin Elmer, Überlingen, Germany) and atomic absorption spectroscopy (AAS) (Perkin Elmer 4100 AAS, Überlingen, Germany) were used. Anion concentration was determined by Ion Chromatography (IC-system 732/733, Metrohm, Filderstadt, Germany). In addition, the total organic carbon (TOC) was analyzed with HT1300-TOC (Analytik Jena, Jena, Germany). The concentrations of sulfate and iron(II) were measured by precipitation of sulfate with barium chloride according to Kolmert *et al.* [30] and by a ferrozine assay according to Viollier *et al.* [31] (spectrophotometer μ QuantTM of Bio-Tek Instruments, Inc., USA). All dilutions were prepared with two-times distilled water. All samples were determined in triplicates.

Development of a pilot plant for industrial scale applications

To transfer the obtained results from laboratory scale to industrial applications, a pilot plant with a total capacity of 100 L was designed (Fig. 1). A glass tank with 330.0 to 405.0 mm diameter and 880.0 mm height (glass wall thickness 20 mm) was manufactured by Marcel Hellbach (Glasbläserei Hellbach, Brand-Erbisdorf, Germany). The lid (545.0 mm diameter, 13.0 mm thickness) was designed removable. For on-line measurements of pH, redox potential, temperature and for sampling, devices were placed in the lid. The pilot plant was located in the laboratory without additional heating and exclusion of light. Two independent runs of the pilot plant with freshly sampled flooding water were performed, respectively.

Results and discussion

Characteristics of the flooding water samples

Prior to the investigations of a possible microbial uranium(VI) reduction, the flooding water samples were characterized using different analytical techniques (Tab. 1). In comparison with previous results [26, 32], the pH value shows no drastic changes during the last years of remediation. As a consequence of the *in situ* leaching with sulfuric acid the pH is acidic (2.8 - 3.0). Due to the ongoing flooding process, oxidizing conditions are prevalent. The redox potential (600 mV - 670 mV) and the oxygen concentration (2.3 mg/L - 3.7 mg/L) displayed no changes since 2011. However, the underground of the former mine is not completely mixed, for that reason one cannot rule out the possibility of areas which could present reducing conditions. During the last years, the metal and trace element concentrations fluctuate considerably. Until 2011, the concentrations are still increasing tremendously for almost all elements. This phenomenon could be explained by additional flooding steps of underground areas (in 2010). Nevertheless, due to the constantly flooding with fresh water during the last years the overall concentrations are decreasing, except for lead. However, in particular the uranium concentration with 8 mg/L is still high and represents the highest risk for possible contamination of the surrounding environment. Together with high concentrations of sulfate (1470 mg/L), iron (56.2 mg/L - 112.0 mg/L), low pH value and other heavy metals, all the mentioned parameters represent a typical acid mine drainage (AMD) site [33].

For microbial activity and metabolism, the total organic carbon (TOC) represents the limiting factor, which is low within the flooding water (1.1 mg/L). AMD sites usually contain a low organic carbon concentration and thus, the addition of extra electron donors is required. At acidic conditions the inhibitory effect of potential substrates should be taken into consideration [34]. Therefore, to stimulate the microbial activity for possible redox reactions and specifically, for uranium(VI) reduction, the electron donor glycerol was added to the flooding water samples.

Previous studies could demonstrate that at acidic conditions the reduction of metals, as well as sulfate, could be affected by different factors [34]. For instance, organic acids could act inhibitory at acidic conditions. The toxicity of these is dependent on their dissociation constants thus, at pH 3.0 half of the concentration of lactate acid would be present in the acid form (undissociated), which is able to diffuse into the cell. Inside the cytoplasm protons would be released, which cause a lowering of the intracellular pH value. Consequently, the protons have to be actively pumped out of the cell [34]. Therefore, glycerol, as well as other non-ionic substrates, like hydrogen, sugars and other alcohols, represents a suitable and cost-effective electron donor, which are preferred at acidic conditions [35–37]. Several SRB, like *Desulfovibrio* spp. and *Desulfosporosinus* spp., were reported to grow with glycerol as carbon and energy source [34, 38–42].

Microbial uranium(VI) reduction

To investigate the possible uranium(VI) reduction ability of the indigenous anaerobic microorganisms within the flooding water, the electron donor and carbon source glycerol was added. The flooding water samples were therefore flushed with N₂ and incubated at 30 °C to achieve

Table 1: Physical-chemical Parameters of the flooding water. Alteration of the parameters prevalent in the flooding water during remediation over six years.

	2011 [26]	2013 [26]	2015	2017
pH	3.3	3.0	2.8 - 2.9	2.8 – 2.9
Redox potential [mV]	600	640	670	650
O ₂ [mg/L]	2.3	3.0	3.7	n.d.
Temperature [°C]	13.5	13.8	13.0	14.0
Na [mg/L]	32.8	108.3	91.3	45.6
SO ₄ ²⁻ [mg/L]	489.8	973.1	1470.0	n.d.
U [mg/L]	6.1	7.8	14.0	8.0
TOC [mg/L]	0.8	0.3	1.1	1.1
Fe [mg/L]	91.6	56.2	122.0	62.5
K [mg/L]	12.5	8.8	7.7	8.6
Mg [mg/L]	8.0	15.4	31.8	18.5
Ca [mg/L]	91.6	246.5	304.0	207.0
Mn [mg/L]	2.5	7.2	8.9	8.4
Cd [µg/L]	19.5	73.4	112.0	62.1
Co [µg/L]	114.7	181.0	292.0	n.d.
Cr [µg/L]	16.3	35.5	75.0	n.d.
Cu [µg/L]	6.9	41.0	86.0	75.8
Pb [µg/L]	79.2	304.0	654.0	917
Ni [µg/L]	242.5	454.1	617.0	384
Zn [mg/L]	3.5	5.7	16.2	9.2

n.d. not determined

reducing and anaerobic conditions. To verify the adjusting reducing conditions, the redox potential was measured. In Fig. 2 the changes of the redox potential during six weeks of incubation time is displayed. A distinct decrease of the redox potential from initially 670 mV to 560 mV was detected after 14 days. In comparison, the sterile control without bacteria, but added with glycerol, displayed no change. After 35 days the equilibrium of around 230 mV was reached. Notably, the sterile control displayed no change during the whole incubation time, consequently the addition of glycerol has no influence on the decrease of the redox potential and the acquired reducing conditions. Within six weeks of incubation time, an absolute change of 440 mV was detected. Theoretical calculations of the uranium speciation and redox state (data not shown) using the experimental conditions (including ion concentrations, pH value, redox potential, and temperature) indicated a uranium reduction. At the detected redox potential of 230 mV after six weeks incubation, uranium(IV) is theoretically predicted.

On this basis, XANES spectroscopy was performed. Therefore, anoxic flooding water samples were prepared and investigated regarding their uranium redox states (Fig. 3). After five weeks of incubation time at 30 °C with 10 mM glycerol, a distinct shift of the spectrum was detected (Fig 3, grey area). Furthermore, compared to the uranium(VI) reference sample, the 'typical' uranium(VI) shoulder disappeared (Fig. 3, arrow). Thus, with XANES spectroscopy a microbial mediated uranium(VI) reduction after five weeks was demonstrated. To quantify the prevalent uranium(VI) and uranium(IV) concentrations during six weeks of incubation time, ITFA (iterative target factor analyses) were performed [29]. By comparison of the obtained spectra with the two prepared references samples, it was possible to determine the relative uranium oxidation state concentrations (Fig. 4). As shown in Fig. 4, after five weeks of incubation approximately 50 % of uranium(VI) was reduced to uranium(IV), indicating the microbial reduction of uranium. During the previous four weeks no change of the oxidation state VI could be detected. Nevertheless, after six weeks, uranium(VI) was completely reduced to uranium(IV). In conclusion, by combining the analyses of the redox potential, theoretical calculations and XANES spectroscopy, a microbial mediated uranium(VI) reduction was demonstrated by simply adding 10 mM glycerol.

Until now only few studies were performed on microorganisms capable of reducing uranium(VI), using cultivation-dependent techniques in natural environments. Furthermore, in contrast to our investigations, they were conducted in sediment slurries under controlled laboratory conditions. Investigations on anaerobic MRB or SRB that carry out respiration in acidic environments is still in its infancy, though the above describes impact of acidic pH on microbial redox reactions [43]. However, in this study we were able to demonstrate the capability of indigenous anaerobic bacteria to use glycerol as electron acceptor for the microbial mediated uranium(VI) reduction. The concept of anaerobic indigenous bacteria, present in the groundwater of a uranium-contaminated site at the Bear Creek Valley (TN, USA), has been tested in laboratory scale experiments. Numerous results using controlled conditions in laboratory experiments displayed the feasibility of

microbial uranium(VI) reduction [44–48].

Moreover, during six weeks of incubation time the sulfate and Fe(II) concentrations were measured to investigate the microbial activity of SRB and IRB within the flooding water (Fig. S1). In association with the analysis of the bacterial diversity using 16S rDNA, the activity of bacteria should be investigated to detect their possible influence on the uranium(VI) reduction. IRB represented the major group, which were identified for their capability of dissimilatory uranium(VI) reduction [49–51]. In subsurface environments, IRB bacteria are likely to outcompete SRB, due to the fact that Fe(II) is usually a much more abundant electron acceptor than sulfate [43, 50, 51]. Therefore, IRB are thought to have a high bioremediation potential in uranium-contaminated subsurface sediments [43]. In accordance to this, during six weeks of incubation the Fe(II) concentration displayed a slight increase, possibly due to the activity of IRB within the flooding water (Fig. S1, black symbols and curve). However, the analyzed sulfate concentration revealed no changes, by meaning no increase could be detected during the whole incubation time (Fig. S1, blue symbols and curve).

Applicability of microbial uranium(VI) in pilot plant scale

The promising results of the microbial uranium(VI) reduction obtained in laboratory scale experiments (1 L) were scaled up and transferred to a pilot plant with a total volume of 100 L (Fig. 1). Similar to the previous experiments, 10 mM glycerol were directly added to the with N₂ flushed and anoxic incubated flooding water. By using an on-line measurement system pH value, redox potential and temperature were examined. The approach was incubated for six weeks at RT. Two independent runs, each time using fresh flooding water samples, were performed. Due to the fact, that both approaches displayed slight deviations, the results were considered independently, and therefore no mean values were calculated.

In contrast to the results obtained from the laboratory scale experiments, the redox potential displayed a faster decrease and furthermore, a lower equilibrium of around 100 mV after 14 days (Fig. 5a and b) in both approaches. However, during the first incubation of the flooding water in the pilot plant a drastic increase of the redox potential at day 14 was detected (Fig. 5a, grey area). This abrupt change could be explained by an accidental invasion of oxygen. Nevertheless, within the following days the redox potential reached the same equilibrium compared to the second run. While incubation at RT, the initial temperature of the flooding water (14-15 °C) increased to nearly 22 °C in the first days and no drastic changes during six weeks of incubation time was observed (Fig. S2, black curves). However, the pH showed distinct changes from initially 2.6/2.8 to 2.4/2.2 (Fig. S2, blue curves). The results obtained from the first run of the pilot plant approach displayed the highest variations during the incubation time (Fig. S2, open circles). The pH value decreased drastically during the second week. Subsequently, the pH increased until the initial value. This observed deviation of the pH is in accordance to the change of the redox potential of

the first run, thus the possible invasion of oxygen in the flooding water of the pilot plant could be an explanation for these differences. In addition, the Fe(II) and sulfate concentrations were investigated (Fig 5b-c, e-f). In accordance to the experiments from laboratory scale samples, the Fe(II) concentration revealed a distinct increase (Fig. 5e). As a consequence of the observed drastic change of the redox potential during the first run at day 14, the Fe(II) concentration increased, too (Fig. 5b). The oxygen invasion could lead to a Fe(II) reoxidation. Moreover, after 26-28 days of incubation time, the sulfate concentration decreased slightly (Fig. 5c and f). Thus, in contrast to the laboratory scale approaches, a possible microbial mediated sulfate reduction could be detected in the samples of the pilot plant.

To confirm the microbial uranium(VI) reduction in the pilot plant, UV-vis analysis of both runs were performed. The two runs revealed the same findings. The results displayed an increase of the uranium(IV) concentration after 21 days (Fig. S3b). During the first 2.5 weeks only uranium(VI) was detected by UV-vis spectroscopy (Fig. S3a). Kirishima *et al.* [52] investigated the luminescence properties of uranium(IV) in solution and demonstrated characteristic maxima of uranium(IV) spectra, using UV-vis spectroscopy. One typical maximum of uranium(IV) displayed at around 650 nm. Compared to the spectra of the samples from the pilot plant approaches starting from day 21, this typical maximum could be detected. Thus, in accordance to the reference samples from previous investigations, uranium(IV) was obviously identified. Although, it has to be mentioned, that due to the absorption maximum of glycerol between 400-500 nm, which was described previously, the typical maxima of uranium(VI) could not clear distinguished [53]. Therefore, a low uranium(VI) concentration, within the samples after three weeks of incubation time, cannot completely ruled out. Using XANES spectroscopy to examine the laboratory scale samples, it was shown that uranium(VI) was completely reduced to uranium(IV). Further investigations should be performed, using the same method, to quantify the uranium(IV) concentration in the flooding water samples from the pilot plant after six weeks of incubation.

In summary, two independent runs of the pilot plant were performed and revealed in the same findings compared to the results of the laboratory scale experiments. Only slight differences were shown. However, we demonstrated a microbial mediated Fe(II) reduction followed by a uranium(VI) reduction. Moreover, due to the lower redox potential, compared to the laboratory scale samples, a microbial sulfate reduction during the last week was shown. Thus, the up-scaling experiments in pilot plant approaches (100 L) verified the industrial applicability of the microbial mediated uranium(VI) reduction in the flooding water of the former uranium mine Königstein for possible bioremediation methods.

Bacterial diversity after uranium(VI) reduction

To investigate the microorganism responsible for uranium(VI) reduction, 16Sr DNA analyses were performed. Compared to previous studies of the bacterial diversity prevalent in the flooding

water of the former uranium mine, the bacterial community displayed distinct changes (Fig. 6). However, in both samples the majority of the bacteria were identified belonging to the class of gammaproteobacteria. In addition, also the quantity of unclassified bacteria revealed in similar numbers. But besides that, the bacterial diversity changes drastically. The investigation of the flooding water before incubation displayed that the majority of the identified species, belonging to gammaproteobacteria, were *Acidithiobacillus* spp. [26]. Studies on the diversity of bacteria at AMD sites demonstrated that *Acidithiobacillus* species represents a dominating group in such harsh environments [54, 55]. Notably, *A. ferrooxidans* displays an important species, which is involved in the degradation of mineral ores and furthermore, the oxidation of iron at AMD sites. Thus, *A. ferrooxidans* is effecting the development of AMD sites [56]. Consequently, the major occurrence of these bacteria is in good accordance to previous investigations, as well as the diversity study before the microbial uranium(VI) reduction within the flooding water. The majority of the identified species after six weeks incubation, belonging to the class of gammaproteobacteria, were represented by *Halomonas* spp. (39 %). Although *Halomonas* species are known for their tolerance to alkaline conditions, previous studies demonstrated their ability to reduce Fe(III) and Cr(VI) [57]. Within the first weeks of incubation an Fe(III) reduction was detected, explaining the occurrence of IRB like *Halomonas* spp.. In addition, the IRB *Acidiphilium* spp. could be identified, which belong to the class of alphaproteobacteria. Cultivated under anoxic conditions, these bacteria are able to reduce Fe(III) to Fe(II) [58, 59]. Furthermore, previous investigation about the ability of Fe(III) reduction displayed, that *Acidiphilium* is able to reduce insoluble Fe(III) into soluble Fe(II) at a redox potential of 770 mV, which equals the prevalent potential in the flooding water before six weeks of incubation [50]. To the best of our knowledge, no studies which described the ability of this identified IRB to reduce uranium(VI) are published. Due to their majority of the bacterial diversity after six weeks incubation and in addition the knowledge that IRB are able for uranium(VI) reduction, it could be assumed that *Halomonas* spp. and *Acidiphilium* spp., are responsible for the microbial mediated uranium(VI) reduction within the flooding water samples. However, further studies should be performed to proof this hypothesis and to investigate their ability to reduce uranium(VI) in more detail.

Although, previous investigations revealed in the presence and activity of SRB in the flooding water, within the laboratory scale samples (1 L) they could not be detected, using 16S rDNA investigations. However, the bacterial diversity of the pilot plant sample (100 L) displayed the occurrence of SRB. Yet, it was not possible to obtain enough sequence information to get an entire overview about the bacterial diversity after six weeks of the pilot plant approaches (data not shown). Nevertheless, the results revealed that the majority of the sequences were identified as *A. ferrooxidans* (60 %), followed by *Desulfovibrio* spp. and *Acidocella* spp.. Despite the low bacterial diversity information, all obtained sequences were associated with SRB and IRB/IOB, which is in good agreement to the results of the laboratory scale experiments.

One explanation for the non-successful stimulation of SRB within the laboratory scale samples

could be the differences of the redox potential. A microbial sulfate reduction at 230 mV is rather unlikely, due the fact that sulfate reduction mediated by microorganisms was investigated in previous studies at redox potentials at -220 mV [60]. Therefore, SRB were rather not metabolic active and thus, could not be detected using 16S rDNA analyses. However, besides the differences of the bacterial diversity of both approaches, the results of the pilot plant confirmed the microbial mediated uranium(VI) reduction in up-scaling setups. In conclusion, this findings suggest the applicability of microbial uranium(VI) reduction for industrial bioremediation approaches on site of the former uranium mine Königstein.

Conclusion

With the obtained results from this study, we could clearly demonstrate the capability of anaerobic microorganisms inhabiting the flooding water to reduce uranium(VI). During an incubation time of six weeks the prevalent uranium(VI) was completely reduced to uranium(IV), only by the addition of 10 mM glycerol. In addition, we could also demonstrate a microbial induced Fe(III) and sulfate reduction. In combination with investigations on the bacterial diversity after six weeks of incubation, bacteria were identified, which might be responsible for the observed redox reduction processes. The results revealed that the bacterial diversity is dominated of IRB and SRB. Concluding, these bacteria, naturally occurring within the flooding water, seems to be responsible for the uranium(VI) reduction. However, the bacterial communities of the laboratory scale approaches compared to the pilot plant sample differs drastically. Thus, further experiments should be performed to investigate the microbial community within the flooding water after uranium(VI) reduction. Moreover, the results obtained from laboratory scale experiments could successfully transferred and verified in industrial scale applications within a pilot plant. The microbial mediated reduction of uranium(VI) could be used for possible bioremediation approaches, which would be cost-effective and less time-consuming, than the conventional pump-and-treat process. With the obtained results, we could confirm previous studies which assumed the applicability of microbial mediated uranium(VI) reduction for *in situ* bioremediation approaches. However, detailed investigations should be performed on the formed uranium(IV) complexes and their stability at long-time conditions.

Acknowledgments

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) grant № 02NUK030F (TransAqua). The authors are grateful to the Wismut GmbH for allowing access to the sampling site, in particular S. Röder for assistance in water sampling. We thank S. Gurlit and C. Eckardt for ICP-MS and AAS measurements, S. Weiß for his assistance during preparation of XANES samples, T. Zimmermann and R. Steudtner for UV-vis analyses and T. Schneider for his grammatical correction of this manuscript.

References

- [1] K. H. Williams, J. R. Bargar, J. R. Lloyd and D. R. Lovley, „*Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: A systems approach to subsurface biogeochemistry*“, *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 489 (2013).
- [2] U. Jenk, K. Nindel and U. Zimmermann, in *Uranium, Mining and Hydrogeology*, Ed. B. J. Merkel and A. Hasche-Berger, P. 431–436. Springer Verlag (2008).
- [3] D. R. Lovley, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby and E. R. Landa, „*Microbial reduction of uranium*“, *Nature* **350**, 413 (1991).
- [4] M. L. Merroun, M. Nedelkova, J. J. Ojeda, T. Reitz, M. L. Fernández, J. M. Arias, M. Romero-González and S. Selenska-Pobell, „*Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses*“, *J. Hazard. Mater.* **197**, 1 (2011).
- [5] D. B. Johnson and K. B. Hallberg, „*Acid mine drainage remediation options: A review*“, *Sci. Total Environ.* **338**, 3 (2005).
- [6] B. J. Baker, G. W. Tyson, L. Goosherst and J. F. Banfield, „*Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities*“, *Appl Environ Microb* (2009).
- [7] J. R. Lloyd and L. E. Macaskie, „*Bioremediation of Radionuclide-Containing Wastewaters*“, in *Environmental Microbe-Metal Interactions*, P. 277–327 (2000).
- [8] H. Shimura, K. Itoh, A. Sugiyama, S. Ichijo, M. Ichijo, F. Furuya, Y. Nakamura, K. Kitahara, K. Kobayashi, Y. Yukawa and T. Kobayashi, „*Absorption of Radionuclides from the Fukushima Nuclear Accident by a Novel Algal Strain*“, *PLoS One* **7** (2012).
- [9] P. Kotrba, L. Dolecková, V. de Lorenzo and T. Ruml, „*Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides.*“, *Appl Environ Microb* **65**, 1092 (1999).
- [10] M. D. Mullen, D. C. Wolf, F. G. Ferris, T. J. Beveridge, C. A. Flemming and G. W. Bailey, „*Bacterial sorption of heavy metals*“, *Appl Environ Microb* **55**, 3143 (1989).
- [11] B. Volesky, „*Biosorption and me*“, *Water Res.* **41**, 4017 (2007).
- [12] K. R. Salome, M. J. Beazley, S. M. Webb, P. A. Sobocky and M. Taillefert, „*Bio-mineralization of U(VI) phosphate promoted by microbially-mediated phytate hydrolysis in contaminated soils*“, *Geochim. Cosmochim. Acta* (2017).
- [13] Y. Suzuki and J. F. Banfield, „*Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site*“, *Geomicrobiol. J.* **21**, 113 (2004).

- [14] A. J. Francis, C. J. Dodge, F. Lu, G. P. Halada and C. R. Clayton, „XPS and XANES Studies of Uranium Reduction by *Clostridium* sp“, Environ. Sci. Technol. **28**, 636 (1994).
- [15] D. R. Lovley, P. K. Widman, J. C. Woodward and E. J. P. Phillips, „Reduction of uranium by cytochrome *c3* of *Desulfovibrio vulgaris*“, Appl Environ Microb **59**, 3572 (1993).
- [16] Y. Suzuki, S. D. Kelly, K. M. Kemner and J. F. Banfield, „Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment“, Appl Environ Microb **71**, 1790 (2005).
- [17] E. L.-W. Majumder and J. D. Wall, „Uranium Bio-Transformations: Chemical or Biological Processes?“, Open J Inorg Chem (2017).
- [18] L. Newsome, K. Morris, D. Trivedi, N. Atherton and J. R. Lloyd, „Microbial reduction of uranium(VI) in sediments of different lithologies collected from Sellafield“, Appl. Geochem. **51**, 55 (2014).
- [19] K. T. Finneran, R. T. Anderson, K. P. Nevin and D. R. Lovley, „Potential for Bioremediation of Uranium-Contaminated Aquifers with Microbial U(VI) Reduction“, Soil Sediment Contam **11**, 339 (2002).
- [20] D. R. Brookshaw, R. A. D. Patrick, J. R. Lloyd and D. J. Vaughan, „Microbial effects on mineral-radionuclide interactions and radionuclide solid-phase capture processes“, Mineral. Mag. **76**, 777 (2012).
- [21] D. R. Lovley and E. J. P. Phillips, „Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*“, Appl Environ Microb **58**, 850 (1992).
- [22] T. Arnold, T. Zorn, H. Zänker, G. Bernhard and H. Nitsche, „Sorption behavior of U(VI) on phyllite: Experiments and modeling“, J. Contam. Hydrol. **47**, 219 (2001).
- [23] M. H. Baik, S. P. Hyun, W. J. Cho and P. S. Hahn, „Contribution of minerals to the sorption of U(VI) on granite“, Radiochim. Acta **92** (2004).
- [24] M. Barnett, P. Jardine, S. Brooks and H. Selim, „Adsorption and Transport of Uranium(VI) in Subsurface Media“, Soil Sci. Soc. Am. J. **64**, 908 (2000).
- [25] M. C. Duff, J. U. Coughlin and D. B. Hunter, „Uranium co-precipitation with iron oxide minerals“, Geochim. Cosmochim. Acta (2002).
- [26] I. Zirnstein, „Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein“, PhD thesis, Technische Universität Dresden (2015).
- [27] H. C. Bimboim and J. Doly, „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“, Nucleic Acids Res. (1979).
- [28] W. Matz, N. Schell, G. Bernhard, F. Prokert, T. Reich, J. Claußner, W. Oehme, R. Schlenk, S. Dienel, H. Funke, F. Eichhorn, M. Betzl, D. Pröhl, U. Strauch, G. Hüttig, H. Krug, W. Neumann, V. Brendler, P. Reichel, M. a. Denecke and H. Nitsche, „ROBL – a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF“, J. Synchrotron Radiat. **6**, 1076 (1999).
- [29] A. Roßberg, T. Reich and G. Bernhard, „Complexation of uranium(VI) with protocatechuic acid-application of iterative transformation factor analysis to EXAFS spectroscopy“, Anal. Bioanal. Chem. (2003).
- [30] Å. Kolmert, P. Wikström and K. B. Hallberg, „A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures“, J Microbiol Meth **41**, 179 (2000).
- [31] E. Viollier, P. W. Inglett, K. Hunter, a. N. Roychoudhury and P. Van Cappellen, „The Ferrozine Method Revisited: Fe (II)/Fe (III) Determination in Natural Waters“, Appl. Geochem. **15**, 785 (2000).

- [32] T. Arnold, N. Baumann, E. Krawczyk-Bärsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk and S. Weiß, „*Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment*“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 2200 (2011).
- [33] D. B. Johnson, „*Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metalmines*“, *Water Air Soil Pollut* **3**, 47 (2003).
- [34] I. Sánchez-Andrea, J. L. Sanz, M. F. M. Bijmans and A. J. M. Stams, „*Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage*“, *J. Hazard. Mater.* **269**, 98 (2014).
- [35] M. F. M. Bijmans, E. de Vries, C.-H. Yang, C. J. N. Buisman, P. N. L. Lens and M. Dopson, „*Sulfate reduction at pH 4.0 for treatment of process and wastewaters*“, *Biotechnol. Progr.* P. NA–NA (2010).
- [36] M. Koschorreck, „*Microbial sulphate reduction at a low pH*“, *FEMS Microbiol Ecol* **64**, 329 (2008).
- [37] I. Nancucheo and D. B. Johnson, „*Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria*“, *Microb. Biotechnol.* **5**, 34 (2011).
- [38] D. Alazard, M. Joseph, F. Battaglia-Brunet, J. L. Cayol and B. Ollivier, „*Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments*“, *Extremophiles* (2010).
- [39] D. R. Kremer and T. A. Hansen, „*Glycerol and dihydroxyacetone dissimilation in Desulfovibrio strains*“, *Arch. Microbiol.* **147**, 249 (1987).
- [40] H. J. Nanninga and J. C. Gottschal, „*Properties of Desulfovibrio carbinolicus sp. nov. and Other Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from an Anaerobic-Purification Plant.*“, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 802 (1987).
- [41] A.-I. Qatibi, A. Bories and J.-L. Garcia, „*Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture*“, *Curr. Microbiol.* **22**, 47 (1991).
- [42] S. C. Santos, M. G. Liebensteiner, A. H. van Gelder, M. R. Dimitrov, P. F. Almeida, C. M. Quintella, A. J. M. Stams and I. Sánchez-Andrea, „*Bacterial glycerol oxidation coupled to sulfate reduction at neutral and acidic pH*“, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **64**, 1 (2018).
- [43] L. Petrie, N. N. North, S. L. Dollhopf, D. L. Balkwill and J. E. Kostka, „*Enumeration and Characterization of Iron(III)-Reducing Microbial Communities from Acidic Subsurface Sediments Contaminated with Uranium(VI)*“, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7467 (2003).
- [44] D. A. Elias, L. R. Krumholz, D. Wong, P. E. Long and J. M. Suflita, „*Characterization of Microbial Activities and U Reduction in a Shallow Aquifer Contaminated by Uranium Mill Tailings*“, *Microb. Ecol.* **46**, 83 (2003).
- [45] B. Gu, W. M. Wu, M. A. Ginder-Vogel, H. Yan, M. W. Fields, J. Zhou, S. Fendorf, C. S. Criddle and P. M. Jardine, „*Bioreduction of uranium in a contaminated soil column*“, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4841 (2005).
- [46] I. Ortiz-Bernad, R. T. Anderson, H. A. Vrionis and D. R. Lovley, „*Resistance of Solid-Phase U(VI) to Microbial Reduction during In Situ Bioremediation of Uranium-Contaminated Groundwater*“, *Appl Environ Microbiol* **70**, 7558 (2004).
- [47] J. M. Senko, J. D. Istok, J. M. Suflita and L. R. Krumholz, „*In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization*“, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1491 (2002).
- [48] J. L. Uhrig, J. I. Drever, P. J. Colberg and C. C. Nesbitt, „*In situ immobilization of heavy metals associated with uranium leach mines by bacterial sulfate reduction*“, *Hydrometallurgy* **43**, 231 (1996).

- [49] D. R. Lovley, „*Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction*“, J Ind Microbiol **14**, 85 (1995).
- [50] D. R. Lovley, D. E. Holmes and K. P. Nevin, „*Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction*“, Adv. Microb. Physiol. (2004).
- [51] D. R. Lovley and R. T. Anderson, „*Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the subsurface*“, Hydrogeology Journal **8**, 77 (2000).
- [52] A. Kirishima, T. Kimura, R. Nagaishi and O. Tochiyama, „*Luminescence properties of tetravalent uranium in aqueous solution*“, Radiochim. Acta **92** (2004).
- [53] M. Nanda, Z. Yuan, W. Qin, M. Poirie and X. Chunboa, „*Purification of Crude Glycerol using Acidi cation: Effects of Acid Types and Product Characterization*“, Austin Chem Eng. **1(1)**, 1 (2014).
- [54] K. Duquesne, S. Lebrun, C. Casiot, O. Bruneel, J. C. Personné, M. Leblanc, F. Elbaz-Poulichet, G. Morin and V. Bonnefoy, „*Immobilization of Arsenite and Ferric Iron by Acidithiobacillus ferrooxidans and Its Relevance to Acid Mine Drainage*“, Appl. Environ. Microbiol. **69**, 6165 (2003).
- [55] D. Leduc, L. G. Leduc and G. D. Ferroni, „*Quantification of bacterial populations indigenous to acidic drainage streams*“, Water Air Soil Pollut **135**, 1 (2002).
- [56] D. K. Nordstrom and G. Southam, „*Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation*“, in *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals*, Ed. J. F. Banfield and K. H. Nealson, P. 361–390, Mineralogical Society of America, Washington, DC (1997).
- [57] M. R. VanEngelen, B. M. Peyton, M. R. Mormile and H. C. Pinkart, „*Fe(III), Cr(VI), and Fe(III) mediated Cr(VI) reduction in alkaline media using a Halomonas isolate from Soap Lake, Washington*“, Biodegradation (2008).
- [58] T. A. M. Bridge and D. B. Johnson, „*Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron- containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria*“, Appl Environ Microb (1998).
- [59] K. Küsel, T. Dorsch, G. Acker and E. Stackebrandt, „*Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of Acidiphilium cryptum JF-5 capable of coupling the reduction of fe(III) to the oxidation of glucose*“, Appl Environ Microb (1999).
- [60] J. D. Wall and L. R. Krumholz, „*Uranium Reduction*“, Annu. Rev. Microbiol. **60**, 149 (2006).

Figures

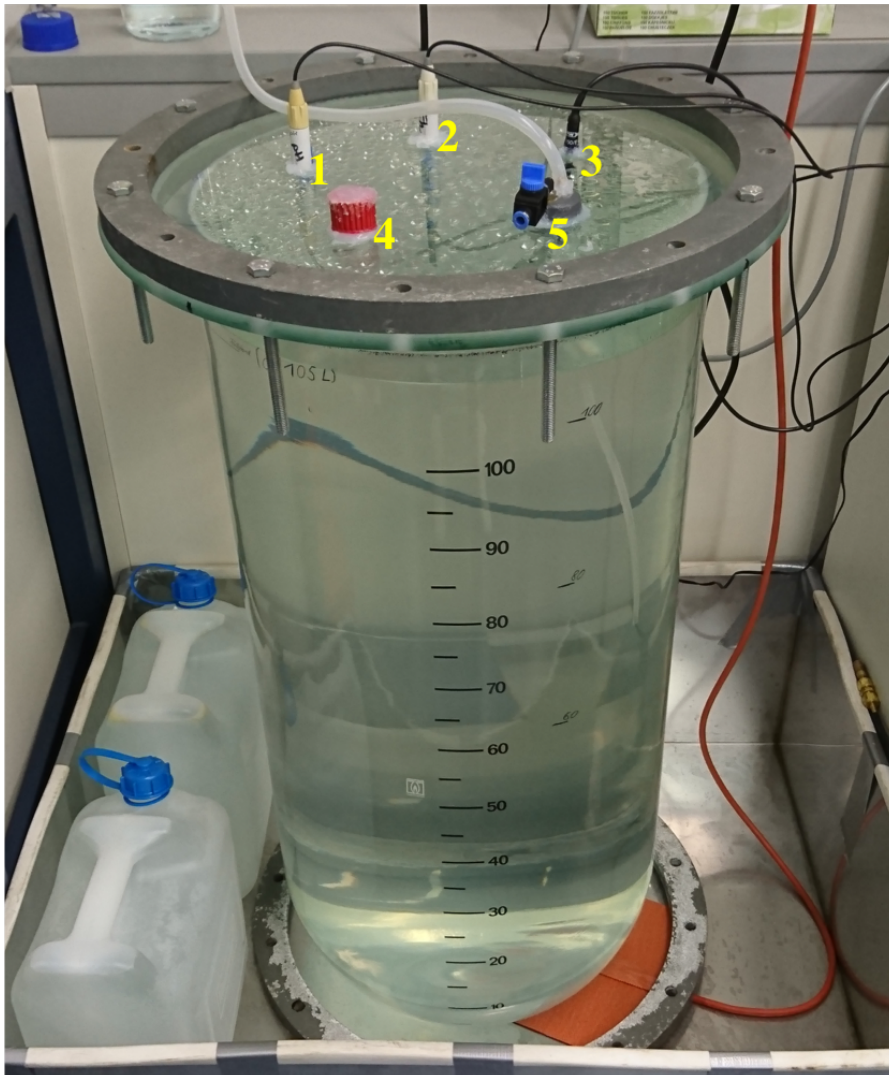


Figure 1: Pilot plant. Flooding water (100 L) was collected and N₂-flushed, 10 mM glycerol were added, incubation for six weeks at room temperature. For on line measurement, devices were placed on the lid, (1) pH electrode, (2) redox electrode, (3) temperature sensor, (4) device for anaerobic samplings by syringe, (5) vent for N₂ flushing.

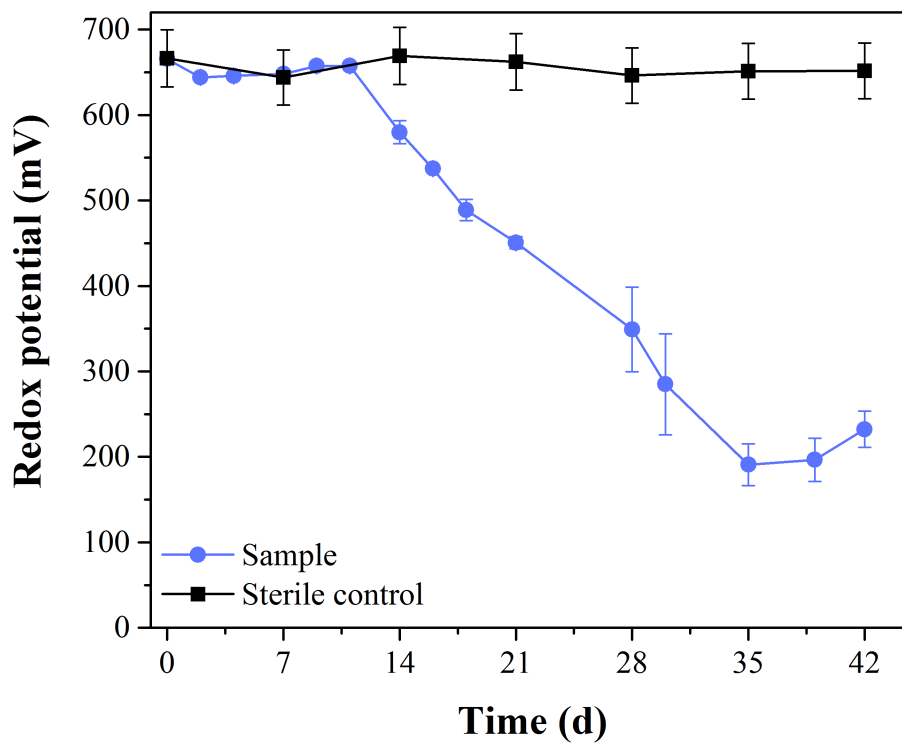


Figure 2: Redox potential of flooding water samples incubated over 6 weeks. Flooding water was collected and N₂-flushed to achieve anoxic conditions. As carbon source 10 mM glycerol was added and the samples were incubated at 30 °C for six weeks in the dark. As sterile control, flooding water was sterile-filtered and supplemented with 10 mM glycerol. Error bars indicate standard deviation, n=3.

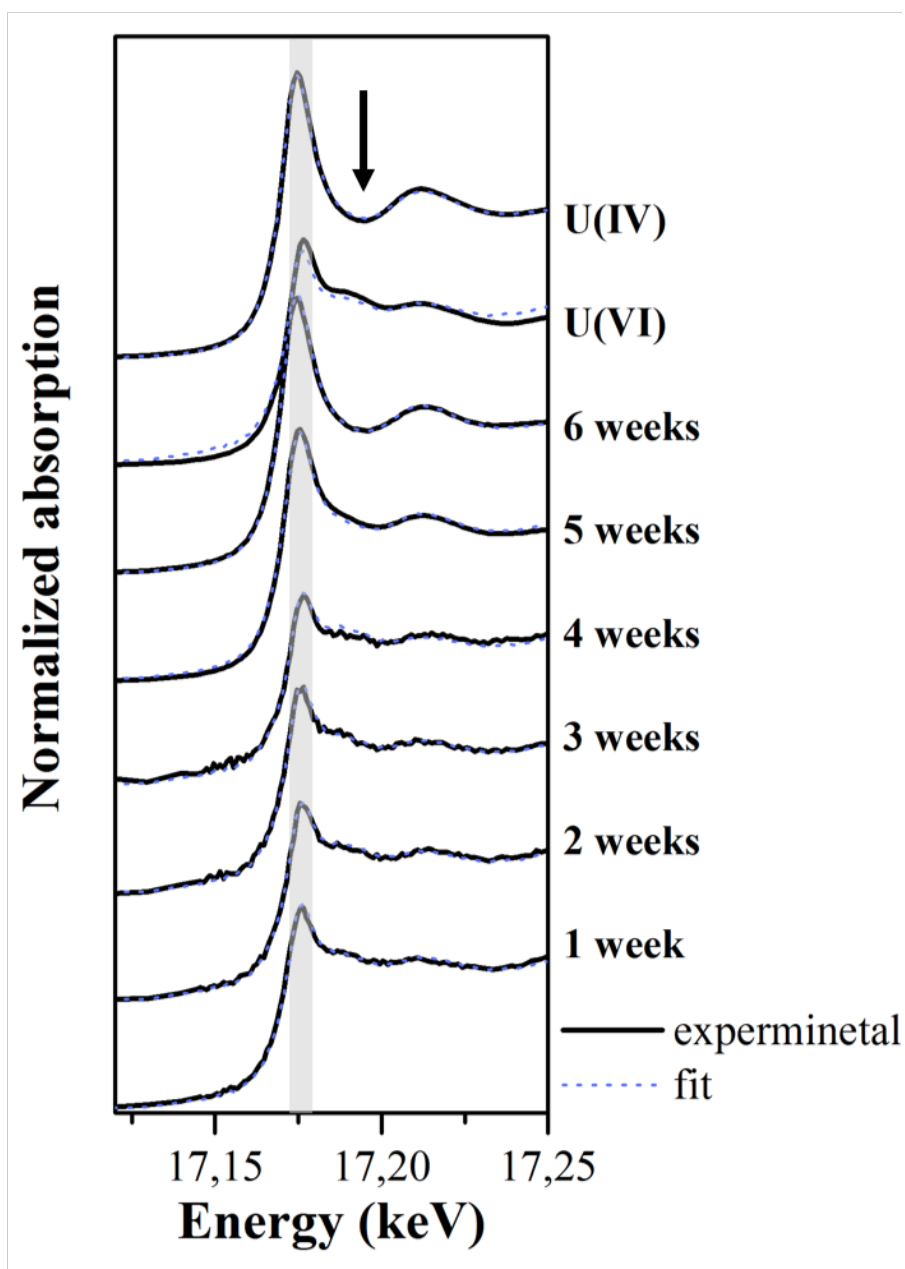


Figure 3: XANES measurements of anoxic flooding water samples. Samples were incubated at 30 °C for six weeks in the dark, 10 mM glycerol was added, samples were taken once a week. As references for uranium(VI) and uranium(IV) samples were prepared with the flooding water a background solution. Grey area displays the shift of the spectra, and the black arrow indicates the disappearing of the typical uranium(VI) shoulder of the uranium(IV) spectra.

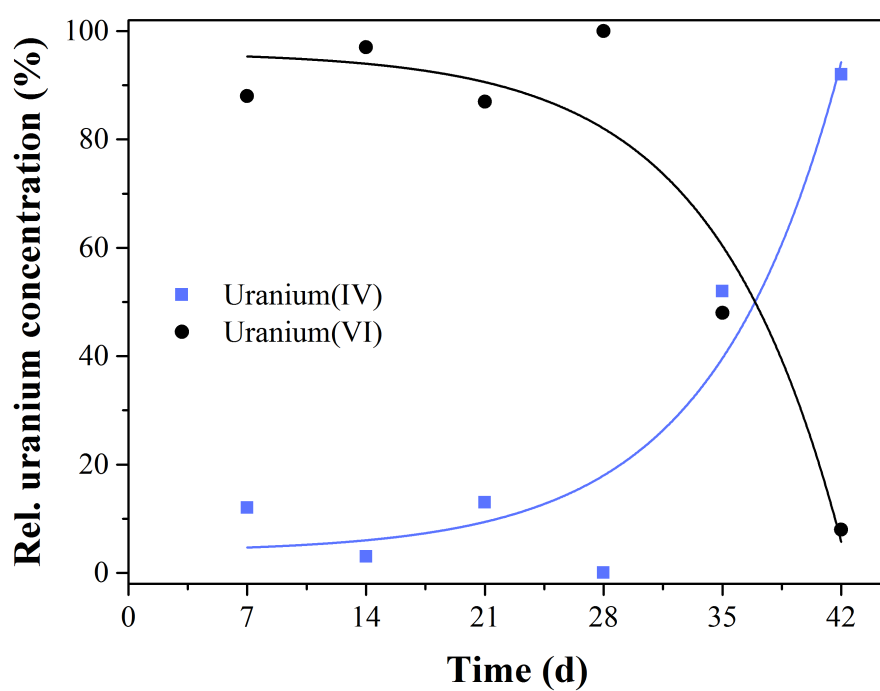


Figure 4: Relative uranium concentration of the anoxic flooding water samples calculated by ITFA. Samples were incubated at 30 °C for six weeks in the dark, 10 mM glycerol was added, samples were taken every week.

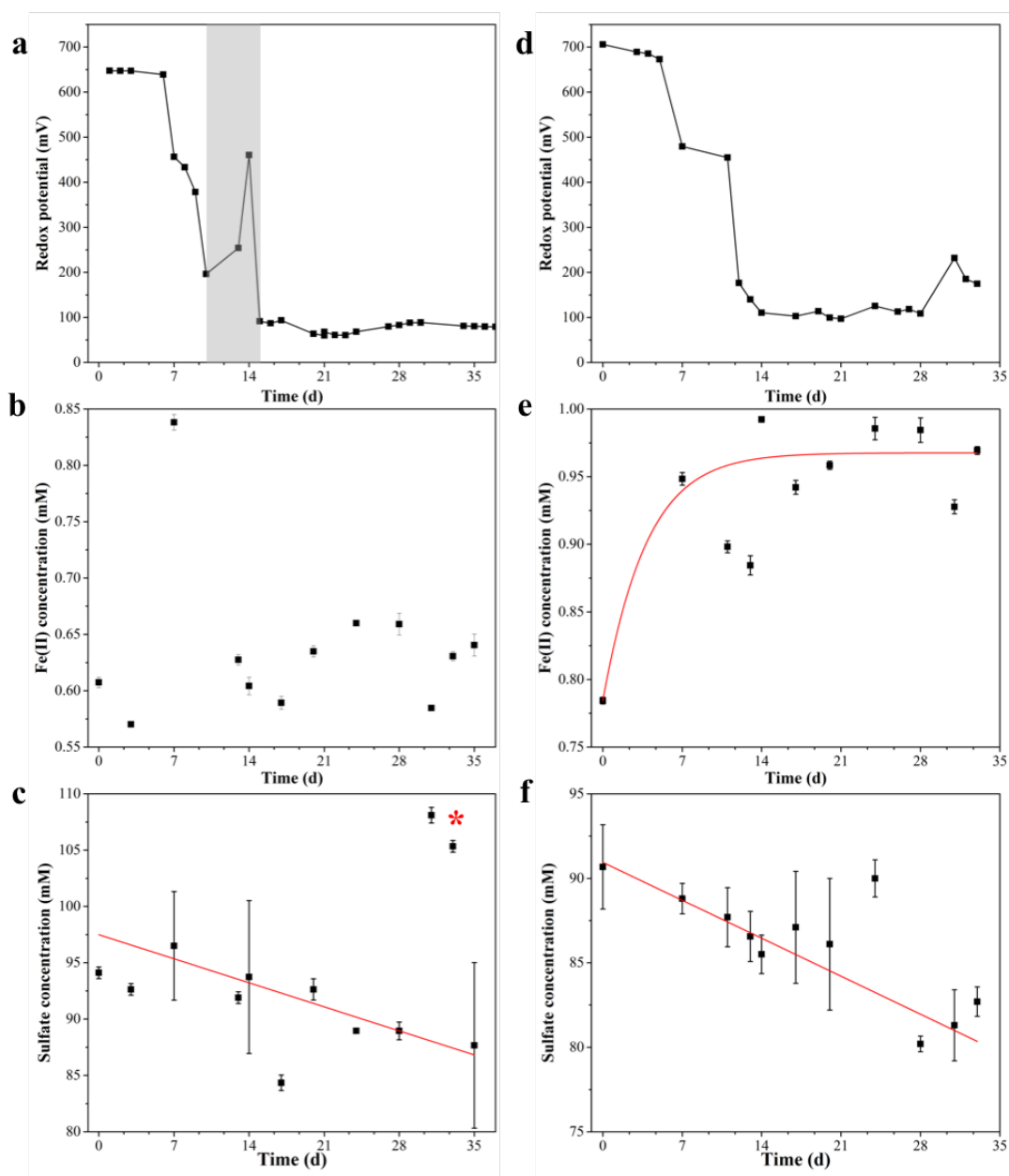


Figure 5: Redox potential, Fe(II) and sulfate concentration during six weeks of incubation time of the pilot plant samples (100 L). Plots (a-c) display the results of the first run of the pilot plant, (d-f) display the second run. Grey marked area in (a) shows a distinct increase of the redox potential, possibly due to an oxygen invasion. The red curves represent a guide to the eye. The red star in (c) indicates two possible outliers of the measured sulfate concentration, which were excluded from the linear fitting.

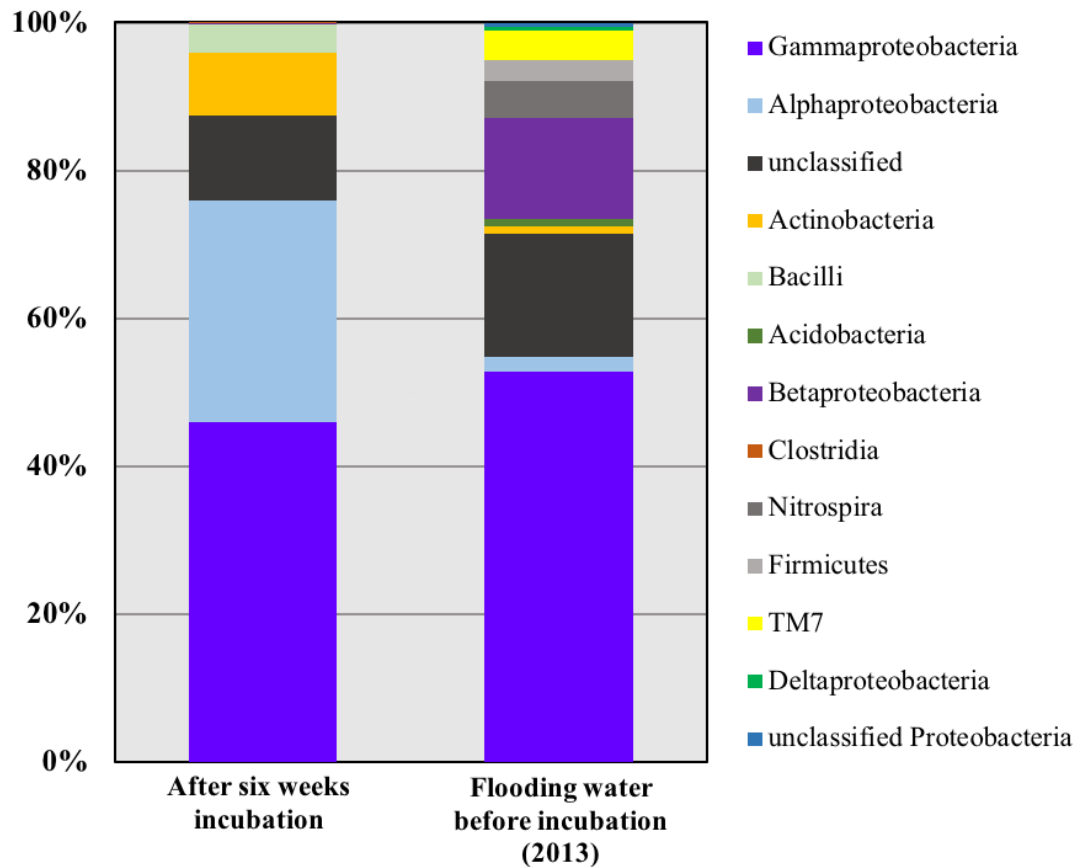


Figure 6: Bacterial diversity of the laboratory scale experiments (1 L) after six weeks incubation and before. Determined using 16S rDNA gene analysis, diversity before incubation (2013) changed after [26].

Supplementary

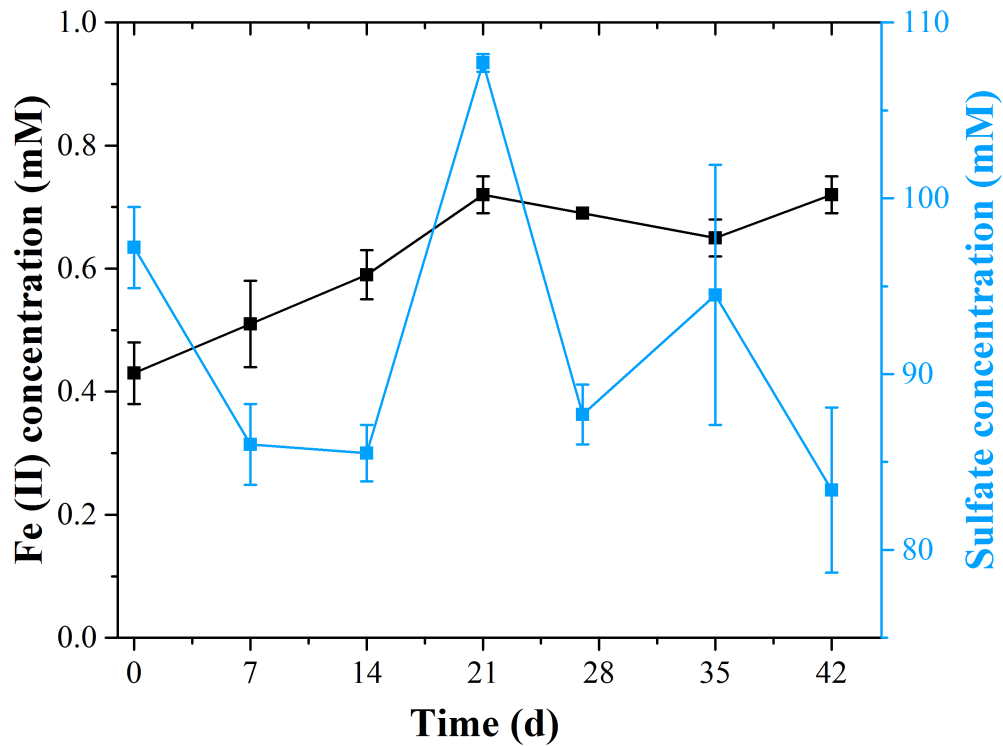


Figure S1: Fe(II) (black symbols) and sulfate (blue symbols) concentration during six weeks of incubation time within the laboratory scale experiments (1 L). Samples were incubated at 30 °C for six weeks in the dark, 10 mM glycerol was added, samples were taken every week.

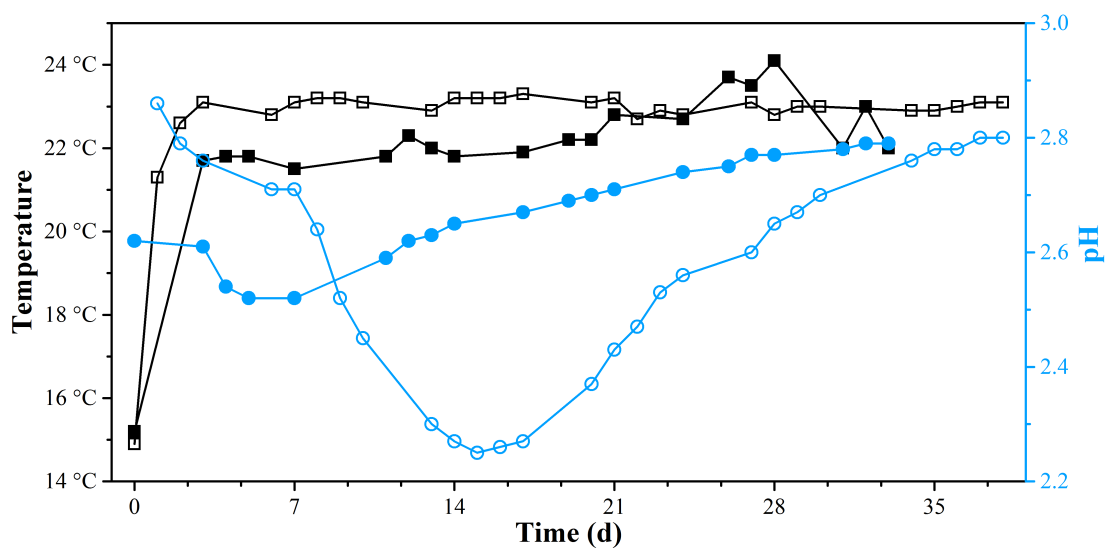


Figure S2: Temperature and pH value of the flooding water samples obtained from the pilot plant. In black the progression of the temperature during six weeks is displayed. The blue curves show the changes of the pH value. Open symbols represent the first run, and closed symbols the second run.

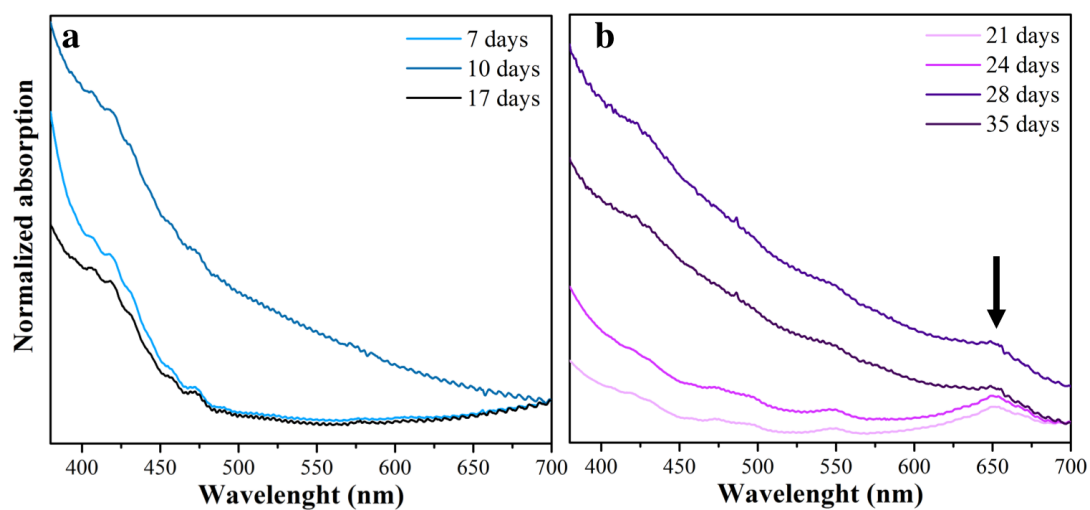


Figure S3: UV-vis spectra of the flooding water samples obtained from the pilot plant. Spectra till day 17 in (a) displayed no uranium(IV) concentration, in (b) the spectra after three weeks of incubation time with detected uranium(IV) (black arrow) are displayed.

4 Discussion

Bioremediation represents a cost-effective and sustainable alternative for the treatment of heavy metal-contaminated sites at large scale. This emerging strategy uses microorganisms to remove or immobilize metals and radionuclides from contaminated environments [111]. In addition, also the use of green plants to decontaminate polluted sites, known as phytoremediation, seems to be promising for the removal of metals [112, 113]. The most attractive advantage of bioremediation is the reduced impact on natural ecosystems, by using indigenous microorganisms [114]. Microorganisms play an important role in the maintenance of ecosystems as they are known to be capable of rapid adjustment towards environmental changes. Furthermore, they are considered to be the first life forms, and thus they are versatile and adaptive to various challenging environmental conditions. Microorganisms are omnipresent and play a major role in regulating biogeochemical cycles within extreme environmental conditions such as acidic lakes, hydrothermal vents, and bottoms of deep oceans [115]. In addition, they are able to produce diverse enzymes which could be applied for the removal of contaminants, by direct destruction or through transformation into lesser toxic intermediates [116]. Microorganisms display many characteristics which make them suitable for bioremediation applications. Some bacteria for example, are able to develop unique properties, like the synthesis of bioactive compounds, biofilm formation or production of biosurfactants [117, 118]. Previous studies could show, that bacteria inhabitant within heavy metal and radionuclide contaminated sites are well adapted to these harsh conditions. Consequently, they play a major role in biogeochemical cycling of toxic metals and may influence their mobility and toxicity [40, 119].

As a consequence of former mining and milling industry, but also by occasional accidents at nuclear facilities, such as the casualty 1986 in Chernobyl, radionuclides are released to the environment, which result in a possible health risk. It is well described, that exposure to radionuclides causes acute health effects to humans. Studies demonstrated, that long-term exposure leads to an elevated risk of kidney damage, leukopenia and leukemia, particularly by the intake of contaminated drinking water [120, 121]. Moreover, early symptoms of high doses could include vomiting, nausea and headache. Increased exposure may result in weakness, fever, hair loss and dizziness, but ultimately death. In addition, radionuclide exposure to fetuses could have effects on a cellular level, which can result in smaller head or brain size, poorly formed eyes, abnormal growth and mental retardation [122–124]. In conclusion, this shows the importance of the elimination of radionuclides, such as uranium, from the environment. Therefore, microbial trans-

formations of heavy metals and radionuclides are a vital part within natural ecosystem processes and could have beneficial impacts for our human community [111].

The results described in this thesis could demonstrate that all investigated strains display different mechanisms to interact with uranium(VI). Resulting from that, the ability to interact with uranium(VI) and decrease its mobility within surrounding solutions is dependent on the individual organism. In addition, it was clearly demonstrated that indigenous microorganisms influence the migration behavior of uranium(VI) in tremendous ways. To predict the fate of uranium in the environment it is important to have knowledge about the indigenous microbial diversity and their possible impact on its solubility. Moreover, the assessment of microbial populations isolated from uranium-contaminated sites not only enables us to gain better insights in their role of metal and radionuclide biogeochemistry, but also allows to evaluate their potential to design effective bioremediation approaches.

4.1 Uranium removal capability and interaction mechanisms of the betaproteobacterium *A. facilis*

The investigated strain *A. facilis* represents a common soil bacterium which is spread worldwide and which is not fastidious to special carbon sources [125, 126]. Previous studies could show that this species represents a major part of metabolic active microorganisms within the flooding water of the former uranium mining site Königstein [109]. Due to its ability to grow at acidic conditions (pH 2.9) and at high uranium concentrations (8-13 mg/L) this strain was examined for its capability to remove uranium from surrounding solutions.

The results of the batch sorption experiments revealed, that the bacterial cells were capable to remove 130 mg U/g dbm, which corresponds to a removal capacity of almost 100 % [127]. Compared to an isolated strain from a potential site for radioactive waste disposal in China, namely *Bacillus* sp. removing about 60 % of total uranium, *A. facilis* is more efficient in uranium removing [128]. However, other investigated gram-negative bacterial strains could remove similar amounts of uranium [129–131].

Further experiments were performed to examine the tolerance of *A. facilis* to grow in the presence of uranium. Interestingly, despite the fact that the bacterial strain was not directly isolated from the flooding water of the former uranium mine and thus, the bacterial cells were not naturally exposed to high uranium concentrations, the strain exhibits a high tolerance against this radionuclide. The investigations revealed a MIC for uranium of 0.2 mM which equals 23.8 mg/L. Compared to the current uranium concentration of 8 mg/L within the flooding water, the bacterial strain is able to tolerate nearly a threefold higher concentration and therefore, would be able to resist the harsh conditions at the former uranium mining site in Königstein. Nevertheless, the uranium tolerance test was performed on solid agar plates. Previous investigations assume that

due to different conditions of diffusion, complexation and bioavailability of the metal, higher tolerances are reported on solid media, in comparison to liquid media, and in addition in rich media, in comparison to minimal media [132, 133]. In conclusion, the revealed values of heavy metal tolerances of the investigated microorganisms vary with type and composition of the used media. Thus, it is often difficult to compare obtained results with previous studies due to the usage of different conditions [40, 134].

To investigate the uranium tolerance of the bacterial cells in more detail, cell viability and metabolic activity of *A. facilis* growing in the presence of uranium were performed using flow cytometry. The cells were grown in liquid NB medium 1:5 diluted to avoid the precipitation of uranium. After an incubation time of 48 h at 30 °C the cells were stained with different fluorescent dyes to examine the viability and activity after uranium exposure. In contrast to the tolerance test on solid medium, these investigations revealed that a concentration of 0.05 mM reduced the activity and viability of the cells by nearly 50 %. Furthermore, at the highest concentration of 0.1 mM uranium 86.3 % of the total cells were not viable and only 6 % of the cells were active [127]. Thus, in liquid medium the cells were able to tolerate only half of the uranium concentration tested on solid medium, which could be explained by different conditions as described above, including bioavailability, diffusion and complexation of uranium in solution. In conclusions, with both investigations it was demonstrated that the tolerance of metals depends on different factors like mentioned above. The results obtained from this study revealed in different uranium concentrations for the tolerance of *A. facilis*. Thus, to study the ability of microorganisms to tolerate heavy metals and radionuclides, like uranium, different methods should be combined to obtain complete insights rather than misinterpretations.

Furthermore, TEM analysis were performed to examine the localization of the removed uranium by the bacterial cells. This method allows the visualization of uranium and other elements on a cellular level. In contrast, the visualization using SEM analyses is limited since this method is surface specific. By embedding and cutting the samples in ultra-thin sections it is possible to visualize the inside of the cells including sub-cellular structures. The TEM based investigation the of interaction mechanisms of *A. facilis* with uranium showed both, heavy metal uptake into the cytoplasm and immobilization on the outer cell membrane. Active bioaccumulation and passive biosorption could be identified as mechanisms of uranium removal from solution. Furthermore, uranium was localized inside the cell in association with polyphosphate granules, which are often found in the cytoplasm of bacteria as storage compartments for phosphorous compounds [135]. Microorganisms are capable to precipitate uranium by the degradation of intracellular polyphosphate granules resulting in the release or efflux of phosphate [136]. However, *A. facilis* interacts with uranium not by the release of phosphate to the surrounding solution (data not shown), uranium is immobilized inside the cytoplasmic polyphosphate inclusions. Similar observations were made by strains isolated from uranium waste piles [137]. In summary, an immobilization of uranium by microorganisms and by means of phosphates is not limited to

phosphate release or efflux, but may also occur via an uptake into the cell and binding uranium to phosphorus-rich compartments inside the cytoplasm. The investigation of *A. facilis* demonstrated that the described interaction mechanisms do not only occur as isolated processes, but occasionally super-impose with other processes and are thus sometimes difficult to recognize. In this case study, the bacterial cells were able to remove the uranium by biosorption on the outer cell membrane and by bioaccumulation within the cytoplasm. During the accumulation, uranium was immobilized by mineralization associated with phosphate in polyphosphate granules.

Moreover, detailed investigations on the molecular structure of cell-associated uranyl species (with *A. facilis*) may contribute to a better understanding of the response of gram-negative bacteria to uranium. This work demonstrates, that uranium is associated to the bacterial cell by the formation of different distinct species, like bound to carboxyl-groups and phosphoryl-groups, and furthermore to polyphosphate granules which are located within the cytoplasm. But not only the in depth described structural information of the uranium speciation, also the kinetically investigations during the removal experiments led to interesting findings. Within the first hours, uranium is mainly bound to the outer membrane of the bacterial cells and therefore, associated with lipopolysaccharides. Subsequently, within the following hours of incubation time, the association pattern change and it is indicated that uranium is additionally bound to carboxylic groups, corresponding to the peptidoglycan. Consequently, uranium immobilization by *A. facilis* represents a complex time-dependent process [138]. The majority of previous studies investigated the endpoint of removal experiments not considering transitional interaction mechanisms in the meantime [139–141]. With the kinetically investigations about the interactions of *A. facilis* with uranium this missing gap could be closed and furthermore, could demonstrate that interaction patterns changes during incubation time. It is important to develop a complete process understanding to predict the fate of radionuclides, like uranium, in the environment and consequently, promising remediation strategies could be developed [36, 142].

In order to obtain information about the prevalent oxidation state after uranium interaction experiments, the XANES region of the obtained X-ray absorption spectra were analyzed. The investigations clearly demonstrate that the removed and immobilized uranium is still prevalent as uranium(VI) and was not reduced to uranium(IV) (data not shown). In addition, uranium(VI) immobilization experiments with *A. facilis* were performed under anaerobic conditions (data not shown), due to the fact that previous studies displayed a uranium(VI) reduction by *Acidovorax* species. For instance, investigations in a long-term experiment (more than 2 years) to evaluate the *in situ* reduction of uranium(VI) at a highly uranium-contaminated site in Oak Ridge (TN, USA), proved the presence of *Acidovorax* spp. [143]. In addition, *Acidovorax* sp. was detected in a community of several metal reducing bacteria in microcosm experiments within sediment samples from the FRC Oak Ridge (TN, USA), to be capable of uranium(VI) reduction [144]. It was shown, that the presence of this denitrifier could contribute to the removal of competing electron acceptors and ensure the stability of the reduced uranium(IV) [145]. However, to stim-

ulate the microbial reduction of uranium(VI) in these previous studies ethanol and lactate were added as carbon source and electron donor, while the experiments performed in this thesis only used sterilized tap water without adding any carbon source or electron donor. This fact might explain the not-detectable uranium(VI) reduction by *A. facilis*. In addition, uranium(VI) reduction was detected within microcosm experiments, by meaning of a community composed of different microorganisms. Thus, the observed uranium(VI) reduction was therefore catalyzed by a community of different microbes. Which could be explaining that no uranium(VI) reduction took place, by performing experiments using a pure culture of *A. facilis*. Further experiments under oxygen-free conditions and by adding, for instance ethanol, should be performed to examine the physiological ability of *A. facilis* pure cultures to reduce uranium(VI).

In conclusion, to investigate the uranium removal capacity, the localization of the removed uranium, the ability to grow in the presence of uranium and furthermore the speciation of uranium associated with the bacterial cells, different methods were used and could deliver detailed informations about the mechanisms how *A. facilis* interacts with uranium(VI). The findings presented in this thesis contribute to a better understanding of microbial interactions with uranium and demonstrate that the investigated betaproteobacterium may play an important role for the prediction of the mobility and fate of uranium in the environment, as well as in contaminated sites, such as the former uranium mine Königstein. Together with the obtained fundamental understanding from this study and the ability of *A. facilis* to immobilize uranium fast and efficient, this bacterial strain could be appropriated for *in situ* bioremediation approaches.

4.2 The isolated yeast KS5 (*R. toruloides*) and its interaction mechanisms with uranium(VI)

To isolate and investigate fungal strains from the flooding water, by using culture-dependent methods, a special medium was needed. Therefore, SDA medium contains a high amount of glucose and is commonly used for fungal cultures [146]. After incubation on solid agar plates containing SDA medium the appearance of single colonies could be observed. The hereby obtained isolates were transferred to fresh liquid medium and phylogenetic affiliations by ITS rDNA gene analysis were performed. Due to its ability to grow in the presence of high uranium concentration the isolated strain KS5, identified as *Rhodospiridium toruloides* (also known as *Rhodotorula toruloides*) [147], was chosen to further investigate its interaction with uranium(VI) and to identify dominant interaction mechanisms. The morphological and physiological characterizations displayed typical yeast cell properties, which were in accordance to the phylogenetic results. Interestingly, *R. toruloides* is an oleaginous yeast with great biotechnological potential, due to its ability to accumulate up to 70 % lipids based on the dry biomass and moreover, regarding to its carotenoid biosynthesis [148].

To investigate the physiological properties of this basidiomycete in more detail the utilization of different carbon sources was tested. In addition, to identify special capabilities as a result of the surrounding conditions present in the flooding water, a reference strain (DSM 10134 *R. toruloides*), was investigated. In agreement with previous studies the isolated strain KS5 as well as the reference strain DSM 10134 were able to utilize most of the tested carbon sources. However, both strains displayed less growth in the presence of galactose, which was also described before [148]. Despite the different conditions present at the isolating sites of the investigated strains, no drastic differences could be revealed. Only for the tested carbon source xylose differences were detectable. KS5 showed less growth, whereas DSM 10134 was not able to utilize the wood sugar. Several studies could demonstrate that the utilization of xylose to ethanol represents a useful process for the production of bioethanol performed by several yeast cells [149–151]. The question arises, why does the isolated strain KS5 exhibit the ability to metabolize xylose in contrast to the reference strain? One explanation could be the remainings of the former uranium mining industry. To underpin the shafts, wooden beams were used and, despite the ongoing flooding, they were left behind. As a consequence of the low TOC within the flooding water microorganisms have to develop adaption mechanisms in form of using alternative carbon sources. Thus, KS5 may have developed adaption mechanisms to survive at the present environmental conditions by using xylose as alternative carbon source. Nevertheless, further investigations should be performed to examine this hypothesis in detail, for instance by gene expression analyses to study possible involved genes responsible for xylose utilization using both strains.

Apart from the physiological investigations on the isolated strain KS5, its ability to tolerate and even to grow in the presence of uranium were tested. Additionally, the interaction of KS5 with uranium was investigated to examine its potential for bioremediation approaches. Therefore, different methods were used, like growth behavior in liquid medium supplemented with different uranium concentrations and tolerance tests on solid medium containing uranium and other selected heavy metals. To investigate the uranium tolerance in liquid medium growth rate and doubling time were examined, in combination with flow cytometry to observe cell viability. The results clearly demonstrate that the isolated yeast is able to tolerate high uranium concentrations and furthermore, is able to grow in its presence. The tolerance test on solid agar plates revealed a MIC for uranium of 6.0 mM, which correlates to a concentration of 1.4 g/L. Compared to the prevalent uranium concentration within the flooding water of 8 mg/L, KS5 is able to tolerate a 175-fold higher uranium concentration. This high MIC results were coherent with finding from previous investigations, indicating that the occurrence of heavy metal tolerant strains increases with the increase of heavy metal or radionuclide concentrations at contaminated sites [152, 153]. Next to the high tolerances of uranium, KS5 also displayed a high tolerance against chromium (MIC 5.0 mM). The ability to grow in the presence of high chromium contents was demonstrated by a former study on *Rhodospiridium* sp. isolated from a metallurgical waste site [154]. This

again represents the adaption ability of the examined yeast cell to tolerate high concentrations of heavy metals, as well as radionuclides. To investigate the adaption mechanism of KS5 further analysis using gene expression should be performed. Interestingly, the tolerance against several heavy metals and radionuclides is not the only useful ability which was encountered for *Rhodospiridium* sp.. Previous investigations could demonstrate its utilization of organic sulfur for the removal from fossil fuels to increase their quality, which is also known as biocleaning [155]. In conclusion, with these first results it could be shown that KS5 represents a useful microorganism in many biotechnological applications regarding remediation of contaminated sites, as well as biocleaning.

However, to investigate the suitability of KS5 in possible bioremediation approaches at uranium-contaminated sites, like the former uranium mine in Königstein, it was necessary to study its uranium removal and immobilization capacity. Therefore, tests were performed to examine the removal of uranium from solution. The results obtained from this thesis could demonstrate a uranium removal of 350 mgU/gdbm (90 %) at the lowest tested dry biomass, representing the maximum capacity to remove uranium from solution. Compared to other fungal strains, KS5 could display an impressive uranium removal capacity. Previous studies on *Pleurotus ostreatus* revealed a maximum biosorption capacity for uranium of about 20 mgU/gdbm [156]. However, the observed strains of *Rhizopus* showed a removal capacity between 180 and 260 mgU/gdbm, which represents a high amount of immobilized uranium as well [157]. Nevertheless, KS5 seems to exhibit a high capacity even for fungi. Compared with the bacterial strains *Arthrobacter* sp. and *Streptomyces longwoodensis* which display a uranium removal capacity of 600 and 440 mgU/gdbm [158, 159], gram-positive bacteria seem to be able to remove higher amounts. Nevertheless, it has to be considered, that the previous performed studies sometimes did not distinguish between immobilization of uranium by biosorption or bioaccumulation. However, the tremendous higher uranium removal by the bacterial strains could be a result of the high surface-to-volume ratio of bacterial cells. The large surface area of bacteria permits on the one hand the efficient uptake of nutrient and the release of metabolic waste products, and on the other hand the interaction with mobile metal fractions of the environment.

With the present results it could only be assumed that the isolated strain KS5 is able to tolerate high concentrations and remove high amounts of uranium. In order to investigate the underlying interaction mechanisms further investigations were performed, using TEM and EXAFS analyses. The obtained results clearly revealed the interaction mechanisms bioaccumulation, biosorption and biomineralization with uranium. In contrast to the examined bacterium *A. facilis*, where biosorption was identified as the dominating process, nearly the whole amount of uranium was removed by bioaccumulation into the cytoplasm and on the inner cytoplasm membrane of the yeast cells. In addition, uranium could be detected inside lipid granules. The findings obtained from this thesis revealed an interesting cascade of metabolic response employed by the cells of naturally occurring yeast cells to mitigate high uranium concentrations and to survive over

an extended period of uranium exposure. The results could show that uranium was localized within the cytoplasm as well as concentrated in granules corresponding to lipid bodies. This compartmentalization of uranium within lipid granules in *R. toruloides* during 48 h of uranium exposure made uranium less available to the cells and consequently minimize its toxicity. Previous studies with cyanobacteria could demonstrate similar findings [160]. Uranium was localized in polyphosphate inclusion bodies, like described above for *A. facilis*. These kind of detoxification mechanisms such as bioaccumulation and "self-protection" play a key role in the migration behavior of radionuclides within the environment. So far, the mechanisms behind the uranium uptake within the cells are not completely understood. Uranium displays no known biological function compared with other heavy metals, and previous studies suggested that uranium may be taken up into the cells as a consequence of increased membrane permeability, which could be caused by its toxicity [39]. However, the findings obtained from the experiments performed in this thesis could demonstrate an active uptake mechanism of uranium within the cytoplasm of the yeast cells. The results revealed different underlying interaction mechanisms at two tested temperatures. Thus, only at a temperature of 30 °C uranium could be detected within the cells of KS5. On the contrary, at 4 °C no uranium was localized inside the cells and furthermore, the removal capacity was drastically reduced. By applying two different temperatures at uranium removal experiments it could be demonstrated, that active mechanisms are involved and furthermore, the uranium uptake by the cells is metabolism-dependent.

To investigate the speciation of the immobilized uranium at a molecular level EXAFS analysis was performed. The resulting spectrum could verify the formation of mineral-like structures, possibly meta-autunite. In accordance to the needle-like structures within the cytoplasm of the yeast cells, detected using TEM analyses, uranium was mainly bound via protonated phosphoryl groups. The formation of meta-autunite minerals by microorganisms as a response of uranium exposure was mentioned by previous studies [161–163] and seems to be an effective detoxification mechanism against uranium. Furthermore, the uranium sequestration as insoluble biominerals represents a promising technique for *in situ* bioremediation approaches, particularly at sites where bioreduction could be unfeasible due to the possible risk of reoxidation [87]. The main advantage of the formation of biominerals like meta-autunite is that the end-products are reported to be insoluble and do not undergo redox changes. Thus, the microbial formation of minerals, probably meta-autunite, by the isolated strain KS5 could represent a promising result to develop new bioremediation approaches. KS5 represents a perfect candidate for further investigations in industrial scale applications, due to its characteristics to persist high uranium concentrations, to remove high amounts of uranium within a short time, and its ability to form insoluble uranium minerals.

4.3 Microbial uranium(VI) reduction - most suitable capability for bioremediation approaches?

The investigations on anaerobic microorganisms within the flooding water of the former uranium mine Königstein demonstrated, that they are able to reduce uranium(VI) to uranium(IV) in efficient manner. Despite the prevalent oxidizing conditions, the obtained results revealed that anaerobic microorganisms survive within the flooding water and are even metabolically active. By adding 10 mM glycerol as an energy source and electron donor, the microbial reduction was stimulated. The dissimilatory uranium(VI) reduction under anaerobic conditions was first described by Lovley *et al.* [69], who reported that *Geobacter metallireducens* and *Shewanella oneidensis* are able to conserve energy for growth via the reduction of uranium(VI). These results could show that some specialized bacteria are able to reduce uranium(VI), whereby the identified species were mainly related to IRB and SRB [69, 70, 73, 164]. However, the identified bacteria including *Clostridium* sp. and *Desulfovibrio vulgaris* also reduce uranium(VI), but are unable to conserve energy for their growth resulting from this transformation [165, 166]. Investigations on the anaerobic microbial diversity in the flooding water of the former uranium mine Königstein at the beginning of the controlled flooding process using culture-independent methods revealed in the presence of aSRB [167]. Additionally, after the ongoing flooding process (2014) culture-dependent approaches were applied to investigate the most probable number (MPN) of aSRB (after [168, 169]) resulting in a probable cell number of 0.21-1.5 MPN/mL of metabolically active heterotrophic aSRB [109]. The same investigations were performed two years later and could confirm the previous results but showed an increase in the most probable cell number to 4.8 MPN/mL. Due to the changing conditions in the underground resulting from the ongoing flooding process this slight aberration could be explained. Furthermore, the underground of the mine is not completely mixed and areas with anoxic conditions are quite likely. In such areas, aSRB could be enriched, explaining the minor increase in the cell number. In conclusion, different previous investigations identified the presence of aSRB and in addition their metabolically activity within the flooding water of the former uranium mine Königstein. For that reason, studies in this thesis were performed to investigate the possible microbial uranium(VI) reduction ability by anaerobic bacteria present within the flooding water.

First, to stimulate microbial uranium(VI) reduction it was necessary to figure out the most suitable carbon source and electron donor. At acid conditions, like predominating within the flooding water of the former uranium mine, the microbial reduction of uranium(VI) and other compounds can be affected by different factors. Thus, the proton concentration represents a major key player. Since the pH scale is a logarithmic scale, at pH 4 1.000 times more protons are present compared to pH 7. This causes a diffusion pressure towards the cell membrane of microbes, consequently much more protons diffuse through it. By active pumping processes, these protons have to be

pumped out of the cell, resulting in the destruction of the proton motive force. For that reason, at low pH microorganisms need to invest additional energy to maintain a higher internal pH. Consequently, less energy is available for growth [170, 171]. Only if this extra needed energy can be compensated, microbial growth can be achieved. Furthermore, carbon sources in form of organic acids can act inhibitory at acid conditions. The toxicity is dependent on their dissociation constants since different concentrations of the protonated form would be present at different pH values. As an example, the pK_a of lactic acid is 3.08, therefore at pH 3 half of the lactate would be present as protonated species. At acid conditions the undissociated organic acid form is able to diffuse into the cell. Due to the higher pH inside the cell, the acid dissociates, releases protons and consequently lowers the internal pH. Additionally, protons have to be pumped out and this again implies an energy loss. For that reason, previous studies on the isolation of aSRB within acidic environments failed using lactate as an electron donor, which represents the most common substrate at neutral conditions. Subsequent studies suggest, that non-ionic substrates like glycerol, hydrogen, alcohols or sugars are more convenient [169, 170, 172–174]. In conclusion, for the enrichment of acidophilic SRB and IRB within the flooding water the non-ionic electron donor glycerol was chosen.

To investigate a possible microbial reduction of uranium(VI) 10 mM glycerol were added directly to the flooding water, which was previously flushed with nitrogen to eliminate remaining oxygen. Afterwards, the flooding water samples were incubated for six weeks at 30 °C. By regular measurements a decrease of the redox potential could be detected from initially 670 mV to 230 mV. Theoretical calculations of the prevalent uranium speciation (Figure 4.1) demonstrated a change in the redox state from uranium(VI) to uranium(IV). However, by applying the geochemical calculations only the available thermodynamic constants (respective formation constants) of inorganic chemical parameters at 25 °C, like cations and anions, were considered [26], meaning, neither the addition of 10 mM glycerol nor the possible production of microbial metabolites were included, due to the lack of respective formation constants. In addition, no kinetic process was included. Consequently, the resulting diagram may not completely display the complex composition prevalent within the flooding water. However, the received diagram represents a simplified system to gain a rough estimation about the dominant uranium species after six weeks of incubation. In agreement with previous studies, the prevalent uranium species within the flooding water of the former uranium mine Königstein could be identified as the highly soluble uranium sulfate (UO_2SO_4 , Figure 4.1 square) [30]. Furthermore, the authors suggested, as a consequence of the ongoing flooding process, an increase of the pH value, due to dilution processes, and a decrease of the redox potential. Thus, the speciation of uranium would change to a solid uranium(IV) phase, either at pH values above 4.2 or at a redox potential below 300 mV [30].

The obvious decrease of the redox potential after six weeks would represent, in comparison with the theoretically calculations, a change in the redox state of uranium (Figure 4.1 circle). To verify the first results further methods, like XANES and UV-vis measurements, were used.

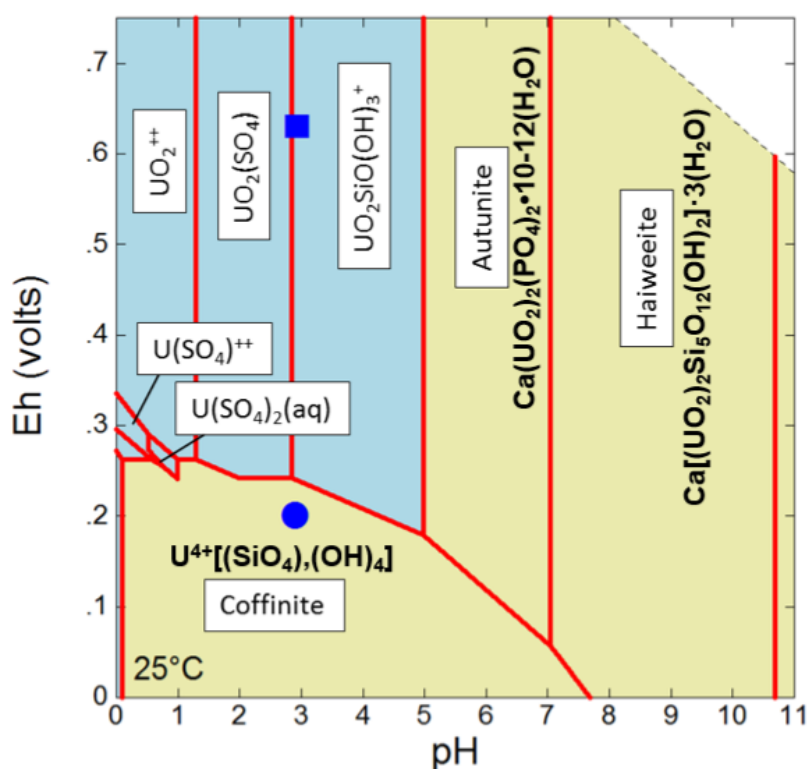


Figure 4.1: pH-Eh predominance area diagram for uranium at 25 °C using the mean elemental concentrations of the flooding water (see Table 1, Chapter 3.4). Theoretical geochemical calculation of the prevalent uranium species was performed using geochemical speciation code "Geochemist's Workbench" Version 8.0.8/ACT2. Yellow areas represent solid uranium phases whereas the blue areas designate aqueous species, the square represents the initially condition at 670 mM, the circle represents the conditions after 6 weeks at a redox potential of 230 mM.

In accordance with the geochemical calculations, a microbial uranium(VI) reduction was identified. XANES spectroscopy was used to determine the oxidation state of uranium and could display an increase of uranium(IV) after five weeks. After six weeks only uranium(IV) could be detected. However, uranium was not reduced within the control samples without microorganisms or glycerol (data not shown), indicating that the addition of 10 mM glycerol in combination with anaerobic conditions resulted in a complete reduction of uranium(VI) induced by active microorganisms prevalent within the flooding water. In agreement with previous studies, the microbial uranium(VI) reduction induced by adding an electron donor within environmental samples in laboratory experiments and also *in situ* was described and seems to be a promising state-of-the-art technique for applications in the field [175–180].

Apart from the determination of the oxidation state of uranium, also iron and sulfate were investigated. During six weeks of incubation, different anaerobic biogeochemical processes could be detected. According to the change of the redox potential, next to a uranium reduction also iron

was reduced. By measuring the Fe(II) concentration during six weeks of incubation a slight increase could be detected, thus Fe(III), prevalent within the flooding water, was microbial reduced. The kinetic investigations revealed the Fe(III) reduction took place within the first three weeks. Compared with the measured redox potential and the resulting standard redox potentials these results are in good agreement (Table 1). During the first weeks and relatively high redox potentials the microbial induced Fe(III) reduction is the dominating process. Afterwards, and by a drastically decrease of the redox potential the dominating redox reaction is the microbial uranium(VI) reduction. However, contrary to the results of the Fe(II) and uranium(VI) reduction no significant change of the sulfate concentration could be detected. In accordance to the standard redox potential (Table 1) a microbial sulfate reduction at 230 mV is rather unlikely. With the addition of 10 mM glycerol to the flooding water it is possible to induce a microbial uranium(VI) reduction. However, to understand the underlying processes in detail it is necessary to have knowledge about the microbial diversity responsible for the reduction of uranium. Therefore, DNA was isolated from samples incubated for six weeks and analyzed with regard to the phylogenetic composition of their microbial communities. The results clearly indicate the dominance of IRB which also explain the initial Fe(III) reduction followed by the uranium(VI) reduction. By 16S rDNA gene analysis more than 40 % of the bacteria were identified as IRB. In minor amounts (< 1%) also IOB were identified, belonging to genus *Acidithiobacillus*, which were found by previous studies within the flooding water. This IOB was detected using culture-independent as well as culture-dependent methods, indicating that these bacteria are metabolically active [109]. Furthermore, *Acidithiobacillus* represents an ubiquitous inhabitant of AMD sites, and is often the dominating group [182, 183]. As a consequence of the changing conditions after flushing with nitrogen and the addition of glycerol, IOB represent after six weeks incubation only a minority of the bacterial community. Nevertheless, the investigations of the bacterial diversity showed no occurrence of SRB, in accordance with the results of sulfate concentration during the six weeks of incubation. However, in contrast to that, by culture-dependent methods they could be detected [109]. In summary, by analytical investigations of iron and sulfate reduction, together with molecular methods of the bacterial diversity, it could be assumed that the microbial uranium(VI) reduction within the flooding water was mediated only by the activity of IRB.

The reasons for this non-successful stimulation and detection of SRB could be the not suitable reducing conditions (high redox potential), thus SRB were not metabolic active and consequently, the cell number was too low for detection. For the culture-dependent determination of SRB

Table 1: Caption

	Chemical equation	Standard redox potential (mV)
Iron	$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^{-} \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$	+770 [181]
Uranium	$\text{U}_2^{2+} + 2 \text{e}^{-} \longrightarrow \text{UO}_2$	-42 to +86 [88]
Sulfate	$\text{SO}_4^{2-} + 8 \text{e}^{-} + 10 \text{H}^{+} \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{H}_2\text{O}$	-220 [88]

within the flooding water a special designed medium was used [109]. However, in this study only glycerol was added to stimulate anaerobic reducing bacteria. Furthermore, to achieve reducing conditions (the redox potential of the medium must be below -150 mV) in the prepared medium reductants like sodium sulfide or sodium thioglycolate, with sodium ascorbate, were added [184]. During the uranium(VI) reduction experiments, performed in this study, no additional reductants were added to avoid uranium(VI) reduction by these substances. The presence of metals as cofactors for several enzymes of SRB is also an important factor. For instance, nickel and selenium are required for their hydrogenase activity. In addition, iron and calcium represent essential elements for microbial metal reduction [184]. Nevertheless, the missing of essential metals may not be the reason for the non-successful stimulation of SRB, due to the fact that the flooding water contains high concentrations of the mentioned metals. Although, previous studies demonstrated that glycerol represents a suitable electron donor and carbon source for the enrichment of SRB under acidic conditions, other substrates should be taken into consideration. Another explanation could be the added concentration of glycerol (10 mM), which could be the limiting factor. Despite previous tests (data not shown), which demonstrated high levels of glycerol after six weeks of incubation time, the concentration could be too low after the metabolic activity and uranium(VI) reduction of IRB. On the contrary, the chosen glycerol concentration could also be too high and could act inhibiting for the metabolic activity of SRB. Also, the incubation time or chosen temperature could be a limiting factor for SRB. So far, the non-successful stimulation of SRB within the flooding water during uranium(VI) reduction experiments seems to be unclear. However, also without the presence of SRB the microbial mediated uranium(VI) reduction by IRB was successful.

In conclusion, results obtained by the use of geochemical methods and molecular biology demonstrate that the indigenous microorganisms within the flooding water of the former uranium mine Königstein display the ability to utilize glycerol as an electron donor and uranium(VI) as an electron acceptor. The addition of glycerol stimulates the microbial reduction capability of uranium(VI) directly, by serving as electron donor for both Fe(III) and uranium(VI) reduction. The microbial induced uranium(VI) reduction is therefore the result of the metabolic activity of IRB. Based on the successful stimulation of microbial uranium(VI) reduction in laboratory scale experiments, a pilot plant for industrial scale applications was designed, to verify the applicability to use this bioremediation approach directly on site of the former uranium mine Königstein. For this purpose, 100 L flooding water were used and treated in the same way like the 1 L samples. Similar to the laboratory scale experiments, samples were examined with regard to a possible uranium(VI) reduction. An online measurement system was applied to obtain real-time information about pH value, redox potential and temperature. Moreover, Fe(II) and sulfate concentration were measured and with molecular genetic methods the microbial diversity was determined after six weeks. Two independent runs of the pilot plant revealed in nearly similar results. During the incubation time of six weeks a distinct decrease of the redox potential was

detectable. In comparison to the laboratory scale experiments (1 L), a more drastic decrease to about 100 mV was measured, which implies a difference of more than 130 mV. In addition, UV-vis measurements were performed to obtain detailed information about the oxidation state of uranium present within the flooding water. A distinct uranium(IV) concentration could be detected after 21 days of incubation. Compared to the experiments performed in laboratory scale the microbial uranium(VI) reduction took place earlier. In laboratory scale experiments, uranium(IV) could be measured after 35 days, by meaning two weeks later compared to the pilot plant. In summary, in consideration of the redox potential and the oxidation state of uranium, reducing conditions were faster adjusted in the 100 L approach of the pilot plant.

Furthermore, similar to the laboratory scale experiments the Fe(II) and sulfate concentration was investigated. However, the first run could not detect a distinct Fe(II) reduction, due to a possible oxygen invasion during the first weeks, the second run confirmed the results from the previous experiments in laboratory scale. Despite these non-successful determination of Fe(II) by analytical methods, pictures of the flooding water, incubated in the pilot plant, revealed an obvious change of the color during six weeks of incubation time (Figure A1). After filling and flushing with N₂ the color of the water turned from colorless to brownish-orange (Figure A1, 3 h), which indicates a oxidation of Fe(II) to insoluble Fe(III) participates. Starting from day 7 the color disappeared and the flooding water displayed colorless like initially. In conclusion to these observations, during the first three weeks a slight but significant increase of Fe(II) could be analytical detected at the second run of the pilot plant. Moreover, in contrast to the previous studies with 1 L flooding water, a slight decrease of sulfate was observable during the last days of the incubation, indicating a microbial sulfate reduction. In conclusion, during the first days of incubation a slight but distinct Fe(III) to Fe(II) reduction was demonstrated, followed by uranium(VI) reduction induced at day 21 and a sulfate reduction after day 30 (Figure 4.2). With the obtained results from this study, it is possible to understand the synergy of the underlying microbial reduction processes and furthermore, to predict the fate of metals, especially uranium, in the environment under reducing conditions. As a consequence of the availability of different metals and ions within the flooding water of the former uranium mine in Königstein, it is not surprising that several reactions will take place simultaneously. However, for possible bioremediation approaches this obtained knowledge could help to predict processes more specifically and furthermore, to demonstrate that other supportive redox reactions might take place, resulting in a decrease of other soluble metals and increase of pH values.

In addition, the bacterial diversity was investigated using 16S rDNA gene analysis. However, it was not possible to obtain enough sequence information to get an entire overview about the bacterial diversity after six weeks within the approach of the pilot plant. Only ten sequences could be obtained and were compared to the NCBI database. The majority of these sequences were identified as *A. ferrooxidans* (60 %), followed by *Desulfovibrio* spp. and *Acidocella* spp.. Two sequences could be associated with the phylum Firmicutes. Despite only a few sequences

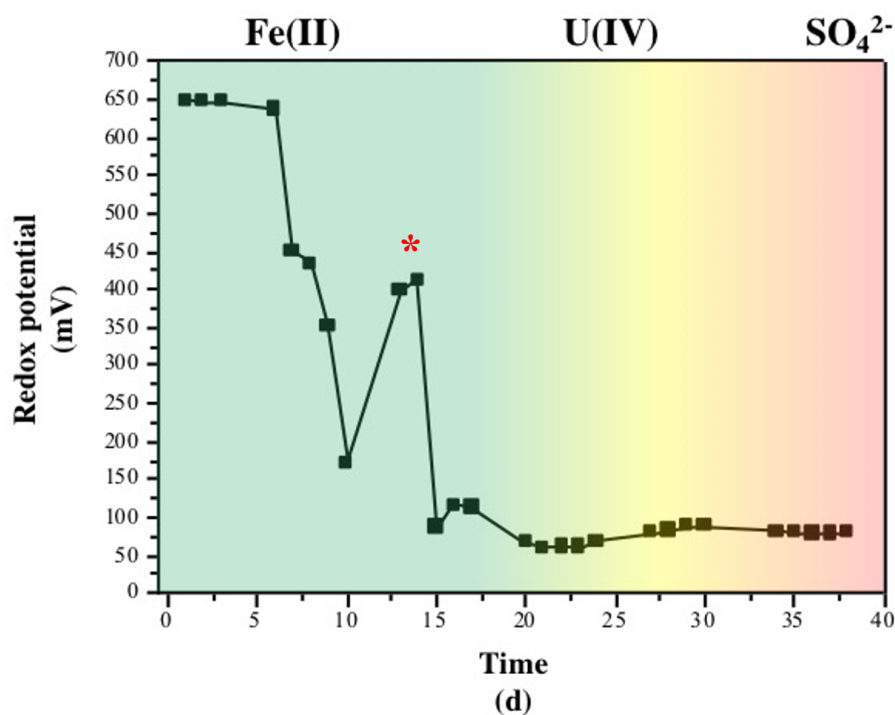


Figure 4.2: Measured redox potential of the pilot plant during six weeks of incubation. Colored areas display the microbial redox reaction taken place while incubation, green - iron reduction, yellow - uranium reduction and red - sulfate reduction. Red star indicates a distinct increase of the redox potential, possibly caused by an oxygen invasion.

could be obtained, all were associated with either IRB/IOB or SRB, which is in accordance to the results to the laboratory scale experiments.

Previous studies demonstrated the ability of *A. ferrooxidans* to reduce metals [185]. These bacteria are able under aerobic conditions to oxidize elemental sulphur to sulphuric acid [186]. Moreover, *A. ferrooxidans* could be identified as a major part of the consortium found at AMD sites and it could be shown that these species are tolerant to uranium [187, 188]. In addition, *A. ferrooxidans* can grow under anaerobic conditions using Fe(III) as final acceptor and sulphur as substrate [186]. More than a half of the identified sequences could be associated with this species, which is also known to reduce uranium(VI) [186]. Thus, these bacteria could be one of the species which are responsible for the detected microbial Fe(II) and uranium(VI) reduction. Interestingly, previous investigations of the microbial diversity within the flooding water identified *A. ferrooxidans* as a dominating group, which is in good accordance of these findings [109]. In addition, the heterotrophic *Acidocella* spp. represent IRB, which are known to be extremely acidophilic. A well-studied strain of *A. aromatica* (PFBC) is able to catalyze Fe(III) reduction under micro-aerobic and anaerobic conditions [189]. Furthermore, experiments demonstrated the ability of chromium reduction and immobilization by *A. aromatica* [190]. Experiments performed to investigate the metal resistance of *Acidocella* strains revealed high tolerances of

zinc, nickel, copper, and cadmium [191]. In comparison with previous studies on the bacterial diversity of the flooding water in Königstein using culture-independent and culture-dependent methods, the species of *Acidocella* spp. was detected as well [109]. Until now, no uranium interaction mechanisms of *Acidocella* spp. are described. However, with this study it was shown that this species could be involved in microbial uranium(VI) reduction within the flooding water. Further investigations should be performed to examine the possible uranium interaction mechanisms of the *Acidocella* species occurring in the flooding water of the former uranium mining site Königstein. In addition, the identified species *Desulfovibrio* was described by Lovley and Phillips [70] for its uranium(VI) reduction capability. The authors highlighted that the enzymatically uranium(VI) reduction was mediated by the cytochrome c_3 . Moreover, the enzyme could be successfully cloned and expressed in two other strains, suggesting that the ability to reduce uranium(VI) could be genetically combined with other metabolic useful properties, like the ability to degrade organic contaminants and denitrification [192]. The previously obtained results demonstrated, that *Desulfovibrio* species are able to reduce uranium(VI) under anaerobic conditions and thus, they could be responsible for the microbial mediated uranium(VI) reduction of flooding water of the pilot plant. Two sequences could be identified with high similarity to the phylum of Firmicutes. By investigations using culture-dependent methods, the species *Desulfosporosinus* could be enriched from the flooding water samples. A well-defined medium for acidophilic SRB [168] was used and incubated with several dilutions of the flooding water (Figure A2). Microscopically investigations displayed bacterial cells containing spores (Figure A3). Previous investigations using similar conditions and 16S rDNA analyses demonstrated the presence of the spore-forming bacterium *D. acidophilus* [109]. This bacterium represents an obligate anaerobic, spore-forming, acidophilic SRB, which was isolated previously from an AMD site [169]. In addition, the SRB bacterium *D. reducens* was described for its ability to reduce metals, like Mn(IV), Fe(III), and Cr(VI). Even uranium(VI) was reduced to uranium(IV) [193]. Thus, the previously detected and described bacterium *Desulfosporosinus* spp. could be, within a consortium of several bacteria, responsible for the microbial uranium(VI) reduction within the flooding water samples of the pilot plant approaches. Despite the differences of the microbial diversity detected within the laboratory scale experiments and the pilot plant approaches, mainly MRB were identified. The obtained results indicate a combined uranium(VI) reduction, mediated by several species, which seems to be reasonable due to the relative high microbial diversity within the flooding water of the former uranium mine.

In conclusion, the results from the pilot plant experiments confirm the microbial reduction of uranium(VI) under anoxic conditions, only by adding of 10 mM glycerol, in up-scaling setups. These findings suggest the applicability of microbial uranium(VI) reduction at the site of the former uranium mine Königstein as a preferred bioremediation approach. Due to the usage of the cost-effective electron donor glycerol and the fast bioreduction process in just six weeks, the microbial-mediated uranium(VI) reduction represents a suitable alternative, which could replace

the traditional waste water treatment. Nevertheless, further experiments should be performed to support this hypothesis and to repeat the experiments in industrial scale applications (> 100 L). In addition, the microbial diversity should be investigated in more detail, to obtain a complete overview of the microorganism, responsible for the uranium(VI) reduction.

4.4 Possible applications for *in situ* bioremediation at the former uranium mining site Königstein

Resulting from the obtained findings within this thesis, different options could be possible to remediate the former uranium mining site by using microorganisms. To select the most suitable process it has to be determined which approach provides a low-cost treatment, at a high efficiency and minimizing the volume of chemical and/or biological sludge to be handled [104].

The bacterial strain *A. facilis* and the yeast *R. toruloides* were able to remove high amounts of uranium by the two identified interaction mechanisms, biosorption and bioaccumulation. *A. facilis* was identified by culture-independent, DNA-based, methods. However, the investigated strain was not directly isolated from the flooding water. Therefore, the bacterial cells have to be pre-cultured in large scale procedures to obtain high amounts of biomass. In additional steps the cells have to be separated from the growth medium and transferred to the flooding water to remove the soluble uranium. Thus, the use of *A. facilis* for *in situ* bioremediation could display further challenges, including additional facilities for the growth of the bacterial cells.

Besides, the major interaction mechanism of *A. facilis* with uranium is biosorption. Most researchers define biosorption as a passive and metabolically-independent process [103, 105, 194] which can be performed by dead biomass or cell fragments with the advantages of easy and safe handling and preparation. However, biosorption can also be performed by living cells as a passive uptake or metabolically-independent adsorption via surface complexation onto cell walls or outer membranes [105, 194]. The biosorption of metals and radionuclides by microorganisms can be affected by different factors, like solution pH, ionic strength, initial pollutant concentration, other pollutants or competitive ions, the biosorbent itself, temperature and the speed of agitation. The most important factor affecting biosorption represents the chemistry of the biosorbents themselves and their availability of metal-binding sites, the activity of functional groups and the competition with coexisting ions within the solution [34]. For instance, an increase of the surrounding pH value enhances the removal of cationic metals, but reduces the removal of anionic metals [104]. Among the biotechnological applicability, a number of proposed biosorption processes have been patented for commercial application. Fomina *et al.*, 2014 [104] published a full list of patents related to biosorption from 1973 till 2011. However, despite the numerous results which could be obtained over decades of research, most biosorption processes are still at the laboratory scale. Reasons for this could be a poor understanding of the underlying mechanisms,

the kinetics and thermodynamics of the process [104]. On the other hand, previous studies suggested an insufficient specificity and stability of biosorbents, which cause the little progress in industrial scale applications [102]. In conclusion, the potential use of *A. facilis* for bioremediation approaches at the former uranium mining site Königstein is rather low and will likely be used only as supporting process in remediation application in the future, as a consequence of the lacking knowledge of the underlying mechanisms of biosorption of metals and radionuclides on microbial surfaces and their potential stability.

Due to the mentioned uncertainties, many established bioremediation approaches are based on active processes, conducted by living cells. Compared to the direct reduction of uranium, which would lead to an immobilization, the process of biosorption is subsequently faster. However, the uranium-polluted flooding water is poor in biomass concentration, due to the high toxicity of uranium and low TOC content. Therefore, biosorption alone may not be sufficient to bioremediate uranium from polluted sites, unless the biomass content is increased [111].

R. toruloides (KS5), in contrast, was directly isolated and experiments displayed that this strain is able to grow directly within the flooding water (data not shown) only by adding a carbon source in the form of sugar. As a consequence, no additional industrial processing with special growth media or growth reactors would be necessary to obtain large amounts of biomass for the removal of uranium directly from the flooding water. Furthermore, the uranium tolerance test displayed that the yeast cells are resistant to the prevalent uranium concentrations, and could tolerate even higher uranium concentrations. The uranium removal by KS5 cells is fast and efficient, nearly the whole amount of soluble uranium in solutions was immobilized during 48 h incubation. In contrast to the bacterial cells of *A. facilis*, the predominant interaction mechanism of the yeast cells with uranium is bioaccumulation, the active uptake within the cells. Also the removal efficiency of KS5 compared to the bacterial cells of *A. facilis* is tremendously higher. As described above, preferentially used bioremediation approaches are based on active interaction mechanisms. Thus, the isolated strain KS5 could represent a candidate to investigate its applicability in larger scale experiments, like pilot plants. Furthermore, uranium is immobilized as minerals associated with phosphate, which exhibit a low solubility and remain stable under changing conditions. Further experiments should be performed such as growing the yeast cells directly within the flooding water and examine its uranium removal ability at the prevalent conditions.

However, the stimulation of anaerobic microorganisms to reduce aqueous uranium(VI) into insoluble minerals *in situ* may provide a cost-effective and non-invasive alternative to remediate radionuclide-contaminated sites. The employment of bioreduction, in particular, appears promising, with the suitable applicability in the field [87]. No additional technical applications to separate the uranium-bearing microorganisms from solution would be necessary and furthermore, the elaborated pump-and-treat technique could be discontinued. The idea was to stimulate microbial growth and activity directly within the flooding water and to use the underground itself as sediment basin for metal sludge formed by precipitation of uranium as well as sulfide and other

metals. This *in situ* treatment using anaerobic microorganisms is a possible low-cost and low maintenance concept for acid mine water processing. Thus, costs for sludge handling could be minimized or eliminated and no additional heavy metal polluted waste would occur. Since the reduction of sulfate could be detected during the last days of incubation time, a longer incubation would possibly lead to a complete sulfate reduction and consequently an increase of the pH value. Thus the high sulfate concentration could be removed from the AMD flooding water with a concomitant increase of the acid pH [195], consequently less chemicals would be necessary for the water treatment at the site of the former uranium mine in Königstein.

The results obtained in this thesis, indicate that the isolated strain KS5, but also anaerobic microorganisms indigenous within the flooding water of the former uranium mine Königstein, may have a crucial role in the bioremediation of uranium at this investigated site and should be taken into consideration for alternative strategies. However, the investigations on the anaerobic microbial uranium(VI) reduction could be transferred to industrial scale applications, and thus represent the most suitable and best characterized approach concerning applicability for *in situ* bioremediation processes at the site of the former uranium mine Königstein.

4.5 Conclusion and scientific relevance

This thesis provides new insights about the interaction of indigenous microorganisms from uranium-contaminated environments. It was shown that the fate and transport behavior of uranium within the environment and at the former uranium mining site strongly depends on the presence and metabolic activity of natural occurring microorganisms. Furthermore, the results demonstrate that the investigated strains *A. facilis* and *R. toruloides* are able to remove high amounts of uranium from surrounding solutions by passive biosorption and active bioaccumulation. In addition, a correlation between microorganisms isolated from heavy metals polluted sites, and high tolerances against them were highlighted. With the obtained results from experiments with anaerobic microorganisms and their potential of uranium(VI) reduction, a pilot plant was developed to verify the previous findings. The results from laboratory scale experiments were successfully transferred and simultaneously confirmed by experiments in larger scale applications, indicating that with the provided knowledge *in situ* bioremediation approaches could be applicable in the future. By comparison of the possible advantages and disadvantages of the investigated interaction mechanisms, it was shown that bioremediation using anaerobic MRB for the reduction of uranium(VI) seems to be the most suitable method.

With this thesis, strategies are presented for possible alternative concepts which could support the conventional and elaborated water treatment of former uranium mining sites, or in future steps to replace them. However, it has to be taken into consideration to prevent or minimize the generation of uranium-contaminated AMD sites at the beginning. By meaning, when there

is the risk of AMD generation, the first option should be avoiding the formation itself [170]. Johnson and Hallberg outlined in their review [196], "prevention is better than the cure", and described approaches, which could be used to prevent or minimize the generation of mine drainage waters. Summarizing, as long as the activity of acidophilic microorganisms increases the formation of AMD sites, technologies should be used, to avoid either oxygen, water or both from contacting the ore, which could elude their microbial activity [197–199]. While metals are mined by conventional methods, which result in the formation of acidic waters mobilizing heavy metals like uranium, extensive waste water treatment processes have to be performed. Therefore, bioremediation represents a promising problem-solving approach.

The obtained results from this thesis were published in international scientific journals and presented at international conferences. Therefore, they are available to a broad community interested in alternative approaches for the remediation of heavy metal polluted sites, like the former uranium mine Königstein. On that account, these findings should be taken into consideration for future remediation applications.

5 Outlook

Although the revealed results could give detailed and unique insights about the interaction mechanisms of the investigated microbial strains with uranium(VI), some open questions still remain. Until now, the uptake process of uranium inside the cells is unknown. With the obtained results from this thesis it could be demonstrated, that the bioaccumulation of uranium seems to be an active mechanism, by meaning it is dependent on the microbial metabolisms. Nevertheless, transporters for uranium-uptake are unidentified. For that reason, investigation should be performed to identify possible transport-proteins which may be responsible for the uptake of uranium. In addition, gene expression analyses could be used to gain information about possibly involved genes. Therefore, this identified genes could be transformed and expressed in reference strains or other microorganisms to investigate the resulting uranium removal efficiency. Consequently, such genetically modified microbes could be used to understand the uptake mechanism of uranium on the one hand, and they could be used for bioremediation approaches at other contaminated sites on the other hand. However, the use of genetically modified microorganisms within the environment is difficult, thus indigenous strains should be preferred. The strain KS5 (*R. toruloides*), which was well described within this study, should be examined in further experiments using directly the flooding water. In further steps the obtained results from laboratory scale could be transferred to industrial scale applications to design a pilot plant, placed directly on site, possibly connected with the borehole.

Moreover, in these studies only a few microorganisms were investigated regarding their interactions with uranium(VI). With *A. facilis* and *R. toruloides* exclusively pure cultures of these strains were used for the experiments. However, in nature microbes occur in communities composed of a large variety of different bacteria, eukaryotes and archaea. Thus, it seems to be necessary to perform microcosm experiments using environmental samples to achieve similar conditions to those found within the flooding water. By using anaerobic microorganisms for uranium(VI) reduction directly within the flooding water these conditions were almost achieved. Nevertheless, working under oxygen-free conditions needs further treatment of the water and a special design of reactors or pilot plants.

The microbial community after anaerobic incubation over six weeks was analyzed using 16S rDNA gene analyses of two pooled samples. Thus, not the complete diversity, including bacteria, archaea and eukarya, could be displayed. Consequently, further investigation should be performed to obtain a detailed and closer view of the microbial community within the flooding

water samples. In addition, the same investigations should be implemented using samples from the pilot plant to compare both experimental approaches in detail. Thus, the microbial diversity could be compared to obtain results about possible differences between the two different approaches, for instance changes due to the up-scaling process. Furthermore, to gain a detailed process understanding a quantification of the microbial biodiversity should be performed, to know which microorganisms are mainly responsible for the microbial uranium(VI) reduction. Therefore, 16S/18S rRNA gene analyses in combination with meta-transcriptome analyses could be used to identify the dominating metabolic active microorganisms. Furthermore, meta-proteomic analyses could be performed to identify proteins involved in uranium stress response to clarify the underlying mechanisms of the microbial uranium(VI) reduction.

Glycerol represents a cost-effective and non-toxic polyhydric alcohol, which is industrially used in food- and pharmaceutical industry. Nevertheless, other similar carbon sources should be taken into consideration to stimulate the microbial uranium(VI) reduction. Therefore, further experiments with alternative carbon sources, like ethanol and sugar derivatives, should be performed to investigate their efficiency in stimulation of microorganisms responsible for metal-/radionuclide reduction.

Another important area for further investigations is the determination of the stability or longevity of the bio-reduced uranium(IV) complexes/minerals, particular if the environmental conditions changes. For instance, re-oxidation processes of uranium(IV) are well described and known to be catalyzed by oxygen, nitrate, Fe(III) minerals, oxides, organic ligands and bicarbonate [145, 200–208]. At the moment only half of the underground mine is flooded, meaning there are large surfaces contacting the water with the surrounding atmosphere. Consequently, within the flooded underground the prevalent redox processes are still oxidizing and oxygen could re-oxidize the microbial reduced uranium(IV). Previous studies using glycerol phosphate as electron donor could demonstrate, that uranium(VI) was successfully reduced by microorganisms and precipitated as uranium phosphate minerals [209]. The precipitation of phosphate minerals is a promising alternative due to the high stability to oxidative changes and their longevity, which has been demonstrated in natural analog sites [49, 210–212]. Therefore, it could be promising to stimulate the microbial reduction of uranium(VI) within the flooding water by adding glycerol phosphate, which could enhance, under the prevalent conditions, the stability of the reduced uranium(IV). With XANES spectroscopy it was possible to determine the oxidation state of uranium within the samples, after stimulation of microbial activity by adding 10 mM glycerol. However, due to the low content of uranium in the natural samples, it was not possible to identify the speciation of the reduced uranium(IV). Further investigation on the formed uranium(IV) species should be performed to understand the microbial reduction of uranium(VI) on molecular level. In addition, the information about the species of uranium(IV) could help to predict the stability of the formed uranium(IV) complexes and to estimate their stability within the underground of the former uranium mine.

Bibliography

- [1] J. F. Ahearne, „*Radioactive Waste: The Size of the Problem*“, Phys. Today **50**, 24 (1997).
- [2] M. Hagen and A. T. Jakubick, „*Returning the WISMUT legacy to productive use*“, in *Uranium in the Environment - Mining Impact and Consequences*, P. 11–26 (2006).
- [3] Wismut GmbH, „<http://www.wismut.de>“ (25 Oct 2017).
- [4] M. Paul, E. Kreyßig, J. Meyer and U. Sporberr, „*Remediation effects of the WISMUT project to surface waters in the Elbe watershed: An overview*“, P. 435–450, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2008).
- [5] Wismut GmbH, „*Sonderausgabe 25 Jahre Wismut GmbH*“, in *Dialog - Mitarbeiterzeitschrift der Wismut GmbH*, P. 10–17, 90. Ed. (2016).
- [6] S. Eulenberger, U. Jenk and M. Paul, in *Mine Water and Circular Economy IMWA 2017*, Ed. C. Wolkersdorfer, L. Sartz, M. Sillanpää and A. Häkkinen, P. 296–302, Lappeenranta, Finland (2017).
- [7] J. Schreyer and U. Zimmermann, in *Uranium, Mining and Hydrogeology II*, Ed. B. Merkel and C. Helling. Sven von Loga, Köln (1998).
- [8] U. Jenk, K. Nindel and U. Zimmermann, in *Uranium, Mining and Hydrogeology*, Ed. B. J. Merkel and A. Hasche-Berger, P. 431–436. Springer Verlag (2008).
- [9] J. Schreyer, U. Zimmermann and U. Jenk, in *Uranium in the Aquatic Environment*, Ed. B. J. Merkel, B. Planer-Friedrich and C. Wolkersdorfer, P. 755–762. Springer (2002).
- [10] M. Birke, U. Rauch, H. Lorenz and R. Kringel, „*Distribution of uranium in German bottled and tap water*“, J. Geochem. Explor. **107**, 272 (2010).
- [11] A. Akcil and S. Koldas, „*Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies*“, Journal of Cleaner Production **14**, 1139 (2006).
- [12] A. Peppas, K. Komnitsas and I. Halikia, „*Use of organic covers for acid mine drainage control*“, Miner. Eng. **13**, 563 (2000).
- [13] A. Azapagic, „*Developing a framework for sustainable development indicators for the mining and minerals industry*“, Journal of Cleaner Production **12**, 639 (2004).
- [14] J. R. Lloyd, D. R. Lovley and L. E. Macaskie, „*Biotechnological Application of Metal-reducing Microorganisms*“, Adv. Appl. Microbiol. **53**, 85 (2003).
- [15] U. Jenk, K. Nindel, C. Wedekind, M. Frenzel, R. Uebe, S. Eulenberger, T. Metschies, U. Terra and U. Gross, „*Bericht zur Flutung der Grube Königstein, Teilbereich I – 140 m NN - report number WIS K 358 (2014) Wismut GmbH*“, Technical report, Wismut GmbH (2014).
- [16] M. Paul, J. Meyer, U. Jenk, D. Baacke, A. Schramm and T. Metschies, „*Mine Flooding and Water Management at Underground Uranium Mines two Decades after Decommissioning*“, P. 1081–1087, Golden, Colorado, USA (2013).
- [17] D. Uhlmann and W. Horn, „*Hydrobiologie der Binnengewässer*“, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (2001).
- [18] C. Normand, G. Pfennig, J. Magill and R. Dreher, „*Mapping the nuclear landscape: 50 years of the Karlsruher Nuklidkarte*“, J Radioanal Nucl Ch **282**, 395 (2009).

- [19] A. Holleman and E. Wiberg, „*Lehrbuch der Anorganischen Chemie*“, Vol. 53 (1995).
- [20] R. D. Dos Reis, L. S. Veiga, C. A. Escanhoela, J. C. Lang, Y. Joly, F. G. Gandra, D. Haskel and N. M. Souza-Neto, „*Unraveling 5f-6d hybridization in uranium compounds via spin-resolved L-edge spectroscopy*“, *Nat Commun* **8** (2017).
- [21] N. Mitchell, D. Pérez-Sánchez and M. C. Thorne, „*A review of the behaviour of U-238 series radionuclides in soils and plants*“, *J. Radiol. Prot.* **33**, R17 (2013).
- [22] A. F. Holleman and E. Wiberg, „*Lehrbuch der Anorganischen Chemie*“, Vol. 102, Walter de Gruyter Berlin, New York (1995).
- [23] J. L. Domingo, „*Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: A review*“, *Adv Exp Med Biol* **15**, 603 (2001).
- [24] D. R. Lide, „*Uranium*“, CRC Press, 74. Ed. (1994).
- [25] M. R. MacDonald, M. E. Fieser, J. E. Bates, J. W. Ziller, F. Furche and W. J. Evans, „*Identification of the +2 oxidation state for uranium in a crystalline molecular complex, [K(2.2.2-Cryptand)][(C₅H₄SiMe₃)₃U]*“, *J Am Chem Soc* **135**, 13310 (2013).
- [26] R. Guillaumont, F. Mompean and O. N. E. Agency, „*Update on the Chemical Thermodynamics of Uranium, Neptunium, Plutonium, Americium and Technetium*“, Vol. 5 of *Chemical thermodynamics*, Elsevier (2003).
- [27] I. Grenthe, J. Fuger, R. J. Lemire, A. B. Muller, H. Wanner and I. Forest, „*Chemical Thermodynamics of Uranium*“, OECD-NEA **1**, 715 (1992).
- [28] G. R. Choppin and B. E. Stout, „*Actinide behavior in natural waters*“, *Sci. Total Environ.* **83**, 203 (1989).
- [29] S. J. Markich, „*Uranium Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems: An Overview*“, *Sci. World J.* **2**, 707 (2002).
- [30] T. Arnold, N. Baumann, E. Krawczyk-Bärsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk and S. Weiß, „*Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment*“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 2200 (2011).
- [31] R. Bencheikh-Latmani, J. O. Leckie and J. R. Bargar, „*Fate of uranyl in a quaternary system composed of uranyl, citrate, goethite, and Pseudomonas fluorescens*“, *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3555 (2003).
- [32] T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, M. Samadfam, N. Kozai, K. Yubuta, T. Mitsugashira, T. Kasama and A. J. Francis, „*Interactions of uranium with bacteria and kaolinite clay*“, *Chem. Geol.* **220**, 237 (2005).
- [33] S. G. Walker, C. A. Flemming, F. G. Ferris, T. J. Beveridge and G. W. Bailey, „*Physicochemical interaction of Escherichia coli cell envelopes and Bacillus subtilis cell walls with two clays and ability of the composite to immobilize heavy metals from solution*“, *Appl Environ Microb* **55**, 2976 (1989).
- [34] K. Vijayaraghavan and Y. S. Yun, „*Bacterial biosorbents and biosorption*“, *Biotechnol. Adv.* **26**, 266 (2008).
- [35] F. Veglio' and F. Beolchini, „*Removal of metals by biosorption: a review*“, *Hydrometallurgy* **44**, 301 (1997).
- [36] J. R. Lloyd and L. E. Macaskie, „*Bioremediation of Radionuclide-Containing Wastewaters*“, in *Environmental Microbe-Metal Interactions*, P. 277–327 (2000).
- [37] M. L. Merroun, J. Raff, A. Rossberg, C. Hennig, T. Reich and S. Selenska-Pobell, „*Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of Bacillus sphaericus JG-A12*“, *Appl Environ Microb* **71**, 5532 (2005).

- [38] J. R. Lloyd and L. E. Macaskie, „Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions“, in *Radioactivity in the Environment*, Ed. M. J. Keith-Roach and F. R. Livens, Vol. 2, P. 313–342, Elsevier Science Ltd, Oxford, UK (2002).
- [39] Suzuki, Y. and Banfield, J.F., „*Geomicrobiology of uranium*“, in *Reviews in Mineralogy*, Ed. R. Burns, P., Finch, P. 393–432, Mineralogical Society of America, Washington, DC (1999).
- [40] Y. Suzuki and J. F. Banfield, „Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site“, *Geomicrobiol. J.* **21**, 113 (2004).
- [41] Roomans, Godfried M., „Localization of divalent cations in phosphate-rich cytoplasmic granules in yeast“, *Physiol. Plant.* **48**, 47 (1980).
- [42] A. Francis, „Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes“, *J Alloy Compd* **271-273**, 78 (1998).
- [43] E. Dassa, M. Cahu, B. Desjoyaux-Cherel and P. L. Boquet, „The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*. Physiological and biochemical study“, *J. Biol. Chem.* **257**, 6669 (1982).
- [44] N. Kurosawa, K. Fukuda, Y. H. Itoh and T. Horiuchi, „Partial purification and characterization of thermostable acid phosphatase from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*“, *Curr Microbiol* **40**, 57 (2000).
- [45] R. K. Porschen and E. H. Spaulding, „Phosphatase activity of anaerobic organisms.“, *Appl Microbiol* **27**, 744 (1974).
- [46] N. Renninger, R. Knopp, H. Nitsche, D. S. Clark and J. D. Keasling, „Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism“, *Appl Environ Microb* **70**, 7404 (2004).
- [47] M. J. Beazley, R. J. Martinez, P. A. Sobecky, S. M. Webb and M. TAILLEFERT, „Uranium biomineralization as a result of bacterial phosphatase activity: Insights from bacterial isolates from a contaminated subsurface“, *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5701 (2007).
- [48] L. E. Macaskie, D. T. Goddard, K. M. Bonthrone and P. Yong, „Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter sp.*: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation“, *Microbiology* **146**, 1855 (2000).
- [49] J. L. Jerden and A. K. Sinha, „Phosphate based immobilization of uranium in an oxidizing bedrock aquifer“, *Appl. Geochem.* **18**, 823 (2003).
- [50] A. Geissler, M. Merroun, G. Geipel, H. Reuther and S. Selenska-Pobell, „Biogeochemical changes induced in uranium mining waste pile samples by uranyl nitrate treatments under anaerobic conditions“, *Geobiology* **7**, 282 (2009).
- [51] B. Allard, H. Boren, C. Pettersson and G. Zhang, „Degradation of humic substances by UV irradiation“, *Environ. Int.* **20**, 97 (1994).
- [52] R. Sutton and G. Sposito, „Molecular structure in soil humic substances: the new view.“, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9009 (2005).
- [53] J. J. Lenhart, S. E. Cabaniss, P. MacCarthy and B. D. Honeyman, „Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids“, *Radiochim. Acta* **88**, 345 (2000).
- [54] J. J. Lenhart and B. D. Honeyman, „Uranium(VI) sorption to hematite in the presence of humic acid“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 2891 (1999).
- [55] S. Sachs, V. Brendler and G. Geipel, „Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy“, *Radiochim. Acta* **95**, 103 (2007).

- [56] K. Schmeide, S. Sachs, M. Bubner, T. Reich, K. H. Heise and G. Bernhard, „Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy“, *Inorg. Chim. Acta* **351**, 133 (2003).
- [57] P. M. Shanbhag and G. R. Choppin, „Binding of uranyl by humic acid“, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **43**, 3369 (1981).
- [58] M Wei and J Liao and N Liu and D Zhang and H Kang and Y Yand and Y Yand and J Jin, „Interaction between uranium and humic acid (I): Adsorption behaviors of U(VI) in soil humic acids“, *Nucl. Sci. Tech.* **18**, 287 (2007).
- [59] W. C. Li, D. M. Victor and C. L. Chakrabarti, „Effect of pH and Uranium Concentration on Interaction of Uranium(VI) and Uranium(IV) with Organic Ligands in Aqueous Solutions“, *Anal. Chem.* **52**, 520 (1980).
- [60] D. R. Lovley, J. L. Fraga, E. L. Blunt-Harris, L. A. Hayes, E. J. P. Phillips and J. D. Coates, „Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction“, *Acta Hydroch Hydrob* **26**, 152 (1998).
- [61] J. K. Fredrickson, H. M. Kostandarithes, S. W. Li, A. E. Plymale and M. J. Daly, „Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1“, *Appl Environ Microb* **66**, 2006 (2000).
- [62] J. B. Neilands, „Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds“, *J. Biol. Chem.* **270**, 26723 (1995).
- [63] S. W. Frazier, R. Kretzschmar and S. M. Kraemer, „Bacterial siderophores promote dissolution of UO₂ under reducing conditions“, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 5709 (2005).
- [64] B. E. Kalinowski, A. Oskarsson, Y. Albinsson, J. Arlinger, A. Ödegaard Jensen, T. Andlid and K. Pedersen, „Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad“, *Geoderma* **122**, 177 (2004).
- [65] A. A. DiSpirito and O. H. Tuovinen, „Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*“, *Arch. Microbiol.* **133**, 28 (1982).
- [66] G. Huber and K. O. Stetter, „*Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a Novel Strictly Chemolithoautotrophic Thermophilic Archaeal Species of Metal-Mobilizers“, *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 372 (1991).
- [67] G. Huber, C. Spinnler, A. Gambacorta and K. O. Stetter, „*Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. Represents a New Genus of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria“, *Syst. Appl. Microbiol.* **12**, 38 (1989).
- [68] J. C. Renshaw, L. J. Butchins, F. R. Livens, I. May, J. M. Charnock and J. R. Lloyd, „Bioreduction of uranium: Environmental implications of a pentavalent intermediate“, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 5657 (2005).
- [69] D. R. Lovley, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby and E. R. Landa, „Microbial reduction of uranium“, *Nature* **350**, 413 (1991).
- [70] D. R. Lovley and E. J. P. Phillips, „Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*“, *Appl Environ Microb* **58**, 850 (1992).
- [71] A. J. Francis, C. J. Dodge, F. Lu, G. P. Halada and C. R. Clayton, „XPS and XANES Studies of Uranium Reduction by *Clostridium* sp“, *Environ. Sci. Technol.* **28**, 636 (1994).
- [72] E. S. Shelobolina, S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin and D. R. Lovley, „Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov.“, *Appl Environ Microb* **70**, 2959 (2004).

- [73] Q. Wu, R. A. Sanford and F. E. Löffler, „Uranium(VI) reduction by *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C“, *Appl Environ Microb* **72**, 3608 (2006).
- [74] K. Kashefi and D. R. Lovley, „Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*“, *Appl Environ Microb* **66**, 1050 (2000).
- [75] M. L. Merroun and S. Selenska-Pobell, „Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective“, *J. Contam. Hydrol.* **102**, 285 (2008).
- [76] Y. Suzuki, S. D. Kelly, K. M. Kemner and J. F. Banfield, „Radionuclide contamination: Nanometre-size products of uranium bioreduction“, *Nature* **419**, 134 (2002).
- [77] S. Regenspurg, D. Schild, T. Schäfer, F. Huber and M. E. Malmström, „Removal of uranium(VI) from the aqueous phase by iron(II) minerals in presence of bicarbonate“, *Appl. Geochem.* **24**, 1617 (2009).
- [78] S. P. Hyun, J. A. Davis, K. Sun and K. F. Hayes, „Uranium(VI) reduction by iron(II) monosulfide mackinawite“, *Environ. Sci. Technol.* **46**, 3369 (2012).
- [79] D. E. Latta, M. I. Boyanov, K. M. Kemner, E. J. O’Loughlin and M. M. Scherer, „Abiotic reduction of uranium by Fe(II) in soil“, *Appl. Geochem.* **27**, 1512 (2012).
- [80] D. M. Singer, S. M. Chatman, E. S. Ilton, K. M. Rosso, J. F. Banfield and G. A. Waychunas, „U(VI) Sorption and Reduction Kinetics on the Magnetite (111) Surface“, *Environ. Sci. Technol.* **46**, 3821 (2012).
- [81] P. M. Fox, J. A. Davis, R. Kukkadapu, D. M. Singer, J. Bargar and K. H. Williams, „Abiotic U(VI) reduction by sorbed Fe(II) on natural sediments“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **117**, 266 (2013).
- [82] E. J. O’Loughlin, S. D. Kelly and K. M. Kemner, „XAFS investigation of the interactions of UVI with secondary mineralization products from the bioreduction of FeIII oxides“, *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1656 (2010).
- [83] H. Veeramani, D. S. Alessi, E. I. Suvorova, J. S. Lezama-Pacheco, J. E. Stubbs, J. O. Sharp, U. Dippon, A. Kappler, J. R. Bargar and R. Bernier-Latmani, „Products of abiotic U(VI) reduction by biogenic magnetite and vivianite“, *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 2512 (2011).
- [84] H. Veeramani, A. C. Scheinost, N. Monsegue, N. P. Qafoku, R. Kukkadapu, M. Newville, A. Lanzirrotti, A. Pruden, M. Murayama and M. F. Hochella, „Abiotic reductive immobilization of U(VI) by biogenic mackinawite“, *Environ. Sci. Technol.* **47**, 2361 (2013).
- [85] J. R. Bargar, K. H. Williams, K. M. Campbell, P. E. Long, J. E. Stubbs, E. I. Suvorova, J. S. Lezama-Pacheco, D. S. Alessi, M. Stylo, S. M. Webb, J. A. Davis, D. E. Giammar, L. Y. Blue and R. Bernier-Latmani, „Uranium redox transition pathways in acetate-amended sediments“, *Proc Natl Acad Sci.* **110**, 4506 (2013).
- [86] K. H. Williams, J. R. Bargar, J. R. Lloyd and D. R. Lovley, „Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: A systems approach to subsurface biogeochemistry“, *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 489 (2013).
- [87] L. Newsome, K. Morris and J. R. Lloyd, „The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides“, *Chem. Geol.* **363**, 164 (2014).
- [88] J. D. Wall and L. R. Krumholz, „Uranium Reduction“, *Annu Rev Microbiol* **60**, 149 (2006).
- [89] F. W. Whicker, T. G. Hinton, M. M. MacDonell, J. E. Pinder and L. J. Habegger, „Environment - Avoiding destructive remediation at DOE sites“, *Science* **303**, 1615 (2004).

- [90] D. Appukuttan, A. S. Rao and S. K. Apte, „*Engineering of Deinococcus radiodurans R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste*“, Appl Environ Microb **72**, 7873 (2006).
- [91] M. M. Cox and J. R. Battista, „*Deinococcus radiodurans — the consummate survivor*“, Nat. Rev. Microbiol. **3**, 882 (2005).
- [92] Y. Suzuki, S. D. Kelly, K. M. Kemner and J. F. Banfield, „*Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment*“, Appl Environ Microb **71**, 1790 (2005).
- [93] B. Gu, W. M. Wu, M. A. Ginder-Vogel, H. Yan, M. W. Fields, J. Zhou, S. Fendorf, C. S. Criddle and P. M. Jardine, „*Bioreduction of uranium in a contaminated soil column*“, Environ. Sci. Technol. **39**, 4841 (2005).
- [94] M. Xu, W.-M. Wu, L. Wu, Z. He, J. D. Van Nostrand, Y. Deng, J. Luo, J. Carley, M. Ginder-Vogel, T. J. Gentry, B. Gu, D. Watson, P. M. Jardine, T. L. Marsh, J. M. Tiedje, T. Hazen, C. S. Criddle and J. Zhou, „*Responses of microbial community functional structures to pilot-scale uranium in situ bioremediation*“, ISME J. **4**, 1060 (2010).
- [95] R. T. Anderson, H. A. Vrionis, I. Ortiz-Bernad, C. T. Resch, P. E. Long, R. Dayvault, K. Karp, S. Marutzky, D. R. Metzler, A. Peacock, D. C. White, M. Lowe and D. R. Lovley, „*Stimulating the In Situ Activity of Geobacter Species to Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer*“, Appl Environ Microb **69**, 5884 (2003).
- [96] C. Yun-Juan, P. E. Long, R. Geyer, A. D. Peacock, C. T. Resch, K. Sublette, S. Pfiffner, A. Smithgall, R. T. Anderson, H. A. Vrionis, J. R. Stephen, R. Dayvault, I. Ortiz-Bernad, D. R. Lovley and D. C. White, „*Microbial incorporation of ¹³C-labeled acetate at the field scale: Detection of microbes responsible for reduction of U(VI)*“, Environ. Sci. Technol. **39**, 9039 (2005).
- [97] E. S. Shelobolina, K. O’Neill, K. T. Finneran, L. A. Hayes and D. R. Lovley, „*Potential for in situ bioremediation of a low-pH, high-nitrate uranium-contaminated groundwater*“, Soil Sediment Contam. **12**, 865 (2003).
- [98] P. Nannipieri, L. Giagnoni, L. Landi and R. G. Enella, „*Role of phosphatase enzymes in soil*“, in *Phosphorus in Action: Biological processes in soil phosphorus cycling*, Ed. E. Bünenmann, A. Oberson and E. Frossard, P. 215–243, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011).
- [99] L. E. Macaskie, K. M. Bonthron and D. A. Rouch, „*Phosphatase-mediated heavy metal accumulation by a Citrobacter sp. and related enterobacteria*“, FEMS Microbiol. Lett. **121**, 141 (1994).
- [100] G. Satta, G. Grazi, P. E. Varaldo and R. Fontana, „*Detection of bacterial phosphatase activity by means of an original and simple test.*“, J Clin Pathol **32**, 391 (1979).
- [101] L. G. Powers, H. J. Mills, A. V. Palumbo, C. Zhang, K. Delaney and P. A. Sobecky, „*Introduction of a plasmid-encoded phoA gene for constitutive overproduction of alkaline phosphatase in three subsurface Pseudomonas isolates*“, FEMS Microbiol. Ecol. **41**, 115 (2002).
- [102] B. Volesky, „*Biosorption and me*“, Water Res. **41**, 4017 (2007).
- [103] G. M. Gadd, „*Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment*“, J. Chem. Technol. Biotechnol. **84**, 13 (2009).
- [104] M. Fomina and G. M. Gadd, „*Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application*“, Bioresource Technol **160**, 3 (2014).

- [105] A. Malik, „*Metal bioremediation through growing cells*“, Environ. Int. **30**, 261 (2004).
- [106] P. Barton, „*The acid mine drainage*“, in *Sulfur in the environment, Part II: ecological impacts*, Ed. J. O. Nriagu, P. 313–358, Wiley-Interscience, New York (1978).
- [107] M. Kelly, „*Mining and the freshwater environment*“ (1988).
- [108] D. K. Nordstrom and G. Southam, „*Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation*“, in *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals*, Ed. J. F. Banfield and K. H. Nealson, P. 361–390, Mineralogical Society of America, Washington, DC (1997).
- [109] I. Zirnstein, „*Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein*“, PhD thesis, Technische Universität Dresden (2015).
- [110] C. Méndez-García, A. I. Peláez, V. Mesa, J. Sánchez, O. V. Golyshina and M. Ferrer, „*Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats*“, Front. Microbiol. **6** (2015).
- [111] D. Prakash, P. Gabani, A. K. Chandel, Z. Ronen and O. V. Singh, „*Bioremediation: A genuine technology to remediate radionuclides from the environment*“, Microb. Biotechnol. **6**, 349 (2013).
- [112] S. D. Cunningham, W. R. Berti and J. W. Huang, „*Phytoremediation of contaminated soils*“, Trends Biotechnol. **13**, 393 (1995).
- [113] S. D. Cunningham, J. R. Shann, D. E. Crowley and T. A. Anderson, „*Phytoremediation of Contaminated Water and Soil*“, in *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, P. 2–17, American Chemical Society (1997).
- [114] J. L. Zhang and C. L. Qiao, „*Novel approaches for remediation of pesticide pollutants*“, Int. J. Environ. Pollut. **18**, 423 (2002).
- [115] F. Seigle-Murandi, P. Guiraud, J. Croize, E. Falsen and K. L. Eriksson, „*Bacteria Are Omnipresent on Phanerochaete chrysosporium Burdsall*“, Appl. Environ. Microbiol. **62**, 2477 (1996).
- [116] H. R. Dash and S. Das, „*Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes*“, Int Biodeter Biodegr **75**, 207 (2012).
- [117] N. Mangwani, H. R. Dash, A. Chauhan and S. Das, „*Bacterial quorum sensing: Functional features and potential applications in biotechnology*“, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **22**, 215 (2012).
- [118] N. Mangwani, S. K. Shukla, T. S. Rao and S. Das, „*Calcium-mediated modulation of Pseudomonas mendocina NR802 biofilm influences the phenanthrene degradation*“, Colloids Surf., B **114**, 301 (2014).
- [119] S. Choudhary and P. Sar, „*Real-time PCR based analysis of metal resistance genes in metal resistant Pseudomonas aeruginosa strain J007*“, J Basic Microb P. 1–10 (2015).
- [120] M. Möhner, M. Lindtner, H. Otten and H. G. Gille, „*Leukemia and exposure to ionizing radiation among German uranium miners*“, Am. J. Ind. Med. **49**, 238 (2006).
- [121] T. Liesch, S. Hinrichsen and N. Goldscheider, „*Uranium in groundwater - Fertilizers versus geogenic sources*“, Sci. Total Environ. **536**, 981 (2015).
- [122] R. H. Nussbaum, „*The Chernobyl nuclear catastrophe: unacknowledged health detriment*“, Environ Health Persp **115**, A238 (2007).
- [123] M. Al-Zoughool and D. Krewski, „*Health effects of radon: A review of the literature*“, Int. J. Radiat. Biol. **85**, 57 (2009).
- [124] N. G. Bogutskaya, M. A. Zuykov, A. M. Naseka and E. B. Anderson, „*Normal axial skeleton structure in common roach Rutilus rutilus (Actinopterygii: Cyprinidae) and malfor-*

- mations due to radiation contamination in the area of the Mayak (Chelyabinsk Province, Russia) nuclear plant*“, J Fish Biol **79**, 991 (2011).
- [125] A. Schatz and C. Bovell, „*Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, Hydrogenomonas facilis.*“, J. Bacteriol. **63**, 87 (1952).
- [126] J. E. Gavagan, R. DiCosimo, A. Eisenberg, S. K. Fager, P. W. Folsom, E. C. Hann, K. J. Schneider and R. D. Fallon, „*A gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles*“, Appl Microbiol Biot **52**, 654 (1999).
- [127] U. Gerber, I. Zirnstein, E. Krawczyk-Bärsch, H. Lünsdorf, T. Arnold and M. L. Merroun, „*Combined use of flow cytometry and microscopy to study the interactions between the gram-negative betaproteobacterium Acidovorax facilis and uranium(VI)*“, J Hazard Mater **317**, 127 (2016).
- [128] X. Li, C. Ding, J. Liao, T. Lan, F. Li, D. Zhang, J. Yang, Y. Yang, S. Luo, J. Tang and N. Liu, „*Biosorption of uranium on Bacillus sp. dwc-2: Preliminary investigation on mechanism*“, J Environ Radioactiv **135**, 6 (2014).
- [129] M. Z. Hu, J. M. Norman, B. D. Faison and M. E. Reeves, „*Biosorption of uranium by Pseudomonas aeruginosa strain CSU: Characterization and comparison studies*“, Biotechnol. Bioeng. **51**, 237 (1996).
- [130] G. W. Strandberg, S. E. Shumate and J. R. Parrott, „*Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa*“, Appl Environ Microb **41**, 237 (1981).
- [131] A. A. DiSpirito, J. W. Talnagi and O. H. Tuovinen, „*Accumulation and cellular distribution of uranium in Thiobacillus ferrooxidans*“, Arch. Microbiol. **135**, 250 (1983).
- [132] E. I. Yilmaz, „*Metal tolerance and biosorption capacity of Bacillus circulans strain EB1*“, Res. Microbiol. **154**, 409 (2003).
- [133] R. Kumar, C. Acharya and S. R. Joshi, „*Isolation and analyses of uranium tolerant Serriatia marcescens strains and their utilization for aerobic uranium U(VI) bioadsorption*“, J Microbiol **49**, 568 (2011).
- [134] Z. Hanbo, D. Changqun, S. Qiyong, R. Weimin, S. Tao, C. Lizhong, Z. Zhiwei and H. Bin, „*Genetic and physiological diversity of phylogenetically and geographically distinct groups of Arthrobacter isolated from lead-zinc mine tailings*“, FEMS Microbiol. Ecol. **49**, 333 (2004).
- [135] R. Docampo, „*Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules*“, in *Inclusions in Prokaryotes*, Vol. 1, P. 53–70, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006).
- [136] J. W. van Groenestijn, G. J. Vlekke, D. M. Anink, M. H. Deinema and a. J. Zehnder, „*Role of Cations in Accumulation and Release of Phosphate by Acinetobacter Strain 210A.*“, Appl Environ Microb **54**, 2894 (1988).
- [137] M. Merroun, M. Nedelkova, A. Rossberg, C. Hennig and S. Selenska-Pobell, „*Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium*“, Radiochim. Acta **94**, 723 (2006).
- [138] E. Krawczyk-Bärsch, U. Gerber, K. Müller, H. Moll, A. Rossberg, R. Steudtner and M. Merroun, „*Multidisciplinary characterization of U(VI) sequestration by Acidovorax facilis for bioremediation purposes*“, J Hazard Mater **347**, 233 (2018).
- [139] T. Reitz, M. L. Merroun, A. Rossberg and S. Selenska-Pobell, „*Interactions of Sulfolobus acidocaldarius with uranium*“, Radiochim. Acta **98**, 249 (2010).

- [140] M. Nedelkova, M. L. Merroun, A. Rossberg, C. Hennig and S. Selenska-Pobell, „*Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium*“, FEMS Microbiol. Ecol. **59**, 694 (2007).
- [141] M. Merroun, C. Hennig, A. Rossberg, T. Reich and S. Selenska-Pobell, „*Characterization of U(VI)-Acidithiobacillus ferrooxidans complexes using EXAFS, transmission electron microscopy, and energy-dispersive X-ray analysis*“, Radiochim. Acta **91**, 583 (2003).
- [142] S. K. Kazy, S. F. D'Souza and P. Sar, „*Uranium and thorium sequestration by a Pseudomonas sp.: Mechanism and chemical characterization*“, J Hazard Mater **163**, 65 (2009).
- [143] E. Cardenas, W. M. Wu, M. B. Leigh, J. Carley, S. Carroll, T. Gentry, J. Luo, D. Watson, B. Gu, M. Ginder-Vogel, P. K. Kitanidis, P. M. Jardine, J. Zhou, C. S. Criddle, T. L. Marsh and J. M. Tiedje, „*Microbial communities in contaminated sediments, associated with bioremediation of uranium to submicromolar levels*“, Appl Environ Microb **74**, 3718 (2008).
- [144] J. L. Nyman, T. L. Marsh, M. A. Ginder-Vogel, M. Gentile, S. Fendorf and C. Criddle, „*Heterogeneous response to biostimulation for U(VI) reduction in replicated sediment microcosms*“, Biodegradation **17**, 303 (2006).
- [145] J. M. Senko, J. D. Istok, J. M. Suflita and L. R. Krumholz, „*In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization*“, Environ. Sci. Technol. **36**, 1491 (2002).
- [146] S. Basu, C. Bose, N. Ojha, N. Das, J. Das, M. Pal and S. Khurana, „*Evolution of bacterial and fungal growth media*“, Bioinformation **11**, 182 (2015).
- [147] Q. M. Wang, A. M. Yurkov, M. Göker, H. T. Lumbsch, S. D. Leavitt, M. Groenewald, B. Theelen, X. Z. Liu, T. Boekhout and F. Y. Bai, „*Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina*“, Stud Mycol **81**, 149 (2015).
- [148] A. M. Johns, J. Love and S. J. Aves, „*Four inducible promoters for controlled gene expression in the oleaginous yeast Rhodotorula toruloides*“, Front. Microbiol. **7** (2016).
- [149] L. d. F. Vilela, V. P. G. de Araujo, R. d. S. Paredes, E. P. d. S. Bon, F. A. G. Torres, B. C. Neves and E. C. A. Eleutherio, „*Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered Saccharomyces cerevisiae strain*“, AMB Express **5**, 16 (2015).
- [150] D. Moysés, V. Reis, J. Almeida, L. Moraes and F. Torres, „*Xylose Fermentation by Saccharomyces cerevisiae: Challenges and Prospects*“, Int J Mol Sci **17**, 207 (2016).
- [151] S. H. M. Azhar, R. Abdulla, S. A. Jambo, H. Marbawi, J. A. Gansau, A. A. M. Faik and K. F. Rodrigues, „*Yeasts in sustainable bioethanol production: A review*“, Biochem Biophys Rep **10**, 52 (2017).
- [152] T. M. Roane and S. T. Kellogg, „*Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils.*“, Can. J. Microbiol. **42**, 593 (1996).
- [153] J. S. Angle, R. L. Chaney and D. Rhee, „*Bacterial resistance to heavy metals related to extractable and total metal concentrations in soil and media*“, Soil Biol. Biochem. **25**, 1443 (1993).
- [154] M. Pepi and F. Baldi, „*Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes*“, Biometals **5**, 179 (1992).
- [155] F. Baldi, M. Pepi and F. Fava, „*Growth of Rhodosporidium toruloides strain DBVPG 6662 on dibenzothiophene crystals and orimulsion*“, Appl Environ Microb **69**, 4689 (2003).
- [156] C. Zhao, J. Liu, H. Tu, F. Li, X. Li, J. Yang, J. Liao, Y. Yang, N. Liu and Q. Sun, „*Characteristics of uranium biosorption from aqueous solutions on fungus Pleurotus ostreatus*“, Environ Sci Pollut R **23**, 24846 (2016).

- [157] M. E. Treen-Sears, B. Volesky and R. J. Neufeld, „*Ion exchange/complexation of the uranyl ion by Rhizopus biosorbent*“, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1323 (1984).
- [158] T. Sakaguchi, „*Bioaccumulation of Uranium*“, Kyushu University Press, Hukuoka, Japan (1996).
- [159] Z. Golab, B. Orłowska and R. W. Smith, „*Biosorption of lead and uranium by Streptomyces sp.*“, *Water. Air. Soil Pollut.* **60**, 99 (1991).
- [160] C. Acharya, P. Chandwadkar and S. Apte, „*Interaction of uranium with a filamentous, heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, Anabaena torulosa*“, *Bioresour. Technol.* **116**, 290 (2012).
- [161] M. L. Merroun, M. Nedelkova, J. J. Ojeda, T. Reitz, M. L. Fernández, J. M. Arias, M. Romero-González and S. Selenska-Pobell, „*Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses*“, *J Hazard Mater* **197**, 1 (2011).
- [162] E. Krawczyk-Bärsch, L. Lütke, H. Moll, F. Bok, R. Steudtner and A. Rossberg, „*A spectroscopic study on U(VI) biomineralization in cultivated Pseudomonas fluorescens biofilms isolated from granitic aquifers*“, *Environ Sci Pollut R* **22**, 4555 (2015).
- [163] F. Jroundi, M. L. Merroun, J. M. Arias, A. Rossberg, S. Selenska-Pobell and M. T. González-Muñoz, „*Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in Myxococcus xanthus*“, *Geomicrobiol. J.* **24**, 441 (2007).
- [164] P. Zhou and B. Gu, „*Extraction of oxidized and reduced forms of uranium from contaminated soils: Effects of carbonate concentration and pH*“, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4435 (2005).
- [165] A. J. Francis, „*Microbial transformations of radioactive wastes and environmental restoration through bioremediation*“, *J Alloy Compd* **213-214**, 226 (1994).
- [166] J. R. Lloyd, A. N. Mabbett, D. R. Williams and L. E. Macaskie, „*Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: Physiological diversity and metal specificity*“, *Hydrometallurgy* **59**, 327 (2001).
- [167] J. Seifert, B. Erler, K. Seibt, N. Rohrbach, J. Arnold, M. Schlömann, S. Kassahun and U. Jenk, „*Characterization of the microbial diversity in the abandoned uranium mine Königstein*“, in *Uranium, Mining and Hydrogeology*, Ed. B. Merkel and A. Hasche-Berger, P. 733–742, Springer, Berlin (2008).
- [168] A. Sen and B. Johnson, „*Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage*“, in *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century - Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium*, P. 709–718, Elsevier (1999).
- [169] D. Alazard, M. Joseph, F. Battaglia-Brunet, J. L. Cayol and B. Ollivier, „*Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments*“, *Extremophiles* (2010).
- [170] I. Sánchez-Andrea, J. L. Sanz, M. F. M. Bijmans and A. J. M. Stams, „*Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage*“, *J Hazard Mater* **269**, 98 (2014).
- [171] M. F. M. Bijmans, M. Dopson, T. W. T. Peeters, P. N. L. Lens and C. J. N. Buisman, „*Sulfate reduction at pH 5 in a high-rate membrane bioreactor: Reactor performance and microbial community analyses*“, *J Microbiol Biotechn* **19**, 698 (2009).
- [172] I. Sánchez-Andrea, A. J. Stams, R. Amils and J. L. Sanz, „*Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments*“, *Environ Microbiol Rep* **5**, 672 (2013).

- [173] J. Meier, A. Piva and D. Fortin, „*Enrichment of sulfate-reducing bacteria and resulting mineral formation in media mimicking pore water metal ion concentrations and pH conditions of acidic pit lakes*“, FEMS Microbiol. Ecol. **79**, 69 (2012).
- [174] D. B. Johnson, E. Jameson, O. Rowe, K. Wakeman and K. B. Hallberg, „*Sulfidogenesis at Low pH by Acidophilic Bacteria and its Potential for the Selective Recovery of Transition Metals from Mine Waters*“, in *Advanced Material Research*, Ed. E. R. Donati, M. R. Viera, E. L. Tavani, M. A. Giaveno, T. L. Lavallo and P. A. Chiacchiarini, Vol. 71-73, P. 693–696 (2009).
- [175] M. J. Wilkins, F. R. Livens, D. J. Vaughan, I. Beadle and J. R. Lloyd, „*The influence of microbial redox cycling on radionuclide mobility in the subsurface at a low-level radioactive waste storage site*“, Geobiology **5**, 293 (2007).
- [176] J. D. Begg, I. T. Burke, J. R. Lloyd, C. Boothman, S. Shaw, J. M. Charnock and K. Morris, „*Bioreduction behavior of U(VI) sorbed to sediments*“, Geomicrobiol. J. **28**, 160 (2011).
- [177] G. T. Law, A. Geissler, I. T. Burke, F. R. Livens, J. R. Lloyd, J. M. McBeth and K. Morris, „*Uranium redox cycling in sediment and biomineral systems*“, Geomicrobiol. J. **28**, 497 (2011).
- [178] J. D. Istok, J. M. Senko, L. R. Krumholz, D. Watson, M. A. Bogle, A. Peacock, Y. J. Chang and D. C. White, „*In Situ Bioreduction of Technetium and Uranium in a Nitrate-Contaminated Aquifer*“, Environ. Sci. Technol. **38**, 468 (2004).
- [179] W. M. Wu, J. Carley, J. Luo, M. A. Ginder-Vogel, E. Cardenas, M. B. Leigh, C. Hwang, S. D. Kelly, C. Ruan, L. Wu, J. Van Nostrand, T. Gentry, K. Lowe, T. Mehlhorn, S. Carroll, W. Luo, M. W. Fields, B. Gu, D. Watson, K. M. Kemner, T. Marsh, J. Tiedje, J. Zhou, S. Fendorf, P. K. Kitanidis, P. M. Jardine and C. S. Criddle, „*In situ bioreduction of uranium (VI) to submicromolar levels and reoxidation by dissolved oxygen*“, Environ. Sci. Technol. **41**, 5716 (2007).
- [180] K. H. Williams, P. E. Long, J. A. Davis, M. J. Wilkins, A. L. N'Guessan, C. I. Steefel, L. Yang, D. Newcomer, F. A. Spane, L. J. Kerkhof, L. McGuinness, R. Dayvault and D. R. Lovley, „*Acetate availability and its influence on sustainable bioremediation of Uranium-contaminated groundwater*“, Geomicrobiol. J. **28**, 519 (2011).
- [181] J. L. Slonczewski and J. W. Foster, „*Mikrobiologie*“, Springer Spektrum, 2. Ed. (2012).
- [182] K. Duquesne, S. Lebrun, C. Casiot, O. Bruneel, J. C. Personné, M. Leblanc, F. Elbaz-Poulichet, G. Morin and V. Bonnefoy, „*Immobilization of Arsenite and Ferric Iron by Acidithiobacillus ferrooxidans and Its Relevance to Acid Mine Drainage*“, Appl. Environ. Microbiol. **69**, 6165 (2003).
- [183] D. Leduc, L. G. Leduc and G. D. Ferroni, „*Quantification of bacterial populations indigenous to acidic drainage streams*“, Water Air Soil Pollut **135**, 1 (2002).
- [184] L. L. Barton and F. A. Tomei, „*Characteristics and Activities of Sulfate-Reducing Bacteria*“, in *Sulfate-Reducing Bacteria*, P. 1–32, Springer US (1995).
- [185] M. QuiIntana, G. Curutchet and E. Donati, „*Factors affecting chromium(VI) reduction by Thiobacillus ferrooxidans*“, Biochem. Eng. J. **9**, 11 (2001).
- [186] R. Gargarello, D. D. Gregorio, H. Huck, J. F. Niello and G. Curutchet, „*Reduction of uranium(VI) by Acidithiobacillus thiooxidans and Acidithiobacillus ferrooxidans*“, Hydrometallurgy **104**, 529 (2010).
- [187] Y. Suzuki, S. D. Kelly, K. M. Kemner and J. F. Banfield, „*Microbial populations stimulated for hexavalent uranium reduction in uranium mine sediment*“, Appl. Environ. Microbiol. **69**, 1337 (2003).

- [188] O. H. Tuovinen and D. P. Kelly, „*Studies on the growth of Thiobacillus ferrooxidans - II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA*“, Arch. Microbiol. **95**, 153 (1974).
- [189] R. M. Jones, S. Hedrich and D. B. Johnson, „*Acidocella aromatica sp. nov.: An acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits*“, Extremophiles **17**, 841 (2013).
- [190] Y. Masaki, T. Hirajima, K. Sasaki and N. Okibe, „*Bioreduction and immobilization of hexavalent chromium by the extremely acidophilic Fe(III)-reducing bacterium Acidocella aromatica strain PFBC*“, Extremophiles **19**, 495 (2015).
- [191] S. Ghosh, N. R. Mahapatra and P. C. Banerjee, „*Metal resistance in Acidocella strains and plasmid-mediated transfer of this characteristic to Acidiphilium multivorum and Escherichia cell*“, Appl Environ Microb **63**, 4523 (1997).
- [192] D. R. Lovley, P. K. Widman, J. C. Woodward and E. J. P. Phillips, „*Reduction of uranium by cytochrome c3 of Desulfovibrio vulgaris*“, Appl Environ Microb **59**, 3572 (1993).
- [193] B. M. Tebo and A. Y. Obraztsova, „*Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors*“, Fems Microbiol Lett (1998).
- [194] B. Volesky, „*Biosorption of Heavy Metals*“, CRC Press (1990).
- [195] J. H. Tuttle, P. R. Dugan and C. I. Randles, „*Microbial sulfate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure.*“, Appl Microbiol **17**, 297 (1969).
- [196] D. B. Johnson and K. B. Hallberg, „*Acid mine drainage remediation options: A review*“, Sci. Total Environ. **338**, 3 (2005).
- [197] L. M. A. B. S.-A. L., in *4th International Conference on Acid Rock Drainage*, P. 115–130, Vancouver, Canada (1997).
- [198] S. D. B. S. W. G., in *4th International Conference on Acid Rock Drainage*, P. 1595, Vancouver, Canada (1997).
- [199] L. M. B. C. M. J. I. E. S. R., in *5th Biennial Symposium of the Groundwater Division of the Geological Survey of South Africa Randberg*, P. 193–200, Transvaal, Pretoria (1989).
- [200] J. K. Fredrickson, J. M. Zachara, D. W. Kennedy, C. Liu, M. C. Duff, D. B. Hunter and A. Dohnalkova, „*Influence of Mn oxides on the reduction of uranium(VI) by the metal-reducing bacterium Shewanella putrefaciens*“, Geochim. Cosmochim. Acta **66**, 3247 (2002).
- [201] W. Luo and B. Gu, „*Dissolution of uranium-bearing minerals and mobilization of uranium by organic ligands in a biologically reduced sediment*“, Environ. Sci. Technol. **45**, 2994 (2011).
- [202] R. K. Sani, B. M. Peyton, A. Dohnalkova and J. E. Amonette, „*Reoxidation of reduced uranium with iron(III) (hydr)oxides under sulfate-reducing conditions*“, Environ. Sci. Technol. **39**, 2059 (2005).
- [203] N. F. Spycher, M. Issarangkun, B. D. Stewart, S. Sevinç Şengör, E. Belding, T. R. Ginn, B. M. Peyton and R. K. Sani, „*Biogenic uraninite precipitation and its reoxidation by iron(III) (hydr)oxides: A reaction modeling approach*“, Geochim. Cosmochim. Acta **75**, 4426 (2011).
- [204] J. Wan, T. K. Tokunaga, E. Brodie, Z. Wang, Z. Zheng, D. Herman, T. C. Hazen, M. K. Firestone and S. R. Sutton, „*Reoxidation of bioreduced uranium under reducing conditions*“, Environ. Sci. Technol. **39**, 6162 (2005).

- [205] J. Wan, T. K. Tokunaga, Y. Kim, E. Brodie, R. Daly, T. C. Hazen and M. K. Firestone, „*Effects of organic carbon supply rates on uranium mobility in a previously bioreduced contaminated sediment*“, Environ. Sci. Technol. **42**, 7573 (2008).
- [206] Z. Wang, S. W. Lee, P. Kapoor, B. M. Tebo and D. E. Giammar, „*Uraninite oxidation and dissolution induced by manganese oxide: A redox reaction between two insoluble minerals*“, Geochim. Cosmochim. Acta **100**, 24 (2013).
- [207] W. M. Wu, J. Carley, M. Fienen, T. Mehlhorn, K. Lowe, J. Nyman, J. Luo, M. E. Gentile, R. Rajan, D. Wagner, R. F. Hickey, B. Gu, D. Watson, O. A. Cirpka, P. K. Kitanidis, P. M. Jardine and C. S. Criddle, „*Pilot-scale in situ bioremediation of uranium in a highly contaminated aquifer. 1. Conditioning of a treatment zone*“, Environ. Sci. Technol. **40**, 3978 (2006).
- [208] L. Newsome, K. Morris, S. Shaw, D. Trivedi and J. R. Lloyd, „*The stability of microbially reduced U(IV); impact of residual electron donor and sediment ageing*“, Chem. Geol. **409**, 125 (2015).
- [209] L. Newsome, K. Morris, D. Trivedi, A. Bewsher and J. R. Lloyd, „*Biostimulation by Glycerol Phosphate to Precipitate Recalcitrant Uranium(IV) Phosphate*“, Environ. Sci. Technol. **49**, 11070 (2015).
- [210] R. Finch and T. Murakami, „*Systematics and paragenesis of uranium minerals*“, Rev. Mineral. Geochem. **38**, 91 (1999).
- [211] K. A. Jensen, C. S. Palenik and R. C. Ewing, „*U6+ phases in the weathering zone of the Bangombé U-deposit: observed and predicted mineralogy*“, Radiochim Acta **90** (2002).
- [212] A. J. Pinto, M. A. Gonçalves, C. Prazeres, J. M. Astilleros and M. J. Batista, „*Mineral replacement reactions in naturally occurring hydrated uranyl phosphates from the Tarabau deposit: Examples in the Cu-Ba uranyl phosphate system*“, Chem. Geol. **312-313**, 18 (2012).

Appendix

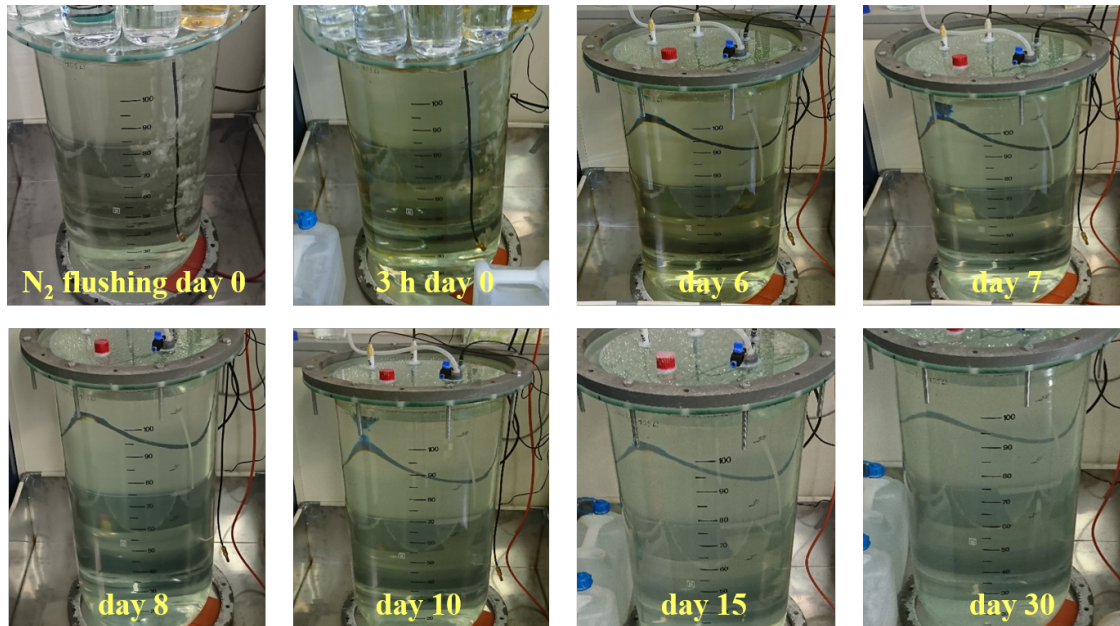


Figure A1: Color change of the flooding water in the pilot plant during 30 days of incubation time.

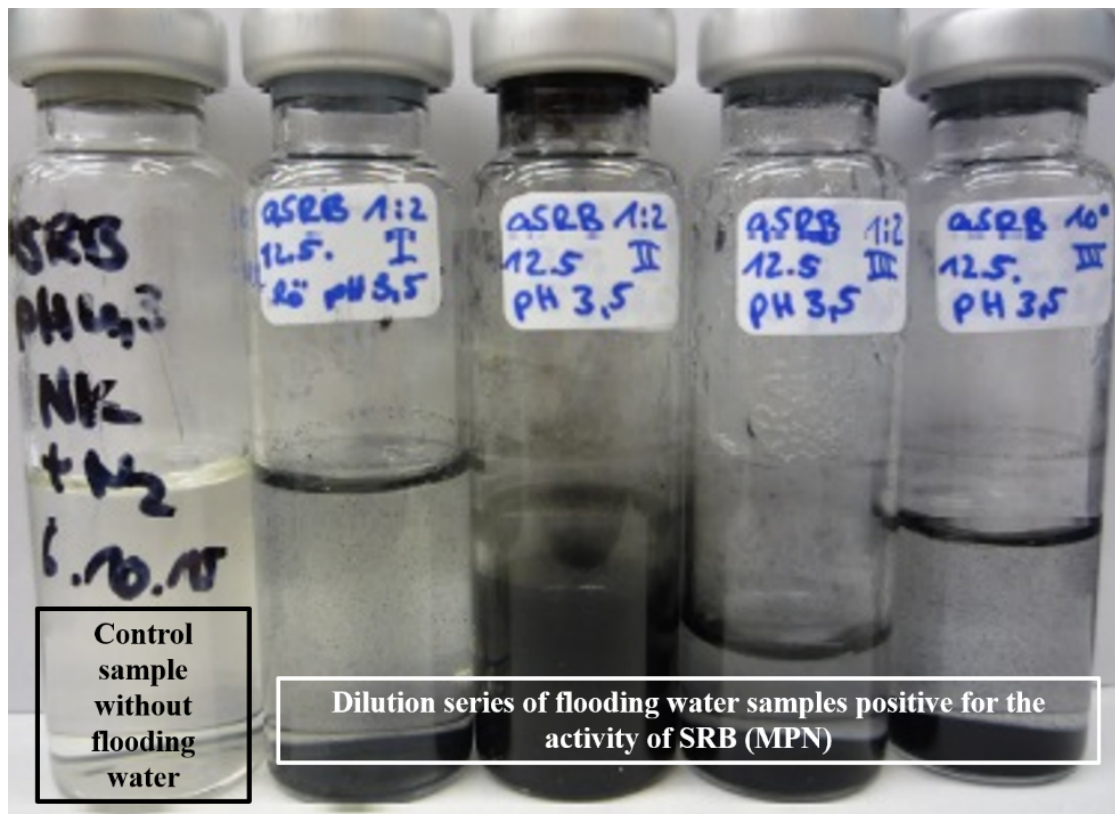


Figure A2: MPN approaches for determination of SRB. A dilution series of the flooding water samples were inoculated in aSRB medium [168]. Left in black control sample without flooding water, negative for SRB activity; right in white samples of the flooding water positive for SRB activity by the occurrence of black precipitation (FeS).

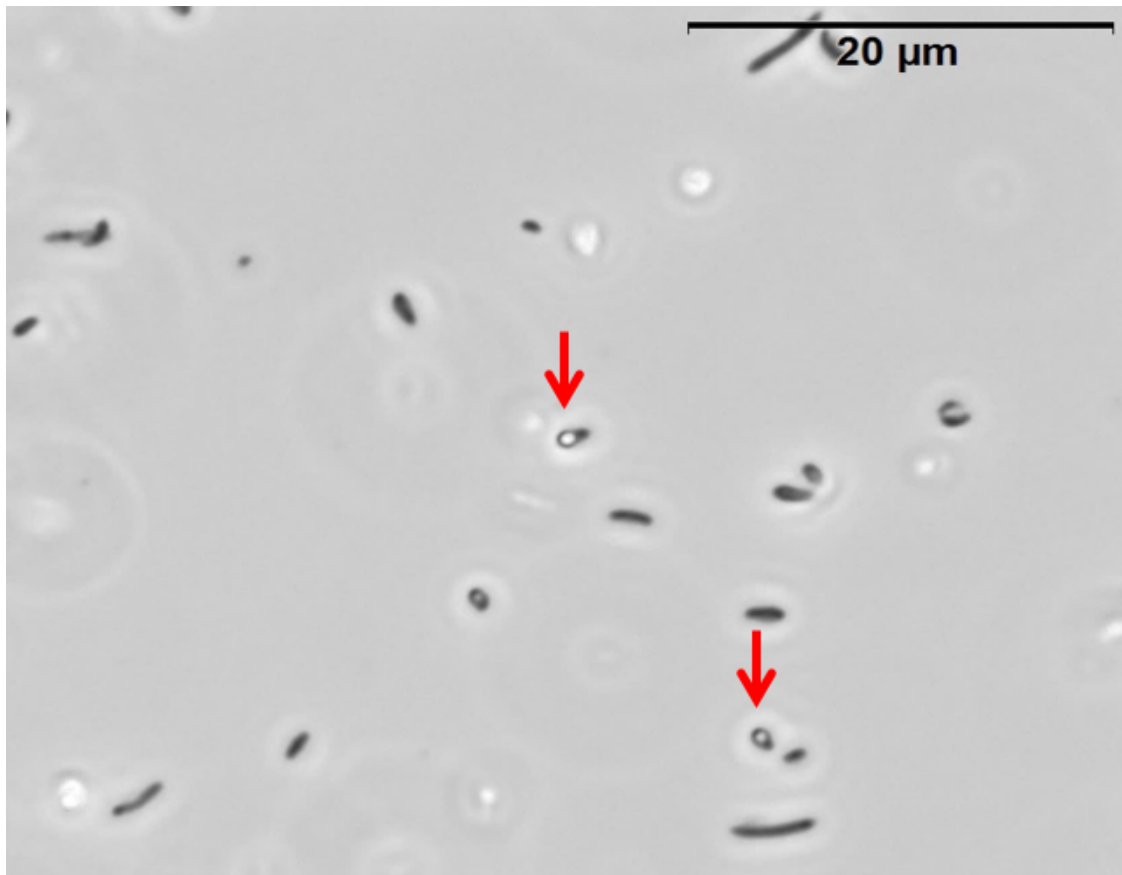


Figure A3: Light microscopy (phase-contrast) of spore-forming bacterial cells within the flooding water samples (1 L) after six weeks incubation at 30 °C, 10 mM glycerol added. Red arrows indicate the endospores.

Abbreviations

<i>A. aromatica</i>	<i>Acidocella aromatica</i>
<i>A. ferrooxidans</i>	<i>Acidothiobacillus ferrooxidans</i>
<i>A. facilis</i>	<i>Acidovorax facilis</i>
AMD	Acid mine drainage
aSRB	Acidophilic sulfate reducing bacteria
ATR FT-IR	Attenuated total reflection Fourier transform-infrared
BLAST	Basic local alignment search tool
CO	Colorado
<i>D. acidophilus</i>	<i>Desulfosporosinus acidophilus</i>
dbm	Dry biomass
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSMZ	Leibniz-Institut Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
e.g.	exempli gratia/for example
Eh	Redox potential
Eq.	Equation
Eqs.	Equations
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
<i>F. myxofaciens</i>	<i>Ferrovum myxofaciens</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Hours
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IOB	Iron oxidizing bacteria
IRB	Iron reducing bacteria
ITS	Internal transcribed spacer
L	Liter

Abbreviations

M	Molar
MIC	Minimal inhibitory concentration
min	Minutes
MPN	Most probable number
MRB	Metal reducing bacteria
MTC	Maximal tolerated concentration
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optical density
P	Phosphorous
PCR	Polymerase chain reaction
pKa	Logarithmic acid dissociation constant
<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT	Room temperature
SDA	Sabouraud dextrose agar
SEM	Scanning electron microscopy
SRB	Sulfate reducing bacteria
TEM	Transmission electron microscopy
TN	Tennessee
TOC	Total organic carbon
TRLFS	Time resolved laser fluorescence spectroscopy
U	Uranium
USA	United States of America
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
WA	Washington
XANES	X-ray absorption near edge structure

Acknowledgement

First of all, I would like to thank the head of the Institute of Ressource Ecology, Prof. Dr. Thorsten Stumpf. I thank him for his supervision and to give me the possibility to investigate this really interesting topic. I know he was at the beginning a little bit skeptical about biological research, but nevertheless I hope with my findings I could convince him that Biology is also really important.

In addition, I would like to thank Prof. Dr. Erika Kothe of the FSU in Jena for the opportunity to be my reviewer. For her support with any questions which I had and her ideas in moments when I had no glue. Moreover, I would like to thank Prof. Dr. Georg Büchel for his willingness to be my second reviewer from the FSU. I would like to thank him for his kind words at every time we have met.

I also would like to thank my supervisor Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch. She supported me in every step and in every idea, I had in mind. Sometimes she was really hard to convince with my plans, but I hope at the end I could show her that other ways also reach in the same direction. I know to work with me was not always easy but she kept always calm. I took comfort from her in things concerning work and in addition also things concerning my personal life.

I would like to thank Dr. Corinna Gagell, Dr. Isabel Zirnstein and Dr. Juliane Schott for their support all the time. Unfortunately, we didn't had the time to work long time together, but nevertheless during the short time with you we built up a friendship which lasts till now.

Moreover, I would like to thank my both students, Grit Röder and Sebastian Schäfer. Grit, you were my first master student and it was a pleasure to work with you. I know the topic was not always easy and sometimes the scientific work was frustrating but you did an excellent job and I really liked to read your work. Sebastian, you performed a perfect work and I thank you for your independence. The work at the pilot plant was not always strait forward but you managed this challenge.

In addition, I thank all the people from the Institute of Ressource Ecology. In particular, I would like to mention the very nice atmosphere with my office colleagues Susanne Lehmann, Dr.

Acknowledgement

Stefan Hellebrandt, Sophia E. Hellebrandt, Manuel Eibl, and Henry Lösch. I really miss the coffee breaks with you. I also would like to thank Dr. Moritz Schmidt, Dr. Nina Huittinen and Robert Barthen for their proof-reading and for really good advises concerning this thesis and the manuscripts. Unfortunately, I can't mentioned all of the people, but I would like to mention the really good support from all the colleagues.

I would like to thank Prof. Dr. Mohamed L. Merroun from the University of Granada in Spain for providing me the opportunity of two laboratory exchanges to his group in Granada and for his support during this time and by supervising of the resulting manuscripts.

I thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) grand N°02NUK030F (TransAqua) for the financial support of this thesis. I am grateful to the Wismut GmbH for allowing access to the sampling site, in particular S. Röder for his assistance in several water samplings.

Last but not least, I would like to thank Tobias Schneider. We have met in a tough time of my life and together with you I could smile again. Thank you for your support and patience in every situation, thank you for your grammatical corrections of this work, and thank you for your love. Anne Hartenhauer, I would like to thank you in particular. For your friendly ear in every situation, for your honesty and for the time I could spent with you together. I thank my parents and the rest of my family for their support during my whole life and especially during my studies, although they were really skeptical concerning Biology. Thank you for everything!

Declaration/ Selbstständigkeitserklärung

Hereby I declare, that this present work was written by myself and no other than indicated sources were used. All text passages, which comply in word or sense other works, I have marked with references.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Alle Stellen, die anderen Werken in Wort oder Sinn entsprechen, habe ich mit Quellenangaben versehen.

Ulrike Gerber

Dresden, den 29.06.2018

**Spektroskopische Untersuchungen zur
Bindungsform dreiwertiger Lanthanide und
Actinide in Biofluiden des menschlichen
Verdauungssystems**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

M. Sc. Claudia Wilke

geboren am 23.08.1989 in Suhl

Eingereicht am 11.10.2017

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2014 bis Juli 2017 im Institut für
Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thorsten Stumpf

Prof. Dr. rer. nat. habil. Eike Brunner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	2
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Chemie der Lanthaniden und Actiniden	5
2.1.1	Oxidationsstufen der Lanthaniden und Actiniden	5
2.1.2	Koordinationschemie der Lanthanid- und Actinidionen	7
2.2	Das menschliche Verdauungssystem	12
2.2.1	Speichelsekretion	13
2.2.2	Magensaftsekretion	15
2.2.3	Pankreassaftsekretion	16
2.2.4	Sekretion der Gallenflüssigkeit	17
2.3	Lumineszenzspektroskopie	19
2.3.1	Spektroskopische Grundlagen	19
2.3.2	Europium- und Curium- Spektroskopie	20
2.3.3	Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)	25
3	Material und Methoden	28
3.1	Chemikalien	28
3.2	Das <i>in vitro</i> -Modell des Gastrointestinaltraktes	28
3.2.1	Herstellung der Biofluide	28
3.2.2	Simulation des Gastrointestinaltraktes	29
3.3	Spektroskopische und strukturanalytische Methoden	31
3.3.1	Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)	31
3.3.2	Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)	32
3.3.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	32
3.3.4	Zirkularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)	32
3.3.5	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	33
3.4	Thermodynamische Berechnungen	33
3.5	Theoretische Studien	33
4	Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem	34
4.1	Speziation von Eu(III) in den synthetischen Biofluiden	34
4.1.1	Komplexierung von Eu(III) im Speichel	34
4.1.2	Komplexierung von Eu(III) im Magensaft	38
4.1.3	Komplexierung von Eu(III) im Pankreassaft	39
4.1.4	Komplexierung von Eu(III) in der Galle	42
4.1.5	LCF-Analyse von Eu(III) in den synthetischen Biofluiden	45
4.2	Speziation von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem	49

Inhaltsverzeichnis

4.3	Speziation von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem	51
4.4	Vergleich spektroskopischer Messungen mit thermodynamischen Berechnungen	53
4.5	Absorption dreiwertiger f-Elemente im Verdauungssystem	57
5	Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin	59
5.1	Was sind Mucine?	59
5.1.1	Allgemeines und Funktionen	59
5.1.2	Struktur	60
5.2	Lumineszenzspektroskopische Eigenschaften von Eu(III) und Cm(III) mit Mucin	63
5.3	Lumineszenzspektroskopische Untersuchungen der Carbohydrate des Mucins	69
5.4	CD-Spektroskopie	72
5.5	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	73
5.6	Rolle des Mucins in der Absorption dreiwertiger f-Elemente	73
6	Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure	75
6.1	Lumineszenzspektroskopische Eigenschaften von Eu(III) und Cm(III) mit NANA	76
6.2	Strukturelle Untersuchungen der Komplexierung von Eu(III) mit NANA . .	84
6.2.1	Untersuchung der Komplexbildung mit der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)	84
6.2.2	Theoretische Studien zur Komplexierung der N-Acetylneuraminsäure mit Eu(III)	85
6.2.3	Strukturuntersuchung mittels ATR-FT-IR	86
6.2.4	Strukturuntersuchung mittels NMR	95
6.3	Bedeutung der Komplexierung von NANA mit f-Elementen	100
7	Zusammenfassung	101
7.1	Zusammenfassung	101
7.2	Abstract	104
7.3	Publikationsliste	107
	Anhang	108
	Literatur	115

Abbildungsverzeichnis

1.1	Radiotoxizität von abgebrannten Kernbrennstoff in Abhängigkeit von der Zeit	2
1.2	Mögliche Expositionswege von Gefahrenstoffen für den Menschen	3
2.1	Lanthanid- und Actinid-Kontraktion dreiwertiger Ionen	7
2.2	Interne Exposition	9
2.3	Schematische Darstellung des Magen-Darm-Trakts	12
2.4	Speichelproduktion	14
2.5	Enzymatische Spaltung der Stärke	14
2.6	Diffusionsbarriere der Mukosa	15
2.7	Strukturen verschiedener Gallensäuren	18
2.8	Emulgierung eines Lipids durch Gallensalze	18
2.9	Jablonski-Termschema	19
2.10	Partielles Energiediagramm von Eu(III)	21
2.11	Energie-Level-Diagramm und Lumineszenzspektrum von Eu(III)	22
2.12	Absorptionsspektrum von Cm(III) in 1 M HClO ₄	24
2.13	Energie-Level-Diagramm und Lumineszenzprozess von Cm(III)	24
2.14	Schematischer Aufbau des verwendeten Lasersystems.	25
2.15	Schematische Darstellung der strahlungslosen Relaxation des angeregten Zustands von Eu(III).	26
4.1	Identifizierung anorganischer Bindungspartner mit Eu(III)	35
4.2	Komplexbildung von Eu(III) im Speichel bei RT	36
4.3	Komplexbildung von Eu(III) im Speichel bei 37°C	38
4.4	Komplexbildung von Eu(III) im Magensaft	39
4.5	Einfluss der anorganischen Liganden im Pankreassaft	40
4.6	Einfluss der organischen Liganden im Pankreassaft	41
4.7	Einfluss der anorganischen Liganden in der Galle	43
4.8	Einfluss der organischen Liganden in der Galle	44
4.9	Lumineszenzspektren und LCF-Analyse von Eu(III) in den Biofluiden	46
4.10	Lumineszenzspektren und LCF-Analyse von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem	50
4.11	Lumineszenzspektren von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem	52
4.12	Vergleich der Speziesverteilung von Eu(III) in den Biofluiden	55
4.13	Vergleich der Speziesverteilung von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem	56
5.1	Querschnitt durch eine Magenschleimhaut	59
5.2	Zusammensetzung der Mukus	60
5.3	Allgemeine Struktur der Mucine	61
5.4	Kernstrukturen der Oligosaccharid-Seitenketten	62

Abbildungsverzeichnis

5.5	Schema der Mucin-Domänen und der Polymerisation	62
5.6	Konzentrationsreihen von Mucin mit Eu(III) und Cm(III)	63
5.7	F_2/F_1 -Verhältnisse der Konzentrations- und pH-Reihe von Mucin mit Eu(III)	64
5.8	Lumineszenzlebensdauern von Cm(III) mit Mucin	64
5.9	pH-Reihe von Mucin mit Eu(III) und Cm(III)	65
5.10	Ausgewählte pH-Werte von Mucin mit Eu(III) bei RT	65
5.11	Peakentfaltung der Lumineszenzspektren von Cm(III) mit Mucin	67
5.12	pH-abhängige Fraktionsverteilung der Cm(III)-Spezies innerhalb des Verdauungssystems	68
5.13	Strukturformeln der untersuchten Zucker	70
5.14	pH-abhängige Lumineszenzspektren von Eu(III) mit den Zuckern Fucose, Galaktose, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylglucosamin	71
5.15	Vergleich der Eu(III) Lumineszenzspektren und Lebensdauern der einzelnen Zucker mit Mucin bei pH 7 und RT	71
5.16	Zirkularer Dichroismus von 0,5 mg/mL Mucin	72
5.17	Kalorimetrische Titrationskurve von Mucin mit Eu(III)	74
6.1	Natürliche Diversität, Struktur und Funktion der Sialinsäuren	75
6.2	Konzentrationsreihen von NANA mit Eu(III) und Cm(III)	77
6.3	F_2/F_1 -Verhältnisse der Konzentrations- und pH-Reihe von NANA mit Eu(III)	77
6.4	pH-Reihe von NANA mit Eu(III) und Cm(III)	78
6.5	Konzentrations- und pH-Reihe von NANA mit Eu(III) unter CO_2 -Ausschluss	79
6.6	Speziation von NANA mit Eu(III)/Cm(III)	83
6.7	Speziation von NANA mit Eu(III)/Cm(III) bei pH 8 und im Dünndarm	83
6.8	Kalorimetrische Titrationskurve von NANA mit Eu(III)	85
6.9	Struktur von NANA mit Nummerierung der C-Atome.	86
6.10	Optimierte Strukturen des Eu-NANA-Komplexes.	87
6.11	Berechnete IR-Spektren des Eu-NANA-Komplexes der deprotonierten und protonierten Form.	87
6.12	ATR-FT-IR-Spektren von NANA mit Eu(III)	88
6.13	ATR-FT-IR-Spektren des Eu-NANA-Komplexes	90
6.14	Strukturen der mit IR untersuchten Zucker	91
6.15	ATR-FT-IR-Spektren von GlcNac mit Eu(III)	92
6.16	ATR-FT-IR-Spektren von GlcA mit Eu(III)	93
6.17	Vorgeschlagene Struktur des Eu-NANA-Komplexes.	97
6.18	$^1\text{D}^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10% D_2O bei pH 4,5.	98
6.19	^{13}C -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10% D_2O bei pH 4,5.	98
6.20	$^1\text{D}^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10% D_2O bei pH 6,9.	99
6.21	^{13}C -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10% D_2O bei pH 6,9.	99

Tabellenverzeichnis

2.1	Elektronenkonfiguration der Lanthaniden und Actiniden	6
2.2	Oxidationsstufen der Actinide	7
2.3	Verteilung von Actinidionen in Geweben und Organen	9
2.4	Verteilung von Lanthanidionen in Geweben und Organen	10
2.5	Wichtige Hydrolasen des Pankreassafts und deren jeweilige Spezifität	16
2.6	Bestandteile des Gallensekrets	17
2.7	Übersicht der Lumineszenzübergänge von Eu(III)	22
2.8	Auswahlregeln des Laporte-Verbots	23
3.1	Zusammensetzung der synthetischen Biofluide.	30
4.1	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit verschiedenen anorganischen Bestandteilen des Speichels bei RT.	36
4.2	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Speichelliganden bei RT.	36
4.3	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Speichelmischungen bei RT.	37
4.4	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Speichelmischungen bei 37°C.	38
4.5	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Liganden des Pankreassafts bei RT.	41
4.6	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit Proteinen des Pankreassafts bei RT.	42
4.7	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit Proteinmischungen des Pankreassafts bei RT.	42
4.8	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Liganden der Galle bei RT.	44
4.9	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in verschiedenen Anorganikmischungen der Galle bei RT.	44
4.10	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen Liganden der Galle bei RT.	45
4.11	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen und anorganischen Liganden der Galle bei RT.	45
4.12	Experimentell bestimmte Speziesverteilung von Eu(III) in den Biofluiden	47
4.13	Experimentell bestimmte Speziesverteilung von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem	50
4.14	Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem.	51
4.15	Lumineszenzlebensdauern von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem.	53
6.1	Vergleich der Lumineszenzlebensdauern der pH-Reihen von NANA mit Eu(III) unter atmosphärischen Bedingungen und CO ₂ -Ausschluss.	80

Tabellenverzeichnis

6.2	Zusammenfassung und Vergleich der Stabilitätskonstanten von Eu(III) und Cm(III).	81
6.3	Thermodynamische Parameter der ITC bei einem 1:1-Bindungsmodell und 25°C.	84
6.4	Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit NANA bei pH 2–6.	89
6.5	Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit GlcNac bei pH 2–6.	92
6.6	Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit GlcA bei pH 2–6.	93
6.7	Chemische Verschiebung δ und Differenzen $\Delta\delta$ der ^1H -Kerne von NANA mit Sm(III)	95
6.8	Chemische Verschiebung δ und Differenzen $\Delta\delta$ der ^{13}C -Kerne von NANA mit Sm(III)	95

Abkürzungsverzeichnis

An	Actinide
ATR-FT-IR	Attenuated Total Reflection Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy
CK	Cystine Knot
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
EC	Enzyme Commission Number
ED	elektrischer Dipolübergang
et al.	et alii
GalNac	N-Acteyl-D-galactosamin
GlcA	Glucuronsäure
GlcNac	N-Acetyl-D-glucosamin
Hb	Hämoglobin
HSA	menschliches Serum Albumin
ICCD	Intensified Charge-Coupled Device
IgA	Immunoglobulin A
Laser	Light Amplification by Simulated Emission of Radiation
LCF	Linear Combination Fitting
Ln	Lanthanide
MD	magnetischer Dipolübergang
MUC	Mucin, cell surface associated
NANA	N-Acetylneuraminsäure
Nd:YAG	Neodymium dotierter Yttrium-Aluminium-Granat Laser

Tabellenverzeichnis

NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
pK_S	dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _S
OPO	Optical Parametric Oscillator
PTS	Prolin-Threonin-Serin-Domäne
RT	Raumtempertaur
Sias	Sialinsäuren
Tf	Transferrin
TR	Tandem Repeat
TRLFS	Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy
UBM	Unified Bioaccessibility Method
UV-Licht	ultraviolettes Licht
vWF	von-Willebrand-Faktor

Symbole und Formeln

E	Energie
h	plancksches Wirkungsquantum
c	Lichtgeschwindigkeit
ν	Frequenz
λ	Wellenlänge
S_x	Singulett-Zustand
T_x	Triplett-Zustand
Δ	Differenz
S	Gesamtspin
L	Gesamtbahndrehimpuls
J	Gesamtdrehimpuls
τ	Lebensdauer

Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von Februar 2014 bis Juli 2017 am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Stumpf angefertigt. Ich danke Prof. Dr. Thorsten Stumpf für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit sowie für die alljährlichen Wanderausflüge und Weinverkostungen in Scheffau.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Astrid Barkleit, die mir nicht nur bei fachlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern mich auch durch ihre positive Sicht motivierte. Danke für deine stets offenen Türen, wertvollen Diskussionen und Unterstützung!

For his help and support I would like to thank Dr. Atsushi Ikeda-Ohno. Especially for the correction and the improvement of my manuscript.

Meinen Kollegen am Institut für Ressourcenökologie danke ich für die angenehme Zeit und die Zusammenarbeit. Besonders Dr. Frank Bok danke ich für zahlreiche anregende sowie motivierende Gespräche.

Ich danke Karsten Heim und Harald Förstendorf für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren, Jenny Philipp für die ITC-Messungen, Julius Knöppel für die Einarbeitung in die CD-Spektroskopie sowie Prof. Dr. Karim Fahmy für seine Hilfestellung bei offenen Fragen.

Ich danke Dr. Peter Kaden und Dr. Michael Patzschke für die hilfreichen Diskussionen über die Zuckerchemie. Zudem danke ich Peter für die Aufnahme der NMR-Spektren und Michael für seine theoretischen Berechnungen.

Den Doktoranden bzw. Masteranden aus meinem Büro; Hannes Brinkmann, Thimo Philipp, Martin Schernikau, Jan-Martin Wolter, Bin Xiao und Konrad Zesewitz danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, fachlichen Diskussionen sowie auch für willkommene, zerstreuende Gespräche.

Ich danke auch David Simon, der mit mir seit dem Studium denselben „Leidensweg“ beschreitet. Danke für deine langjährige Freundschaft, aufmunternden Worte sowie vielen feuchtfröhlichen Abenden.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund André, der je nachdem wie es mit der Arbeit lief, meinen guten und schlechten Stimmungen ausgesetzt war und sich nicht davon abschrecken ließ, sondern mich immer unterstützte und motivierte.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich immer unterstützten, mein Studium finanzierten und stets an mich geglaubt haben. Es immer wieder schön zu euch nach Hause zu kommen.

1 Einleitung und Zielstellung

Radioaktive Abfälle entstehen vor allem durch den Betrieb und Rückbau von Kernkraftwerken, Forschungsreaktoren oder auch durch medizinische Anwendungen. Nach dem Reaktorunfall im japanischen Kernkraftwerk Fukushima Daiichi im März 2011 kam es zum Beschluss der Bundesregierung zur Energiewende, was einen beschleunigten Ausstieg aus der Kernenergie bedeutet. Zurzeit sind in Deutschland noch neun Kernkraftwerke in Betrieb, das letzte Werk soll spätestens Ende 2022 stillgelegt werden. 2011 wurden 18 % des Stroms aus Kernenergie bezogen, 2015 reduzierte sich der Anteil bereits auf 14 %. Der Rückbau der Anlagen nimmt einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren in Anspruch. 90 % des Abfallvolumens bestehen dabei aus leicht- bis mittel-radioaktiven Abfällen. Hochradioaktive Abfälle nehmen zwar nur 10 % des Abfallvolumens ein, sind aber für 99 % der gesamten Radioaktivität verantwortlich. Die Radiotoxizität wird vor allem durch das langlebige Radionuklid ^{239}Pu und die Isotope der minoren Actinide (Am, Cm und Np) bestimmt, deren Radioaktivität über hunderttausende von Jahren abnimmt. Die Spaltprodukte ^{137}Cs und ^{90}Sr hingegen klingen bereits nach einigen hundert Jahren auf das Niveau von Natururan ab (siehe Abb. 1.1).^[1-3]

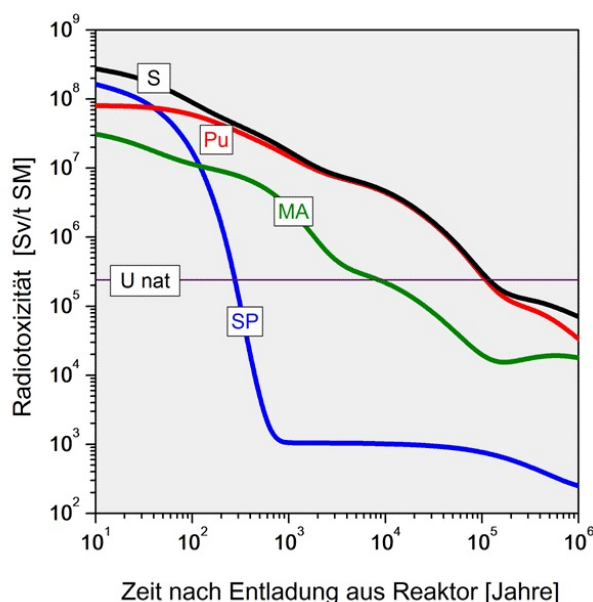


Abbildung 1.1: Radiotoxizität von abgebrannten Kernbrennstoff in Abhängigkeit von der Zeit (U nat: Natururan; SP: Spaltprodukte; MA: Minore Actinide; Pu: Plutonium; S: Summe aller Teilradiotoxizitäten).^[3]

Die Entsorgung radioaktiver Abfälle soll durch geologische Tiefenlagerung erfolgen. Als geeignete geologische Formationen werden international Salz- und Tongestein sowie kris-

1 Einleitung und Zielstellung

talline Gesteine (Granit/Gneis) untersucht. Für die Endlagerung von schwach- bis mittelradioaktiven Abfällen ist in Deutschland die Schachtanlage Konrad vorgesehen. Ein geeignetes Endlager für hochradioaktive Abfälle wurde hierzulande jedoch noch nicht gesucht. Im finnischen Olkiluoto hingegen wurde bereits mit dem Bau eines Endlagers begonnen.^[1,2]

Actinide können zum Beispiel durch Reaktorunfälle oder oberirdische Kernwaffentests in die Umwelt und in die Nahrungskette gelangen und über verschiedene Wege vom Menschen aufgenommen werden.^[4,5] Eine Übersicht von möglichen Expositionswegen ist Abbildung 1.2 zu entnehmen.

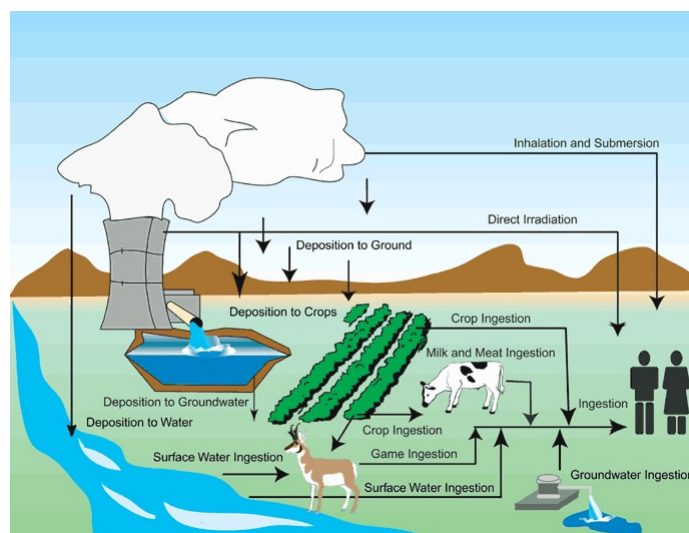


Abbildung 1.2: Mögliche Expositionswegen von Gefahrstoffen für den Menschen (<http://www.gsseser.com/Annuals/2003/Images/Figure3-1.gif>).

In den letzten Jahrzehnten gewann eine weitere Serie an Elementen immer mehr an Bedeutung. Die Lanthanide, die mit Scandium und Yttrium zu den Seltenerdmetallen gehören, haben heutzutage einen breiten Anwendungsbereich. So werden sie zum Beispiel in Leuchtmitteln, Computer- und Fernsehbildschirmen, als Katalysatoren oder auch in der medizinischen Bildgebung eingesetzt. Mit der starken Nachfrage an Seltenerdmetallen stieg parallel dazu die weltweite Produktion enorm an. Allein im Jahre 2008 wurden 124.000 Tonnen an Seltenerdoxid hergestellt.^[4,6]

Der Abbau, die Herstellungsprozesse sowie die Abfalllagerung der Seltenerdmetalle haben jedoch ernste Auswirkungen auf die Umwelt und Gesundheit des Menschen.

Es ist daher wichtig die chemische Speziation von Lanthaniden und Actiniden im menschlichen Körper aufzuklären. Die Speziation eines Elements beeinflusst dessen Aufnahme, Verteilung, Bindungsverhalten, Bioverfügbarkeit, Toxizität sowie die Exkretion. Durch Kenntnisse über die Speziation können Gesundheitsrisiken besser eingeschätzt und effektive Dekontaminationstherapien entwickelt werden.^[7,8]

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes „TransAqua“ angefertigt, welches sich in verschiedenen Teilprojekten mit der Radioökologie in aquatischen Systemen beschäftigt. Das Teilprojekt *Biokinetische Modelle* dient zur besseren Einschätzung des Gefährdungspotentials von inkorporierten Radionukliden. Ein möglicher Inkorporationsweg

1 Einleitung und Zielstellung

von Lanthaniden und Actiniden ist deren Aufnahme über kontaminierte Lebensmittel und Flüssigkeiten. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Aufklärung chemischer Bindungsformen dreiwertiger Actinide und Lanthanide in Biofluiden des menschlichen Verdauungssystems. Die Speziationsuntersuchungen sollten erstmalig auf molekularer Ebene mit spektroskopischen Methoden erfolgen. Bisherige Arbeiten zur Speziationsbestimmung von Lanthaniden und Actiniden wurden nur anhand von Computersimulationen durchgeführt in denen vorwiegend anorganische Liganden berücksichtigt wurden. An der Verdauung von Nahrungsbestandteilen und Absorption von Nährstoffen sind jedoch eine Vielzahl an Enzymen und Proteinen beteiligt. Diese wurden in den thermodynamischen Modellierungen aufgrund von fehlenden Stabilitätskonstanten bisher vernachlässigt.^[9,10] Demzufolge entsprechen die Computermodelle nicht den physiologischen Bedingungen des Gastrointestinaltraktes und liefern unzureichende Ergebnisse.

Zur Simulierung des menschlichen Verdauungssystems wurde ein *in vitro*-Modell genutzt. Dafür wurden die Verdauungssäfte Speichel, Magensaft, Pankreassaft und Galle synthetisch hergestellt und mittels zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) untersucht. Diese sensitive Methode eignet sich besonders gut zur Untersuchung von lumineszierenden Metallen wie Eu(III) und Cm(III), die als Vertreter der dreiwertigen Lanthanide und Actinide ausgewählt wurden. Im ersten Teilschritt der vorliegenden Arbeit wurde ein spektroskopisches Screening durchgeführt, um dominierende Bindungspartner der Metallionen zu identifizieren. Dafür wurden zunächst die chemischen Bindungsformen von Eu(III) und Cm(III) in den einzelnen Biofluiden bestimmt, um im Anschluss die Speziationsänderung der Metallionen im Verlauf eines Verdauungsvorganges zu untersuchen. Zudem wurden thermodynamische Modellierungen zur Ermittlung der theoretischen Speziation vorgenommen und diese mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden fehlende Komplexbildungskonstanten mit ausgewählten Bioliganden ermittelt und spektroskopische Bindungsstudien von Eu(III) und Cm(III) mit den dominierenden Komplexen durchgeführt.

Durch die Untersuchungen wurden neue Erkenntnisse zum biochemischen Verhalten von dreiwertigen Lanthaniden und Actiniden in Biofluiden des menschlichen Verdauungssystems gewonnen. Daraus können weitere Auswirkungen auf die Aufnahme, den Transport, die Akkumulation und Exkretion dieser Elemente abgeleitet werden, was zu einer besseren Einschätzung des Gefährdungspotentials beiträgt und als Grundlage zur Entwicklung geeigneter Dekontaminationstherapien dient.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Chemie der Lanthaniden und Actiniden

Als Lanthanide (Ln), laut IUPAC Lanthanoide, werden die Elemente der sechsten Periode, die dem Lanthan folgenden Elemente Cer–Lutetium mit den Ordnungszahlen 58–71 zusammengefasst. Bis auf die Ausnahme des instabilen Promethium kommen alle Lanthanide natürlich in der Erdkruste vor und werden vorrangig in Displays und Permanentmagneten, als Lichtquellen oder zur Herstellung von Lasern genutzt. Des Weiteren sind in der Ln-Serie ein Großteil der Seltenerdelemente enthalten, zu denen weiterhin die Elemente der dritten Nebengruppe Scandium und Yttrium zählen. Analog werden in der siebten Periode die Elemente Thorium–Lawrencium mit den Ordnungszahlen 90–103, dem Actinium folgend, als Actinide/Actinoide (An) bezeichnet. Actinide sind radioaktiv und zerfallen unter Abgabe von Energie. Natürlich vorkommend sind nur die primordialen Radionuklide wie Thorium und Uran, die in Mineralien enthalten sein können wie z.B. in Pechblende (Uran). Alle Elemente, die dem Uran folgen, können nur künstlich erzeugt werden und sind unter dem Namen Transurane bekannt. Gewonnen werden diese meist über Neutronen-Beschuss von z.B. Uran in Nuklearreaktoren. Als wichtigstes, synthetisch erzeugtes Radionuklid kann hierbei Plutonium genannt werden, das vor allem als ^{239}Pu zur Energiegewinnung genutzt wird.^[11–15]

2.1.1 Oxidationsstufen der Lanthaniden und Actiniden

Innerhalb des Periodensystems nehmen Lanthanide und Actinide den sogenannten f-Block ein und werden infolgedessen auch als f-Elemente bezeichnet. Bei beiden Element-Serien wird im Laufe der Periode die 4f-bzw. 5f-Schale kontinuierlich mit Elektronen aufgefüllt. Eine Übersicht der zugehörigen Elektronenkonfigurationen der Ln- und An-Elemente ist Tabelle 2.1 zu entnehmen.^[8,11,12]

Im Allgemeinen kann eine Tendenz zur Ausbildung von nicht-, halb- bzw. vollbesetzten Unterschalen erkannt werden. Ausnahmen sind hierbei Ce, Pa, U, Np und Bk. Bei La wird an Stelle des 4f-Orbitals das 5d-Niveau besetzt, da sich dieses noch auf einer energetisch niedrigeren Stufe befindet. Mit der Zunahme an Protonen im Atomkern erhöht sich auch die Stabilität der 4f-Orbitale, sodass ab Ce die 4f-Schale schrittweise aufgefüllt wird. Da nach Eu die Schale einen energetisch günstigen, halbbesetzten Zustand erreicht, wird bei Gd zunächst das d-Orbital besetzt. Auch Lu besitzt ein d-Elektron aufgrund der vollbesetzten 4f-Schale.

Auch bei den frühen Actiniden (Ac–Np) weist das 6d-Orbital eine niedrigere Energie auf als die 5f-Orbitale, sodass das 6d-Niveau eher befüllt wird als die 5f-Schale. Prinzipiell unterscheiden sich beide Gruppen nur im Bau der drittäußersten Elektronenschale (4.

2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 2.1: Elektronenkonfiguration der Lanthaniden und Actiniden.^[11]

Lanthanide		Actinide	
Element	Atom	Element	Atom
Lanthan (La)	$5d^1 6s^2$	Actinium (Ac)	$6d^1 7s^2$
Cer (Ce)	$4f^1 5d^1 6s^2$	Thorium (Th)	$6d^2 7s^2$
Praeseodym (Pr)	$4f^3 6s^2$	Protactinium (Pa)	$5f^2 6d^1 7s^2$
Neodym (Nd)	$4f^4 6s^2$	Uran (U)	$5f^3 6d^1 7s^2$
Promethium (Pm)	$4f^5 6s^2$	Neptunium (Np)	$5f^4 6d^1 7s^2$
Samarium (Sm)	$4f^6 6s^2$	Plutonium (Pu)	$5f^6 7s^2$
Europium (Eu)	$4f^7 6s^2$	Americium (Am)	$5f^7 7s^2$
Gadolinium (Gd)	$4f^7 5d^1 6s^2$	Curium (Cm)	$5f^7 6d^1 7s^2$
Terbium (Tb)	$4f^9 6s^2$	Berkelium (Bk)	$5f^9 7s^2$
Dysprosium (Dy)	$4f^{10} 6s^2$	Californium (Cf)	$5f^{10} 7s^2$
Holmium (Ho)	$4f^{11} 6s^2$	Einsteinium (Es)	$5f^{11} 7s^2$
Erbium (Er)	$4f^{12} 6s^2$	Fermium (Fm)	$5f^{12} 7s^2$
Thulium (Tm)	$4f^{13} 6s^2$	Mendelevium (Md)	$5f^{13} 7s^2$
Ytterbium (Yb)	$4f^{14} 6s^2$	Nobelium (No)	$5f^{14} 7s^2$
Lutetium (Lu)	$4f^{14} 5d^1 6s^2$	Lawrencium (Lr)	$5f^{14} 6d^1 7s^2$

bzw. 5. Schale). So werden die 4f-Elektronen der Lanthanide durch die äußeren, gefüllten 5s,5p-Orbitale vor einem Ligandeneinfluss weitestgehend abgeschirmt, sodass die spektroskopischen und magnetischen Eigenschaften zum größten Teil von der chemischen Umgebung unabhängig sind. Dadurch ergibt sich für Lanthanide eine vereinfachte Situation bzgl. möglicher Oxidationsstufen. Neben der dominierenden, stabilsten Oxidationsstufe von +III können nur Sm, Eu und Yb einen zweiwertigen und Ce, Pr und Tb einen vierwertigen Zustand einnehmen.^[12,14,16]

Komplizierter gestaltet sich das Bild bei den Actiniden. Im Gegensatz zu den Lanthaniden erfahren die 5f-Orbitale der Actinide durch ihre größere radiale Ausdehnung nur eine geringe Abschirmung durch die besetzten 6s,6p-Unterschalen. Infolgedessen sind die 5f-Elektronen weniger stark an dem Atomkern gebunden und somit für chemische Bindungen besser verfügbar. Zudem liegen die Energielevel der 7s-, 6d- und 5f-Elektronen näher beieinander als bei den Lanthaniden. Dies hat zur Folge, dass eine wesentlich geringere Energie aufgewendet werden muss, um ein 5f-Elektron in ein 6d-Orbital anzuregen als ein 4f-Elektron in das zugehörige 5d-Orbital. Damit ergibt sich ein wesentlich größerer Bereich an möglichen Oxidationsstufen von +II bis +VII, was vor allem bei den leichten Actiniden beobachtet werden kann (siehe Tab. 2.2). Der höchste Oxidationszustand entspricht dabei der maximalen Anzahl an Elektronen, die aus der äußersten Schale entfernt werden können. Mit steigender Ordnungszahl nimmt die Energie der 5f-Orbitale kontinuierlich ab, was eine Angleichung der chemischen Eigenschaften an die Lanthanide hervorruft. Somit verhalten sich die späten Actiniden ähnlich den Lanthaniden, sodass ab Cm bevorzugt der dreiwertige Oxidationszustand vorliegt.^[8,11,12,14]

Mit zunehmender Kernladungszahl kann bei beiden Serien eine Abnahme der Ionenradien

2 Theoretische Grundlagen

ihrer dreiwertigen Ionen beobachtet werden, die sich nur in einem geringen Maß voneinander unterscheiden (siehe Abb. 2.1). Durch ihre chemische Ähnlichkeit erweisen sich Lanthanide daher als nützliche Analoga für die radioaktiven Actinide.^[8,14]

Tabelle 2.2: Oxidationsstufen der Actiniden^a.^[14]

Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr
	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	2	2	2	
3	(3)	(3)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	4	4	4	4	4	4	4	4	(4)					
		5	5	5	5	5								
			6	6	6	6								
				7	(7)	(7)								

^afett: stabilste Oxidationsstufe, in Klammern: nur im Festkörper nachgewiesen

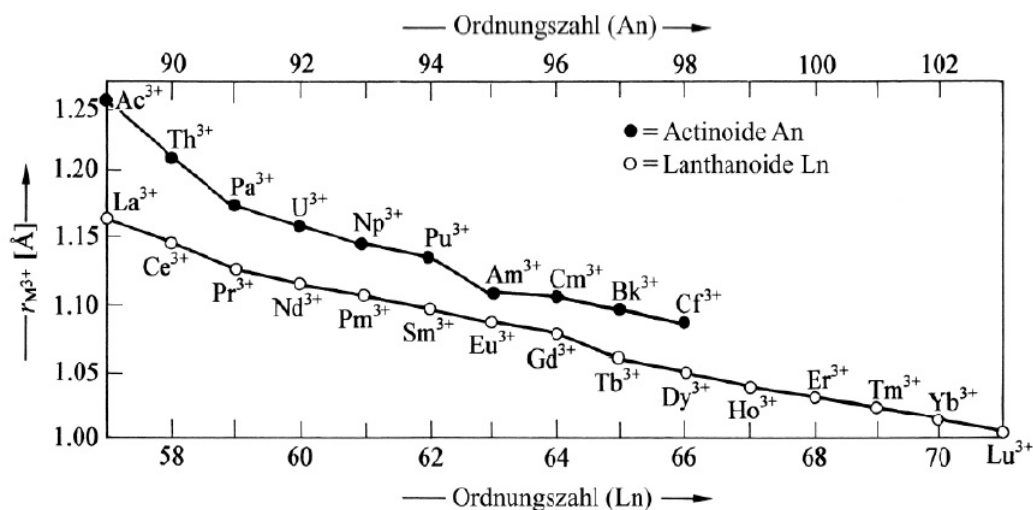


Abbildung 2.1: Lanthanid- und Actinid-Kontraktion dreiwertiger Ionen.^[14]

2.1.2 Koordinationschemie der Lanthanid- und Actinidionen

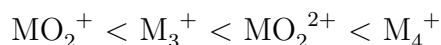
Aquatische Chemie der f-Elementionen

Nach Pearson's HSAB-Prinzip (Hard and Soft Acids and Bases) zählen Ln und An aufgrund ihrer geringen Polarisierbarkeit zu den harten Säuren (kleine, hochgeladene Kationen). Das bedeutet sie bilden bevorzugt stabile Komplexe mit sogenannten harten Basen, die negativ geladene Donor-Gruppen aufweisen wie Sauerstoff oder Fluor. Die Bindung erfolgt hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen. Dabei ist folgender Trend bzgl. ihrer Komplexierungsstärke zu beobachten:



2 Theoretische Grundlagen

In den Oxidationsstufen +III und +IV liegen Actinidionen im wässrigen Medium hydratisiert vor. Actinide höherer Oxidationsstufen bilden in Lösung lineare trans-dioxo Kationen aus, sogenannte Actinyl-Ionen (MO_2^{2+} , MO_2^+) wie zum Beispiel Uran (UO_2^{2+}), Neptunium (NpO_2^+) oder Plutonium (PuO_2^{2+}). Eine wichtige Reaktion der aquatischen Chemie der Actinide stellt die Hydrolyse dar, deren Stärke mit der effektiven Ladung des Metallkations in folgender Reihenfolge zunimmt:



Auch Lanthanide hydrolysieren in wässriger Lösung und bilden dabei verschiedene Hydroxide ($\text{Ln}(\text{OH})_{3\text{aq}}$, $\text{Ln}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Ln}(\text{OH})_2^+$) oder fallen als unlösliche Spezies $\text{Ln}(\text{OH})_{3\text{s}}$ aus. Im Allgemeinen liegen dreiwertige Ln und An unter nicht-komplexierenden, sauren Bedingungen als Aquoionen $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_n]^{3+}$ vor. Abhängig vom Ionenradius sind sie dabei von neun (für größere Ionen) bzw. acht (für kleinere Ionen) Wassermolekülen umgeben. Während einer Komplexbildung konkurrieren Liganden mit den Wassermolekülen des Aquoions. Kommt es zu einem Ligandenaustausch und einem direkten Kontakt zwischen Ligand und Metallion wird von einem inner-sphere-Komplex gesprochen. Bei outer-sphere-Komplexen hingegen ist der Ligand nicht an der ersten Koordinationssphäre des Kations beteiligt und von mindestens einem Lösungsmittelmolekül von diesem getrennt.^[8,13,14,17-20]

Lanthanide und Actinide in biologischen Medien

Lanthanide und Actinide sind exogene, also körperfremde Elemente. Sie können jedoch über verschiedene Wege vom Menschen aufgenommen werden. Am wahrscheinlichsten ist dabei die gastrointestinale Aufnahme über kontaminiertes Essen und Flüssigkeiten sowie die Inhalation von Partikeln in die Lunge. Auch die Absorption über die Haut oder Wunden ist möglich. In der normalen Biochemie des Menschen spielen sie keine spezifische Rolle. Der menschliche Körper besitzt keinerlei Regulationsmechanismen, um nach einer erhöhten Aufnahme eine erleichterte Ausscheidung der Elemente einzuleiten, sodass sich diese zu großen Mengen im Körper ablagern können. Vor allem Actinide stellen aufgrund ihrer Radiotoxizität ein ernsthaftes Gesundheitsrisiko dar. Alle Elemente der Actinidreihe zerfallen unter Aussendung von α -Strahlung und können nach langjähriger Deposition Tumore in den Knochen, der Leber oder Lunge sowie Leukämie hervorrufen. Um nach einer Aufnahme von Radionukliden Gesundheitsfolgen zu reduzieren, wird zur Dekontamination hauptsächlich DTPA (Diethylenetriaminpentaacetat) als Chelat-Ligand eingesetzt. Dieser muss jedoch für eine effektive Dekontamination intravenös injiziert werden. DTPA weist nur eine sehr geringe orale Aktivität auf, sodass nach einer oralen Gabe bei dreiwertigen Actiniden lediglich eine moderate und bei U(VI) sogar keine Effektivität zu beobachten ist.^[21-24]

Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Lanthaniden und Actiniden in biologischen Medien wurden vor allem für die Biofluide Blut und Urin durchgeführt.^[21,25,26] Bei einer oralen Inkorporation wären jedoch die ersten Kontaktmedien Biofluide des Verdauungssystems: Speichel, Magen-, Pankreassaft und Galle. Dennoch wurden bisher nur wenige Speziationsuntersuchungen von Lanthaniden und Actiniden im menschlichen Gastrointestinaltrakt durchgeführt.

Da für die Absorption in den Blutkreislauf nach einer oralen Ingestion nur ein kleiner fraktioneller Absorptionsfaktor von $5 \cdot 10^{-4}$ für Lanthanide und Actinide bestimmt wurde,

2 Theoretische Grundlagen

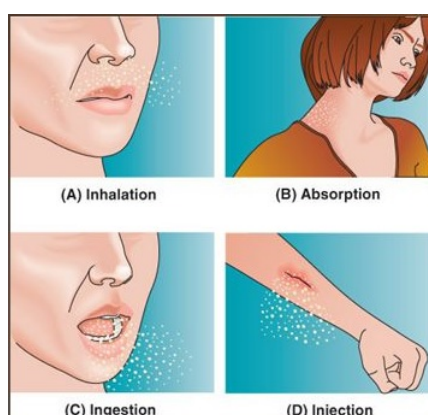


Abbildung 2.2: Interne Exposition (http://images.slideplayer.com/23/6668399/slides/slide_49.jpg).

wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur Speziation von Ln/An im Gastrointestinaltrakt durchgeführt. Jedoch ist der Faktor individuell abhängig vom Alter und Gesundheitszustand. So kann ein erhöhter Wert bei Kleinkindern oder Eisenmangel festgestellt werden. Die Absorption erfolgt hauptsächlich im Dünndarm über die Darmwand.^[13,21,22,27]

Einmal gelöst und ins Blut transportiert ist die Verteilung in Gewebe und die anschließende Exkretion unabhängig vom Aufnahmeweg. Vor allem im Skelett und der Leber werden Lanthanide und Actinide aller Oxidationsstufen abgelagert, in kleineren Mengen auch in Muskeln, der Milz oder der Lunge. Ausnahme ist das Uranyl-Ion UO_2^{2+} , welches bei neutralen pH gegenüber Hydrolysen eine größere Stabilität besitzt. Als Folge dessen werden Uranyl-Ionen weniger im Knochen oder der Leber aufgenommen, sondern vorrangig in der Niere gespeichert und zu großen Teilen mit dem Urin ausgeschieden. Eine Verteilungsübersicht ausgewählter An und Ln in Organen und Geweben kann den Tabellen 2.3 und 2.4 entnommen werden.^[21,27,28]

Tabelle 2.3: Verteilung von Actinidionen in Geweben und Organen.^[27]

Actinid	Zeit [d]	Gewebe [%]				Exkrete [%]	
		Skelett	Leber	Niere	anderes Gewebe	Urin	Faeces
$^{241}\text{Am}^{3+a}$	4	31	69	-	-	-	-
$^{241}\text{Am}^{3+b}$	4	35	42	-	3	10	10
$^{237}\text{Pu}^{4+a}$	20	32	~59	-	6	2	2
$^{239}\text{Pu}^{4+a}$	4	67	10	2	8	1	11
$^{234,235,238}\text{UO}_2^{2+a}$	1	15	-	18	5	63	-
$^{233}\text{UO}_2^{2+b}$	4	21	0,2	20	2	56	-

^aMensch

^bTierdaten (Ratten)

2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 2.4: Verteilung von Lanthanidionen in Geweben und Organen^a.^[29]

Lanthanid	Ionen- radius [pm]	Zeit [d]	Gewebe [%]			Exkrete [%]	
			Skelett	Leber	anderes Gewebe	Urin	Faeces
Ce ³⁺	103	4	28	51	6	6	9
Nd ³⁺	100	4	31	27	10	22	10
Eu ³⁺	95	4	36	25	11	17	11
Tb ³⁺	92	4	60	7	10	16	7
Ho ³⁺	89	4	56	2	8	21	13
Lu ³⁺	85	4	68	3	6	16	7

^aTierdaten (Ratte)

Die Daten variieren dabei stark bei unterschiedlichen Tierrassen, dem Alter, Geschlecht oder auch dem Gesundheitszustand. Ein wichtiger Faktor, der den Transport und die Verteilung der Metallionen beeinflusst, ist die Ionengröße. Mit sinkendem Ionenradius ist eine erhöhte Aufnahme in den Knochen und eine erniedrigte Einlagerung in der Leber zu beobachten (siehe Tab. 2.4). Vor allem dreiwertige Actinide wie Cm(III) und Am(III) werden rasch aus dem Blutstrom eliminiert und zu 95 % innerhalb einer Stunde in den Zielorganen gespeichert. Pu(IV) hingegen kann nach einer Stunde nur zu 30 % in Knochen und weichem Gewebe gefunden werden. Ursache hierfür ist die stärkere Bindung des Radionuklids an das Eisentransportprotein Transferrin (Tf), sodass Pu(IV) wesentlich langsamer aus dem Blutstrom abgegeben wird als die schwach gebundenen dreiwertigen Metallionen. Das Blutserum-Protein ist aufgrund seiner Eisen-Bindungsseiten eines der wichtigsten Metall-Transporter. Dabei sind jedoch nur etwa 30 % der Tf-Moleküle mit Eisen gesättigt, sodass nicht-gesättigtes Tf für die Komplexierung von anderen Metallionen zur Verfügung steht. Neben Eisen wurden bereits über 30 weitere drei- und vierwertige Metallionen identifiziert, die an das Protein binden können. Als Beispiele für Ln und An können dabei Nd(III), Th(IV), Np(IV), Am(III) und Cm(III) genannt werden.^[25,30] Eine Studie von Bauer et al.^[25] untersuchte die Komplexierung zwischen Transferrin und Cm(III). In Abhängigkeit des pH-Wertes konnten sie die Ausbildung von zwei Cm(III)-Spezies beobachten. Im pH-Bereich 5–8,0 wurde eine partielle Komplexierung des Proteins mit der Cm(III)-Komplex-Spezies 1 festgestellt während von pH 8,3 bis 11,0 eine Inkorporation der Cm(III)-Komplex-Spezies 2 in eine Eisen-Bindungsseite erfolgt. Zwischen pH 7,4 und 9,0 liegen beide Spezies nebeneinander vor. Zudem weist das C-terminale Ende des Transferrins eine höhere Bindungsaffinität auf als der N-Terminus. Die Anwesenheit von Carbonat-Ionen unterdrückt die Ausbildung der Cm(III)-Komplex-Spezies I, wirkt jedoch als Synergist für die Cm(III)-Komplex-Spezies 2.^[25,31]

Weitere Bindungspartner im Blutplasma stellen das Serum Albumin oder Hämoglobin dar. Das menschliche Serum Albumin (HSA) ist das am häufigsten vorkommende Protein im Blutplasma (~ 55 % des totalen Proteingehalts im Plasma) und spielt eine zentrale Rolle beim Transport von wasserunlöslichen Molekülen wie Fettsäuren, Hormonen, Bilirubin, Pharmaka oder auch Metallionen. Eine Wechselwirkung zwischen An und den Polypeptid-

2 Theoretische Grundlagen

Liganden von HSA führt dabei zu einer Entfaltung des Proteins und einer strukturellen Änderung der Sekundärstruktur durch die Bindung der Metallionen an Carbonyl- und Amid-Gruppen.^[30,32] Auch das Hämoglobin (Hb) ist eines der häufigsten Metalloproteine im Blut (38%). Hb enthält ebenfalls Eisen und ist für die Bindung und den Transport von Sauerstoff verantwortlich. Eine Studie von Kumar et al. [32] postuliert ein Verhältnis zwischen Ladung und Ionenradius von Metallionen als Grundlage für die Wechselwirkungen mit Hb. Das Verhältnis soll die Bindungsseite des Metallions im Protein steuern und somit deren Effektivität beeinflussen. Eine Ähnlichkeit des Ladung:Ionenradius-Verhältnis von Metallionen zu dreiwertigen Eisen kann bei höherer Konzentration zu biochemischen und funktionellen Störungen führen. Wechselwirkungen zwischen Hb und Metallionen können beispielsweise einen Verlust der α -Helix-Struktur im Protein verursachen oder die Sauerstoff-Affinität beeinflussen.^[30,32] Zudem können dreiwertige Lanthanide und Actinide aufgrund ihres ähnlichen Ionenradius zu Ca(II) dessen Bindungsplätze in Proteinen, wie zum Beispiel in Calmodulin, einnehmen.

Von der ICRP (International Commission on Radiological Protection) wird für Actinide eine biologische Halbwertszeit von 50 bzw. 20 Jahren im menschlichen Skelett und der Leber angenommen. Eine Studie mit ^{88}Y als Stellvertreter dreiwertiger Lanthanide ermittelte eine Halbwertszeit von 2,5 Jahren. Der dominierende Ausscheidungsweg ist sowohl für An als auch Ln über den Urin.^[21,22,29,33]

2.2 Das menschliche Verdauungssystem

Das menschliche Verdauungssystem ist zuständig für die Aufnahme, Zerkleinerung, Verdauung und Resorption der Nahrung und versorgt somit den Körper mit Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen. Es besteht aus mehreren Segmenten (siehe Abb. 2.3), wobei jeder Abschnitt spezielle und charakteristische Funktionen aufweist. Die Verdauung beginnt bereits im Mund, aufgenommene Nahrung wird aus der Mundhöhle über den Oesophagus (Speiseröhre) in den Magen transportiert, wo diese zunächst zeitlich gespeichert und durch die Magensäure desinfiziert wird. Anschließend wird der sogenannte Chymus (Speisebrei) portionsweise an den Dünndarm abgegeben, wo ein Großteil der Verdauung und die Resorption von Nährstoffen stattfinden. Der Dünndarm besteht aus drei Abschnitten:

- Duodenum (Zwölffingerdarm)
- Jejunum (Leerdarm)
- Ileum (Krummdarm)

Nachfolgend der Dickdarm, der letzte Teil des Verdauungstraktes, in dem der Entzug von Wasser und weiteren Ionen aus dem Darminhalt zur Vorbereitung der Ausscheidung stattfindet.

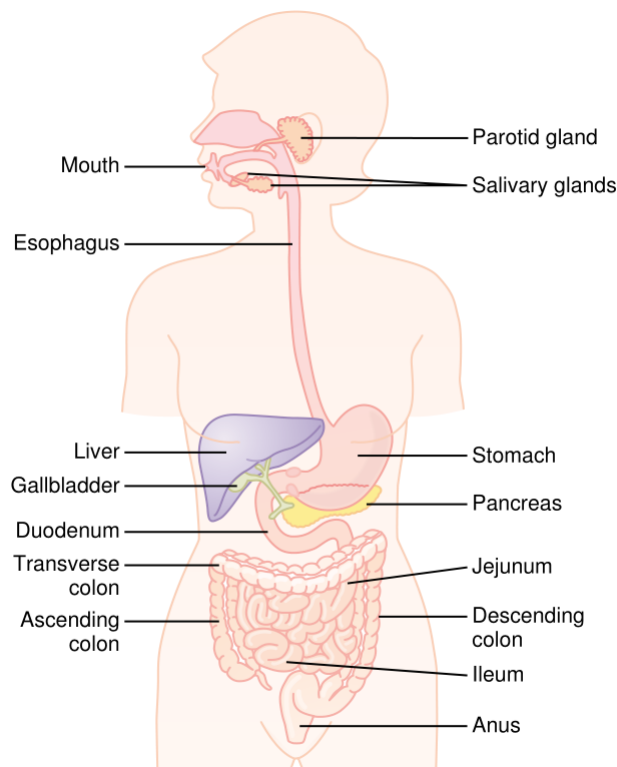


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Magen-Darm-Trakts.^[34]

Sowohl die Motilität (lat. *motio* = Bewegung) als auch die Sekretion von Verdauungssäften und die Absorption von Nährstoffen werden über lokale, hormonelle und nervale Systeme

kontrolliert und zugleich gesteuert. Zudem sind am Vorgang der Verdauung mechanische und biochemische Prozesse beteiligt. Durch die Peristaltik der Magen-Darm-Muskulatur wird Nahrung zerkleinert, mit verschiedenen Verdauungssekreten vermischt und durch den Gastrointestinaltrakt (Magen-Darm-Trakt, von griech. *gaster* = Magen und lat. *intestinum* = Darm) transportiert. Die Zerlegung von Makromolekülen in deren kleinste Bausteine erfolgt hingegen anhand von Hydrolysen, die durch eine Vielzahl an Enzymen katalysiert werden. Die Enzyme sind Bestandteile von verschiedenen Verdauungssäften, die für die Verdauung und Resorption benötigt werden.^[34–37]

2.2.1 Speichelsekretion

In der Mundhöhle erfolgt neben der Zerkleinerung von Nahrung die Produktion von Speichel, welcher von Drüsen sezerniert wird. Speichel besteht zu 99 % aus Wasser mit einer Vielzahl an Elektrolyten (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Magnesium, Bicarbonat, Phosphat, Thiocyanat) und Proteinen. Die durchschnittliche Sekretmenge liegt zwischen 1–1,5 L/d, wobei diese als auch der Gehalt an Ionen und Proteinen abhängig von der aufgenommenen Nahrung sind. Zudem verändert sich die Zusammensetzung des Speichels durch Ausführungsvorgänge (Ionenaustauschprozesse) innerhalb der produzierenden Drüsen (siehe Abb. 2.4). Der Primärspeichel weist anfangs eine plasmaähnliche Elektrolyt-Zusammensetzung auf mit hohen Natrium- und Chloridkonzentrationen, das sekundäre Sekret ist hingegen reich an Hydrogencarbonat- und Kalium-Ionen. Der pH-Wert im Speichel kann zwischen 6 und 7 schwanken.

Zudem sind im Speichel mehrere Proteinfamilien enthalten wie Enzyme (α -Amylase, linguale Lipase, Lysozym), Immunoglobuline (IgA), antimikrobielle Faktoren, Mucine, Spuren von Albumin sowie weitere Makromoleküle (Prolin-reiche Proteine, Cystatine, Histatine und Statherine) und stickstoffhaltige Produkte (z.B. Harnstoff).

Als proteolytisches (von griech. *lysis* = Auflösung, Eiweiß abbauend) Enzym wirkt das Lysozym, unterstützend zu den Thiocyanat-Ionen, antibakteriell. Die Aufgabe der α -Amylase (Ptyalin, EC 3.2.1.1), dem häufigsten Speichelprotein, besteht im Abbau von Polysacchariden wie Stärke, Glykogen und Dextrinen. Die Amylase katalysiert dabei die Hydrolyse von α -1,4-glykosidischen Bindungen wie zum Beispiel bei Amylose und Amylopektin, den Bestandteilen von Stärke. Als Folgeprodukte werden Maltose, Maltotriose sowie Dextrine gebildet, wie schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt. 1,6-glykosidische Bindungen, die auch im Amylopektin oder Glykogen enthalten sind, können nicht gespalten werden.

2 Theoretische Grundlagen

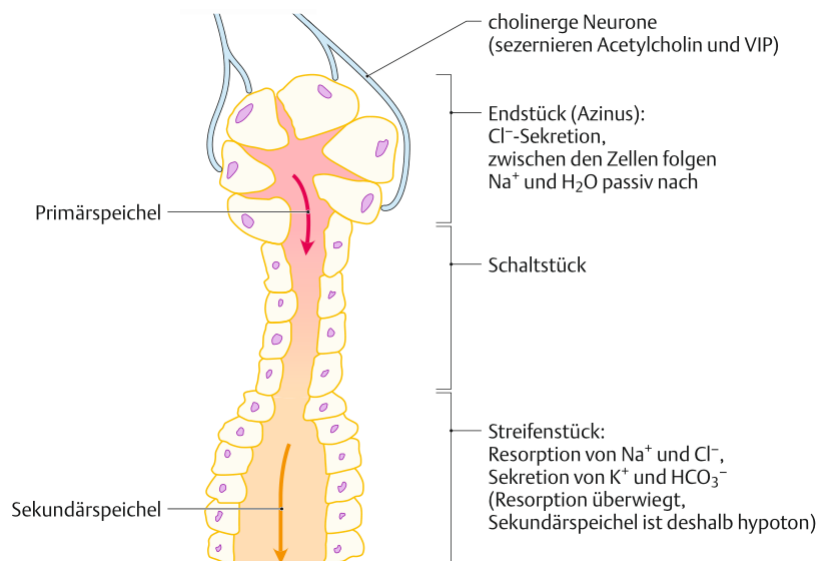


Abbildung 2.4: Speichelproduktion: Der Speichel wird von insgesamt drei Drüsen produziert (Glandulae submandibularis, sublingualis und parotis), wobei 70 % des Speichels von den Gl. submandibularis und 25 % von den Gl. parotis geliefert werden. Der Primärspeichel wird in den Azinuszellen der Speicheldrüsen-Endstücke gebildet und anschließend in die Ausführungsvorgänge sezerniert. Dort werden im Streifenstück Natrium- und Chlorid-Ionen resorbiert und Hydrogencarbonat- und Kalium-Ionen sezerniert, was zur Bildung des Sekundärspeichels führt.^[38]

Insgesamt werden jedoch nur etwa 5 % der Stärke aus der Nahrung abgebaut, sodass die α -Amylase nur einen geringen Beitrag zur Verdauung leistet. Es wird daher vermutet, dass das Enzym primär für die Zahnreinigung durch die Hydrolyse von Nahrungsresten verantwortlich ist. Auch die im Speichel enthaltene Lipase trägt nur bei Säuglingen aufgrund der geringen Sekretion der Pankreaslipase einen wesentlichen Anteil zur Verdauung der Milchlipide bei.^[34–36,38–43]



Abbildung 2.5: Enzymatische Spaltung der Stärke.^[44]

2.2.2 Magensaftsekretion

Nach der Durchmischung des Bolus (lat. Bissen) mit dem Speichel gelangt dieser über die Speiseröhre in den Magen, wo eine weitere Zerkleinerung und Homogenisierung der aufgenommenen Nahrung über peristaltische Kontraktionswellen erfolgt. Zudem wird der Speisebrei mit dem sezernierten Magensaft vermischt (Sekretmenge: 2–3 L/d). Die durchschnittliche Magenverweildauer des Chymus liegt zwischen 1–5 h, bevor dieser an den Dünndarm (Duodenum) weitergegeben wird. Feste Nahrung kann bis zu fünf Stunden im Magen verbleiben; breiige Nahrung 1–2 h.

Bei dem Magensekret handelt es sich um eine plasmaisotone ¹ Flüssigkeit, die aus Verdauungsenzymen (Pepsin, Magenlipase), Mucinen, dem Intrinsic Factor, Bicarbonat-Ionen und einer hohen Salzsäure-Konzentration besteht. Bei dem Intrinsic Factor handelt es sich um ein Glykoprotein, welches ebenfalls im Magen sezerniert (von lat. *secernere* = absondern) wird und anschließend im Ileum für die intestinale Resorption des Vitamins B12 verantwortlich ist.

Aufgrund der hohen Säurekonzentration herrscht im Magen ein saurer pH-Wert von 0,8 bis 1,5. Zum Schutz des Magenepithels vor Selbstverdauung und Säureschäden werden Mucine abgesondert, die eine Schutzschicht (Mucus) bilden (siehe Abb. 2.6, Schritt 1). Diese kann allerdings durch Alkohol und Medikamente wie Acetylsalicylsäure geschädigt werden. Als weiterer Schutz gegenüber der luminalen Säure wird über die Magenmukosa zusätzlich ein bicarbonatreiches Sekret produziert (siehe Abb. 2.6, Schritt 2), sodass ein pH-Gradient zwischen den Zelloberflächen des Magenepithels (pH 7) und dem Lumen (pH < 2) entsteht. In die Mukosa zurückdiffundierende H⁺-Ionen werden somit neutralisiert. Als Reaktionsprodukt entsteht dabei H₂CO₃, welches jedoch zu CO₂ und H₂O zerfällt.

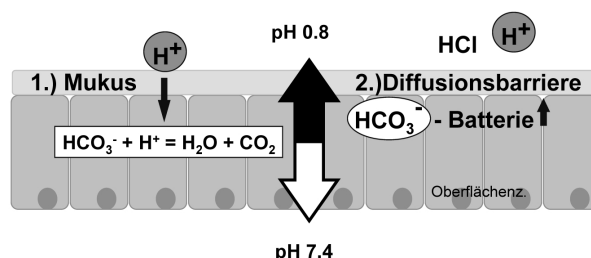


Abbildung 2.6: Diffusionsbarriere der Mukosa.^[41]

Die Hauptaufgaben der Magensäure bestehen vor allem im Abtöten pathogener Mikroorganismen sowie der Aktivierung des Pepsins, welches zunächst als Pepsinogen, der inaktiven Vorstufe, sezerniert wird. Unterhalb pH 4 erfolgt durch eine Konformationsänderung die Umwandlung in das aktive Enzym. Als erster Schritt der Proteinverdauung werden diese im sauren Milieu des Magens denaturiert und durch die Protease Pepsin hydrolytisch in Polypeptide gespalten. Hierbei werden weniger als 20 % der Nahrungseiweiße verdaut. Auch die Fettverdauung spielt im Magen quantitativ nur eine untergeordnete Rolle, da die Magenlipase nur in geringen Mengen gebildet wird.^[35–38,41,45–48]

¹Bezeichnung für eine Lösung, die denselben osmotischen Druck aufweist wie das menschliche Blut.^[45]

2.2.3 Pankreassaftsekretion

Wie vom Namen abzuleiten, wird dieses Fluid im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) produziert (1–1,5 L/d) und anschließend in den oberen Teil des Dünndarms (Duodenum) abgesondert. Das Sekret besteht vorwiegend aus Wasser, Bicarbonat, Elektrolyten und organischen Verbindungen. Zudem enthält es die meisten (über 20) und wichtigsten Verdauungsenzyme. In Tabelle 2.5 ist eine Übersicht der häufigsten Hydrolasen des Pankreassafts dargestellt.

Tabelle 2.5: Wichtige Hydrolasen des Pankreassafts und deren jeweilige Spezifität.^[35]

Enzym	Spezifität ^a
<i>proteolytische Wirkung (Eiweiß)</i>	
Trypsin	Endopeptidase, basische Reste
Chymotrypsin	Endopeptidase, aromatische Reste
Elastase	Endopeptidase, hydrophobe Reste
Carboxypeptidase A	Exopeptidase, nichtbasische Reste
Carboxypeptidase B	Exopeptidase, basische Reste
Aminopeptidase	Exopeptidase, Aminoende
<i>amylolytische Wirkung (Stärke)</i>	
α -Amylase	Endoglykosidase/1,4- α -Glykosidbindungen
<i>nukleolytische Wirkung (Nukleinsäuren)</i>	
Ribonuklease	Phosphodiesterbindungen in Ribonukleinsäuren
Desoxyribonuklease	Phosphodiesterbindungen in Desoxyribonukleinsäuren
<i>lipolytische Wirkung (Fett)</i>	
Cholesterinesterase	Cholesterinester
Phospholipase A	Fettsäureester in Position 2
Lipase	Fettsäureester in Position 1 und 3

^aEndoenzyme: Spaltung innerhalb Protein; Exoenzyme: Spaltung am Proteinende

Eine weitere Hauptaufgabe des Sekrets ist die Neutralisation des sauren Chymus, der vom Magen in den Duodenum weitergeleitet wird. Die Neutralisation der Magensäure erfolgt durch die Durchmischung des abgesonderten Bicarbonats aus dem Pankreas, der Leber sowie der duodenalen Mukosa. Somit wird ein nahezu neutraler pH-Bereich zwischen 7 und 8 erreicht, der den optimalen Wirkungsbereich der Pankreasenzyme darstellt.

Mit Hilfe der Pankreas-Amylase wird die enzymatische Hydrolyse der Stärke in Monosaccharide fortgesetzt. Die Proteasen werden zunächst in einer inaktiven Vorstufe produziert und erreichen erst im Darmlumen ihre Aktivität. Die Enzyme Chymotrypsin und Trypsin spalten die Nahrungsproteine in Polypeptide auf. Es entstehen 30–40% freie Aminosäuren, der Rest setzt sich aus Oligopeptiden zusammen, die aus sechs bis sieben Aminosäuren aufgebaut sind. Durch die Carboxypeptidasen A und B werden die Aminosäuren vom C-terminalen Ende hydrolysiert. Als Esterase ist die Pankreaslipase für die Hydrolyse von Triglyceriden zuständig, diese werden über Diglyceride in Monoglyceride, Glycerol und freie Fettsäuren abgebaut. Die Hydrolyse von Phospholipiden, den Bestandteilen biologi-

scher Zellmembranen, wird durch die Phospholipase ausgeführt. Bei der Cholesterinesterase handelt es sich um eine unspezifische Esterase, die nicht nur Ester aus Cholesterin und Fettsäuren spaltet, sondern auch andere Ester hydrolysieren kann. Die Verdauung der Nucleinsäuren zu Oligo- und Mononukleotiden wird durch spezifische Nukleasen eingeleitet.

Durch die Vielzahl an Enzymen erfolgt durch den Pankreassaft eine nahezu vollständige Verdauung der Nahrung.^[35,36,38,49,50]

2.2.4 Sekretion der Gallenflüssigkeit

Die Leber (Hepar) sondert täglich 600–1000 mL Gallenflüssigkeit in den oberen Dünndarmabschnitt ab. Beim dem Sekret handelt es sich um eine komplexe Mischung diverser Bestandteile, die in Tabelle 2.6 aufgelistet sind.

Tabelle 2.6: Bestandteile des Gallensekrets.^[51]

sekretorische Bestandteile
Gallensäuren und Gallenalkohole
Glutathion
exkretorische Bestandteile
Cholesterin
Bilirubin (und Biliverdin)
Schwermetalle (zum Beispiel Eisen und Kupfer)
lipophile Pharmaka
Xenobiotika (zum Beispiel Lignane und Triterpene)
Konjugate von fettlöslichen Vitaminen, Steroidhormonen, Retinsäure, Vitamin-D-Derivaten
Vitamine: Haptocorrin-B12-Komplex, Glucosaminsalz
sonstige Bestandteile
Phospholipide (vor allem Lecithine)
Mukus
Immunoglobuline
H ⁺ , HCO ₃ ⁻
organische Säuren
Elektrolyte

Zu den wichtigsten organischen Komponenten der Galle zählen die Gallensäuren, Cholesterin, Phospholipide und Gallenfarbstoffe. Als wichtigste anorganische Ionen können Na⁺, K⁺, Cl⁻ und HCO₃⁻ aufgeführt werden. Zusätzlich werden auch Produkte des Fremdstoffmetabolismus (z.B. Abbau von Medikamenten–Xenobiotika, Steroidhormone) und Abfallprodukte im Gallensekret abgesondert. Zu Letzteren gehören die Gallenfarbstoffe, bei denen es sich um Abbauprodukte des Hämoglobins handelt (z.B. Bilirubin).

Aufgrund des basischen pH-Wertes von 8,2 liegen die Gallensäuren als negativ geladene Ionen vor. In dieser Form werden sie als Gallensalze bezeichnet und sind zudem meist mit Glycin oder Taurin konjugiert. Sie wirken als Detergens, da sie als Ampholyt durch

2 Theoretische Grundlagen

Carboxyl- und Hydroxylgruppen eine hydrophile Oberseite und durch ihr Steroidgerüst eine hydrophobe Unterseite aufweisen (siehe Abb. 2.7).

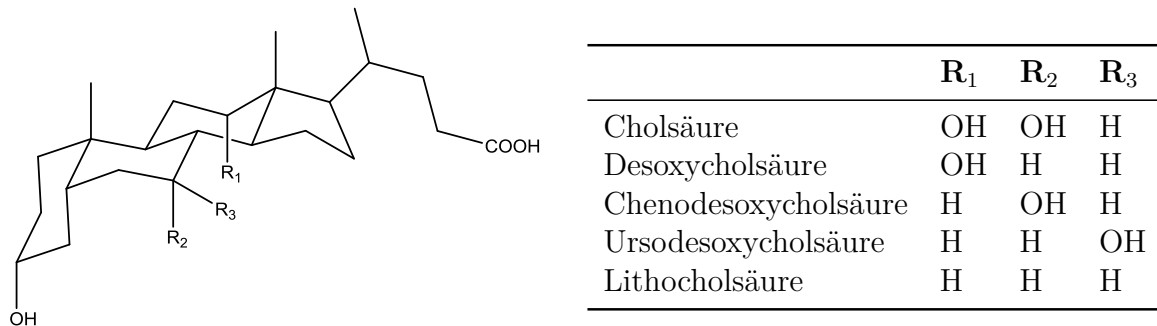


Abbildung 2.7: Strukturen verschiedener Gallensäuren.^[52]

Das Gallensekret trägt zum einen durch seine hohe Bicarbonatkonzentration zur Neutralisation des Chymus bei und ist zum anderen für die Fettverdauung und Absorption verantwortlich. Dabei lösen die Gallensalze Lipide aus den Nahrungsbestandteilen heraus und emulgieren sie, indem die Oberflächenspannung zwischen der Phasengrenzfläche herabgesenkt wird. Ab einer kritischen Mizellenkonzentration kommt es zur Ausbildung von Mizellen und somit zur Spaltung der Lipid-Aggregate in kleine Lipidtröpfchen, deren Oberfläche nun gut für die Pankreaslipase und andere Enzyme zugänglich ist (siehe Abb. 2.8).

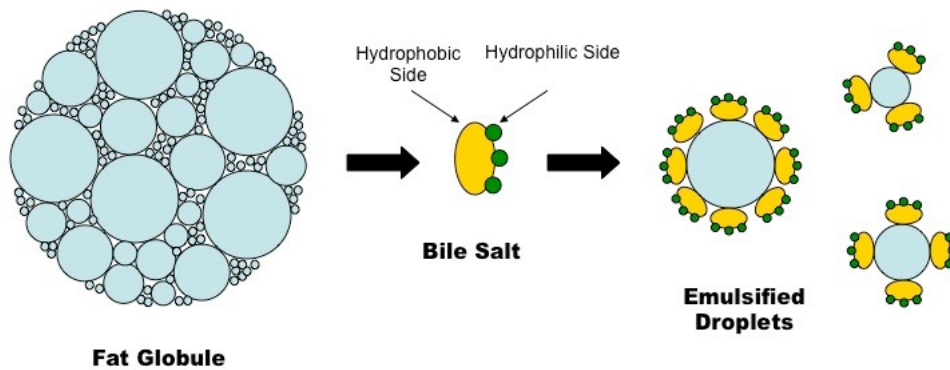


Abbildung 2.8: Emulgierung eines Lipids durch Gallensalze.^[53]

Über den enterohepatischen Kreislauf resorbieren bis zu 94 % der Gallensalze über Diffusion oder aktive Transportprozesse durch die Darmmukosa ins Blut und werden erneut der Leber zugeführt. Insgesamt rezirkuliert die Gallenflüssigkeit bis zu 17 mal, bevor sie über die Faeces (lat. Fäkalien) ausgeschieden wird.^[34–36,38,45,51,52]

2.3 Lumineszenzspektroskopie

2.3.1 Spektroskopische Grundlagen

Mit Hilfe der Spektroskopie werden die Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie untersucht. Dabei besteht elektromagnetische Strahlung aus Teilchen, sogenannten Photonen, die die Energie $h\nu$ besitzen mit dem Planckschen Wirkungsquantum h und der Frequenz ν , die sich aus dem Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit c zur Wellenlänge λ ergibt.^[54,55]

$$E = h \cdot \nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.1)$$

Die Energie ist somit abhängig von der Frequenz bzw. der Wellenlänge der eingestrahnten Photonen, die von Atomen/Molekülen entweder absorbiert, emittiert oder gestreut werden können. Durch Absorption eines Photons wird dessen Energie auf ein Elektron übertragen, welches vom Grundzustand S_0 auf ein Level höherer Energie angehoben wird. Es befindet sich in einem angeregten Singulett-Zustand S_x . Eine schematische Darstellung von Übergangsprozessen zwischen Energiezuständen ist Abbildung 2.9 zu entnehmen.^[12,54-57]

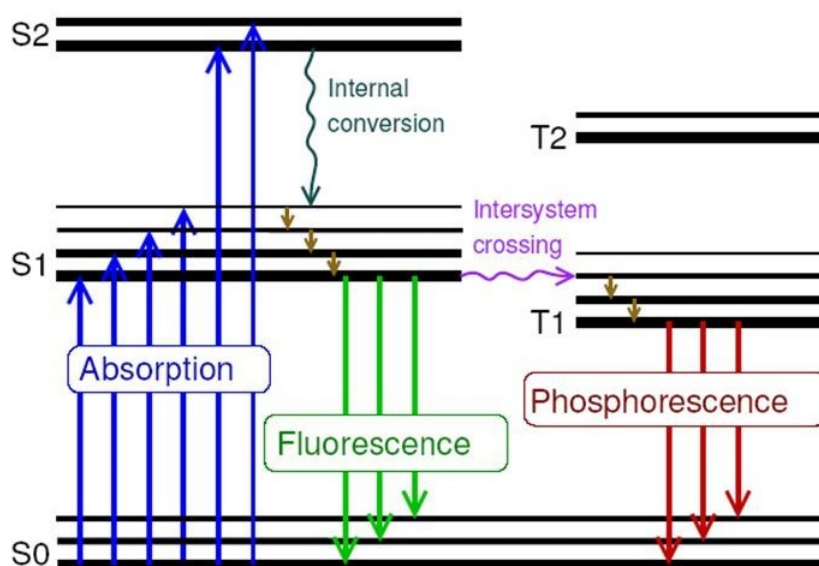


Abbildung 2.9: Jablonski-Termschema: Dargestellt sind Energiezustände (schwarze Linien) und Übergangsprozesse zwischen Energiezuständen (blau: Absorption, grün: Fluoreszenz und rot: Phosphoreszenz).^[58]

Dabei sind nicht alle Übergänge zwischen Energiezuständen erlaubt. Energetisch höhere Zustände werden nur mit Elektronen besetzt, wenn Atome/Moleküle mit Licht (z.B. UV-Licht) einer bestimmter Wellenlängen bestrahlt werden, das mit der Energie eines erlaubten Übergangs übereinstimmt. Erst dadurch entstehen diskrete Atom- und Molekülspektren.

Die Rückkehr zum Grundzustand erfolgt über mehrere Schritte. Zunächst kommt es zu einem Übergang zwischen elektronisch angeregten Zuständen (Internal Conversion) durch Stöße des angeregten Moleküls mit Teilchen der Umgebung. Dabei wird Energie in Form von

Rotations-, Schwingungs- und Translationsenergie strahlungslos abgegeben, die wiederum in thermische Energie (Wärme) der Umgebung umgewandelt werden kann. Nach einer strahlungslosen Desaktivierung befindet sich das Photon im niedrigsten Zustand des Singulets. Die verbleibende Anregungsenergie ($E=h\nu'$) wird anschließend durch Emission abgegeben, die jedoch bei einer kleineren Frequenz stattfindet als bei der Absorption ($h\nu' < h\nu$). Diese Verschiebung wird im Allgemeinen auch als Stokes-Shift bezeichnet.

Die Emission zum Grundzustand S_0 kann nun auf zwei Wegen erfolgen. Der direkte Übergang, bei dem die Multiplizität des Systems erhalten bleibt ($\Delta S=0$), wird als Fluoreszenz bezeichnet und hält für einige Nanosekunden an. Beim Prozess der Phosphoreszenz wird durch Entkopplung des Elektronenspins von antiparallel zu parallel ein strahlungsloser Übergang zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (Intersystem Crossing) zum Triplett-Zustand T ($\Delta S \neq 0$) ermöglicht. Die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand S_0 ist nun jedoch spinverboten bzw. nur schwach erlaubt, sodass die Desaktivierung nur sehr langsam erfolgt und die Phosphoreszenz einige Sekunden bis sogar Stunden andauern kann.^[12,55,57,59]

Nach dieser Einteilung sind die untersuchten Prozesse dieser Arbeit der Phosphoreszenz zuzuordnen, da die Lebensdauern der angeregten Eu(III)/Cm(III)-Spezies im Mikro- bis Millisekunden-Bereich liegen und ein Spinwechsel erfolgt. In der Literatur wird jedoch meist für die Lumineszenz des Eu(III) und Cm(III) der Begriff der Fluoreszenz verwendet. Aus diesem Grund werden die Prozesse der Fluoreszenz und Phosphoreszenz in dieser Arbeit nicht unterschieden und im Folgenden unter dem Oberbegriff der Lumineszenz zusammengefasst.

2.3.2 Europium- und Curium- Spektroskopie

Außer den Elementen Lanthan und Lutetium weisen alle dreiwertigen Lanthanidionen Lumineszenzprozesse auf, so auch Europium, welches als Vertreter der Lanthanid-Serie ausgewählt wurde.^[56] In der Oxidationsstufe +III besitzt Europium die Elektronenkonfiguration $[\text{Xe}]4f^6$, welche durch verschiedene Wechselwirkungen in diverse Energielevel aufgespalten wird wie in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt ist.^[60]

Durch Elektron-Elektron-Abstoßungen (Coulomb-Wechselwirkung) innerhalb der 4f-Orbitale kommt es zu einer Aufspaltung der elektronischen Konfiguration in ^{2S+1}L -Terme mit den Quantenzahlen S (Gesamtspin) und L (Gesamtbahndrehimpuls). Jeder dieser Terme wird durch die Kopplung verschiedener LS-Zustände (Spin-Bahn-Kopplung) weiter in J-Level aufgespalten. Diese repräsentieren das freie Ionen-Level und werden mit der Quantenzahl J (Gesamtdrehimpuls) und dem Termsymbol $^{2S+1}L_J$ beschrieben. Durch den Kristallfeldeffekt, oder auch Stark-Effekt genannt, ist eine zusätzliche Aufspaltung der 7F_J -Level in Sublevel (Stark-Level) möglich. Verursacht wird die Aufspaltung durch Wechselwirkungen zwischen den 4f-Elektronen des Eu(III) und den Elektronen des Liganden. So kann zum Beispiel der 7F_1 -Zustand in drei weitere Stark-Level aufgespalten werden.^[60-63]

Aufgrund der Abschirmung der 4f-Elektronen durch die äußeren, gefüllten 5s, 5p-Orbitale ist die Kristallfeldaufspaltung allgemein bei Lanthanidionen nur schwach ausgeprägt, sodass nur ein geringer Ligandeneinfluss zu beobachten ist und die Stark-Level somit energetisch nah beieinander liegen (10^2 cm^{-1}). Der Grundzustand von Lanthaniden ist somit unabhängig vom Ligandenfeld und kann mit Hilfe des Russel-Saunders-Kopplungsschema und dem Termsymbol $^{2S+1}L_J$ beschrieben werden. Das Russel-Saunders-Kopplungsschema kann bei

2 Theoretische Grundlagen

schwachen Spin-Bahn-Kopplungen, wie sie bei leichten Lanthaniden vorzufinden sind, angewendet werden. Für das dreiwertige Europium-Ion ergibt sich somit unter Anwendung der Hund'schen Regeln ein 7F_0 -Grundzustand.^[12,56,64]

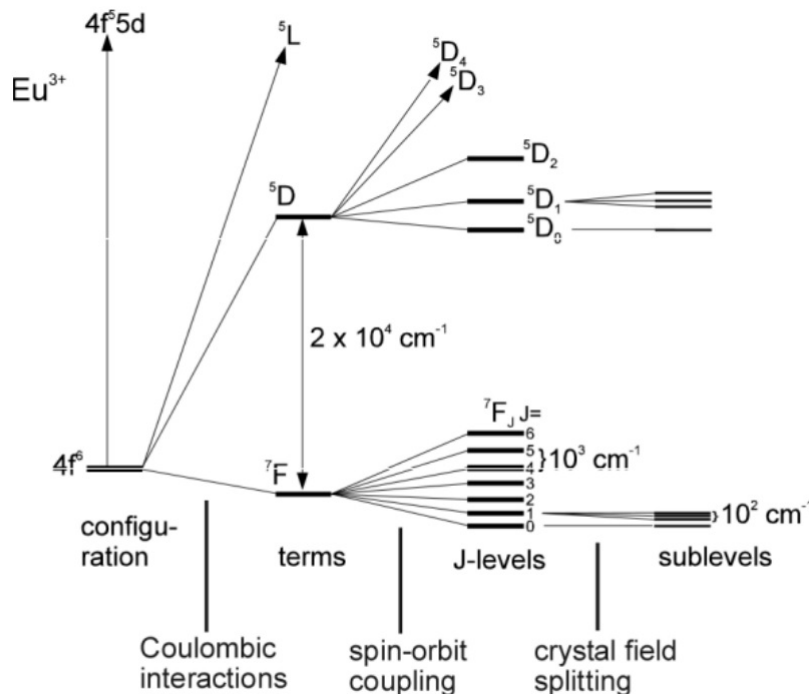


Abbildung 2.10: Partielles Energiediagramm von $\text{Eu}(\text{III})$ zur Verdeutlichung der Wechselwirkungen, die zur Aufspaltung der elektronischen Energielevel führen.^[62]

Nach Anregung des 7F_0 -Grundzustandes in das energetisch höhere 5L_6 -Niveau wird zunächst durch strahlungslose Relaxation der erste angeregte 5D_0 -Zustand besetzt. Von dort aus erfolgt durch verschiedene Lumineszenzprozesse die Rückkehr in diverse J-Level ($J=0-6$) des Grundzustandes (siehe linke Abb. 2.11). Eine Übersicht aller Lumineszenzübergänge kann Tabelle 2.7 entnommen werden. In der Praxis werden vor allem die F_1 - und F_2 -Bande beobachtet, die zu einem charakteristischen Spektrum des $\text{Eu}(\text{III})$ -Aquoions führen wie in Abbildung 2.11 dargestellt. Besonders die F_0 -, F_1 -, F_2 und F_4 -Bande liefern Informationen bzgl. Stöchiometrie und Geometrie gebildeter Komplexe. Die F_5 - und F_6 -Level werden nur selten gemessen und beobachtet, da sie auch häufig außerhalb des Wellenlängenbereichs des Detektors liegen.^[12,60,63,65-67]

Bei dreiwertigen Lanthanidionen werden meist intensitätsschwache und scharfe Emissionslinien beobachtet, da sie vorwiegend einen elektrischen Dipolcharakter aufweisen. Elektrische Dipolübergänge (ED) unterliegen jedoch dem Laporte-Verbot, da es sich um Übergänge zwischen Zuständen gerader Parität handelt. Erlaubte magnetische Dipolübergänge (MD) sind mit Zuständen ungerader Parität verbunden. Die Intensität solcher Übergänge ist aber dennoch nur schwach ausgeprägt. Zudem gelten für ED- und MD-Übergänge zusätzliche Auswahlregeln bezüglich der Quantenzahlen ΔS , ΔL und ΔJ , die in Tabelle 2.8 zusammengefasst sind. Verbotene, interne f-f-Übergänge können durch J-Beimischungen höherer

2 Theoretische Grundlagen

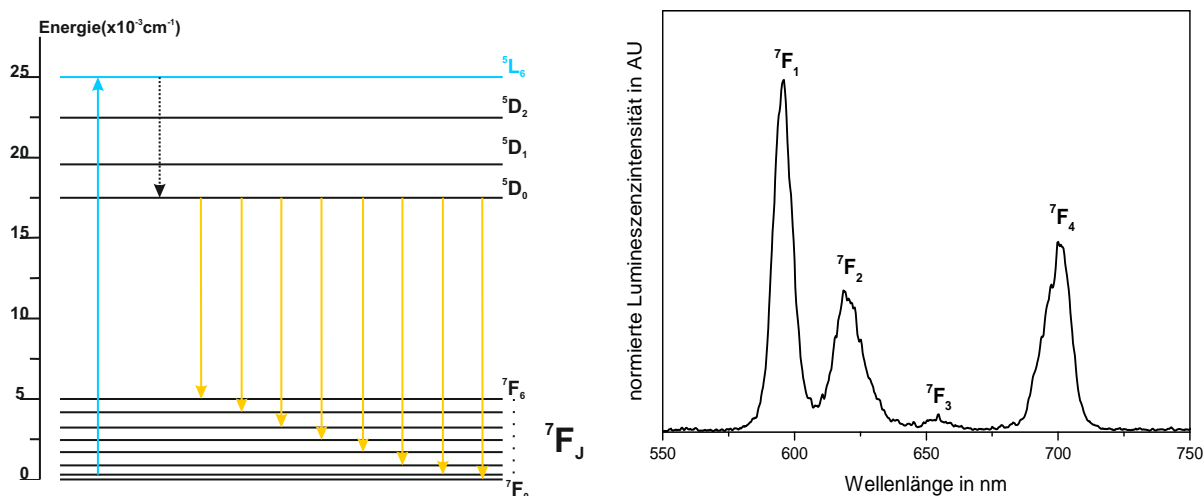


Abbildung 2.11: Energie-Level-Diagramm von Eu(III) (links, blau = Absorption, gepunktet = strahlungslose Relaxation, orange = Emissionsprozesse) und Lumineszenzspektrum eines Eu(III)-Aquoions (rechts).

Tabelle 2.7: Übersicht der Lumineszenzübergänge ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ von Eu(III).^[12,60]

J	Dipolcharakter	λ (nm)	Intensität ^a	Eigenschaften
0	ED	570–585	vw–s	Laporte verboten, bei hoher Symmetrie nicht zu beobachten
1	MD	585–600	s	erlaubter Übergang, Intensität unabhängig von chemischer Umgebung
2	ED	610–630	s–vs	hypersensitiver Übergang, Intensität stark abhängig von chemischer Umgebung
3	ED	640–660	vw–w	verbotener Übergang, immer sehr schwach ausgeprägt
4	ED	680–710	m–s	umgebungssensitiv
5	ED	740–770	vw	verbotener Übergang
6	ED	810–840	vw–m	selten gemessen und beobachtet

^avw=sehr schwach, w=schwach, m=mittel, s=stark, vs=sehr stark

2 Theoretische Grundlagen

Zustände zu einer Lockerung der Auswahlregeln führen, sodass diese teilweise erlaubt sind. Somit handelt es sich bei den meisten Übergängen im Lumineszenzspektrum um sogenannte „induzierte“ elektrische Dipolübergänge, die mit einer ähnlichen Intensität wie die erlaubten MD emittieren.^[56,60,61]

Tabelle 2.8: Auswahlregeln des Laporte-Verbots.^[56]

Übergang	Parität	ΔS	ΔL	ΔJ
ED	ungerade	0	≤ 6	≤ 6 (2,4,6 bei J=0)
MD	gerade	0	0	$0, \pm 1$

Der paritätsverbotene ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ -Übergang erscheint nur bei einer Erniedrigung der Eu(III)-Symmetrie und ist somit abhängig vom Liganden. Jedoch bewirkt dessen Kristallfeld keine Aufspaltung in weitere Stark-Level, sodass dieser Übergang nicht-entartet vorliegt. Jeder ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ -Übergang ist somit charakteristisch für einen spezifischen Eu(III)-Komplex. Die Intensität des MD-Überganges ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ hingegen ist unabhängig von der Umgebung des Metallions und kann somit zur Normierung der Eu(III)-Lumineszenzspektren genutzt werden. Auch der ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ -Übergang ist abhängig von der lokalen Symmetrie des Eu(III)-Ions und der Art des Liganden und wird daher als hypersensitiv bezeichnet. Das Intensitätsverhältnis der F_2 - zur F_1 -Bande wird oft genutzt um Aussagen über das Komplexierungsverhalten eines Liganden zu treffen. Ein Anstieg des F_2/F_1 -Verhältnis deutet oft auf eine Verstärkung der ionischen Bindung hin.^[56,60,63]

Auch einige Elemente der Actiniden-Serie wie Uran (U), Americium (Am), Curium (Cm), Berkelium (Bk), Californium (Cf) und Einsteinium (Es) weisen Lumineszenzeigenschaften in einem oder mehreren Oxidationszuständen auf, wobei vor allem Studien zu U(VI), Am(III) und Cm(III) durchgeführt wurden.^[68] In der vorliegenden Arbeit wurde Cm(III) als Vertreter der Actinide genutzt. Im Gegensatz zu den Lanthaniden weisen Actinide eine größere räumliche Verteilung auf, zusätzlich werden ihre 5s-Orbitale nicht durch die gefüllten 6s, 6p-Schalen abgeschirmt. Dies resultiert in einer stärkeren Wechselwirkung der 5f-Orbitale mit den umgebenden Liganden und somit in einem deutlichen Ligandeneinfluss. Als Folge dessen tritt eine Lockerung des f-f-Übergangverbotes auf, sodass die Absorptionsbanden von Actinidionen zehnmal intensiver und doppelt so breit sind als die der Lanthanidionen. Aufgrund der stärkeren Spin-Bahn-Wechselwirkung kann das Russel-Saunders-Kopplungsschema für Actinide nicht angewendet werden, da eine Beimischung anderer Zustände erfolgt, die zwar gleiche J-Werte, aber unterschiedliche L- und S-Werte besitzen (intermediäre Kopplung). Cm(III) weist somit zu $\sim 78\%$ einen ${}^8S_{7/2}$ -Charakter auf und zusätzlich mit $\sim 19\%$ ${}^6P_{7/2}$ einen weiteren Zustand.^[12,14,64,69-71]

Das Absorptionsspektrum von Cm(III) in 1 M $HClO_4$ ist in Abbildung 2.12 dargestellt. Es ist eine Vielzahl an f-f-Übergängen zu erkennen, die mit steigender Energie in alphabetischer Reihenfolge gekennzeichnet sind. Die Anregung des Cm(III) erfolgt im UV-Bereich in die drei intensivsten Banden (F, G und H) zwischen 375,4 und 396,6 nm (siehe rechte Abb. 2.13). Im Anschluss findet eine strahlungslose Relaxation in den A-Zustand (${}^6D_{7/2}$) statt. Bei wässrigen Lösungen wird bei Raumtemperatur nur die Emission vom angeregten A-Zustand in den Grundzustand Z beobachtet. Theoretisch bewirkt die Beimischung weiterer

2 Theoretische Grundlagen

Zustände eine Aufspaltung des Grundzustandes $^8S_{7/2}$ und des angeregten $^6D_{7/2}$ -Zustands in vier Kramer-Dubletts (siehe linke Abb. 2.13). Die Aufspaltung des Grundzustandes ist mit $10\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ sehr gering, sodass dieser praktisch entartet vorliegt und die Aufspaltung vernachlässigt werden kann. Die Aufspaltung des $^6D_{7/2}$ -Zustands ist hingegen mehrere 100 cm^{-1} groß ($300\text{--}600\text{ cm}^{-1}$). Bei Raumtemperatur wird jedoch nur das niedrigste Niveau des angeregten Zustands besetzt, sodass das Spektrum von Cm(III) nur eine Emissionsbande mit einem Maximum bei $593,8\text{ nm}$ und einer Halbwertsbreite von $7,7\text{ nm}$ aufweist. Bei einer Komplexierung des Cm(III) erfolgt eine bathochrome Verschiebung (Rotverschiebung) der Bande. Infolgedessen ermöglichen Lage, Intensität und Form dieser Emissionsbande eine Charakterisierung der chemischen Umgebung des Cm(III)-Ions.^[69,71–73]

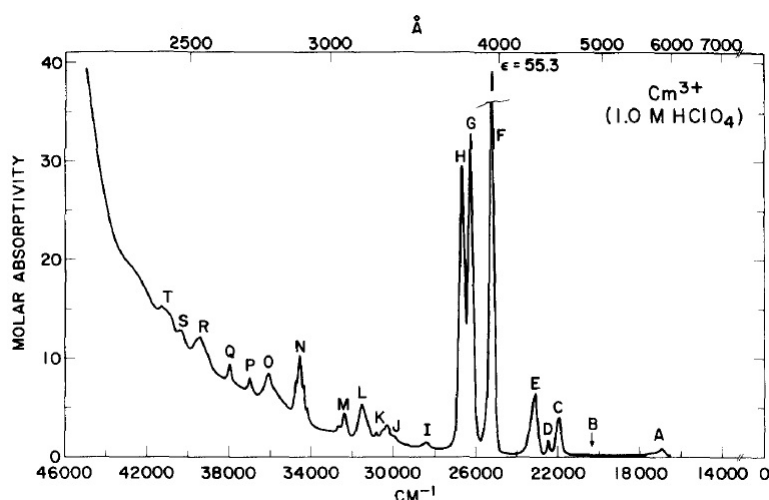


Abbildung 2.12: Absorptionsspektrum von Cm(III) in 1 M HClO_4 .^[72]

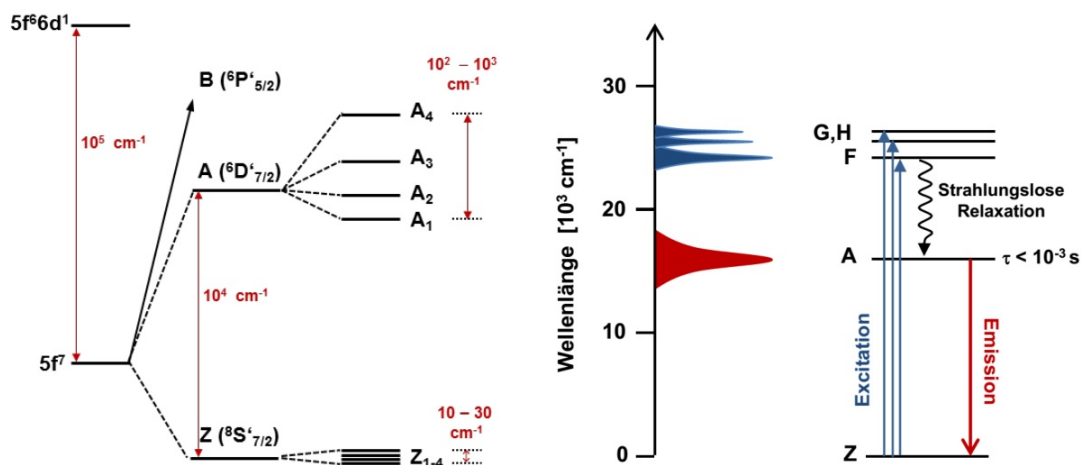


Abbildung 2.13: Energie-Level-Diagramm (links) und Lumineszenzprozess von Cm(III) (rechts).^[74]

2.3.3 Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (**T**ime-**R**esolved **L**aser-Induced **F**luorescence **S**pectroscopy, TRLFS) stellt eine sehr empfindliche, selektive und analytische Methode dar, die nicht in das untersuchte Medium eingreift. Sie eignet sich sowohl für Untersuchungen von Lösungen als auch von Feststoffen und liefert nützliche Informationen zur Koordinationschemie eines Elements. Sie wird vor allem zu Speziationsuntersuchungen von Ln und An eingesetzt, welche noch im Spurenbereich ($\leq 10^{-12}$ M) nachgewiesen werden können.^[69,75-77]

Das Prinzip der TRLFS basiert auf der Anregung von lumineszierenden Metallionen durch einen gepulsten Laser und einer nachfolgenden zeitlichen Auflösung des Lumineszenzsignals.^[75] Ein schematischer Aufbau des genutzten Lasersystems ist in Abbildung 2.14 dargestellt.

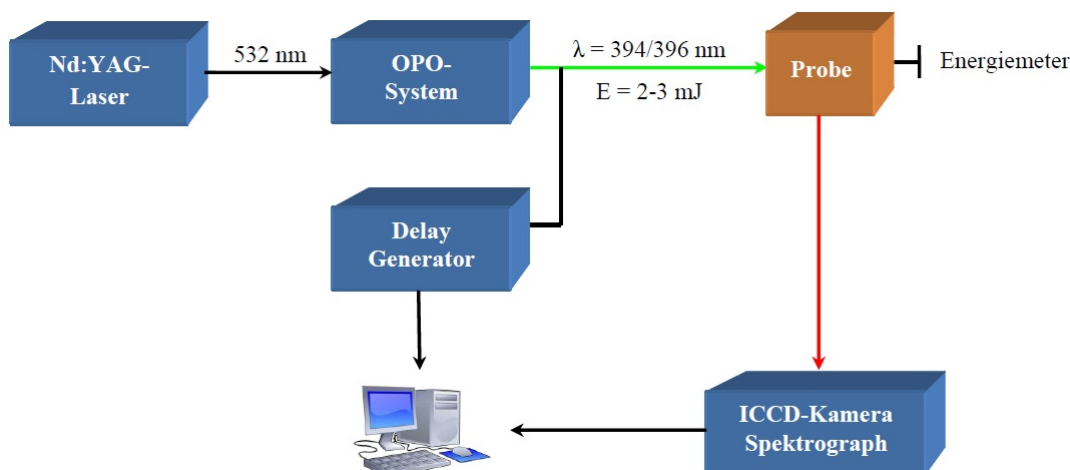


Abbildung 2.14: Schematischer Aufbau des verwendeten Lasersystems.

Als Laser wurde ein Nd:YAG-Laser verwendet, der bei einer Wellenlänge von 532 nm emittiert. Das monochromatische Laserlicht wird über ein OPO-System gelenkt, welches die benötigte Anregungswellenlänge (394 nm für Eu(III) und 396 nm für Cm(III)) der Probe einstellt. Nach Anregung der Probe wird das emittierte Fluoreszenzlicht mit Hilfe eines Gitters mit 300 Linien/mm oder 1200 Linien/mm spektral zerlegt und von der ICCD-Kamera detektiert. Um Störungen durch das Laserlicht zu vermeiden, wird das Fluoreszenzsignal im Winkel von 90° aufgenommen. Der Delay-Generator ermöglicht die Aufnahme zeitaufgelöster Spektren, indem er die Verzögerung zwischen Laserpuls und Öffnen der Kamerablende steuert.

Die Probe wird dabei immer wieder neu angeregt und die Emissionsintensität mit zunehmender Verzögerungszeit detektiert. Die daraus resultierende zeitliche Abnahme der Lumineszenzintensität $I(t)$ kann mit folgender exponentiellen Gleichung beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (2.2)$$

2 Theoretische Grundlagen

Dabei beschreibt I_0 die Lumineszenzintensität zum Zeitpunkt $t=0$, t die Verzögerungszeit und τ die Lebensdauer des angeregten Zustands. Die Lebensdauer τ ist ein weiteres Charakteristikum des Elements einer Verbindung und nimmt, in Abhängigkeit der jeweiligen Umgebung des untersuchten Metallions, Werte zwischen Nano- und Millisekunden ein.^[75,78]

Neben der Emission kann die Desaktivierung eines angeregten Zustands auch über strahlungsfreie Prozesse erfolgen, was eine signifikante Verringerung der Emission und der Lebensdauer zur Folge hat. Verursacht wird dieses sogenannte Quenching vorwiegend durch Schwingungsenergie transfers in hochenergetische Schwingungszustände von koordinierenden Liganden (Schwingungsrelaxation). In wässriger Lösung wird dieser Prozess vor allem durch die Schwingungszustände der OH-Gruppen von koordinierten Wassermolekülen hervorgerufen. Eine schematische Darstellung der strahlungslosen Relaxation am Beispiel von Eu(III) wird in Abbildung 2.15 gezeigt.^[12,76]

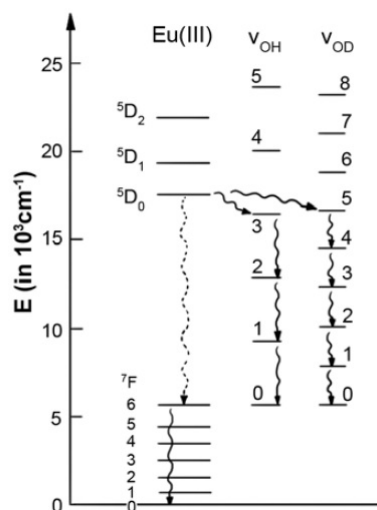


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der strahlungslosen Relaxation des angeregten Zustands von Eu(III).^[79]

Zwischen dem angeregten Emissionszustand und dem energetisch höchst gelegenen Niveau des Grundzustands von Eu(III) besteht eine Energiedifferenz von 12.000 cm^{-1} . Diese Lücke kann durch die hohe Energie der OH-Schwingungen ($\nu \approx 3300\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$) überbrückt werden, da bereits die dritte Obertonschwingung der koordinierten OH-Oszillatoren mit dem angeregten Zustand des Eu(III) gekoppelt werden kann. Dies führt zu einer effektiven Energieübertragung und einer strahlungslosen Desaktivierung, was eine kurzlebige Lumineszenz ($\tau = 110 \mu\text{s}$) zur Folge hat. Ein weniger ausgeprägter Quench-Prozess ist bei OD-Oszillatoren zu beobachten, die eine niedrigere Schwingungsenergie ($\nu \approx 2200 \text{ cm}^{-1}$) aufweisen. Daher sind für eine Energieübertragung aus dem niedrigsten angeregten Zustand höhere Schwingungsobertöne notwendig, was in einer geringeren Wahrscheinlichkeit der strahlungslosen Relaxation und einer längeren Lumineszenzlebensdauer von $4100 \mu\text{s}$ resultiert.^[76,80,81]

Basierend auf diesem Zusammenhang kann mit Hilfe von Lebensdaueremessungen für Eu(III) und Cm(III) die Anzahl an Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre der Metallionen berechnet werden. Beschrieben wurde dies in Arbeiten von Horrocks et al.^[82] und Kimura et al.,^[83,84] die daraus entstandenen empirischen Beziehungen sind in den

2 Theoretische Grundlagen

Gleichungen 2.3 und 2.4 für Eu(III) und Cm(III) zusammengefasst.

$$n(H_2O) \pm 0,5 = \frac{1,07}{\tau(\text{ms})} - 0,62 \quad \text{für Eu(III)} \quad (2.3)$$

$$n(H_2O) \pm 0,5 = \frac{0,65}{\tau(\text{ms})} - 0,88 \quad \text{für Cm(III)} \quad (2.4)$$

Diese empirischen Gleichungen sind jedoch nur bei der Beteiligung von OH-Schwingungen anwendbar. Weitere Quench-Prozesse können durch NH- und CH-Schwingungen ($\nu(\text{NH}) \approx 3300 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{CH}) \approx 2900 \text{ cm}^{-1}$) hervorgerufen werden, die zusätzlich berücksichtigt werden müssen.^[81]

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Für die Simulierung des Gastrointestinaltraktes wurde eine Vielzahl an Stammlösungen von anorganischen (NaCl, KCl, KHCO₃, NaH₂PO₄, Na₂SO₄, KSCN, CaCl₂, NH₄Cl, NaHCO₃, KH₂PO₄ und MgCl₂ bezogen von Merck, Roth oder Riedel-de Haen) und organischen (Fucose, Harnstoff, Harnsäure, Galaktose, Glukose, Glukosamin Hydrochlorid, Glucuronsäure, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure (NANA) bezogen von Acros, Fluka, Roth, Merck, Alfa Aesar oder Calbiochem) Chemikalien hergestellt. Die organischen Substanzen wurden dabei stets frisch vor dem Gebrauch vorbereitet. Die verwendeten Proteine (Amylase, BSA, Mucin, Pepsin, Pankreatin, Trypsin, Lipase und bile bovine bezogen von Sigma, Roth oder Applichem) wurden den jeweiligen Probelösungen als Feststoff zugefügt. Alle Chemikalien waren zudem von p.a. Qualität.

Die Eu(III)-Stammlösung wurde aus EuCl₃·6H₂O (bezogen von Sigma) hergestellt. Die Cm(III)-Stammlösung (²⁴⁸Cm in 1 M HClO₄) war bereits vorhanden und wurde vom Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy Office of Basic Energy Science zur Verfügung gestellt.

3.2 Das *in vitro*-Modell des Gastrointestinaltraktes

3.2.1 Herstellung der Biofluide

Für die Simulierung der Verdauungssäfte Speichel, Magen-, Pankreassaft und Galle wurden diese unter Verwendung der Unified Bioaccessibility Method (UBM) synthetisch hergestellt. Das sogenannte UBM-Protokoll wurde von der Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE) entwickelt und basiert auf der menschlichen Physiologie. Es stellt dabei eine *in vitro*-Methode zur Simulierung des menschlichen Verdauungsprozesses dar. Insgesamt werden drei Bestandteile des Verdauungssystems berücksichtigt: Mund, Magen und Dünndarm.^[85] Da die Verdauung und Absorption der Nährstoffe vorrangig im Dünndarm stattfindet, wird der Dickdarm, welcher zudem hauptsächlich von Bakterien besiedelt ist, in der Simulation vernachlässigt.^[35,86] Eine Übersicht der einzelnen Zusammensetzungen der synthetischen Biofluide ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Ein Großteil wurde aus der Synthesvorschrift des UBM-Protokolls entnommen, jedoch wurden folgende Modifikationen in der Zusammensetzung der Biofluide vorgenommen.

Die angegebenen Konzentrationen der Proteine Amylase und Mucin im Speichelmedium sind mit 0,15 und 0,05 mg/mL im Vergleich zu Literaturwerten als zu gering einzuordnen, sodass die Werte nach Barkleit et al. [87] und Marques et al. [88] angepasst wurden. Als weitere Bestandteile des Speichelsekrets wurden die Salze CaCl₂ und KHCO₃ hinzugefügt.

Calcium-Ionen werden als wichtiger Cofaktor für die Amylase-Aktivität benötigt, Kalium- und Carbonat-Ionen hingegen werden im Austausch von Natrium- und Chlorid-Ionen in großen Mengen von den Speicheldrüsen sekretiert.^[34,89] Bovine Serum Albumin (BSA) wird im UBM-Protokoll als Surrogat für weitere Proteine in den Verdauungssäften verwendet. Da BSA jedoch hauptsächlich im Blutplasma vorkommt und nicht im Lumen des Verdauungssystems, wurde es experimentell nach einigen Übersichtsmessungen im Magensaft und der Galle vernachlässigt und im Pankreassaft durch das Verdauungsenzym Trypsin ersetzt.^[90,91]

Die pH-Werte wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

3.2.2 Simulation des Gastrointestinaltraktes

Um den Transport von Ln/An im menschlichen Verdauungssystem zu simulieren, wurde die Vorschrift des UBM-Protokolls genutzt.^[85] Dafür wurden die Verdauungssäfte nach Tabelle 3.1 hergestellt und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zur Simulation der Magenbedingungen wurden 3,3 mL der Speichellösung mit Eu(III)/Cm(III) versetzt und erneut 5–15 min inkubiert. Anschließend wurden 4,95 mL vom Magensaft zur Probe hinzugefügt und abermals bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die resultierende Lösung sollte einen pH-Wert zwischen 1,2 und 1,7 aufweisen. Die Darmphase wurde aus 9,9 mL Pankreassaft und 3,3 mL Galle hergestellt, mit Eu(III)/Cm(III) versetzt und für mindestens eine Stunde auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert der Lösung sollte sich zwischen sieben und acht einstellen. Um das Verdauungssystem vollständig zu simulieren, wurden beide Phasen kombiniert und für vier Stunden auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. In der gastro-intestinalen Phase sollte zum Schluss ein pH-Wert von $6,3 \pm 0,5$ vorliegen. Die Konzentrationen von Eu(III) und Cm(III) in den einzelnen Verdauungsphasen (Magen, Darm) wurden stets auf $1 \cdot 10^{-5}$ M bzw. $3 \cdot 10^{-7}$ M eingestellt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der synthetischen Biofluide.

Speichel	Magensaft	Pankreassaft	Galle
Anorganik	24 mM KCl 15 mM KHCO ₃ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 10,2 mM NaCl 8 mM Na ₂ SO ₄ 4,1 mM KSCN 1 mM CaCl ₂	94,2 mM NaCl 22,1 mM KCl 11,4 mM NH ₄ Cl 5,4 mM CaCl ₂ 3,9 mM NaH ₂ PO ₄	180 mM NaCl 137,7 mM NaHCO ₃ 10,1 mM KCl 1,5 mM CaCl ₂
Organik	6,7 mM Harnstoff 0,1 mM Harnsäure	234 mM NaCl 133,5 mM NaHCO ₃ 15,1 mM KCl 1,4 mM CaCl ₂ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM MgCl ₂	8,3 mM Harnstoff
Proteine	1,0 mg/mL Amylase 0,5 mg/mL Mucin	7,2 mM Glukose 2,8 mM Harnstoff 3,1 mM Glukosamin Hydrochlorid 0,2 mM Glucuronsäure	6,0 mg/mL Galle 3,0 mg/mL Mucin 3,0 mg/mL Pankreatin 1,0 mg/mL Trypsin (1,0 mg/mL BSA) 0,5 mg/mL Lipase
pH	6,5 ± 0,5	1,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2

3.3 Spektroskopische und strukturanalytische Methoden

3.3.1 Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die zeitaufgelösten laserinduzierten Fluoreszenzmessungen wurden bei 25°C bzw. 37°C mit einem von einer Blitzlampe gepulsten Nd:YAG-OPO Lasersystem (Powerlite Precision II 9020 Laser ausgestattet mit einem Green PANTHER EX OPO von Continuum) durchgeführt. Um die Temperatur während der Messungen konstant zu halten, wurde ein temperierbarer Küvettenhalter mit Rührwerk (Flash 300™, Quantum Northwest) verwendet. Die Pulsenergie des Lasers lag zwischen 1 und 3 mJ und wurde mit Hilfe einer Photodiode gemessen. Es wurde mit einer Anregungswellenlänge von 394 nm für Eu(III) bzw. 396 nm für Cm(III) gearbeitet. Die Emissionsspektren wurden durch einen optischen Multikanalanalysator detektiert, der aus einem Monochromator (Oriel MS 257), einem Spektrographen (300 oder 1200 Linien/mm-Gitter) und einer ICCD Kamera (Andor iStar) besteht. Alle Bestandteile des Lasersystems wurden von der Lot-Oriel Group erworben.

Die statischen und zeitaufgelösten Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen 570–650 nm (1200 Linien/mm-Gitter) und 470–840 nm (300 Linien/mm-Gitter) aufgenommen. Das Zeitfenster der Kamera wurde für alle Messungen auf 1 ms eingestellt. Je nach Langlebigkeit der Spezies wurden für die zeitaufgelösten Messungen 42 bis 82 Einzelspektren mit einer Schrittweite zwischen 15 und 100 μ s aufgenommen. Ein Spektrum wird dabei aus 200 Einzelmessungen akkumuliert, statische Spektren aus 2000 Aufnahmen.

Die Konzentration der Metalle wurde in allen Lösungen bei $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) bzw. $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) konstant gehalten. Für die Eu(III)-Experimente wurden die Probelösungen tags zuvor hergestellt, die pH-Werte wurden jeweils vor der Messung nochmals kontrolliert. Aus Sicherheitsgründen wurden alle Cm(III)-Proben in einer Glove Box unter Stickstoffatmosphäre bereits in der Küvette hergestellt und anschließend untersucht.

Um wichtige Bindungspartner mit Ln/An zu identifizieren, wurden zunächst alle einzelnen Liganden des *in vitro*-Modells und diverse Ligandmischungen mit Eu(III) analysiert. Um einen möglichen Temperatureinfluss festzustellen, wurden die Experimente bei Raum- und Körpertemperatur (25°C und 37°C) durchgeführt. Ausgewählte Versuche wurden im Anschluss mit Cm(III) wiederholt.

Für konzentrationsabhängige Messungen mit ausgewählten Liganden wurde die Ligandenkonzentration zwischen 0,02 und 10 mM NANA sowie 0,01 und 2 mg/mL Mucin bei pH 4,5 variiert. Bei pH-Reihen wurde ein Metall-Ligandverhältnis von 1:100 bzw. eine Proteinkonzentration von 1 mg/mL konstant gehalten. Bei allen Versuchen wurde mit NaCl als Hintergrundelektrolyt eine Ionenstärke von 0,1 M eingestellt.

Die aufgenommenen Lumineszenzspektren wurden mit OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation) ausgewertet. Die Eu(III)-Spektren wurden auf die Fläche der 7F_1 -Bande normiert, während die Cm(III)-Spektren auf die gesamte Peakfläche normiert wurden. Mit Hilfe der TRLFS-Spektren und dem Programm *HypSpec* wurden zudem Stabilitätskonstanten berechnet. Die LCF (Linear Combination Fitting)-Analyse der Lumineszenzspektren erfolgte mit dem Excel-Solver.

3.3.2 Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)

Die ATR-FT-IR-Messungen der wässrigen Lösungen wurden mit einem Bruker Vertex 80/v Vakuum Spektrometer durchgeführt, welches mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellur-Detektor ausgestattet ist. Die genutzte ATR-Einheit DURA SamplIR II (Smiths Inc.) besteht aus einem horizontalen Diamantkristall mit neun internen Reflexionen an der Oberfläche und einem Einfallswinkel von 45° .

Zur Aufnahme der Absorption von wässrigen Lösungen muss eine Untergrundkorrektur durchgeführt werden, indem eine Durchflusszelle mit einem Volumen von 0,2 mL genutzt wurde. Dabei wird zunächst eine Referenzprobe, die dieselben Bedingungen aufweist wie die Probelösung (pH, Temperatur, Ionenstärke), mit einer konstanten Flussrate von $200 \mu\text{L}/\text{min}$ über den ATR-Diamantkristall gespült und anschließend mit der Probelösung ausgetauscht. Aus den Spektren der Referenz und der Probe kann anschließend ein Differenzspektrum erhalten werden, welches nur die Absorptionsänderungen enthält, die durch das Metallion bzw. den Liganden hervorgerufen worden sind.

Die Absorptionsspektren wurden in einem Wellenzahlenbereich von 1800 bis 800 cm^{-1} und einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Weitere Ausführungen zum Aufbau und den Grundlagen der Methode sind bei Müller [92] aufgeführt.

Die Proben wurden in 10 mL Kolben vorbereitet und anschließend bei RT gemessen. Die Komplexierung von Eu(III) mit verschiedenen Zuckern wurde in einem pH-Bereich zwischen 2 und 6 untersucht, da ab $\text{pH} \geq 6$ Kolloidbildung beobachtet wird. Die Eu(III)- und Ligandenkonzentration betrug in allen Proben jeweils 10 mM mit einem Metall-Ligandverhältnis von 1:1.

3.3.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Da sich Eu(III) aufgrund seiner starken Bandenverbreiterung nicht für die NMR-Spektroskopie eignet, wurde als Analog Sm(III) verwendet. Um im wässrigen System arbeiten zu können, wurden den Proben je 10 % D_2O hinzugefügt. Die Messungen wurden bei pH 4,5 und einer Konzentration von 40 mM NANA durchgeführt, dabei wurde ein Metall-Ligandverhältnis von 1:1 eingestellt. Zur Untersuchung der Komplexierung wurde jeweils ein Spektrum mit und ohne Ligandzugabe gemessen.

Die Spektren wurden an einem Agilent 400-MR Spektrometer mit einer Frequenz von $399,95 \text{ MHz}$ für ^1H und $100,58 \text{ MHz}$ für ^{13}C bzw. einem Agilent 600 DD2 Spektrometer mit einer Frequenz von $599,80 \text{ MHz}$ für ^1H und $150,84 \text{ MHz}$ für ^{13}C aufgenommen. Alle Spektren wurden bei 298 K mit einem Agilent One Probenkopf mit z-Gradienten gemessen. Für die 1D- und 2D-Spektren wurden Standard-Pulssequenzen der Firma Agilent verwendet.

3.3.4 Zirkularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)

Um die Sekundärstruktur des Mucins und mögliche strukturelle Veränderungen bei Zugabe von Eu(III) zu untersuchen, wurde die CD-Spektroskopie bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 2 und 7 durchgeführt. Die CD-Spektren wurden im fernen UV-Bereich mit einer Schrittweite von 1 nm zwischen 196–260 nm mit dem Spektrometer JASCO J-815 aufgenommen. Zur Aufnahme der Spektren wurden 1 mm Quarzküvetten verwendet. Die Tem-

peratur wurde bei 20°C mit einem Peltierthermostaten konstant gehalten. Es wurde mit einer 0,5 mg/mL Mucin-Lösung in 0,01 M NaCl gearbeitet, der schrittweise von 1–50 µL eine 1 mM Eu(III) Stammlösung hinzugefügt wurde. Zunächst wurde von jeder Probe für ein CD-Spektrum nur ein Scan aufgenommen. Die CD-Spektren ausgewählter Proben wurden im Anschluss zur Reduzierung des Rauschens aus fünf unabhängigen Messungen akkumuliert.

3.3.5 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung thermodynamischer Bindungsparameter wie Bindungskonstanten, Enthalpie ΔH und Entropie ΔS wurde die isothermale Titrationskalorimetrie mit Hilfe eines Mikrokalorimeters (VP-ITC von Microcal Inc., Northampton, MA) durchgeführt. Zur Untersuchung der Komplexreaktion zwischen Eu(III) und Mucin enthielten die Referenz- und Probenzelle 0,1 M NaCl und 1 mg/mL Mucin-Lösung. Zu der Proteinlösung wurde 1 mM Eu(III) bei 25°C in 40 Zyklen mehrfach injiziert ($V = 2\text{--}10 \mu\text{L}$). Bei der untersuchten Komplexierung zwischen Eu(III) und NANA enthielten die Referenz- und Probenzelle 0,1 M NaCl und 1 mM Eu(III)-Lösung. Als Ligand wurde 10 mM NANA bei 25°C in 29 Zyklen mehrfach injiziert ($V = 2\text{--}10 \mu\text{L}$). Alle verwendeten Lösungen wurden vorher entgast. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm MicroCal Origin Version 7.0 genutzt.

3.4 Thermodynamische Berechnungen

Die thermodynamische Modellierung zur Berechnung der Speziation von Eu(III) in den einzelnen Biofluiden sowie im simulierten Verdauungssystem wurde mit Hilfe der Software *Hydra/Medusa* durchgeführt.^[93] Die verwendeten Stabilitätskonstanten sind im Anhang aufgelistet (siehe Tab. A1).

3.5 Theoretische Studien

Die N-Acetylneuraminsäure (NANA) wurde als ein wichtiger Bindungspartner von Eu(III) bzw. Cm(III) identifiziert. Zum besseren Verständnis der gebildeten Strukturen während der Komplexierung mit Eu(III) wurden quantenchemische Berechnungen mit dem Programm Turbomole durchgeführt. Mit einem def2-SVP Basissatz und dem Funktional BP86 wurden verschiedene Strukturen optimiert. Skalar-relativistische Effekte wurden durch die Verwendung eines small-core ECP's (effektives Rumpfpotential) miteinbezogen. Das Vorliegen eines lokalen Minimums auf der Potentialhyperfläche wurde durch Berechnungen der Schwingungsfrequenzen geprüft. Basierend auf den NMR-Ergebnissen wurden vor allem Strukturen berücksichtigt bei denen die OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette und die Carboxylgruppe der NANA an der Komplexierung mit Eu(III) beteiligt sind. Um den Einfluss des pH-Wertes zu visualisieren, wurde die Struktur mit der niedrigsten Energie ebenfalls in der protonierten Form optimiert. Die Koordinationssphäre des Europiums wurde durch explizite Wassermoleküle aufgefüllt.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Zur Untersuchung der Speziation von dreiwertigen Lanthaniden und Actiniden im menschlichen Verdauungssystem wurden synthetische Biofluide (Speichel, Magen-, Pankreassaft und Galle) hergestellt, mit Eu(III) bzw. Cm(III) umgesetzt und mittels TRLFS untersucht. Analog wurde ebenfalls das Verdauungssystem vom Magen bis zum Dünndarm simuliert, indem die Verdauungssäfte nacheinander physiologisch vereinigt wurden. Um wichtige Bindungspartner zu identifizieren, wurden zunächst die Liganden der jeweiligen Biofluide einzeln untersucht und anschließend diverse Mischungen. Im Folgenden werden sowohl die spektroskopischen Ergebnisse als auch thermodynamische Berechnungen vorgestellt und abschließend verglichen.

4.1 Speziation von Eu(III) in den synthetischen Biofluiden

4.1.1 Komplexierung von Eu(III) im Speichel

Um den Einfluss der organischen und anorganischen Liganden auf eine Komplexierung mit Eu(III) einschätzen zu können, wurden verschiedene Mischungen des Modellspeichels hergestellt. Im Folgenden werden mit den Abkürzungen A und O die jeweiligen anorganischen (KCl , KHCO_3 , NaH_2PO_4 , NaCl , Na_2SO_4 , KSCN und CaCl_2) und organischen (Harnstoff und Harnsäure) Liganden bezeichnet. Für die Mischung der aufgezählten Liganden wird das Akronym OA verwendet.

Für die Identifizierung der anorganischen Bindungspartner mit Eu(III) im Speichel wurden verschiedene Speichelmischungen angefertigt, bei denen jeweils ein anorganischer Ligand weggelassen wurde. Die zugehörigen Lumineszenzspektren und Lebensdauern sind in der Abbildung 4.1 und in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Auffällig sind vor allem die stark verrauschten Lumineszenzspektren ohne Calcium- und Carbonat-Ionen. Dies ist vermutlich auf die Ausfällung von festen EuPO_4 zurückzuführen. Des Weiteren ist eine deutliche Intensitätsabnahme der F_2 -Bande zu erkennen. Auch die Abwesenheit der Sulfat-Liganden hat eine Erniedrigung in der Intensität der F_2 -Bande zur Folge. Die Abwesenheit von Phosphat-Ionen resultiert hingegen in einer Intensitätssteigerung der hypersensitiven Bande. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine erhöhte Komplexierung des Eu(III) mit Carbonat-Ionen als Bindungspartner. Die beschriebenen Effekte können zudem in den Änderungen der Lumineszenzlebensdauern und der Intensitätsverhältnisse beobachtet werden.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Die chlorid- und thiocyanatfreien Probelösungen weisen nahezu identische Lumineszenzspektren im Vergleich mit der vollständigen Anorganikprobe auf, sodass Cl^- und SCN^- als Bindungspartner auszuschließen sind. Den größten Einfluss auf die Komplexbildung mit Eu(III) haben demzufolge die Anionen CO_3^{2-} , PO_4^{3-} und SO_4^{2-} . Im Gegensatz zu Na^+ und K^+ hat das Kation Ca^{2+} ebenfalls eine Auswirkung auf die Komplexbildung mit Eu(III), da es zum Ladungsausgleich beiträgt. Die aufgezählten Anionen liegen demzufolge wahrscheinlich mit Eu(III) und Ca(II) als Gegenionen in einem Mischkomplex vor.

Um diese Aussage zu überprüfen, wurde eine Mischung dieser Ionen (Probe A) hergestellt. Das erhaltene Lumineszenzspektrum wurde im Anschluss mit einer Probe verglichen, die alle anorganischen Speichelkomponenten enthält (Probe Anorganik_{ges}). Das Lumineszenzspektrum von Probe A weist dabei dieselbe Spektralform auf wie das der vollständigen, anorganischen Mischung. In Tabelle 4.2 sind zusätzlich die berechneten Lumineszenzlebensdauern und Intensitätsverhältnisse der einzelnen Proben dargestellt, die ebenso übereinstimmen.

Zusätzlich wurden die ausgewählten Ionen CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} und Ca^{2+} mit den Proteinen Amylase und Mucin versetzt und mit einer vollständigen Speichelprobe verglichen, die auch die organischen Liganden Harnstoff und Harnsäure enthält (siehe rechte Abb. 4.1). Dabei weisen beide Proben dieselbe Spektralform auf, sodass die Speichelkomponenten Harnstoff und Harnsäure als Bindungspartner ausgeschlossen werden können. Beim Vergleich der Lumineszenzspektren der Proben mit und ohne die Proteine Amylase und Mucin sind jedoch Unterschiede sichtbar. Die Proben mit den Proteinen zeigen eine höhere Intensität der F_2 -Bande sowie verkürzte Lebensdauern (siehe Tab. 4.2). Dies weist auf einen Einfluss der Speichelproteine auf die Komplexbildung mit Eu(III) hin, der im Folgenden näher erläutert wird.

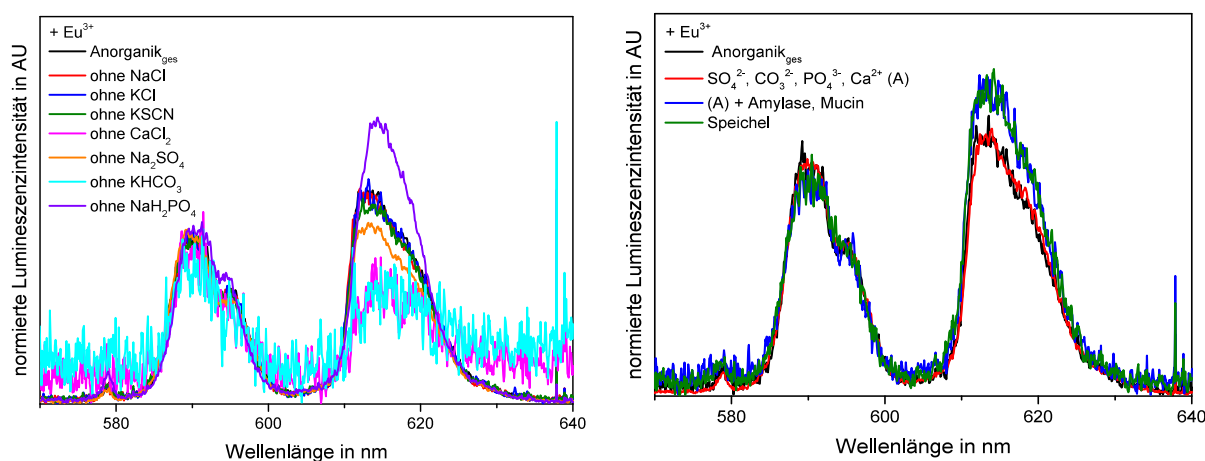


Abbildung 4.1: Identifizierung anorganischer Bindungspartner mit Eu(III) bei $\text{pH } 6,5 \pm 0,5$ und RT.

Zur Identifizierung der organischen Bindungspartner mit Eu(III) im Speichel wurden verschiedene Mischungen mit und ohne anorganische Liganden angefertigt und untersucht. Die zugehörigen Lumineszenzspektren sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Bei Abwesenheit der anorganischen Komponenten weisen vor allem die Speichelproteine Amylase und Mucin eine intensitätsstarke F_2 -Bande auf, was auf eine ausgeprägte Kom-

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Tabelle 4.1: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit verschiedenen anorganischen Bestandteilen des Speichels bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Anorganik _{ges}	6,81	187 ± 14	1,6	486 ± 14	5,1	1,5
ohne NaCl	6,89	173 ± 10	1,4	523 ± 14	5,6	1,5
ohne KCl	6,82	196 ± 16	4,8	470 ± 27	1,7	1,5
ohne KSCN	6,78	165 ± 14	1,9	430 ± 12	5,9	1,4
ohne CaCl ₂	4,51	255 ± 10	3,6			1,0
ohne Na ₂ SO ₄	6,76	471 ± 38	1,7	824 ± 91	0,7	1,3
ohne NaH ₂ PO ₄	8,72	258 ± 34	3,5	603 ± 11	1,2	1,8

^a ± 0,5

Tabelle 4.2: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Speichelliganden bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Anorganik _{ges}	6,89	244 ± 17	3,8	571 ± 49	1,3	1,3
Probe (A) ^b	6,77	253 ± 15	3,6	555 ± 18	1,3	1,3
(A) + Amylase, Mucin	6,90	121 ± 17	8,3	400 ± 25	2,1	1,6
Speichel	6,83	148 ± 18	6,6	415 ± 24	2,0	1,6

^a ± 0,5

^b CO₃²⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻ und Ca²⁺

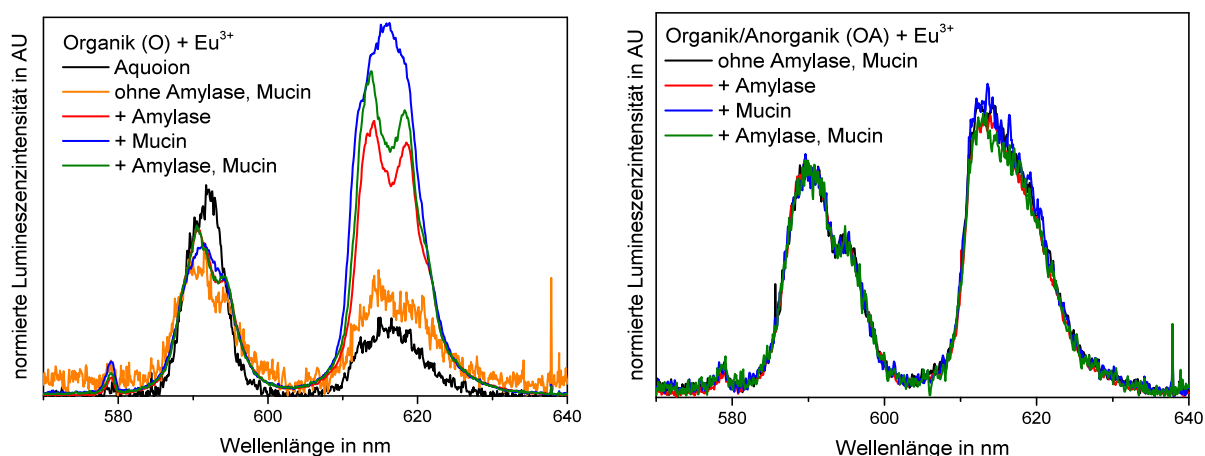


Abbildung 4.2: Einfluss organischer (O = Harnstoff und Harnsäure) und anorganischer Liganden auf die Komplexbildung von Eu(III) im Speichel bei pH 6,5 ± 0,5 und RT.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

plexierung mit Eu(III) schließen lässt (siehe linke Abb. 4.2). Bei den organischen Liganden Harnstoff und Harnsäure kann hingegen nur eine intensitätsschwache Komplexierung mit Eu(III) beobachtet werden. Die Komplexierung von Harnstoff mit Eu(III) wurde bereits von Heller et al. [94] untersucht. Dabei wurden zwei Stabilitätskonstanten berechnet, die aufgrund ihrer geringen Größe die schwache Komplexierung mit Eu(III) bestätigen ($\beta_1 = -0,12 \pm 0,05$; $\beta_2 = -6,86 \pm 0,15$).

Die Eu(III)-Protein-Komplexe werden jedoch in Anwesenheit der anorganischen Speichel-liganden stark zurückgedrängt. Im Gegensatz zur rechten Abbildung 4.1 sind nahezu keine Intensitätsunterschiede der F_2 -Bande bei Zugabe der Proteine zu beobachten. Dies wird auch im Intensitätsverhältnis der F_2 zur F_1 -Bande ersichtlich (siehe Tab. 4.3). Als Folge dessen können die anorganischen Liganden als Hauptbindungspartner mit Eu(III) im Speichel identifiziert werden.

Tabelle 4.3: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Speichelmischungen bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
OA ^b	6,86	159 ± 17	6,1	448 ± 22	1,8	1,4
OA+Amylase	6,88	288 ± 34	3,1	622 ± 25	1,1	1,4
OA+Mucin	6,87	173 ± 17	5,6	504 ± 17	1,5	1,5
Speichel	6,70	146 ± 18	6,7	470 ± 16	1,7	1,4

^a $\pm 0,5$

^bOA= Anorganik (KCl, KHCO₃, NaH₂PO₄, NaCl, Na₂SO₄, KSCN, CaCl₂) und Organik (Harnstoff, Harnsäure)

Die organischen Komponenten scheinen in Anbetracht der Lumineszenzspektren keinen Einfluss auf die Komplexbildung zu nehmen. Die berechneten Lebensdauern zeigen hingegen eine deutliche Veränderung in Gegenwart der Proteine, was auf eine Modifikation der Speziation schließen lässt. Allgemein ist ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz festzustellen, was auf die Ausbildung von mindestens zwei Eu(III)-Spezies schließen lässt. Durch Zugabe der Proteine kommt es vor allem zu einer Verlängerung der zweiten Lumineszenzlebensdauer τ_2 . Dies deutet auf eine Verdrängung von Wassermolekülen durch die Anlagerung der Proteine an die Koordinationssphäre des Eu(III) hin. Dies steht im Gegensatz zu den Lebensdauern aus Tabelle 4.2, wo in Folge der Proteinaddition eine Verkürzung der Lebensdauern beobachtet wurde. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse scheint es sich bei der Koordination von Eu(III) im Speichel um einen komplexen Vorgang zu handeln, der von der Reihenfolge der Ligandzugabe und minimalen experimentellen Schwankungen (Konzentration und pH) abhängig sein könnte.

Die beschriebenen Speichelmischungen wurden ebenfalls bei Körpertemperatur (37°C) analysiert. Die aufgenommenen Lumineszenzspektren stimmen mit denen bei RT überein (siehe Abb. 4.3). Auch die berechneten Lumineszenzlebensdauern und Intensitätsverhältnisse sind mit den Werten bei 25°C vergleichbar (siehe Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Speichelmischungen bei 37°C.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
OA ^b	6,87	146 ± 21	6,7	384 ± 35	2,2	1,6
OA+Amylase	6,88	163 ± 17	6,0	545 ± 14	1,7	1,5
OA+Mucin	6,74	162 ± 23	6,0	427 ± 39	1,9	1,5
Speichel	6,87	146 ± 21	6,7	384 ± 35	2,2	1,5

^a ± 0,5

^bOA= Anorganik (KCl, KHCO₃, NaH₂PO₄, NaCl, Na₂SO₄, KSCN, CaCl₂) und Organik (Harnstoff, Harnsäure)

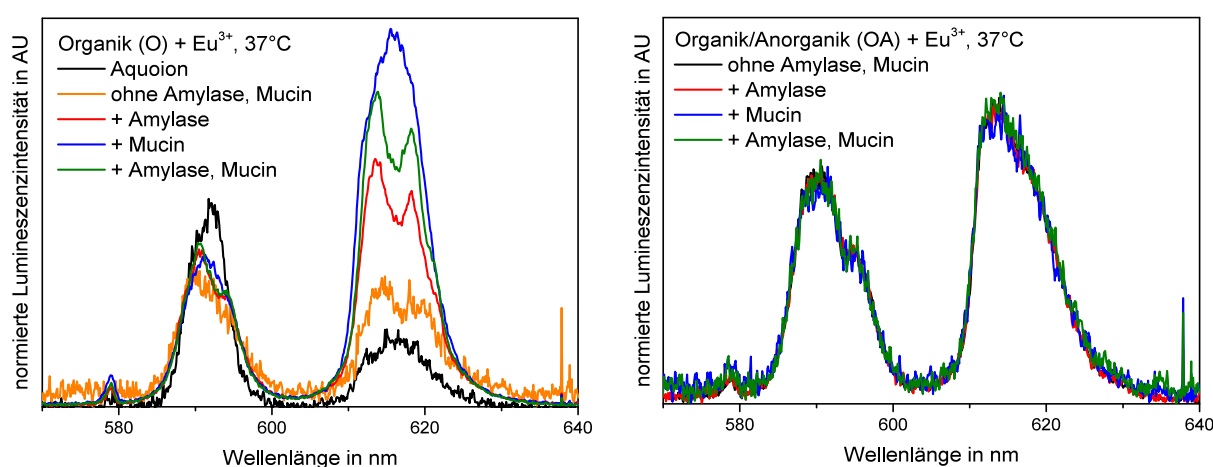


Abbildung 4.3: Einfluss organischer (O = Harnstoff und Harnsäure) und anorganischer Liganden auf die Komplexbildung mit Eu(III) im Speichel bei pH $6,5 \pm 0,5$ und 37°C.

4.1.2 Komplexierung von Eu(III) im Magensaft

Wie bereits beim Modellspeichel beschrieben, wurden die anorganischen (NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂ und NaH₂PO₄) und organischen (Glukose, Harnstoff, Glukosamin Hydrochlorid, Glucuronsäure, Mucin, Pepsin und BSA) Liganden des simulierten Magensafts mit Eu(III) umgesetzt und mit Hilfe von TRLFS untersucht. Die zugehörigen Lumineszenzspektren und Lebensdauern sind Abbildung 4.4 und im Anhang den Tabellen A2 und A3 zu entnehmen.

Aufgrund des niedrigen pH-Wertes von $1 \pm 0,2$ liegt Eu(III) in nahezu allen Probenmischungen als Aquoion vor. Lediglich die Proben, die das Protein Mucin enthalten, weisen eine leicht erhöhte Lebensdauer von 124 μs auf. Auch die Lumineszenzspektren zeigen eine geringe Steigerung der Intensität der F_2 -Bande. Je mehr Bindungspartner zur Verfügung stehen desto geringer ist jedoch die Komplexbildung von Mucin mit Eu(III) ausgeprägt. Vor allem in Anwesenheit anorganischer Ionen wird die Komplexbildung von Eu(III) mit Mucin zurückgedrängt. Als Konkurrenzpartner zu Mucin bzw. Eu(III) wären zum Beispiel Chlorid- oder Calcium-Ionen möglich.

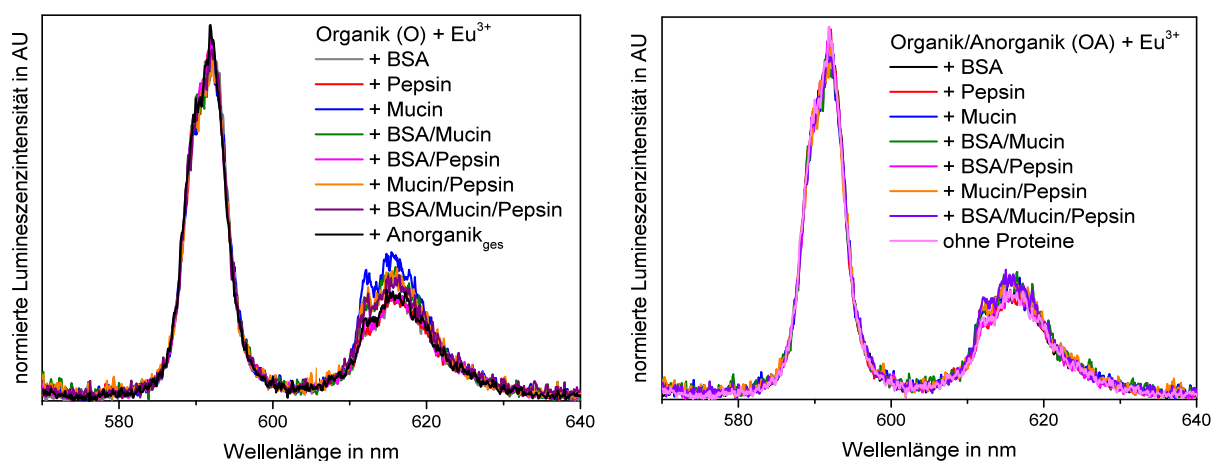


Abbildung 4.4: Einfluss organischer und anorganischer Liganden auf die Komplexbildung von Eu(III) im Magensaft bei $\text{pH } 1 \pm 0,2$ und RT (Organik = Glukose, Harnstoff, Glukosamin Hydrochlorid und Glucuronsäure).

Trotz der geringen Komplexbildung des Mucins mit Eu(III) ist diese erstaunlich in Anbetracht des niedrigen pH-Wertes. Bei dem Protein Mucin handelt es sich um ein Schutzprotein, welches ein wichtiger Bestandteil der Mukusschicht des Gastrointestinaltraktes ist. Es ist lubrizierend (schleimbildend) und enthält oft Carbonat-Ionen zur Neutralisation von Säuren.^[34] Vor allem im Magen fungieren Mucine u.a. als Diffusionsbarriere für Nährstoffe, Drogen, Ionen, Toxine und Makromoleküle und zur Entgiftung durch die Bindung von Schwermetallen.^[47] Die Bindung von Metallionen erfolgt bei geringer Konzentration über die Carbohydrat-Motive des Proteins. Auch Ca^{2+} -Ionen können an die Polysaccharide koordinieren, sodass außer Eu(III) weitere Kationen als Bindungspartner zur Verfügung stehen, die Bindungsplätze des Mucin einnehmen und somit die Eu-Mucin-Bindung zurückgedrängt werden könnte. Dies würde ebenfalls die Verringerung der Komplexbildungsrate mit Eu(III) bei Zugabe der anorganischen Komponenten erklären. Allerdings liegt das Glykoprotein unterhalb pH 2 neutral geladen vor, sodass im Magensaft eine Komplexbildung über die Carbohydrat-Ketten unwahrscheinlich ist.^[95,96] Jedoch unterliegt Mucin im sauren Bereich einer Konformationsänderung. Das Glykoprotein besteht sowohl aus hydrophilen als auch aus hydrophoben Domänen. Letztere befinden sich bei pH 7 innerhalb der gefalteten Struktur. Im niedrigen pH-Bereich werden polare Gruppen jedoch protoniert und hydrophobe Bereiche entfaltet. Innerhalb der hydrophoben Bereiche befindet sich ein unglykosyliertes Polypeptidrückgrat, welches nach der Entfaltung als Bindungsseite für Eu(III) agieren könnte.^[97–99]

Die gemessenen Lumineszenzspektren bei 37°C weisen erneut denselben Trend auf wie bei RT und sind im Anhang dargestellt (siehe Abb. A1).

4.1.3 Komplexbildung von Eu(III) im Pankreassaft

Analog zum Speichel und Magensaft wurde erneut der Einfluss der anorganischen (NaCl , NaHCO_3 , KCl , CaCl_2 , KH_2PO_4 und MgCl_2) und organischen (Harnstoff, Mucin,

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Pankreatin, BSA und Lipase) Liganden des Pankreassekrets auf die Komplexbildung mit Eu(III) untersucht.

Für die Identifizierung der anorganischen Bindungspartner mit Eu(III) im Pankreassaft wurden verschiedene Mischungen angefertigt, bei denen jeweils ein anorganischer Ligand weggelassen wurde. Die zugehörigen Lumineszenzspektren und Lebensdauern sind in der Abbildung 4.5 und in der Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Wie im Falle des Modellspeichels weisen vor allem PO_4^{3-} - und CO_3^{2-} -Ionen eine starke Bindung zu Eu(III) auf. Fehlende Ca^{2+} - und CO_3^{2-} -Ionen resultieren in einer Intensitätserniedrigung der hypersensitiven Bande aufgrund der Bildung von schwerlöslichen EuPO_4 . Es ist zu vermuten, dass die positiv geladen Calcium-Ionen erneut zum Ladungsausgleich benötigt werden. Ebenso bewirkt die Abwesenheit von PO_4^{3-} -Ionen eine Intensitätserniedrigung der F_2 -Bande, wenn auch im geringeren Maße. Ohne Phosphat wurde jedoch nur ein monoexponentieller Zerfall der Lumineszenz beobachtet, was auf die Bildung von einer Eu(III)-Spezies schließen lässt. Es könnten auch mehrere Spezies mit ähnlichen Lebensdauern vorliegen, die spektroskopisch nicht unterschieden werden können. Mit Phosphat in Lösung wurden stets zwei Lebensdauern berechnet aufgrund des biexponentiellen Zerfalls der Lumineszenz. Demzufolge wurden mindestens zwei Eu(III)-Spezies ausgebildet. Da das Lumineszenzspektrum der Mischung ohne Ca^{2+} stark verrauscht ist, konnte für diese Probe keine Lebensdauer bestimmt werden.

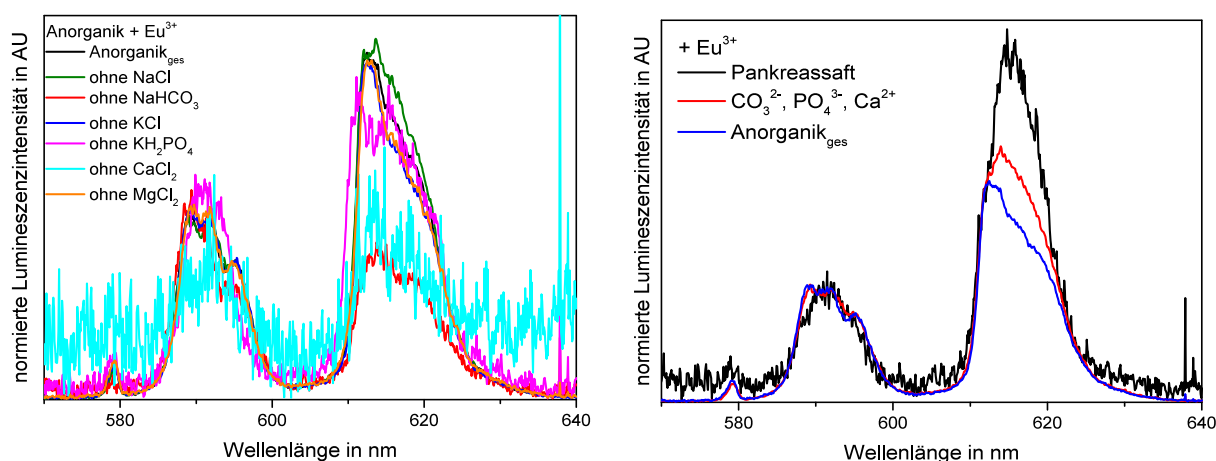


Abbildung 4.5: Einfluss der anorganischen Liganden auf die Komplexbildung von Eu(III) im Pankreassaft bei $\text{pH } 7,4 \pm 0,5$ und RT.

Zwar kann in den Lumineszenzspektren kein Einfluss der Komponenten KCl, NaCl und MgCl_2 auf die Komplexbildung mit Eu(III) beobachtet werden, jedoch weichen die Lumineszenzlebensdauern von der Probe $\text{Anorganik}_{\text{ges}}$ ab, die alle anorganischen Komponenten des Pankreassafts enthält. Es sind daher nicht nur CO_3^{2-} -, PO_4^{3-} - und Ca^{2+} -Ionen an der Komplexbildung mit Eu(III) beteiligt. Dies wird auch im rechten Spektrum von Abbildung 4.5 deutlich. Das Lumineszenzspektrum der ausgewählten Ionen entspricht nicht dem Spektrumverlauf der Probe $\text{Anorganik}_{\text{ges}}$. Da es sich um ein komplexes System handelt, können mehrere Effekte die Komplexbildung beeinflussen. Mögliche Einflüsse sind zum Beispiel die Ionenstärke, die Bildung von Hydroxid-Komplexen sowie andere Liganden (Kationen, An-

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

ionen). Auch die Ligandenkonzentration kann sich auf die Speziation auswirken. Im Gegensatz zum Speichel weist der Pankreassaft einen hohen Gehalt an Chloriden und Carbonaten auf, sodass nicht nur Carbonat- sondern auch Chloro- oder Mischkomplexe gebildet werden könnten.

Um den Einfluss der organischen Liganden zu untersuchen, wurden verschiedene Proteinmischungen hergestellt. Die Lumineszenzspektren dieser Versuche sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Probe Proteinmischung enthält alle Proteine des synthetischen Pankreassafts (BSA, Mucin, Pankreatin und Lipase). Es ist deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Kombinationen der Makromoleküle einen annähernd gleichen Spektrenverlauf und ähnliche Lebensdauern (siehe Tab. 4.6) zeigen. Aufgrund des biexponentiellen Zerfalls der Lumineszenz werden mindestens zwei Eu(III)-Spezies ausgebildet mit Lebensdauern zwischen 352–369 μs und 906–953 μs . Ohne das Glykoprotein Mucin kommt es jedoch zu einer sichtlichen Intensitätssenkung der hypersensitiven Bande und zu einer Verkürzung der Lumineszenzlebensdauer τ_2 um etwa 200 μs .

Tabelle 4.5: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Liganden des Pankreassafts bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Anorganik _{ges}	7,88	211 ± 16	4,5	1144 ± 11	0,3	2,0
ohne NaCl	7,74	564 ± 24	1,3	1344 ± 37	0,2	2,2
ohne NaHCO_3	7,22	104 ± 11	9,7	319 ± 18	2,7	1,0
ohne KCl	7,73	244 ± 20	3,8	1132 ± 14	0,3	1,9
ohne KH_2PO_4	7,91	513 ± 11	1,5			2,2
ohne MgCl_2	7,87	379 ± 24	2,2	1206 ± 21	0,3	1,9

^a $\pm 0,5$

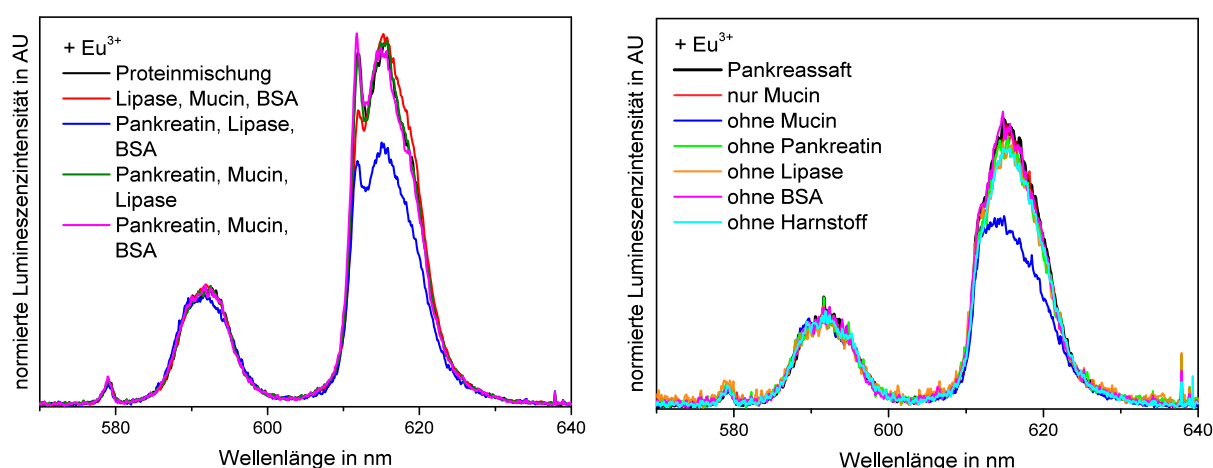


Abbildung 4.6: Einfluss der organischen Liganden auf die Komplexierung von Eu(III) im Pankreassaft bei $\text{pH } 7,4 \pm 0,5$ und RT.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

In Anwesenheit der anorganischen Liganden und des Proteins Mucin werden Lumineszenzspektren der verschiedenen Proteinmischungen mit einer ähnlichen Spektrenform erhalten (siehe rechtes Spektrum Abb. 4.6). Ohne Mucin wird auch in dieser Messreihe ein ausgeprägter Intensitätsabfall der F_2 -Bande beobachtet, was auf einen deutlichen Einfluss des Proteins auf die Komplexbildung mit Eu(III) im Pankreassaft hinweist. Die Lumineszenzlebensdauern der einzelnen Messungen gleichen überwiegend der Lebensdauer der Pankreassaftmischung (siehe Tab. 4.7). Die größte Abweichung weist die Probe ohne Pankreatin auf, die geringste die Probe ohne das Protein Lipase. Genauere Aussagen zur Komplexbildung mit Eu(III) können aus den Lebensdauern jedoch nicht entnommen werden. Insgesamt sind an der Komplexbildung von Eu(III) im Pankreassaft sowohl anorganische als auch organische Liganden beteiligt, wobei Mucin als ein wichtiger Bindungspartner zu nennen ist.

Tabelle 4.6: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit Proteinen des Pankreassafts bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Proteinmischung	7,25	370 ± 10	2,3	907 ± 23	0,6	3,5
ohne Pankreatin	7,63	353 ± 10	2,4	953 ± 21	0,5	3,6
ohne Mucin	7,31	325 ± 17	2,7	704 ± 27	0,9	2,7
ohne BSA	7,27	341 ± 10	2,5	875 ± 25	0,6	3,5
ohne Lipase	7,24	366 ± 13	2,3	902 ± 38	0,6	3,5

^a $\pm 0,5$

Tabelle 4.7: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit Proteinmischungen des Pankreassafts bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Pankreassaft	7,67	224 ± 10	4,2	713 ± 23	0,9	3,3
nur Mucin	7,63	232 ± 10	4,0	845 ± 27	0,6	3,2
ohne Mucin	7,60	244 ± 15	3,8	803 ± 26	0,7	2,3
ohne Pankreatin	7,56	188 ± 18	5,1	602 ± 29	1,2	3,1
ohne Lipase	7,62	206 ± 16	4,6	715 ± 48	0,9	3,2
ohne BSA	7,63	267 ± 13	3,4	859 ± 31	0,6	3,3
ohne Harnstoff	8,39	233 ± 10	4,0	818 ± 20	0,7	3,1

^a $\pm 0,5$

4.1.4 Komplexbildung von Eu(III) in der Galle

Um die wichtigsten Bindungspartner der Gallenflüssigkeit mit Eu(III) bestimmen zu können, wurden verschiedene Mischungen der anorganischen (NaCl , NaHCO_3 , KCl und CaCl_2) und organischen (Harnstoff, Galle und BSA) Komponenten hergestellt und untersucht.

In Abbildung 4.7 sind die Einflüsse der einzelnen anorganischen Liganden auf die Komplexbildung mit Eu(III) dargestellt. Wie bereits im Speichel und im Pankreassaft festgestellt werden konnte, sind vor allem Carbonat-Ionen an der Komplexbildung beteiligt. Die Abwesenheit von Carbonat resultiert in einer starken Intensitätserniedrigung der hypersensitiven Bande. Auch die Lebensdauer wird im Vergleich zu den carbonathaltigen Proben (Anorganik_{ges}, Proben ohne Chlorid) stark verkürzt (siehe Tab. 4.8). Zudem wurden für die Proben mit Carbonat ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz gemessen, ohne Carbonat jedoch ein monoexponentieller, was auf die Ausbildung von nur einer Eu(III)-Spezies hindeutet.

Die Lumineszenzspektren der chloridfreien Probelösungen zeigen hingegen keine sichtbaren Veränderungen. Unter Berücksichtigung der berechneten Lebensdauern ist jedoch erkennbar, dass diese variieren und nicht mit der Lebensdauer der vollständigen Anorganikprobe übereinstimmen. Auch die Kombination von CO_3^{2-} -Ionen mit den verschiedenen Chloriden (CaCl_2 , NaCl und KCl) ergeben abweichende Lumineszenzspektren und Lebensdauern (siehe Tab. 4.9). Es sind daher an der Komplexbildung mehrere anorganische Komponenten beteiligt.

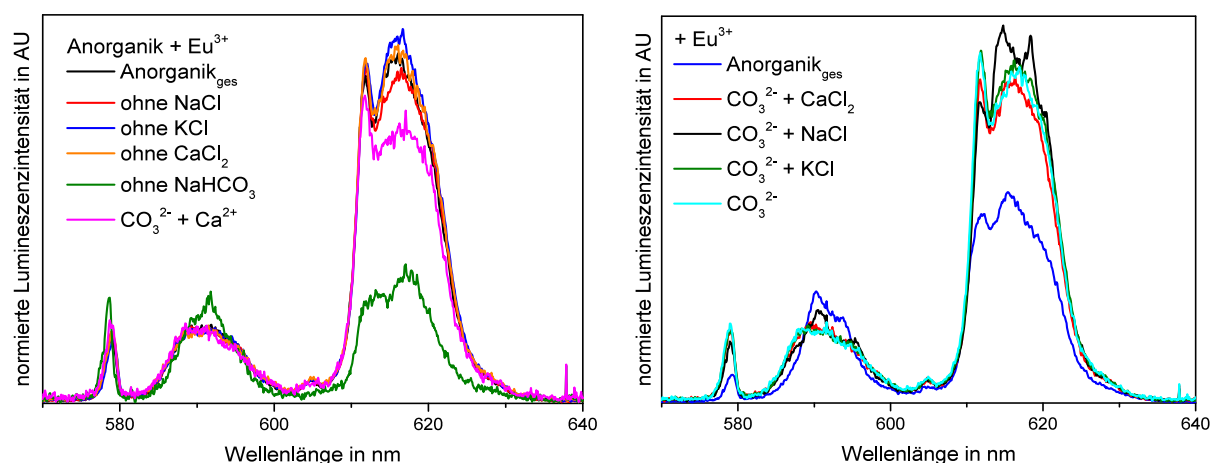


Abbildung 4.7: Einfluss der anorganischen Liganden auf die Komplexbildung in der Galle bei $\text{pH } 8,0 \pm 0,2$ und RT.

In Abbildung 4.8 wurde der Einfluss der organischen Liganden auf die Komplexbildung von Eu(III) in der Gallenflüssigkeit untersucht. Dabei ist zu erkennen, dass drei von vier Lumineszenzspektren denselben Spektrenverlauf aufweisen. Die Spektren der Probe ohne Harnstoff und der Probenmischung, die alle organischen Komponenten der Gallenflüssigkeit enthält, stimmen in der Spektrenform überein. Jedoch weichen die berechneten Lumineszenzlebensdauern voneinander ab (siehe Tab. 4.10). Somit kann ein Einfluss des Harnstoffs auf die Komplexbildung von Eu(III) in der Galle nicht ausgeschlossen werden.

In Anwesenheit der anorganischen Liganden (siehe rechtes Spektrum Abb. 4.8) wurden erneut ähnliche Lumineszenzspektren erhalten, die dem Spektrum der vollständigen Gallenprobe entsprechen. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen gleichen sich auch die Lebensdauern an, die Tabelle 4.11 entnommen werden können. Eine Mischung der anorganischen Liganden mit dem Gallenextrakt als organischen Liganden weist nicht nur denselben

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Tabelle 4.8: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit anorganischen Liganden der Galle bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Anorganik _{ges}	8,18	221 \pm 10	4,2	1250 \pm 10	0,2	4,5
ohne NaCl	8,20	193 \pm 10	4,9	544 \pm 31	1,3	4,6
ohne KCl	8,18	213 \pm 10	4,4	613 \pm 62	1,1	4,9
ohne CaCl ₂	8,10	206 \pm 10	4,6			4,8
ohne NaHCO ₃	7,90	124 \pm 10	8,0			1,7

^a $\pm 0,5$

Tabelle 4.9: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in verschiedenen Anorganikmischungen der Galle bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Anorganik _{ges}	8,22	211 \pm 11	4,4	1174 \pm 20	0,3	3,0
CO ₃ ²⁻ + CaCl ₂	8,03	205 \pm 10	4,9	544 \pm 31	1,3	4,5
CO ₃ ²⁻ + NaCl	8,22	216 \pm 10	4,3	486 \pm 47	1,6	4,9
CO ₃ ²⁻ + KCl	8,20	207 \pm 1	4,5	613 \pm 62	1,1	4,9
CO ₃ ²⁻	8,11	200 \pm 10	4,7			4,8

^a $\pm 0,5$

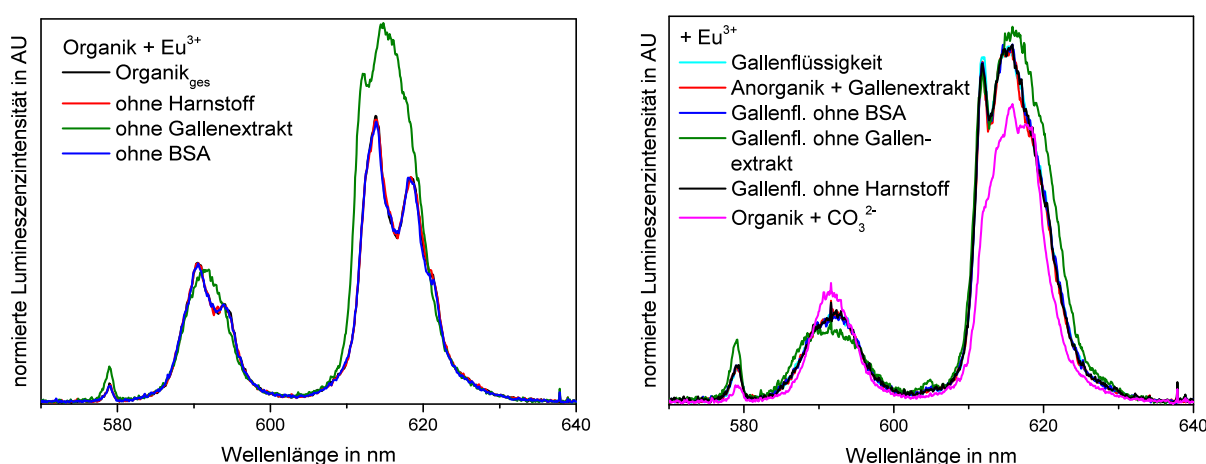


Abbildung 4.8: Einfluss der organischen Liganden auf die Komplexbildung in der Galle bei pH 8,0 \pm 0,2 und RT.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Spektrenverlauf wie die vollständige Gallenflüssigkeit auf, sondern erzielt auch vergleichbare Lebensdauern. Den größten Einfluss der organischen Liganden auf die Komplexierung des Eu(III) besitzt somit der Gallenextrakt. Das Protein BSA und der Harnstoff zeigen keinen oder nur einen geringen Einfluss.

Es ist jedoch anzumerken, dass es sich bei dem verwendeten Gallenextrakt um eine komplexe Mischung aus diversen Bestandteilen handelt (siehe Kapitel 2.2.4).^[51]

Aufgrund dieser komplexen Zusammensetzung ist es nicht möglich komplexierende Spezies im Einzelnen zu bestimmen. Hierfür müssten die Bestandteile des Gallenextraktes untersucht werden. Problematisch sind zudem fehlende Literaturangaben bzgl. der physiologischen Konzentration der Einzelkomponenten.

Tabelle 4.10: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen Liganden der Galle bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Organik _{ges}	7,90	428 \pm 43	1,9	855 \pm 20	0,6	2,5
ohne Harnstoff	7,85	294 \pm 24	3,0	811 \pm 8	0,7	2,5
ohne Gallenextrakt	7,84	232 \pm 10	4,0	512 \pm 118	1,5	3,6
ohne BSA	7,89	335 \pm 31	2,6	828 \pm 10	0,7	2,5

^a $\pm 0,5$

Tabelle 4.11: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen und anorganischen Liganden der Galle bei RT.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Gallenfl.	8,18	248 \pm 10	3,7	773 \pm 27	0,8	4,4
A ^b + Gallenextrakt	8,16	241 \pm 10	3,8	690 \pm 28	0,9	4,3
ohne BSA	8,19	248 \pm 10	3,7	747 \pm 26	0,8	4,4
ohne Gallenextrakt	8,19	221 \pm 10	4,2	1496 \pm 105	0,1	5,0
ohne Harnstoff	8,14	674 \pm 28	1,0	2367 \pm 10	3,9	4,4

^a $\pm 0,5$

^bA=Anorganik(NaCl, NaHCO₃, KCl und CaCl₂)

4.1.5 LCF-Analyse von Eu(III) in den synthetischen Biofluiden

Die aufgenommenen Lumineszenzspektren von Eu(III) mit den einzelnen Biofluiden wurden im Anschluss durch eine lineare Kombinationsanalyse (LCF-linear combination fitting) analysiert. Die Analyse basiert auf den einzelnen Lumineszenzspektren der Hauptkomponenten der Biofluide um wichtige Bindungspartner mit Eu(III) zu identifizieren. In den LCF-Analysen wurde das Protein BSA nicht berücksichtigt, da es im verwendeten UBM-Protokoll lediglich als Modellprotein fungiert. Für allgemeine Untersuchungen stellt das Protein keinen Störfaktor dar. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten jedoch Wechselwirkungen

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

zwischen Eu(III)/Cm(III) und den Bestandteilen des Gastrointestinaltraktes genauer untersucht werden. BSA ist jedoch ein potentieller Bindungspartner für dreiwertige Ln und An. Allerdings kommt das Protein vorrangig im Blutplasma vor und nicht im fokussierten Verdauungssystem. Daher wurden für die LCF-Analysen die benötigten Lumineszenzspektren des Magensafts und der Gallenflüssigkeit ohne das Protein BSA aufgenommen und im Pankreassaft wurde das Protein durch das Verdauungsenzym Trypsin ersetzt.

Die LCF-Analysen von Eu(III) mit den Biofluiden Speichel, Magensaft, Pankreassaft und Galle sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Die daraus vorgeschlagene Speziesverteilung ist in Tabelle 4.12 zusammengefasst.

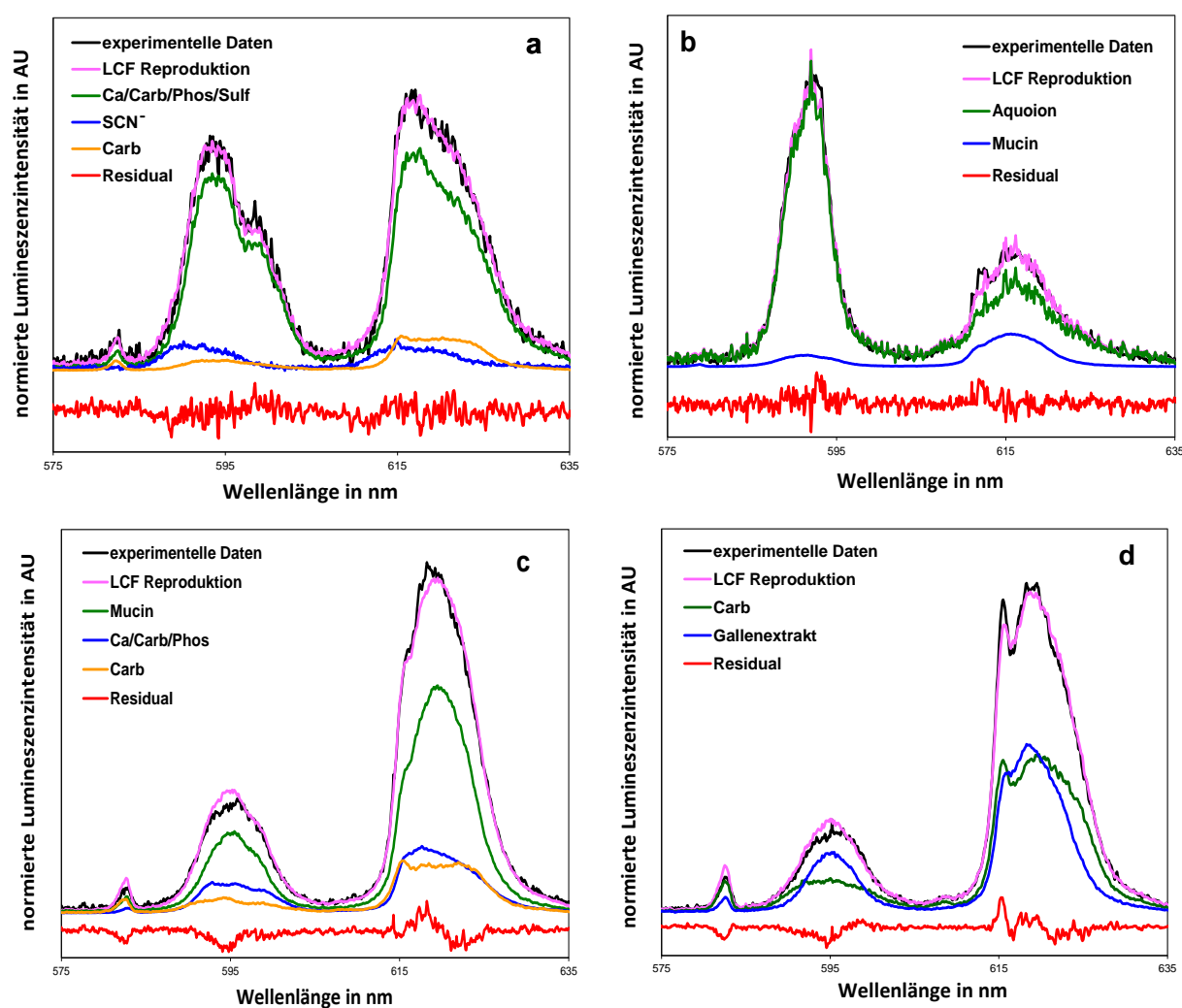


Abbildung 4.9: Lumineszenzspektren und LCF-Analyse von Eu(III) im (a) Speichel, (b) Magensaft, (c) Pankreassaft und (d) Galle.

Basierend auf den experimentellen Daten wird die Speziation von Eu(III) im Speichel überwiegend von anorganischen Komponenten bestimmt. Hauptbindungspartner ist ein Komplex aus Eu(III), Carbonat, Phosphat, Sulfat und zusätzlichen Calcium-Ionen als Gegenionen wie bereits im Kapitel 4.1.1 vorgeschlagen (in der Arbeit als Eu/Carb/Phos/Sulf

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Tabelle 4.12: Experimentell bestimmte Speziesverteilung von Eu(III) in den Biofluiden.

Ligand	Speichel	Magensaft	Pankreassaft	Galle
Ca/Carb/Phos/Sulf	84 %	–	27 %	–
KSCN	11 %	–	–	–
Carbonat	5 %	–	13 %	45 %
Aquoion	–	95 %	–	–
Mucin	–	5 %	60 %	–
Gallenextrakt	–	–	–	55 %

+ (Ca) bezeichnet). Zur Vereinfachung werden alle $H_nCO_3^{(2-n)-}$, $H_nPO_4^{(3-n)-}$ bzw. $H_nSO_4^{(2-n)-}$ -Spezies unter den Begriffen Carbonat (Carb), Phosphat (Phos) bzw. Sulfat (Sulf) zusammengefasst. Der Versuch das Lumineszenzspektrum des Speichels nur mit den binären, anorganischen Eu(III)-Spezies anzupassen (Eu/Carb und Eu/Phos), ergab zu hohe Fehlerwerte. Eine Mischung der anionischen Carbonat-, Phosphat-, Sulfat-Liganden und Calcium als Kation reproduziert hingegen das Spektrum des Speichels in einem guten Maßstab. Zudem weisen die binären Komplexe Eu/Carb und Eu/Phos nur einen monoexponentiellen Zerfall der Lumineszenz auf, der quaternäre Komplex Eu/Carb/Phos/Sulf + (Ca) sowie die Gesamtprobe des Speichels dagegen einen biexponentiellen.

Die binären Komplexe von Eu(III) mit Thiocyanat (Eu/SCN) und Hydrogencarbonat (Eu/HCO₃) als Liganden haben nur einen geringen Einfluss auf die Speziation. Die Speichelproteine Mucin und Amylase scheinen zudem für die Speziation bedeutungslos zu sein. Eine Studie von Barkleit et al. [100] hebt jedoch einen wesentlichen Beitrag der Proteine, vor allem der Amylase, auf die Eu(III)/Cm(III)-Speziation in menschlichen Speichel hervor. Da eine chemische Speziation stark von der Konzentration der einzelnen Bestandteile eines Systems abhängig ist, könnten die Diskrepanzen zwischen den einzelnen Studien auf Konzentrationsunterschiede zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer dreifach höheren Konzentration der anorganischen Liganden Carbonat und Phosphat (15 mM) gearbeitet als in der erwähnten Studie (4 mM). Es ist anzunehmen, dass die erhöhte Konzentration dieser bindungsstarken Liganden zu einer gesteigerten Komplexierung mit Eu(III) führt und die Komplexbildung mit den Speichelproteinen unterdrückt.

Dieselbe Studie beschreibt außerdem einen ternären Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca), der dem quaternären Komplex Eu/Carb/Phos/Sulf + (Ca) dieser Arbeit in der Zusammensetzung nahezu gleicht. Für den ternären Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca) wird ein monoexponentieller Zerfall der Lumineszenz beobachtet. Die daraus berechnete Lebensdauer von 445 µs ähnelt sehr der von $Eu(CO_3)_3^-$ (440 µs), wo Carbonat als zweizähliger Ligand fungiert. Daraus schlussfolgernd kann angenommen werden, dass im ternären Komplex drei bidentate Liganden (Carb, Phos) an Eu(III) koordiniert sind. Vorgeschlagene Stöchiometrien des Eu:Carb:Phos-Verhältnisses sind 1:1:2 oder 1:2:1. Aufgrund des höheren Gehalts an berechneten Phosphat-Komplexen in den thermodynamischen Speziationsberechnungen wird das Eu:Carb:Phos-Verhältnis von 1:1:2 als wahrscheinlicher angesehen. Die zum Ladungsaustausch benötigten Calcium-Ionen des ternären Komplexes sind voraussichtlich in der äußeren Koordinationssphäre involviert.^[100]

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Da die Speziationsuntersuchungen dieser Arbeit im Speichel zusätzlich mit Sulfat durchgeführt wurden, liegt im bestimmten Komplex Eu/Carb/Phos/Sulf +(Ca) eine andere Stöchiometrie vor als in der Literatur beschrieben. Ein mögliches Metall:Ligand-Verhältnis wäre 1:1:1:1 (Eu:Carb:Phos:Sulf). Die Phosphat- und Carbonatkonzentrationen im Speichel sind jedoch höher als die des Sulfats. Des Weiteren scheinen Sulfat-Liganden nur einen geringen Einfluss auf die Speziation von Eu(III) im Speichel einzunehmen aufgrund der geringen Änderungen im Lumineszenzspektrum (siehe Abb. A2). Sulfat könnte demzufolge wie Calcium nur an der äußeren Koordinationssphäre von Eu(III) beteiligt sein.

Ein weiterer Unterschied zu dem beschriebenen ternären Komplex aus der Literatur stellt die Anzahl möglicher Spezies dar. Der ternäre Komplex Eu/Carb/Phos +(Ca) weist wie bereits erwähnt einen monoexponentiellen Zerfall der Lumineszenz auf, was auf die Ausbildung einer Spezies hindeutet. Der quaternäre Komplex Eu/Carb/Phos/Sulf +(Ca) zeigt hingegen einen biexponentiellen Zerfall der Lumineszenz, sodass vermutlich mindestens zwei Spezies gebildet werden. In den Speichelproben wurde wie vorher beschrieben eine dreifach höhere Konzentration an Phosphat- und Carbonat-Liganden eingesetzt als in der Speziationsstudie von Barkleit et al. [100]. Aufgrund dessen könnten zwei Komplexe mit unterschiedlicher Stöchiometrie vorliegen (Eu:Carb:Phos = 1:1:1, 1:2:2). Mit Hilfe der zwei unterschiedlichen Lebensdauern lässt sich die Anzahl der verbleibenden Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Metallions berechnen (siehe Tab. 4.2). Der quaternäre Komplex weist demzufolge mindestens zwei Spezies mit vier Wassermolekülen bzw. nur noch einem Molekül auf. Vier Wassermoleküle könnten auf die Bindung von zwei bzw. drei bidentaten Liganden in einem Eu:Carb:Phos-Verhältnis von 1:1:1 hindeuten. Mit einem Wassermolekül in der ersten Koordinationssphäre wären vier bidentate Liganden in einem 1:2:2-Verhältnis (Eu:Carb:Phos) möglich.

Eine Komplexierung im Magensaft ist aufgrund der sauren Bedingungen von pH=1 weder mit organischen noch anorganischen Liganden zu erwarten, was mit den TRLFS Ergebnissen übereinstimmt. Nach der LCF-Analyse liegen 95 % der Eu(III) Spezies als Aquoion vor. Die restlichen 5 % bilden einen Komplex mit dem Protein Mucin (siehe Tab. 4.12).

Im Allgemeinen weist eine chemische Speziation nicht nur eine Konzentrations- sondern auch eine starke pH-Abhängigkeit auf. Im Vergleich zum sauren Magensaft herrscht im Pankreassaft ein nahezu neutraler bis leicht basischer pH. Des Weiteren enthalten der Pankreassaft und das Pankreatin als Extrakt des Pankreassekrets eine Vielzahl an wichtigen Verdauungsenzymen (über 20!).^[38,101] Demzufolge wird die Eu(III)-Speziation im Gegensatz zum Speichel vorwiegend von organischen Spezies bestimmt anstatt von anorganischen Komplexen. Basierend auf den TRLFS-Daten ergab die LCF-Analyse mit 60 % eine dominante Eu(III)-Spezies mit Mucin währenddessen der ternäre Komplex Eu/Carb/Phos +(Ca) einen moderaten Beitrag (27 %) auf die Eu(III)-Speziation im Pankreassaft zeigt. Zusätzlich wurde ein geringer Einfluss (13 %) der binären Carbonat-Spezies (Eu/Carb) berechnet (siehe Tab. 4.12). Da im Pankreassaft nach der verwendeten Versuchsvorschrift keine Sulfationen vorhanden sind, liegt hier der ternäre Komplex Eu/Carb/Phos +(Ca) vor. Allerdings weist auch dieser einen biexponentiellen Zerfall der Lumineszenz auf, sodass wie im Speichel zwei ternäre Komplexe mit unterschiedlicher Stöchiometrie (Eu:Carb:Phos = 1:1:1, 1:2:2) vorliegen könnten.

In der Gallenflüssigkeit erhöht sich der Beitrag des binären Komplexes Eu/Carb auf 45 %.

Die verbliebenen 55 % bestehen aus verschiedenen Eu(III)-Spezies mit Bestandteilen des Gallenextraktes, welches, wie bereits erwähnt, ein komplexes System aus Gallensalzen und -alkoholen, Cholesterin, Metallionen, metabolischen Produkten oder auch Phospholipiden darstellt.^[51]

4.2 Speziation von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem

Um das vollständige Verdauungssystem zu simulieren, wurden die einzelnen Verdauungssäfte Schritt für Schritt hinzugefügt. Zuerst wurden die Biofluide Speichel und Magensaft kombiniert, um die physiologischen Bedingungen des Magens zu imitieren. Die Simulation des Dünndarms erfolgte durch das Mischen von Pankreassaft und Gallenflüssigkeit. Im Anschluss wurden beide Phasen (Magen und Dünndarm) miteinander vereint, um einen vollständigen Verdauungsvorgang zu erhalten. Die Lumineszenzspektren des simulierten Systems sowie die Ergebnisse der LCF-Analyse sind in der Abbildung 4.10 und Tabelle 4.13 dargestellt. Die wichtigsten spektroskopischen Parameter können Tabelle 4.14 entnommen werden. Zudem wurden die Lumineszenzspektren sowohl bei Raum- als auch bei Körpertemperatur gemessen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Spektren festgestellt werden (siehe Anhang Abb. A3).

Der erste Schritt der Verdauung, der schon im Mund stattfindet, wurde bereits anhand der Komplexierung von Eu(III) im Speichel beschrieben. Im nachfolgenden Prozess wird eine Mischung aus Nahrung und Speichel, der sogenannte *Bolus*, vom Mund durch den Oesophagus in den Magen transportiert.^[35] Während der Magensaft einen pH-Wert zwischen 0,9–1,0 aufweist, stellt sich in der Speichel-Magensaft-Phase ein pH zwischen 1,2 und 1,7 ein. Diese kleine, aber dennoch wichtige Erhöhung des pH-Wertes im Magen sowie die Konzentrationsänderung der Mischung im Vergleich zum Magensaft können zu einer Änderung der chemischen Speziation führen. In Tabelle 4.13 sind die berechneten Speziesverteilungen von Eu(III), basierend auf den TRLFS-Daten, zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass im Vergleich zur Speziation des reinen Magensafts, die Eu(III)-Speziation im Magen mehr Bindungspartner aufweist. Der Anteil an Mucin- wie auch an anorganischen Komplexen ist mit 13 % Gesamtbeteiligung als gering einzuordnen. Als anorganischer Bindungspartner fungiert vermutlich der bereits beschriebene ternäre Komplex $\text{Eu/Carb/Phos} + (\text{Ca})$. Zwar liegen im Magen aufgrund des Speicheltransports Sulfat-Ionen vor, jedoch nur in einer sehr geringen Konzentration. Es ist daher anzunehmen, dass Sulfat nahezu keinen Einfluss auf die Komplexierung mit Eu(III) im Magen einnimmt. Des Weiteren wird die Bildung des Aquoions im Vergleich zum reinen Magensaft im Magen unterdrückt (61 %), während bei pH 0,9–1,0 die Eu(III)-Speziation vorwiegend durch das Aquoion bestimmt wird (95 %). Stattdessen kann im Magen eine weitere Eu(III)-Spezies mit Pepsin (26 %), dem Verdauungsenzym des Magens,^[102] vorgefunden werden. Ein Großteil der Verdauung findet im Dünndarm statt. Hier sind zwei Biofluide co-existent: der Pankreassaft und die Gallenflüssigkeit. Der Pankreassaft wird in der Pankreas (Bauchspeicheldrüse) sekretiert und anschließend in den oberen Dünndarmabschnitt (Duodenum) transportiert. Die Gallenflüssigkeit wird zunächst in der Leber produziert und dann in der Gallenblase gespeichert.^[34]

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

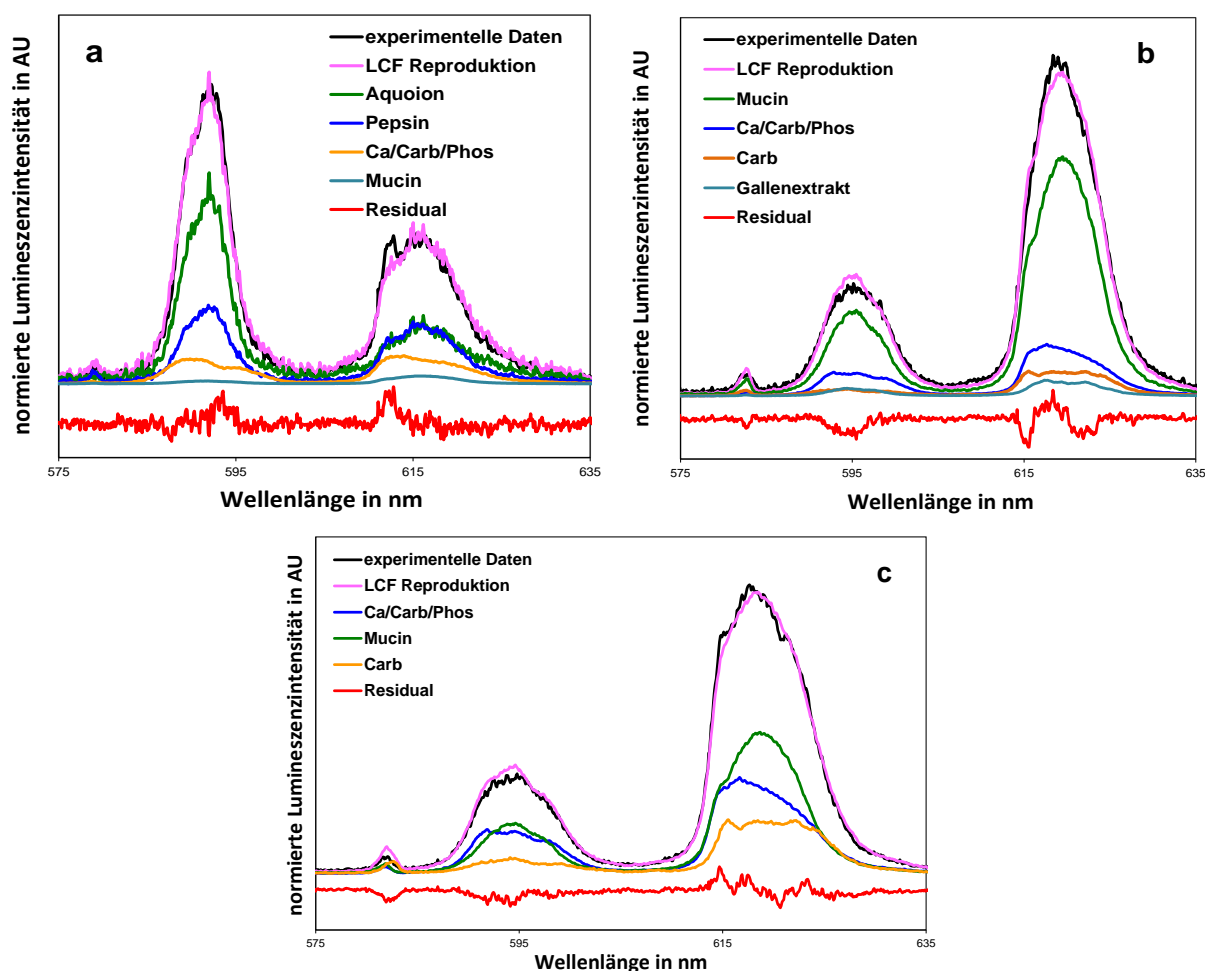


Abbildung 4.10: Lumineszenzspektren und LCF-Analyse von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem: (a) Magen, (b) Dünndarm und (c) vollständiges Verdauungssystem.

Tabelle 4.13: Experimentell bestimmte Speziesverteilung von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem.

Ligand	Magen	Dünndarm	gesamtes System
Aquoion	61 %	–	–
Ca/Carb/Phos/Sulf	12 %	21 %	43 %
Pepsin	26 %	–	–
Mucin	1 %	66 %	42 %
Carbonat	–	7 %	15 %
Gallenextrakt	–	6 %	–

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

Kombiniert weisen diese beiden Biofluide einen pH-Wert zwischen 7 und 8 auf. Wie in Tabelle 4.13 dargestellt, deuten die Ergebnisse der LCF-Analyse auf einen wesentlichen Einfluss des Glykoproteins Mucin auf die Eu(III) Speziation im Dünndarm hin (66 %). Auch im Pankreassaft wird Eu(III) mit Mucin als Hauptspezies postuliert. Die Komponenten der Gallenflüssigkeit zeigen hingegen nur eine geringe Beteiligung an der Speziation im Dünndarm (6 %). Das Sekret der Galle kann jedoch auch Mucin enthalten,^[51] sodass der berechnete Anteil der Mucin-Spezies sich möglicherweise aus Pankreassaft und Galle zusammensetzt. Ebenso wurde der ternäre Komplex Eu/Carb/Phos +(Ca) als anorganischer Bindungspartner detektiert, der allerdings nur einen geringen Beitrag an der Gesamtfraction aufweist.

Im simulierten Gesamtsystem stellt sich ein pH von $6,3 \pm 0,5$ ein. Die LCF-Analyse der TRLFS-Daten resultiert in zwei Hauptspezies mit Mucin (42 %) und dem ternären, anorganischen Komplex Eu/Carb/Phos +(Ca) (43 %). Zudem werden aufgrund des hohen Carbonatgehalts des Pankreassafts und der Gallenflüssigkeit binäre Eu(III)-Carbonat-Komplexe (Eu/Carb) gebildet.

Tabelle 4.14: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem.

Probe	pH	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
Magen	1,4	121 ± 10	8,2			0,7
Dünndarm	8,1	292 ± 30	3,0	1240 ± 417	0,2	3,2
Vollständiges System	6,8	261 ± 11	3,5	1299 ± 32	0,2	3,3

^a $\pm 0,5$

4.3 Speziation von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem

Basierend auf den Ergebnissen mit Eu(III) wurde der Versuch des simulierten Verdauungssystems (Probenmedien Speichel, Magen, Dünndarm und vollständiges System) mit Cm(III) wiederholt. Die Lumineszenzspektren der ausgewählten gastrointestinalen Flüssigkeiten sowie Referenzspektren des Cm(III)-Aquoions und des Mucin-Komplexes sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die spektroskopischen Parameter sind in Tabelle 4.15 zusammengefasst.

Verglichen mit dem Referenzspektrum des Cm(III)-Aquoions zeigt das Spektrum der Speichelprobe eine deutliche Rotverschiebung auf. Dies deutet auf Wechselwirkungen zwischen Cm(III) und den Liganden des Speichels hin. Zudem wurde ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz gemessen, sodass zwei Lumineszenzlebensdauern bestimmt wurden. Dies lässt die Bildung von mindestens zwei Cm(III)-Spezies im Speichel vermuten. Die berechneten Lebensdauern von 98 ± 15 und $346 \pm 18 \mu\text{s}$ entsprechen jeweils 6 und 1 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Eu(III)-Experimente wird auch bei Cm(III) aufgrund der sauren Bedingungen im Magen eine Erhöhung der Wassermolekülanzahl in der ersten Koordinationssphäre des Metallions beobachtet. Die zugehörige Lumineszenzle-

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

bensdauer der Magenphase von $68 \pm 5 \mu\text{s}$ entspricht ungefähr dem Literaturwert des reinen Cm(III)-Aquoions ($65 \pm 2 \mu\text{s}$, Anzahl Wassermoleküle = 9).^[83]

Im Lumineszenzspektrum der Pankreassaft-Galle-Mischung kann erneut eine Rotverschiebung festgestellt werden. Auch die Lumineszenz weist einen biexponentiellen Zerfall auf, was auf die Bildung von mindestens zwei Cm-Spezies hindeutet. Im Vergleich zur Speichelprobe sind diese jedoch langlebiger. Die berechneten Lebensdauern von 129 ± 9 und $380 \pm 12 \mu\text{s}$ entsprechen jeweils 4 und 1 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre. Werden alle vier Biofluide zusammengefügt, zeigt das zugehörige Spektrum ebenso eine Rotverschiebung mit ähnlichen spektroskopischen Parametern auf.

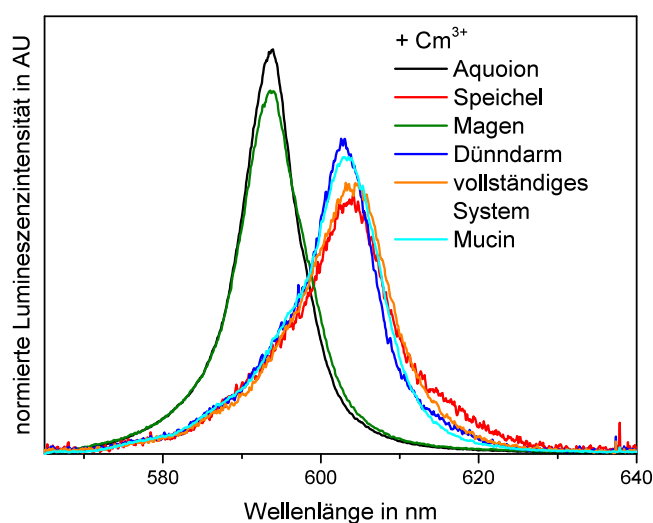


Abbildung 4.11: Lumineszenzspektren von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem.

In der Eu(III)-Speziation wurde das Protein Mucin als ein wichtiger Ligand identifiziert. Auch im TRLFS-Spektrum von Cm(III) mit Mucin kann sowohl eine signifikante Rotverschiebung als auch ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz beobachtet werden. Ein ähnlicher Trend wurde bereits in den Proben der Dünndarmphase und des vollständig simulierten Systems beschrieben. Daraus schlussfolgernd scheint Mucin nicht nur in der Eu(III)-Speziation ein wichtiger organischer Bindungspartner zu sein sondern ebenfalls in der von Cm(III).

Generell konnte mit Hilfe der TRLFS ein *in vivo*-Übergang dreiwertiger f-Elemente vom Magen in den Dünndarm simuliert werden. Aufgrund der sauren Bedingungen im Magen wird die Speziation dreiwertiger Ln und An vom reinen Aquoion mit einem geringen Beitrag des Pepsin-Komplexes dominiert. Infolge des pH-Anstiegs beim Transport der Metallionen in den Dünndarm konnte eine Wechselwirkung mit dem Protein Mucin und die Bildung eines ternären, anorganischen Komplexes (Ln oder An/Carb/Phos + (Ca)) festgestellt werden.

Tabelle 4.15: Lumineszenzlebensdauern von Cm(III) im simulierten Verdauungssystem.

Probe	pH	λ in nm	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_2 in μs	$n_2(\text{H}_2\text{O})^a$
Aquoion	2,3	593,8	67 ± 5	8,8		
Mund	6,4	603,9	98 ± 15	5,7	346 ± 18	1,0
Magen	1,3	593,5	68 ± 5	8,7		
Dünndarm	7,4	602,6	129 ± 9	4,2	380 ± 12	0,8
vollständiges System	6,8	603,7	138 ± 7	3,8	498 ± 13	0,4
Mucin	6,0	603,1	81 ± 5	7,2	259 ± 5	1,6

^a $\pm 0,5$

4.4 Vergleich spektroskopischer Messungen mit thermodynamischen Berechnungen

Chemische Speziationen können auch über thermodynamische Modellierungen simuliert werden. Im Folgenden sollen daher verschiedene thermodynamische Simulationen vorgestellt und mit der experimentell bestimmten Speziationsverteilung von Eu(III) verglichen werden, um die Wichtigkeit experimenteller Ergebnisse hervorzuheben. Die ersten thermodynamischen Speziationsberechnungen für Lanthanide und Actinide im menschlichen Verdauungssystem wurden von Webb et al. [9, 10] veröffentlicht. Dabei wurde die chemische Speziation von Eu(III) und Am(III) im Speichel und Magensaft sowie von Gd(III) und Cm(III) im Pankreassaft und der Galle untersucht. Die Simulationen basierten vor allem auf anorganischen Komponenten mit nur einer geringen Zahl an möglichen organischen Bindungspartnern wie Citrat, Lactat oder Aminosäuren. Bio-Makromoleküle wie Verdauungsenzyme wurden in der Simulation nicht berücksichtigt aufgrund des Fehlens von entsprechenden thermodynamischen Daten.

In Folge dessen wird die Speziation im Speichel vorwiegend durch Carbonat- und Phosphatkomplexe sowie dem Aquoion bestimmt, während sich im Magensaft vorrangig Chlorid-Spezies (entspricht dem Aquoion) bilden. Im Dünndarm wird die Speziation vor allem durch Phosphat-, Carbonat- und Hydroxid-Komplexe dominiert. Des Weiteren sagen Webb et al. unterschiedliche Verhalten der dreiwertigen Ln und An voraus. Im Pankreassaft wird die Speziation von Gd(III) durch Phosphate und dem freien Ion beeinflusst, die dominierende Spezies von Cm(III) ist allerdings CmOH^{2+} . In der Galle wurden für Gd(III) bis zu sieben unterschiedliche Spezies bestimmt, die von Phosphat- und Carbonat-Komplexen dominiert werden. Währenddessen bei Cm(III) hauptsächlich das freie Ion, Lactat- und Hydroxid-Komplexe vorliegen.^[9,10]

Eine weitere *in silico*-Studie sowie ein *in vitro*-Modell wurden von Jones et al. [103] veröffentlicht. In der erwähnten Studie wurde die chemische Speziation von Np(V) untersucht. Allerdings wurde im *in vitro*-Modell lediglich zwischen Komplexen mit einer hohen bzw. niedrigen molekularen Masse und unlöslichen Spezies unterschieden. Im Speichel, Magen und Dünndarm wurde Np(V) vor allem in Komplexen mit einer geringen molaren Masse und in unlöslichen Fraktionen vorgefunden. Die computersimulierte Modellierung berechnete erneut eine Speziationsverteilung zwischen Carbonat- und Phosphat-Komplexen.^[103]

Basierend auf kürzlich veröffentlichten Stabilitätskonstanten für die α -Amylase von Barkleit et al. [87] wurde in dieser Arbeit auch eine thermodynamische Modellierung der Eu(III)-Speziation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 zusammengefasst. Die Resultate stimmen jedoch nicht mit den experimentell bestimmten Daten überein. Ursache hierfür ist erneut der Mangel an vorhandenen thermodynamischen Daten besonders für größere organische Moleküle (z.B. Mucin oder Pepsin) wie auch Mehrkomponentensysteme anorganischer Spezies (z.B. der ternäre, anorganische Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca)). Dies hebt die enorme Bedeutung experimenteller Bestimmungen von Speziationen von komplexen Systemen mit organischen und Mehrkomponenten-Spezies hervor. Thermodynamische Modellierungen können vor allem für einfache Systeme, die aus anorganischen Spezies bestehen, angewendet werden. So besteht zum Beispiel beim Speichel und Magensaft eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und dem thermodynamischen Modell. Bei beiden Methoden wird eine Speziation vorausgesagt, die von anorganischen Spezies und dem Aquoion dominiert wird (siehe Abb. 4.12). Thermodynamische Berechnungen können zudem sehr nützlich sein, um eine detaillierte Übersicht anorganischer Spezies zu erhalten, besonders wenn diese experimentell nicht unterscheidbar sind. Fehlen jedoch die Stabilitätskonstanten, wie z.B. von organischen und Mehrkomponenten-Spezies, oder können diese nicht bestimmt werden, sind experimentelle Daten notwendig, um chemische Speziationen voraussagen zu können. Dies wird anhand der TRLFS bestimmten Speziationsverteilung von Eu(III) in den Abbildungen 4.12 und 4.13 deutlich.

Weiterhin ist die Stöchiometrie und der Protonierungsgrad des ternären Komplexes Eu/Carb/Phos + (Ca) unbekannt. Die thermodynamisch bestimmte Verteilung der Eu-Carbonat und Eu-Phosphat-Spezies (z.B. im Dünndarm und dem vollständig simulierten System, siehe rechte Abb. 4.13) könnten dabei helfen, die genaue Zusammensetzung des ternären Komplexes zu charakterisieren. Basierend auf thermodynamischen Berechnungen wird wie bereits erwähnt in der Literatur ein 1:1:2 (Eu:Carb:Phos)-Komplex mit deprotoniertem Carbonat vorausgesagt. Der Protonierungsgrad des Phosphat-Liganden ist immer noch unbekannt. Die Zusammensetzung ist dabei abhängig vom pH und der Ligandenkonzentration in den jeweiligen Biofluiden.

Wie bereits beim quaternären Komplex im Speichel beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer dreifach höheren Konzentration an Phosphat- und Carbonat-Liganden gearbeitet als in der Speziationsstudie von Barkleit et al. [100]. Dies könnte die Unterschiede zwischen dem ternären Komplex aus der Literatur und dem aus dieser Arbeit erklären. Ersterer weist einen monoexponentiellen Zerfall der Lumineszenz auf, was auf die Ausbildung einer Spezies hindeutet. Der ternäre Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca) dieser Arbeit zeigt hingegen einen biexponentiellen Zerfall der Lumineszenz, sodass vermutlich mindestens zwei Spezies gebildet werden. Durch die höhere Konzentration an Carbonat und Phosphat könnten somit zwei ternäre Komplexe mit unterschiedlicher Stöchiometrie vorliegen (Eu:Carb:Phos = 1:1:1, 1:2:2). Diese Zusammensetzung des ternären Komplexes wird für sowohl für den Dünndarm als auch das gesamte Verdauungssystem postuliert.

4 Speziation von Eu(III) und Cm(III) im menschlichen Verdauungssystem

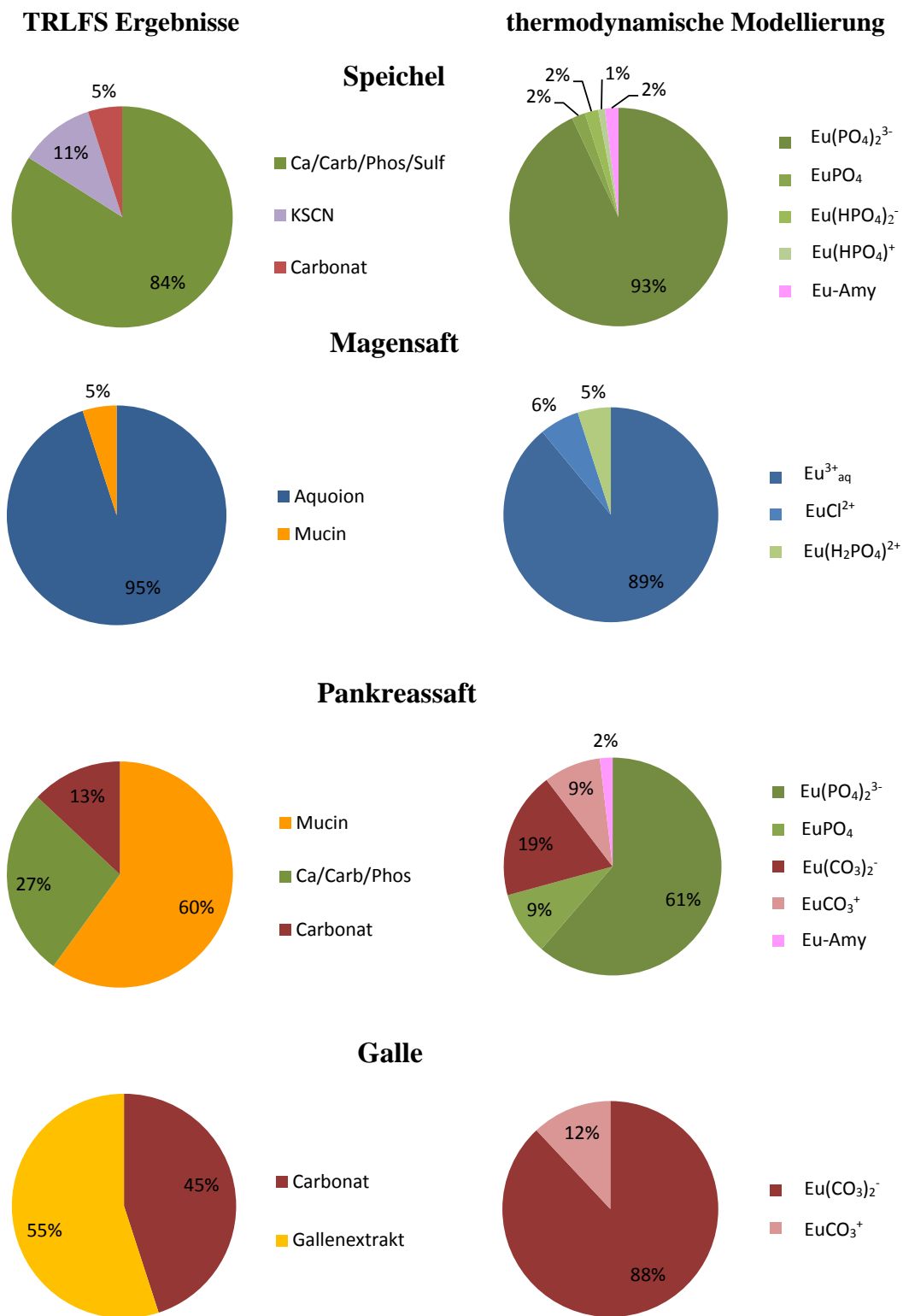
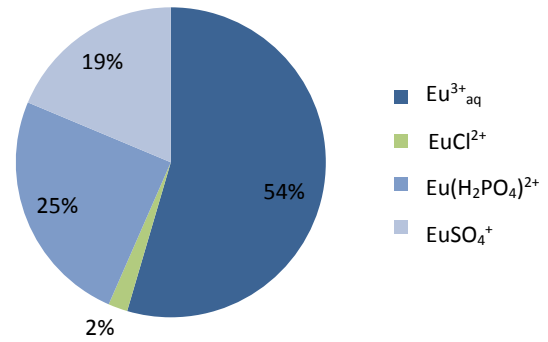
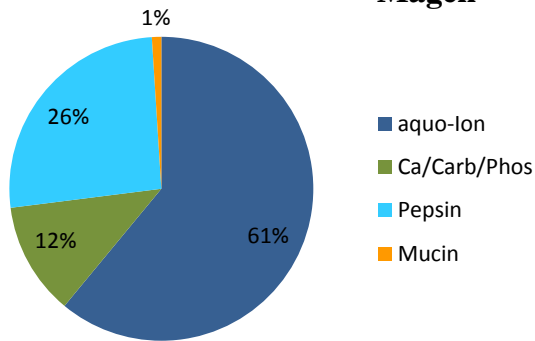


Abbildung 4.12: Vergleich der Speziesverteilung von Eu(III) in den Biofluiden basierend auf experimentellen Daten (links) und thermodynamischer Modellierung (rechts).

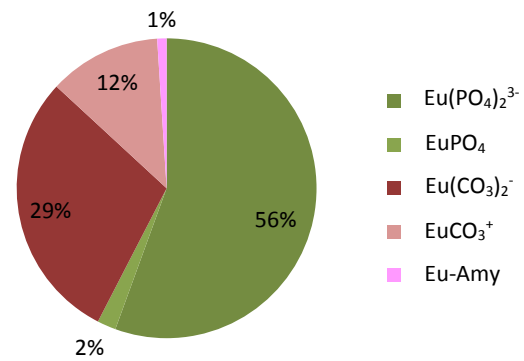
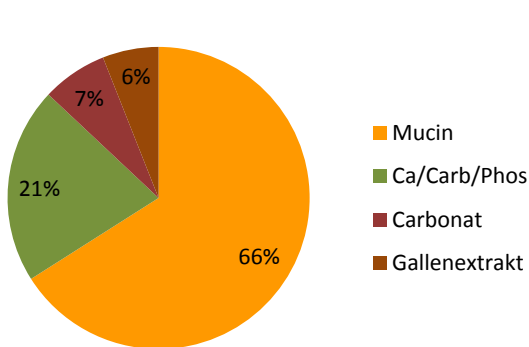
TRLFS Ergebnisse

Thermodynamische Modellierung

Magen



Dünndarm



gesamtes Verdauungssystem

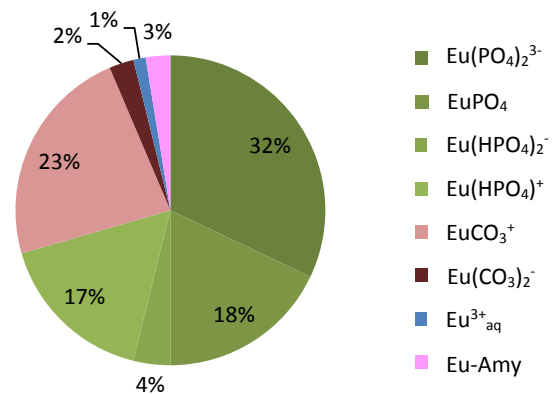
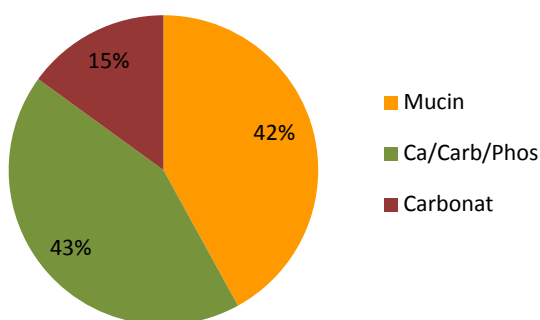


Abbildung 4.13: Vergleich der Speziesverteilung von Eu(III) im simulierten Verdauungssystem basierend auf experimentellen Daten (links) und thermodynamischer Modellierung (rechts).

4.5 Absorption dreiwertiger f-Elemente im Verdauungssystem

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit soll in diesem Kapitel ein mögliches *in vivo*-Verhalten der dreiwertigen f-Elemente im menschlichen Verdauungssystem, ihre Wechselwirkungen mit Verdauungsenzymen und Proteinen sowie potentielle Absorptionsmechanismen diskutiert werden.

Die Speziation dreiwertiger Ln und An wird im Speichel, dem ersten Kontaktmedium des Verdauungssystems, vorwiegend durch anorganische Carbonat/Phosphat-Spezies beeinflusst. Beim Übergang in den Magen verschiebt sich die Speziesverteilung zu einem großen Teil zum Aquoion. Ein signifikanter Anteil ist jedoch an das Hauptenzym des Magens gebunden, das Pepsin. Aufgrund seines niedrigen isoelektrischen Punktes (1,0) liegt Pepsin trotz des sauren pH-Wertes im Magen negativ geladen vor, sodass eine Komplexbildung auch mit anderen Metallen (Cu, Ni, Al) beobachtet werden konnte. Beschriebene Folgen der Bindung zwischen Pepsin und diesen Metallen sind zum Beispiel der Anstieg der Pepsin-Aktivität mit zunehmender Konzentration der Metallionen Al^{3+} , Cu^{2+} oder Ni^{2+} .^[104,105] *In vitro*-Digestionsstudien beschreiben auch die Bildung von Metall-Protein-Komplexen zwischen gelösten Bodenschwermetallen (z.B. Mn, Pb und Zn) und Verdauungsenzymen. Folge dessen ist eine erhöhte Mobilisierung der Schwermetalle aus dem Erdboden in die Biofluide des Verdauungssystems. Diese Beobachtungen könnten auch bei fester Nahrung zutreffend sein. Die Komplexbildung enzymatischer Liganden wie Pepsin scheint somit ein wichtiger Vorgang für die Aufnahme von Metallionen in das Verdauungssystem zu sein. Mögliche Prozessklärungen dieses Mechanismus sind jedoch nicht bekannt.^[106,107]

Beim Übergang in den Dünndarm wird das Aquoion aus dem Magen schließlich in die organische Mucin-Spezies transformiert. Die Pepsin-gebundenen Metallionen werden ebenso in andere Spezies überführt, da Pepsin aufgrund des intestinalen pH-Werts einer hydrolytischen Spaltung unterliegt.^[46] Im Dünndarm findet ein Großteil der Verdauung sowie die Resorption von Nährstoffen statt. Auch die Absorption von Transuranelementen (^{237}Np , ^{239}Pu , ^{241}Am , ^{244}Cm und ^{249}Bk) erfolgt hauptsächlich im Dünndarm.^[22,35] Infolgedessen wäre die Bindung der dreiwertigen f-Elemente an das Protein Mucin ein wichtiger Prozess, der möglicherweise die Akkumulation und Inkorporation radioaktiver Elemente im menschlichen Körper beeinflusst.

Mucine sind große Glykoproteine mit einem hohen Molekulargewicht, die einen wichtigen Bestandteil der menschlichen Mukosa darstellen. Bei der Mukosa handelt es sich um ein viskoelastisches Gel, welches eine Barriere gegenüber Bakterien, Viren oder chemischen Substanzen einschließlich Schwermetallen bildet und eine Absorption verhindert. Verantwortlich für die viskoelastischen Eigenschaften der Mukosa sind die Glykoproteine.^[47,108] Die Komplexbildung zwischen dreiwertigen f-Elementen und Mucinen könnte bei einer Inkorporation der radiotoxischen Elemente die Absorption vom Dünndarm in den Blutkreislauf unterdrücken sowie möglicherweise eine effiziente Exkretion unterstützen. Für eine detaillierte Bestimmung der *in vivo*-Funktionen von Mucinen gegenüber Lanthaniden und Actiniden sind weitere Untersuchungen notwendig.

Eine bereits bekannte chemische Speziation kann zu der Entwicklung von Dekontaminationstherapien beitragen. Diese sind nach einer internen Exposition von Radionukliden

notwendig, um mögliche Gesundheitsrisiken zu senken. Nach einer Actinid-Kontamination wird hierfür üblicherweise DTPA als Chelat-Ligand genutzt, um die Ausscheidung durch die Bildung extrahierbarer An-Komplexe zu erleichtern. Die orale Aktivität von DTPA ist jedoch als gering einzuordnen. Zudem sind die mäßigen Wechselwirkungen des Liganden mit dreiwertigen An nach einer oralen Aufnahme für eine effektive Dekontamination nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten neue Chelat-Liganden für die Dekontamination von Actiniden entwickelt wie zum Beispiel cyclische Hydroxypyridonate (HOPO), die auf natürlich vorkommenden Siderophoren basieren.^[109]

Siderophore sind hoch selektive, mikrobielle Eisentransporter mit Catechol-Gruppen als Bindungsmotiv. Vielversprechende Vertreter dieser Gruppe sind 3,4,3-LI(1,2-HOPO) und 5-LIO(Me-3,2-HOPO).^[23] Im Gegensatz zu DTPA weisen diese Liganden eine orale Aktivität auf und werden als effektive Bindungspartner für drei- und vierwertige Actinide beschrieben.^[23,109]

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Mucin eine wichtige Rolle in der gastrointestinalen Speziation von dreiwertigen f-Elementen einnimmt. Die Siderophor-basierten HOPO-Liganden könnten zusätzlich zum Mucin lösliche Komplexe mit toxischen Schwermetallen bilden und somit eine effiziente Exkretion dieser unterstützen. Dies hebt zudem die Bedeutung von weiteren Studien zur kompetitiven Komplexbildung zwischen Bio-Makromolekülen/Proteinen und Dekontaminationsagenten mit toxischen Schwermetallen unter physiologischen Bedingungen hervor.

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

5.1 Was sind Mucine?

5.1.1 Allgemeines und Funktionen

Im Atem- und Verdauungssystem sowie im urogenitalen Trakt sind die Oberflächen der Epithelzellen von einer dicken Mukusschicht überzogen, wie in Abbildung 5.1 beispielhaft anhand eines Querschnittes der Gastric Mucosa (Magenschleimhaut) dargestellt. Es handelt sich dabei um ein 200–400 μm dickes, viskoelastisches Gel, welches eine Barriere gegenüber Pathogenen und Toxinen darstellt und ebenfalls die Epithelien vor Infektionen, Dehydrierung sowie physischen/chemischen Verletzungen schützt. Im Magen stellt die Mukusschicht zudem einen Schutz gegenüber den extrem sauren Bedingungen im Lumen ($\text{pH} \leq 2$) dar. Aufgrund der effizienten Lubrikation wird die Passage von Materialien im Gastrointestinaltrakt unterstützt und eine enzymatisch bedingte Selbstverdauung verhindert (siehe Kapitel 2.2.2).^[98,108,110–113]

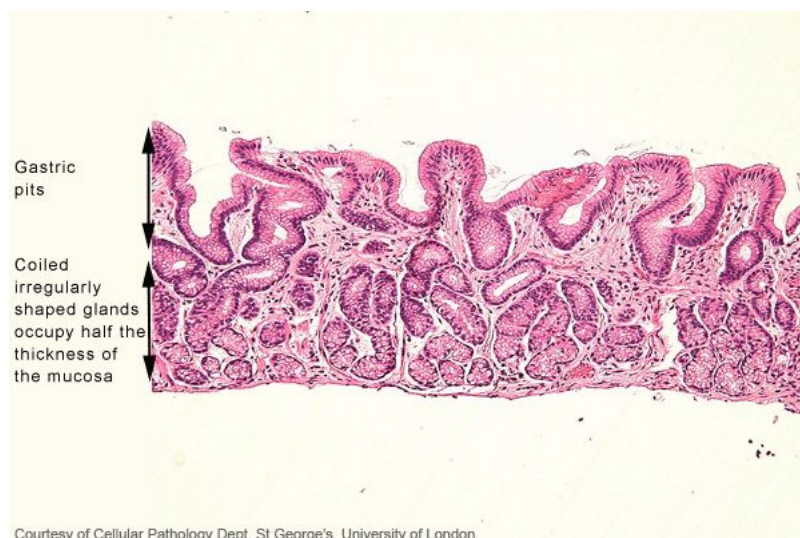


Abbildung 5.1: Querschnitt durch eine Magenschleimhaut.^[114]

Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, besteht die Mukusschicht zu 90–95 % aus Wasser, die restlichen Bestandteile setzen sich aus einer Mischung von Glykoproteinen (Mucine), Elek-

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

trolyten und diversen Bestandteilen zusammen (Epithelzellen, Proteine, Bakterien, DNA, Lipide). Die exakte Zusammensetzung ist jedoch abhängig vom Sekretionsort, der physiologischen oder mechanischen Rolle und der Präsenz von Krankheitsbedingungen. Obwohl die Glykoproteine mit nur einem geringen prozentualen Anteil (5–10 %) an der epithelialen Mukus beteiligt sind, sind sie für einen Großteil der Geleigenschaften verantwortlich.^[112,115]

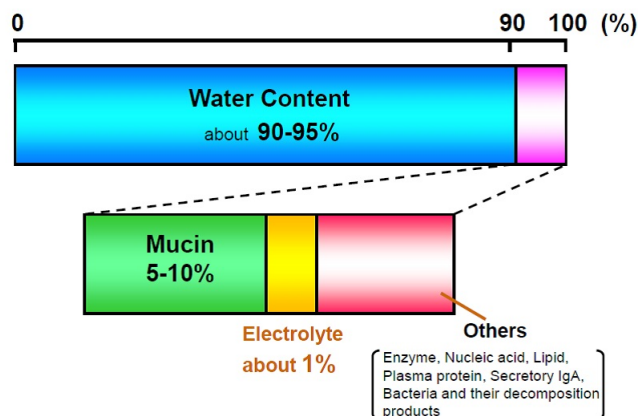


Abbildung 5.2: Zusammensetzung der Mukus.^[116]

5.1.2 Struktur

Mucine sind große, extrazelluläre Glykoproteine, die typischerweise ein sehr hohes Molekulargewicht zwischen 0,5 und 20MDa aufweisen. Sie können somit stark in der Größe variieren und besitzen zwischen 322 bis 13288 Aminosäurereste, je nach Organismus werden zudem strukturell unterschiedliche Mucine synthetisiert. Zurzeit sind etwa 20 MUC-Gene identifiziert, davon sind allerdings nur wenige vollständig sequenziert. Dabei kann die Mucin-Familie in zwei Gruppen aufgeteilt werden, in membrangebundene und sezernierte. Von den bekannten menschlichen Mucinen sind zwei membrangebunden (MUC1, MUC4) und vier werden als Sekret ausgeschieden (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC7). Die restlichen Mucine (MUC3, MUC6, MUC8) konnten noch nicht klassifiziert werden.^[99,110,111,117]

In Abbildung 5.3 ist unter Anderem der strukturelle Unterschied zwischen membrangebundenen und sezernierten Mucinen grafisch dargestellt, die verschiedenen Domänen von Mucinen werden im Weiteren erklärt.

Im Allgemeinen enthalten die Glykoproteine eine Polypeptidkette, welche einen hohen Anteil an Prolin, Threonin und Serin (PTS-Domäne) aufweist. Die PTS-Regionen sind dabei kurze, aneinandergereihte, sich wiederholende Sequenzen, wodurch sie auch als *Tandem Repeats* (TR) bezeichnet werden. Diese TR-Domänen sind charakteristisch für jedes MUC-Protein, sodass Mucine anhand ihres Proteinrückgrates, welches durch das MUC-Gen codiert wird, klassifiziert werden. Die Sequenzen können dabei sowohl in der Länge (5 bis 375 Aminosäurereste) als auch in ihrer Zahl (5 bis 395 Wiederholungen) variieren.^[108,110,118]

Die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin dienen in den MUC-Proteinen als Akzeptoren für O-Glykane, die über eine O-glykosidische Bindung verzweigte Oligosaccharid-Ketten ausbilden und eine sogenannte „bottle-brush“-Konfiguration aufweisen. Die

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

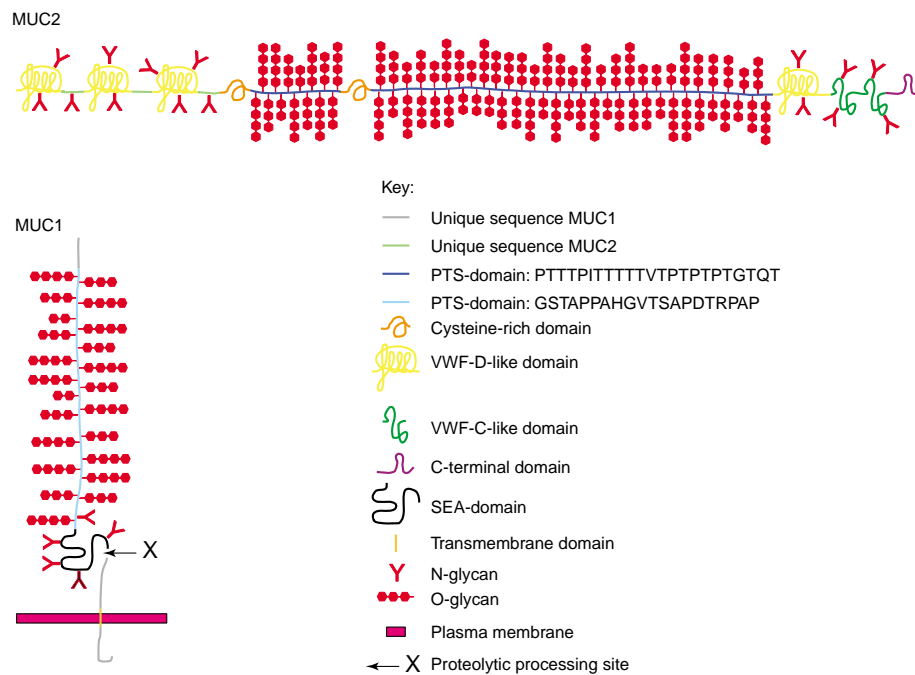


Abbildung 5.3: Allgemeine Struktur der Mucine mit MUC1 als membrangebundenes und MUC2 als sezerniertes Mucin.^[118]

Carbohydrat-Ketten können 50–90 % des Molekulargewichts einnehmen, sodass eine dichte, hydrophile Schicht entsteht, die die biophysikalischen Eigenschaften der Mucine bestimmt. Die hoch glykosylierten Domänen weisen keine Sekundärstruktur auf, sondern lange, ausgehende und filamentöse Strukturen aufgrund der sterischen Abstoßung zwischen den Carbohydraten und dem Peptidrückgrat.^[96,99,110–112,118]

Die Oligosaccharid-Seitenketten enthalten je nach Mucinquelle zwischen zwei bis 20 Monosaccharide pro Kette und bestehen meist aus den Zuckern N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, Galaktose, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Weitere Bestandteile können Mannose und sulfatisierte Zucker sein. Dabei sind die Saccharide in unterschiedlichen Kernstrukturen angeordnet (siehe Abb. 5.4). Die glykosidische Bindung wird zwischen den Sauerstoffatomen der Hydroxyl-Gruppen in den Aminosäureresten von Serin oder Threonin und über die α -1-Position von N-Acetylgalactosamin ausgebildet. Als terminale Zucker sind häufig Fucose, Sialinsäure oder Sulfate zu beobachten. Aufgrund von Sialinsäure-Resten ($pK_S = 2,6$) und Sulfat-Gruppen tragen Mucine oberhalb pH 2 eine negative Gesamtladung. Bei Anwesenheit der Aminosäure Asparagin können sich zudem über das Stickstoffatom der Amidgruppe N-Glykane bilden.^[99,108,111,112,117–119]

Während die Carbohydratketten als hydrophile Bereiche fungieren, agiert das unglykosylierte Polypeptidrückgrat als Bindungsseite für hydrophobe Wechselwirkungen. Die Aminosäure-Regionen ähneln dabei globulären Proteinen mit N- und C-terminalen Enden, einer geringen Glykosylierung und einem hohen Anteil an Cystein. Zudem weisen die aminoterminalen Regionen zusätzlich eine Sequenzähnlichkeit zu den C- und D-Domänen des von-Willebrand-Faktors (vWF) auf. Bei dem von-Willebrand-Faktor handelt es sich eben-

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

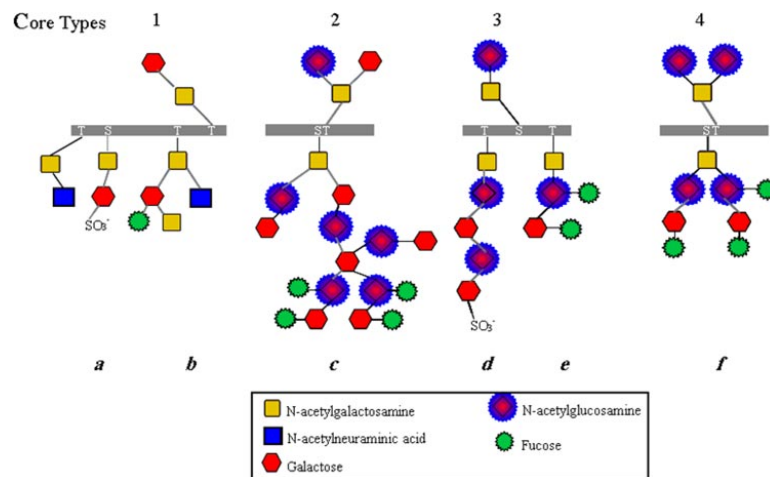


Abbildung 5.4: Kernstrukturen der Oligosaccharid-Seitenketten.^[108]

falls um ein multimeres Glykoprotein, welches jedoch im Blutplasma und in Blutplättchen vorkommt. Jedes Monomer des Proteins ist aus identischen, sich wiederholenden Domänen zusammengesetzt, die als A, B, C, D und E bezeichnet werden.

Das C-terminale Ende des Mucins wird durch cysteinreiche und CK (*cystine knot* = strukturelles Proteinmotiv mit Disulfidbrücken aus Cystein-Molekülen)-Domänen charakterisiert. Die CK-Domänen liefern dabei Cysteingruppen zur Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Polypeptidketten, was zur Ausbildung von Dimeren und zur Polymerisation führt. Eine anschließende Gelierung von Mucinen wird vermutlich durch ein komplexes Zusammenspiel elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen verursacht, indem eine nicht-kovalente Quervernetzung über hydrophobe Bereiche (nicht-glykosylierte Domänen) stattfindet. Aufgrund des Wechsels von langen, glykosylierten, hydrophilen Domänen und kurzen, nicht-glykosylierten, hydrophoben Bereichen wird eine alternierende Bindungsaffinität zu Wasser ausgebildet. Dies resultiert in einer Stabilisierung der nicht-kovalenten Bindungen. Eine schematische Darstellung der einzelnen Domänen sowie der Polymerisation und der Gelierung ist in Abbildung 5.5 veranschaulicht.^[97,99,110,111,117,120,121]

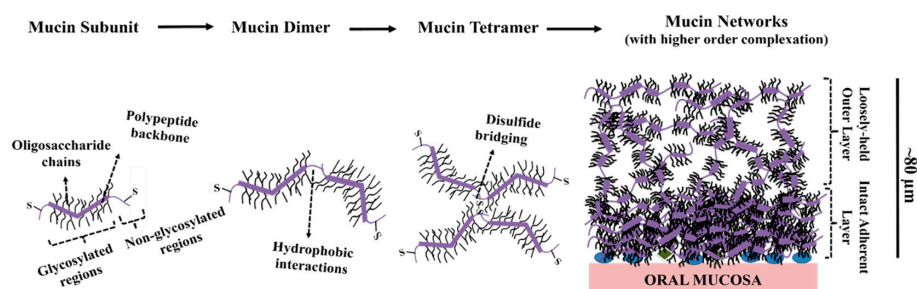


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der einzelnen Domänen und der Polymerisation von Mucin-Monomeren.^[120]

5.2 Lumineszenzspektroskopische Eigenschaften von Eu(III) und Cm(III) mit Mucin

Um die Komplexbildung zwischen Eu(III)/Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin genauer charakterisieren zu können, wurden zunächst Bindungsstudien mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt und diskutiert.

Dazu genauer zu untersuchen wurden Konzentrationsreihen des Proteins mit Eu(III) bzw. Cm(III) aufgenommen. Die zugehörigen Lumineszenzspektren sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Die Proteinkonzentration wurde unter konstanten Bedingungen (pH und Metallkonzentration) zwischen 0,01 und 2 mg/mL variiert. In den Lumineszenzspektren von Eu(III) ist mit zunehmender Proteinkonzentration ein deutlicher Intensitätsanstieg der F_2 -Bande zu erkennen. Besonders im niedrigen Konzentrationsbereich bis 0,3 mg/mL steigt das F_2/F_1 -Verhältnis stark an (siehe linke Abb. 5.7). Danach ist ein mäßiger Anstieg zu beobachten bis sich bei einer Mucin-Konzentration von 1,5 mg/mL ein konstantes F_2/F_1 -Verhältnis einstellt.

Die Lumineszenzspektren von Cm(III) zeigen die für eine Komplexbildung typische Rotverschiebung. Während das Spektrum des Aquoions bei pH 4,5 ein Intensitätsmaximum bei einer Wellenlänge von 593,5 nm aufweist, liegt das Maximum des Cm-Mucin-Komplexes bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/mL bei 602,8 nm. Ähnlich wie bei den Eu-Spektren ist die Komplexbildung anhand der Rotverschiebung bereits bei niedrigen Proteinkonzentrationen sichtbar.

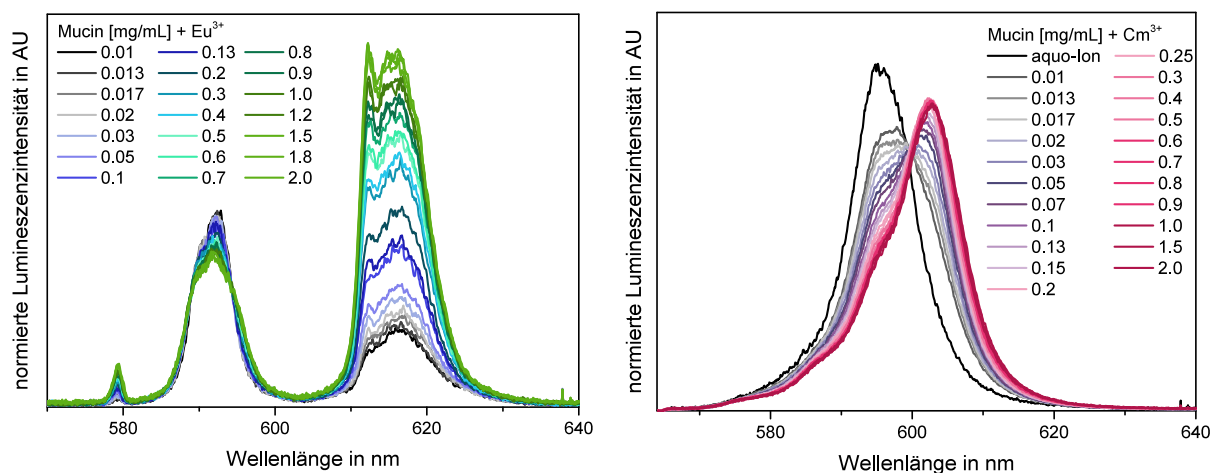


Abbildung 5.6: Konzentrationsreihen von Mucin mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) (links) und $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) (rechts) bei pH 4,5 und RT.

In Abbildung 5.8 sind die Lumineszenzlebensdauern der Mucin-Konzentrationsreihe mit Cm(III) grafisch dargestellt. Bereits ab einer Proteinkonzentration von 0,01 mg/mL kann ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz und somit die Bildung von mindestens zwei Spezies vermutet werden. Beide Lebensdauern schwanken geringfügig in einem Bereich von 20 μ s ($\tau_1 = 80\text{--}103$ μ s, $\tau_2 = 260\text{--}284$ μ s), wobei sie ihren höchsten Wert bei einer Mucinkonzentration von 0,3 mg/mL erreichen. Danach sinken beide Lebensdauern geringfügig. Für

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

die Lebensdauern τ_1 bzw. τ_2 wurden je 5,4–7,2 bzw. 1,4–1,6 Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre von Cm(III) berechnet. Die grafische Darstellung der Lebensdauern für Eu(III) ist dem Anhang zu entnehmen (siehe linke Abb. A4). Im Allgemeinen kann hier derselbe Verlauf wie für die Lebensdauern des Cm(III) aufgezeigt werden. Die höchsten Werte von τ_1 und τ_2 sind im niedrigen Konzentrationsbereich vorzufinden ($\tau_1 = 121\text{--}153\ \mu\text{s}$, $\tau_2 = 325\text{--}585\ \mu\text{s}$). Jedoch schwanken die Werte stärker als bei Cm(III), da sie einen größeren Fehlerbereich aufweisen.

Da für das kommerziell erhältliche Mucin keine molare Masse bekannt ist, konnten die gewünschten Stabilitätskonstanten nicht aus den gemessenen Konzentrationsreihen berechnet werden. Die Verwendung von Literaturwerten blieb ebenfalls ergebnislos. Ursache hierfür ist vermutlich das große Molekulargewicht und die unzähligen Bindungsstellen des Proteins, sodass eine Berechnung der Stabilitätskonstanten durch einfache thermodynamische Modelle nicht möglich ist.

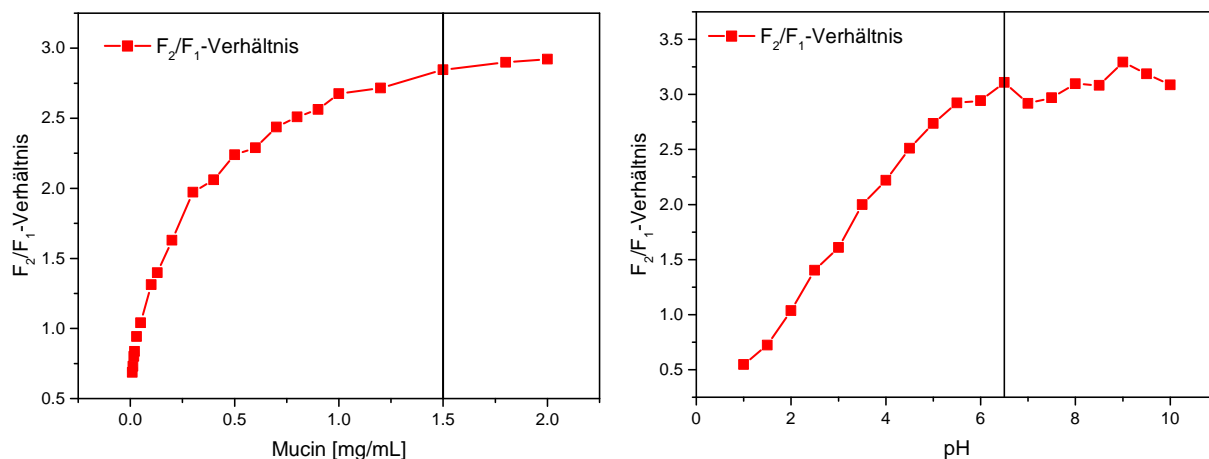


Abbildung 5.7: F_2/F_1 -Verhältnisse der Konzentrations- (links) und pH-Reihe (rechts) von Mucin mit Eu(III).

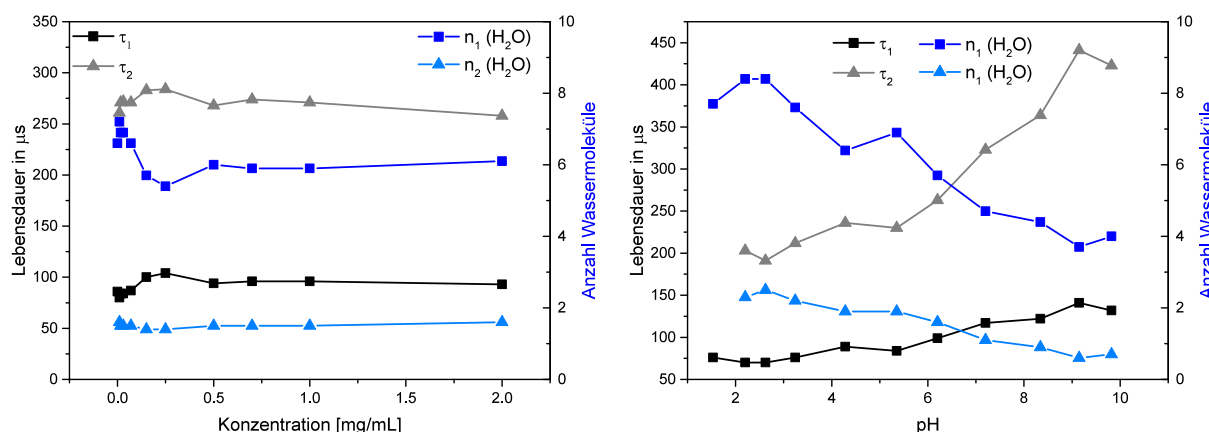


Abbildung 5.8: Lumineszenzlebensdauern von $3 \cdot 10^{-7}\ \text{M}$ Cm(III) mit Mucin der Konzentrations- (links) und pH-Reihe (rechts).

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

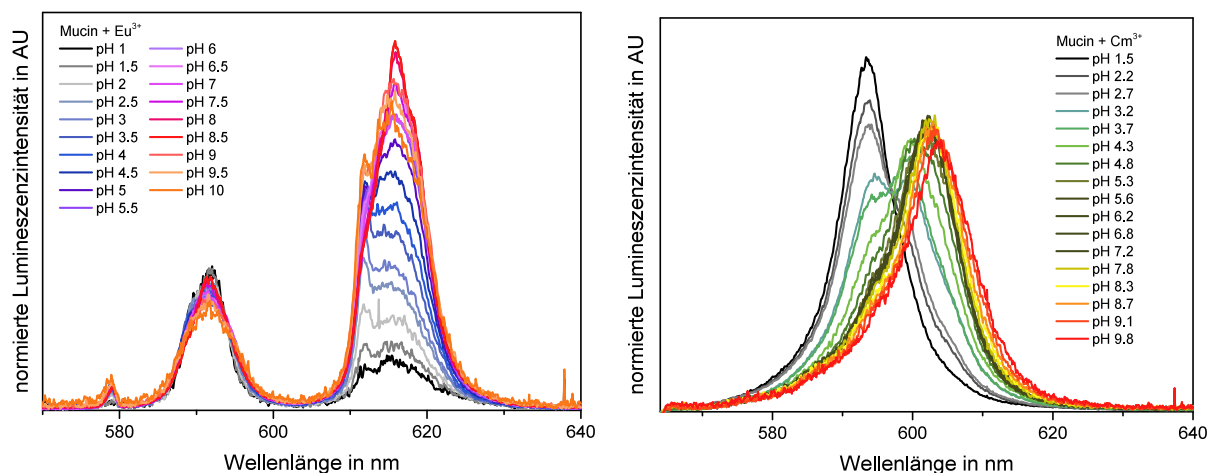


Abbildung 5.9: pH-Reihe von 1 mg/mL Mucin mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) (links) und $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) (rechts) bei RT.

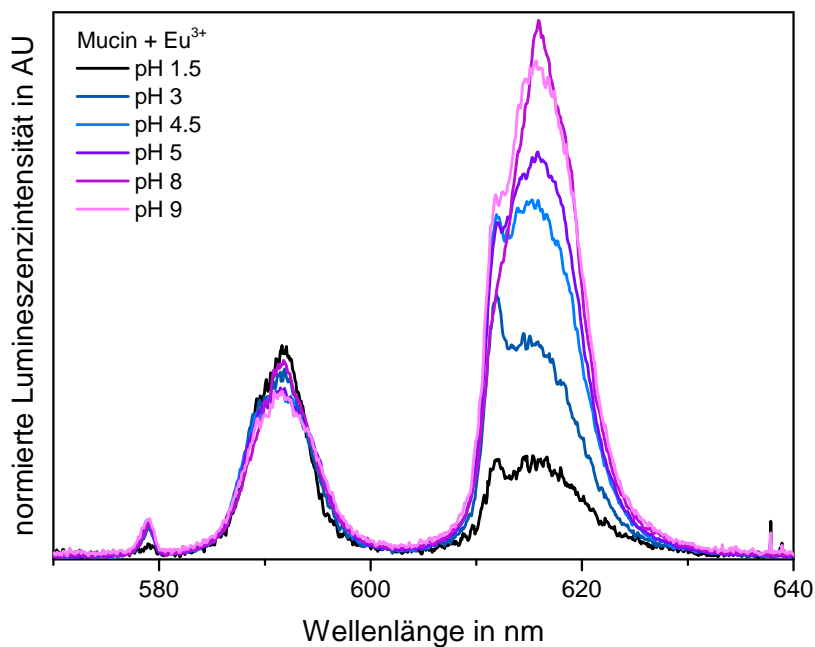


Abbildung 5.10: Ausgewählte pH-Werte von 1 mg/mL Mucin mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) bei RT.

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

Da Speziationen stets eine starke pH-Abhängigkeit aufweisen, wurden für das Protein mit Eu(III) und Cm(III) Messreihen mit variierenden pH-Werten aufgenommen (siehe Abb. 5.9). Die pH-Reihe von Mucin mit Eu(III) zeigt im sehr sauren pH-Bereich bis pH=1 keine Komplexbildung auf. Das zugehörige Spektrum entspricht dem des Aquoions. Ab pH 1,5 ist jedoch bereits eine Zunahme der Intensität der F₂-Bande zu erkennen, die mit steigenden pH immer deutlicher wird. Dies ist auch anhand der F₂/F₁-Verhältnisse zu erkennen (siehe rechte Abb. 5.7), welche bis etwa pH 6 stetig ansteigen. Bei höheren pH-Werten muss zusätzlich der Einfluss von Hydroxid- und Carbonat-Ionen auf die Speziation beachtet werden. Durch die Ausbildung von zum Beispiel Eu-Hydroxid-Komplexen, die eine niedrigere Lumineszenz aufweisen, kommt es ab pH 9 zu einer sichtbaren Erniedrigung der Intensität der F₂-Bande. Auch die Form der Eu-Lumineszenzspektren ändert sich in Abhängigkeit des pH-Wertes. Zwischen pH 1,5 und 4,5 ist eine Aufspaltung der hypersensitiven Bande zu beobachten, die ab pH 5 verschwindet und anschließend im basischen Bereich ab pH 9 sich wieder entwickelt (siehe Abb. 5.10).

Die grafische Darstellung der Eu-Lebensdauern ist erneut dem Anhang zu entnehmen (siehe rechte Abb. A4). Ab pH 2,1 werden aufgrund des biexponentiellen Lumineszenzabfalls mindestens zwei Spezies mit 8,7 bzw. 2,4 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre von Eu(III) ausgebildet ($\tau_1 = 115 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 357 \mu\text{s}$). Beide Lumineszenzlebensdauern entwickeln sich mit steigenden pH und erreichen ihren höchsten Wert im Basischen ($\tau_1 = 399 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 826 \mu\text{s}$) während die Anzahl der Wassermoleküle auf 2,1 bzw. 0,7 sinkt. Die unterschiedlichen Lebensdauern deuten auf eine pH-abhängige Veränderung der Speziation von Eu(III) hin, da es sich bei den berechneten Lebensdauern um eine Mischung verschiedener Spezies handelt.

Wie bereits die Konzentrationsreihen zeigen die pH-abhängigen Lumineszenzspektren von Cm(III) ebenso eine Rotverschiebung, die jedoch stärker ausgeprägt ist. Bei pH 1,5 liegt das Intensitätsmaximum des Spektrums bei 593,5 nm, dies entspricht dem Cm-Aquoion. Mit zunehmenden pH verschiebt sich das Maximum des Cm-Komplexes im Basischen allmählich zu 604,0 nm. Wie bei den Eu-Spektren ist auch hier aufgrund der Bildung von Hydroxid-Komplexen ab pH 9 eine Erniedrigung der Lumineszenzintensität zu beobachten. Auffällig ist zudem die Peakaufspaltung, welche im Laufe des Kapitels noch näher erläutert wird.

Die berechneten Lumineszenzlebensdauern zeigen dieselbe Entwicklung wie bei Eu(III) und bestätigen den Trend, der für die Cm-Spektren beschrieben wurde (siehe rechte Abb. 5.8). Mit steigenden pH-Wert kann eine zunehmende Komplexbildung zwischen Cm(III) und dem Mucin auch aufgrund der stetig größer werdenden Lebensdauern festgestellt werden. Ab pH 2 kann zudem ein biexponentieller Verlauf an den Lumineszenzabfall angepasst werden, was auf die Bildung von mindestens zwei Spezies rückschließen lässt. Die Lumineszenzlebensdauer τ_1 erhöht sich dabei von 70 μs bei pH 2,2 auf 141 μs bei pH 8,5. Dies entspricht 8,4 bzw. 3,7 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre von Cm(III). Die Lebensdauer τ_2 steigt von 191 μs bei pH 2,2 stark an auf 441 μs bei pH 9. Dabei sinkt die Anzahl der berechneten Wassermoleküle von 2,3 auf 0,6. Erneut handelt es sich bei den berechneten Lebensdauern um eine Mischung verschiedener Spezies, sodass die variierenden Lumineszenzlebensdauern auf eine pH-abhängige Veränderung der Speziation von Cm(III) hinweisen.

Wie bereits erwähnt, kann bei den Cm-Spektren im pH-Bereich 2–4 eine starke Peakauf-

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

spaltung beobachtet werden, sodass für die einzelnen Spektren der pH-Reihe eine Peakentfaltung durchgeführt wurde. Eine Übersicht der Aufspaltung und ausgewählte Spektren der zugehörigen Entfaltung sind in Abbildung 5.11 zusammengefasst.

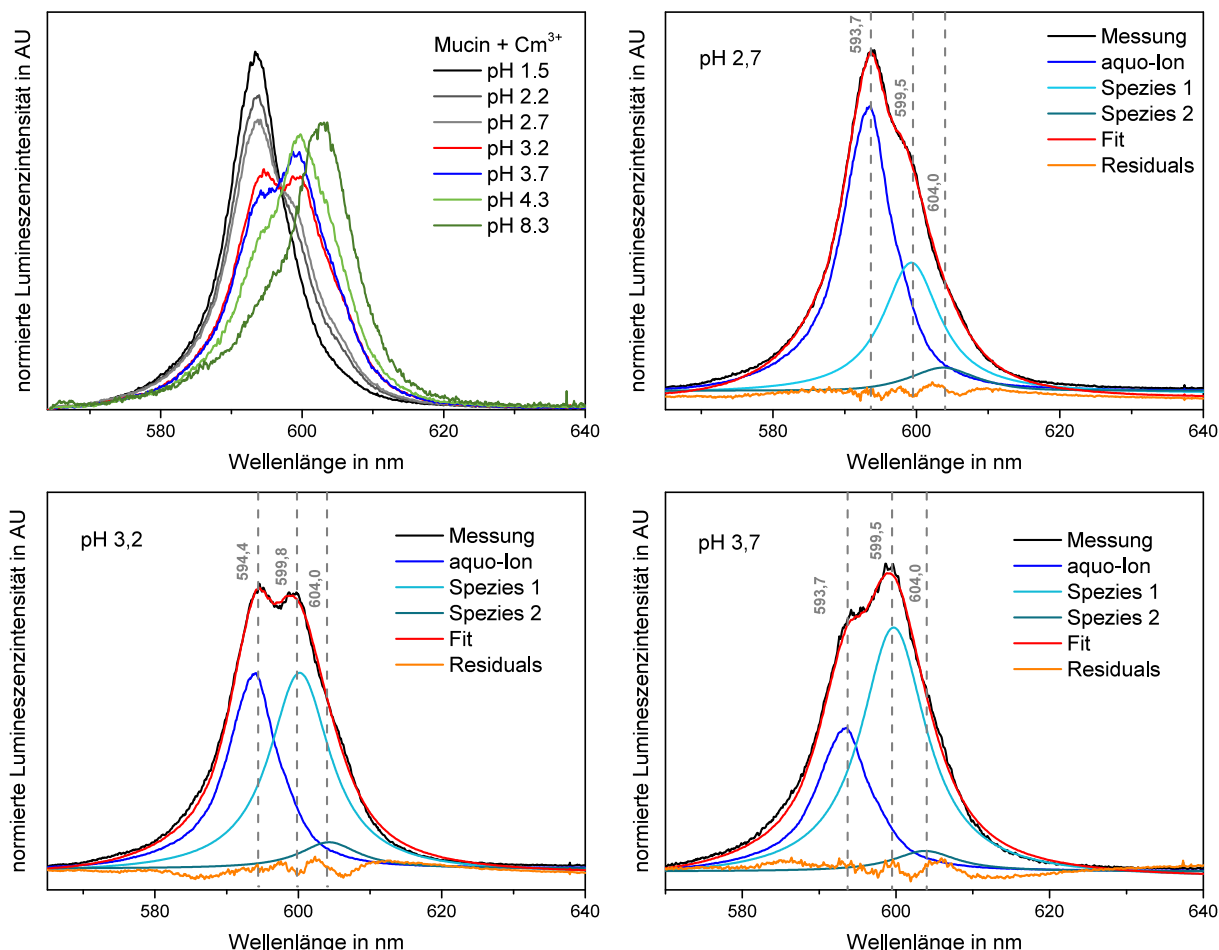


Abbildung 5.11: Peakentfaltung der Lumineszenzspektren von $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) mit Mucin.

Während bei pH 1,5 noch das typische Spektrum des Cm-Aquoions vorliegt, ist bei pH 2,2 bereits die Rotverschiebung und die Herausbildung einer schwachen Schulter im Peak zu erkennen. Diese Entwicklung setzt sich mit steigendem pH verstärkt fort. Bei pH 2,7 können neben dem Peakmaximum bei 593,7 nm noch zwei weitere Schultern bei 599,5 und 604,0 nm identifiziert werden. Als Ergebnis der Peakentfaltung können somit drei Cm-Spezies festgehalten werden, die aus dem reinen Cm-Aquoion und zwei Mucin-Spezies bestehen. Ein Großteil der Speziation wird bei pH 2,7 noch vom Aquoion bestimmt, doch mit steigenden pH verschieben sich die Anteile der Speziation immer mehr zu den Mucin-Spezies hin. Bereits bei pH 3,2 liegen das Cm-Aquoion und die Mucin-Spezies 1 nahezu im Verhältnis 1:1 vor. Es sind daher zwei Peakmaxima bei 594,4 und 599,8 nm zu beobachten. Ein weiterer leichter pH-Anstieg auf pH 3,7 führt zu einer deutlichen Verschiebung der Speziesverteilung zu der Mucin-Spezies 1.

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

Die Mucin-Spezies 2 herrscht vor allem im neutralen bis basischen Bereich vor. Dies ist auch in der grafisch erstellten Fraktionsverteilung der Spezies zu erkennen, die in Abbildung 5.12 dargestellt ist. Hier ist deutlich die fraktionelle Absenkung des Aquoions in Abhängigkeit des pH-Wertes zu erkennen. Im sauren pH-Bereich (1–2,5) wird die Cm-Speziation nahezu vollständig vom Aquoion bestimmt. Bezogen auf das Verdauungssystem entspricht dies den Bedingungen im Magen.

Die Mucin-Spezies 2 liegt zusammen mit dem Aquoion im pH-Bereich 3–5 zu 30–40 % vor. Ab pH 6 liegt nicht mehr das Aquoion sondern der Hydroxo-Komplex des Cm(III) vor, dessen Spektrum einer Rotverschiebung unterliegt und ein Peakmaximum bei 603,2 nm aufweist (siehe linke Abb. 6.7). Bei der linken Schulter, die im Spektrum des Hydroxo-Komplexes ausgeprägt ist, handelt es sich um eine nicht aufgelöste heiße Bande. Diese asymmetrische Verbreiterung der Bande im energetisch höheren Bereich wird durch die minimale Besetzung höherer Ligandenfeldniveaus des ${}^6D_{7/2}$ -Zustands hervorgerufen.^[69]

Aufgrund der Nähe zum Peakmaximum der Mucin-Spezies 2 können die Komplexe in der Peakentfaltung nicht voneinander unterschieden werden, sodass der starke Anstieg der Mucin-Spezies 2 ab pH 6 auf die Bildung von Hydroxo-Komplexen oder auch Mischkomplexen zurückzuführen ist. Im Mund (pH 6–7) und im Dünndarm (pH 7–8) wird die Speziation somit vorrangig von der Mucin-Spezies 2 und Hydroxo-Komplexen bestimmt, die zwischen pH 6 und 8 einen prozentualen Anteil von 70 % einnehmen.

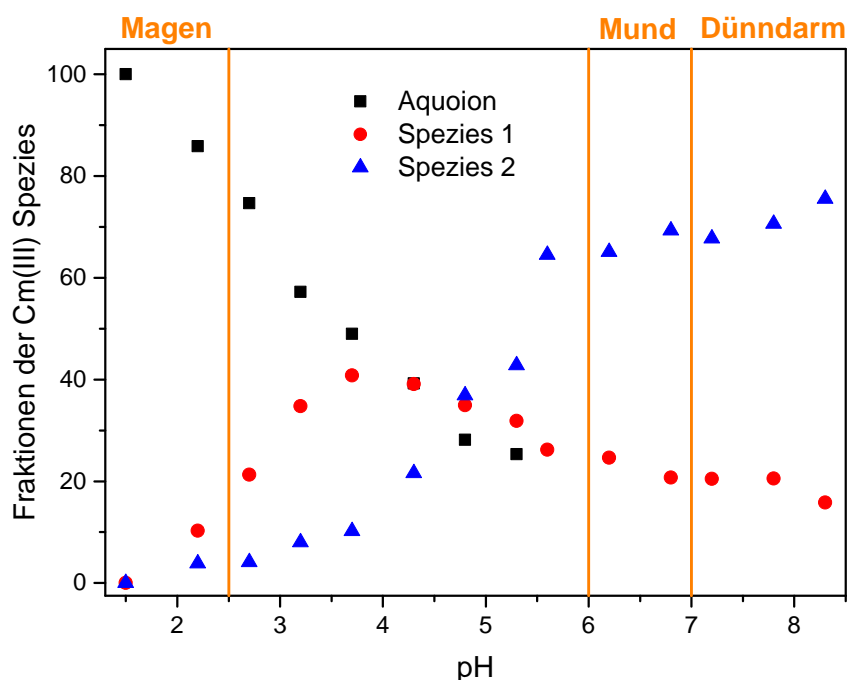


Abbildung 5.12: pH-abhängige Fraktionsverteilung der Cm(III)-Spezies innerhalb des Verdauungssystems.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Speziation der dreiwertigen f-Elemente Eu(III) und Cm(III) sowohl durch die Konzentration des Mucins als auch durch den umgebenden pH-Wert stark beeinflusst wird. Zudem kommt es zur Ausbildung von min-

destens zwei Spezies. Es wurde gezeigt, dass sich bei höheren Proteinkonzentrationen ein konstantes Bindungsverhältnis zwischen den Metallionen und dem Mucin einstellt. Da im Verdauungssystem von einem Überschuss an Mucin ausgegangen werden kann, ist anzunehmen, dass der Faktor der Proteinkonzentration keine tragende Rolle in der Speziation einnimmt. Dafür weist die Speziation der dreiwertigen f-Elemente eine starke pH-Abhängigkeit auf. Ab pH 2 zeigen die Spektren einen biexponentiellen Zerfall und somit zwei unterschiedliche Lebensdauern, was auf die Ausbildung von mindestens zwei Spezies hindeutet. Auch mit Hilfe der Peakentfaltung konnten zwei Mucin-Spezies bestimmt werden. Zwischen pH 3–5 wird die Speziation vor allem durch die Mucin-Spezies 1 und dem Aquoion nahezu zu gleichen Teilen bestimmt. Allerdings spielt dieser pH-Bereich im Verdauungssystem keine große Rolle. Die Cm(III)-Mucin-Spezies 2 dominiert die Speziation im pH-Bereich des Dünndarms (6–8). Unter Einbezug der berechneten Lebensdauern ist die längere Lebensdauer (τ_2) der Mucin-Spezies 2 zuzuordnen, da diese Spezies stärker gebunden ist und somit weniger Wassermoleküle aufweist. Da im Dünndarm ein Großteil der Verdauung und Resorption von Nährstoffen stattfindet,^[35] hat die Mucin-Spezies 2 nicht nur einen Einfluss auf die Cm-Speziation im Verdauungssystem, sondern könnte auch bei der Absorption dreiwertiger f-Elemente in den Blutstrom von Bedeutung sein.

5.3 Lumineszenzspektroskopische Untersuchungen der Carbohydrate des Mucins

Um die genauen Bindungspartner innerhalb des Glykoproteins mit Eu(III) bzw. Cm(III) identifizieren zu können, wurden dessen Bestandteile spektroskopisch untersucht. Wie bereits im Kapitel 5.1.2 beschrieben, bestehen Mucine zu einem Großteil aus Carbohydraten. Die am häufigsten vorkommenden Zucker in den Carbohydrat-Ketten des Proteins sind dabei N-Acetylglucosamin (GlcNac), N-Acetylgalactosamin (GalNac), Galaktose, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure, NANA).^[99] Die Strukturformeln der Zucker sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Sie wurden für weitere Bindungsstudien mit Eu(III) ausgewählt und mit Hilfe der TRLFS analysiert.

Wie auch beim Protein wurden pH-abhängige Messreihen durchgeführt, die von den Zuckern N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, Galaktose und L-Fucose in Abbildung 5.14 zusammengefasst sind. Diese vier Zucker weisen ein ähnliches Bindungsverhalten auf. Von pH 1 bis 4,5 entsprechen die Lumineszenzspektren der Monosaccharide dem des Aquoions. Im leicht sauren Bereich (pH 5–6,5) kann eine leichte Intensitätssteigerung der F_2 -Bande beobachtet werden, dies deutet auf eine mit Eu(III) sehr schwach ausgeprägte Komplexierung hin. Ab pH 7 ist ein sprunghafter Intensitätsanstieg der F_2 -Bande sichtbar sowie das Auftreten einer intensitätsstarken F_0 -Bande. Da zuvor mit Eu(III) nur ein schwacher Komplex festzustellen war, ist der Einfluss von Carbonat- und Hydroxid-Ionen auf die Speziation im neutralen und basischen pH-Bereich als sehr wahrscheinlich anzusehen. Besonders da der beschriebene Spektrenverlauf dem der Eu(III)-Hydrolyse sehr ähnelt (siehe Abb. A5). Lediglich im pH-Bereich zwischen 7–8 ist ein abweichendes Speziationsverhalten gegenüber dem Aquoion zu erkennen.

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

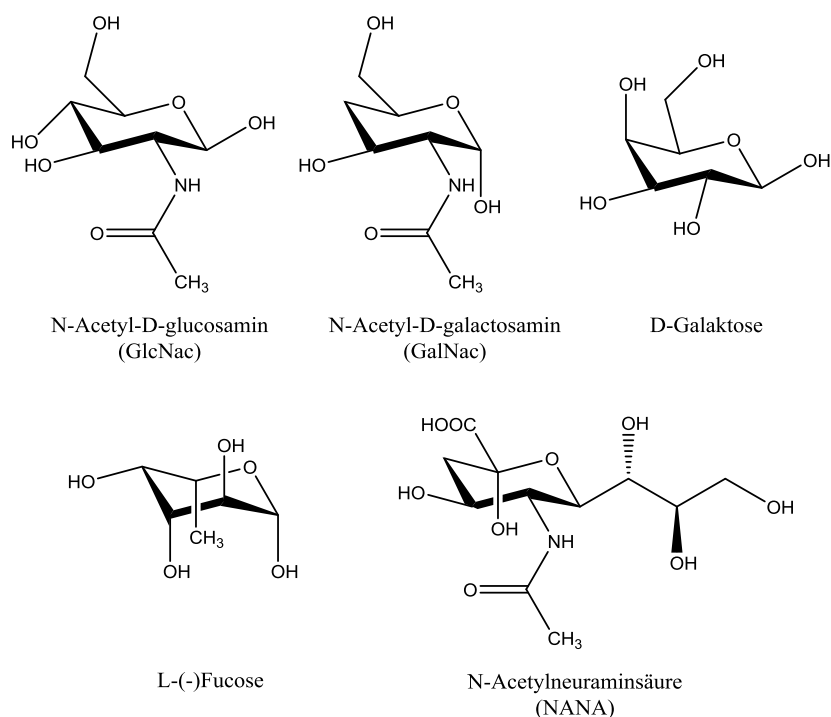


Abbildung 5.13: Strukturformeln der untersuchten Zucker.

Die aufgenommenen Lumineszenzspektren der Monosaccharide sowie eine Mischung aller Zucker wurden im Anschluss mit dem Spektrum des Proteins und des Eu-Aquoions bei pH 7 verglichen. In Abbildung 5.15 ist der Vergleich der Lumineszenzspektren sowie der Lebensdauern gegenüber gestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass kein Spektrum der einzelnen Zucker weder in der Form noch in der Intensität mit dem des Mucins übereinstimmt. Dafür ähneln die Lumineszenzspektren der Monosaccharide überwiegend dem von Eu(III) in Wasser. Die intensitätsstärksten F_2 -Banden weisen die Zuckermischung sowie das Monosaccharid NANA auf. Eine genauere Beschreibung des Komplexierungsverhalten von NANA mit dreiwertigen f-Elementen erfolgt im nächsten Kapitel.

Wie bereits zuvor erwähnt, zeigen die übrigen Carbohydrate Galaktose, GlcNac, GalNac und Fucose nur eine sehr schwache Komplexierung mit Eu(III). Demzufolge handelt es sich um Spezies mit kurzen Lebensdauern zwischen 110–140 μs , die im Vergleich zu den Lebensdauern der Eu(III)-Hydrolyse (110–130 μs) nur leicht erhöht sind (siehe rechte Abb. 5.15). Die Lebensdauern der NANA liegen im Bereich zwischen 111–173 μs . NANA besitzt somit im Vergleich zu den anderen Zuckern die am stärksten ausgeprägte Komplexierung mit Eu(III), da sie bei Betrachtung ihrer Strukturformel auch mehr funktionelle Gruppen, wie die Glycerol-Seitenkette oder die Carboxylgruppe (siehe Abb. 5.13). Vor allem die Carboxylgruppe ist ein starker Komplexbildner im Vergleich zu den OH- und NH-Gruppen der anderen Monosaccharide. Zudem weisen α -Hydroxycarbonsäuren wie NANA im Allgemeinen eine stärkere Komplexierung mit Kationen auf als neutrale Zucker wie Fucose oder Galaktose.^[122]

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

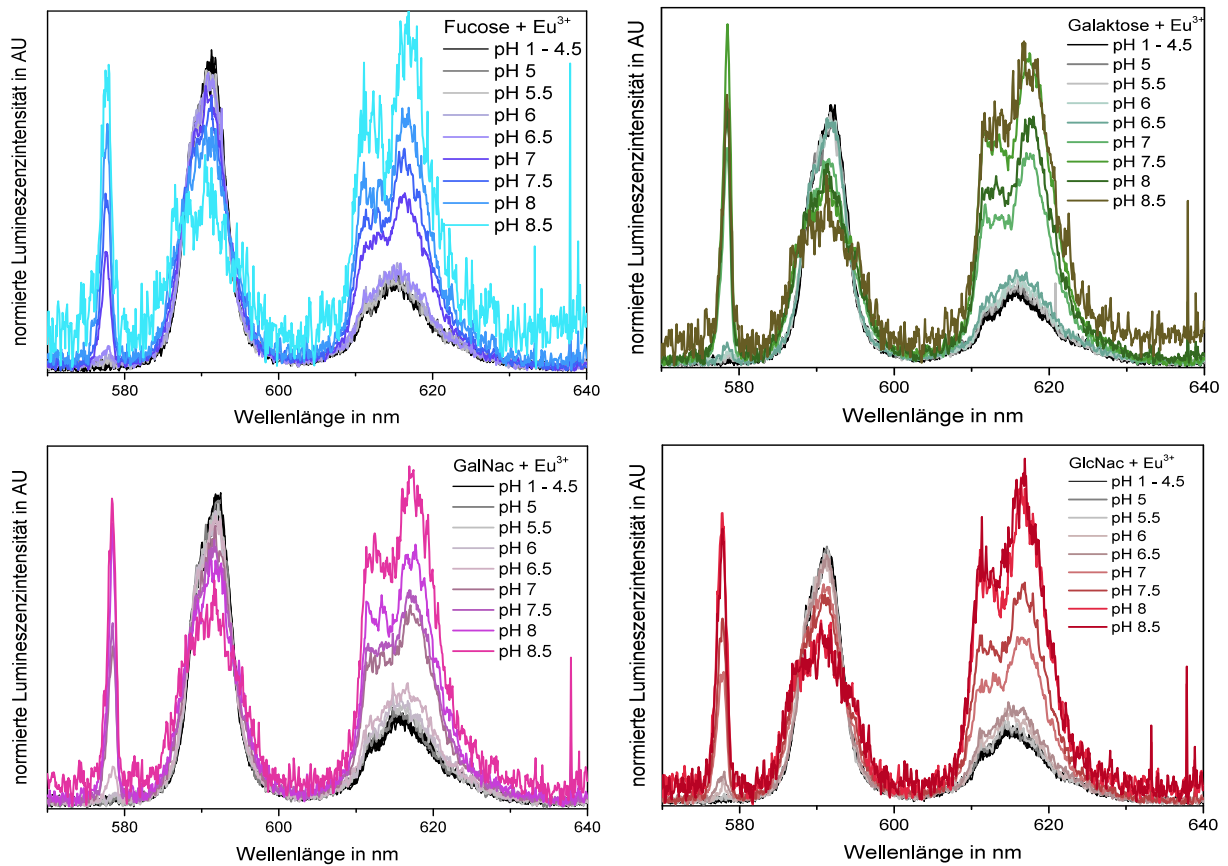


Abbildung 5.14: pH-abhängige Lumineszenzspektren von $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) mit den 1 mM Zuckern Fucose, Galaktose, N-Acetylgalactosamin (GalNac) und N-Acetylglucosamin (GlcNac).

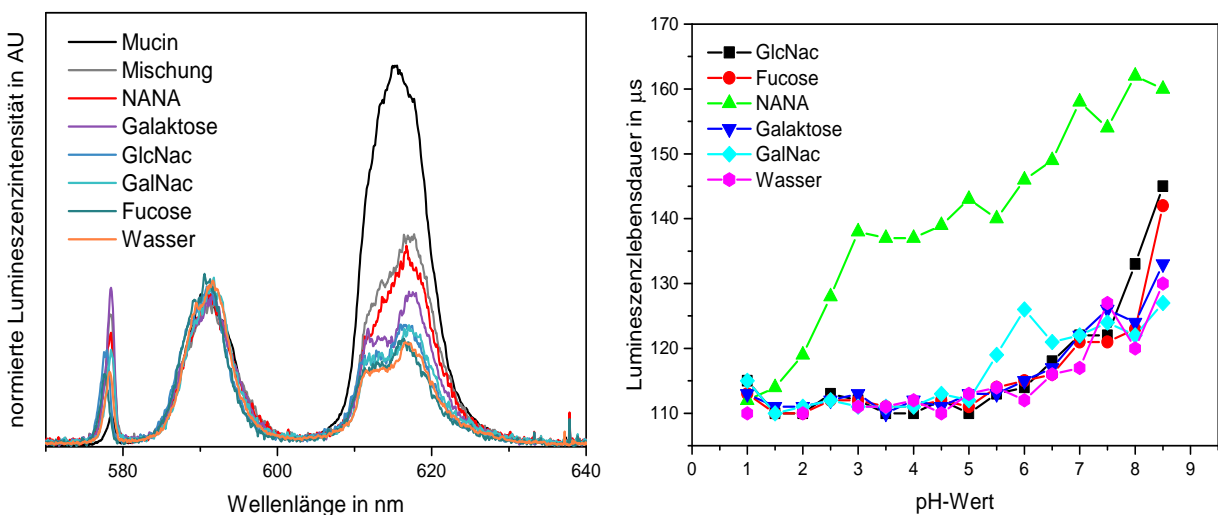


Abbildung 5.15: Vergleich der Eu(III) Lumineszenzspektren (links) und Lebensdauern (rechts) der einzelnen Zucker (1 mM) mit 1 mg/mL Mucin bei pH 7 und RT.

5.4 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe des zirkularen Dichroismus lassen sich schnell Sekundärstrukturen, Bindungseigenschaften sowie Konformationsänderungen von Proteinen bestimmen. Enantiomere eines chiralen Stoffes absorbieren dabei in einem unterschiedlichen Ausmaß zirkular polarisiertes Licht. Strukturell verschiedene Elemente wie α -Helices oder β -Faltblätter besitzen somit charakteristische CD-Spektren.^[123,124]

Die aufgenommenen CD-Spektren des Mucins bei unterschiedlichen pH-Werten und unter Eu(III)-Zugabe bei pH 7 können Abbildung 5.16 entnommen werden. Es wurden ebenso bei pH 2,5 und 4,5 Untersuchungen mit Eu(III) durchgeführt, da sie denselben Spektrenverlauf aufweisen wie bei pH 7 sind sie im Anhang dargestellt (siehe Abb. A6).

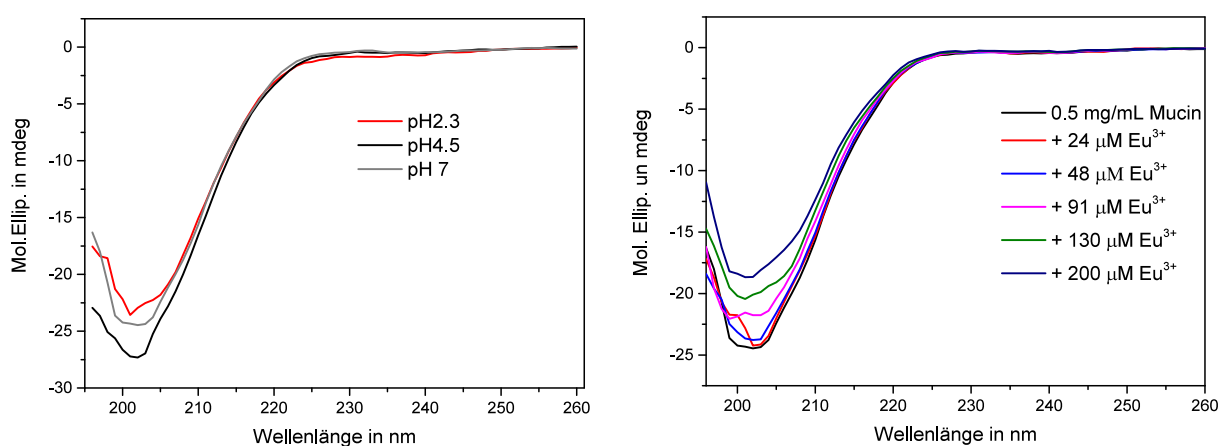


Abbildung 5.16: Zirkularer Dichroismus von 0,5 mg/mL Mucin bei unterschiedlichen pH-Werten (links) und unter Eu(III)-Zugabe bei pH 7 (rechts).

Die Spektren entsprechen einer *random coil*-, also einer ungeordneten Konformation mit einer geringen molaren Elliptizität über 210 nm und einer charakteristischen starken, negativen Bande bei etwa 195 nm. Zudem ist bei 220 nm eine leichte, positive Schulter zu erkennen. Diese Signale im fernen UV-Bereich (170–250 nm) sind vor allem auf Peptidbindungen zurückzuführen, die bei Mucinen in der PTS-Region vorliegen.

Im Allgemeinen können zwischen den unterschiedlichen pH-Werten keine strukturellen Veränderungen beobachtet werden. Lediglich die Intensität der negativen Bande wird bei pH 2,3 und 7 leicht reduziert. Diese Intensitätssenkung tritt ebenso bei Zugabe von Eu(III) auf. Demzufolge wird die molare Elliptizität reduziert, jedoch nur in einem geringen Ausmaß. Da bis zu 90 % des Molekulargewichts von Carbohydrat-Ketten bestimmt werden, wird die Konformation der PTS-Regionen größtenteils beibehalten.^[123,125] Somit führen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den dreiwertigen f-Elementen zu keiner Konformationsänderung.

Die Intensitätsreduzierung deutet ebenso auf eine Aggregation des Proteins hin. Eine Faltung der Mucin-Struktur kann somit nicht beobachtet werden. Trotz einer hohen Zugabe an Eu(III) bleibt das Protein in Lösung. Beim Mucin handelt es sich somit um ein Protein mit Pufferfunktion, welches viele Carboxylgruppen aufweist und aufgrund seiner hohen Ladung eine hohe Löslichkeit besitzt. Die Abnahme der Intensität deutet darauf hin, dass eine

neutrale Ladung des Proteins sowohl durch den pH als auch durch eine Metallaufnahme erreicht werden kann. Die Bindung des Eu(III) erfolgt dabei wahrscheinlich über Carboxylgruppen, bei niedrigeren pH-Werten ist auch eine Komplexbildung mit den Zuckern nicht auszuschließen.

5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Mit Hilfe der ITC können thermodynamische Daten wie die Reaktionsenthalpie ΔH und -entropie ΔS direkt ermittelt werden. Dabei wird bei konstanter Temperatur die abgegebene oder aufgenommene Wärme während einer Reaktion durch das isothermale Kalorimeter angezeigt.^[126] Für die Analyse der ITC-Daten ist die Annahme eines Bindungsmodells notwendig (z.B. 1:1, 1:2, etc.).^[127] Aufgrund der hohen Bindungskapazität und der unbekanntenen Molmasse des Mucins wurde kein passendes Modell gefunden. In Folge dessen konnten die thermodynamischen Parameter nicht bestimmt werden, sodass lediglich eine Aussage über den energetischen Verlauf der Reaktion (exo-/endotherm) möglich ist. Das Ergebnis des ITC-Experiments ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

Aufgrund der vorwiegend positiven ITC-Signale lässt der Verlauf der Wärmekurve auf eine endotherme Reaktion zwischen Eu(III) und dem Protein Mucin schließen, da Wärme aufgenommen wird. Bei den negativen Signalen der Wärmekurve handelt es sich lediglich um Störungen während der Messung, die nicht auf eine exotherme Teilreaktion zurückzuführen sind.

5.6 Rolle des Mucins in der Absorption dreiwertiger f-Elemente

Das Mucin ist nicht nur ein wichtiger Bindungspartner von dreiwertigen f-Elementen im menschlichen Verdauungssystem; das Glykoprotein ist auch für die schützende Geleigenschaft der Mukusschicht gegenüber Pathogenen und Toxinen einschließlich Schwermetallen verantwortlich. Mucine könnten somit eine wichtige Rolle bei der Absorption dreiwertiger f-Elemente in den Blutkreislauf einnehmen und zur Detoxifizierung dieser Schwermetalle beitragen.

Mucine weisen allgemein eine große Bindungskapazität für Metallionen auf, dabei werden dreiwertige Ionen stärker gebunden als zwei- oder einwertige ($M^{3+} > M^{2+} > M^{+}$). Da die Mukus-Schicht immer wieder erneuert wird, hängt die Absorption der Metallionen stark von deren Mobilität durch die Dünndarmschleimhaut ab. Je stärker die Kationen an das Gel gebunden sind, desto niedriger ist deren Absorptionsrate ($M^{+} > M^{2+} > M^{3+}$). Dies stellt zum einen ein Regulationsmechanismus für Metallionen und zum anderen einen Schutz gegenüber toxischen Metallen dar.^[128]

Dies könnte den niedrigen fraktionellen Absorptionsfaktor von $5 \cdot 10^{-4}$ der Lanthanide und Actinide im Dünndarm erklären.^[13,22] Ln und An könnten möglicherweise durch die Komplexbildung und einer nachfolgenden Exkretion durch Mucine immobilisiert werden. Der Absorptionsfaktor ist jedoch sehr individuell und hängt von verschiedenen Umständen wie dem Alter, der Ernährung oder dem Gesundheitszustand einer Person ab. Experimentelle

5 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit dem Glykoprotein Mucin

Tierdaten deuten darauf hin, dass der Faktor bei neugeborenen Tieren um mindestens eine Größenordnung oder höher ansteigt im Vergleich zum erwachsenen Tier. Ebenso können fastende Umstände den Absorptionsfaktor um das zweifache oder mehr erhöhen. Ein Defizit an Eisen könnte zum Beispiel die fraktionelle Absorption um den Faktor 1,7 steigern, wohingegen ein gut genährter Zustand die Absorption reduziert. Aus diesen Gründen handelt es sich bei dem Absorptionsfaktor um keine konstante Größe, der über einige Größenordnungen schwanken kann.^[22]

Des Weiteren wird die mukosale Schutzschicht durch exogene Wirkstoffe wie Alkohol oder nichtsteroidale, entzündungshemmende Medikamente (zum Beispiel Aspirin oder Ibuprofen) beschädigt. Mukosale Verletzungen im Dünndarm führen allgemein zu einer erhöhten Absorption von Schadstoffen (wie Radionukliden) in den Blutstrom und einer Ablagerung in den Zielorganen. Daher ist der Gesundheitszustand jedes Einzelnen ein wichtiger Faktor, der das Ausmaß an absorbierten f-Elementen im Dünndarm bestimmt. Eine gesunde und aktive mukosale Barriere hingegen könnte diese Schwermetalle binden und eine Absorption in den Blutstrom größtenteils verhindern.^[129,130]

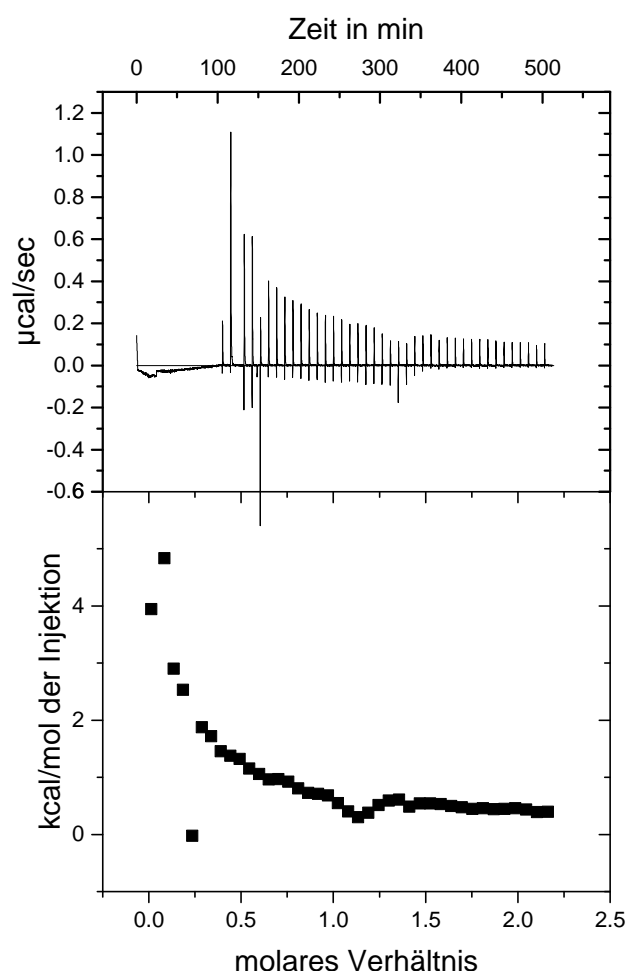


Abbildung 5.17: Kalorimetrische Titrationskurve von 1 mg/mL Mucin mit 1 mM Eu(III) in 0,1 M NaCl bei pH 4,5 und RT.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Die N-Acetylneuraminsäure (kurz NANA) gehört zu der Familie der sogenannten Sialinsäuren (Sias), die eine Gruppe von 30 Derivaten der Neuraminsäure umfasst. Es handelt sich dabei um Aminosäurezucker mit unterschiedlichen Substituenten an der Aminogruppe und den alkoholischen Hydroxygruppen. In Abbildung 6.1b ist eine Auswahl an möglichen Strukturen der Sias dargestellt. Alle Sias besitzen ein Grundgerüst aus 9 C-Atomen und einem Carbonsäurerest am C2-Atom. Hinzu kommen eine Vielzahl an möglichen Substituenten an der C2, 4, 5, 7, 8 und 9-Position, was zu der großen strukturellen Diversität der Sias führt.^[131–133]

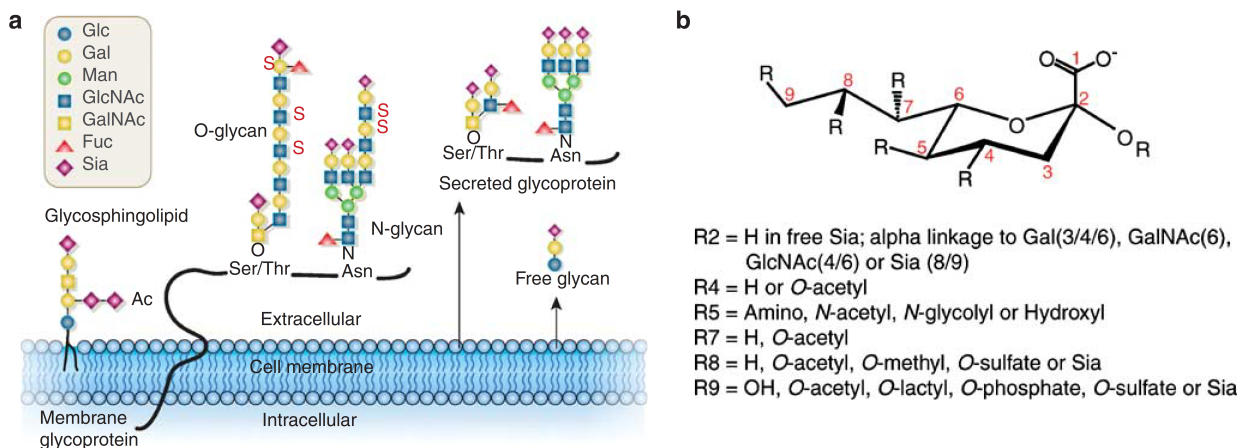


Abbildung 6.1: Natürliche Diversität, Struktur und Funktion der Sialinsäuren. (a) typische terminale Position der Sias an N- und O-verbundenen Glykanen an der Zelloberfläche, an sekretierten Glykoproteinen und an Glykosphingolipiden. Ac=O-Acetyler, Fuc=Fucose, Gal=Galaktose, GalNAc=N-Acetylgalactosamin, Glc=Glucose, GlcNAc=N-Acetylglucosamin, Man=Mannose, S=Sulfatester (b) Strukturelle Diversität.^[133]

Die Sias befinden sich vor allem an der äußeren Zellmembran oder am terminalen Ende von Glykoproteinen (wie dem Mucin), -lipiden (z.B. Ganglioside) oder Polysacchariden (siehe Abb. 6.1a). Die am häufigsten vorkommenden Sias sind dabei die N-Acetyl- und N-Glycolylneuraminsäure, wobei letztere nicht vom Menschen produziert wird. Das Organ

mit den meisten Sias im menschlichen Körper ist die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) mit 14 unterschiedlichen Aminosäurezuckern. Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass das Molekulargewicht des gebildeten Mucin der Glandula submandibularis zu 30 % von Sias bestimmt wird.^[125,131,133]

Die Sialinsäuren sind aufgrund ihrer negativen Ladung ($pK \approx 2$) in verschiedene biologische Prozesse involviert, wie zum Beispiel an der Bindung und dem Transport von positiv geladenen Molekülen. So beeinflussen sie zum Beispiel den Transport von Kalium-Ionen oder Aminosäuren durch die Zellmembran. Zudem befinden sich bis zu $>10^7$ Sialinsäure-Reste an der Oberfläche von Zellmembranen, was zu einer Akkumulation der negativen Ladung führt und somit elektrostatische Abstoßungskräfte eine Aggregation von Blutplättchen, Erythrozyten oder auch Krebszellen verhindern. Sias können jedoch auch Ca^{2+} -Brücken ausbilden und eine Aggregation erleichtern. Als Komponente von Glykoproteinen tragen sie zur schützenden Viskosität der Mukus-Schicht wie zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt bei und beeinflussen die Passage von verschiedenen Substanzen durch diese. Des Weiteren haben sie einen Einfluss auf die Konformation von Gangliosiden und Glykoproteinen, was sich auf die Funktionen der Makromoleküle und die Aktivität von Enzymen auswirkt. Zudem sind Sias aufgrund ihrer negativen Ladung an Anti-proteolytischen Effekten beteiligt, da sie mit großen, hydrophilen Molekülen wechselwirken können und somit eine Erkennung von Rezeptoren verhindern (Maskierung).^[131,132,134,135]

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, weist die N-Acetylneuraminsäure aufgrund ihrer negativen Ladung die intensivsten Wechselwirkungen mit dreiwertigen f-Elementen im Glykoprotein Mucin auf. Da NANA an der Struktur und Funktion von Makromolekülen und dem Transport von Substanzen beteiligt ist, hat eine Bindung dreiwertiger Ln und An nicht nur Auswirkungen auf die Eigenschaften des Zuckermoleküls, sondern ebenso auf biologische Prozesse, die mit der Sialinsäure verbunden sind. Im folgenden Kapitel werden daher die Komplexbildung von Eu(III)/Cm(III) mit NANA und deren Speziation im Gastrointestinaltrakt untersucht.

6.1 Lumineszenzspektroskopische Eigenschaften von Eu(III) und Cm(III) mit NANA

Um die Komplexbildung zwischen Eu(III)/Cm(III) mit NANA genauer charakterisieren zu können, wurden zunächst Bindungsstudien mit Hilfe der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt und diskutiert.

Zuerst wurden Konzentrationsreihen des Monosaccharids mit Eu(III) bzw. Cm(III) aufgenommen. Die zugehörigen Lumineszenzspektren sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Die Ligandkonzentration wurde unter konstanten Bedingungen (pH und Metallkonzentration) zwischen 0,02 (Metall:Ligand-Verhältnis = 1:2) und 10 mM (1:1000) NANA variiert. In den Lumineszenzspektren von Eu(III) ist mit zunehmender Ligandkonzentration ein konstanter Intensitätsanstieg der F_2 -Bande zu erkennen. Dies wird auch anhand der F_2/F_1 -Verhältnisse deutlich (siehe linke Abb. 6.3). Im Gegensatz zum Mucin wurde bei der Komplexbildung von NANA mit Eu(III) ein monoexponentieller Zerfall der Lumineszenz beobachtet, was auf die

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Ausbildung von nur einer Spezies hindeutet. Mit steigender Ligandenkonzentration steigt die Lebensdauer von 119 auf 174 μs an, dies entspricht 8,4 und 5,5 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre von Eu(III) (siehe Tab. A6).

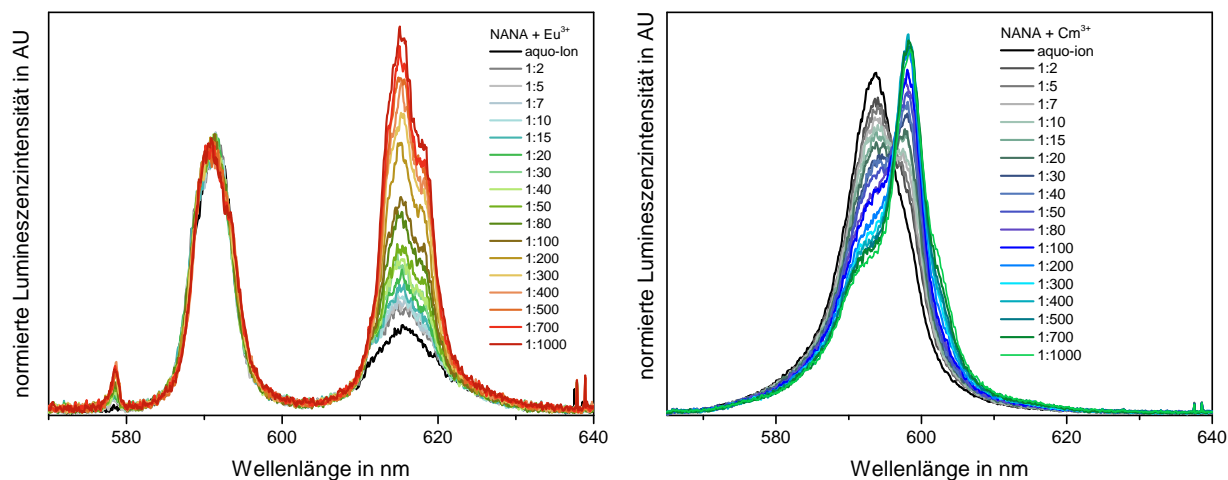


Abbildung 6.2: Konzentrationsreihen von NANA mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) (links) und $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) (rechts) bei pH 4,5 und RT.

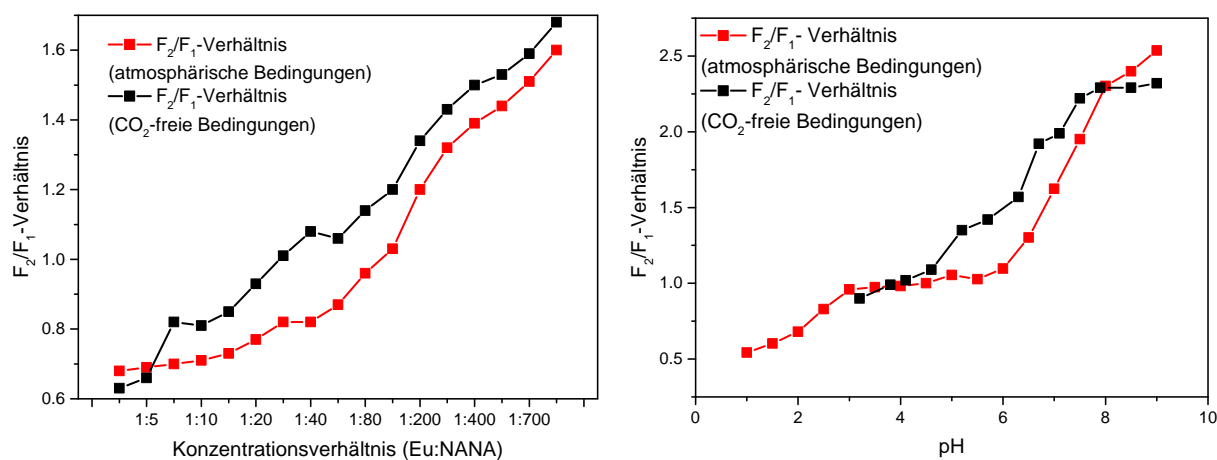


Abbildung 6.3: F_2/F_1 -Verhältnisse der Konzentrations- (links) und pH-Reihe (rechts) von NANA mit Eu(III).

Die Lumineszenzspektren von Cm(III) zeigen die für eine Komplexbildung typische Rotverschiebung. Zudem verschiebt sich mit steigender Ligandkonzentration das Intensitätsmaximum von 593,5 nm auf 598,2 nm. Die sichtbare Schulter im kurzwelligen Bereich des Cm-Spektrums bei einem Metall:Ligand-Verhältnis von 1:1000 liegt bei etwa 593 nm und kann dem Aquoion zugeordnet werden. Auch im langwelligen Bereich ist eine kleine Schulter im Spektrum zu erkennen, was auf eine zweite Spezies hindeutet. Jedoch ist diese zu gering ausgeprägt, sodass keine Peakentfaltung durchgeführt werden konnte. Wie bei der Komplexbildung mit Eu(III) wird demzufolge auch mit Cm(III) aufgrund des monoexponentiellen Lumineszenzzerfalls nur eine Spezies angenommen. Die Lumineszenzlebensdauer τ

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

steigt mit zunehmender Ligandkonzentration von 72 auf 102 μs . Die zugehörige Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationsphäre des Metallions liegt zwischen 8,1 und 5,5 (siehe Tab. A6). Falls eine zweite Spezies vorhanden ist, kann diese spektroskopisch nicht bestimmt werden.

Wie bereits im Kapitel 2.2 erwähnt, handelt es sich bei den berechneten Lebensdauern um gemittelte Werte von mehreren Spezies, die nebeneinander vorliegen. Im Falle der NANA liegt eine Mischung aus Aquoion und dem Metall-NANA-Komplex vor. Der Ligandenaustausch zwischen Wasser- und NANA-Molekülen unterliegt einer schnellen Fluktuation, die vom Lasersystem nicht erfasst werden kann. Bei einer starken Komplexbildung mit Eu(III)/Cm(III), wie beispielsweise mit dem Protein Mucin, erfolgt ein biexponentieller Zerfall der Lumineszenz.

Wie beim Mucin wurden ebenso für NANA pH-abhängige Messreihen mittels TRIFS durchgeführt (siehe Abb. 6.4). Die pH-Reihe von NANA mit Eu(III) zeigt im sehr sauren pH-Bereich bis pH=1 keine Komplexbildung auf. Das zugehörige Spektrum entspricht dem des Aquoion. Parallel zum Mucin zeigt auch der Zucker bereits ab pH 1,5 eine Zunahme der Intensität der F_2 -Bande, die mit steigenden pH immer deutlicher wird. Dies ist ebenfalls anhand der F_2/F_1 -Verhältnisse zu erkennen (siehe rechte Abb. 6.3), welche zunächst bis pH 3 ansteigen, um anschließend bis pH 6 einen konstanten Wert einzunehmen. Auch in Anbetracht der Lumineszenzspektren, die keinen weiteren Intensitätsanstieg der F_2 -Bande aufweisen, wird dies deutlich. Erst oberhalb pH 6 kann eine weitere Erhöhung der F_2/F_1 -Verhältnisse mit steigendem pH verzeichnet werden. Zudem ist im Lumineszenzspektrum bei pH 8 eine Aufspaltung der F_2 -Bande sowie eine Abnahme der Lumineszenzintensität zu erkennen. Diese Beobachtung kann durch die Ausbildung von schwach lumineszierenden Eu-Hydroxid-Komplexen erklärt werden. Aufgrund des monoexponentiellen Zerfalls der Lumineszenz konnte nur eine Lumineszenzlebensdauer τ berechnet werden, die in Abhängigkeit des pH-Wertes von 119 auf 173 μs ansteigt, was 8,3 bzw. 5,6 Wassermolekülen in der ersten Koordinationsphäre des Metallions entspricht (siehe Tab. A7).

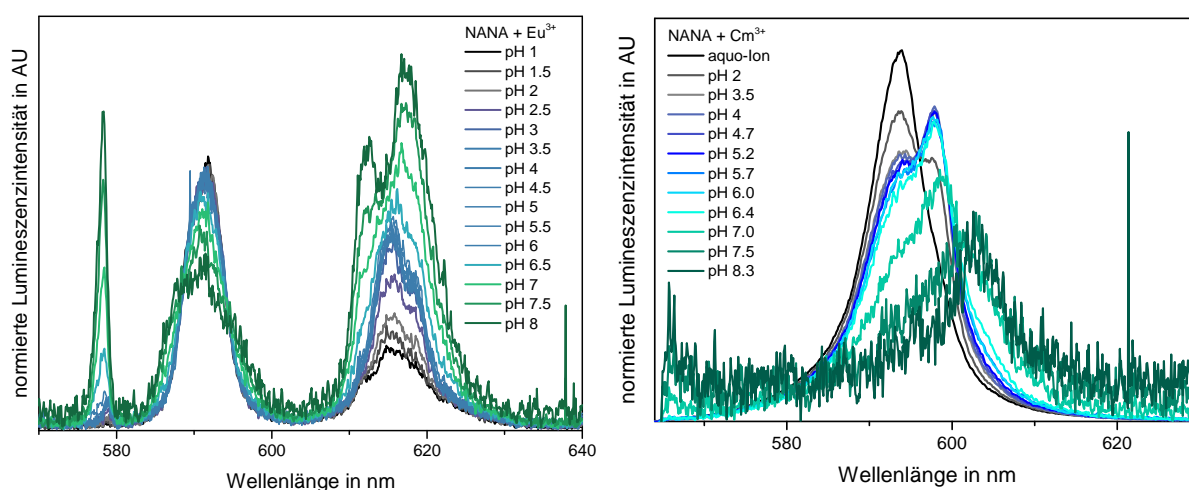


Abbildung 6.4: pH-Reihe von 1 mM NANA mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) (links) und $3 \cdot 10^{-7}$ M Cm(III) (rechts) bei RT.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Wie bereits die Konzentrationsreihen zeigen die Lumineszenzspektren von Cm(III) ebenso eine pH-abhängige Rotverschiebung, die jedoch stärker ausgeprägt ist. Bei pH 2 liegt das Intensitätsmaximum des Spektrums bei 593,5 nm, dies entspricht dem Cm-Aquoion. Mit zunehmenden pH verschiebt sich das Maximum des Cm-Komplexes im Basischen allmählich zu 602,6 nm. Wie bei den Eu-Spektren ist auch hier aufgrund der Bildung von Hydroxid-Komplexen bereits ab pH 7 eine starke Erniedrigung der Lumineszenzintensität und ein erhöhtes Rauschen zu beobachten. Aufgrund des monoexponentiellen Zerfalls der Lumineszenz konnte erneut nur eine Lumineszenzlebensdauer τ berechnet werden, die sich mit dem pH von 67 auf 93 μs erhöht und 8,8 bzw. 6,1 Wassermolekülen in der ersten Koordinationssphäre von Cm(III) entspricht. (siehe Tab. A7).

Um einen möglichen Einfluss des atmosphärischen CO_2 auf die Komplexbildung von NANA mit Eu(III) zu untersuchen, wurden die Konzentrations- und pH-Reihen wie die Cm-Experimente in einer Glove Box unter CO_2 -Ausschluss durchgeführt. Die zugehörigen Messreihen sind in Abbildung 6.5 dargestellt.

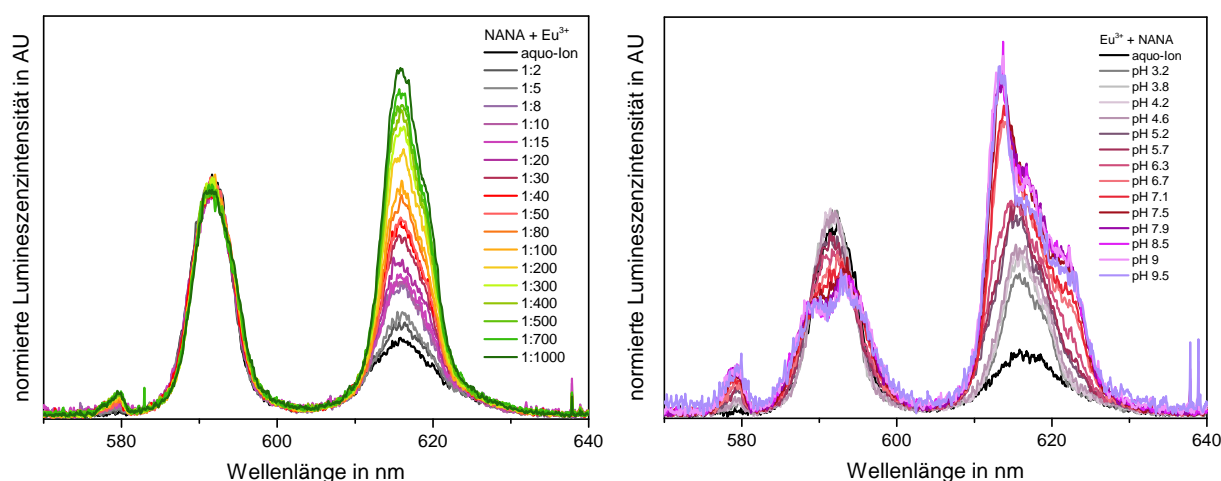


Abbildung 6.5: Konzentrations- (links) und pH-Reihe (rechts) von NANA mit $1 \cdot 10^{-5}$ M Eu(III) unter CO_2 -Ausschluss.

Die Lumineszenzspektren der Konzentrationsreihe bei pH 4,5 unter atmosphärischen Bedingungen und unter CO_2 -Ausschluss zeigen keine sichtbaren Unterschiede bezüglich der Spektrenform. Ebenso weisen die F_2/F_1 -Verhältnisse (siehe linke Abb. 6.3) einen simultanen Verlauf auf. Die berechneten Lebensdauern unter CO_2 -Ausschluss liegen im Bereich zwischen 114–184 μs (8,7–5,3 Wassermoleküle) und stimmen mit denen unter atmosphärischen Bedingungen überein.

Beim Vergleich der beiden pH-Reihen sind jedoch deutliche Unterschiede in der Spektrenform zu erkennen (vergleiche Abb. 6.4 und 6.5). Im sauren pH-Bereich weisen die Lumineszenzspektren und die F_2/F_1 -Verhältnisse einen ähnlichen Verlauf auf. Ab pH 5 weichen sowohl die Spektrenformen als auch die berechneten Lebensdauern stark voneinander ab. Die Lumineszenzlebensdauern unter atmosphärischen Bedingungen und CO_2 -Ausschluss sind in Tabelle 6.1 gegenübergestellt. Im Allgemeinen weisen beide Messreihen einen monoexponentiellen Zerfall der Lumineszenz auf, wodurch nur eine Lumineszenzlebensdauer berechnet werden konnte. Dies deutet auf die Ausbildung von nur einer Spezies hin. Es ist jedoch

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

wahrscheinlicher, dass eine Mischung aus mehreren Spezies vorliegt. Dies ist der Fall, wenn der Ligandenaustausch schneller erfolgt als die Laserfrequenz, sodass es sich bei den berechneten Lebensdauern um gemittelte Werte verschiedener Spezies handelt.

Die Lebensdauern unter CO₂-Ausschluss sind jedoch wesentlich höher als die unter atmosphärischen Bedingungen. Auch die Spektrenformen unterscheiden sich. Unter atmosphärischen Bedingungen weisen die Lumineszenzspektren eine intensive F₀-Bande auf, die unter CO₂-Ausschluss zwar vorhanden ist, aber wesentlich geringer ausgeprägt. Vor allem im basischen Bereich weichen die Spektrenformen voneinander ab. So zeigen die Spektren bei pH 8 unter CO₂-Ausschluss zum Beispiel keine Peakaufspaltung der F₂-Bande. Stattdessen kann eine Aufspaltung der umgebungsunabhängigen F₁-Bande beobachtet werden.

Für weitere Aussagen werden die Lumineszenzspektren der aufgenommenen pH-Reihe unter atmosphärischen Bedingungen mit der Eu-Hydrolyse verglichen, die durch Carbonat- und Hydroxokomplexe beeinflusst wird (siehe Abb. A5). Jedoch stimmen die Spektrenformen der beiden Messreihen nicht miteinander überein. Während bei der Eu-Hydrolyse bis pH 6,5 keine Intensitätserhöhung der F₂-Bande zu beobachten ist, was auf eine Dominanz des Aquoions hindeutet, kann bei der Komplexbildung von Eu(III) mit NANA eine stetige Steigerung der Intensität festgestellt werden. Auch im basischen Bereich weichen die Spektrenformen voneinander ab. In Folge dessen wird die Eu(III)-Speziation vorwiegend durch Mischkomplexe wie Eu/NANA/Hydroxo und Eu/NANA/Carbonat beeinflusst.

Tabelle 6.1: Vergleich der Lumineszenzlebensdauern der pH-Reihen von NANA mit Eu(III) unter atmosphärischen Bedingungen und CO₂-Ausschluss.

Probe	Atmosphäre		CO ₂ -Ausschluss	
	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$
pH 3	137 ± 10	7,2	135 ± 10	8,9
pH 4	137 ± 10	7,2	143 ± 10	6,8
pH 5	143 ± 10	6,9	170 ± 10	5,7
pH 5,5	140 ± 10	7,0	179 ± 10	5,4
pH 6	146 ± 10	6,7	196 ± 10	4,8
pH 6,5	149 ± 10	6,6	203 ± 10	4,5
pH 7	158 ± 10	6,2	208 ± 10	4,5
pH 7,5	154 ± 10	6,3	224 ± 10	4,2
pH 8	162 ± 10	6,0	232 ± 10	4,0
pH 8,5	160 ± 10	6,1	245 ± 10	3,7
pH 9	173 ± 10	5,6	250 ± 10	3,7

^a± 0,5

Für weitere Aussagen zur Speziation von Eu(III)/Cm(III) mit dem Liganden NANA im wässrigen Medium wurden aus den Lumineszenzspektren der Konzentrationsreihen Stabilitätskonstanten für die Komplexe Eu-NANA (unter atmosphärischen Bedingungen), Eu-NANA (unter CO₂-Ausschluss) und Cm-NANA berechnet. Für alle drei Komplexe wurde eine 1:1-Stöchiometrie mit folgenden Stabilitätskonstanten ermittelt:

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

$\log\beta = 2,94 \pm 0,1$ für Eu-NANA (unter atmosphärischen Bedingungen)

$\log\beta = 3,23 \pm 0,1$ für Eu-NANA (unter CO₂-Ausschluss)

$\log\beta = 3,32 \pm 0,1$ für Cm-NANA

Die berechneten Konstanten konvergieren gut miteinander, liegen jedoch in der Nähe des pK_s-Wertes der NANA von 2,6,^[136] was auf eine eher schwach ausgeprägte Komplexbildung zwischen den Metallionen und dem Zucker schließen lässt. In Tabelle 6.2 sind die ermittelten Konstanten mit Literaturwerten von weiteren Metall-Komplexen zusammengefasst.

Tabelle 6.2: Zusammenfassung und Vergleich der Stabilitätskonstanten von Eu(III) und Cm(III).

Spezies	Kation	Methode	Ionenstärke	logK	Referenz
[M(NANA)]	Eu(III)	TRLFS	0,1 M NaCl	2,94 ± 0,1	diese Arbeit
				3,23 ± 0,1	diese Arbeit
[M(NANA)]	Cm(III)	TRLFS	0,1 M NaCl	3,32 ± 0,1	diese Arbeit
[M(NANA)] ⁺	Cu(II)	Potentiometrie	0,1 M NaNO ₃	3,57	[132]
[M(NANA)] ⁺	Co(II)	Potentiometrie	0,1 M NaNO ₃	3,84	[132]
[M(NANA)] ⁺	Cd(II)	Potentiometrie	0,1 M NaNO ₃	3,60	[132]
[M(NANA)] ⁺	Pb(II)	Potentiometrie	0,1 M NaNO ₃	3,22	[132]
[M(NANA)] ⁺	Ca(II)	Potentiometrie	0,02–0,04 M	1,90	[137]
M(Ac) ²⁺ ^a	Eu(III)	TRLFS	0,1 M	2,20 ± 0,2	[138]
M(Lac) ²⁺ ^b	Eu(III)	TRLFS	0,1 M NaClO ₄	2,51 ± 0,1	[139]
[M(NeuGc)] ^c	Ca(II)	NMR	-	2,29	[140]
[MGala] ^d	Cd(II)	Potentiometrie	0,05 M NaNO ₃	4,51	[141]
[MGala] ^d	Pb(II)	Potentiometrie	0,05 M NaNO ₃	4,42	[141]
[MGala] ^d	Hg(II)	Potentiometrie	0,05 M NaNO ₃	2,86	[141]
[MGala] ^d	Ni(II)	Potentiometrie	0,05 M NaNO ₃	3,22	[141]
[MGala] ^d	Co(II)	Potentiometrie	0,05 M NaNO ₃	3,08	[141]

^aAc=Acetat

^bLac=Lactat

^cNeuGc=N-Glycolylneuraminsäure

^dGala=Galactarsäure/Mucinsäure

Saladini et al. [132] untersuchte das Komplexbildungsverhalten von NANA mit toxischen, zweiwertigen Schwermetallionen. Die Stabilitätskonstanten der 1:1-Komplexe von Cu(II), Co(II), Cd(II) und Pb(II) liegen im selben Bereich wie die bestimmten Werte für den Eu(III)/Cm(III)-Komplex. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit beschreibt Saladini et al. [132] jedoch die gleichzeitige Ausbildung eines 1:2-Komplexes [M(NANA)₂] mit zweiwertigen Metallionen während für die dreiwertigen f-Elemente nur ein 1:1-Komplex festgestellt werden konnte. Des Weiteren ermittelte die Arbeitsgruppe Stabilitätskonstanten für einen Mischkomplex aus NANA und Hydroxid-Ionen [M(NANA)₂OH]⁻, der ab pH 7 vorliegt.^[132]

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Die Ausbildung eines solchen Mischkomplexes mit Eu(III)/Cm(III) wird in dieser Arbeit ebenfalls vermutet.

Da dreiwertige Ln und An einen ähnlichen Ionenradius wie Ca(II) aufweisen, wurde auch der $[\text{Ca}(\text{NANA})]^+$ -Komplex zum Vergleich herangezogen. Dieser zeigt jedoch mit einer Komplexbildungskonstante von 1,90 eine geringere Stabilität auf.

Verglichen mit der Komplexbildung von Anionen einfacher Carbonsäuren, Acetat und Lactat mit Eu(III) kann für den Eu/Cm-NANA-Komplex eine höhere Stabilität festgestellt werden. Für ein weiteres Sialinsäure-Derivat, die N-Glycolylneuraminsäure (NeuGc), wurde die Komplexbildung nur mit Ca(II) untersucht. NeuGc kommt vor allem in tierischen Organismen vor während sie im menschlichen Körper nur in bestimmten Fällen von Krebserkrankungen gefunden wurde.^[142] Aber auch diese Ca(II)-Verbindung weist eine geringere Stabilitätskonstante auf als der Eu/Cm-NANA-Komplex.

Da nur wenige Studien das Komplexbildungsverhalten dreiwertiger Ln/An mit Zuckersäuren untersucht haben, sind zum Vergleich noch weitere Stabilitätskonstanten, vorrangig von zweiwertigen Übergangsmetallionen, in Tabelle 6.2 aufgeführt. Die Galactarsäure GalaH₂, auch unter dem Namen Mucinsäure bekannt, besitzt neben den zuckertypischen Hydroxyl- noch zwei Carboxylgruppen als mögliche Bindungsstellen. Die ermittelten Stabilitätskonstanten dieser Komplexspezies sind zum größten Teil mit den NANA-Komplexen vergleichbar. Lediglich Cd(II) und Pb(II) bilden stabilere Komplexe aus.^[141]

In Übereinstimmung mit der Irving-Williams-Reihe wird insgesamt deutlich, dass Ca(II) als Erdalkalimetall eine geringere Komplexstabilität aufweist als Übergangsmetalle. Die Irving-Williams-Reihe beschreibt die Stabilität von Übergangsmetallkomplexen der 4. Periode in der Reihenfolge $\text{Mn} < \text{Fe} < \text{Co} < \text{Ni} < \text{Cu} > \text{Zn}$. Des Weiteren stellen Irving und Williams [143] fest, dass unabhängig vom Ionenradius Komplexe zweiwertiger Übergangsmetallionen eine höhere Stabilität aufweisen als Erdalkalimetallionen wie zum Beispiel Mg(II) oder Ca(II).^[143] Auch die NANA-Komplexe von Eu(III) und Cm(III) als Vertreter der dreiwertigen Ln und An zeigen eine höhere Stabilität als die entsprechenden Ca(II)-Spezies.

Um die genaue Speziation von NANA mit Eu(III) und Cm(III) aufzuklären, wurden mit Hilfe der ermittelten Stabilitätskonstanten Speziationsdiagramme erstellt, die in Abbildung 6.6 zusammengefasst sind. Es ist zu erkennen, dass unter atmosphärischen Bedingungen die Speziation der dreiwertigen f-Elemente bis pH 5,5 ausschließlich vom Eu-NANA-Komplex und dem Aquoion bestimmt wird. Ab pH 6 nehmen Eu-Carbonat-Komplexe einen starken Einfluss auf die Speziation, die ab pH 8 wiederum von Eu-Hydroxid-Komplexen dominiert wird.

Den dominierenden Einfluss der Hydroxid-Komplexe im Basischen zeigt auch die Konzentrationsreihe von NANA mit Cm(III) bei pH 8 (siehe linke Abb. 6.7). Trotz Zugabe des Zuckers bis zu einem Metall:Ligand-Verhältnis von 1:1000 wird keine Komplexbildung mit dem Monosaccharid beobachtet. Alle gemessenen Spektren weisen die Spektrenform des Cm-Hydroxoions bei pH 8 auf.

Die Speziation von Eu(III)/Cm(III) wurde auch unter Beachtung der physiologischen Bedingungen im Dünndarm simuliert (siehe rechte Abb. 6.7). Zur Neutralisation des sauren Magensafts werden im Darm Carbonat-Ionen sekretiert,^[35] sodass die Speziation vorrangig von Carbonat-Komplexen bestimmt wird. Der Zucker-Komplex und das Aquoion beeinflussen diese nur im sauren Bereich bis pH 3,5.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

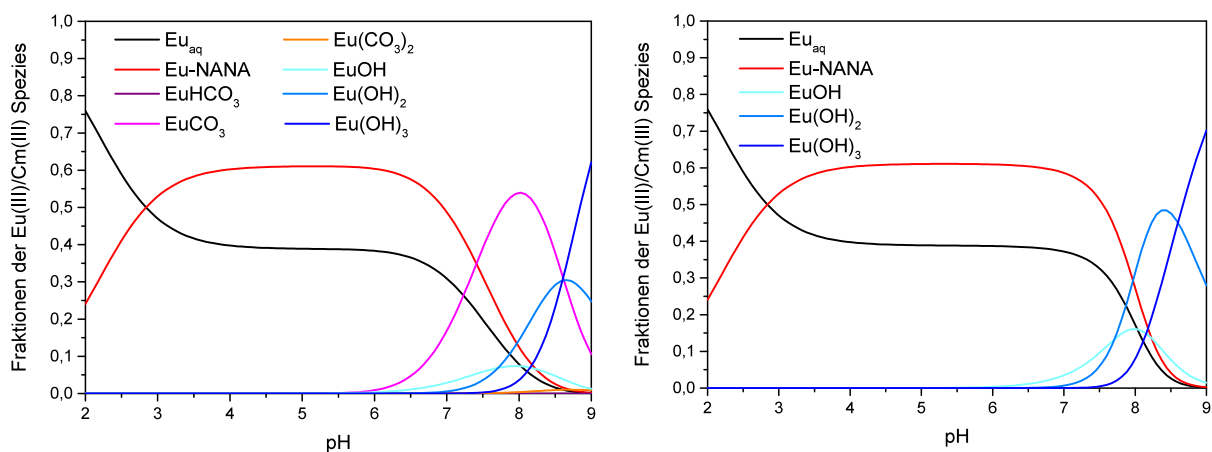


Abbildung 6.6: Speziation von NANA mit Eu(III)/Cm(III) unter atmosphärischen Bedingungen (links) und CO_2 -Ausschluss (rechts).

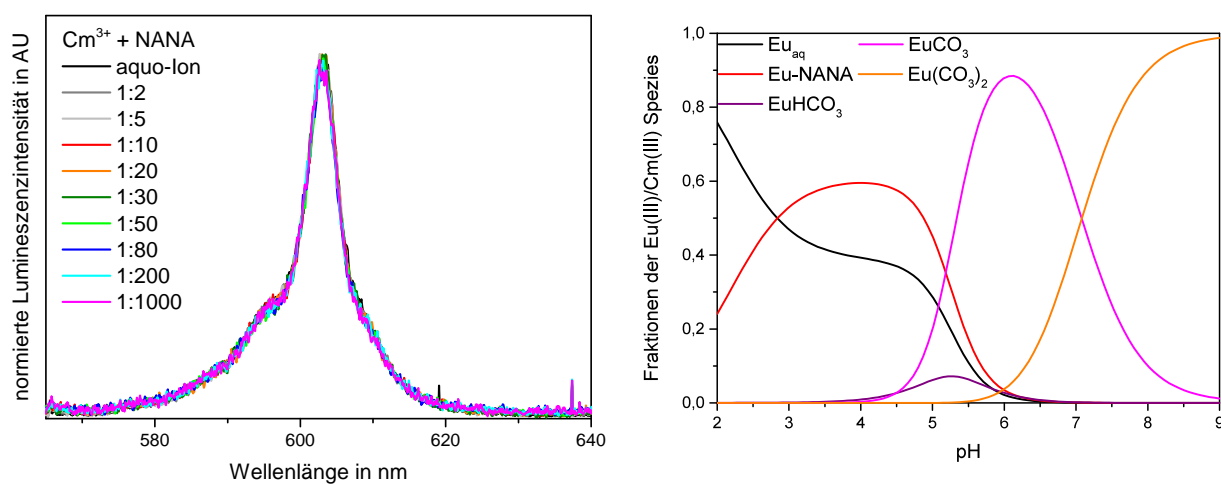


Abbildung 6.7: Konzentrationsreihe von NANA mit $3 \cdot 10^{-7} \text{ M Cm(III)}$ bei pH 8 und RT (links). Speziation von NANA mit Eu(III)/Cm(III) unter physiologischen Bedingungen ($c(\text{CO}_3^{2-}) = 0,1 \text{ M}$, rechts).

6.2 Strukturelle Untersuchungen der Komplexierung von Eu(III) mit NANA

6.2.1 Untersuchung der Komplexbildung mit der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC wurde genutzt um thermodynamische Daten der Komplexreaktion zwischen Eu(III) und NANA zu bestimmen. Mit Hilfe der ITC können diese direkt bestimmt werden. Dabei wird bei konstanter Temperatur die abgegebene oder aufgenommene Wärme während einer Reaktion durch das isothermale Kalorimeter angezeigt.^[126] Die Ergebnisse der ITC sind in Abbildung 6.8 und Tabelle 6.3 dargestellt. Zur Analyse der Daten wurde ein 1:1-Bindungsmodell genutzt. Bei der Komplexierung handelt es sich um eine exotherme Reaktion, da während der Messung Wärme abgegeben wurde (negative ITC-Signale in der oberen Wärmekurve) und die Reaktion eine negative Enthalpieänderung aufweist. Die Änderung der freien Enthalpie ΔG kann mit Hilfe von ΔH und ΔS über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden. Die logarithmische Bindungskonstante der ITC-Messung $\log K = 3,35 \pm 2,76$ stimmt mit den TRLFS-ermittelten Werten überein. Diese Bindungskonstante ist jedoch methodisch bedingt stark fehlerbehaftet, da die ITC vor allem eine Methode zur direkten Bestimmung der Enthalpie, Entropie und Gibbs-Energie darstellt.^[144] Für genaue Bindungskonstanten sollte die Ligandkonzentration nicht höher als das Reziproke der Konstante sein. Bei starken Bindungsreaktionen wären optimale Konzentrationen jedoch zu gering um messbare Wärmeveränderungen zu erhalten. Aus diesem Grund sind mit der ITC Bindungskonstanten meist nicht akkurat bestimmbar und können demzufolge nur als grobe Orientierung dienen.^[145]

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6.1)$$

Tabelle 6.3: Thermodynamische Parameter der ITC bei einem 1:1-Bindungsmodell und 25°C.

Parameter	Ergebnis
Stöchiometriefaktor N	$1,16 \pm 0,09$
Stabilitätskonstante $\log K$	$3,35 \pm 2,76$
Enthalpieänderung ΔH	$-460,72 \pm 58,49$ J/mol
Entropieänderung ΔS	$62,38$ J/Kmol
freie Enthalpieänderung ΔG	$-19,06$ kJ/mol

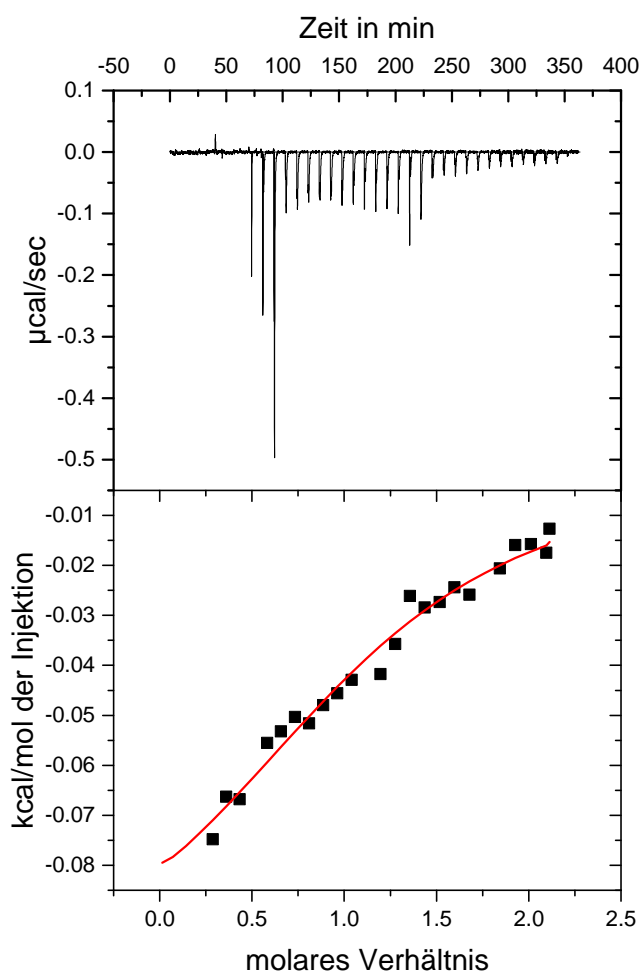


Abbildung 6.8: Kalorimetrische Titrationskurve von 1 mM NANA mit 1 mM Eu(III) in 0,1 M NaCl bei pH 4,5 und RT.

6.2.2 Theoretische Studien zur Komplexierung der N-Acetylneuraminsäure mit Eu(III)

Neben der ITC wurden verschiedene spektroskopische Methoden (IR, NMR) kombiniert, um die gebildete Komplexstruktur zwischen Eu(III) und NANA genauer zu untersuchen. Um die Ergebnisse der IR- und NMR-Spektroskopie zu unterstützen, wurden theoretische Studien zur Optimierung der vermuteten Struktur herangezogen. Im Folgenden werden zunächst die theoretischen Ergebnisse vorgestellt, die im Anschluss mit experimentellen Daten verifiziert werden sollen. Zum besseren Verständnis ist die Struktur der NANA mit Zuordnung der C-Atome in Abbildung 6.9 dargestellt. Die NANA liegt in wässriger Lösung vorrangig als β -Isomer (91,2%) vor.^[146]

Während der Strukturoptimierung wurden mehrere mögliche Komplexstrukturen berücksichtigt. Die Struktur mit der niedrigsten Energie zeigt eine Komplexierung des Eu(III) über die terminalen OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette und der Carboxylgruppe der NANA (siehe linke Abb. 6.10). Der Sauerstoff der OH-Gruppe des C8-Atoms ist dabei 246 pm vom

Eu(III) entfernt, die OH-Gruppe des C9-Atoms 273 pm. Der nähere Sauerstoff der Carboxylgruppe (\cong Carbonyl-Gruppe) ist in einer Entfernung von 231 pm, der weiter entfernte (\cong OH-Gruppe) kann mit einem Abstand von 386 pm nicht mit Eu(III) wechselwirken.

Durch Protonierung der carboxylischen OH-Gruppe und erneuter Optimierung des Komplexes ändert sich die Struktur (siehe rechte Abb. 6.10). Die Bindung zu den OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette wird verstärkt (249 pm und 254 pm) während sich der Abstand zum Sauerstoff der Carboxylgruppe auf 252 pm vergrößert.

Der Unterschied in der Struktur zeigt sich ebenfalls im IR-Spektrum. Die berechneten Spektren sind vorsichtig zu interpretieren, da die Schwingungsfrequenzen mit der harmonischen Näherung berechnet wurden. In Abbildung 6.11 ist deutlich das Auftreten eines zusätzlichen Signals bei 1600 cm^{-1} in der protonierten Form zu erkennen. Diese Schwingung entspricht der C=O-Streckschwingung der Carboxylgruppe.

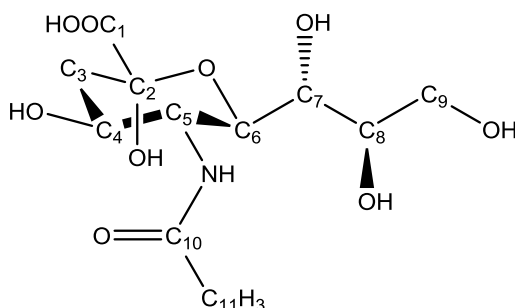


Abbildung 6.9: Struktur von NANA mit Nummerierung der C-Atome.

6.2.3 Strukturuntersuchung mittels ATR-FT-IR

Um die Wechselwirkungen zwischen Eu(III) und NANA genauer zu untersuchen, wurden die ATR-FT-IR-Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Eine Auswahl gemessener IR-Spektren der N-Acetylneuraminsäure sind in Abbildung 6.12 (links) zusammengefasst. Die Zuordnung der Schwingungsbanden kann Tabelle 6.4 entnommen werden.

Die Spektren der reinen NANA von pH 2 bis 6 sind bis auf den Bereich zwischen 1500–1800 cm^{-1} nahezu identisch. Bei pH 2 ist eine deutliche Schwingungsbande bei 1735 cm^{-1} zu erkennen, die charakteristisch für die protonierte Säuregruppe ist. Zudem können die Amid I- und Amid II-Banden klar bei 1627 und 1565 cm^{-1} zugeordnet werden. Mit ansteigenden pH und der folgenden Deprotonierung verschwindet die Bande der protonierten Säuregruppe^[147] und die charakteristischen Schwingungsbanden der deprotonierten Form erscheinen im IR-Spektrum bei 1580 ($\nu_{as}(\text{COO}^-)$) und 1413 cm^{-1} ($\nu_s(\text{COO}^-)$). In Folge dessen ist eine Unterscheidung der beiden Amid-Banden und der antisymmetrischen Schwingungsbande der deprotonierten Carboxylgruppe bei höheren pH-Werten nicht mehr möglich, da die Schwingungsbanden dieser funktionellen Gruppen im selben Frequenzbereich liegen und sich die Banden bei 1580 cm^{-1} überlagern.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

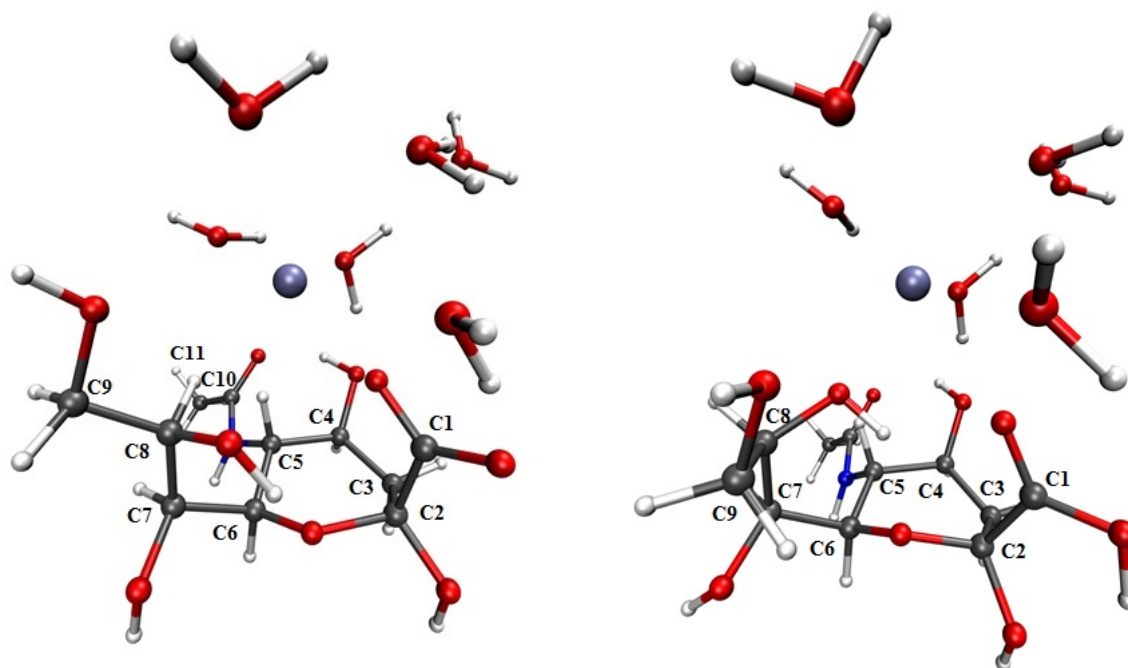


Abbildung 6.10: Optimierte Strukturen des Eu-NANA-Komplexes. (a) deprotonierter (b) protonierter Komplex

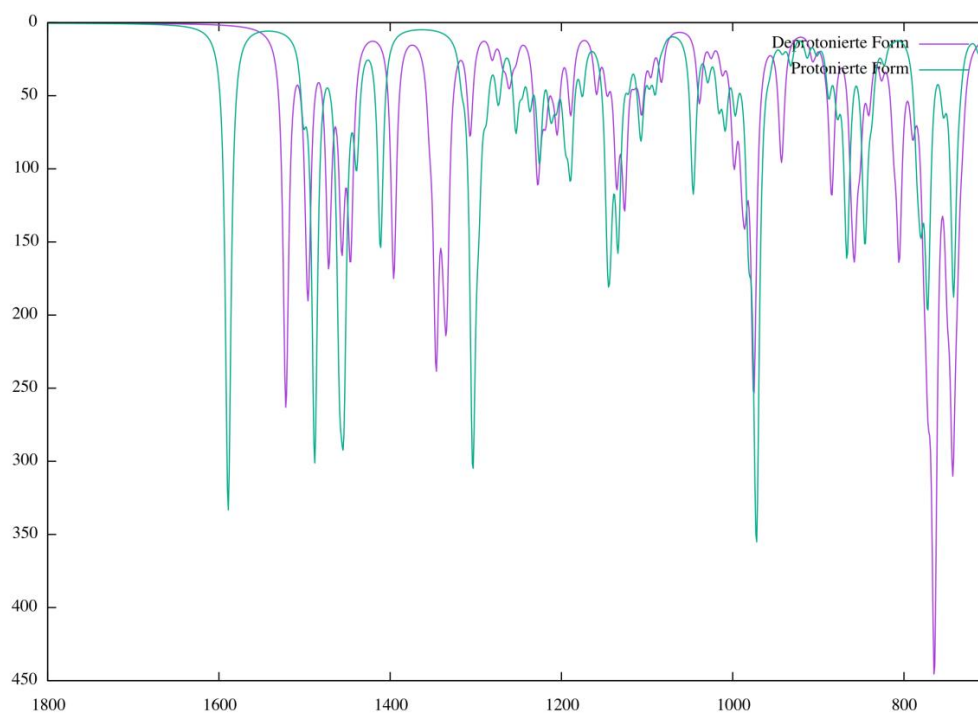


Abbildung 6.11: Berechnete IR-Spektren des Eu-NANA-Komplexes der deprotonierten und protonierten Form.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

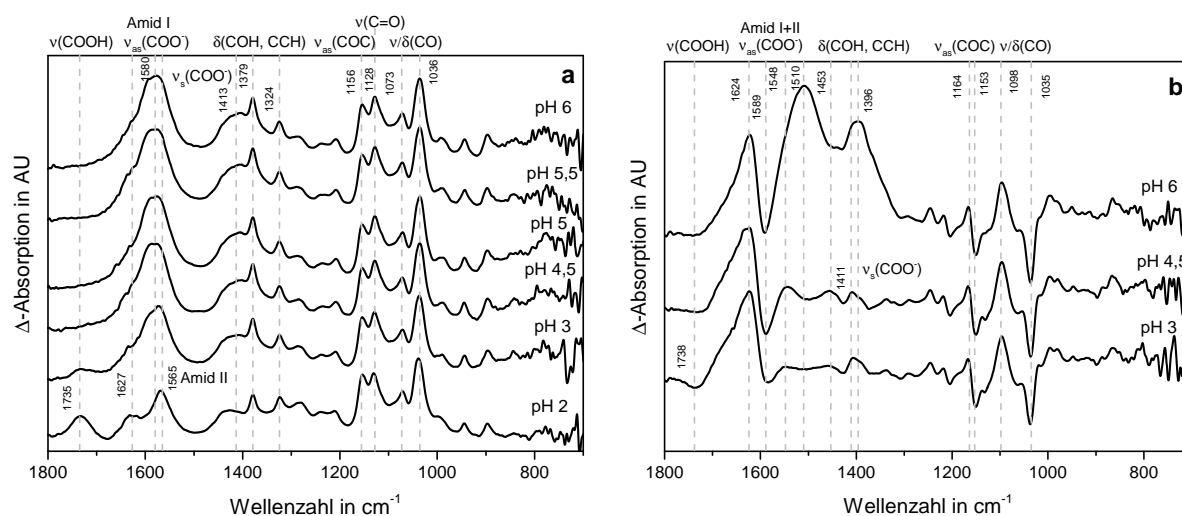


Abbildung 6.12: ATR-FT-IR-Absorptionsspektren von NANA (a) und ATR-FT-IR-Differenzspektren (b) von 10 mM NANA mit 1 mM Eu(III) bei $I=0,1$ und RT an Luft in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Schwingungsbanden zwischen $1200\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$ sind vorrangig CCH-, COH- und CCO-Schwingungen zuzuordnen, während die Banden im Bereich $1160\text{--}940\text{ cm}^{-1}$ durch CO- und CC-Streckschwingungen hervorgerufen werden.^[141,148]

Bei Zugabe von Eu(III) sind vor allem Änderungen im Bereich der Amid I- und der Carboxyl-Bande zu erkennen (siehe rechte Abb. 6.12). Die Differenzspektren zwischen dem Komplex und dem reinen Liganden zeigen eine intensive Schwingungsbande bei 1624 cm^{-1} , die sowohl auf Schwingungen der Amid- als auch der Carboxyl-Gruppe zurückzuführen sein könnte. Unter Einbezug der theoretischen Studien ist jedoch eine Komplexbeteiligung der deprotonierten Säuregruppe wahrscheinlicher. Unterstützt wird diese These durch die symmetrische Schwingungsbande $\nu_s(\text{COO}^-)$ bei 1411 cm^{-1} , die ebenfalls auf eine Komplexbildung des Eu(III) über die Carboxylgruppe hindeutet.

Mit Hilfe der antisymmetrischen und symmetrischen Streckschwingung der Carboxylgruppe kann die Koordinationsgeometrie (monodentat, bidentat oder überbrückend) dieser funktionellen Gruppe bestimmt werden. Dafür werden die Differenzen $\Delta\nu(\text{COO}^-)$ zwischen den Wellenzahlen von $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ und $\nu_s(\text{COO}^-)$ im reinen Liganden und im Komplex berechnet. Dabei können drei Geometrien unterschieden werden:^[149]

- monodentat $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Komplex}} \gg \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Ligand}}$
- bidentat $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Komplex}} \ll \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Ligand}}$
- verbrückend (*bridging*) $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Komplex}} \leq \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Ligand}}$

Für die NANA ergeben sich die Differenzen $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Ligand}} = 167\text{ cm}^{-1}$ und $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Komplex}} = 228\text{ cm}^{-1}$, sodass Eu(III) monodentat zur Carboxylgruppe gebunden wird. Dies wurde bereits in der theoretischen Studie beschrieben, da die OH-Gruppe der Carboxylfunktion aufgrund der zu großen Entfernung nicht mit dem Metallion wechselwirken kann. Auch in der Literatur wird die Komplexbildung von α -Hydroxycarbonsäuren und Ln-Ionen nur über ein Sauerstoff-Atom der Carboxylgruppe beschrieben.^[150,151]

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Tabelle 6.4: Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit NANA bei pH 2–6.^[141,148,149,152]

Abs. ^a		Diff. ^b		Zuordnung ^c	Ligand/Komplex ^d
cm ⁻¹	pH	cm ⁻¹	pH		
1735 (m)	2	1738 (-)	3	$\nu(\text{HOC}=\text{O})$	Ligand
1627 (m)	2	1624 (+)	3–6	Amid I ($\nu(\text{C}=\text{O})$) $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ $\delta(\text{H}_2\text{O})$	Komplex
1580 (s)	3–6	1589 (-)	3–6	Amid II ($\delta(\text{C-NH})$) $\nu_{as}(\text{COO}^-)$	Ligand
1565 (s)	2			Amid II ($\delta(\text{C-NH})$)	
		1548 (+)	3–5	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	Komplex
		1453 (+)	3–5	$\delta(\text{COH})$ $\delta(\text{CCH})$	Komplex
1413 (*)	3–6	1411 (+)	3–6	$\nu_s(\text{COO}^-)$	Komplex
		1396 (+)	3–6	$\nu_s(\text{COO}^-)$	Komplex
1379 (m)	2–6			$\delta(\text{COH})$ $\delta(\text{CCH})$	
1324 (w)	2–6			$\delta(\text{CCH})$ $\delta(\text{COH})$	
1156 (m)	2–6	1164 (+)	3–6	$\nu_{as}(\text{COC})$	Komplex
		1153 (-)			Ligand
1128 (m)	2–6			$\nu(\text{C}=\text{O})$ $\nu(\text{COC})$	
1073 (w)	2–6	1098 (+)	3–6	$\nu(\text{CO})$ $\nu(\text{CCC})$	Komplex
1036 (s)	2–6	1035 (-)	3–6	$\nu(\text{CO})$ $\delta(\text{CCO})$ $\delta(\text{CC})$	Ligand

^aAbsorptionsspektrum des Liganden (NANA): s = stark, m = mittel, w = schwach, * = Schulter

^bDifferenzspektrum: + = positive Bande (Komplex), - = negative Bande (Ligand)

^c ν = Streckschwingung, $\nu_{s,as}$ = symmetrische/asymmetrische Streckschwingung, δ = Deformationsschwingung

^dAngaben beziehen sich auf Differenzspektrum

Im Bereich zwischen 1160 und 1035 cm⁻¹, der zuvor den CO- und CC-Schwingungen zugeordnet wurde, ist eine Verschiebung der Streckschwingung $\nu(\text{CO})$ von 1035 cm⁻¹ zu 1098 cm⁻¹ zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Wechselwirkungen zwischen Eu(III) und OH-Gruppen des Zuckers sein, was bereits in den theoretischen Berechnungen vermutet wurde.

Bei pH 6 ist ein überraschendes Auftauchen der Banden bei 1510 und 1396 cm⁻¹ zu beobachten, die keinen funktionellen Gruppen der NANA zugeordnet werden können. Die theoretische Bindungsstudie sagt zwar eine Veränderung des IR-Spektrums voraus, diese

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

bezieht sich jedoch auf die Protonierung der Zuckerstruktur. Da die NANA aufgrund ihres niedrigen pKs-Wertes von 2,6^[136] bereits ab pH 3 größtenteils deprotoniert vorliegt, sollten die IR-Spektren nahezu unverändert bleiben. In Abbildung 6.13 sind die pH-abhängigen Absorptionsspektren des Eu-NANA-Komplexes zusammengefasst.

Aufgrund der stark verbreiterten Banden sind diese nicht mit dem berechneten IR-Spektrum vergleichbar (siehe Abb. 6.11). Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die Spektren zwischen pH 3 und 5,5 in der Lage und Intensität der Schwingungsbanden übereinstimmen. Lediglich bei pH 6 ist zwischen 1560 und 1500 cm^{-1} die Ausbildung einer schwachen Schulter zu erkennen. Aufgrund der hohen, benötigten Eu-Konzentration von 1 mM wurde während der IR-Messung bereits ab pH 6 die Bildung von Kolloiden beobachtet, sodass höhere pH-Werte nicht untersucht werden konnten. Die gebildeten Kolloide könnten die starken Banden im Differenzspektrum bei 1510 und 1396 cm^{-1} bei pH 6 verursachen. Daraus folgende mögliche strukturelle Veränderungen des Komplexes sind jedoch mit den eingesetzten Methoden nicht erklärbar und müssten weiter untersucht werden.

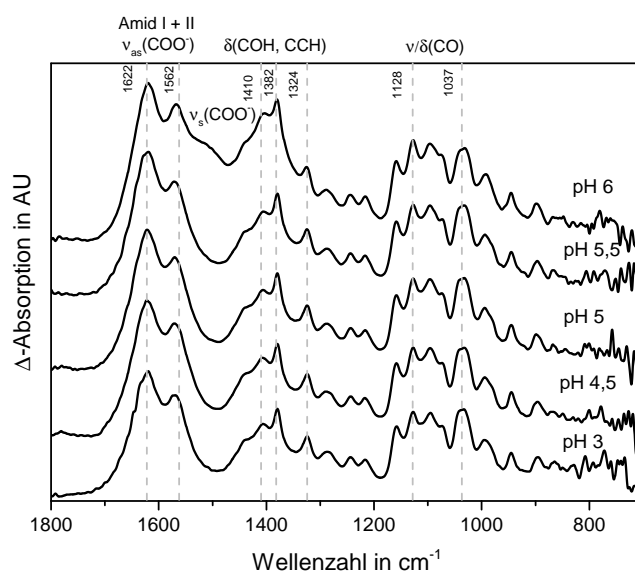


Abbildung 6.13: ATR-FT-IR-Absorptionsspektren des Eu-NANA-Komplexes bei $I=0,1$ und RT an Luft in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Da nur mit Hilfe der ATR-FT-IR-Spektren der NANA mit Eu(III) keine genauen Aussagen zur Struktur des Eu-Zucker-Komplexes möglich sind, wurden das N-Acetylglucosamin (GlcNac) und die Glucuronsäure (GlcA) als strukturähnliche Monosaccharide ebenfalls untersucht (siehe Abb. 6.14). In Abbildung 6.15 sind die IR-Spektren des Zuckeramins GlcNac in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Die Zuordnung der Schwingungsbanden kann Tabelle 6.5 entnommen werden.

N-Acetylglucosamin weist wie die NANA eine sekundäre Aminogruppe auf, besitzt jedoch weder eine Glycerol-Seitenkette noch eine Carboxylgruppe. Die Schwingungsbanden bei 1631 und 1586 cm^{-1} sind somit als Amid I ($\nu(\text{C}=\text{O})$)- und Amid II ($\delta(\text{C}-\text{NH})$)-Banden einzuordnen. Die restlichen Banden werden wie bei NANA vorwiegend durch CCH-, COH-, CO- und CC- Schwingungen hervorgerufen.

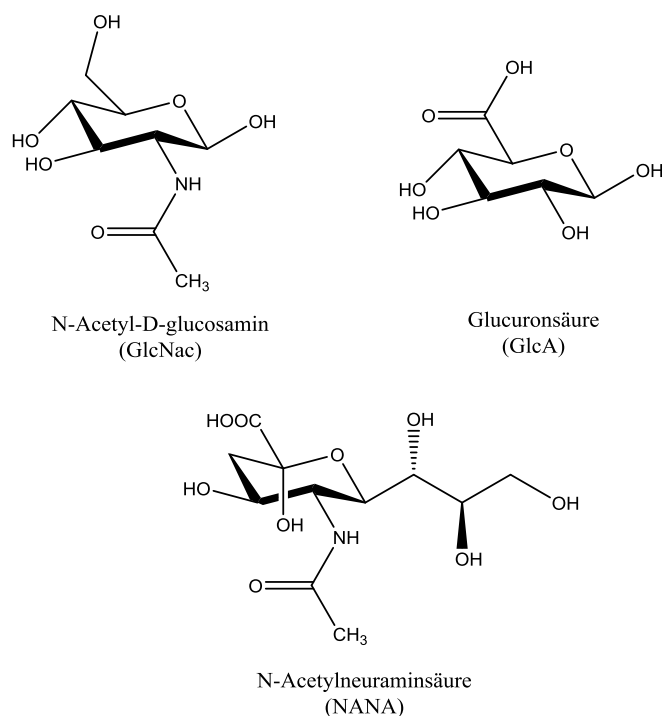


Abbildung 6.14: Strukturen der mit IR untersuchten Zucker.

Alle IR-Spektren sind unabhängig vom pH und der Metallzugabe nahezu identisch in ihrer Form und Intensität der Banden. Die Differenzspektren des Metall-Komplexes und des reinen Liganden zeigen nur eine breite Bande bei 1623 cm^{-1} . Diese könnte auf einen nicht vollständig abgezogenen Wasseranteil zurückzuführen sein, da die Deformationsschwingung des Wassers in dem beschriebenen Bereich auftritt. Demzufolge ist anzunehmen, dass die Aminogruppe keinen Einfluss auf die Bindung des Eu(III) im Eu-NANA-Komplex ausübt. Dies stimmt mit den theoretischen Berechnungen überein, die keine Bindung des Eu(III) über die NH-Gruppe voraussagt.

Zur weiteren Strukturaufklärung des Eu-NANA-Komplexes wurde auch die Glucuronsäure verwendet. Im Gegensatz zur GlcNac besitzt dieses Monosaccharid eine Carboxyl- und keine Aminogruppe. Die gemessenen IR-Spektren sowie die Zuordnung der Schwingungsbanden sind in Abbildung 6.16 und Tabelle 6.6 dargestellt.

Die charakteristische Bande der protonierten Säuregruppe ist im Spektrum bei pH 2 deutlich bei 1732 cm^{-1} zu erkennen. Die zugeordneten Schwingungsbanden des Carbonsäureanions liegen bei pH 4,5 und 6 bei 1590 und 1418 cm^{-1} . Die restlichen Banden werden wie bei den Zuckern NANA und GlcNac durch CCH-, COH-, CO- und CC-Schwingungen hervorgerufen. Die Differenzspektren des Eu-Komplexes und der GlcA zeigen schwach ausgeprägte Banden bei 1622 , 1583 und 1438 cm^{-1} (siehe Abb. 6.16b), wobei die Bande bei 1622 cm^{-1} vermutlich durch die Deformationsschwingung des Wassers hervorgerufen wird. Diese Bande verdeckt somit das negative Signal der antisymmetrischen Streckschwingung $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, die sich von 1590 zu 1573 cm^{-1} im Differenzspektrum verschiebt. Eine Verschiebung der Schwingungsbande ist ebenfalls bei der symmetrischen Streckschwingung $\nu_s(\text{COO}^-)$ zu beobachten.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

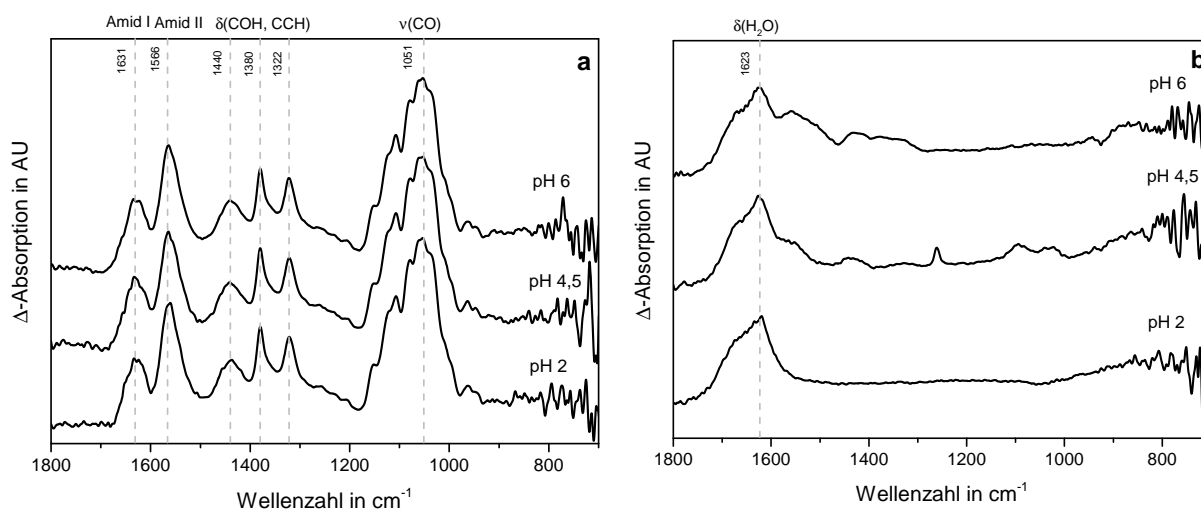


Abbildung 6.15: ATR-FT-IR-Absorptionsspektren von GlcNac (a) und ATR-FT-IR-Differenzspektren (b) von 10 mM GlcNac mit 1 mM Eu(III) bei $I=0,1$ und RT an Luft in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Tabelle 6.5: Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit GlcNac bei pH 2–6.^[148,152]

Abs. ^a cm ⁻¹	pH	Diff. ^b cm ⁻¹	pH	Zuordnung ^c	Ligand/Komplex ^d
1631 (m)	2–6	1623 (+)	2–6	Amid I ($\nu(\text{C}=\text{O})$) $\delta(\text{H}_2\text{O})$	Ligand
1586 (s)	2–6			Amid II ($\delta(\text{C}-\text{NH})$)	
1440 (m)	2–6			$\delta(\text{COH})$ $\delta(\text{CCH})$	
1380 (m)	2–6			$\delta(\text{CCH})$ $\delta(\text{COH})$	
1322 (m)	2–6			$\delta(\text{COH})$ $\delta(\text{OCH})$	
1051 (s)	2–6			$\nu(\text{CO})$ $\nu(\text{CC})$	

^aAbsorptionsspektrum des Liganden (GlcNac): s = stark, m = mittel, w = schwach, * = Schulter

^bDifferenzspektrum: + = positive Bande (Komplex), - = negative Bande (Ligand)

^c ν = Streckschwingung, $\nu_{s,as}$ = symmetrische/asymmetrische Streckschwingung, δ = Deformationsschwingung

^dAngaben beziehen sich auf Differenzspektrum

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

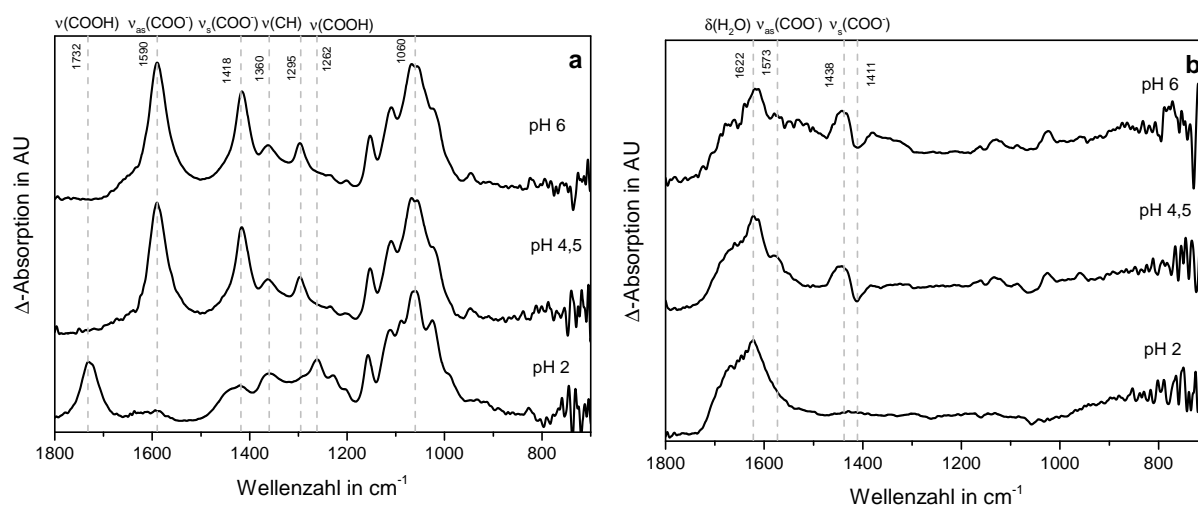


Abbildung 6.16: ATR-FT-IR-Absorptionsspektren von GlcA (a) und ATR-FT-IR-Differenzspektren (b) von 10 mM GlcA mit 1 mM Eu(III) bei $I=0,1$ und RT an Luft in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Tabelle 6.6: Zuordnung der ATR-FT-IR-Banden von Eu(III) mit GlcA bei pH 2–6.^[148,153]

Abs. ^a cm ⁻¹	pH	Diff. ^b cm ⁻¹	pH	Zuordnung ^c	Ligand/Komplex ^d
1732 (m)	2			$\nu(\text{HOC}=\text{O})$	
		1622 (+)	2–6	$\delta(\text{H}_2\text{O})$	
1590 (s)	4–6			$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	
		1573 (+)	4–6	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	Komplex
1418 (w-s)	2–6	1438 (+)	4–6	$\nu_s(\text{COO}^-)$	Komplex
		1411 (-)	4–6	$\nu_s(\text{COO}^-)$	Ligand
1360 (w)	2–6			$\delta(\text{CCH})$	
				$\delta(\text{COH})$	
1295 (w)	4–6			$\delta(\text{COH})$	
				$\delta(\text{OCH})$	
1262 (w)	2			$\nu(\text{HOC-O})$	
1060 (s)	2–6			$\nu(\text{CO})$	
				$\nu(\text{CC})$	

^aAbsorptionsspektrum des Liganden (GlcA): s = stark, m = mittel, w = schwach, * = Schulter

^bDifferenzspektrum: + = positive Bande (Komplex), - = negative Bande (Ligand)

^c ν = Streckschwingung, $\nu_{s,as}$ = symmetrische/asymmetrische Streckschwingung, δ = Deformationsschwingung

^dAngaben beziehen sich auf Differenzspektrum

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

Das Negativsignal des Liganden kann bei 1411 cm^{-1} lokalisiert werden während sich die Bande des Komplexes zu 1438 cm^{-1} verschiebt. Die Berechnung der Differenzen $\Delta\nu(\text{COO}^-)$ lässt auf eine bidentate Komplexierung über die Carboxylgruppe schließen ($\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Ligand}} = 172\text{ cm}^{-1}$, $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Komplex}} = 135\text{ cm}^{-1}$). Da die Bande der antisymmetrischen Streck-schwingung $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ sich jedoch mit der Deformationsschwingung des Wassers überlagert, kann die genaue Lage der $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ -Bande nur vermutet werden. Es ist daher anzunehmen, dass die berechneten $\Delta\nu(\text{COO}^-)$ und die daraus folgende Koordinationsgeometrie fehlerbehaftet sind.

Da die Banden nur schwach ausgeprägt sind, deutet dies auf geringe Wechselwirkungen zwischen Eu(III) und der Säuregruppe der Glucuronsäure hin. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Komplexierung des Eu(III) im NANA-Komplex nicht nur über die Carboxyl-Gruppe erfolgt. Eine Studie von Angyal [122] berichtet zudem über die Ausbildung eines Komplexes zwischen dem β -Anomer der NANA und Ca(II). Postuliert wurde dabei die Bindung des Metallions über die Carboxylgruppe, dem Ring-Sauerstoff sowie über ein Sauerstoff-Atom der Seitenkette. Die Entfernung der Seitenkette resultierte in einer erniedrigten Komplexstabilität.^[122]

Zusammenfassend bestätigen die IR-Ergebnisse die der theoretischen Studie. Trotz der Überlagerung der Amid- und Carboxyl-Banden ist eine Komplexierung des Eu(III) über ein Sauerstoff-Atom der Carboxylfunktion (monodentat) und OH-Gruppen der NANA als wahrscheinlich anzusehen. Die IR-Spektren der GlcNac zeigen, dass die Bindung des Eu(III) nicht über die Amid-Gruppe erfolgt. Des Weiteren beweist die geringe Komplexstabilität des Eu-GlcA-Komplexes, dass das Metallion im NANA-Komplex nicht nur über die Carboxylgruppe komplexiert wird.

6.2.4 Strukturuntersuchung mittels NMR

Zur weiteren Strukturuntersuchung des Eu-NANA-Komplexes wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Aufgrund der starken Bandenverbreiterung durch Eu(III) wurde Sm(III) als Analogon verwendet. Für die Messungen bei pH 4,5 und 6,9 wurde ein äquimolares Metall:Ligand-Verhältnis und ein D₂O-Anteil von 10 % gewählt. Die Zuordnung der C-Atome der NANA ist in Abbildung 6.9, die aufgenommenen ¹H- und ¹³C-Spektren bei pH 4,5 und 6,9 sind in den Abbildungen 6.18 bis 6.21 dargestellt. Die zugehörigen chemischen Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Signale sind in den Tabellen 6.7 und 6.8 zusammengefasst.

Tabelle 6.7: Chemische Verschiebung δ (in ppm) und Differenzen $\Delta\delta$ der ¹H-Kerne von NANA mit Sm(III). (1a) NANA bei pH 4,5 (1b) NANA + Sm(III) bei pH 4,5 und (2a) NANA bei pH 6,9.

		HN	H3a	H3b	H4	H5	H6	H7	H8	H9a	H9b	H11
1a	δ	7,92	2,07	1,68	3,87	3,77	3,82	3,37	3,61	3,70	3,45	1,90
1b	δ	7,78	2,46	2,39	3,77	3,48	2,99	3,25	3,73	2,99	2,88	1,83
	$\Delta\delta$	0,14	0,39	0,71	0,10	0,29	0,83	0,12	0,12	0,71	0,57	0,07
2b	δ	7,91	2,06	1,68	3,88	3,77	3,82	3,36	3,62	3,70	3,48	1,90

Tabelle 6.8: Chemische Verschiebung δ (in ppm) und Differenzen $\Delta\delta$ der ¹³C-Kerne von NANA mit Sm(III). (1a) NANA bei pH 4,5 (1b) NANA + Sm(III) bei pH 4,5 und (2a) NANA bei pH 6,9.

		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
1a	δ	176,5	96,4	39,4	67,4	52,4	70,2	68,4	70,5	63,1	174,6	22,1
1b	δ	179,6	99,1	39,2	66,2	51,3	69,9	67,4	72,5	60,5	174,6	22,0
	$\Delta\delta$	3,1	2,7	0,2	1,2	1,1	0,3	1,0	2,0	2,6	0,0	0,1
2b	δ	179,3	99,0	42,1	70,0	55,0	72,8	71,3	73,0	66,0	177,4	24,8

In den ¹H-Spektren bei pH 4,5 ist eine geringe Verschiebung des NH-Signals von 7,92 zu 7,78 ppm mit Zugabe des Metallions festzustellen. Da sowohl nach den theoretischen Berechnungen als auch nach den ATR-FT-IR-Untersuchungen Wechselwirkungen mit der Acetoamid-Gruppe auszuschließen sind, ist zu vermuten, dass die Verschiebung auf Interaktionen mit Wassermolekülen zurückzuführen ist. Bindungsstudien von NANA mit zweiwertigen Metallionen bestätigen dies aufgrund vicinaler Abstoßungskräfte zwischen der Glycerol-Seitenkette und der Acetylgruppe.^[132,146]

Neben der Acetoamid-Gruppe sind in den ¹H-Spektren generell zwei Regionen erkennbar. Die H3-Protonen des Methylenrests sowie die der Methylgruppe (H11) sind im Bereich zwischen 1,4–2,2 ppm vorzufinden, die restlichen Protonen des Zuckers liegen zwischen 3,2–3,9 ppm. Die Protonen H11 sowie H4 und H5 des Pyranose-Rings zeigen nur eine schwache chemische Verschiebung in den unteren ppm-Bereich. Auch die Protonen der Glycerol-Seitenkette H7 und H8 weisen nur eine minimale Verschiebung auf. Beim Vergleich der

NMR-Daten mit der berechneten, depotonierten Struktur (siehe Abb. 6.10) ist festzustellen, dass vor allem die Acetoamid-Gruppe mit ihrem Methylrest in größerer Entfernung zu der Wechselwirkungsebene mit Sm(III) liegt. Auch die geringen Verschiebungen der Protonen H4, H7 und H8 sind durch ihre räumliche Abschirmung zu erklären.

Die Protonen H9a und H9b der Seitenkette sind im Spektrum mit Sm(III) hingegen stark in den unteren ppm-Bereich verschoben, was auf eine starke Wechselwirkung mit der Glycerol-Kette schließen lässt. Die Beteiligung der Glycerol-Seitenkette wurde bereits bei Untersuchungen der NANA mit Alkali- und Erdalkalimetallionen postuliert.^[154] Diese Vermutung wird ebenfalls durch die theoretische Studie bestätigt.

Ebenso starke chemische Verschiebungen sind bei den Protonen H3a, H3b und H6 des Pyranose-Rings zu beobachten. Jedoch weist das Proton H3b eine größere Verschiebung auf als H3a. Ursache hierfür könnte eine äquatoriale Raumrichtung des H3a-Protons sein, sodass es durch die negativ dissoziierte Carboxylgruppe abgeschirmt werden kann, während das Proton H3b räumlich axial ausgerichtet und ungeschützt ist.^[132] Die optimierte Struktur der NANA mit Eu(III) zeigt die beschriebene Ausrichtung der H3-Protonen.

Auffällig sind zudem die breiten Banden im Protonenspektrum des Sm-Komplexes. Die Verschiebungen könnten nicht nur auf Wechselwirkungen mit dem Metallion zurückzuführen sein sondern ebenso auf eine Konformationsänderung des Zuckers.

Bei Anstieg des pH-Wertes auf 6,9 ist im ¹H-Spektrum des reinen Liganden keine Veränderungen festzustellen. Mit Zugabe von Sm(III) kann eine starke Bandenverbreiterung im ¹H-NMR-Spektrum beobachtet werden, sodass eine Zuordnung der Protonen nicht möglich ist. Die Bandenverbreiterung könnte auf eine unspezifische Reaktion zwischen Sm(III) und dem Liganden bei höheren pH-Werten hinweisen wie zum Beispiel die Bildung von Kolloiden, was bereits anhand der IR-Ergebnisse bei pH 6 vermutet wurde. Das Metallion würde demzufolge nicht oder nur für geringe Wechselwirkungen mit dem Zucker zur Verfügung stehen.

Beim Vergleich der ¹³C-Spektren des freien Liganden und des Komplexes zeigen die Atome C1, C2, C8 und C9 die größten Differenzen der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ auf. Dies weist sowohl auf eine Komplexierung des Sm(III) über den Carboxylrest und der benachbarten OH-Gruppe als auch über die terminalen OH-Gruppen der Seitenkette hin. Diese Bindungsseiten werden ebenfalls in zwei NMR-Bindungsstudien von Illi et al. [146] und Marco et al. [155] mit NANA und Pd(II) bzw. Al(III) als Metallion angenommen. Die theoretische Studie stimmt größtenteils mit diesen Ergebnissen überein. Die Wechselwirkung des Metallions über die Sauerstoffe der C8- und C9-Atome sowie über die Carboxylgruppe wird sowohl in der Theorie als auch durch die ¹³C-Spektren postuliert. Die starke Verschiebung des C2-Atoms könnte aus der Komplexierung mit der Carboxylgruppe resultieren. Eine weitere Erklärung wäre die parallele Anwesenheit mehrerer, verschiedener Komplexstrukturen, in denen das Metallion über den Carboxylrest und die benachbarte OH-Gruppe gebunden wird. Da sich bei Zuckern in Lösung ein Gleichgewicht zwischen den Isomeren einstellt, könnte neben dem β -Anomer auch die minore α -Form der NANA vorliegen. Auch in der Literatur wird abhängig von der Konzentration die Ausbildung verschiedener Spezies beschrieben.^[146]

Saladini et al. [132] postulieren eine Komplexierung von zweiwertigen Metallionen über die Carboxylgruppe, das Sauerstoff-Atom des Pyranose-Rings und die alkoholischen Hydroxy-Gruppen der Glycerol-Kette. Des Weiteren wird im pH-Bereich 2–7 die Ausbildung

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

der Spezies $[M(\text{NANA})_2]$ und oberhalb pH 7 der Komplex $[M(\text{NANA})_2\text{OH}]^-$ suggeriert. Basierend auf den Bindungsstudien dieser Arbeit mit dreiwertigen Metallionen wird für den Eu/Cm-NANA-Komplex hingegen eine 1:1-Stöchiometrie angenommen. Anhand der theoretischen Studie, den IR- und NMR- Ergebnissen wird für dreiwertige f-Elemente zudem eine Bindung der Metallionen über die terminalen OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette sowie über ein Sauerstoff-Atom der Carboxylgruppe vermutet (siehe Abb. 6.17). Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass mehrere Komplexstrukturen in Lösung nebeneinander vorliegen. Ab pH 6 wird zudem ein starker Einfluss der Hydroxid-Ionen beobachtet, der die Komplexbildung zwischen Eu(III)/Cm(III) und NANA stark zurückdrängt.

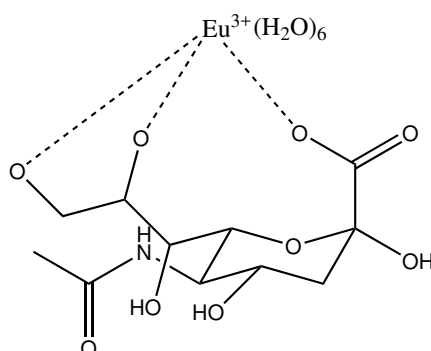


Abbildung 6.17: Vorgeschlagene Struktur des Eu-NANA-Komplexes.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

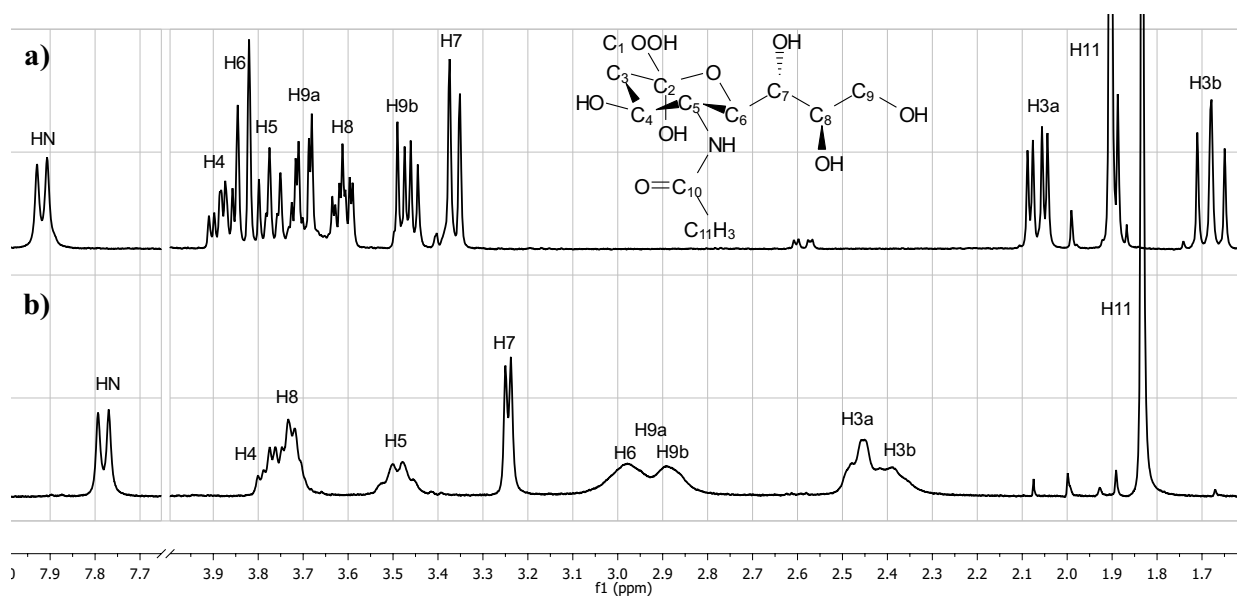


Abbildung 6.18: $^1\text{D}^1\text{H-NMR}$ -Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10 % D_2O bei pH 4,5. (a) 40 mM NANA (b) 40 mM NANA mit Sm (III) im Verhältnis 1:1.

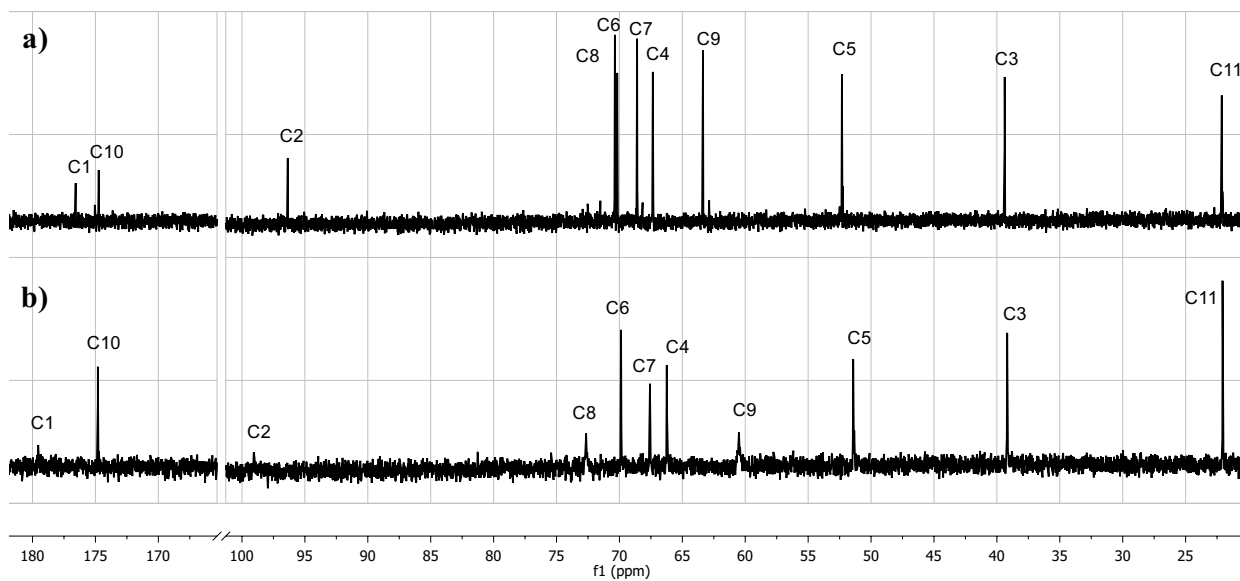


Abbildung 6.19: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10 % D_2O bei pH 4,5. (a) 40 mM NANA (b) 40 mM NANA mit Sm (III) im Verhältnis 1:1.

6 Komplexbildung von Eu(III) und Cm(III) mit N-Acetylneuraminsäure

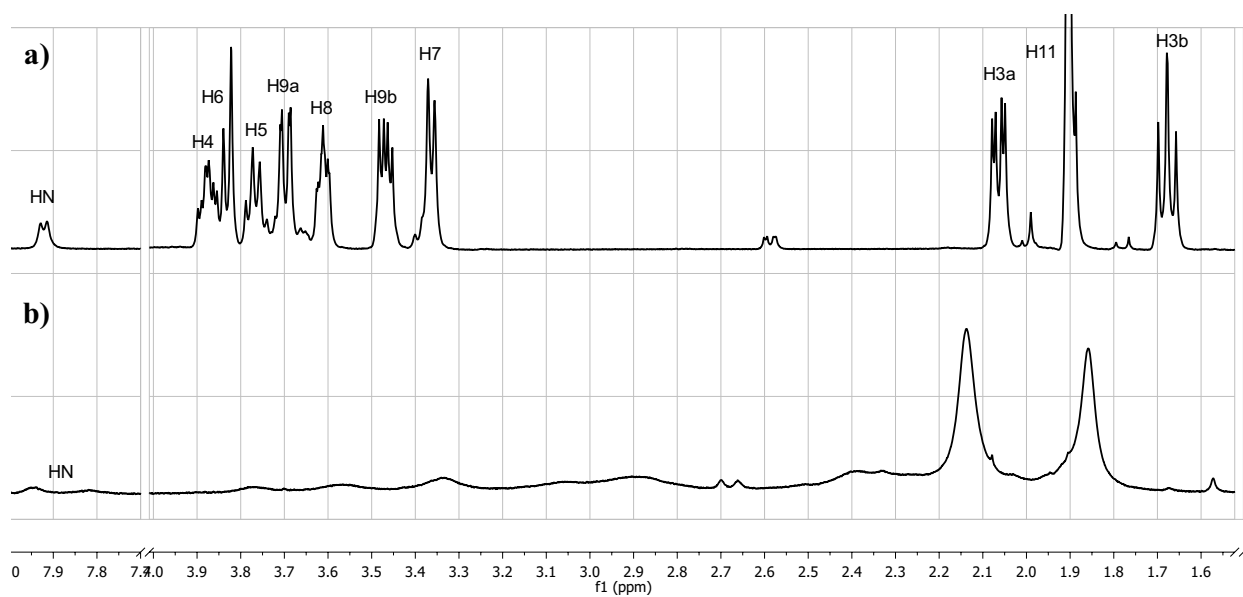


Abbildung 6.20: $^1\text{D}^1\text{H}$ -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10 % D_2O bei pH 6,9. (a) 40 mM NANA (b) 40 mM NANA mit Sm (III) im Verhältnis 1:1.

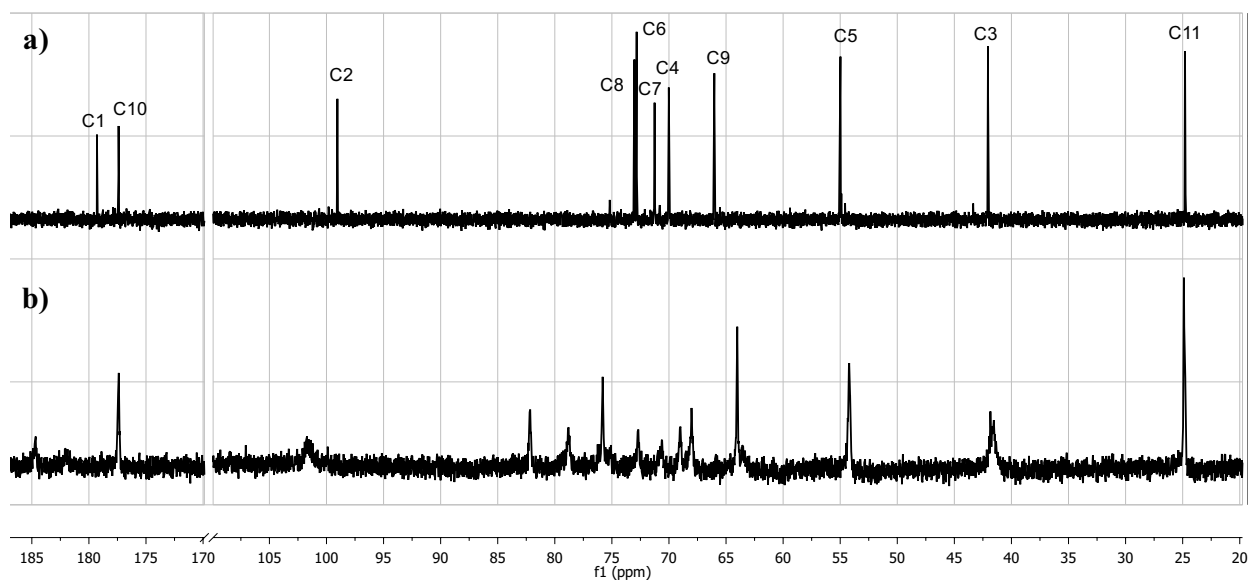


Abbildung 6.21: ^{13}C -NMR-Spektren bei 400 MHz von NANA mit 10 % D_2O bei pH 6,9. (a) 40 mM NANA (b) 40 mM NANA mit Sm (III) im Verhältnis 1:1.

6.3 Bedeutung der Komplexierung von NANA mit f-Elementen

Die N-Acetylneuraminsäure ist ein wichtiger Bestandteil von Glykoproteinen und ragt als terminaler Zucker der Carbohydrat-Ketten in das Darmlumen hinein. Bindungen von Metallionen mit dem Glykoprotein Mucin sollen über diesen Zucker initiiert werden. Die NANA begünstigt somit die Extraktion von Metallionen aus dem Lumen in die Mukus-Schicht.^[128] Zwar wurde anhand der Bindungsstudien nur eine schwach ausgeprägte Komplexierung zwischen Eu(III)/Cm(III) und NANA im interessanten, physiologischen pH-Bereich Bereich des Darms (pH = 7–8) beobachtet, jedoch sind Speziationen auch stark konzentrationsabhängig. Da das Mucin ein hohes Molekulargewicht aufweist,^[99] kann eine hohe Konzentration von terminalen Sialinsäure-Resten angenommen werden, die einen Mischkomplex $[M(NANA)_2OH]^-$ aus NANA und Hydroxid-Ionen mit den Metallionen ausbilden könnten wie von Saladini et al. [132] angenommen. Im Mucin sind zudem neben der NANA weitere funktionelle Gruppen, wie zum Beispiel Sulfat-Reste,^[111] als Koordinationsstellen für dreiwertige f-Elemente vorhanden. Dies wird anhand der unterschiedlichen Lumineszenzspektren und Lebensdauern des Proteins und des Zuckers deutlich (siehe Abb. 5.15).

Des Weiteren lassen die Bindungsstudien eine Konformationsänderung von NANA durch die Komplexierung mit den dreiwertigen f-Elementen vermuten. Dies könnte strukturelle Veränderungen der Oligosaccharid-Ketten des Mucins und somit eine Veränderung der rheologischen und viskoelastischen Eigenschaften des Glykoproteins hervorrufen. Die negative Ladung des Mucins entsteht durch die mit NANA und/oder Sulfat-Resten substituierten Carbohydrat-Ketten, was sich auf die Polarität und Azidität des Proteins auswirkt. Eine strukturelle Veränderung der Oligosaccharid-Ketten ist somit mit einer Vielzahl an pathologischen Erscheinungsbildern verknüpft wie zum Beispiel Atemwegserkrankungen.^[156]

Die CD-Spektren des Mucins (siehe Kapitel 5.4) zeigen jedoch keine Strukturänderung des Proteins bei Zugabe von Eu(III). Eine Änderung der Proteineigenschaften wurde allerdings nicht untersucht und kann nicht ausgeschlossen werden. Zudem weisen kommerziell erhältliche Mucine die wichtige, schützende Geleigenschaft der natürlichen Proteine nicht auf.^[99]

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Lanthanide und Actinide stellen ein Risiko für die Gesundheit des Menschen dar. Sie können über verschiedene Expositionswege in die Umwelt gelangen und vom Menschen aufgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die chemische Speziation von dreiwertigen Lanthaniden (Eu(III)) und Actiniden (Cm(III)) im menschlichen Gastrointestinaltrakt untersucht. Hierfür wurden synthetische Biofluide (Speichel, Magensaft, Pankreassaft und Galle) nach dem UBM-Protokoll^[85] hergestellt, mit Eu(III)/Cm(III) versetzt und mittels TRLFS analysiert. Die Biofluide wurden zunächst einzeln untersucht und anschließend kombiniert, um den Magen, Dünndarm und das vollständige Verdauungssystem zu simulieren. Die aufgenommenen Lumineszenzspektren der Verdauungssäfte sowie der simulierten Verdauungsphasen wurden im Anschluss mit der linearen Kombinationsanalyse (LCF) analysiert. Das Ziel dieses spektroskopischen Screenings war die Identifizierung wichtiger Bindungspartner mit Eu(III)/Cm(III).

Als dominierende Spezies im Speichel wurde ein quaternärer Komplex aus Eu(III), Phosphat-, Carbonat- und Sulfat-Ionen mit Ca(II) als Gegenion identifiziert (Eu/Carb/Phos/Sulf + (Ca)). Die organischen Liganden haben nur einen geringen Einfluss auf die Komplexierung. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Magensafts (0,9–1,0) wird die chemische Speziation dieses Biofluids vorrangig durch das Aquoion bestimmt. Der Pankreassaft weist hingegen einen pH-Wert zwischen 7 bis 8 auf und enthält die meisten und wichtigsten Verdauungsenzyme.^[38,85] In Folge dessen wird die Speziation vorwiegend durch organische Spezies beeinflusst. 60 % der Speziation werden durch den Eu-Mucin-Komplex bestimmt und etwa ein Drittel von dem anorganischen, ternären Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca). Durch die hohe Carbonatkonzentration weist die Gallenflüssigkeit einen basischen pH-Wert auf, sodass in diesem Biofluid 45 % der chemischen Speziation von Carbonat-Komplexen dominiert werden. Ein weiterer, wichtiger Einflussfaktor ist der Gallenextrakt (55 %). Dies ist jedoch ein komplexes System aus diversen Bestandteilen wie Gallensalzen und -alkoholen, Cholesterin, Schwermetallen und Abbauprodukten.^[51] Aufgrund dessen konnte keine Identifizierung einzelner Bindungspartner erfolgen.

Zur Simulation des Verdauungssystems wurden die einzelnen Biofluide miteinander kombiniert. Der erste Schritt der Verdauung erfolgt im Mund. Anschließend wird die Speichelmischung über die Speiseröhre in den Magen transportiert. Die entstandene Speichel-Magen-Phase weist im Vergleich zum Magensaft einen leicht erhöhten pH-Wert von 1,2–1,7 und in Folge dessen eine veränderte Speziation auf. Der Anteil des Aquoions wird von 95 auf 61 % zurückgedrängt und es erfolgt eine Komplexierung mit dem magenspezifischen Enzym, dem Pepsin. Im Dünndarm findet durch die zwei co-existenten Biofluide (Pankreassaft und Gallenflüssigkeit) ein Großteil der Verdauung statt.^[34] Die dominierende Spezies der

Pankreassaft-Gallen-Phase besteht aus dem Eu-Mucin-Komplex (66 %). Auch der anorganische, ternäre Komplex Eu/Carb/Phos + (Ca) hat einen moderaten Einfluss (20 %) auf die chemische Speziation im Darm. Die Vereinigung aller vier Biofluide für die Simulation des vollständigen Verdauungssystems resultiert in zwei Hauptspezies: dem Mucin und dem anorganischen, ternären Komplex.

Die experimentell mit TRLFS ermittelte Speziation wurde im Anschluss mit thermodynamischen Berechnungen verglichen. Diese Simulationen sind jedoch stark abhängig von den zur Verfügung stehenden Stabilitätskonstanten. Da vor allem für Bio-Makromoleküle thermodynamische Daten fehlen, wird die berechnete Speziation vorwiegend durch anorganische Liganden wie Phosphat oder Carbonat bestimmt. Dies hebt die Bedeutung von experimentellen Bestimmungen von Stabilitätskonstanten und chemischen Speziationen hervor, besonders bei Systemen, die Bio-Makromoleküle oder Mehrkomponenten-Spezies enthalten, da deren thermodynamische Daten meist unvollständig oder nicht bekannt sind.

Die starke Komplexfähigkeit von Mucin gegenüber dreiwertigen f-Elementen könnte die Absorption dieser im menschlichen Körper unterdrücken und deren Exkretion fördern. Mucin ist ein Glykoprotein mit einem hohen Molekulargewicht, welches ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Schleimhaut (Mucus) ist und ein Schutzprotein gegenüber Toxinen, Bakterien oder auch Schwermetallen darstellt.^[47,99]

Aus diesem Grund wurden die Wechselwirkungen des Mucins mit Eu(III)/Cm(III) genauer untersucht. Dafür wurden zunächst Konzentrations- und pH-Reihen des Glykoproteins mit TRLFS aufgenommen. Mit steigender Ligandkonzentration wurde eine erhöhte Komplexierung mit Eu(III)/Cm(III) festgestellt. Dieser Trend kann auch bei der pH-Reihe von niedrigen zu hohen pH-Werten beobachtet werden. Ab pH 6 müssen jedoch Einflüsse von Hydroxid- und Carbonationen auf die chemische Speziation berücksichtigt werden. Zudem konnten zwei Mucin-Spezies identifiziert werden. Zwischen pH 3 bis 5 liegt vor allem die Mucin-Spezies 1 vor. Im neutralen bis basischen Bereich, was dem physiologischen pH im Mund oder Dünndarm entspricht, kommt es zur Ausbildung der Mucin-Spezies 2. Da vorrangig diese Spezies im pH-Bereich 6–8 gebildet wird, scheint die Mucin-Spezies 2 stärker an Eu(III) gebunden zu sein als die Mucin-Spezies 1. Demzufolge weist diese Spezies eine längere Lebensdauer und weniger Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Metallions auf. Die Mucin-Spezies 2 könnte somit die Absorption von dreiwertigen f-Elementen in den Blutkreislauf beeinflussen.

Weitere Untersuchungen mit der CD-Spektroskopie und der ITC ergaben, dass das Protein in einer ungeordneten Konformation vorliegt, welche durch die Zugabe von Eu(III) nicht beeinflusst wird. Zudem handelt es sich bei der Komplexierung zwischen Mucin und Eu(III) um eine endotherme Reaktion.

Da das Glykoprotein eine unspezifische Struktur und eine hohe Anzahl an möglichen Bindungsstellen aufweist, ist die Komplexierung mit Metallionen schwer zu untersuchen. Allerdings besteht Mucin bis zu 80 % aus Carbohydrat-Ketten. Die am häufigsten vorkommenden Zucker in diesen Ketten sind dabei N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, Galaktose, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure (NANA).^[99] Um die genauen Bindungspartner im Protein zu identifizieren, wurden zunächst diese Zucker mit TRLFS studiert. Bei allen Monosacchariden konnte jedoch nur eine schwache Komplexierung mit Eu(III) festgestellt werden. Die am stärksten ausgeprägte Komplexierung mit Eu(III) besitzt dabei der Zucker NANA.

7 Zusammenfassung

Die NANA ist ein wichtiges biologisches Molekül, welches sich an der äußeren Zellmembran oder am terminalen Ende von Glykoproteinen oder -lipiden befindet.^[132] Um die Komplexbildung zwischen NANA und Eu(III)/Cm(III) genauer charakterisieren zu können, wurden Bindungsstudien mit Hilfe der TRLFS, IR, NMR, ITC und theoretischen Studien durchgeführt. Anhand der Lumineszenzspektroskopie konnten Stabilitätskonstanten für Eu(III) ($\log\beta = 3,23 \pm 0,1$) und Cm(III) ($\log\beta = 3,32 \pm 0,1$) bestimmt werden. Wie beim Mucin konnte mit steigenden pH eine verstärkte Komplexbildung zwischen Eu(III)/Cm(III) und der NANA beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem Protein ist die Abschwächung der Lumineszenzintensität durch die Ausbildung schwach lumineszierender Hydroxid-Komplexe stärker ausgeprägt. Des Weiteren konnte ein Einfluss des atmosphärischen CO₂ auf die Komplexbildung von NANA mit Eu(III) festgestellt werden, der bereits ab pH 5 in den Lumineszenzspektren sichtbar ist.

Anhand der ITC-Messung konnten ein exothermer Reaktionsverlauf sowie Enthalpie- und Entropieänderungen ($\Delta H = -460,72 \pm 58 \text{ J/mol}$, $\Delta S = 62 \text{ J/Kmol}$) für die Komplexbildungsreaktion bestimmt werden. Für den ausgebildeten Komplex von NANA mit Eu(III)/Cm(III) sind mehrere Strukturen möglich. Theoretische Berechnungen prognostizieren eine Komplexbildung von Eu(III) über die Carboxylgruppe und die terminalen OH-Gruppen der Glycerol-Seitenkette der NANA. Unter Einbezug der IR-Ergebnisse kann aufgrund der Überlagerung der Amid- und Carboxylbanden eine Beteiligung der Carboxylgruppe an der Komplexbildung nur vermutet werden. Durch den Vergleich mit anderen Zuckern kann jedoch eine Beteiligung der Amid-Gruppe ausgeschlossen werden. In den NMR-Spektren ist eine Verschiebung der C1-, C2-, C8- und C9-Atome zu erkennen, was die Beteiligung der Carboxylgruppe und der Glycerol-Seitenkette an der Komplexbildung bestätigt. Des Weiteren wird ab pH 6 sowohl in den IR- als auch den NMR-Spektren eine Verbreiterung der Banden beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das Metallion Kolloide bildet und die Komplexbildung mit dem Zucker weniger stark ausgeprägt ist.

In dieser Studie wurde erstmalig die chemische Speziation von dreiwertigen Ln und An im menschlichen Verdauungssystem experimentell bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einblicke in das biochemische Verhalten dreiwertiger f-Elemente und können zudem zur Einschätzung von Gesundheitsrisiken nach der Inkorporation von Radionukliden und der Entwicklung von Dekontaminationstherapien beitragen.

7.2 Abstract

Lanthanides and actinides represent a serious risk to the human health. They could be released into the environment by different pathways and could eventually be incorporated into the human digestive system. In the present study, the chemical speciation of trivalent lanthanides (Eu(III)) and actinides (Cm(III)) in the human gastrointestinal tract was investigated for the first time. Artificial digestive juices (saliva, gastric juice, pancreatic juice and bile fluid) were prepared according to the UBM protocol,^[85] spiked with Eu(III) or Cm(III) and analyzed by TRLFS. Each biofluid was first investigated as a single component and subsequently mixed with other biofluids to simulate the stomach, small intestine and the whole digestive system. The acquired luminescence spectra of Eu(III)/Cm(III) were further analyzed by a linear combination fitting (LCF) to identify major binding partners of Eu(III)/Cm(III) in each digestive process.

The speciation of Eu(III) in saliva is primarily dominated by a quaternary species consisting of Eu(III), phosphate, carbonate, sulfate, and Ca(II) as a counter ion (Eu/carb/phos/sulf + (Ca)). Organic ligands have only a minor influence to the speciation of Eu(III). Because of the acidic condition (0.9–1.0), the chemical speciation of Eu(III) in the gastric juice is found to be primarily the aquo ion. On the other hand, the pancreatic juice shows rather a neutral pH range between 7 and 8 and contains the most and most important digestive enzymes.^[38,85] Consequently, the speciation in the pancreatic juice is dominated by organic species. That is, 60 % of the species are forming complexes with mucin, while the ternary inorganic complex of Eu/carb/phos(+Ca) shows a moderate contribution (27 %). Due to the high carbonate concentration, the bile fluid has an alkaline pH value, indicating that 45 % of the speciation in the bile fluid is dominated by carbonate complexes. Another important component in the bile fluid is the bile extract (55 %), which is a complicated system with various compounds such as bile salts and alcohols, cholesterol, metal ions and metabolic products.^[51] As a consequence, it is difficult to identify the chemical species of Eu(III)/Cm(III) with the bile extract.

To simulate the digestive system the single biofluids were combined. After the initial step of digestion in the mouth, the mixture of food and saliva passes through the esophagus and is further transported into the stomach. In order to simulate this first digestive process, single biofluids of saliva and gastric juice were mixed and the speciation in the mixture was investigated. The pH of pure gastric juice is 0.9–1.0, while the pH is slightly increased to 1.2–1.7 when the gastric juice is mixed with saliva. This slight but significant increase in pH surely alters the chemical speciation of Eu(III)/Cm(III). The formation of the pure aquo species is suppressed from 95 to 61 %, whereas a new species with pepsin, the specific digestion enzyme of the stomach, is formed instead. Because of the coexistence of two biofluids (pancreatic juice and bile fluid), the majority of digestion occurs in the small intestine, where the dominant Eu(III) species is the species with mucin (66 %) and the ternary inorganic complex of Eu/carb/phos(+Ca) (20 %). This speciation does not change when combining all the four biofluids to simulate the whole digestive system, where the two major species, one with mucin and the ternary inorganic complex, are identified.

The chemical speciation determined by TRLFS was also compared with thermodynamic calculations. These thermodynamic simulations, however, depend strongly on the availability of stability constants. For instance, the stability constants of Eu(III)/Cm(III) with bio

macromolecules or large organic ligands are mostly not reported thus far. Because of this lack of data, the speciation simulated based on the thermodynamic database is dominated by inorganic ligands, such as phosphate or carbonate. This highlights the importance of experiments to determinate the stability constants and chemical speciation particularly for systems including bio macromolecules and/or multi-component species for which the current thermodynamic database is incomplete and may not be reliable.

The results of this study suggest a strong complexation ability of mucins towards the trivalent f-elements. Mucins are high molecular weight glycoproteins comprising the main components of the human mucosa and prevent toxins, bacteria or heavy metals from the absorption.^[47,99] Taking into account their strong complexation ability, mucins could suppress the absorption of the heavy metal elements in the human body and would potentially facilitate their excretion.

In order to investigate the interaction of Eu(III)/Cm(III) with mucins more in detail, concentration and pH series of the protein were performed with TRLFS. With increasing the mucin concentration, the interaction between Eu(III)/Cm(III) and mucin was found to be enhanced. A similar trend was also observed when increasing pH. When the pH exceeds 6, the chemical speciation is influenced by hydroxide and carbonate species. Based on these TRLFS measurements, two mucin species could be identified. The mucin species 1 exists mainly in the pH range 3–5, while the mucin species 2 is formed under the neutral and alkaline conditions corresponding to the physiological pH in the mouth or the small intestine. Because the mucin species 2 exists primary in the pH range 6–8 these species seems to be more stable than the mucin species 1. Consequently the mucin species 2 has a longer lifetime and less water molecules in the first coordination sphere of the metal ion. Therefore, these species could affect the absorption of trivalent f-elements to the bloodstream.

Additional investigations with CD spectroscopy and ITC reveal that the protein mucin is randomly conformed and is not affected by the addition of Eu(III). The interaction between Eu(III) and mucin is also confirmed to be an endothermic reaction.

Because of the unspecific structure of the glycoprotein with a large number of possible binding sites, it is difficult to study the interaction of mucin with metal ions. However, mucin contains up to 80 % of carbohydrate chains, the most common sugars are N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, galactose, fucose and N-acetylneuraminic acid (NANA).^[99] In order to identify significant binding partners of the protein mucin, the interaction of Eu(III) with these sugars were studied by TRLFS. All the studied monosaccharides showed only a weak interaction with Eu(III). Among them, the strongest interaction was observed for the sugar NANA.

NANA is an important biological molecule, which exists in the outer cell membrane or the terminal end of glycoproteins or -lipids.^[132] In order to characterize the complexation between NANA and Eu(III)/Cm(III), a series of study based on TRLFS, IR, NMR, ITC and theoretical studies were performed. The results from TRLFS provide the stability constants of $\log\beta = 3.23 \pm 0.1$ and 3.32 ± 0.1 for Eu(III)- and Cm(III)-NANA species, respectively. Similarly to the mucin species, the interaction between Eu(III)/Cm(III) and NANA is enhanced with increasing pH. In contrast to the protein the reduction of the luminescence intensity due to the formation of weakly luminescent hydroxide complexes is more pronounced. Furthermore an influence of atmospheric CO₂ to the complexation of NANA and Eu(III) was found, which is already detectable in the luminescence spectra at

pH 5.

The ITC measurements indicate an exothermic reaction process for the interaction with NANA with enthalpy- and entropy changes of $\Delta H = -460.72 \pm 58 \text{ J/mol}$ and $\Delta S = 62 \text{ J/Kmol}$. Theoretical calculations further simulate several possible structures of Eu(III)-NANA complexes, suggesting that the carboxyl group and the terminal OH groups of the glycerol side chain of NANA could be significant coordination sites towards Eu(III). Because of the superimposition of the amide and carboxyl band the IR results could only assume a participation of the carboxyl group on the complexation. However, by comparing different sugars the interaction with the amide group could be excluded. In the NMR spectra shifts of the C1-, C2-, C8- and C9-atoms were observed, which confirms the participation of the carboxyl group and the glycerol side chain in the interaction with Eu(III). Furthermore, the IR as well as the NMR spectra show a band broadening from pH 6. This indicates a colloid formation of the metal ion and a weaker complexation with the sugar.

This study is successful in providing a comprehensive overview of the chemical speciation of trivalent Ln and An in the whole digestive system. The results obtained in this study provide new insights into the biochemical behavior of trivalent f-elements and could help to assess the health risks when these heavy metals are incorporated into the human body as well as to develop possible decontamination measures.

7.3 Publikationsliste

Publikationen

- A. Barkleit, C. Wilke, A. Heller, T. Stumpf, A. Ikeda-Ohno, *Trivalent f-elements in human saliva: A comprehensive speciation study by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and thermodynamic calculations*, Dalton Trans, **2017**, 46, 1593-1605
- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, A. Ikeda-Ohno, *Speciation of the trivalent f-elements Eu(III) and Cm(III) in digestive media*, J Inorg Biochem, **2017**, 175, 248-258

Vorträge

- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, *Spectroscopic investigation of the complexation of trivalent actinides/lanthanides in body fluids*, 10th HZDR PhD Seminar, 02.–04.11.2015, Altenberg, Deutschland
- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, *Spectroscopic screening for the speciation of europium and curium in the gastrointestinal tract*, RANC-International Conference on Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 10.–15.04.2016, Budapest, Ungarn
- C. Wilke, A. Barkleit, A. Ikeda-Ohno, T. Stumpf, *Interaction of Eu(III) and Cm(III) with mucin – a key component of the human mucosa*, Goldschmidt, 26.06.–01.07.2016, Yokohama, Japan
- C. Wilke, A. Barkleit, A. Ikeda-Ohno, T. Stumpf, *Spectroscopic studies on the interaction of europium(III) and curium(III) with components of the human mucosa*, Biometals - 10th International Biometals Symposium, 10.–15.07.2016, Dresden, Deutschland

Poster

- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, *Spectroscopic investigation of the complexation of trivalent actinides/lanthanides in body fluids*, 9th HZDR PhD Seminar, 06.–08.10.2014, Altenberg, Deutschland
- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, *Spectroscopic investigation of the complexation of trivalent actinides/lanthanides in body fluids*, Wilhelm and Else Heraeus Physics School on *Ionizing Radiation and Protection of Man*, 10.–22.08.2014, Bad Honnef, Deutschland
- C. Wilke, A. Barkleit, T. Stumpf, *Spectroscopic investigation of the complexation of trivalent actinides/lanthanides in body fluids*, GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2015 Chemie verbindet, 30.08.–02.09.2015, Dresden, Deutschland – ausgezeichnet mit dem Posterpreis der Fachgruppe Nuklearchemie

Anhang

Tabelle A1: Verwendete Stabilitätskonstanten für die Speziationberechnungen im Verdauungssystem.

Spezies	$\log\beta^0$	Referenz
$\text{Eu}[\text{Amy-COO}]^{2+}$	5,20	Barkleit et al. [87]
$\text{Eu}[\text{Amy}-(\text{COO})_3]$	13,31	Barkleit et al. [87]
EuCit	9,46	Heller et al. [94]
$\text{Eu}(\text{HCit})(\text{Cit})^{2-}$	12,70	Heller et al. [94]
$\text{Eu}(\text{Cit})_2^{3-}$	13,20	Heller et al. [94]
EuHCO_3^{2+}	11,93	Haas et al. [157]
EuCO_3^+	7,95	Haas et al. [157]
$\text{Eu}(\text{CO}_3)_2^-$	12,24	Haas et al. [157]
$\text{EuH}_2\text{PO}_4^{2+}$	22,43	Liu und Byrne [158]
EuHPO_4^+	18,47	Liu und Byrne [158]
EuPO_4	12,20	Lee und Byrne [159]
$\text{Eu}(\text{PO}_4)_2^{3-}$	20,66	Lee und Byrne [159]
EuOH_2^+	-7,90	Haas et al. [157]
$\text{Eu}(\text{OH})_2^+$	-16,38	Haas et al. [157]
$\text{Eu}(\text{OH})_3$	-25,42	Haas et al. [157]
$\text{Eu}(\text{OH})_4^-$	-34,53	Haas et al. [157]
EuCl_2^+	0,28	Haas et al. [157]
EuCl_2^+	-0,50	Haas et al. [157]
EuCl_3	-0,44	Haas et al. [157]
EuSO_4^+	3,66	Haas et al. [157]
$\text{Eu}(\text{SO}_4)_2^-$	5,20	Spahiu und Bruno [160]
EuSCN_2^+	1,10	Khopkar und Narayanankutty [161]
$\text{Eu}(\text{SCN})_2^+$	1,75	Khopkar und Narayanankutty [161]
EuU_3^+	-0,12	Heller et al. [162]
$\text{EuU}(\text{OH})_2^+$	-6,86	Heller et al. [162]

Anhang

Tabelle A2: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen Magensaftliganden pH $1 \pm 0,2$ und RT.

Probe	pH	τ in μs	$n(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
O+BSA ^b	0,88	111 ± 10	9,0	0,5
O+Pepsin	1,06	111 ± 10	9,0	0,5
O+Mucin	1,04	124 ± 10	8,0	0,7
O+BSA/Mucin	0,92	117 ± 10	8,5	0,6
O+BSA/Pepsin	0,96	112 ± 10	9,0	0,5
O+Mucin/Pepsin	0,92	115 ± 10	8,7	0,6
O+BSA/Mucin/Pepsin	0,84	114 ± 10	8,8	0,6
O+Anorganik _{ges} ^c	0,92	111 ± 10	9,1	0,5

^a $\pm 0,5$

^bO=Organik (Harnstoff, Harnsäure)

^cA=NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂ und NaH₂PO₄

Tabelle A3: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Magensaftmischungen bei pH $1 \pm 0,2$ und RT.

Probe	pH	τ in μs	$n(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
OA+BSA ^b	1,03	112 ± 10	8,9	0,5
OA+Pepsin	0,86	112 ± 10	9,0	0,5
OA+Mucin	0,89	115 ± 10	8,7	0,6
OA+BSA/Mucin	0,90	113 ± 10	8,9	0,6
OA+BSA/Pepsin	0,95	110 ± 10	9,1	0,5
OA+Mucin/Pepsin	0,94	113 ± 10	8,8	0,6
OA+BSA/Mucin/Pepsin	0,98	116 ± 10	8,6	0,6

^a $\pm 0,5$

^bOA=Organik (Harnstoff, Harnsäure) und Anorganik (NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂ und NaH₂PO₄)

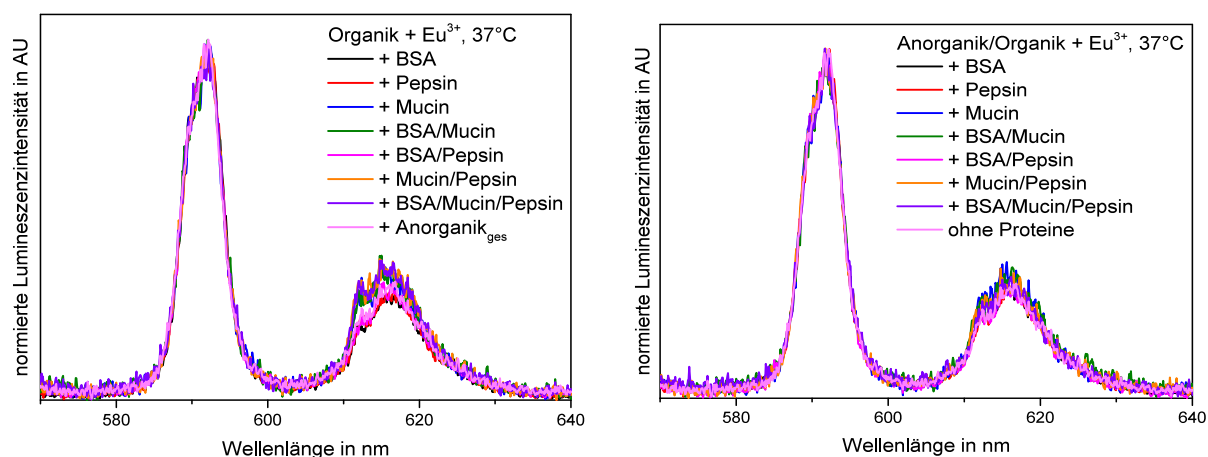


Abbildung A1: Einfluss der Organik und Anorganik auf die Komplexbildung mit Eu(III) im Magensaft bei pH 1 und 37°C

Tabelle A4: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) mit organischen Magensaftliganden pH $1 \pm 0,2$ und 37°C.

Probe	pH	τ in μs	$n(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
O+BSA ^b	0,95	108 ± 10	9,4	0,5
O+Pepsin	0,94	110 ± 10	9,1	0,6
O+Mucin	0,94	108 ± 10	9,4	0,7
O+BSA/Mucin	0,97	112 ± 10	8,9	0,7
O+BSA/Pepsin	1,04	107 ± 10	9,4	0,6
O+Mucin/Pepsin	0,99	112 ± 10	8,9	0,7
O+BSA/Mucin/Pepsin	1,04	108 ± 10	9,1	0,7
O+Anorganik _{ges} ^c	0,89	111 ± 10	9,4	0,6

^a $\pm 0,5$

^bO=Organik (Harnstoff, Harnsäure)

^cA=NaCl, KCl, NH_4Cl , CaCl_2 und NaH_2PO_4

Anhang

Tabelle A5: Lumineszenzlebensdauern von Eu(III) in Magensaftmischungen bei pH 1 ± 0,2 und 37°C.

Probe	pH	τ in μs	$n(\text{H}_2\text{O})^a$	F_2/F_1
OA+BSA ^b	0,93	108 ± 10	9,3	0,6
OA+Pepsin	0,75	109 ± 10	9,2	0,6
OA+Mucin	0,96	113 ± 10	8,8	0,7
OA+BSA/Mucin	0,87	110 ± 10	9,1	0,7
OA+BSA/Pepsin	0,89	111 ± 10	9,0	0,6
OA+Mucin/Pepsin	0,80	110 ± 10	9,1	0,6
OA+BSA/Mucin/Pepsin	0,76	107 ± 10	9,4	0,6

^a± 0,5

^bOA=Organik (Harnstoff, Harnsäure) und Anorganik (NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂ und NaH₂PO₄)

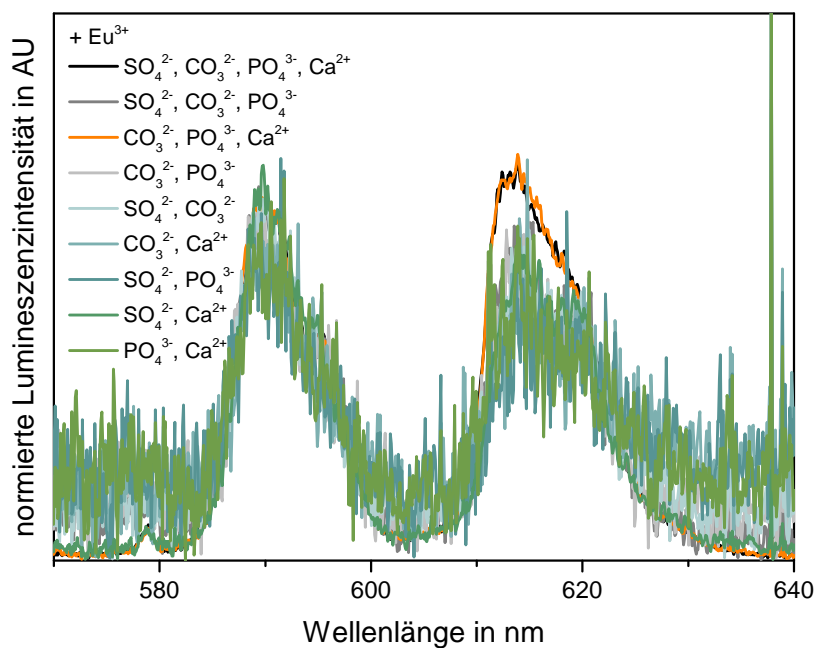


Abbildung A2: Versuchsreihe zur Identifizierung der anorganischen Bindungspartner mit Eu(III) im Speichel bei RT.

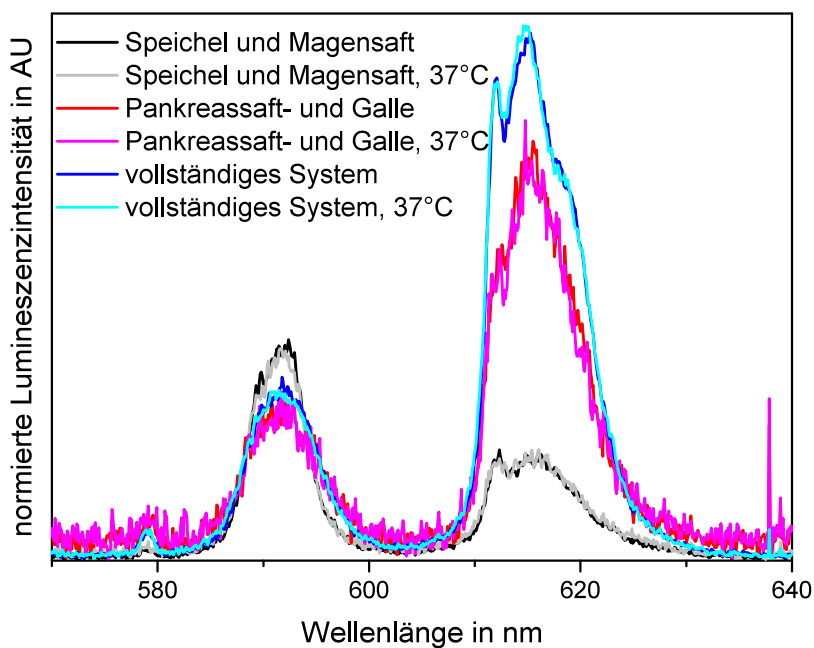


Abbildung A3: Simuliertes Verdauungssystem mit Eu(III) bei Raum- und Körpertemperatur.

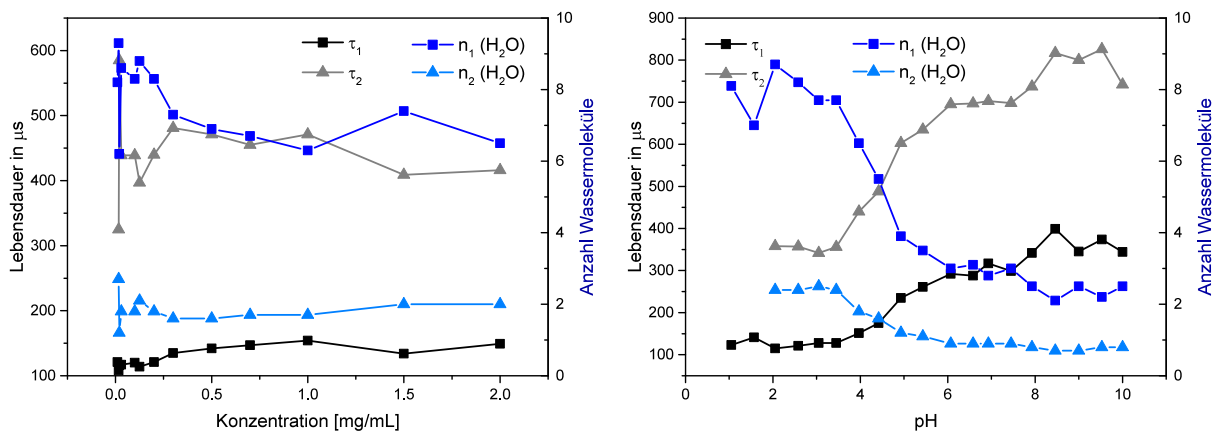


Abbildung A4: Lumineszenzlebensdauern von $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ Eu(III) mit Mucin der Konzentrations- (links) und pH-Reihe (rechts).

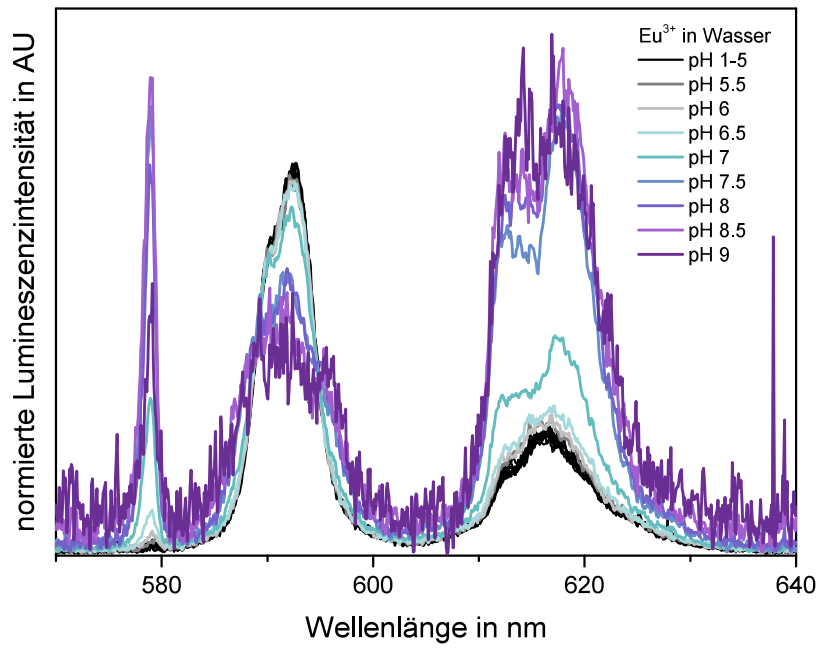


Abbildung A5: Lumineszenzspektren der Eu(III)-Hydrolyse bei RT.

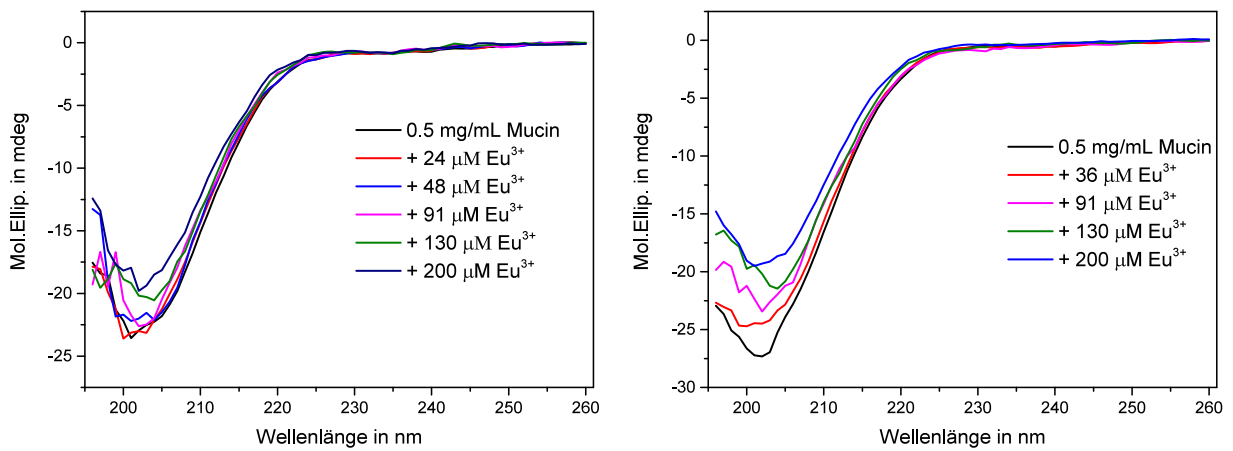


Abbildung A6: Zirkularer Dichroismus von 0,5 mg/mL Mucin bei pH 2,3 (links) und 4,5 (rechts).

Anhang

Tabelle A6: Lumineszenzlebensdauern der Konzentrationsreihe von NANA mit Eu(III) und Cm(III).

Probe	Eu(III)		Cm(III)	
	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$
1:2	120 \pm 10	8,3	72 \pm 5	8,1
1:10	120 \pm 10	8,3	78 \pm 5	7,4
1:20	125 \pm 10	7,9	79 \pm 5	7,3
1:30	125 \pm 10	7,9	82 \pm 5	7,0
1:50	129 \pm 10	7,7	83 \pm 5	6,9
1:80	136 \pm 10	7,2	84 \pm 5	6,9
1:100	140 \pm 10	7,0	87 \pm 5	6,6
1:200	150 \pm 10	6,5	90 \pm 5	6,4
1:300	154 \pm 10	6,3	93 \pm 5	6,1
1:500	159 \pm 10	6,1	96 \pm 5	5,9
1:1000	174 \pm 10	5,5	102 \pm 5	5,5

^a \pm 0,5

Tabelle A7: Lumineszenzlebensdauern der pH-Reihe von NANA mit Eu(III) und Cm(III).

Probe	Eu(III)		Cm(III)	
	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$	τ_1 in μs	$n_1(\text{H}_2\text{O})^a$
pH 2	119 \pm 10	8,3	78 \pm 5	7,4
pH 3,5	137 \pm 10	7,2	85 \pm 5	6,8
pH 4	137 \pm 10	7,2	83 \pm 5	7,0
pH 4,5	139 \pm 10	7,1	82 \pm 5	7,1
pH 5	143 \pm 10	6,9	83 \pm 5	7,0
pH 6	146 \pm 10	6,7	84 \pm 5	6,9
pH 6,5	149 \pm 10	6,6	85 \pm 5	6,8
pH 7	158 \pm 10	6,2	93 \pm 5	6,1
pH 7,5	154 \pm 10	6,3		
pH 8	162 \pm 10	6,0		
pH 8,5	160 \pm 10	6,1		
pH 9	173 \pm 10	5,6		

^a \pm 0,5

Literatur

- [1] DAtF, Endlagerung hochradioaktiver Abfälle, Deutsches Atomforum e.V., **2015**.
- [2] DAtF, Stilllegung und Rückbau, Zugriff am 17.11.2016, **2014**, <http://www.kernenergie.de/kernenergie/themen/entsorgung/stilllegung--rueckbau.php>.
- [3] H. Geckeis, A. Türler, Kernenergie: ein Auslaufmodell?, (Hrsg.: GDCh), Zugriff am 17.11.2016, **2010**, <http://archiv.aktuelle-wochenschau.de/2010/w20/w20.html>.
- [4] K. T. Rim, K. H. Koo, J. S. Park, *Saf Health Work* **2013**, *4*, 12–26.
- [5] BfS, Radionuklide in Lebensmitteln, **2016**, <http://www.bfs.de/DE/themen/ion/umwelt/lebensmittel/einfuehrung/einfuehrung.html>.
- [6] EPA, Rare Earth Elements: A Review of Production, Processing, Recycling, and Associated Environmental Issues, United States Environmental Protection Agency, **2012**.
- [7] P. Apostoli, *Fresenius J Anal Chem* **1999**, *363*, 499–504.
- [8] E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. D. Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, V. Moulin, *Biochimie* **2006**, *88*, Facets of Environmental Nuclear Toxicology, 1605–1618.
- [9] L. Webb, D. Taylor, D. Williams, *Radiat Prot Dosim* **1998**, *79*, 219–222.
- [10] L. Webb, D. Taylor, D. Williams, *J Alloys Compd* **1998**, *271*, 112–115.
- [11] N. M. Edelstein, J. Fuger, J. J. Katz, L. R. Morss in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, (Hrsg.: L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger), Springer Netherlands, Dordrecht, **2011**, S. 1753–1835.
- [12] S. Cotton, *Lanthanide and Actinide Chemistry*, John Wiley & Sons, **2006**.
- [13] R. Leggett, E. Ansoborlo, M. Bailey, D. Gregoratto, F. Paquet, D. Taylor, *Int J Radiat Biol* **2014**, *90*, 996–1010.
- [14] A. Holleman, N. Wiberg, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 102. Aufl., de Gruyter, **2008**.
- [15] C. Keller, *Grundlagen der Radiochemie*, 3. Auflage, Otto Salle Verlag GmbH & Co, Frankfurt am Main, **1993**.
- [16] G. T. Seaborg, *Radiochim Acta* **1993**, *61*, 115–122.
- [17] F. S. Richardson, *Chem Rev* **1982**, *82*, 541–552.
- [18] A. G. Davies, D. Phillips, J. D. Woollins, C. J. Jones, *d- and f-Block Chemistry*, (Hrsg.: E. W. Abel), The Royal Society of Chemistry, **2001**, S. X001–X004.

- [19] R. J. Silva, H. Nitsche, *Radiochim Acta* **1995**, 70-71, 377–396.
- [20] G. R. Choppin, M. P. Jensen in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, (Hrsg.: L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger), Springer Netherlands, Dordrecht, **2006**, S. 2524–2621.
- [21] J. R. Duffield, D. M. Taylor, D. R. Williams in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Bd. 18, Elsevier Science, **1994**, Kap. 129, S. 591–621.
- [22] F. Ménétrier, D. Taylor, A. Comte, *Appl Radiat Isot* **2008**, 66, 632–647.
- [23] R. J. Abergel, P. W. Durbin, B. Kullgren, S. N. Ebbe, J. Xu, P. Y. Chang, D. I. Bunin, E. A. Blakely, K. A. Bjornstad, C. J. Rosen, D. K. Shuh, K. N. Raymond, *Health phys* **2010**, 99, 401–407.
- [24] E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, V. Moulin, F. Taran, T. Bailly, R. Burgada, M.-H. Henge-Napoli, A. Jeanson, C. D. Auwer, L. Bonin, P. Moisy, *C R Chim* **2007**, 10, 1010–1019.
- [25] N. Bauer, D. R. Fröhlich, P. J. Panak, *Dalton Trans* **2014**, 43, 6689–6700.
- [26] A. Heller, A. Barkleit, G. Bernhard, *Chem Res Toxicol* **2011**, 24, 193–203.
- [27] P. W. Durbin in *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*, (Hrsg.: L. R. Morss, N. M. Edelstein, J. Fuger), Springer Netherlands, Dordrecht, **2011**, S. 3339–3440.
- [28] J. D. Harrison, *Sci Total Environ* **1991**, 100, 43–60.
- [29] D. M. Taylor, R. W. Leggett, *Radiat Prot Dosim* **2003**, 105, 193–198.
- [30] M. Ali, A. Kumar, M. Kumar, B. N. Pandey, *Biochimie* **2016**, 123, 117–129.
- [31] N. Bauer, P. J. Panak, *New J Chem* **2015**, 39, 1375–1381.
- [32] A. Kumar, M. Ali, R. S. Ningthoujam, P. Gaikwad, M. Kumar, B. B. Nath, B. N. Pandey, *J Hazard Mater* **2016**, 307, 281–293.
- [33] D. M. Taylor, *Sci Total Environ* **1989**, 83, 217–225.
- [34] A. C. Guyton, J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Saunders, **2006**.
- [35] E. J. Speckmann, J. Hescheler, R. Köhling, *Physiologie*, 6. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, **2013**.
- [36] A. Schek, *Ernährungslehre kompakt*, 5. Auflage, Umschau Zeitschriftenverlag GmbH, **2011**.
- [37] M. Stolte, J. Rüschoff, G. Klöppel, *Pathologie - Verdauungstrakt und Peritoneum*, Springer-Heidelberg, **2013**.
- [38] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, *Duale Reihe - Biochemie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, **2012**.
- [39] G. H. Carpenter, *Annu Rev Food Sci Technol* **2013**, 4, 267–76.
- [40] D. I. Cook, E. W. V. Lennep, M. L. Roberts, J. A. Young in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, **1994**, S. 1061–1103.

- [41] E. Jensen-Jarolim, *Gastrointestinaltrakt, Mukosale Pathophysiologie und Immunologie*, Springer-Verlag /Wien, **2006**.
- [42] L. Schenkels, E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen, *Crit Rev Oral Biol Med* **1995**, *6*, 161–175.
- [43] P. D. V. de Almeida, A. M. T. Gregio, M. A. N. Machado, A. A. S. de Lima, L. R. Azevedo, *J Contemp Dent Pract* **2008**, *9*, 1–11.
- [44] E.-G. Beck, Zugriff am 06.03.2015, **2007**, <http://www.biokurs.de/chemkurs/skripten/12/cs12-52.htm>.
- [45] R. Sauermost, D. Freudig, *Lexikon der Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1999**.
- [46] S. J. Hersey in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, **1994**, S. 1227–1236.
- [47] J. F. Forstner, G. G. Forstner in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, New York, **1994**, S. 1255–1284.
- [48] M. Fried, M. P. Mannes, G. Rogler, *Module Innere Medizin, Magen-Darm-Trakt*, Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, **2013**.
- [49] G. Flemmström in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, **1994**.
- [50] M. E. Lowe in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, **1994**.
- [51] A. F. Hofmann in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*, (Hrsg.: L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobson, J. H. Walsh), Raven Press, **1994**, S. 1555–1571.
- [52] S. Handschuh, Diss., Friedrich-Alexander-Universität Erlangen -Nürnberg, **1999**.
- [53] Zugriff am 22.08.2017, <http://www.old-ib.bioninja.com.au/options/option-h-further-human-2/h2-digestion.html>.
- [54] J. M. Hollas, *Moderne Methoden in der Spektroskopie*, 2. Auflage, Vieweg, **1995**.
- [55] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Auflage, Wiley-VCH, **2006**.
- [56] P. Hänninen, H. Härmä, *Lanthanide Luminescence, Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2011**.
- [57] S. Svanberg, *Atomic and Molecular Spectroscopy*, 2. Auflage, Springer, **1992**.
- [58] L. Keene, Molecular photophysics and photochemistry, **2007**, <http://slideplayer.com/slide/591692/>.
- [59] I. Billard in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earth Elements, Bd. 33*, Elsevier Science, **2003**, Kap. 126.

- [60] K. Binnemans, *Coord Chem Rev* **2015**, *295*, 1–45.
- [61] B. M. Walsh in *Advances in Spectroscopy for Lasers and Sensing*, (Hrsg.: B. Bartolo, O. Forte), Springer Netherlands, **2006**, Kap. Judd-Ofelt theory: principles and practices, S. 403–433.
- [62] M. H. Werts, *Sci Prog* **2005**, *88*, 101–131.
- [63] B. Marmodée, J. S. de Klerk, F. Ariese, C. Gooijer, M. U. Kumke, *Anal Chim Acta* **2009**, *652*, 285–294.
- [64] N. Kaltsoyannis, P. Scott, *The f Elements*, Oxford Chemistry Primers, **1999**.
- [65] M. M. Fernandes, M. Schmidt, T. Stumpf, C. Walther, D. Bosbach, R. Klenze, T. Fanghänel, *J Colloid Interface Sci* **2008**, *321*, 323–331.
- [66] J. Kratsch, B. B. Beele, C. Koke, M. A. Denecke, A. Geist, P. J. Panak, P. W. Roesky, *Inorg Chem* **2014**, *53*, 8949–8958.
- [67] A. M. Nonat, A. J. Harte, K. Senechal-David, J. P. Leonard, T. Gunnlaugsson, *Dalton Trans* **2009**, 4703–4711.
- [68] I. Billard, G. Geipel in *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques*, (Hrsg.: U. Resch-Genger), Springer Berlin Heidelberg, **2008**, S. 465–492.
- [69] N. M. Edelstein, R. Klenze, T. Fanghänel, S. Hubert, *Coord Chem Rev* **2006**, *250*, 948–973.
- [70] J. Sytsma, K. M. Murdoch, N. M. Edelstein, L. A. Boatner, M. M. Abraham, *Phys Rev B* **1995**, *52*, 12668–12676.
- [71] P. Lindqvist-Reis, C. Walther, R. Klenze, A. Eichhöfer, T. Fanghänel, *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 5279–5285.
- [72] W. T. Carnall, K. Rajnak, *J Chem Phys* **1975**, *63*, 3510–3514.
- [73] R. K. J. I. Kim, H. Wimmer, *J Solid State Inorg Chem* **1991**, 347–356.
- [74] C. M. Ruff, Diss., Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2013**.
- [75] G. Planque, V. Moulin, P. Toulhoat, C. Moulin, *Anal Chim Acta* **2003**, *478*, 11–22.
- [76] G. R. Choppin, D. R. Peterman, *Coord Chem Rev* **1998**, *174*, 283–299.
- [77] T. Stumpf, Habilitation, Karlsruher Institut für Technologie, **2008**.
- [78] E. Soini, T. Lövgren, C. B. Reimer, *Crit Rev Anal Chem* **1987**, *18*, 105–154.
- [79] A. Heller, Diss., Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, **2011**.
- [80] J.-C. G. Bünzli in *Spectroscopic Properties of Rare Earths in Optical Materials*, (Hrsg.: R. Hull, J. Parisi, R. M. Osgood, H. Warlimont, G. Liu, B. Jacquier), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2005**, S. 462–499.
- [81] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. Gareth Williams, M. Woods, *J Chem Soc, Perkin Trans 2* **1999**, 493–504.

Literatur

- [82] W. D. Horrocks, D. R. Sudnick, *J Am Chem Soc* **1979**, *101*, 334–340.
- [83] T. Kimura, G. R. Choppin, *J Alloys Compd* **1994**, *213*, 313–317.
- [84] K. Y. Kimura Takaumi, Choppin Gregory R., Y. Zenko, *Radiochim Acta* **1996**, *72*, 61–64.
- [85] J. Wragg, M. Cave, H. Taylor, N. Basta, E. Brandon, S. Casteel, C. Gron, A. Oomen, T. V. de Wiele, Inter-laboratory trial of a unified bioaccessibility testing procedure, Techn. Ber., British Geological Survey, Nottingham, UK, **2009**.
- [86] G. A. Oomen, M. C. J. Rompelberg, A. M. Bruil, G. C. J. Dobbe, H. D. P. K. Pereboom, M. A. J. A. Sips, *Arch Environ Contam Toxicol* **2003**, *44*, 281–287.
- [87] A. Barkleit, A. Heller, A. Ikeda-Ohno, G. Bernhard, *Dalton Trans* **2016**, *45*, 8724–8733.
- [88] M. Marques, R. Loebenberg, M. Almukainzi, *Dissolut Technol* **2011**, 15–28.
- [89] S. J. Hur, D. H. Kim, S. C. Chun, S. K. Lee, Y. S. Keum, *Food Funct* **2013**, *4*, 1827–1834.
- [90] W. Rotard, W. Christmann, W. Knoth, W. Mailahn, *UWSF* **1995**, *7*, 3–9.
- [91] F. Faridbod, M. R. Ganjali, P. Norouzi, *Anal Lett* **2008**, *41*, 1933–1943.
- [92] K. Müller, Diss., Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden, **2010**.
- [93] I. Puigdomenech, *MEDUSA and HYDRA: Software for Chemical Equilibrium Calculations*, Royal Institute of Technology, Sweden, **2013**.
- [94] A. Heller, A. Barkleit, H. Foerstendorf, S. Tsushima, K. Heim, G. Bernhard, *Dalton Trans* **2012**, *41*, 13969–13983.
- [95] Y. Su, Y. Xu, L. Yang, S. Weng, R. Soloway, D. Wang, J. Wu, *J Mol Struct* **2009**, *920*, 8–13.
- [96] P. G. Bhat, D. R. Flanagan, M. D. Donovan, *Int J Pharm* **1996**, *134*, 15–25.
- [97] S. Lee, M. Mueller, K. Rezwani, N. D. Spencer, *Langmuir* **2005**, *21*, 8344–8353.
- [98] H. Y. Shrivastava, B. U. Nair, *J Biomol Struct Dyn* **2012**, *20*, 575–587.
- [99] R. Bansil, B. S. Turner, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2006**, *11*, 164–170.
- [100] A. Barkleit, C. Wilke, A. Heller, T. Stumpf, A. Ikeda-Ohno, *Dalton Trans* **2017**, *46*, 1593–1605.
- [101] G. Walsh, *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, **2002**.
- [102] L. Christensen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1955**, *57*, 163–173.
- [103] P. W. Jones, D. M. Taylor, D. R. Williams, *Chem Spec Bioavailab* **2005**, *17*, 49–53.
- [104] Z. Krejpcio, R. W. Wojciak, *Pol J Environ Stud* **2002**, *11*, 251–254.
- [105] M. Kirchgessner, M. G. Beyer, H. Steinhart, *Br J Nutr* **1976**, *36*, 15–22.
- [106] A. Turner, Y. Olsen, *Estuar Coast Shelf Sci* **2000**, *51*, 717–728.
- [107] Y. Li, W. Demisie, M.-k. Zhang, *Environ Sci Pollut Res* **2013**, *20*, 4993–5002.

Literatur

- [108] M. C. Rose, J. A. Voynow, *Physiol Rev* **2006**, *86*, 245–278.
- [109] P. W. Durbin, *Health Phys* **2008**, *95*, 465–92.
- [110] J. Perez-Vilar, R. L. Hill, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 31751–31754.
- [111] J. M. Coles, D. P. Chang, S. Zauscher, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2010**, *15*, 406–416.
- [112] A. MacAdam, *Adv Drug Deliv Rev* **1993**, *11*, 201–220.
- [113] B. S. Turner, K. Bhaskar, M. Hadzopoulou-Cladaras, J. LaMont, *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr* **1999**, *1447*, 77–92.
- [114] U. o. L. St. Georges, Zugriff am 08.06.2015, **2007**, http://www.elu.sgu.ac.uk/refresh/guest/scorm/109/package/content/non_specialised_gastric_mucosa_100.htm.
- [115] K. Khanvilkar, M. D. Donovan, D. R. Flanagan, *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *48*, 173–193.
- [116] T. Ichikawa, K. Ishihara in *Gastritis and Gastric Cancer - New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments*, (Hrsg.: P. Tonino), Intech, **2011**.
- [117] O. Svensson, T. Arnebrant, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2010**, *15*, 395–405.
- [118] J. Dekker, J. W. Rossen, H. A. Büller, A. W. Einerhand, *Trends Biochem Sci* **2002**, *27*, 126–131.
- [119] H. H. Sigurdsson, J. Kirch, C.-M. Lehr, *Int J Pharm* **2013**, *453*, 56–64.
- [120] R. Bansil, J. P. Celli, J. M. Hardcastle, B. S. Turner, *Front Immunol* **2013**, *4*, 1–12.
- [121] M. I. Hassan, A. Saxena, F. Ahmad, *Blood Coagul Fibrinolysis* **2012**, *23*, 11–22.
- [122] S. J. Angyal, *Adv Carbohydr Chem Biochem* **1989**, *47*, 1–43.
- [123] N. J. Greenfield, *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2876–2890.
- [124] T. A. Keiderling, *Curr Opin Chem Biol* **2002**, *6*, 682–688.
- [125] B. Zappone, N. J. Patil, J. B. Madsen, K. I. Pakkanen, S. Lee, *Langmuir* **2015**, *31*, 4524–4533.
- [126] E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal Chem* **1990**, *62*, 950A–959A.
- [127] M. W. Freyer, E. A. Lewis in *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, Methods in Cell Biology, Academic Press, **2008**, S. 79–113.
- [128] M. W. Whitehead, R. P. Thompson, J. J. Powell, *Gut* **1996**, *39*, 625–628.
- [129] A. Allen, D. A. Hutton, A. J. Leonard, J. P. Pearson, L. A. Sellers, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1986**, *21*, 71–78.
- [130] S. P. Authimoolam, T. D. Dziubla, *Polymers* **2016**, *8*, 71.
- [131] R. Schauer, *Trends Biochem Sci* **1985**, *10*, 357–360.
- [132] M. Saladini, L. Menabue, E. Ferrari, *J Inorg Biochem* **2002**, *88*, 61–68.
- [133] N. M. Varki, A. Varki, *Lab Invest* **2007**, *87*, 851–857.

Literatur

- [134] R. Schauer in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Bd. 40, (Hrsg.: R. S. Tipson, D. Horton), Academic Press, **1982**, S. 131–234.
- [135] R. Schauer, *Glycoconj J* **2000**, *17*, 485–499.
- [136] L. W. Jaques, E. B. Brown, J. M. Barrett, W. Brey WS Jr Weltner, *J Biol Chem* **1977**, *252*, 4533–8.
- [137] J.-P. Behr, J.-M. Lehn, *FEBS Lett* **1972**, *22*, 178–180.
- [138] G. Plancque, Y. Maurice, V. Moulin, P. Toulhoat, C. Moulin, *Appl Spectrosc* **2005**, *59*, 432–441.
- [139] A. Barkleit, J. Kretzschmar, S. Tsushima, M. Acker, *Dalton Trans* **2014**, *43*, 11221–11232.
- [140] L. W. Jaques, B. F. Riesco, W. Weltner, *Carbohydr Res* **1980**, *83*, 21–32.
- [141] M. Saladini, E. Ferrari, L. Menabue, *J Inorg Biochem* **2002**, *92*, 121–127.
- [142] C. Traving, R. Schauer, *Cell Mol Life Sci* **1998**, *54*, 1330–1349.
- [143] H. Irving, R. J. P. Williams, *J Chem Soc* **1953**, 3192–3210.
- [144] L. Baranauskienė, V. Petrikaite, J. Matulienė, D. Matulis, *Int J Mol Sci* **2009**, *10*, 2752–2762.
- [145] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J Mol Recogn* **1999**, *12*, 3–18.
- [146] S. Illi, J. Schulten, P. Klüfers, *Z Anorg Allg Chem* **2013**, *639*, 77–83.
- [147] E. Mueller, A. Blume, *BBA-Biomembranes* **1993**, *1146*, 45–51.
- [148] A. Synytsya, M. Urbanova, V. Setnicka, M. Tkadlecova, J. Havlicek, I. Raich, P. Matejka, A. Synytsya, J. Copikova, K. Volka, *Carbohydr Res* **2004**, *339*, 2391–2405.
- [149] D. Filipiuk, L. Fuks, M. Majdan, *J Mol Struct* **2005**, *744 - 747*, 705–709.
- [150] K. Izumi, *Agric Biol Chem* **1980**, *44*, 1623–1631.
- [151] S. J. Angyal, D. Greeves, L. Littlemore, *Carbohydr Res* **1988**, *174*, 121–131.
- [152] L. D'Souza, P. Devi, D. S. M.P., C. G. Naik, *Anal Chem Insights* **2008**, *3*, 135–143.
- [153] J. Max, C. Chapados, *J Phys Chem A* **2004**, *108*, 3324–3337.
- [154] J.-P. Behr, J.-M. Lehn, *FEBS Lett* **1973**, *31*, 297–300.
- [155] V. D. Marco, A. Karoly-Lakatos, A. Venzo, R. Bertani, R. Seraglia, T. Kiss, *Inorg Chim Acta* **2006**, *359*, 4227–4234.
- [156] A. Lewis, K. Jones, K. Lewis, S. Jones, P. Lewis, *Carbohydr Polym* **2013**, *92*, 1294–1301.
- [157] J. Haas, E. Shock, D. Sassani, *Geochim Cosmochim Acta* **1995**, *59*, 4329–4350.
- [158] X. Liu, R. H. Byrne, *Geochim Cosmochim Acta* **1997**, *61*, 1625–1633.
- [159] J. H. Lee, R. H. Byrne, *Geochim Cosmochim Acta* **1992**, *56*, 1127–1137.
- [160] K. Spahiu, J. Bruno, A selected thermodynamic database for REE to be used in HLNW performance assessment exercises, Techn. Ber., MBT Tecnologia Ambiental, **1995**.

Literatur

- [161] P. Khopkar, P. Narayanankutty, *J Inorg Nucl Chem* **1971**, *33*, 495–502.
- [162] A. Heller, A. Barkleit, G. Bernhard, J.-U. Ackermann, *Inorg Chim Acta* **2009**, *362*, 1215–1222.

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.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf in der Zeit von Februar 2014 bis Juli 2017 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Dr. Astrid Barkleit angefertigt.

Frühere erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Ich erkenne die Promotionsordnung in der aktuellen Fassung des Bereichs Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden an.

Ort, Datum

Unterschrift



Bautzner Landstr. 400
01328 Dresden, Germany
Tel. +49 351 260-2432
Fax +49 351 260-12432
t.arnold@hzdr.de
<http://www.hzdr.de>