

**HZDR-061**

# **EINFLUSS VON BIOFILMEN AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN VON URAN, AMERICIUM UND EUROPIUM IN DER UMWELT**

Nils Baumann, Isabel Zirnstein, Thuro Arnold

Wissenschaftlich Technische Berichte  
HZDR-061 · ISSN 2191-8716

**WISSENSCHAFTLICH-  
TECHNISCHE BERICHTE**

**hZDR**



**HELMHOLTZ  
ZENTRUM DRESDEN  
ROSSENDORF**

Wissenschaftlich-Technische Berichte  
HZDR-061

Nils Baumann, Isabel Zirnstein, Thuro Arnold

**EINFLUSS VON BIOFILMEN  
AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN VON URAN,  
AMERICIUM UND EUROPIUM IN DER UMWELT**

**HZDR**

 **HELMHOLTZ  
ZENTRUM DRESDEN  
ROSSENDORF**

Druckausgabe: ISSN 2191-8708

Elektronische Ausgabe: ISSN 2191-8716

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

Qucosa: <http://fzd.qucosa.de/startseite/>

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02NUK015F gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

2015

Herausgegeben vom

Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf

Bautzner Landstraße 400

01328 Dresden

Germany

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

Vorhabens Bezeichnung: Verbundprojekt Strahlung und Umwelt II:  
Radionuklide in der Umwelt, ihr Transport in Nahrungsketten zum und im Menschen,  
Teilprojekt F

Zuordnung zum FuE-Programm: Arbeitspaket 2.1 –  
Einfluss von Biofilmen auf das Migrationsverhalten von Uran, Americium und  
Europium in der Umwelt

Förderkennzeichen: 02NUK015F

Laufzeit des Vorhabens: vom 01.09.2010 bis 31.12.2013

Gesamtkosten des Vorhabens: 351.591,00 €

Projektleiter: Dr. Thuro Arnold

Projektbearbeiter: Dr. Nils Baumann, Isabel Zirnstein

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



## Inhaltsangabe

### I. Schlussbericht

1. Aufgabenstellung (Problem – Aufgabe – Ziel) .....7
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde ..... 9
3. Planung und Ablauf des Vorhabens .....10
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde .....10
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....11

### II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses  
im Einzelnen ..... 12
2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....12
3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....12
4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit  
des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans .....12
5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt  
gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens  
bei anderen Stellen ..... 13
6. Veröffentlichungen der Ergebnisse ..... 13

### III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen  
des Förderprogramms ..... 14
2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens ..... 14
3. Fortschreibung des Verwertungsplanes .....21
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben ..... 22
5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer ..... 22
6. Ausgaben- und Zeitplanung ..... 22

IV.    Berichtsblatt (Document Control Sheet) .....	23
V.     Anhang .....	25
Zirnstein, I.; Arnold, T.; Krawczyk-Bärsch, E.; Jenk, U.; Bernhard, G. & Röske, I. (2012): Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine. <i>MicrobiologyOpen</i> , 1(2), 83-94. ....	27
Baumann, N.; Arnold, T. & Lonschinski, M. (2012a): TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil. <i>Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry</i> , 291, 673-679. ....	39
Baumann, N.; Arnold, T. & Lonschinski, M. (2012b): Speciation of Uranium in Seepage and Pore Waters of Heavy Metal-Contaminated Soil. In: Erika Kothe & Ajit Varma (Editors) <i>Bio-Geo Interactions in       Metal-Contaminated Soils</i> . ISBN 978-3-642-23326-5, Springer, 131-141. ....	47
Baumann, N.; Arnold, T. & Haferburg, G. (2013): Uranium in mashrooms related to the iron and manganese concentrations. <i>Report HZDR-030</i> , ISSN 2191-8708, p. 30. ....	59
Baumann, N. & Arnold, T. (2014): Laser fluorescence lifetime of uranyl species onto <i>Euglena mutabilis</i> determined with single photon avalanche diode and a multichannel event timer. <i>Report HZDR-048</i> , ISSN 2191-8708, p. 10. ....	61
Zirnstein, I.; Köppchen, S.; Röske, I. & Arnold, T. (2014): Cultivation of microorganisms live in the mine water of the former uranium mine Königstein, Germany. <i>Report HZDR-048</i> , ISSN 2191-8708, p.11. ....	63
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. <i>Environmental Science       and Pollution Research</i> , 21, 6921-6929. ....	65
Zirnstein, I.: Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Gruben- wasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein. Dissertation, TU Dresden 2015. ....	75

## I. Schlussbericht

### 1. Aufgabenstellung (Problem – Aufgabe – Ziel)

Uranerzbergbau führt oft zu ökologischen Problemen, und das besonders in Folge der unkontrollierten Verbreitung des radioaktiven Elements Uran, aber auch von Radium und Radon, darüber hinaus von nichtradioaktiven Schwermetallen wie Arsen, Eisen und Mangan. So auch in Sachsen und Thüringen, wo die SDAG WISMUT Jahrzehnte lang einen besonders rücksichtslosen Uranerzbergbau betrieb (zeitweise war die damalige DDR der drittgrößte Uranproduzent der Welt). Zu den aus dem Uranaustrag resultierenden ökologischen Problemen gab es bislang auch eine Vielzahl an Untersuchungen, die letztendlich die Erforschung von Wechselwirkungen des Urans mit dem Menschen zum Inhalt hatten. Diese konzentrierten sich jedoch allerdings fast ausschließlich auf Fragen anorganischer Prozesse (z. B. zur Uranlöslichkeit, und/oder zum Migrations- und Sorptionsverhalten von Uran).

Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Uran in der Oxidationsstufe +6 (U(VI)), in der es in wässriger Lösung als das Uranylion ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) vorkommt, gelegt. Als U(VI) geht Uran auch bedeutend leichter in Lösung, als in der Oxidationsstufe +4 (U(IV)), U(VI) ist also „mobiler“ als U(IV) – und damit sehr bedeutsam was die Untersuchungen möglicher Urantransportpfade angeht.

Das Uranylion kommt in wässriger Lösung nur untergeordnet „frei“ vor, vielmehr neigt es unter natürlichen Umständen dazu, sich – je nach Angebot und Rahmenbedingungen – mit Liganden zu verbinden, mit ihnen (mehr oder weniger stabile) Komplexe zu bilden. Die Art dieser Komplexe ist entscheidend für z.B. das Migrations- und Sorptionsverhalten des darin enthaltenen U(VI) – auch für dessen Giftigkeit. Das macht die Untersuchung der Uranspeziation (der chemischen Uran-Bindungsform) so wichtig.

Uran(VI)-Verbindungen haben dazu die Eigenschaft, dass sie nach Anregung mittels LASER-Strahlung bestimmter Wellenlänge fluoreszieren können. Dieser Umstand ermöglicht es, mit Hilfe der Methode der Zeit-aufgelösten Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie (Time-Resolved Laserinduced Fluorescence Spectroscopy, TRLFS) Informationen zu ihrer Speziation zu gewinnen, um damit dem Migrationsverhalten des Urans in der Natur näher zu kommen. Denn das Spektrum des durch die Laseranregung von Uran(VI)-verbindungen hervorgerufenen Fluoreszenzlichtes

(des Fluoreszenzsignales), sowie die Lebensdauer dieses Signales bergen Auskünfte, die zur Bestimmung der Speziation des fluoreszierenden Teilchens – hier des U(VI) – herangezogen werden können.

Ein bedeutender Vorteil dieser Methode ist der Umstand, dass man mit ihr in derart kleine Konzentrationsbereiche vordringen kann, die mit keiner anderen Speziations-Analysenmethode erreichbar sind – und sehr niedrige Konzentrationen sind im Falle des chemisch giftigen und radioaktiven Schwermetalls Uran bereits umweltrelevant. Auf Grund dieser hohen Sensitivität der TRLFS kann so diese Methode an Proben mit sehr geringen, aber für die Umwelt doch schon sehr bedeutsamen Konzentrationen durchgeführt werden (im ppb-Bereich), was sich bislang für Speziationsuntersuchungen bezüglich U(VI) zu Problemen anorganischer Natur als sehr hilfreich erwies.

Innerhalb der Gesamtheit der vielfältigen bisherigen Untersuchungen zu den Wechselwirkungen radioaktiver Nuklide mit dem Menschen sind solche zum Einfluss der auf der Erde fast allgegenwärtigen Mikrobiologie auf diese Wechselwirkungen deutlich unterrepräsentiert, auch im Falle von Uran. Darum konzentrierten sich unsere Arbeiten innerhalb dieses Projektes darauf, einen Beitrag zu der Frage zu liefern, inwieweit Mikroorganismen die Ausbreitung und Immobilisierung von Radionukliden (und dabei insbesondere von Uran) in der Umwelt beeinflussen.

So gibt es auch in Grubenwässern von Uranerz-Bergwerksanlagen eine komplexe mikro-biologische Lebensgemeinschaft, und dies trotz dortiger lebensfeindlicher Rahmenbedingungen (niedriger pH-Wert, hohe Schwermetallkonzentrationen). Und diese dortige mikrobielle Lebensgemeinschaft muss mit dem dort in relativ hohen Konzentrationen vorliegenden Uran in Wechselwirkung treten.

Im Hinblick auf die Diversität dieser Mikroorganismen gibt es noch Forschungsbedarf. Das ehemalige Uranbergwerk in Königstein (Sachsen, ca. 25 km südöstlich von Dresden) der WISMUT GmbH stellt durch seine kontrollierte Flutung ein interessantes, und durch einen anhaltenden sauren pH-Wert (um pH 3) sowie durch die dortigen hohen Uran- und Metallkonzentrationen einen idealen Untersuchungsort mikrobieller Biozönosen in sauren kontaminierten Grubenwässern dar.

Ziel war es, eine erste Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose in Wässern des Bergwerkes durchzuführen und mit den Ergebnissen zu Untersuchungen der mikrobiellen Diversität vor dem Flutungsprozess dort zu vergleichen. Hierfür kam ein brei-

tes Spektrum an Methoden zum Einsatz, das klassische mikrobiologische Methoden und molekularbiologische Techniken umfasste. Die Analysen sollten dabei über mehrere Jahre hinweg erfolgen, um die Variabilität der mikrobiellen Population im Grundwasser planktonisch und im Biofilm zu erfassen.

Um Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit fluoreszierenden, radioaktiven Schwermetallionen zu untersuchen sollte auch die hoch sensible TRLFS eingesetzt werden. Dazu waren Anwendungsmöglichkeiten der Methodik der TRLFS auch auf kleinstem, mikroskopischem Raum zu erforschen. Hierfür war das am Haus vorhandene Konfokale Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) dergestalt zu modifizieren, dass eine gepulste Laseranregung auf mikroskopisch kleinem Raum mit verschiedenen Wellenlängen über einen möglichst breiten Wellenlängenbereich hinweg möglich ist. Für die Auswertung des (entsprechend des mikroskopisch kleinen Anregungsraumes) sehr geringen Fluoreszenzsignales sollte die Methode der Einzelphotonenzählung an das CLSM angepasst werden.

## **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Zum Migrationsverhalten von Uran in der Umwelt wurden (auch am Haus) bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt und deren Ergebnisse veröffentlicht. Auch und besonders zum Sorptionsverhalten von Uran auf diversen Mineralgrenzflächen gibt es schon zahlreiche wissenschaftliche Publikationen.

Dem Einfluss der Mikrobiologie auf das Migrationsverhalten von Radionukliden wurde demgegenüber bis heute nur vergleichsweise wenig Forschungsaufwand gewidmet. Und dies obwohl das Vorhandensein mikrobiologischer Organismen selbst unter „lebensfeindlichsten“ Bedingungen (hohe Schwermetallkonzentrationen, niedrige pH-Werte) in natürlichen Umgebungen nachgewiesen werden konnte: Biokinetische Prozesse werden bei der Beurteilung des Migrationsverhaltens von Radionukliden bisher zu wenig berücksichtigt. Die hier vorgestellten Arbeiten sollen darum auch ein Beitrag dafür sein, diese Disproportion mit auszugleichen. Denn besonders bezüglich der Suche nach Möglichkeiten zur sicheren Endlagerung radioaktiver Abfälle ist die ausreichende Berücksichtigung mikrobiologischer Aspekte unabdingbar.

### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde in der Zeit vom 01.09.2010 bis zum 31.12.2013 durchgeführt. Frau Zirnstein hat bis August 2014 ihre praktischen Arbeiten im Labor fortgesetzt, und schrieb seit dieser Zeit an ihrer Doktorarbeit.

### 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zum Ausbreitungsverhalten und zu Wechselwirkungen an Phasengrenzflächen von Uranyl wurde bereits viel gearbeitet, auch am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf. Zahlreiche Arbeiten, die die Untersuchung des Sorptionsverhaltens von Uran(VI) an diversen Mineraloberflächen mit modernsten spektroskopischen Methoden zum Inhalt hatten, wurden bereits durchgeführt, auch am Hause, z.B. zur Uranylsorption an Gibbsit, Kaolinit oder an Muskovit, wobei deren Ergebnisse unter Anderem veröffentlicht werden konnten in:

- Baumann, N.; Brendler, V.; Arnold, T.; Geipel, G. & Bernhard, G. (2004): Uranyl sorption onto gibbsite studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Journal of Colloid and Interface Science*, 290, 318-324.
- Arnold, T.; Utsunomiya, S.; Geipel, G.; Ewing, T.C.; Baumann, N. & Brendler, V. (2006): Identification of adsorbed U(VI) surface species on muscovite by TRLFS and HAADF-STEM. *Environmental Science & Technology*, 40, 4646-4652.
- Křepelová, A.; Brendler, V.; Sachs, S.; Baumann, N. & Bernhard, G. (2007): U(VI)-Kaolinite Surface Complexation in Absence and Presence of Humic Acid Studied by TRLFS. *Environmental Science & Technology*, 41, 6142-6147.

Erfahrungen bestehen zum Immobilisierungsverhalten von Biofilmen gegenüber Uranyl, diese wurden u. A. durch Speziations-Untersuchungen mittels Fluoreszenzmessungen am CLSM gewonnen. Ebenfalls bereits durchgeführt wurden Fluoreszenzuntersuchungen an Mikroorganismen von Biofilmen der Grube Königstein mit in sauren Medien stabilen Fluoreszenzfarbstoffen. – Die Fähigkeit der eukariotischen Einzeller *Euglena mutabilis* Schmitz (die auch in sauren Grubenwässern vorkommen) zur Aufnahme von Uranyl aus sulfatischen und perchloratischen Medien bei pH 3 - 4 (und damit die Eignung dieser Einzeller zur Immobilisierung von Uranyl aus Grubenwässern) und die Speziation des aufgenommenen Uranyls ist ebenfalls bereits untersucht und veröffentlicht.

- Arnold, T.; Großmann, K. & Baumann, N. (2010): Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396, 1641-1653.

Brockmann, S.; Arnold, T. & Schweder, B. & Bernhard, G. (2010): Visualizing Acidophilic Microorganisms in Biofilm Communities Using Acid Stable Fluorescence Dyes. *Journal of Fluorescence*. 20, 943-951.

Brockmann, S.; Arnold, T. & Bernhard, G. (2014): Speciation of bioaccumulated uranium(VI) by *Euglena mutabilis* cells obtained by laser fluorescence spectroscopy. *Radiochimica Acta*. 102 (5), 411-422.

Ergebnisse zu Speziations-Untersuchungen mittels TRLFS an den sauren Grubenwässern (Acid Mine Drainage, AMD) des WISMUT-Uranerzbergwerkes Königstein konnten nach entsprechenden Untersuchungen im Haus ebenfalls bereits veröffentlicht werden. Die Uran-Speziation wurde dabei in Drainage- und Sickerwässern als die des hydratisierten  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  Moleküls spektroskopisch nachgewiesen.

Arnold, T.; Baumann, N.; Krawczyk-Bärsch, E.; Brockmann, S.; Zimmermann, U.; Jenk, U. & Weiß, S. (2011): Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 75, 2200-2212.

## 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Probenahmen der Wasser- und Biofilmproben, und die Installation der Über Tage Probenahme Einrichtung im ehemaligen Uranerzbergbau-Betrieb Königstein war nur mittels enger Zusammenarbeit mit den entsprechenden Mitarbeitern der WISMUT GmbH möglich (siehe Anhang Dissertation I. Zirnstein).

Die Entnahme und Auswahl von Pilz- und Pflanzenmaterial, das von urankontaminierten Böden des Testfeldes der Friedrich Schiller Universität namens „Gessenwiese“ nahe Ronneburg (Thüringen) stammte, geschah in enger Zusammenarbeit mit Frau Prof. Erika Kothe und Herrn Prof. Georg Büchel von der Uni Jena (siehe Anhang Baumann et al. 2012a und -b, Baumann et al. 2014, Report HZDR-030).

Die technischen Entwicklungsarbeiten am Fluoreszenzmesssystem für das Ermöglichen der zeitaufgelösten Messungen über einen breiten Anregungswellenlängenbereich wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. v. Volkmann der Firma APE Angewandte Physik und Elektronik GmbH (Berlin) und mit Herrn Dr. Buschmann der PicoQuant GmbH (Berlin) durchgeführt (siehe Anhang Report HZDR-048).

## **II. Eingehende Darstellung**

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

Die Dissertationsschrift von Frau Isabel Zirnstein sowie die mit dieser Arbeit verbundenen schriftlichen Veröffentlichungen sind im Anhang (ab Seite 75) dieses hiermit vorliegenden Berichts zusammengefasst.

### **2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Frau Isabel Zirnstein wurde vom 1.12.2010 bis zum 31.7.2012, also 20 Monate, mit einer halben Stelle auf das Projekt angestellt, und vom 1.8.2012 bis zum 31.12.2013, also 17 Monate, mit einer  $\frac{3}{4}$ -Stelle auf des Projekt angestellt.

Herr Dr. Nils Baumann wurde vom 18.12.2010 bis zum 31.12.2013, also 36,5 Monate mit einer vollen Stelle von den Mitteln des Projekts bezahlt.

Die das Laserfluoreszenzmesssystem im Sinne der Einzelphotonenzählung (Time-Coupled Single-Photon Counting, TCSPC) erweiternden Komponenten, darunter die HydraHarp und die Single Photon Avalanche Diode (SPAD), wurden aus Mitteln des Projektes finanziert (47 717,33 €).

### **3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Bei der Erforschung des Ausbreitungsverhaltens von Uran und letztendlich dessen Wechselwirkungen mit dem Menschen ist der mögliche Einfluss der Mikrobiologie bislang nur unzureichend berücksichtigt worden. Mit der geleisteten und hier beschriebenen Arbeit sollte dieser Mangel mit ausgeglichen, und die Umweltchemie von Radionukliden wie dem Uran hinsichtlich seiner Mobilisierung und Immobilisierung durch Mikroorganismen untersucht werden.

### **4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Im Rahmen des Projektes konnte sich Frau Isabel Zirnstein auf dem Gebiet der Strahlenforschung in verschiedenen naturwissenschaftlichen Disziplinen weiter qualifizieren und hat ihre Doktorarbeit am 31. März 2015 an der TU Dresden eingereicht. Dies trägt zum Kompetenzerhalt und auch dazu bei, neues Personal für Strahlenforschung, Industrie und Behörden bereit zu stellen.

Die Ergebnisse aus ihren Arbeiten wurden bzw. werden (siehe Anhang und Abschnitt II.6) noch publiziert.

Darüber hinaus werden zusammenfassende Beiträge im Erfolgskontrollbericht (Abschnitt III.3) dargestellt.

## **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 Forschungsergebnisse wurden in Publikationen, der Promotionsschrift von Frau Isabel Zirnstein, in Jahresberichten des HZDR (siehe Anhang), sowie in Vorträgen und durch Poster auf Fachkonferenzen präsentiert und zur Diskussion gestellt.

### **Publikationen**

Die ganz oder teilweise auf die durch die Zuwendung unterstützten Arbeiten basierenden Veröffentlichungen sind im Anhang zusammen gestellt. Hier schon genannt werden sollen die Publikationen in referierten Fachzeitschriften, die Dissertationsschrift von Frau Zirnstein, eine eingereichte und eine zur Einreichung beabsichtigte Publikation:

Zirnstein, I.; Arnold, T.; Krawczyk-Bärsch, E.; Jenk, U.; Bernhard, G. & Röske, I. (2012): Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine. *Microbiology-Open*, 1(2), 83-94.

Baumann, N.; Arnold, T. & Lonschinski, M. (2012): TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 291, 673-679.

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. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6921-6929.

Zirnstein, I.: Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein, Diss., TU Dresden 2015.

Arnold, T.; Lünsdorf, H.; Brockmann, S.; Müller, K. & Baumann, N. (2014): Uranium uptake into *Euglena mutabilis* Cells by Pinocytosis and Vesicle Mediated Transport to Lysosomes. Eingereicht bei *Environmental Science and Pollution Research*.

Zirnstein, I.; Arnold, T. & Röske, K. (2015): Identification of the microbial community in salt sumps of the Asse-II pit, a former salt mine used as a deep geological repository for intermediate and low level radioactive waste. Zur Einreichung beabsichtigt bei *PLOS ONE*.

### III: Erfolgskontrollbericht

**Verbundprojekt Strahlung und Umwelt II: Radionuklide in der Umwelt, ihr Transport in Nahrungsketten zum und im Menschen, Teilprojekt F  
Arbeitspaket 2.1: Einfluss von Biofilmen auf das Migrationsverhalten von Uran, Americium und Europium in der Umwelt**

**Durchführende Institution:** Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Ressourcenökologie, 01062 Dresden

**BMBF Förderkennzeichen:** 02NUK015F

#### **1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms**

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

#### **2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens**

Die eigentlichen Arbeiten am Thema wurden durch eine Reihe von Voruntersuchungen eingeführt. So konnte zuerst die Diversität der Eukaryoten in den Biofilmen des WISMUT Uranerzbergwerkes Königstein, die sowohl stalaktitisch von den Stollendecken hängen, als auch mattenartig in den Drainageausflüssen hängen, bestimmt werden. Dies wurde durch Mikroskopie, sowie Methoden wie 18S rDNA PCR, Klonieren und Sequenzierung erreicht. Dabei wurden in diesen Biofilm-Lebensgemeinschaften 9 Haupt-Taxa nachgewiesen, dazu eine große Anzahl unkultivierter säuretoleranter Eukaryoten. Erstmals wurden die Flagellaten *Bodo saltans*, die Stramenopilen *Diplophrys archer*, und die Rotiferen-Klasse *Bdelloidea* unter diesen AMD-Bedingungen nachgewiesen.

Diese Resultate wurden in „MicrobiologyOpen“ publiziert (siehe Anhang).

Die Speziation des Urans in Oberflächen- und Bodenwasserproben von einem Testfeld der Uni Jena, das sich praktisch auf dem Grunde einer ehemaligen, inzwischen aber abgetragenen Uranerzbergbauhalde nahe Ronneburg (der sog. Gessenhalde) in West-Thüringen befindet, konnte als hydratisierte Uranylsulfat-Moleküle mit TRLFS nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gründet sich auf die Lage der Peakmaxima des Lumineszenzspektrums, sowie auf das Abklingverhalten des Lumineszenzsignals, das einen eindeutig monoexponentiellen Verlauf aufweist und damit für nur *ein* in diesen Wässern vorkommendes Uranylspezies spricht – und dies im Gegensatz zu den Ergebnissen, die vorher mittels mathematischer Modellrechnungen erzielt wur-

den: deren Voraussage für zusätzliches Vorkommen von sog. „freiem Uranyl“ wurden durch die TRLFS-Ergebnisse widerlegt.

Dies geschah als Voruntersuchung in Richtung zu Uranspeziations-Untersuchungen in Biofilmen, die mit diesen Wässern in Kontakt stehen. Dazu wurden mit diesen Ergebnissen an Wasserproben gezeigt, dass sich die TRLFS eignet, um Uranylspezies in komplexen, natürlichen Wässern zu analysieren, und dies innerhalb eines pH-Wertes zwischen 3 und 4 erstmalig überhaupt.

Die Ergebnisse mündeten in eine Publikation in der Zeitschrift „Journal of Radioanalytical and Nuclear Science“ (siehe Anhang).

Von Kultur- und Wildpflanzen, die auf demselben urankontaminierten Boden (auf dem Grunde der ehemaligen Gessenhalde) aufwuchsen, wurden deren Urangehalte in ihren Wurzeln, Sprossen, Blättern und Blüten mittels ICP-MS bestimmt. Dies wurde auch mit Pilzfruchtkörpern, die von diesem Boden gesammelt wurden, durchgeführt. Die Urangehalte in den Pilz und Pflanzenkompartimenten erwiesen sich jedoch als zu niedrig, als das die untersuchten Pflanzen oder Pilze als Hyperakkumulatoren für Uran in Frage kämen – die Urangehalte in den Oberflächen- und Bodenwässern dieses Gebietes lagen stets deutlich über den Gehalten an Uran in den untersuchten Pflanzen und Pilzfruchtkörpern. Leider erwiesen sich die Urangehalte der Pflanzen und Pilze auch als zu gering, um daran TRLFS-Ergebnisse erzielen zu können – und dies insbesondere in Gegenwart der hohen Konzentrationen an Uranylfluoreszenz-Dämpfern („Quenchern“) wie Eisen, Mangan und/oder organische Substanzen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die höchsten Urankonzentrationen sich im Allgemeinen in den Wurzeln der dort wachsenden Pflanzen befinden, und da wiederum auf den Wurzeloberflächen.

Bezüglich der Pilzfruchtkörper konnte mit wachsender Urankonzentration im Biomaterial auch ein – wenn auch nicht einwandfrei stetiger – Anstieg der Mangan- und Eisenkonzentration dokumentiert werden. Diese Ergebnisse mündeten ebenfalls in eine Publikation, nun in der Zeitschrift „Environmental Science and Pollution Research“ (siehe Anhang).

Im ehemaligen Uranbergwerk Königstein kam in dessen aktiver Phase massiv Schweflige Säure zu Herauslösung und Gewinnung des Urans aus dem Gestein zum Einsatz. Hierdurch entstand ein Milieu niedrigen pH-Wertes und hoher Schwerme-

tallgehalte, und die dortige mikrobielle Diversität änderte sich dahingehend, dass sich vornehmlich säure- und schwermetall-tolerante Mikroorganismen durchgesetzt haben. Durch die Flutung der Schächte im Jahr 2010 wurde die Zusammensetzung dieser Mikroorganismengemeinschaft weiterhin beeinflusst.

Im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Isabel Zirnstein wurde die gesamte mikrobielle Biozönose im Grubenwasser und in Biofilmen dieses ehemaligen Uranerzbergwerkes nach dessen Flutung charakterisiert, und mit den Ergebnissen der Bestimmungen der mikrobiellen Diversität vor dem Flutungsprozess verglichen. Dafür kam ein breites Methodenspektrum zum Einsatz, das sowohl klassische mikrobiologische Methoden als auch molekularbiologische Techniken einschloss. Um die Variabilität der mikrobiellen Population zu erfassen, erfolgten diese Analysen dabei über mehrere Jahre hinweg.

Die Gesamtzellzahl (Anzahl der lebenden und toten Mikroorganismen pro Volumeneinheit) des Königsteiner Grubenwassers beträgt  $1,46 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Diese Zahl wurde als Durchschnitt von drei Zählungen ermittelt, und ist wohl auf Grund der hohen Acidität und der hohen Schwermetallkonzentrationen, und des Nährstoffmangels in diesem Milieu (wenig organische Substanz, Stickstoff und Phosphor) derart niedrig – im Vergleich zu Gesamtzellzahlen saurer Grubenwässer von Abraumhalten aus der Literatur. Für die Lebendzellzahl der aerob lebenden Mikroorganismen im Grubenwasser wurde  $3,3 \cdot 10^3$  Kolonie bildende Einheiten (KbE) pro ml ermittelt, für anaerob lebende Mikroorganismen 0,24 KbE/ml. Doch der wirkliche Wert liegt wahrscheinlich deutlich höher, da sich die bestimmte Lebendzellzahl nur auf die Zellen stützt, die auf den getesteten Nährmedien kultivierbar waren.

Zur Züchtung der Grubenwasser-Biofilme wurde eine Flusszelle aus Plexiglas mit Aufwuchsträgern verschiedener Materialien (Plexiglas, Glas, PE, PVC) konstruiert, durch die das Grubenwasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 l/min (unter Vermeidung von Licht- und Sauerstoffeintrag) geleitet wurde.

Aus den Biofilmproben der Flusszelle konnten die Bakterien mit einem Anteil von ca. 69 % von der Gesamtzellzahl hybridisiert werden, aus den Wasserproben ca. 59 %. Biofilme stellen den bevorzugten Lebensraum für Bakterien dar, da diese an Oberflächen (auch an anderen Mikroorganismen) vorzugsweise anheften. Die Abundanzen für Archaea betragen durchschnittlich 1,5 % im Wasser und 0,3 % im Biofilm der Flusszelle; Eukaryonten-Zellen wurden im Wasser und im Biofilm mit <0,2 % hybridisiert. In den planktonischen- und in den Biofilm-Proben ergab die Identifikation der

Bakterien durch die Erstellung von 16S rDNA Bakterien Pyrosequenzierungs-Bibliotheken eine Dominanz der Alpha-, Beta- und Gamma-Proteobakterien. Erhebliche Anteile an der gesamten Diversität wiesen weiterhin die phylogenetischen Gruppen Nitrospira, Firmicutes, Acidobacteria und TM7 auf. Vor allem die Gattungen Acidithiobacillus, Leptospirillum, Acidocella und Thiomonas waren in großer Anzahl in allen Proben vertreten. In Abhängigkeit der Parameter Stickstoff, Chlorid und Natrium konnten Variabilitäten im Zusammenhang mit dem Probenahme-Jahr gezeigt werden. Die Anzahl der identifizierten Phylotypen variiert auch und nahm von 2011 bis 2013 zu. Im Biofilm wurde die bakterielle Lebensgemeinschaft – im Vergleich zu den planktonischen Grubenwasserproben – zu dem von einer großen Anzahl unklassifizierter Bakterien dominiert. Die Art *Ferrovum myxofaciens*, die vor der Flutung die bakterielle Biozönose dominierte, wurde nach der Flutung nicht mehr nachgewiesen und durch die Art *Acidithiobacillus* spp. verdrängt. Die RNA-basierte Analyse und anschließende Pyrosequenzierung zeigte unter den stoffwechselaktiven Bakterien eine Dominanz der Beta-Protobakterien, dazu wurden Nitrospira, Alpha- und Gamma-Proteobakterien als metabolisch aktive Phyla nachgewiesen. Schwefel- und Eisen-oxidierende, sowie Eisen-reduzierende Bakterien der Gattungen Acidithiobacillus, Leptospirillum, Acidocella und Thiomonas, die in den DNA-basierten Pyrosequenzierungsbibliotheken dominierten, waren im dortigen Wasser stoffwechselaktiv. Für die Eisen-oxidierenden Mikroorganismen im Grubenwasser wurde mittels der Methode der „Most Probable Number“ (MPN) eine wahrscheinliche Zellzahl von  $8 \cdot 10^3$  -  $25 \cdot 10^3$  MPN/ml; für die Schwefeloxidierer  $2 \cdot 10^3$  -  $6 \cdot 10^3$  MPN/ml ermittelt. Bezogen auf die ermittelte Gesamtzellzahl von  $1,46 \cdot 10^6$  Zellen/ml konnte damit ein geschätzter Anteil von 0,6 - 1,7 % kultivierbarer Eisen-oxidierender Mikroorganismen, sowie von 0,1 - 0,4 % Schwefel-oxidierender Mikroorganismen gemutmaßt werden. Eisen- und Schwefel-oxidierende Bakterien der Gattungen Thiomonas und Acidithiobacillus, sowie die Eisen-reduzierenden Bakterien Acidocella und Acidiphilium konnten durch die Anwendung verschiedener Kultivierungstechniken und Nährmedien isoliert und kultiviert werden. Identifiziert wurden auch Sulfid-oxidierende, methylo-trophe, Metall-tolerante, Sporen bildende und humanpathogene Bakterien. Geringe wahrscheinliche Zellzahlen wurden für Sulfatreduzierer ermittelt: Zwischen 0,21 und 1,5 MPN/ml. Die Gattung Desulfosporosinus, die auch in den DAN- und RNA-Analysen nachgewiesen wurde, konnte aus den MPN-Mischkulturen als Sulfatreduzierer identifiziert werden.

In geringerem Maße, und neben den die Biozönose dominierenden Bakterien, wurden Archaea durch Pyrosequenzierung identifiziert, wobei die Gruppe der Thermoplasmata in allen Proben die Gemeinschaft dominierte. Innerhalb dieser Gruppe waren Ferropasma und Thermogymnomonas am häufigsten.

Unter der Domäne der Eukaryonten, die den kleinsten Anteil an der Biozönose hat, erwiesen sich Fungi und unklassifizierte Eukaryonten als am häufigsten. Nachgewiesen werden konnten neben den Fungi Amoebozoa, Alveolata, Heterolobosea, Cercozoa, Ciliophora und Rotifera.

Mit Hilfe von Lektinen und der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurden die Biofilme und deren Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) visualisiert. Wohl wegen der wenig vorhandenen organischen Substanzen im Milieu wurde allgemein wenig EPS gebildet.

Es konnte ein Einfluss der Biofilme auf die Immobilisierung von Eisen und Arsen gezeigt werden: Es bildete sich eine durch Eisen- und Schwefeloxidierende Bakterien geförderte Biofilm-Mineral-Verbindung an den Aufwuchsträgern der Durchflusszellen. TRLFS Untersuchungen an dem Mineral-Biofilm-Präzipitat wiesen Uranylsulfat nach, das vermutlich in den Wasserkanälen der Biofilme war. An den Biofilmen sorbiertes Uran konnte durch die TRLFS Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Eventuell wurden geringe Mengen gelöstes Uran(VI) von den Zellen mit dem Wasser aufgenommen, und inwieweit die dortigen Eisen-Hydroxosulfat-Mineral-Auswirkungen auf das Uran haben, ist unklar. Eine nennenswerte Akkumulation von Uran aus den Grubenwässern in den Biofilmen, auch mit extra dafür eingerichteten Biofilmreaktoren, war jedoch nicht nachweisbar. Im Falle von Europium lagen die Absorptionsraten am Biofilm in Labor- und besonders in Feldversuchen höher, die Bindungsform (Speziation) des Europiums im Biofilm ist noch aufzuklären, auch Arsen konzentrierte sich besser am Biofilm auf. Von Akkumulation des Europiums im Biofilm gegenüber dem Wasser kann jedoch nicht gesprochen werden.

Messungen der chemisch-physikalischen Parameter durch Mitarbeiter der WISMUT ermöglichten die Charakterisierung des Grubenwassers, und unter diesen Parametern wurden besonders hohe Eisen- und Sulfatkonzentrationen festgestellt, doch auch erhöhte Arsen-, Nickel-, Mangan-, Zink- und natürlich Urankonzentrationen; die meisten dieser chemischen Parameter stiegen mit dem fortschreitenden Flutungs-

prozess, was auch eine Beeinflussung der mikrobiellen Zusammensetzung erwarten ließ.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Entwicklung eines Messsystems zur Trennung kurz- von langlebigen Fluoreszenzen.

Für die Strukturuntersuchung der nächsten atomaren Nachbarschaft verschiedener fluoreszierender radioaktiver Schwermetallionen wie U(VI) ist die zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektrometrie ein immer wichtiger werdendes Werkzeug. Das Spektrum des durch Laser-Anregung hervorgerufenen Fluoreszenzsignals von zu Fluoreszenz anregbaren Schwermetallionen, und die Lebenszeit dieses Fluoreszenzsignales sind wichtige Indizien zur Entschlüsselung der Bindungsform (Speziation) dieser Ionen, und das schon bei sehr niedrigen Konzentrationen, die im Falle radioaktiver Elemente bereits umweltrelevant sind.

In biologischer Matrix wird jedoch bei kontinuierlicher Laseranregung von Proben neben der Fluoreszenz der da eventuell vorhandenen radioaktiven Schwermetalle Ionen auch stets die intensivere, aber kurzlebige Fluoreszenz organischer Stoffe (wie z. B. von Chlorophyll) ständig mit angeregt, die dann die interessierende Fluoreszenz der Schwermetallionen überdeckt, und deren Interpretation verhindert. Darum wurde im Rahmen dieses Projektes angestrebt, ein Laser-Fluoreszenz-Messsystem zu entwickeln, das in der Lage ist, die interessierende Fluoreszenz radioaktiver Schwermetalle von der störenden Fluoreszenz organischer Stoffe über deren verschiedene Fluoreszenzlebenszeiten abzutrennen. Hierfür ist eine in zeitlich passenden Intervallen *gepulste* Laseranregung Voraussetzung.

Nach Abschluss der Testphase (kurze Fluoreszenzen von längeren Metall-Lumineszenzen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) zu separieren) wurden verschiedene Komponenten ausgewählt, beschafft und mit der Adaption an das bestehende CLSM/LIFS System begonnen.

Im ersten Schritt zum Trennen von kurzlebigen (von organischen Stoffen herrührenden) von den langlebigen (von hier interessierenden, radioaktiven Schwermetallionen verursachten) Fluoreszenzen wurde eine quasi gepulste Laseranregung geschaffen. Dies wurde realisiert, in dem der Anregungslaserstrahl durch einen Telluroxidkristall geschickt wurde. Dieser Kristall wurde durch eine alternierend angelegte HF-Spannung (von ca. 100 MHz) und einem Piezoelement alternierend zum Schwingen gebracht. Der durch den Kristall hindurchgehende Anregungslaserstrahl wird dadurch alternierend zur Probe hin gebeugt. Durch An- und Ausschalten der Schwingung die-

ses Kristalls in einer Frequenz von z. B. 100 kHz ist es so möglich, den praktisch kontinuierlichen (80 MHz) Anregungslaserstrahl des Mai Tai Lasers in einen unterbrochenen, quasi in dieser Frequenz (z. B. 100 kHz) „gepulsten“ Laserstrahl umzuwandeln, der eine Voraussetzung für eine zeitaufgelöste Analyse des Fluoreszenzsignales der Probe ist. So wurde ein praktisch kontinuierlicher Laserstrahl (80 MHz) in einen quasi im Mikrosekundenbereich (z. B. 100 kHz) gepulsten Anregungslaserstrahl umgewandelt (eigentlich durch das Herausschneiden definierter, aufeinanderfolgender, mehrere Mikrosekunden großer zeitlicher Lücken aus einem 80 MHz Laserstrahl einer Energie von ca. 3 Watt).

Die zeitlich exakte Anregung zur Schwingung des Kristalls, und der so erreichte quasi-gepulste Laserstrahl konnte mittels Photodiode durch ein Oszilloskop sichtbar gemacht werden. Die zeitliche Feinabstimmung der „Quantelung“ des Laserstrahles erfolgt über einen Delay-Generator.

Die zeitaufgelöste Analyse des (von seinen kurzlebigen Bestandteilen „gereinigten“) Fluoreszenzsignales, soll mit dem oben beschriebenen „gepulsten“ Laserstrahl sowie einem „Multichannel Picosecond Event Timer & TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) Module“ (HydroHarp) der Firma PicoQuant (Berlin) und einem daran gekoppelten Detektor zur Einzelphotonenzählung (SPAD) – ebenfalls von PicoQuant – realisiert werden.

Durch den Einsatz von Frequenzverdopplern und -verdreifachern der Firmen APE (Berlin) und RADIANTIS (Barcelona) ist es mit dem MaiTai Laser möglich, Laseranregungswellenlängen in einem Frequenzbereich von 230 bis 1020 nm bereit zu stellen (mit einer kleinen Lücke um 340 bis 345 nm). Denn da der Mai Tai Laser von 690 bis 1020 nm durchstimmbar ist, und die Laserstrahlung dann noch mit Frequenzvervielfältigern halbiert oder gedrittelt werden kann, ist es möglich, den Anregungswellenlängenbereich derart zu erweitern. Damit würden dann mit dem Laser Scanning Mikroskop (CLSM) Speziations-Untersuchungen einer ganzen Reihe radioaktiver Schwermetallionen im mikroskopischen Bereich über eine Fläche, und in die Tiefe einer biologischen Probe durchführbar sein.

Die nach der Laseranregung von der Probe ausgehenden Photonen, aus denen sich das Fluoreszenzsignal zusammensetzt, werden in der SPAD (Single Photon Avalan-

che Diode) einzeln detektiert, verstärkt und in einer HydraHarp (Multichannel Picosecond Event Timer & TCSPC Module) im Verhältnis zur Anregung in ein Histogramm geordnet, welches dann die zeitliche Abklingkurve der Fluoreszenz beschreibt.

Das zeitliche aufeinander Abstimmen des Arbeitens der einzelnen Messsystem-Komponenten (Laserpuls, SPAD, HydraHarp) erfolgt mit Delay-Generatoren.

Indizien für das Auftreten von U(VI) Spezies in Grubenwasser neben fluoreszierendem biologischem Material konnten so über die Lebenszeiten mit SPAD und HydraHarp gefunden werden.

Auf diese Weise gelang es zudem, die Fluoreszenzlebenszeitkurve von U(VI) Species, die sich an der Oberfläche von den Protozoen „Augentierchen“ (*Euglena Mutabilis*) befanden, aufzuzeichnen. Diese Kurve wies anfänglich eine schnell abfallende Fluoreszenz auf, die in eine deutlich langsamer abfallende Fluoreszenz überging. Dies spricht für einen schnell abfallenden Anteil von Fluoreszenz, der von organischen Stoffen der Einzeller hervorgerufen wird, sowie einen langsamer abklingenden Fluoreszenzanteil, der von den Uranylspezies stammt. Nimmt man so einen bi-exponentiellen Fluoreszenzabfall an, betrug die Lebenszeit der von Organika verursachten Fluoreszenz 35 ns, während dessen die Lebenszeit des den Uranylspezies zuordenbaren Fluoreszenzanteils der Gesamtfluoreszenz 24  $\mu$ s betrug. Die so von der Fluoreszenz der Uranylspezies ermittelte Lebenszeit von >10  $\mu$ s spricht für phosphatgebundenes Uranyl. Damit gelang an diesem Beispiel einer Augentierchen Suspension, die vorher einer definierten U-Lösung ausgesetzt waren, das nebeneinander Bestimmen von Organika verursachter- und von radioaktiven Schwermetallionen verursachter Fluoreszenz mit diesem Messsystem.

### **3. Fortschreibung des Verwertungsplanes**

Die Untersuchungen zur Immobilisierung von radioaktiven und toxischen Schwermetallen durch Biofilme sollen Sanierungsstrategien von kontaminierten Wässern liefern. Unsere Arbeiten haben gezeigt, dass (auch in urankontaminierten Milieus vorkommende) Eukaryonten in der Lage sind, Radionuklide zurückzuhalten. Diese Erkenntnis ist ein kleiner Schritt auf dem Weg zu mikrobiologisch ausgerichteten Sanierungsstrategien. Für diese ist aber noch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen notwendig.

#### **4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben**

Hochradioaktives Americium konnte nicht wie geplant eingesetzt werden, da die dafür vorgesehenen biologischen Systeme nicht ausreichend verstanden waren.

#### **5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer**

Die Ergebnisse der Arbeiten im Rahmen dieses Projektes wurden auf Workshops und internationalen Treffen und Konferenzen vorgestellt. So erfuhr ein breiter Publikums- oder Anwenderkreis davon. Um bessere Vorhersagen zum Ausbreitungsverhalten und den Transportwegen von Radionukliden wie Uran in der Umwelt treffen zu können, ist es unumgänglich, den Einfluss der Mikrobiologie bei der Erforschung von deren Umweltverhalten besser zu berücksichtigen.

#### **6. Ausgaben- und Zeitplanung**

Das Projekt wurde gemäß dem Arbeitsplan durchgeführt.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN ISSN 2191-8708	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel  Einfluss von Biofilmen auf das Migrationsverhalten von Uran, Americium und Europium in der Umwelt	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Baumann, Nils Zirnstein, Isabel Arnold, Thuro	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31. 12. 2013
	6. Veröffentlichungsdatum 27.02.2015
	7. Form der Publikation HZDR-Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Ressourcenökologie HZDR Bautzner Landstraße 400 01328 Dresden	9. Ber. Nr. Durchführende Institution HZDR-061
	10. Förderkennzeichen 02NUK015F
	11. Seitenzahl 300
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 578
	14. Tabellen 46
	15. Abbildungen 70
16. Zusätzliche Angaben Es handelt sich nicht um einen Fortsetzungsbericht.	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Die Ergebnisse sind publiziert (siehe oben Punkt II.6. und Anhang).	

18. Kurzfassung

1. Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik

Im Gegensatz zum Einfluss anorganischer Immobilisierungsprozesse auf das Ausbreitungsverhalten von Radionukliden in der Umwelt ist der Einfluss der Mikrobiologie und besonders der von Biofilmen auf den Transport und die Immobilisierung von Radionukliden bislang kaum erforscht; und dies obwohl bekannt ist, dass Biofilme die Speziation von Radionukliden durch Veränderungen geochemischer Gradienten innerhalb der Biofilme und durch die Produktion von Metaboliten maßgeblich beeinflussen und damit das Transportverhalten von Radionukliden stark verändern können.

2. Begründung/ Zielsetzung der Untersuchung

Die Mechanismen von Immobilisierungsprozessen radioaktiver Schwermetall-Ionen innerhalb von Biofilmen sind nicht bekannt. Das liegt an der Komplexität der Biofilme, welche häufig diskrete geochemische Mikromilieus bilden, die sich von der umgebenden „Bulk Solution“ in Bezug auf deren mikrobieller Diversität, den geochemischen Bedingungen, wie z.B. dem Redoxpotential  $E_h$  sowie der gelösten Sauerstoffkonzentration, aber auch in der Konzentration potentieller Komplexbildner wie Metaboliten und EPS Komponenten, deutlich unterscheiden. Alle diese Faktoren können die Speziation der Radionuklide verändern und damit auch deren Transportverhalten in der Umwelt. Dazu sollte die Biozönose (die Diversität der Mikroorganismen) in Gruben des ehemaligen WISMUT Uranerzbergwerkes Königstein über mehrere Jahre hinweg nach klassischen mikrobiologischen Methoden und mit molekularbiologischen Techniken erstmalig bestimmt werden. Innerhalb dieses Projektes war so beabsichtigt, ein Prozessverständnis zu den Wechselwirkungen von Radionukliden mit natürlichen, in urankontaminierten Milieus lebenden Mikroorganismen zu erfassen. Aus einem Vergleich der Chemie im Biofilm mit der Chemie der umgebenden Lösung soll der Einfluss der Biofilme auf das Migrationsverhalten von Radionukliden in der Natur geklärt werden. So sollen verbesserte Aussagen zur Mobilität von Radionukliden in der Natur möglich sein.

3. Methode

Zur Züchtung der Biofilme aus den Grubenwässern wurde eine geeignete Flusszelle mit verschiedenen Aufwuchsträger-Materialien hergestellt und installiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der Prokaryoten erfolgte u.A. mit der CARD FISH Methode. Die selektive Visualisierung der EPS- Komponenten in der Matrix der Biofilme erfolgte (mit Hilfe von Lektinen) mit der mikroskopischen Technik der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM). - Die Fluoreszenzlebenszeitkurve von U(VI) Species, die sich an der Oberfläche von den Protozoen *Euglena Mutabilis* befanden, wurde mit der Time-Correlated Single-Photon Counting Methode (TCSPC) und mit Hilfe einer Single-Photon Avalanche Diode (SPAD) ermittelt. Zur Untersuchung der Speziation von flüchtigen Schwermetall-Ionen wie U(VI) kam die zeitaufgelöste, laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) zum Einsatz.

4. Ergebnis

Die Biozönose (die Diversität der Mikroorganismen) in Gruben des ehemaligen WISMUT Uranerzbergwerkes Königstein wurde über mehrere Jahre hinweg nach klassischen mikrobiologischen Methoden und mit molekularbiologischen Techniken erstmalig bestimmt. Damit wurde auch die Variabilität der mikrobiellen Population im Grubenwasser planktonisch und im Biofilm erfasst. Die Ergebnisse waren Grundlage für im Labor durchgeführte Bioakkumulations- bzw. Biosorptionsexperimente an Biofilmen aus natürlich vorkommenden Wässern mit Radionukliden und nicht radioaktiven Schwermetall-Ionen. Für die Experimente wurde die Zeit-aufgelöste Laser-induzierte Fluoreszenz Spektroskopie (TRLFS) methodisch weiter entwickelt. Das Konfokale Laserscanning Mikroskop (CLSM) wurde dergestalt modifiziert, dass eine gepulste Laseranregung auf mikroskopisch kleinem Raum mit verschiedenen Wellenlängen über einen breiten Wellenlängenbereich möglich ist. Der breite Anregungs-wellenlängenbereich wurde durch die Einbindung von Frequenzvervielfachern erreicht. Für die Auswertung des (entsprechend des mikroskopisch kleinen Anregungsraumes) sehr geringen Fluoreszenzsignales wurde die Einzelphotonenzählung an das Laser-Anregungssystem angepasst.

5. Schlussfolgerungen/Anwendungsmöglichkeiten

Die Arbeiten werden im Rahmen des Nachfolgeprojektes „TransAqua“, Arbeitspaket 4.3: „Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen unter Tage lebenden Mikroorganismen mit Uran und deren Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in gefluteten Urangruben“ in ähnlicher Weise fortgeführt. Um die Entwicklung möglicher Bioremediationstechniken voran zu treiben, sind gezielte Untersuchungen mit in radioaktiv kontaminierten Milieus lebenden Mikroorganismen notwendig, die zur Immobilisierung gelöster Radionuklide beitragen könnten.

19. Schlagwörter

Uran, AMD, Mikrobiologie, Biozönose, TRLFS, TCSPC

20. Verlag

21. Preis

V. **Anhang**

Zirnstein, I.; Arnold, T.; Krawczyk-Bärsch, E.; Jenk, U.; Bernhard, G. & Röske, I. (2012): Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine. <i>MicrobiologyOpen</i> , 1(2), 83-94. ....	27
Baumann, N.; Arnold, T. & Lonschinski, M. (2012a): TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil. <i>Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry</i> , 291, 673-679. ....	39
Baumann, N.; Arnold, T. & Lonschinski, M. (2012b): Speciation of Uranium in Seepage and Pore Waters of Heavy Metal-Contaminated Soil. In: Erika Kothe & Ajit Varma (Editors) <i>Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils</i> . ISBN 978-3-642-23326-5, Springer, 131-141. ....	47
Baumann, N.; Arnold, T. & Haferburg, G. (2013): Uranium in mashrooms related to the iron and manganese concentrations. <i>Report HZDR-030</i> , ISSN 2191-8708, p. 30. ....	59
Baumann, N. & Arnold, T. (2014): Laser fluorescence lifetime of uranyl species onto <i>Euglena mutabilis</i> determined with single photon avalanche diode and a multichannel event timer. <i>Report HZDR-048</i> , ISSN 2191-8708, p. 10. ....	61
Zirnstein, I.; Köppchen, S.; Röske, I. & Arnold, T. (2014): Cultivation of microorganisms live in the mine water of the former uranium mine Königstein, Germany. <i>Report HZDR-048</i> , ISSN 2191-8708, p.11. ....	63
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. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> , 21, 6921-6929. ....	65
Zirnstein, I.: Charakterisierung der Mikroorganismen im sauren Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein. Dissertation, TU Dresden 2015. ....	75



## Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine

Isabel Zirnstein<sup>1</sup>, Thuro Arnold<sup>1</sup>, Evelyn Krawczyk-Bärsch<sup>1</sup>, Ulf Jenk<sup>2</sup>, Gert Bernhard<sup>1,3</sup> & Isolde Röske<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Resource Ecology, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V., P.O. Box 510119, D-01314 Germany

<sup>2</sup>Wismut GmbH, Jagdschänkenstraße 29, D-09117 Chemnitz, Germany

<sup>3</sup>Institute of Chemistry, Technical University Dresden, D-01062 Dresden, Germany

<sup>4</sup>Institute of Microbiology, Technical University Dresden, Zellescher Weg 20 b, D-01217 Dresden, Germany

### Keywords

18S rDNA PCR, acid mine drainage, biofilm, environmental microbiology, eukaryote, microbial biodiversity, microbial ecology, uranium.

### Correspondence

Isabel Zirnstein, Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf e.V.; Institute of Resource Ecology; P.O. Box 510119, D-01314 Dresden.  
 Tel: +49 (351) 260-3487;  
 Fax: +49 (351) 260-3553;  
 E-mail: i.zirnstein@hzdr.de

Supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (project number 02NUK015F).

Received: 2 November 2011; Revised: 31 January 2012; Accepted: 6 February 2012

*MicrobiologyOpen* 2012; 1(2): 83–94

doi: 10.1002/mb3.17

### Abstract

The underground uranium mine Königstein (Saxony, Germany), currently in the process of remediation, represents an underground acid mine drainage (AMD) environment, that is, low pH conditions and high concentrations of heavy metals including uranium, in which eye-catching biofilm formations were observed. During active uranium mining from 1984 to 1990, technical leaching with sulphuric acid was applied underground on-site resulting in a change of the underground mine environment and initiated the formation of AMD and also the growth of AMD-related copious biofilms. Biofilms grow underground in the mine galleries in a depth of 250 m (50 m above sea level) either as stalactite-like slime communities or as acid streamers in the drainage channels. The eukaryotic diversity of these biofilms was analyzed by microscopic investigations and by molecular methods, that is, 18S rDNA PCR, cloning, and sequencing. The biofilm communities of the Königstein environment showed a low eukaryotic biodiversity and consisted of a variety of groups belonging to nine major taxa: ciliates, flagellates, amoebae, heterolobosea, fungi, apicomplexa, stramenopiles, rotifers and arthropoda, and a large number of uncultured eukaryotes, denoted as acidotolerant eukaryotic cluster (AEC). In Königstein, the flagellates *Bodo saltans*, the stramenopiles *Diplophrys archeri*, and the phylum of rotifers, class *Bdelloidea*, were detected for the first time in an AMD environment characterized by high concentrations of uranium. This study shows that not only bacteria and archaea may live in radioactive contaminated environments, but also species of eukaryotes, clearly indicating their potential influence on carbon cycling and metal immobilization within AMD-affected environment.

## Introduction

In-situ leaching of uranium ores with sulfuric acid has been applied worldwide, for example, in the United States, Australia, China, Russia, Ukraine, Bulgaria, Czech Republic (Hennig et al. 2007) to extract uranium from rock matrices. The same technique has also been employed underground in the uranium mine Königstein near Dresden in Saxony/Germany from 1984 to 1990 by injecting sulfuric acid into the sandstone host rock. The uranium bearing liquid was collected and further processed (Zeissler et al. 2006). The longstanding treatment of the uranium containing sandstone host rock with sulfuric acid resulted in the formation of acid mine drainage (AMD). AMD or acid rock drainage (ARD) is a severe environmental problem characterized by

very high metal and sulfate concentrations and very low pH values, and in Königstein by uranium concentrations of up to  $3 \times 10^{-4}$  M (Arnold et al. 2011). The underground uranium mine Königstein is currently in the process of remediation, which is realized by controlled flooding. The acidic flooding water that contains elevated concentrations of radionuclides and heavy metals is collected and pumped out and treated on the surface by a conventional water treatment plant.

Even though acid mine waters are known to be toxic to aquatic organisms (Barton 1978; Kelly 1988), they are also known as surface waters to contain abundant microbial life (Nordstrom and Southam 1997). Heterotrophic microbes living underground in biofilm communities appear as dense slime streamers in flowing metal-rich acidic water or grow as stalactite-like forms from the gallery ceilings (Edwards

et al. 2000; Espana et al. 2005; Hallberg et al. 2006). Acid slime streamers have already been described, for example, by Lackey (1938) who identified flagellates, rhizopods, ciliates, and green algae, and by Dugan et al. (1970) who isolated bacteria and yeasts.

Transport of uranium in the bulk solution predominantly occurs as aqueous uranium species and is heavily influenced by its surrounding, that is, inorganic and organic reactions. Currently applied performance assessment studies on the transport of heavy metals focus mainly on chemical aspects and ignore the potential influence of metabolically active microorganisms. Such metabolically active microorganisms live in biofilms attached to surfaces. Biofilms are not only composed of bacteria, but may also include archaea and eukaryotic organisms (Flemming and Wingender 2001).

So far microbial studies focus mainly on the elucidation of the bacterial diversity in uranium-contaminated AMD (Bruynesteyn 1989; Chang et al. 2001; Hwang et al. 2009; Selenska-Pobell et al. 2009) and do not include the identification of eukaryotes. However, eukaryotic life in uranium-contaminated environments, for example, waste heaps, is not rare but only little investigated. These studies concentrate mainly on individual groups of eukarya and shown that different algae species (Sakaguchi et al. 1978; Horikoshi et al. 1981; Nakajima et al. 1982) and some fungi (Galun et al. 1983; Nakajima and Sakaguchi 1993) are able to accumulate uranium. The full diversity of eukaryotes living in such underground AMD affected by high concentrations of uranium is unknown, and their potential ecological roles in acidic environments remain poorly understood. The first step to better assess their potential influence on the migration behavior of uranium in the geobiosphere is thus the determination of the on-site present eukaryotic biodiversity.

In this study, a eukaryotic rRNA gene library was generated together with a detailed microscopic examination to determine the present eukaryotic diversity in the underground acidic uranium mine environment in Königstein, Saxony, Germany. In addition, light microscopy investigations were performed to visually identify observed eukaryotic species in the biofilm samples collected underground in the mine galleries. With the acquired information, a better evaluation on the potential influence of eukaryotes on the carbon cycling and metal immobilization should be possible.

## Results

### Geochemical parameters

The geochemical conditions in the drainage water channels as well as the composition of the dripping stalactite waters in the underground environment of the uranium mine in Königstein have been described in detail by Arnold et al. (2011). The water in the underground drainage channel is

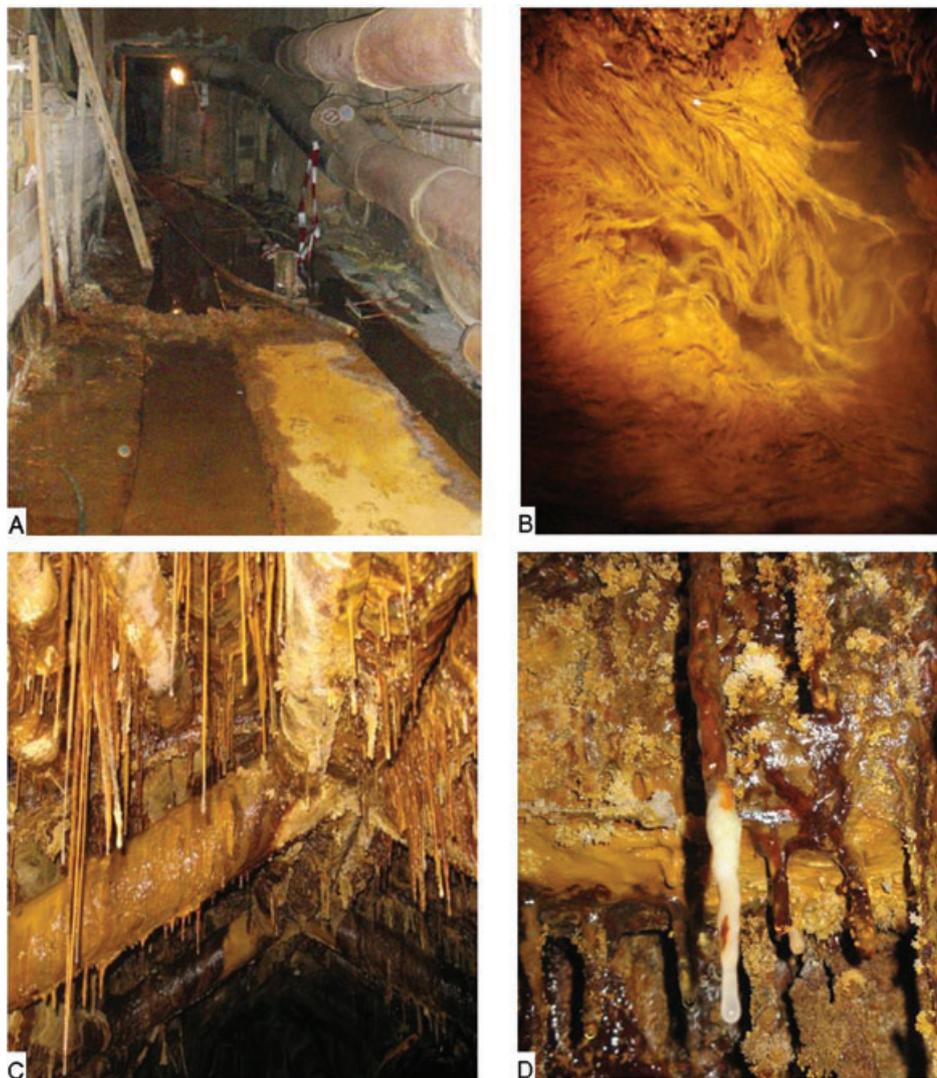
characterized by a relatively constant (almost seasonally independent) on-site temperature ranging between 13°C and 15°C, a low pH of around  $2.86 \pm 0.05$ , and by high concentrations of Fe (47–90 mg/L),  $\text{SO}_4^{2-}$  (707–920 mg/L), and uranium (9.3–14.2 mg/L). The stalactite water shows an even lower pH of  $2.55 \pm 0.05$  and higher concentrations of Fe (225–381 mg/L),  $\text{SO}_4^{2-}$  (2210–2520 mg/L), and uranium (39.5–69.5 mg/L).

There are two types of ecological niches in the underground mine galleries of the AMD environment in Königstein forming habitats for microbial life. The first type of habitat is in the drainage channels (Fig. 1A and B) and is characterized by flowing water and a mixture of brown-colored sediments and microorganisms living in biofilm consortia with acid streamer morphology attached to the substrate. The precipitates are the result of the biologically mediated iron oxidation carried out by Fe-oxidizing microorganisms that live in and on the Fe precipitates forming copious biofilms. Similar processes representing another microbial habitat in the Königstein mine galleries were observed in stalactite-like dripstones growing at the gallery ceilings (Fig. 1C and D). They showed solid orange brownish precipitates at the top parts and soft gel-like whitish to translucent endings. The bacterial diversity of these two types of biofilm communities was already described by Brockmann et al. (2010) who found that the acidophilic iron-oxidizing betaproteobacterium *Ferroplasma mycofaciens* was dominating the bacterial diversity.

### Microscopic characterization

Light microscopy was used to identify the eukaryotic diversity in the two types of biofilms of the AMD environment of Königstein. Most eukaryotes were visible by microscopy because of their cell size of  $>2 \mu\text{m}$ . The result showed that both biofilm habitats, that is, stalactites and acid streamers, were composed of bacteria and eukaryotes. Different genera of amoebae, heterolobosea, stramenopiles, flagellates, ciliates, rotifers, and fungi were identified (see Figs. 2 and 3). Flagellates, stramenopiles, and rotifers were observed for the first time in such an underground AMD environment affected by high concentrations of uranium.

The flagellates, the smallest eukaryotes, in the AMD biofilms from the Königstein gallery environment ranged in size from 4 to 5  $\mu\text{m}$  in width and from 10 to 20  $\mu\text{m}$  in length (including flagellum). Stramenopiles, that is, *Diplophrys archeri* were approximately  $8 \times 20 \mu\text{m}$  in size. Amoebae species, that is, *Vannella* cells were approximately 10  $\mu\text{m}$  in diameter and thecamoebae cells ranged in size from 30 to 60  $\mu\text{m}$  in diameter. Heterolobosea, that is, *Vahlkampfia* and *Naegleria* varied from  $15 \times 20 \mu\text{m}$  in width to 30  $\mu\text{m}$  in length. The ciliates were bigger than the above-mentioned groups (Fig. 3A) and ranged in size from 40  $\mu\text{m}$  in width and from 60 to 100  $\mu\text{m}$  in length. Some ciliates

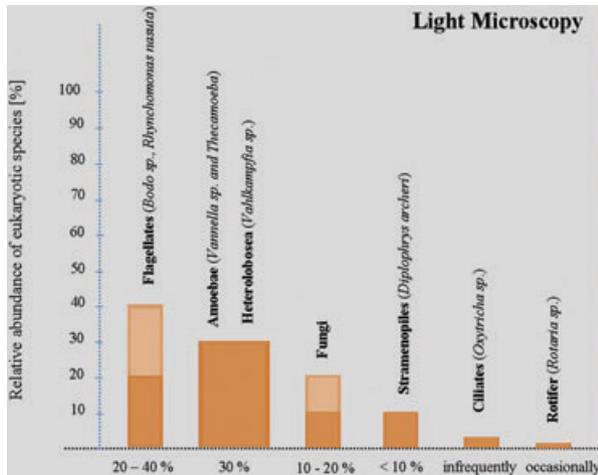


**Figure 1.** (A) Overview of the gallery in pit 390 + 50 m floor in the former uranium mine Königstein (Germany) showing the drainage channel. (B) Close-up of the acid streamer biofilms growing in the drainage channel of the gallery. (C) Stalactites hanging from the ceiling. (D) Stalactite-like biofilms in detail.

showed, however, roundish forms with diameters of approximately  $50\ \mu\text{m}$ . Bdelloid rotifers, belonging to the metazoans, that were the largest organisms in the underground AMD biofilm environment of Königstein with  $50\ \mu\text{m}$  in width and  $200\ \mu\text{m}$  in length. Fungi had hyphae that are more than  $100\ \mu\text{m}$  in length and  $2\text{--}5\ \mu\text{m}$  in width. The eukaryotic diversity of the acid streamer biofilms and the stalactite biofilms based on light microscopy and was nearly identical. Figure 2 shows the visualized groups of the identified eukaryotes in the Königstein environment together with their relative abundance. In addition, examples of micrographs of the observed eukaryotes in the two types of habitats are shown in Figure 3.

Light microscopy showed that flagellates were the dominant eukaryotic group in both biofilm habitats. Of all eukaryotes 20–40% were flagellates, in terms of biomass (Fig. 2). *Bodo saltans* (Fig. 3B) was the dominant flagellate species. In addition, *B. angustus* and *Rhynchomonas* species were sporadically observed in the acid streamer biofilms. Amoebae were also frequently observed in the biofilm samples and were attributed to *Vannella* species as well as *Thecamoeba* species (Dykova et al. 2008).

Eukaryotic species belonging to the representatives of the heterolobosea, a group of amoeboid protists, first described by Page and Blanton (1985), were also observed. The heterolobosea were represented by *Vahlkampfiidae*,



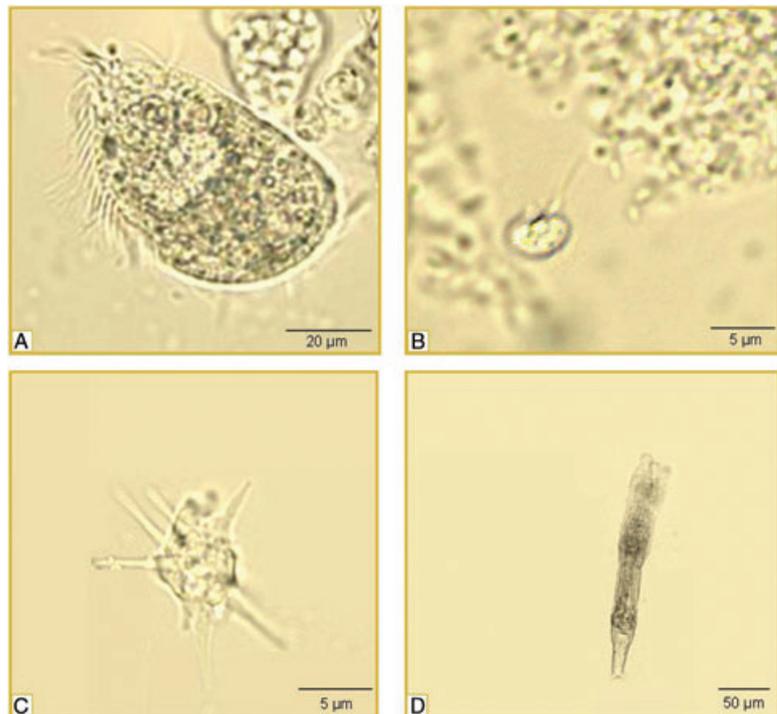
**Figure 2.** The relative abundance of the identified eukaryotes in both biofilms (stalactite and acid streamer) habitats of the Königstein environment detected by light microscopy. The light- and dark-colored bars are based on a percentage variation of the eukaryotic presence.

*Paravahlkampfiidae*, and *Naegleriidae*. *Vahlkampfia* species were detected in very high abundance. The amoebae together with the heterolobosea made up approximately 30% of the total number of eukaryotes. Stramenopiles were also constituents of the biofilm habitat. However, they were only detected in limited numbers (<10%). The dominant iden-

tified stramenopiles species was the amoebae-like *D. archeri*. Fungal filaments were observed in all biofilm samples. In stalactite biofilms, the hyphae made up between 10 and 20% of the cell biomass. In the acid streamer biofilms, the contribution of the fungal hyphae was lower and amounted to approximately 5% of the total cell biomass. Ciliates were rarely detected in the biofilm samples. In most instances the observed specimen were attributed to *Oxytricha*. Another class observed in the Königstein environment were bdelloid rotifers (Fig. 3D), which were occasionally observed in the stalactite biofilms, however not in the acid streamer biofilms.

### Eukaryotic diversity in biofilms by 18S rDNA PCR

To evaluate the level of eukaryotic diversity, 18S rDNA analyses were performed with samples from the Königstein biofilm habitats. In total, 103 clones were obtained of the eukaryote 18S rRNA genes of both the acid streamer biofilms and the stalactite biofilms and subsequently sequenced (Table 1). A sequence identity search by comparison with the NCBI gene databank confirmed that all clones were eukaryotic and were grouped into 23 OTUs (operational taxonomic unit). Six OTUs were identified in the acid streamer habitat, 15 OTUs were detected in the stalactite habitat, and two OTUs occurred in both habitats. Five phylogenetic groups, that is, fungi, ciliates, apicomplexa, heterolobosea, and arthropoda, were identified within the 23 OTUs. In addition, 13 OTUs



**Figure 3.** Examples of micrographs showing the eukaryotes observed in the two types of biofilm habitats of the underground acid uranium environment of Königstein. (A) Ciliate species; (B) flagellate species *Bodo saltans*; (C) *Vahlkampfia* species; (D) bdelloid rotifers (*Rotatoria*).

were assigned to uncultured species associated with acidotolerant eukaryotic clusters (AECs), whereby one of these 13 OTUs (KS\_S.8) was found in both types of biofilm. The assignment of the identified OTUs to the phylogenetic groups is shown in Table 1.

### Molecular composition of biofilms

The sequence search with the NCBI gene databank showed that four of 23 18S rDNA sequences from Königstein mine had significant identity (more than 99%) to known sequences. The maximum sequence identities of the other sequences to known eukaryote 18S rDNAs ranged from 87% to 98% (Table 1). The allocation of the identified clones to their phylogenetic groups of the two types of biofilms show their relationship to reference sequences and is graphically displayed in a circle library shown in Figure 4.

One observed phylogenetic group was attributed to the alveolates with their subgroups ciliates and apicomplexa (see Fig. 4). Four sequences (KS\_D.1, KS\_D.3, KS\_D.8, and KS\_S.1) were assigned to the class ciliates and two clones (KS\_S.2, KS\_S.15) to the class apicomplexa. The clones KS\_D.1, KS\_D.3, and KS\_D.8 are 99% similar to three differ-

ent *Vorticella* species, that is, *Vorticella fusca*, a poorly known species (Precht 2001), *V. convallaria*, and *V. gracilis*.

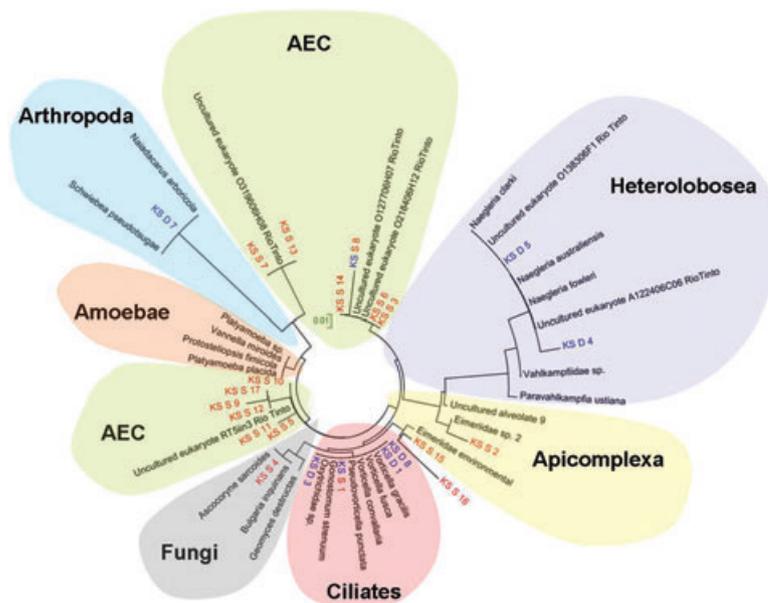
Two clones (KS\_S.2, KS\_S.15) were attributed to the alveolate lineage and match with the apicomplexa family *Eimeriidae*. However, the affinity of these two clones with known sequences of *Eimeriidae* of the NCBI gene databank is not strongly supported by bootstrapping (89% and 96%, respectively).

Two detected heterolobosea sequences (KS\_D.4 and KS\_D.5) related with 94% similarity to *Naegleria australiensis* and *N. clarki*. *Naegleria* species were only detected in the acid streamer biofilm samples. This cluster of the heterolobosea lineage includes two additional reference sequences defined as uncultured eukaryotes, which also have been found in the mining-affected Rio Tinto environment in Spain (O138306F10, A122406C06 [Amaral-Zettler et al. 2011]).

Fungi have been isolated from extreme habitats all over the world and were also found in the underground environment of Königstein. The Fungi sequences were related to the ascomycota, chytridiomycota, and zygomycota groups, and were found exclusively in stalactite biofilms. Clone KS\_S.4 is 99% similar to ascomycota sequences, *Ascocoryne sarcoides*.

**Table 1.** Clones from the NCBI 18S rRNA gene library and their taxonomic affiliations.

GenBank accession no.	OTU name	Number of clones	Closest BLAST match	Similarity percentage	Taxonomic affiliation
<b>Stalactites</b>					
EF024975.1	KS_S.1	6	Oxytrichidae environmental sample	>99	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
EF024492.1	KS_S.2	9	Eimeriidae environmental sample	>89	Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa
	KS_S.15				
FN866184.1	KS_S.3	5	Uncultured eukaryote clone O218406H12	>98	Eukaryota
	KS_S.6				
EU940066.1	KS_S.4	13	Fungal sp. M258 isolate M258	>99	Eukaryota; Fungi
EU091865.1	KS_S.5	1	Uncultured Banisveld eukaryote clone P4-3m5	>97	Eukaryota
FN867225.1	KS_S.7	11	Uncultured eukaryote clone O319606H08	>99	Eukaryota
	KS_S.13				
FN865594.1	KS_S.8	6	Uncultured eukaryote clone O127706H07	>97	Eukaryota
	KS_S.14				
EU910606.1	KS_S.9	1	Uncultured alveolate clone G40	>89	Eukaryota
AY082996.1	KS_S.10	1	Uncultured eukaryote clone RT5iin3	>98	Eukaryota
FJ592496.1	KS_S.11	1	Uncultured eukaryote clone F11_SE1B	>93	Eukaryota
AF372716.1	KS_S.12	1	Uncultured fungus clone LEM108	>87	Eukaryota
GU290114.1	KS_S.16	2	Uncultured eukaryote clone TKR07M.132	>92	Eukaryota
AF372716.1	KS_S.17	1	Uncultured eukaryotic picoplankton clone P34.42	>93	Eukaryota
<b>Acid streamers</b>					
EF024975.1	KS_S.1	4	Oxytrichidae environmental sample	>99	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
FN865594.1	KS_S.8	3	Uncultured eukaryote clone O127706H07	>97	Eukaryota
DQ868349.1	KS_D.1	23	<i>Vorticella</i> sp. JCC-2006-4	>97	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
DQ868348.1	KS_D.3	1	<i>Vorticella convallaria</i>	>97	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora
DQ768720.1	KS_D.4	7	<i>Naegleria</i> sp. RR13ZI	>94	Eukaryota; Heterolobosea; Vahlkampfiidae
AY321362.1	KS_D.5	1	<i>Naegleria australiensis</i> isolate TT	>94	Eukaryota; Heterolobosea; Vahlkampfiidae
EU152499.1	KS_D.7	5	<i>Schwiebia pseudotsugae</i>	>95	Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Acari
DQ190468.1	KS_D.8	1	<i>Vorticella fusca</i>	>97	Eukaryota; Alveolata; Ciliophora



**Figure 4.** Phylogenetic tree based on minimum-evolution analysis of 18S ribosomal RNAs using neighbor-joining evolutionary distance model. Clones (OTUs) retrieved from the acid streamer biofilms were denoted as KS.D and are shown in blue, and clones (OTUs) from the stalactite biofilms are labeled as KS.S and are shown in red. Clones (OTUs) appearing in blue and red were identified in both types of biofilms. The scale bar corresponds to a distance of one substitution per 100 nucleotide positions.

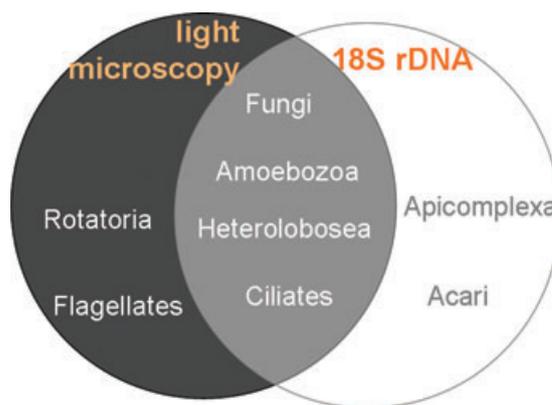
Arthropoda was associated with clone KS.D.7. This clone was collected from the acid streamers in the drainage channel and was attributed to acari and showed a 95–98% similarity to *Schwiebia pseudotsugae* and *Naiadacarus arboricola*.

The 18S rDNA fragments obtained in the Königstein biofilm samples revealed, in addition to the five above-described phylogenetic groups, a number of uncultured eukaryotes, which were denoted in the following as AEC. Almost a third of all sequences belong to the group of AEC. Most (nine of 13) of these uncultured sequences are similar to uncultured eukaryote species isolated from the Rio Tinto site.

In summary, on the basis of the eukaryotic species identified in this environment it becomes clear that eukaryotes have to be included when evaluating the biotic influence on carbon and heavy metal cycling including radionuclides in such an underground AMD environment.

### Discussion

The results, obtained by two different methods, that is, microscopic observations and 18S rDNA analyses, showed that eukaryotes live in biofilms growing in the extreme Königstein environment. Similar to the results reported by Savin and coworkers (2004), it was found that both techniques showed different results for the microbial diversity. Species of fungi, amoebozoa, heterolobosea, and ciliates were detected by both methods (Fig. 5). Genetic analyses identified the presence of apicomplexa, acari, and a cluster of AEC in the uranium mine Königstein. Additional to these results, flagellates and rotatoria were exclusively visualized by light microscopy. Both methods show deficits, as earlier reported (Vaerewijck et al.



**Figure 5.** Identification of eukaryotic groups detected by light microscopy and 18S rDNA gene analyses. Species of groups in the circle colored gray were detected by light microscopy, groups in the blue circle determined by genetic analyses. Groups situated in the overlapping part were analyzed by both methods.

2008), in determining eukaryotes from complex environmental habitats. Vaerewijck et al. (2008) found that results of light microscopy and sequencing only have a little agreement. In another study by Aguilera et al. (2010), it was shown in the identified eukaryotes of various environment samples that microscopy is the method for better and more complete results than PCR. Otherwise, several studies based on 18S rDNA (Moon-van der Staay et al. 2001; Moreira and Lopez-Garcia 2002) show high numbers of unculturable organisms, indicating higher biodiversity than detected by traditional methods.

It was difficult to identify all observed species morphologically and impossible to sequence (Vaerewijck et al. 2008). Both methods together identified a higher number of species than either method separately (Vaerewijck et al. 2008). Some research groups (Dopheide et al. 1998; Savin et al. 2004; Aguilera et al. 2006) used a similar approach, that is, a combination of light microscopy and molecular investigations, to identify biofilm communities and also found different results for the two methods.

Both biofilm sampling sites in Königstein are characterized by high concentrations of iron and uranium (Arnold et al. 2011) and represent adverse conditions for microbial life. The biodiversity of the heterotrophic eukaryotes is therefore low. Baker et al. (2009) analyzed the eukaryotic diversity in biofilms growing in slowly flowing extremely acidic, warm ( $T \sim 38^\circ\text{C}$ ), and metal-rich underground AMD solutions within the Richmond mine (California) and also reported that the encountered diversity was limited. In contrast to the rather low diversity found in Königstein and at Richmond mine, the communities obtained from the Rio Tinto River in Spain (pH 2) showed a high eukaryotic species richness (Zettler et al. 2002, 2003). Rio Tinto is an example of an extremely acidic (pH 1.7–2.5) environment with a high metal content, but with a prolific prokaryotic and eukaryotic microbial life. The reason that explains the higher diversity in Rio Tinto is the sunlight. The underground AMD environment of the former uranium mine Königstein and the underground Richmond mine are without sunlight. Here, the diversity is limited due to the absence of photoautotrophic eukaryotes.

### Producers—consumers—decomposers

In the AMD gallery environment of Königstein, chemolithotrophic acidophilic bacteria gain their energy from chemosynthesis of reduced iron and sulphur species and thereby are the primary producers of biomass (Fig. 6), and form the basis for grazing protozoa and invertebrates in this environment (Laybourn-Parry 1984). Protists grazing on acidophilic bacteria suggest that they likely influence the abundances of various community members (Wright 1988). Thus, grazing by protozoa stimulates the rate of decomposition of organic matter (Finlay and Esteban 1998). In this habitat bacteria are the basis of the food chain for phagotrophic eukaryotes, as in groundwater ecosystems (Danielopol et al. 2003).

The Königstein gallery microfauna environment is further colonized by protozoa. Like bacteria, protozoa decompose organic matter and influence the processes of nutrient recycling (Laybourn-Parry 1984) (see Fig. 6). They feed upon microfungi and bacteria and are major predators or rather consumers (Azam et al. 1983) in the uranium contaminated Königstein mine. To some extent protozoa are important

to control bacterial populations and biomass (Johnson and Rang 1993).

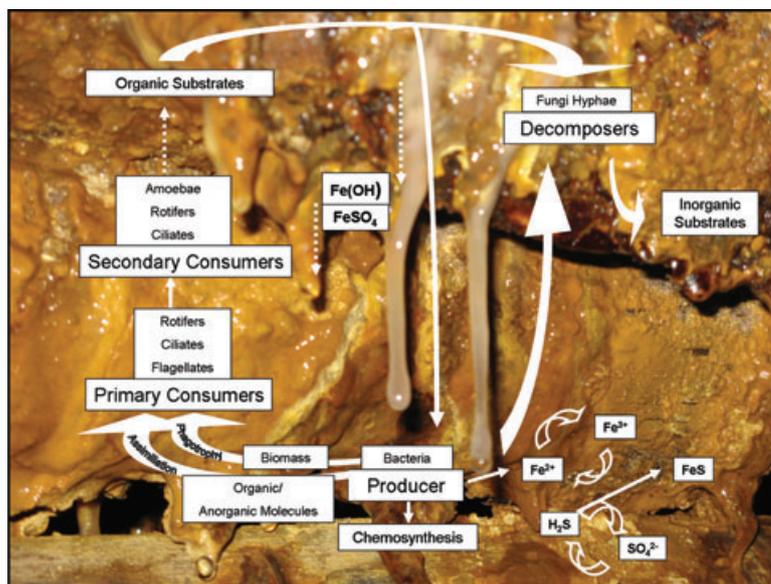
Flagellates are present in high numbers in biofilm habitats within the Königstein gallery environment. The flagellates, especially *B. saltans*, feed on bacteria and typically live in freshwater and marine ecosystem or in wastewater (Vickerman 1991). Bacteria are grazed upon mainly by small phagotrophic flagellates, which in most cases turn out to be the most efficient predators of bacteria and were able to control the bacterial populations even during their highest productivity (Bloem and Bargilissen 1989; Berninger et al. 1991). *Bodo saltans* is considered ubiquitous on earth (Patterson 1990). The heterotrophic flagellates including *B. saltans* are comparatively resistant and adaptive to different extreme habitats, identified, for example, in polar desert (Adams et al. 2006), acidic environments (Aguilera et al. 2010), deep sea (Lopez-Garcia et al. 2006), or in hot springs. The heterotrophic flagellates have high turnover rates and take a central position in the transfer of organic carbon in the microbial food web of Königstein.

Ciliates as primary or secondary consumers in biofilms constitute another member of the food chain (see Fig. 6) in the AMD environment containing in addition high concentrations of uranium ( $5 \times 10^{-5}$ – $3 \times 10^{-4}$  M). The natural diet of ciliates is diverse ranging from bacteria, flagellates to microalgae. Many ciliate species are predatory to other ciliates and represent the main predators (Pace and Orcutt 1981; Kilham 1988). Mainly, species of *Oxytricha* and *Vorticella* have been reported to live in very acid habitats (Porter et al. 1985), for example, in Spains Rio Tinto (Amaral Zettler et al. 2003). Both ciliate species occur in high number in both biofilm habitats (stalactites and acid streamers). *Oxytricha* species have also been observed in other extreme environments, for example, at deep sea hydrothermal vents (Lopez-Garcia et al. 2006).

Amoebae-like cells, both naked and with case, for example, the groups amoebae and heterolobosea, graze effectively on bacteria and other protists by phagocytosis and tolerate extreme environments. *Vahlkampfia* species for example were detected not only in the underground uranium mine in Königstein, but also in white smoker environments of Lost City (Lopez-Garcia et al. 2006). Investigations of Baker et al. (2009) have shown that amoebae and heterolobosea, especially *Vahlkampfia*, *Paravahlkampfia*, and *Naegleria*, living in AMD biofilm communities are able to withstand extreme acidic metal-rich environments (pH < 1).

Another group of eukaryotes was detected in Königstein, that is, rotifers (*Rotaria* sp.). They usually eat organic detritus and bacteria and/or prey on protozoa and function as primary and/or secondary consumer (Fig. 6).

Studies of Lopez-Archilla et al. (2001) suggest a close relationship between acid pH and abundance of both chemolithotrophic bacteria and filamentous fungi. Many



**Figure 6.** Model of the food chain of stalactite biofilms in the underground Königstein uranium mine.

yeasts and fungi are able to grow in acidic soils and peat bogs of pH 3–5, though fewer are active in more acidic environments (Duran *et al.* 1999; Amaral Zettler *et al.* 2002, 2003; Baker *et al.* 2004, 2009). Fungi are decomposers (together with bacteria) and main producers of inorganic substances (see Fig. 6) in the underground Königstein biofilm environment.

### Microbial ecology model of the stalactite ecosystem

The dripping water and the age of the stalactite influence the biodiversity of the stalactite biofilm habitat. Young biofilms are white or colorless with a soft and slimy consistency (see Fig. 1D). They were mainly composed of prokaryotes, in particular of iron oxidizing bacteria as described by Brockmann *et al.* (2010), who are involved in the microbially mediated oxidation of ferrous iron leading to iron precipitates in and on the stalactite. With increasing age, the stalactite-like biofilms grow in length and form solid brownish Fe precipitates at the stalactite base (see Fig. 1C and D). In parallel, the number of eukaryotic species in the stalactite biofilms increases. Similar findings were reported by Martiny *et al.* (2003) who confirmed the relationship between age and diversity in biofilms.

Bacteria are the first colonizers (Flemming and Wingender 2001). They actively form the slimy stalactite-like structures followed by small eukaryotes, for example, flagellates. In this habitat flagellates are primary consumers, which feed on bacteria.

Ciliates are present also as secondary consumers and feed on bacteria and flagellates (Laybourn-Parry *et al.* 1992). Microbial colonization reflects the age of the stalactite biofilms and is in accordance with the food chain structure. Producers,

consumers, and destruents take an active part in the stalactite biofilms. Young biofilms show colonization by bacteria, flagellates, and ciliates followed, in older biofilms by additionally occurring amoebae and fungi. Growing stalactites accumulate ferric iron. This is the reason why older stalactite biofilms show a solid orange–brownish colored basis (Fig. 6). In summary, the formation and growth of stalactites in the underground uranium mine gallery environment is characterized by a rapid increase of lithotrophic microorganism biomass followed by an increasing eukaryotic biodiversity with time. This observation was confirmed by Boe-Hansen *et al.* (2003) in their biofilm experiment in which they studied the microbial activity in drinking water, while comparing biomass and microbial diversity. Eukaryotes may also be present in such environments (Baker and Banfield 2003), however, up to date overlooked and their influence on transport and immobilization behavior so far was not at all considered in performance assessments.

The mining activity in the underground uranium mine in Königstein with subsequent remediation measures has created a specific biofilm habitat for microorganisms. The microbial community living in this ecological niche is characterized by forming a food chain due to mutual interactions between the metabolically active microorganisms.

The results of this study show that eukaryotes colonize to a greater extent extreme habitats as originally thought and are not only present but may play a substantial role in the cycling of carbon within AMD communities (Baker *et al.* 2009). In this context, it is important to include the influence of metabolically active microorganisms, not only bacteria and archaea but also eukaryotes living as biofilm community in natural ecosystem. In addition, performance assessment

studies should not exclusively focus on chemical aspects and thermodynamics but also consider microbial mediated reactions, which may significantly influence geochemical processes, including transport and immobilization reactions of toxic heavy metals.

## Experimental Procedures

### Sampling of acid streamers in mine sites

Biofilm samples were collected on two sampling campaigns during March and June 2010. Sampling sites were situated in a gallery of pit 390 (250 m underground) on level +50 m above sea level in the former uranium mine of Königstein (Saxony, Germany). The galleries were dimly lit and aerated by an underground mine ventilation system. The mine habitat offers two types of ecological niches associated with copious biofilm growth. The first one grows in the drainage channels of the galleries and occurs as gelatinous filament streamers, called acidic streamers (=macroscopic streamers as defined by Hallberg et al. [2006]) and were heavily associated with brownish iron-rich precipitates (Fig. 1A and B).

The second type of biofilm was collected in a parallel gallery by breaking off stalactite-like structures from the ceiling (comparable to snottites [Macalady et al. 2007]). These stalactite biofilms showed solid orange brownish precipitates at the base and soft gel-like whitish to translucent endings (Fig. 1C and D). Such biofilms have been described by Hose and Pisarowicz (1999), Bond et al. (2000a, b), and Ziegler et al. (2009). Both soft whitish stalactites and orange precipitates included stalactites had been sampled.

Biofilm samples for the determination of the eukaryote diversity were taken from both the drainage channel and the stalactite. The two sampling sites were approximately 50 m apart (see Fig. 1 for further details). The biofilm samples were collected in sterile glass bottles, stored at 4°C and subsequently transported to the laboratory for analysis.

### Microscopic investigations

Forty microliter of biofilm sample was placed on a glass slide with a cover slip. A phase contrast microscope (Axioskop from Carl Zeiss, Germany with an ocular E-PI 10×/20 and a Plan-Neofluar 40/0.65 PHP alternatively 100×/1.30 Oil objective lens) was used to visualize the biofilm samples. Micrographs were taken with an AxioCam microscope camera. In addition, a TCS-SP2 CLSM (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH Bensheim, Germany) was used to get information on the distribution of eukaryotes in the biofilms. The CLSM system was equipped with Helium–Neon Laser with a wavelength of 633 nm. The biofilm samples were observed with a 63× immersible objective (Leica L 63×/0.70 CORR PL, Fluotar) and an ocular HC PLAN s 10×/25. All micrographs were image processed with Jasc Paint Shop Pro 8 software

(Jasc Software, Inc.; Corel USA, 46430 Fremont Blvd. Fremont, CA 94538, USA).

### Molecular analyses of the eukaryote biofilm communities

Material was obtained from the sampling sites shown in Figure 1. The eukaryote diversity of the biofilm samples was analyzed by extracting the total DNA approximately 5 h after collection using the extraction method for acidic samples containing high concentration of iron by Johnson et al. (2005). Purifying the DNA after extraction followed an ethanol precipitation. PCR amplifications of 18S rDNA used the 515F (5'-GTGCCAAGCAGCCGCGTAA-3') and 1209R (5'-GGGCATCACAGACCTG-3') primers Baker et al. (2009). Amplification was performed for 30 cycles with an annealing temperature of 55°C using the 5'-Primer MasterMix (2,5×) from Eppendorf. The purified amplified 18S rDNA fragments were cloned into *E. coli* (Top 10F, chemical competent) using the pMBL T/A Cloning Kit (Genaxxon BioScience, Soeflinger Strasse 100, 89077 Ulm, Germany) following the manufacturers' recommendations. The 103 recombinant clones were selected by blue–white colony selection. The retrieved 18S rDNA sequences were compared to sequences available in the nonredundant nucleotide database of the National Center or Biotechnology database using BLASTN (for GenBank accession numbers see Table 1). The sequences were aligned to the closest phylogenetic relatives by using CLUSTALW version 1.7 (Thompson et al. 1994). Neighbor-joining trees were calculated by using MEGA 4 software (Tamura et al. 2007).

### Acknowledgments

We thank Dr. Klaus Hänel (former: VVB Wasserversorgung und Abwasserbehandlung, Leipzig), for analyzing the zooflagellates, U. Zimmermann/Wismut GmbH for allowing access to the sampling site, and R. Uebe and P. Lutz from the Wismut GmbH for their cooperation and assistance in biofilm sampling. We are grateful to Prof. D. Uhlmann for critically reviewing this manuscript and discussion. The work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (project number 02NUK015F).

### References

- Adams, B. J., R. D. Bardgett, E. Ayres, D. H. Wall, J. Aislabie, S. Bamforth et al. 2006. Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biol. Biochem.* 38:3003–3018.
- Aguilera, A., F. Gomez, E. Lospitao, and R. Amils. 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:593–605.
- Aguilera, A., V. Souza-Egipsy, E. Gonzalez-Toril, O. Rendueles, and R. Amils. 2010. Eukaryotic microbial diversity of

- phototrophic microbial mats in two Icelandic geothermal hot springs. *Int. Microbiol.* 13:21–32.
- Amaral Zettler, L. A., F. Gomez, E. Zettler, B. G. Keenan, R. Amils, and M. L. Sogin. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire - This ancient and hostile ecosystem hosts a surprising variety of microbial organisms. *Nature* 417:137–137.
- Amaral Zettler, L. A., M. A. Messerli, A. D. Laatsch, P. J. S. Smith, and M. L. Sogin. 2003. From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *Biol. Bull.* 204:205–209.
- Amaral-Zettler, L. A., E. R. Zettler, S. M. Theroux, C. Palacios, A. Aguilera, and R. Amils. 2011. Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *ISME J.* 5:42–50.
- Arnold, T., N. Baumann, E. Krawczyk-Barsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk, and S. Weiß. 2011. Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment analysed by laser fluorescence spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75(8):2200–2212.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyerreil, and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol.* 10:257–263.
- Baker, B. J., and J. F. Banfield. 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:139–152.
- Baker, B. J., M. A. Lutz, S. C. Dawson, P. L. Bond, and J. F. Banfield. 2004. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6264–6271.
- Baker, B. J., G. W. Tyson, L. Goosherst, and J. F. Banfield. 2009. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2192–2199.
- Barton, P. 1978. The acid mine drainage. Pp. 313–358 in J. O. Nriagu, ed. *Sulfur in the environment, Part II: ecological impacts*. Wiley-Interscience, New York.
- Berninger, U. G., B. J. Finlay, and P. Kuuppoleinikki. 1991. Protozoan control of bacterial abundances in fresh-water. *Limnol. Oceanogr.* 36:139–147.
- Bloem, J., and M. J. B. Bargilissen. 1989. Bacterial-activity and protozoan grazing potential in a stratified lake. *Limnol. Oceanogr.* 34:297–309.
- Boe-Hansen, R., A. C. Martiny, E. Arvin, and H. J. Albrechtsen. 2003. Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. *Water Sci. Technol.* 47:91–97.
- Bond, P. L., G. K. Druschel, and J. F. Banfield. 2000a. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4962–4971.
- Bond, P. L., S. P. Smriga, and J. F. Banfield. 2000b. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3842–3849.
- Brockmann, S., T. Arnold, B. Schweder, and G. Bernhard. 2010. Visualizing acidophilic microorganisms in biofilm communities using acid stable fluorescence dyes. *J. Fluoresc.* 20:943–951.
- Bruynesteyn, A. 1989. Mineral biotechnology. *J. Biotechnol.* 11:1–10.
- Chang, Y. J., A. D. Peacock, P. E. Long, J. R. Stephen, J. P. McKinley, S. J. Macnaughton et al. 2001. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3149–3160.
- Danielopol, D. L., C. Griebler, A. Gunatilaka, and J. Notenboom. 2003. Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environ. Conserv.* 30:104–130.
- Dopheide, A., G. Lear, R. Stott, and G. Lewis. 2008. Molecular characterization of ciliate diversity in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1740–1747.
- Dugan, P. R., C. B. MacMillan, and R. M. Pfister. 1970. Aerobic heterotrophic bacteria indigenous to pH 2.8 acid mine water: predominant slime-producing bacteria in acid streamers. *J. Bacteriol.* 101:982–988.
- Duran, C., I. Marin, and R. Amils. 1999. Specific metal sequestering acidophilic fungi. Pp. 521–530 in R. Amils and A. Ballester, eds. *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, Pt B 1999*. Elsevier Science Bv, Amsterdam.
- Dykova, I., I. Fiala, H. Dvorakova, and H. Peckova. 2008. Living together: the marine amoeba *Thecamoeba hilla* Schaeffer, 1926 and its endosymbiont *Labyrinthula* sp. *Eur. J. Protistol.* 44:308–316.
- Edwards, K. J., P. L. Bond, T. M. Gihring, and J. F. Banfield. 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287:1796–1799.
- Espana, J. S., E. L. Pamo, E. Santofimia, O. Aduvire, J. Reyes, and D. Baretino. 2005. Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Appl. Geochem.* 20:1320–1356.
- Finlay, B. J., and G. F. Esteban. 1998. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. *Biodivers. Conserv.* 7:1163–1186.
- Flemming, H.-C., and J. Wingender. 2001. Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie unserer Zeit* 3:169–180.
- Galun, M., P. Keller, D. Malki, H. Feldstein, E. Galun, S. Siegel, and B. Siegel. 1983. Recovery of uranium (VI) from solution using precultured penicillium biomass. *Water Air Soil Pollut.* 20:221–232.
- Hallberg, K. B., K. Coupland, S. Kimura, and D. B. Johnson. 2006. Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2022–2030.
- Hennig, C., K. Schmeide, V. Brendler, H. Moll, S. Tsushima, and A. C. Scheinost. 2007. The structure of uranyl sulfate in aqueous solution monodentate versus bidentate coordination.

- Pp. 262–264 in B. Hedman and P. Painetta, eds. X-ray absorption fine structure-XAFS13. Amer Inst Physics, Melville.
- Horikoshi, T., A. Nakajima, and T. Sakaguchi. 1981. Studies on the accumulation of heavy-metal elements in biological systems. 19. Accumulation of uranium by microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12:90–96.
- Hose, L. D., and J. A. Pizarowicz. 1999. Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. *J. Cave Karst Stud.* 61:13–21.
- Hwang, C. C., W. M. Wu, T. J. Gentry, J. Carley, G. A. Corbin, S. L. Carroll et al. 2009. Bacterial community succession during in situ uranium bioremediation: spatial similarities along controlled flow paths. *ISME J.* 3:47–64.
- Johnson, D. B., and L. Rang. 1993. Effects of acidophilic protozoa on populations of metal-mobilizing bacteria during the leaching of pyritic coal. *J. Gen. Microbiol.* 139:1417–1423.
- Johnson, D. B., N. Okibe, and K. B. Hallberg. 2005. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. *J. Microbiol. Methods* 60:299–313.
- Kelly, M. 1988. Mining and the freshwater environment. Elsevier Applied Science, London, 231 pp.
- Kilham, S. S. 1988. Complex interactions in lake communities - Carpenter, SR. *Science* 242:1450–1451.
- Lackey, J. B. 1938. The flora and fauna of surface waters polluted by acid mine drainage. *Public Health Rep.* 53:1499–1507.
- Laybourn-Parry, J. 1984. A functional biology of free-living protozoa. Univ. of California Press, Berkeley, CA.
- Laybourn-Parry, J., H. J. Marchant, and P. E. Brown. 1992. Seasonal cycle of the microbial plankton in crooked lake, Antarctica. *Polar Biol.* 12:411–416.
- Lopez-Archilla, A. I., I. Marin, and R. Amils. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microb. Ecol.* 41:20–35.
- Lopez-Garcia, P., A. Vereshchaka, and D. Moreira. 2006. Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* 9:546–554.
- Macalady, J. L., D. S. Jones, and E. H. Lyon. 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ. Microbiol.* 9:1402–1414.
- Martiny, A. C., T. M. Jorgensen, H. J. Albrechtsen, E. Arvin, and S. Molin. 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6899–6907.
- Moon-van der Staay, S. Y., R. De Wachter, and D. Vaultot. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409:607–610.
- Moreira, D., and P. Lopez-Garcia. 2002. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol.* 10:31–38.
- Nakajima, A., and T. Sakaguchi. 1993. Accumulation of uranium by basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:574–578.
- Nakajima, A., T. Horikoshi, and T. Sakaguchi. 1982. Studies on the accumulation of heavy-metal elements in biological systems. 21. recovery of uranium by immobilized microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16:88–91.
- Nordstrom, D. K., and G. Southam. 1997. Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. Pp. 361–390 in J. F. Banfield and K.H. Neelson, eds. *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals*. Mineralogical Soc. of America, Washington.
- Pace, M. L., and J. D. Orcutt. 1981. The relative importance of protozoans, rotifers, and crustaceans in a freshwater zooplankton community. *Limnol. Oceanogr.* 26:822–830.
- Page, F. C., and R. L. Blanton. 1985. The heterolobosea (Sarcodina, Rhizopoda), a new class uniting the Schiizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica* 21:121–132.
- Patterson, D. J. 1990. Jakoba-Libera (Ruinen, 1983), a heterotrophic flagellate from deep oceanic sediments. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 70:381–393.
- Porter, K. G., E. B. Sherr, B. F. Sherr, M. Pace, and R. W. Sanders. 1985. Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.* 32:409–415.
- Precht, H. 1935. Epizoen der Kieler Bucht. *Nova Acta Leopold.* 3:405–474.
- Sakaguchi, T., T. Horikoshi, and A. Nakajima. 1978. Studies on the accumulation of heavy-metal elements in biological systems. 6. uptake of uranium from sea-water by microalgae. *J. Ferment. Technol.* 56:561–565.
- Savin, M. C., J. L. Martin, M. LeGresley, M. Giewat, and J. Rooney-Varga. 2004. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microb. Ecol.* 48:51–65.
- Selenska-Pobell, S., G. Kampf, K. Flemming, G. Radeva, and G. Satchanska. 2001. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79:149–161.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Vaerewijck, M. J. M., K. Sabbe, J. Bare, and K. Houf. 2008. Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5741–5749.

- Vickerman, K. 1991. Organization of the bodonid flagellates. Pp. 159–176 *in* D. J. Patterson and J. Larsen, eds. *Biology of free-living heterotrophic flagellates*. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Wright, R. T. 1988. A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing. *Hydrobiologia* 159:111–117.
- Zeissler, K. O., K. Nindel, and T. Hertwig. 2006. Hydrochemical aspects of the flooding of the mine Konigstein - a water mixing model for recognizing the influence of groundwater by contaminated water. Pp. 713–719 *in* B. J. Merkel and A. HascheBerger, eds. *Uranium in the environment: mining impact and consequences*. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- Zettler, L. A. A., F. Gomez, E. Zettler, B. G. Keenan, R. Amils, and M. L. Sogin. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire - This ancient and hostile ecosystem hosts a surprising variety of microbial organisms. *Nature* 417:137–137.
- Zettler, L. A. A., M. A. Messerli, A. D. Laatsch, P. J. S. Smith, and M. L. Sogin. 2003. From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *Biol. Bull.* 204: 205–209.
- Ziegler, S., S. Ackermann, J. Majzlan, and J. Gescher. 2009. Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Envir. Microbiol.* 11:2329–2338.

# TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil

Nils Baumann · Thuro Arnold · Martin Lonschinski

Received: 6 June 2011 / Published online: 26 August 2011  
© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** In situ leaching of uranium ores with sulfuric acid during active uranium mining activity on the Gessenheip has caused longstanding environmental problems of acid mine drainage and elevated concentrations of uranium. To study there remediation measures the test site Gessenwiese, a recultivated former uranium mining heap near Ronnenburg/East Thuringia/Germany, was installed as a part of a research program of the Friedrich-Schiller University Jena to study, among other techniques, the phytoremediation capacity of native and selected plants towards uranium. In the first step the uranium speciation in surface seepage and soil pore waters from Gessenwiese, ranging in pH from 3.2 to 4.0, were studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). Both types of water samples showed mono-exponential luminescence decay, indicating the presence of only one major species. The detected emission bands were found at 477.5, 491.8, 513.0, 537.2, 562.3, and 590.7 nm in case of the surface water samples, and were found at 477.2, 493.2, 513.8, 537.0, 562.4, and 590.0 nm in case of the soil water samples. These characteristic peak maxima together with the observed mono-exponential decay indicated that the uranium speciation in the seepage and soil pore waters is dominated by the uranium (VI) sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ .

Due to the presence of luminescence quenchers in the natural water samples the measured luminescence lifetimes of the  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species of 1.0–2.6  $\mu\text{s}$  were reduced in comparison to pure uranium sulfate solutions, which show a luminescence lifetime of 4.7  $\mu\text{s}$ . These results convincingly show that in the pH range of 3.2–4.0 TRLFS is a suitable and very useful technique to study the uranium speciation in naturally occurring water samples.

**Keywords** Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy · TRLFS · Uranium (VI) · Speciation · Pore water · Seepage water

## Introduction

Phytoremediation is considered a clean, cost-effective and non-environmentally disruptive technology and relies on the ability that plants take up nutrients and toxic heavy metals from the surrounding pore water. This technique has been successfully applied in experiments concerning the restoration of abandoned metal-mine workings [1]. In case of increased uranium concentrations in the pore water, uranium may enter the plants, which grow on the contaminated site and accumulate in certain plant compartments, e.g., leaves and stems. Recent studies have shown that different plants species incorporate different amounts of uranium. This fact is decisive in selecting plants as hyperaccumulators to bioaccumulate uranium for remediation purposes of heavy metal contaminated soils by bio/phytoremediation.

As part of a research program of the Friedrich-Schiller University Jena for investigations of acid mining drainage (AMD) and heavy metals retention, especially uranium [2], as well as heavy metal uptake and accumulation into

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10967-011-1389-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Baumann (✉) · T. Arnold  
Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf,  
Institute of Radiochemistry, 01328 Dresden, Germany  
e-mail: n.baumann@hzdr.de

M. Lonschinski  
Friedrich-Schiller University, Institute of Geosciences,  
07743 Jena, Germany

plants, test site Gessenwiese, a recultivated former uranium mining heap close to Ronneburg in Eastern Thuringia was installed. AMD is a severe environmental problem characterized by very metal-rich waters, high sulfate concentrations and low pH. In combination with uranium mining AMD at the Gessenwiese was generated by in situ leaching of uranium ores with sulfuric acid. Despite the high concentrations of toxic heavy metals in the Gessenbach heap drainage waters many microorganisms thrive in this low pH environment and have been identified by [3, 4].

The aim of this study was to identify the speciation of aqueous uranium in surface and pore water, surrounding the plant roots growing on the test site Gessenwiese by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). TRLFS combines very low detection limits and a high sensitivity toward U(VI) complex formation in aqueous solutions [5, 6] and was used to identify the uranium speciation of sorbed uranium on different mineral surfaces [7–9], in solutions prepared in the laboratory [10], in thin mineral coatings [11, 12], and in waters from AMD [13]. Uranium has various oxidation states (i.e., III–VI) and it is well established that its transport behavior strongly depends on its oxidation state [13]. In contrast to tetravalent uranium, U(VI) is much more soluble and may migrate in the environment in dissolved form via the water path. Geochemical predictions indicate that the dissolved metals in the acid mine waters are likely present in the form of either individual free ions or as some different sulfate ionic species [14]. Sulfate is able to form strong complexes with

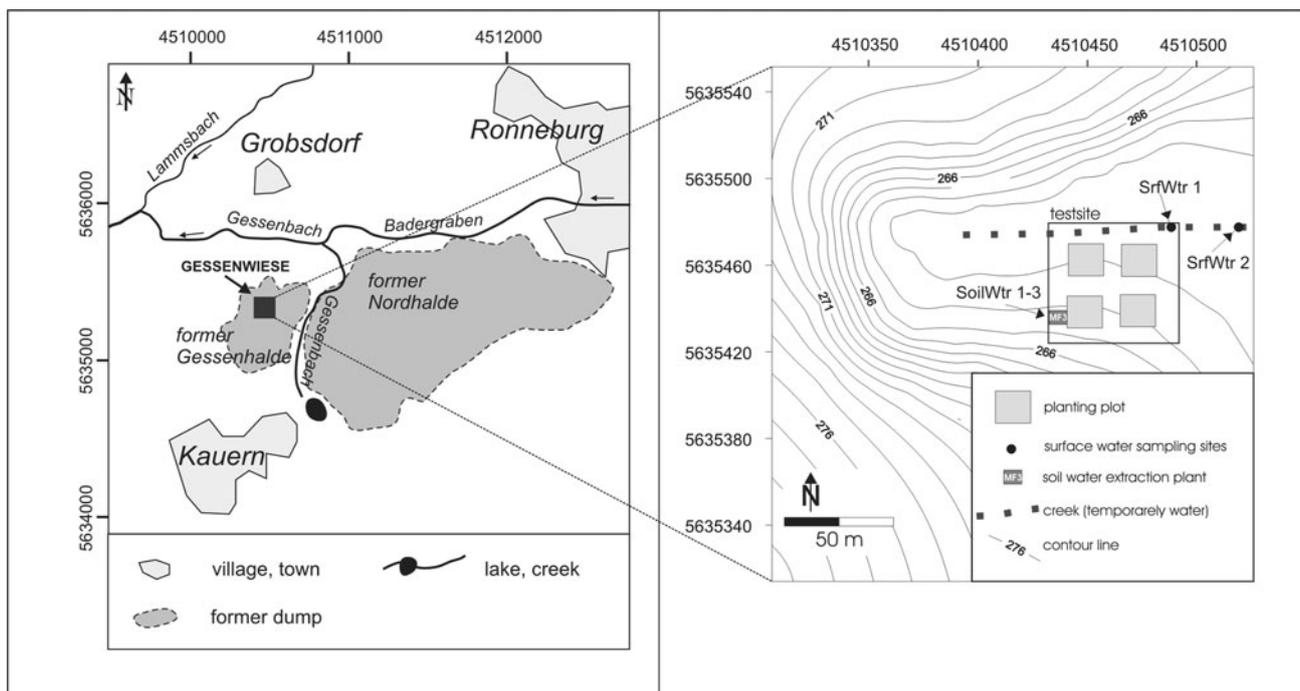
uranium and thereby strongly affects its speciation and migration [15]. Uranium sulfate complexation has been studied by TRLFS and X-ray absorption spectroscopy (EXAFS) for simple two component solutions prepared in the laboratory [15–18] and thermodynamic data are available for three sulfato species,  $UO_2SO_{4(aq)}$ ,  $UO_2(SO_4)_2^{2-}$ , and  $UO_2(SO_4)_3^{4-}$  [16, 19, 20].

The speciation of uranium in the complex pore water solution, i.e., real solution and not a synthetically prepared two component solution, surrounding the plant roots was investigated and should be the basis for a comparison with the present uranium speciation in certain plant compartments. From a comparison of the identified speciation outside and inside of the plant in the respective plant compartment conclusions should be drawn about how the uranium speciation changes during the transport into the plant and how the plant barrier were passed. This study should contribute to better understand the mechanisms of how uranium enters plant cells and how this knowledge can be applied to extract more uranium from contaminated soils by phytoremediation.

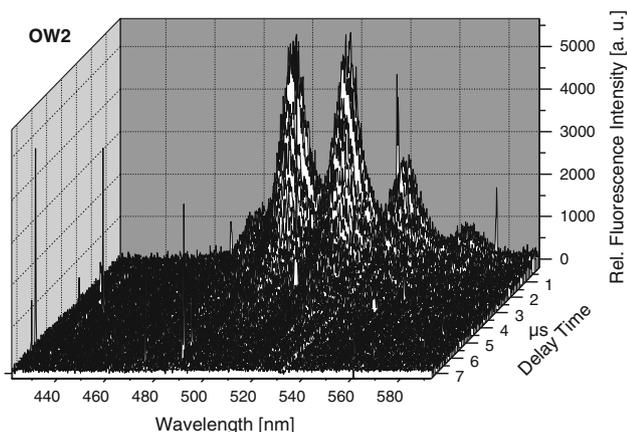
### Experimental

#### Sampling campaign

The surface water samples OW1 and OW2 were collected in and close to the test site Gessenwiese (see Fig. 1) from a



**Fig. 1** Test site Gessenwiese in eastern Thuringia (left), and sample localities within test site. Coordinates are in the German grid (Gauß-Krüger zone 4)



**Fig. 2** Time-resolved laser-induced luminescence signal obtained from sample OW2

little creek in the north of the test site on the 29th of March in 2009. Soil water samples (BW1–BW3) were taken from the site section MF 3 (Fig. 2) on the 19th of November 2009. The test field “Gessenwiese” is on the ground of a former leaching heap, a legacy of the uranium mining activity, close to Ronneburg and located between the villages Kauern and Grobsdorf (eastern Thuringia). The top of leaching heap was removed and replaced by approximately one meter thick soil cover. A more detailed description of the history and composition of the Gessenwiese are found by [2].

**Water analyses**

All water samples investigated in this study show a low pH, and contain high concentration in heavy metals, including uranium, and a high concentration in sulfate. These results are in agreement with data published in [21].

The chemical composition of seepage water samples (OW1 and OW2) and soil water samples (BW1–BW3) were analyzed for cations by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), atomic absorption spectrometry (AAS) for Na, K, Mg, and Ca, and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for Fe, respectively. An ELAN 9000 type ICP-MS spectrometer

(Perkin Elmer SCIEX, Waltham, Massachusetts, USA), a Perkin Elmer 4100 AAS, and an AAS-6F ZEE nit 600s Graphite furnace AAS with Zeeman background correction (Analytik Jena, Jena, Germany) were used for these analyses. The error of the chemical analysis for AAS analyses is only 1–2 and 5–10% for ICP-MS measurements. Anions, i.e., chloride, nitrate, phosphate and sulfate were determined by ion chromatography (IC-system 732/733, Metrohm, Filderstadt, Germany). The analytical error for the anion analyses is smaller than 5%. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN<sub>b</sub>) were obtained by a Multi-N/C 2100 (Analytik Jena, Jena, Germany). The concentrations of selected anions from the two investigated surface water samples and the three soil water samples, together with the measured pH values are listed in Table 1. Metal concentrations from these sampling sites are shown in Table 2.

**Description of the TRLFS analyses**

Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) possesses some superior features, above all a very high sensitivity for fluorescent heavy metal ions. The superiority of TRLFS compared to other spectroscopic techniques, e.g., was showed in [12].

The measurements were made with the untreated samples, directly after they were filled in quartz glass cuvettes. Within the few days between taking samples and TRLFS measurements the samples were stored at 2 °C in the refrigerator. TRLFS measurements of all water samples presented here were carried out at room temperature. The TRLFS system consists of a Nd:YAG diode laser (Inlite Continuum), where the actual laser power was monitored with an optical power meter (model LabMaster, Ultima Coherent, USA) to allow for corrections due to fluctuations in the laser power. The excitation wavelength was 266 nm. The resulting generated luminescence signal was collected perpendicular to the excitation beam and focused into a fibre optic cable that was coupled to the slit of a triple-grating spectrograph (0.5 m spectrograph, model 1236 OMA, Princeton Applied Research, USA). The luminescence spectra were measured by a charge-coupled device

**Table 1** Concentrations of anions, total organic carbon (TOC), and total nitrogen (TN<sub>b</sub>) in mg/L; and pH of the water samples. Uncertainty values are between 3 and 10%

	OW1	OW2	BW1	BW2	BW3
Chloride	48.8	82.6	3.75	1.85	11.4
Nitrate	<2	<2	<2	<2	<2
Phosphate	<5	<5	<5	<5	<5
Sulfate	3520	4480	966	1010	2530
TOC	7.54	4.90	6.38	2.36	2.04
TN <sub>b</sub>	0.50	0.46	<0.2	0.60	0.25
PH	3.84	3.76	4.02	3.40	3.27

**Table 2** Concentrations of metals in  $\mu\text{g/L}$  in the surface water and soil water samples. Uncertainty values are between 1 and 10%

	OW1	OW2	BW1	BW2	BW3
Na	7040	8570	1920	1540	2520
Mg	622000	849000	52500	11000	133000
Al	30100	43100	21500	31700	100000
Si	18600	22300	28900	32800	49500
K	4890	5350	830	1240	2010
Ca	344000	340000	209000	244000	389000
Mn	86600	97400	12000	1870	23700
Fe	8070	5390	2420	15500	18300
Co	2050	2910	331	102	1000
Ni	11400	14200	1920	751	6370
Cu	54.3	293	1120	1490	3600
Zn	1760	2870	1130	1490	2840
As	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Sr	518	612	136	81.2	251
Cd	14.1	43.3	24.4	9.76	107
Ba	17.2	16.1	10.6	7.02	7.36
Pb	64.4	31.1	1.87	0.508	8.63
U	75.1	291	322	156	890

(CCD) camera (model 7467-0008, Princeton Instruments, Inc., USA), which was cooled to 18 °C.

The spectra were recorded in the wavelength range from 430 to 600 nm. Exposure time from the camera was set to 2  $\mu\text{s}$ . In steps of 100 ns, the delay time for each following exposure after the excitation laser pulse was recorded and ranged from 30 to 8 030 ns. The average laser power was approximately 3 mJ. For every delay time, every luminescence spectrum was measured three times, and for each spectrum 100 laser shots were averaged. All functions (time controlling, device settings, recording of the spectra, data storage) of the spectrometer were computer controlled. The computer software WinSpec/32 version 2.5.19.0 (2000–2003 Roper Scientific VBScript, Microsoft Corp) was used for the deconvolution of the spectra. The decay equations and life time curves of the spectra were calculated with the Origin 7.5G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) program. Another more detailed data processing procedure, described in [12] was used in the data evaluation process too, and both methods delivered similar numerical results. The acquired TRLFS spectra displayed a high signal-to-noise ratio and sharp emission bands.

## Results

TRLFS results on the uranium speciation were obtained for natural surface and soil water samples collected from the Gessenwiese test site. These samples represent complex natural solutions containing a multitude of components.

They were no simple two component samples synthesized in the laboratory.

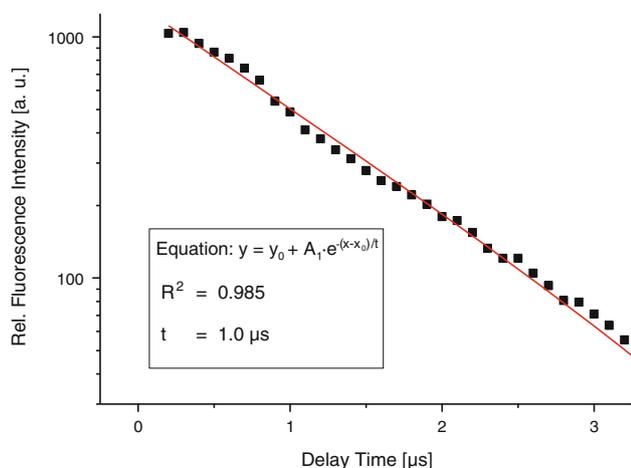
Generally, TRLFS provides two kind of spectroscopic information: the position of the emission maxima and the luminescence lifetime. In a fingerprinting procedure the measured TRLFS spectra are then identified with the help of previously recorded reference substances. At an excitation wavelength of 266 nm, the luminescence quantum yield for uranium (VI) is very high, and the respective uranium (VI) luminescence is detected in the range 470–600 nm [22].

### Surface water samples

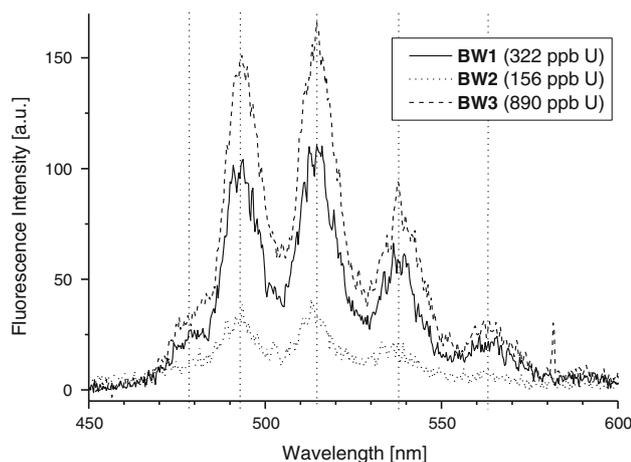
Both samples delivered an evaluable luminescence signal for TRLFS which were characteristic for uranium luminescence. A time-resolved luminescence spectrum of sample OW2 is shown in Fig. 2 and the respective emission bands are summarized in Table 3. The TRLFS-signals of both water samples showed a mono-exponential decay, indicating the presence of only one main species. The observed emission bands of these samples were found at 477, 491, 513, 537, 562, and 591 nm (478–492–513–538–562–590). The positions of the six recorded peak maxima for both water samples were in agreement with data for reported uranium sulfate species [13, 16, 18, 23]. The intensity of the luminescence signal from sample OW1 is about half of the intensity of sample OW2 and is characteristic for the different uranium content of these samples [75.1 and 291  $\mu\text{g/L}$ , respectively] (Table 2). The characteristic positions of peak maxima together with the

**Table 3** Positions of the peak maxima of the luminescence signals OW1 and OW2 in nm and their means in nm, rounded to one decimal place (uncertainty values are  $\pm 0.3$  nm), and lifetime of the signals  $t$  in  $\mu\text{s}$ , compared with data published in [18] and [13]

	First peak	Second peak	Third peak	Fourth peak	Fifth peak	Sixth peak	$t$
OW1	477.2	491.5	513.3	536.8	562.1	591.3	1.6
OW2	477.7	492.0	512.7	537.6	562.5	590.1	1.0
Means (surface wtrs.)	477.5	491.8	513.0	537.2	562.3	590.7	
[18]	477	493	515	538	565	–	–
[13]	477.5	492.8	514.1	537.5	563.0	590.1	4.7



**Fig. 3** Life time curve from the luminescence signal sample OW2



**Fig. 4** Intensity from the luminescence signals of the three pore water samples, in comparison with positions of peak maxima published in [13] for  $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$  (dashed vertical lines)

observed mono-exponential decay revealed without doubt that the uranium speciation in the seepage water is dominated by the uranium (VI) sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ . A respective mono-exponential decay curve from sample OW1 is shown in Fig. 3.

Speciation calculations, however, predict also the presence of  $\text{UO}_2^{2+}$  (“free uranyl”) and the  $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$

species as minor components. These calculations were made with the geochemical speciation code EQ3/6 [24] and the software “Geochemists Workbench” Version 8.0.8/ACT2 [25], using formation constants of NEA report [20], and using the respective surface water compositions of the sample sites. In contrast to the obtained results obtained for the speciation calculations, no spectroscopic evidence for any additional uranium species was found by TRLFS.

However, the observed lifetimes of the two uranium luminescence signals were 1.6 and 1.0  $\mu\text{s}$ , respectively, and thus (Table 3) shorter than reported lifetime for uranium sulfate species found in literature of 4.3 and 4.7  $\mu\text{s}$  [13, 17]. These shortened lifetimes of the uranium sulfate luminescence signal from the investigated natural samples was attributed to the presence of luminescence quenchers in the samples, e. g., iron, manganese, and organic substances. The different lifetimes of the luminescence signals in the two surface water samples investigated here were explained with the different concentrations of potential quenchers in the two samples.

#### Pore water samples

All three pore water samples from the test field showed also an evaluable luminescence signal for TRLFS with mono-exponential luminescence decay. The reproducibility of the positions from the peak maxima from the luminescence spectra within the three soil water samples BW1, BW2, and BW3 is satisfactory. The means of the positions of the peak maxima of 477.2, 492.57, 513.80, 537.03, 562.43, and 589.95 nm from these fluorescence signals were also in agreement with data for uranium sulfate species published in the literature [13, 16, 18, 23].

A time-resolved luminescence measurement consists of a row of spectra, in which every single spectra is one time frame (in measurements presented here 100 ns) further away from the excitation laser pulse (Fig. 2). So the most intense spectrum from one signal in general is the first spectra recorded directly after excitation. The three most intensive spectra from these three soil water samples are shown in Fig. 4. They show that higher uranium concentrations (Table 2) result in higher luminescence intensities

**Table 4** Positions of the peak maxima from the luminescence signals of three pore water samples and their means in nm, rounded to one decimal place (uncertainty values are  $\pm 0.3$  nm), compared with data published in the literature [13, 18], and lifetime of the signals  $t$  in  $\mu\text{s}$ 

	First peak	Second peak	Third peak	Fourth peak	Fifth peak	Sixth peak	$t$
BW1	–	492.2	513.7	537.3	562.5	590.2	2.6
BW2	–	492.3	513.2	535.3	562.5	–	1.7
BW3	477.2	493.2	514.5	538.5	562.3	589.7	1.0
Means (pore waters)	477.2	492.6	513.8	537.0	562.4	590.0	
[18]	477	493	515	538	565	–	–
[13]	477.5	492.8	514.1	537.5	563.0	590.1	4.7

for the first spectrum (Fig. 4). These results obtained for the pore water samples were summarized in respect to positions of the peak maxima and their respective lifetimes of the signals Table 4.

As in the analyzed surface water samples from the test site Gessenwiese show the pore water samples from the Gessenwiese characteristic positions of the peak maxima and a mono-exponential decay. By comparing these spectra with spectra obtained for uranyl sulfate reference substance it was found that the uranium speciation in the soil water samples is dominated by the uranium (VI) sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ , no evidence for the presence of the so called “free uranyl” was found in this samples by TRLFS. But it could be, that a possible signal from free uranyl was suppressed by the intensive signal from the  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species. However, also the mono-exponential decay curves indicate only one species. Same as in case of surface water samples, no hint was found for additional uranium species by TRLFS in these soil water samples. This was in contradiction to results of speciation calculations based on soil water compositions of three different data sets.

The different lifetimes of the luminescence signals in the three soil water samples, ranging from 1.0 to 2.6  $\mu\text{s}$ , were again related to the presence of luminescence quenchers in different concentration ratios. In case of the soil water samples there seems to be a dependency between life time of the uranium luminescence signal and iron concentration in the sample: The higher the Fe concentration in the soil water sample, the shorter becomes the uranium luminescence signal (Tables 2 and 4).

## Conclusion

So it was showed that TRFLS can be a useful tool for clearing up the speciation of uranium in water, which is affiliated by plants.

Uranium speciation in two natural occurring seepage water samples, OW1 and OW2, and three soil water samples, BW1, –2, and –3, all samples from test site Gessenwiese, were analyzed by TRLFS. All five samples

delivered an evaluable luminescence signal for TRLFS. The positions of the six peak maxima from these five water samples were very well in agreement with already published information on synthetically prepared uranyl sulfate solution [17, 18] and with data obtained from an uranium containing acid mine drainage environment [13]. The TRLFS-signals of all five water samples show in addition a mono-exponential decay, indicating the presence of one major uranium species. These two characteristics, i.e., positions of peak maxima and the observed mono-exponential decay of the luminescence signal revealed that the uranium speciation in the surface water and the pore water samples is dominated by the uranium (VI) sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ . Except for this uranium species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  no hint for a second or a third uranium species was found by TRLFS, in contrast to results obtained by speciation. The luminescence life time of this  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species decreases in the presence of luminescence quenchers, in particular iron ions. The higher the iron concentration, the shorter becomes the uranium luminescence life time. This is one strong piece of evidence that iron plays an important role in quenching the uranium (VI) luminescence signal lifetime in natural occurring water samples.

The TRLFS analyses were performed to identify the uranium speciation in the surface water and pore water surrounding plant (plant roots). In a later stage these results will be compared with the uranium speciation identified in plants and plant compartments, respectively, which grow on the test site Gessenwiese within a phytoremediation study. These plants take up the same uranium contaminated water during their growth, in which the uranyl sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  dominates.

It was showed that TRFLS is a suitable tool for identifying the speciation of uranium in complex natural waters, which contain a multitude of different ions and complexes.

TRLFS measurements with the aim to identify the uranium speciation in different plant compartments (e.g., roots, leaves, shoots) which grow in association with the pore water will be carried out in future TRLFS investigations. The results will then be compared with identified uranium speciation in surface and soil water of the

Gessenheap in order to better understand the uranyl transport in cell and to better assess the phytoremediation ability of certain plants. Plant samples of different plant compartments useful for TRLFS investigations can be obtained by centrifugation as cell sap, or as solid milled plant compartment sample [26]. The reactivity and toxicity of uranium depend on the speciation of heavy metals and thus has to be considered as important possible risk factor as uranium may enter economic plants and eventually arrives in the food chain.

**Acknowledgment** The authors thank the EU project “UMBRELLA” (Using MicroBes for the REgulation of heavy metaL mobiLity at ecosystem and landscape scAle) GA No 226870, project within FP7 topic “Recovery of degraded soil resources” for funding, and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Project No 02NUK015F also for support, as well as E. Kothe and G. Büchel (both Friedrich-Schiller Universität Jena) for getting access to the test site “Gessenwiese”.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

## References

- Mkandawire M, Tauert B, Dudel EG (2004) *Int J Phytoremediation* 6:347–362
- Grawunder A, Lonschinski M, Merten D, Büchel G (2009) *Chemie der Erde Geochem* 69:5–19
- Haferburg G, Kothe E (2007) *J Basic Microbiol* 47:453–467
- Haferburg G, Merten D, Büchel G, Kothe E (2007) *J Basic Microbiol* 47:474–484
- Moulin C, Beaucaire C, Decambox P, Mauchien P (1990) *Anal Chim Acta* 238:291–296
- Moulin C, Decambox P, Moulin V, Decaillon JG (1995) *Anal Chem* 67:348–353
- Baumann N, Brendler V, Arnold T, Geipel G, Bernhard G (2005) *J Colloid Interface Sci* 290(2):318–324
- Arnold T, Utsunomiya S, Geipel G, Ewing RC, Baumann N, Brendler V (2006) *Environ Sci Technol* 40(15):4646–4652
- Křepelová A, Brendler V, Sachs S, Baumann N, Bernhard G (2007) *Environ Sci Technol* 41:6142–6147
- Götz C, Geipel G, Bernhard G (2011) *J Radioanal Nucl Chem* 287:961–969
- Baumann N, Arnold T, Geipel G, Trueman E, Black S, Read D (2006) *Sci Total Environ* 366:905–909
- Baumann N, Arnold T, Foerstendorf H, Read D (2008) *Environ Sci Technol* 42(22):8266–8269
- Arnold T, Baumann N, Krawczyk-Bärsch E, Brockmann S, Zimmermann U, Jenk U, Weiß S (2011) *Geochim Cosmochim Acta* 75:2200–2212
- Espana JS, Pamo EL, Santofimia E, Aduvire O, Reyes J, Baretino D (2005) *Appl Geochem* 20:1320–1356
- Hennig C, Schmeide K, Brendler V, Moll H, Tsushima S, Scheinost AC (2007) *Inorg Chem* 46:5882–5892
- Hennig C, Ikeda A, Schmeide K, Brendler V, Moll H, Tsushima S, Scheinost AC, Skanthakumar S, Wilson R, Soderholm L, Servaes K, Görrler-Walrand C, van Deun R (2008) *Radiochim Acta* 96:607–611
- Geipel G, Brachmann A, Brendler V, Bernhard G, Nitsche H (1996) *Radiochim Acta* 75:199–204
- Vercouter T, Vitorge P, Amekraz B, Moulin C (2008) *Inorg Chem* 47:2180–2189
- Bernhard G, Geipel G, Brendler V, Nitsche H (1998) *J Alloy Compd* 271:201–205
- Guillaumont R, Fanghänel T, Fuger J, Grenthe I, Neck V, Palmer DA, Rand MH (2003) *Update on the chemical thermodynamics of uranium, neptunium plutonium americium and technetium*. Elsevier, Amsterdam
- Merten D, Kothe E, Büchel G (2004) *Mine Water Environ* 23:34–43
- Billard I, Ansoberlo E, Apperson K, Arpigny S, Azenha ME, Birch D, Bros P, Burrows HD, Choppin G, Couston L, Dubois V, Fanghänel T, Geipel G, Hubert S, Kim JJ, Kimura T, Klenze R, Kronenberg A, Kumke M, Lagarde G, Lamarque G, Lis S, Madic C, Meinrath G, Nagaishi R, Parker D, Plancque G, Scherbaum F, Simoni E, Sinkov S, Viallesoubranne C (2003) *Appl Spectrosc* 57(8):1027–1038
- Vetešník A, Semelová M, Štamberg K, Vopálka D (2009). In: Merkel BJ, Hasche-Berger A (eds) *Uranium mining and hydrogeology*. Springer, Berlin Heidelberg
- Wolery TJ (1992) EQ3/6 A software package for the geochemical modeling of aqueous systems. UCRL-MA-110662615 Part I, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore
- Bethke CM, Yeakel S (2009) *The geochemist’s workbench® release 8.0 hydrogeology program*. University of Illinois, Urbana
- Günther A, Bernhard G, Geipel G, Reich T, Rossberg A, Nitsche H (2003) *Radiochim Acta* 91:319–328



# Chapter 7

## Speciation of Uranium in Seepage and Pore Waters of Heavy Metal-Contaminated Soil

Nils Baumann, Thuro Arnold, and Martin Lonschinski

### 7.1 Introduction

Plants take up nutrients and toxins from the surrounding pore water. If this water contains increased uranium concentrations, uranium may enter the plants and accumulate in plant compartments. Different plant species incorporate different amounts of uranium. This is a decisive criterion for selecting plants for remediation of heavy metal-contaminated soils by bio/phytoremediation.

The aim of this chapter is to identify the speciation of uranium in seepage and pore waters of the “Gessenwiese” environment, which provides dissolved nutrients for plants growing on the test site which is used in a phytoremediation study. The Gessenwiese is a recultivated former uranium mining heap close to Ronneburg in Eastern Thuringia. This test field was installed as a part of a research program of the Friedrich Schiller University Jena for investigations of acid mining drainage (AMD) and heavy metals retention, especially uranium (Grawunder et al. 2009), as well as heavy metal uptake and accumulation into plants. AMD is a severe environmental problem characterized by very metal-rich waters, high sulfate concentrations, and low pH. Mining of sulfidic ore bodies or lignite deposits containing significant amounts of pyrite is the result of the formation of AMD. In combination with uranium mining, AMD is either generated by technical processing or by in situ leaching of uranium ores with sulfuric acid. Despite the hostile environment in the Gessenbach heap, many microorganisms thrive in this low pH environment and have been identified (Haferburg and Kothe 2007; Haferburg et al. 2007).

---

N. Baumann (✉) • T. Arnold  
Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiochemie, PF 51 01 19 01314 Dresden,  
Germany  
e-mail: [n.baumann@hzdr.de](mailto:n.baumann@hzdr.de)

M. Lonschinski  
Friedrich-Schiller University, Institute of Geosciences, Jena 07743, Germany

Uranium is a potentially dangerous substance, which in enriched concentrations represents a major health hazard. Uranium has various oxidation states (i.e., III–VI) and it is well established that its transport behavior strongly depends on its oxidation state (Arnold et al. 2011). In contrast to tetravalent uranium, U(VI) is much more soluble and may migrate in the environment in dissolved form via the water path. Geochemical calculations indicate that aqueous uranium in low pH acid mine water environments generally occur either as free uranyl ion or as uranyl sulfate species (España et al. 2005).

Sulfate is also able to form strong complexes with uranium and thereby strongly affects its speciation and migration (Hennig et al. 2007). Uranium sulfate complexation has been studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) and X-ray absorption spectroscopy (EXAFS) for simple two-component solutions prepared in the laboratory (Hennig et al. 2007, 2008; Geipel et al. 1996; Vercouter et al. 2008) and thermodynamic data are available for three sulfato species,  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ ,  $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$ , and  $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_3^{4-}$  (Geipel et al. 1996; Bernhard et al. 1998; Guillaumont et al. 2003).

TRLFS combines very low detection limits and a high sensitivity toward U(VI) complex formation in aqueous solutions (Moulin et al. 1990, 1995). Currently, the detection limit of TRLFS for uranium(VI) species in solution is 0.2  $\mu\text{g/l}$  (Bernhard and Geipel 2007). TRLFS is sensitive to the electron states induced by the ligand arrangements (Hennig et al. 2008) and thus provides direct evidence about uranium speciation.

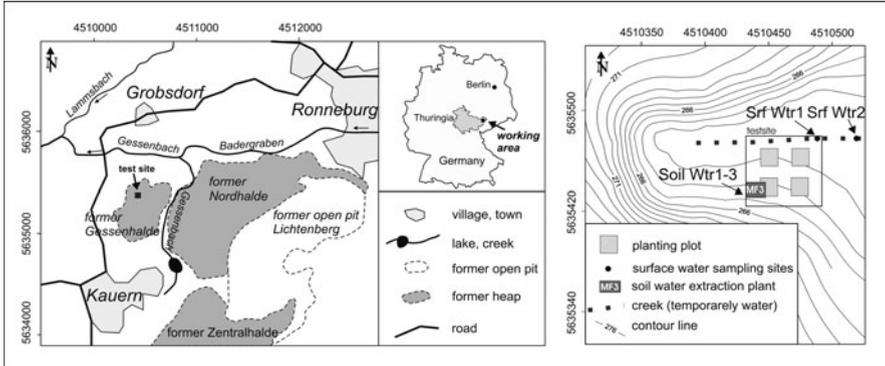
Elemental uranium does not emit fluorescence (Baumann et al. 2006), whereas U(IV) (Kirishima et al. 2003, 2004), U(V) (Großmann et al. 2007, 2009; Steudtner et al. 2006), and, in particular, U(VI) emit characteristic fluorescence signals and are thus detectable with TRLFS. Aqueous complexes of hexavalent uranium have been well investigated (Billard et al. 2003; Brendler et al. 1996; Wang et al. 2004) as also have solid uranium(VI) phases (Amayri et al. 2004a, b; Arnold and Baumann 2009) and uranium(VI) species adsorbed on mineral surfaces (Baumann et al. 2005; Arnold et al. 2006; Křepelová et al. 2007).

The uranium speciation and hence its migration behavior in natural waters might be different in comparison with laboratory samples, since these waters are no pure two-component systems but do contain additional complexing agents, e.g., inorganic and organic components as well as microbial metabolites. In this study, TRLFS was used to identify the uranium speciation in seepage and soil waters of the test field Gessenwiese. Such investigations are important, because speciation determines chemical reactivity and thus its transport behavior and bioavailability (Carrière et al. 2005) in the biosphere.

## 7.2 Sampling Campaign

The surface water samples SrfWtr1 and SrfWtr2 were collected in and close to the test site Gessenwiese (see Fig. 7.1) from a little creek in the north of the test site on 29th of March in 2009.

Three pore water samples (SoilWtr1–3) were extracted from Gessenwiese soil (30–100 cm depth) of the site section MF3 (Fig. 7.1) on the 19th of November 2009.



**Fig. 7.1** Test site Gessenwiese near Ronneburg in eastern Thuringia (*left side*) with sampling sites (*right side*). Coordinates are in the German grid (Gauß-Krüger zone 4)

The test field “Gessenwiese” is located on a former leaching heap of the former uranium mining area Ronneburg, between the villages Kauern and Grobsdorf (eastern Thuringia), which was covered up during remediation by a soil layer. For more details see Grawunder et al. (2009).

### 7.3 Water Analyses

All water samples investigated in this study show a low pH and contain high concentration of heavy metals, including uranium, and a high concentration of sulfate. These results are in agreement with data published in Merten et al. (2004).

The chemical composition of seepage (SrfWtr1 and -2) and soil water samples (SoilWtr1, -2, and -3) were analyzed for cations by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), atomic absorption spectrometry (AAS) for Na, K, Mg, and Ca, and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for Fe. An ELAN 9000 type ICP-MS spectrometer (Perkin Elmer SCIEX, Waltham, Massachusetts, USA), a Perkin Elmer 4100 AAS, and an AAS-6F ZEE nit 600s Graphite furnace AAS with Zeeman background correction (Analytik Jena, Jena, Germany) were used for these analyses. The error of the chemical analysis for AAS analyses is only 1–2% and 5–10% for ICP-MS measurements. Anions, i.e., chloride, nitrate, phosphate, and sulfate were determined by ion chromatography (IC-system 732/733, Metrohm, Filderstadt, Germany). The analytical error for the anion analyses is smaller than 5%. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN<sub>t</sub>) were obtained by Multi-N/C 2100 (Analytik Jena, Jena, Germany). The concentration of selected anions from the two investigated surface water samples and the three soil water samples, together with the measured pH values and concentrations of cations are listed in Tables 7.1 and 7.2, respectively.

**Table 7.1** Concentrations of anions, total organic carbon (TOC), and total nitrogen (TN<sub>b</sub>) in mg/l; and pH of the water samples

	SrfWtr1	SrfWtr2	SoilWtr1	SoilWtr2	SoilWtr3
Chloride	48.8	82.6	3.75	1.85	11.4
Nitrate	<2	<2	<2	<2	<2
Phosphate	<5	<5	<5	<5	<5
Sulfate	3,520	4,480	966	1,010	2,530
TOC	7.54	4.90	6.38	2.36	2.04
TN <sub>b</sub>	0.50	0.46	<0.2	0.60	0.25
pH	3.84	3.76	4.02	3.40	3.27

**Table 7.2** Concentrations of cations in µg/l of the water samples

	SrfWtr1	SrfWtr2	SoilWtr1	SoilWtr2	SoilWtr3
Na	7,040	8,570	1,920	1,540	2,520
Mg	622,000	849,000	52,500	11,000	133,000
Al	30,100	43,100	21,500	31,700	100,000
Si	18,600	22,300	28,900	32,800	49,500
K	4,890	5,350	830	1,240	2,010
Ca	344,000	340,000	209,000	244,000	389,000
Mn	86,600	97,400	12,000	1,870	23,700
Fe	8,070	5,390	2,420	15,500	18,300
Co	2,050	2,910	331	102	1,000
Ni	11,400	14,200	1,920	751	6,370
Cu	54.3	293	1,120	1,490	3,600
Zn	1,760	2,870	1,130	1,490	2,840
As	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Sr	518	612	136	81.2	251
Cd	14.1	43.3	24.4	9.76	107
Ba	17.2	16.1	10.6	7.02	7.36
Pb	64.4	31.1	1.87	0.508	8.63
U	75.1	291	322	156	890

The reason for the scatter of the uranium concentrations in the different water samples could be related to the heterogeneity in the metal contents of the soil (Grawunder et al. 2009) or to the precipitation history prior to sampling.

## 7.4 Description of the TRLFS Analyses

TRLFS exhibits some outstanding features, above all a very low detection limit in case of fluorescent heavy metal ions. The predominance of TRLFS for analyzing uranium(VI) phosphate species, compared to other spectroscopic techniques, e.g., XRD and IR, was shown in Baumann et al. (2008).

TRLFS measurements of the water samples presented here were carried out at room temperature. The TRLFS system consists of a Nd:YAG diode laser (Inlite Continuum), where the actual laser power was monitored with an optical power meter (model LabMaster, Ultima Coherent, USA) to allow for corrections due to fluctuations in the laser power. The excitation wavelength was 266 nm. The resulting generated fluorescence signal was collected perpendicular to the excitation beam and focused into a fiber optic cable that was coupled to the slit of a triple-grating spectrograph (0.5 m spectrograph, model 1236 OMA, Princeton Applied Research, USA). The fluorescence spectra were measured by a charge-coupled device (CCD) camera (model 7467-0008, Princeton Instruments, Inc., USA) cooled to 18°C.

The spectra were recorded in a wavelength ranging from 430 to 600 nm. Exposure time from the CCD camera was set to 2  $\mu$ s. The recording of the fluorescence signal occur in certain time intervals after the laser excitation pulse, in successive steps of 100 ns, in a range from 30 to 8030 ns. The average laser power was approximately 3 mJ. For every delay time, every fluorescence spectrum was measured three times, and for each spectrum, 100 laser shots were averaged. All functions (time controlling, device settings, recording of the spectra, data storage) of the spectrometer were computer-controlled. The computer software WinSpec/32 version 2.5.19.0 (Galactic Industries Corporation, USA) was used for the deconvolution of the spectra. The time dependencies of the spectra were calculated with the Origin 7.5G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) program. Another more detailed data processing procedure, described in Baumann et al. (2008), was used in the data evaluation process. Both methods delivered similar numerical results. The acquired TRLFS spectra displayed a high signal-to-noise ratio and sharp emission bands.

## 7.5 Results

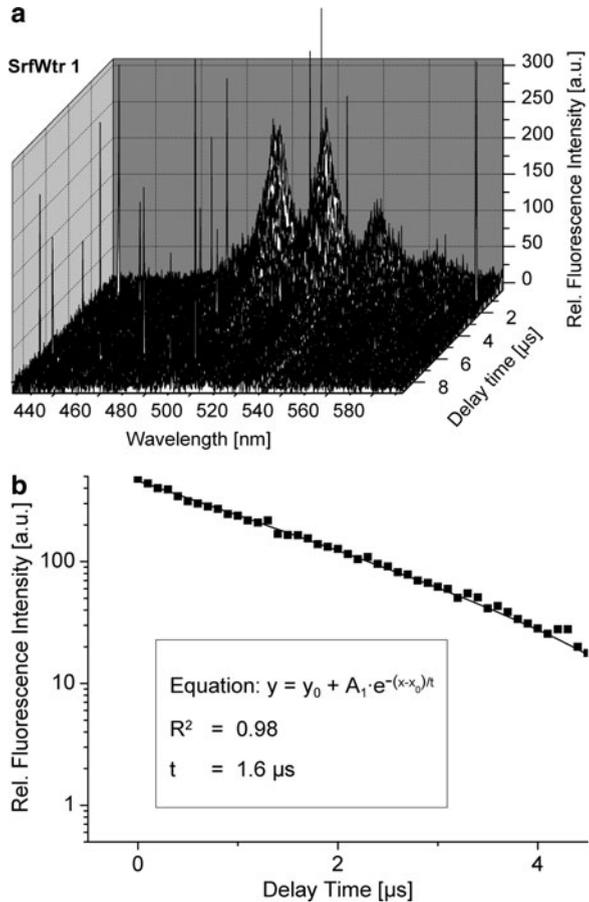
Results obtained by TRLFS on U(VI) species on the investigated natural surface water samples and naturally occurring soil water samples – not on samples synthesized in the laboratory – were presented. Generally, TRLFS provides two kinds of spectroscopic information: the position of the emission maxima and the fluorescence lifetime. In a fingerprinting procedure, the TRLFS spectra obtained are then identified with the help of previously recorded reference substances. At an excitation wavelength of 266 nm, the fluorescence quantum yield for uranium(VI) is very high (Billard et al. 2003), and the respective uranium(VI) fluorescence is detected in the range 470–600 nm (Billard et al. 2003).

As shown in previous investigation, TRLFS is a useful tool for identifying the speciation of uranium in water, which are associated with plants.

### 7.5.1 Surface Water Samples

Both samples, i.e., SrfWtr1 and SrfWtr2, provided an evaluable fluorescence signal for TRLFS; one example of a time-resolved fluorescence signal is shown in Fig. 7.2. The positions of the six peak maxima from these signals in both water samples are shown in Table 7.3 and are in agreement with data for uranium sulfate species published in the literature (Geipel et al. 1996; Vercouter et al. 2008; Vetešník et al. 2009; Arnold et al. 2011). The intensity of the fluorescence signal from sample SrfWtr1 is about half of the intensity from sample SrfWtr2 in analogy to the different uranium content of these samples (Table 7.2).

The TRLFS signals of both water samples possess a mono-exponential decay, indicating the presence of only one main species. These two characteristics, i.e., positions of peak maxima and lifetimes revealed without doubt that the uranium speciation in the seepage water is dominated by the uranium(VI) sulfate species



**Fig. 7.2** Time-resolved laser-induced fluorescence signal obtained from sample SrfWtr1 (*top*) and lifetime curve from the fluorescence signal sample SrfWtr1 (*bottom*)

**Table 7.3** Positions of the peak maxima of the fluorescence signals SrfWtr1 and SrfWtr2 in nm, rounded in whole nm, and lifetime of the signals  $t$  in  $\mu\text{s}$ , compared with data published in Vercouter et al. (2008)

	First peak	Second peak	Third peak	Fourth peak	Fifth peak	Sixth peak	$t$
SrfWtr1	477	491	513	537	562	591	1.6
SrfWtr2	478	492	513	538	562	590	1.0
Vercouter et al. (2008)	477	493	515	538	565	–	–

$\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ . A mono-exponential decay curve from sample SrfWtr1 is shown in Fig. 7.2 (right).

The observed lifetimes of the two uranium fluorescence signals were 1.6 and 1.0  $\mu\text{s}$ , respectively, and thus (Table 7.3) shorter than reported lifetime ( $4.3 \pm 0.5 \mu\text{s}$ ) for uranium sulfate species found in the literature (Geipel et al. 1996). These shortened lifetimes of the uranium sulfate fluorescence signal from the investigated natural samples were attributed to the presence of quenchers in the samples, e.g., iron, manganese, and organic substances.

A reason for the shorter lifetime of the fluorescence signal from SrfWtr2 compared to the fluorescence signal from SrfWtr1 is attributed to the higher concentration of manganese in SrfWtr2, because manganese quenches the fluorescence signal of uranium(VI).

## 7.5.2 Pore Water Samples

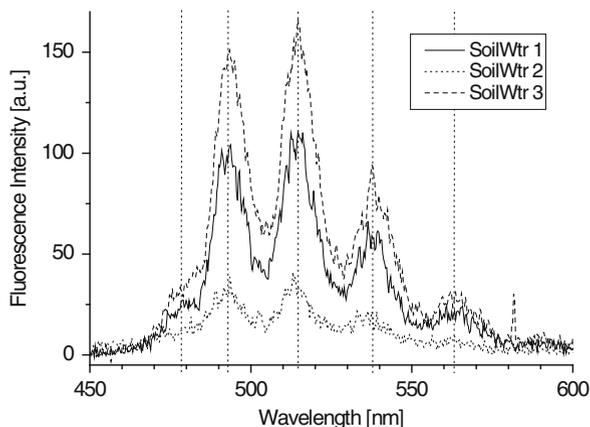
All three pore water samples from the test field showed an evaluable fluorescence signal for TRLFS. The positions of the peak maxima from these signals in all pore water samples are also in concordance with data for uranium sulfate species published in the literature (Geipel et al. 1996; Vercouter et al. 2008; Vetešník et al. 2009; Arnold et al. 2011).

A time-resolved fluorescence measurement is a row of single spectra, in which every single fluorescence measurement (every single spectrum) is occurs temporal offset a certain time interval after the excitation laser pulse (Fig. 7.2). In measurements presented here, every single time interval between two consecutive single spectra is 100 ns wide. Because the fluorescence signal decays immediately after laser excitation, the first fluorescence spectrum directly acquired after excitation shows the highest fluorescence intensity.

The three spectra with the highest fluorescence intensity of the three soil water samples are shown in Fig. 7.3 and the respective emission maxima and fluorescence lifetimes are shown in Table 7.4.

Figure 7.3 shows that the fluorescence intensity contains information on the uranium(VI) concentration. The higher the uranium concentration (Table 7.2), the more intensive is the fluorescence intensity of the first spectrum (Fig. 7.3). A comparison with literature data, e.g., with Vercouter et al. (2008), indicate that the TRLFS results, based

**Fig. 7.3** Intensity from the fluorescence signals of the three pore water samples, in comparison with positions of peak maxima published in Vercouter et al. (2008) for  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  (dashed vertical lines)



**Table 7.4** Positions of the peak maxima from the fluorescence signals of three pore water samples in nm, rounded in whole nm, compared with data published in the literature and lifetime of the signals  $t$  in  $\mu\text{s}$

	First peak	Second peak	Third peak	Fourth peak	Fifth peak	Sixth peak	$t$
SoilWtr1	480	492	514	537	562	590	2.6
SoilWtr2	473	492	513	535	562	–	1.7
SoilWtr3	477	493	514	538	562	590	1.0
Vercouter et al. (2008)	477	493	515	538	565	–	–

on the positions of the peak maxima and the mono-exponential decay of the fluorescence signal, are interpreted in such a way that the observed uranium speciation in the soil water from the “Gessenwiese” is dominated by the presence of the  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species. This shows that the speciation in the seepage waters as well as in the soil waters are both dominated by the presence of the  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species.

The different lifetimes of the fluorescence signals in the three soil water samples investigated here were explained with the different concentration of quenching substances in these samples. In case of the soil water samples, there seems to be a dependency between lifetime of the uranium fluorescence signal and the iron concentration in the sample: Fe behaves as a quencher for the uranium(VI) fluorescence signal. The higher the Fe concentration in the soil water sample, the shorter is the uranium fluorescence signal (Tables 7.2 and 7.4). The differences in the positions of the first peaks in Table 7.4 are an effect of the comparatively small size of these peaks, which are rather shoulders than real peaks.

## 7.6 Conclusions

It was shown that TRFLS is a useful tool for identifying the speciation of uranium in natural waters characterized by low pH and high metal concentration.

Uranium speciation in two naturally occurring seepage water samples, SrfWtr1 and SrfWtr2, and three soil water samples, SoilWtr1, -2, and -3, all samples from test site Gessenwiese, was analyzed by TRLFS. All five samples showed an evaluable fluorescence signal for TRLFS. The positions of the six peak maxima from these signals are in all five water samples in agreement with data for uranium sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  (Geipel et al. 1996; Vercouter et al. 2008). Moreover, the TRLFS signals of all five water samples possess a mono-exponential decay, indicating the presence of one main uranium species. These two characteristics, i.e., positions of peak maxima and the observed mono-exponential decay of the fluorescence signal revealed that the uranium speciation in the seepage water is dominated by the uranium(VI) sulfate species  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ . The fluorescence lifetime of this  $\text{UO}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$  species decreases in the presence of iron ions. The higher the iron concentration, the shorter becomes the uranium fluorescence lifetime. This indicates that iron plays an important role in quenching the uranium(VI) fluorescence signal lifetime in naturally occurring water samples, an additional quenching effect is assumed as a result of the high manganese concentrations in these waters.

The analyses were performed to compare the results on the identified uranium speciation in a later stage with the uranium speciation in plants, which grow on the grassland test site Gessenwiese and take up the same uranium-contaminated water during their growth.

TRLFS measurements with plant compartments (e.g., roots, leaves, shoots), which grow in association with the seepage water, will be carried out in future investigations and will be compared to the identified uranium speciation in surface water and soil water of the Gessenheap. Samples could be obtained from the plant compartments by centrifugation as cell sap, or as solid milled plant compartment sample and subsequently analyzed by TRLFS. The reactivity and toxicity of uranium depends on the speciation of heavy metals, and has to be considered as important possible risk factor as uranium may enter economic plants and eventually arrives in the food chain.

**Acknowledgments** The authors thank the EU for funding UMBRELLA, GA No 226870, project within FP7 topic “Recovery of degraded soil resources,” and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Project No 02NUK015F also for support, and E. Kothe and G. Büchel (both Friedrich-Schiller Universität Jena) for getting access to test site “Gessenwiese.”

## Supplemental Information

Original sample name	Sample name in that report
GB 3	SrfWtr1
GB 6	SrfWtr2
MF3/60/1	SoilWtr1
MF3/30/2	SoilWtr2
MF3/100/3	SoilWtr3

## References

- Amayri S, Arnold T, Foerstendorf H, Geipel G, Bernhard G (2004a) Spectroscopic characterization of synthetic becquerelite,  $\text{Ca}[(\text{UO}_2)_6\text{O}_4(\text{OH})_6]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , and swartzite,  $\text{CaMg}[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . *Can Mineral* 42(4):953–962
- Amayri S, Arnold T, Reich T, Foerstendorf H, Geipel G, Bernhard G, Massanek A (2004b) Spectroscopic characterization of the uranium carbonate andersonite  $\text{Na}_2\text{Ca}[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . *Environ Sci Technol* 38:6032–6036
- Arnold T, Baumann N (2009) Boltwoodite  $[\text{K}(\text{UO}_2)(\text{SiO}_3\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{1.5}]$  and compreignacite  $\text{K}_2[(\text{UO}_2)_3\text{O}_2(\text{OH})_3]_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  characterized by laser fluorescence spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 71:1964–2968
- Arnold T, Utsunomiya S, Geipel G, Ewing RC, Baumann N, Brendler V (2006) Adsorbed U(VI) surface species on muscovite identified by laser fluorescence spectroscopy and transmission electron microscopy. *Environ Sci Technol* 40:4646–4652
- Arnold T, Baumann N, Krawczyk-Bärsch E, Brockmann S, Zimmermann U, Jenk U, Weiß S (2011) Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochim Cosmochim Acta*. 75(8):2200–2212
- Baumann N, Brendler V, Arnold T, Geipel G, Bernhard G (2005) Uranyl sorption onto gibbsite studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *J Colloid Interface Sci* 290:318–324
- Baumann N, Arnold T, Geipel G, Trueman E, Black S, Read D (2006) Detection of U(VI) on the surface of altered depleted uranium by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Sci Total Environ* 366:905–909
- Baumann N, Arnold T, Foerstendorf H, Read D (2008) Spectroscopic verification of the mineralogy of an ultra-thin mineral film on depleted uranium. *Environ Sci Technol* 42:8266–8269
- Bernhard G, Geipel G (2007) Bestimmung der Bindungsform des Urans in Mineralwässern. *Vom Wasser* 105(3):7–10
- Bernhard G, Geipel G, Brendler V, Nitsche H (1998) Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *J Alloys Compd* 271–273:201–205
- Billard I, Ansoberlo E, Apperson K, Arpigny S, Azenha ME, Birch D, Bros P, Burrows HD, Choppin G, Couston L, Dubois V, Fanghänel T, Geipel G, Hubert S, Kim JI, Kimura T, KlENZE R, Kronenberg A, Kumke M, Lagarde G, Lamarque G, Lis S, Madic C, Meinrath G, Nagaishi R, Parker D, Plancque G, Scherbaum F, Simoni E, Sinkov S, Viallesoubranne C (2003) Aqueous solutions of uranium(VI) as studied by time-resolved emission spectroscopy: a round-robin test. *Appl Spectrosc* 57(8):1027–1038
- Brendler V, Geipel G, Bernhard G, Nitsche H (1996) Complexation in the system  $\text{UO}_2^{2+}/\text{PO}_4^{3-}/\text{OH}_{(\text{aq})}^-$ : potentiometric and spectroscopic investigations at very low ionic strengths. *Radiochimica Acta* 74:75–80
- Carrière M, Gouget B, Gallien JP, Avoscan L, Gobin R, Verbavatz JM, Khodja H (2005) Cellular distribution of uranium after acute exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B-Beam Interact Mater Atoms* 231:268–273
- Espana JS, Pamo EL, Santofimia E, Aduvire O, Reyes J, Baretino D (2005) Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Appl Geochem* 20(7):1320–1356
- Geipel G, Brachmann A, Brendler V, Bernhard G, Nitsche H (1996) Uranium(VI) sulfate complexation studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta* 75:199–204
- Grawunder A, Lonschinski M, Merten D, Büchel G (2009) Distribution and bonding of residual contamination in glacial sediments at the former uranium mining leaching heap of Gessen/Thuringia, Germany. *Chemie der Erde – Geochemistry* 69:5–19
- Großmann K, Arnold T, Krawczyk-Bärsch E, Diessner S, Wobus A, Bernhard G, Krawietz R (2007) Identification of fluorescent U(V) and U(VI) microparticles in a multispecies biofilm by

## 7 Speciation of Uranium in Seepage and Pore Waters of Heavy Metal-Contaminated Soil 141

- confocal laser scanning microscopy and fluorescence spectroscopy. *Environ Sci Technol* 41:6498–6504
- Großmann K, Arnold T, Ikeda-Ohno A, Steudtner R, Geipel G, Bernhard G (2009) Fluorescence properties of a uranyl(V)-carbonate species  $[\text{U}(\text{V})\text{O}_2(\text{CO}_3)_3]^{5-}$  at low temperature. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 72:449–453
- Guillaumont R, Fanghänel T, Fuger J, Grenthe I, Neck V, Palmer DA, Rand MH (2003) Update on the chemical thermodynamics of uranium, neptunium, plutonium, americium and technetium. In: OECD Nuclear Energy Agency (ed) *Chemical thermodynamics*, vol 1. Elsevier, Amsterdam, pp 230–233
- Günther A, Bernhard G, Geipel G, Reich T, Roßberg A, Nitsche H (2003) Uranium speciation in plants. *Radiochimica Acta* 91:319–328
- Haferburg G, Kothe E (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol* 47:453–467
- Haferburg G, Merten D, Büchel G, Kothe E (2007) Biosorption of metal and salt tolerant microbial isolates from a former uranium mining area. Their impact on changes in rare earth element patterns in acid mine drainage. *J Basic Microbiol* 47:474–484
- Hennig C, Schmeide K, Brendler V, Moll H, Tsushima S, Scheinost AC (2007) EXAFS investigations of U(VI), U(IV), and Th(IV) sulfate complexes in aqueous solution. *Inorg Chem* 46:5882–5892
- Hennig C, Ikeda A, Schmeide K, Brendler V, Moll H, Tsushima S, Scheinost AC, Skanthakumar S, Wilson R, Soderholm L, Servaes K, Görrler-Walrand C, van Deun R (2008) The relationship of monodentate and bidentate coordinated uranium(VI) sulphate in aqueous solution. *Radiochimica Acta* 96:607–611
- Kirishima A, Kimura T, Tochiyama O, Yoshida Z (2003) Luminescence study of tetravalent uranium in aqueous solution. *Chem Commun* 7:910–911
- Kirishima A, Kimura T, Nagaishi R, Tochiyama O (2004) Luminescence properties of tetravalent uranium in aqueous solution. *Radiochimica Acta* 92:705–710
- Křepelová A, Brendler V, Sachs S, Baumann N, Bernhard G (2007) U(VI)-kaolinite surface complexation in absence and presence of humic acid studied by TRLFS. *Environ Sci Technol* 41:6142–6147
- Merten D, Kothe E, Büchel G (2004) Studies on microbial heavy metal retention from uranium mine drainage water with special emphasis on rare earth elements. *Mine Water Environ* 23:34–43
- Moulin C, Beaucaire C, Decambox P, Mauchien P (1990) Determination of uranium in solution at the  $\text{ng L}^{-1}$  level by time-resolved laser-induced spectrofluorimetry – application to geological samples. *Anal Chim Acta* 238(2):291–296
- Moulin C, Decambox P, Moulin V, Decaillon JG (1995) Uranium speciation in solution by time-resolved laser-induced fluorescence. *Anal Chem* 67(2):348–353
- Steudtner R, Arnold T, Großmann K, Geipel G, Brendler V (2006) Luminescence spectrum of uranyl(V) in 2-propanol perchlorate solution. *Inorg Chem Commun* 9:939–941
- Vercouter T, Vitorge P, Amekraz B, Moulin C (2008) Stoichiometries and thermodynamic stabilities for aqueous sulfate complexes of U(VI). *Inorg Chem* 47(6):2180–2189
- Vetešník A, Semelová M, Štamberg K, Vopálka D (2009) Uranium(VI) sulfate complexation as a function of temperature and ionic strength studied by TRLFS. In: Merkel BJ, Hasche-Berger A (eds) *Uranium mining and hydrogeology*. Springer, Berlin, pp 623–630
- Wang Z, Zachara JM, Yantasee W, Gassman PL, Liu C, Joly AG (2004) Cryogenic laser induced fluorescence characterization of U(VI) in Hanford vadose zone pore waters. *Environ Sci Technol* 38:5591–5597



## Uranium in mushrooms related to the iron and manganese concentrations

N. Baumann, T. Arnold, G. Haferburg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany

**Anion contents in the dry masses of nine fruiting body mushroom samples were analyzed. These samples were collected from a test field in a uranium contaminated area in Eastern Thuringia. It turns out, that proximate as more uranium is in the fruiting bodies of mushrooms, as more manganese and iron they have. This could be important in the expectation for evaluable uranium (VI) laser-induced fluorescence signals from material of these fruiting bodies of mushrooms.**

The test site, where samples were collected, was installed by the Friedrich-Schiller-University Jena for investigation the interactions between biosphere and heavy metals in soil [1]. From this test site, the uranium speciation in surface water and in pore water samples was identified by time-resolved laser-induced spectroscopy as the  $UO_2SO_{4(aq)}$ -speciation [2].

**EXPERIMENTAL.** The collected fruiting bodies from mushrooms were washed, chopped in small chips and dried in an oven at 105 °C, milled in an agate mortar and digested in a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide within a microwave. After chemical digestion, the anions were measured with ICP-MS, the values for iron additional were controlled with Graphite furnace AAS.

**RESULTS.** The uranium concentrations in dry masses from nine mushroom fruiting body samples collected from a heavy metal contaminated site are confronted with their manganese concentrations and their iron contents. The samples are tableted with increasing uranium content in the dry mass. Because the water content on fruiting bodies of mushrooms is 92% or more [3], the uranium concentrations in the dried masses are much higher than in saps of mushrooms. It turns out, as higher the uranium concentration, proximate as higher are the concentrations in the uranium(VI) fluorescence quenching elements iron and manganese.

Tab. 1: Uranium contents in dry masses of different mushrooms collected from the test site, to the opposites to contents in iron and manganese (concentrations in ppb).

	U	Mn	Fe
<i>Tricholoma sulphureum</i> (sulphur knight)	30	30,040	79,470
<i>Leccinum versipelle</i> (orange birch bolete)	35	6,070	304,290
<i>Lactarius torminosus</i> (woolly milkcap)	130	14,870	247,010
<i>Amanita phalloides</i> (death cap)	260	33,770	386,970
<i>Pisolithus arhizus</i> (dyeball)	500	5,970	923,930
<i>Leccinum scabrum</i> (brown birch bolete)	900	72,480	5,077,520
<i>Laccaria laccata</i> (deceiver)	950	69,480	1,017,270
<i>Thelephora terrestris</i> (earthfan)	1,200	98,950	2,79,905
<i>Paxillus involutus</i> (brown roll-rim)	3,470	114,930	10,020,450

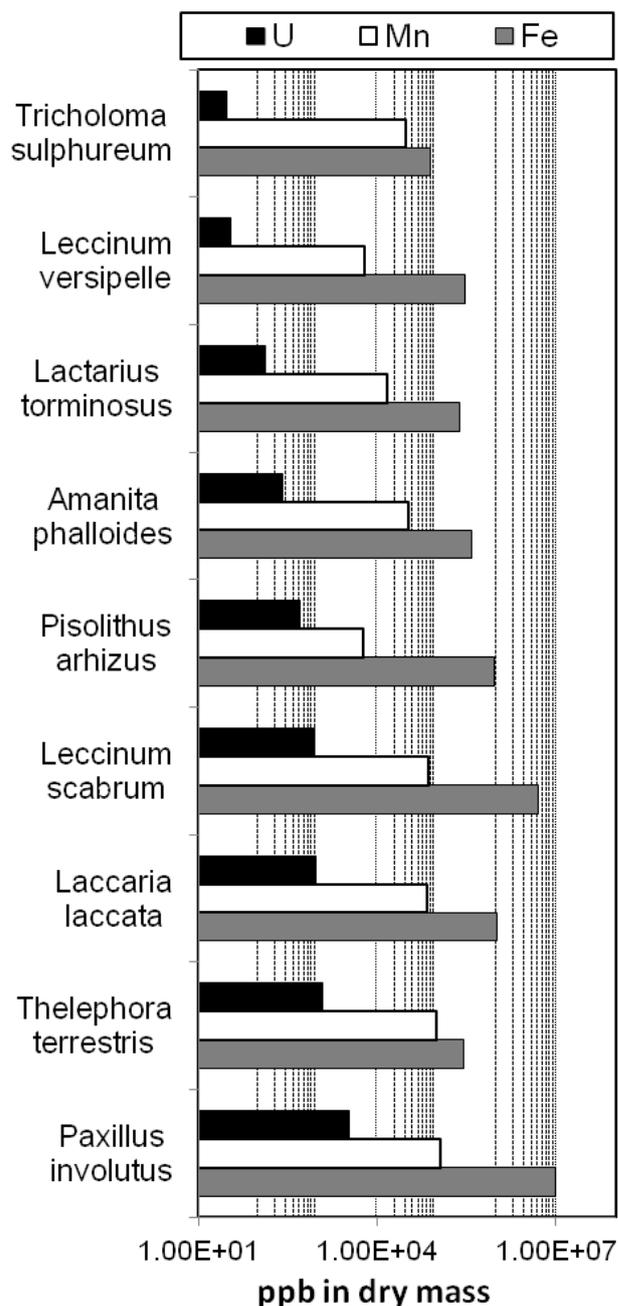


Fig. 1: Uranium contents in dry masses of mushrooms collected from the test site together with contents of iron and manganese. In general, as more uranium as more iron and manganese.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors are grateful to A. Ritter for ICP-MS measurements, EU for funding within the UMBRELLA project, and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Project No 02NUK015F, also for support.

- [1] Baumann, N. et al. (2012) *Report HZDR-013*, p. 15.  
 [2] Baumann, N. et al. (2012) *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **291**, 673–679.  
 [3] Donker, H.C.W. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1427**, 287–297.



## Laser fluorescence lifetime of uranyl species onto *Euglena mutabilis* determined with single photon avalanche diode and a multichannel event timer

N. Baumann, T. Arnold

**Lifetime from the fluorescence of uranyl species onto *Euglena mutabilis* suspended in a water solution at pH 3 was measured. For the separation of the intensive, unwanted, and short living fluorescence, caused by organic substances from the interesting fluorescence of the uranyl species, a quasi-pulsing laser excitation was created from an 80 MHz MaiTai laser by periodic diffraction from the excitation beam. Fluorescence photons were detected with a Single Photon Avalanche Diode (SPAD) and evaluated by a multichannel event timer (HydraHarp).**

*Euglena mutabilis* belongs to unicellular flagellate protists. Euglenoids are often used in laboratory as model organism. They are abundant in many inland waters and in particular *Euglena mutabilis* is often observed in environments with low pH values and high metal concentrations as in acid mine drainage (AMD) regions. Due to technical leaching of uranium ores with sulfuric acid AMD environments are found related to former mining and milling sites [1], also on the WISMUT uranium mining heap contact area “Gessenwiese” close to Ronneburg (Thuringia) [2]. The influence of *Euglena mutabilis* on the transport behavior of uranium in such AMD, environments is so far not understood. In this study, laser fluorescence life time of uranyl species immobilized by living, i.e. metabolically active *Euglena mutabilis* was measured for getting information regarding the binding form of respective species. For that measurement the so called Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) method was used for the first time.

Laser induced fluorescence caused by organic substances like chlorophyll in general has a much shorter lifetime than the fluorescence caused by heavy metal ions, and is often very intensive. In case of quasi continuous laser excitation as supplied by the 80 MHz MaiTai HP laser, this unwanted and intensive fluorescence from organic substances is permanent present and so continuously covers up the interesting metal fluorescence. That’s why the quasi continuous laser excitation was transformed to quasi pulsed excitation as described below.

**EXPERIMENTAL.** For achieving a pulsing laser excitation beam, the 80 MHz laser beam from the MaiTai HP laser was periodically interrupted by an alternated diffraction of the beam with an adjustable acousto-optic modulator (AOM, APE Berlin). The AOM is a TeO<sub>2</sub>-crystal which can be alternately set in oscillation by an alternating applying HF voltage of approximately 100 MHz. In the vibrational status, the crystal diffracts the laser beam during transmitting the crystal.

AOM, SPAD and HydraHarp were coordinated and synchronized by delay generators. The correct timing of the quasi-pulsing from the excitation laser beam was controlled and visualized by using a photo diode and an oscillograph. The AOM was triggered with 100 kHz, one laser excitation spans 2000 ns, afterwards the SPAD detects the fluorescence photons within 8000 ns. The amplified fluorescence photons were chronologically ordered in a TCSPC histogram between periodic excitation by the HydraHarp. For drawing the life time curve and calculating

the life times, the software package SymPhoTime (PicoQuant Berlin) was applied. The accuracy control of the complex life time measuring system was made with a reference solution of  $5 \times 10^{-5}$  M uranium perchlorate ( $T = 1.95 \pm 0.05 \mu\text{s}$ ,  $n = 7$ ).

As a first attempt, the measurement was made by separating the short living, but intensive and unwanted, fluorescence originated from organic substances like chlorophyll, from the longer living and interesting fluorescence caused from heavy and radioactive metal ion species like uranium (VI) species, via their different life times. *Euglena mutabilis* were in contact with a  $10^{-5}$  M uranium perchlorate solution at pH 3 for 5 days, after that the *Euglena mutabilis* were separated from the uranium solution by a centrifuge and then stirred up again within a perchlorate solution with the same pH value. The measurement was made with permanently stirring the *Euglena mutabilis* suspension in a quartz glass cuvette.

**RESULTS.** The bi-exponential decay of the bulk fluorescence signal revealed that fluorescence is composed of a very short living part and a longer living content. The short living part is interpreted as originated from organic substances e.g. chlorophyll or protein, the longer living part of  $>10000$  ns is interpreted as originated from the uranyl species onto of the *Euglena mutabilis* cells. Previously carried out investigations on *Euglena mutabilis* cells in contact with uranium [1] have shown that uranium is coordinated with carboxyl and/or with phosphate groups, a distinction was not possible. Our results indicate that uranium - because of the long fluorescence lifetime of  $>10 \mu\text{s}$  [3] - is more likely coordinated to phosphate.

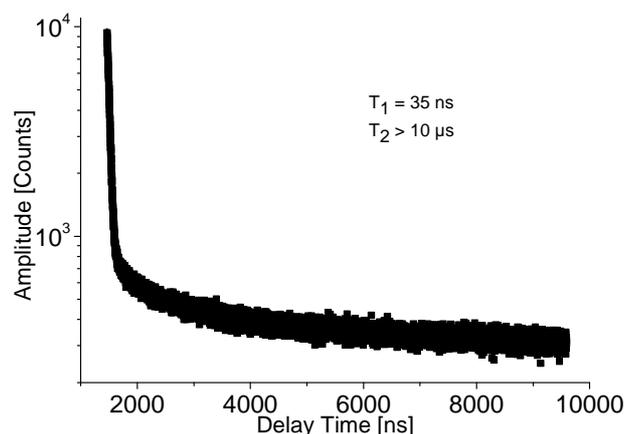


Fig. 1: Life time curve from the fluorescence signal from euglena mutabilis suspension gained by a HydraHarp and SymPho Time software package.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** Authors are grateful to S. Brockmann for preparing *Euglena mutabilis* suspensions, and BMBF project no. 02NUK015F for financial support.

- [1] Brockmann, S. et al. (2014) *Radiochim. Acta*, accepted.  
 [2] Baumann, N. et al. (2014) *Environ. Sci. Pollut. Res.*, in press.  
 [3] Baumann, N. et al. (2008) *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8266–8269.



## Cultivation of microorganisms live in the mine water of the former uranium mine Königstein, Germany

I. Zirnstein, S. Köppchen, I. Röske,<sup>1</sup> T. Arnold

<sup>1</sup>Institute of Applied Microbiology, TU Dresden, Dresden, Germany

**Using different nutrient solutions under different conditions (e.g. temperature, pH, chemical composition of culture media), microorganisms from mine water of the uranium mine Königstein were cultured and isolated. Iron-oxidizing and sulfur oxidizing bacteria are dominating the cultures. Some of them were chosen to check their uranium tolerance. It was found that the eukaryotic species *Rhodospiridium toruloides* were grown on culture media with up to 6 mM  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ .**

Microbes affect the mobility of actinides [1]. Microorganisms from sites of former uranium mining areas have to be investigated regarding their interaction mechanisms with soluble actinides. The mine water from former uranium mine Königstein has been used to isolate different microbial strains.

**EXPERIMENTAL.** For determining the cell number of metabolic active microorganisms (LZZ) in the mine water the colonies (KbE) on different culture media were counted. For cultivation, different plate-count-agar-media (PCA) and different conditions were tested: plate-count-agar and Königstein-plate-count-agar (sterile Königstein mine water instead of MilliQ). The media differ in pH 2 or 7, carbon source: glucose or yeast extract, temperature: 28 °C or 45 °C, oxygen: aerob or anaerob. Additionally, specific culture solutions for metabolic groups (e.g. sulfur-oxidizing bacteria, iron-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria, arsenic-tolerant bacteria, manganese-tolerant bacteria) were used. Uranium tolerance of some isolates were tested by plating isolates on PCA with pH 7 and uranium concentrations from 0.5 to 10 mM  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ .

**RESULTS.** The Königstein mine water contains  $5.2 \times 10^5$  cells/mL including all microbial cells – living and dead. For determination of metabolic active microorganisms, up to  $4.8 \times 10^2$  KbE/mL were analyzed at anaerobic conditions and up to  $3.3 \times 10^3$  KbE/mL mine water had grown aerobic.

The Königstein mine water is dominated by bacteria e.g. *Acidithiobacillus sp.*, *Acidocella sp.*, *Thiomonas sp.*, *Acidiphilium sp.*, analyzed by molecular genetic methods (16S rDNA PCR, pyrosequencing). Almost all dominant bacteria were isolated and cultured in the lab (see Tab. 1). The most culture media were populated by the iron-oxidizing bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In addition to different bacteria species, eukaryotes esp. fungi and yeasts could isolate. One eukaryotic representative called *Rhodospiridium toruloides* has grown on agar plates in the presence of 6 mM  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ . After cell lysis of the yeast, a uranium concentration of 1.7 mg uranium/g<sub>cell dry mass</sub> were measured inside the cells by ICP-MS analyses. This result is supported by scanning electron microscopy (SEM) measurements. SEM pictures of *Rhodospiridium toruloides* cells obtained from a uranium culture medium showed regions with high contrast in the cells which were attributed to elements of high atomic weight. EDX measurements of these regions identified uranium in or at the yeast cells (data not shown).

Tab. 1: The microbial species, that were isolated from former uranium mine water with the uranium concentration, they tolerate at different nutrient solutions.

Species	Uranium tolerance
<b>Iron-oxidizing bacteria</b>	
<i>Acidocella sp.</i>	–
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	≤ 0.5 mM
<b>Iron-reducing bacteria</b>	
<i>Acidiphilium sp.</i>	–
<b>Sulfur-oxidizing bacteria</b>	
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	–
<i>Sulfobacillus sp.</i>	≤ 2 mM
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	–
<i>Thiomonas cuprina</i>	≤ 0.5 mM
<i>Thiomonas sp.</i>	≤ 1 mM
<b>Methylophilic bacteria</b>	
<i>Methylobacterium sp.</i>	≤ 1 mM
<b>Other bacteria</b>	
<i>Arthrobacter sp.</i>	≤ 1 mM
<i>Streptomyces sp.</i>	–
<i>Sediminibacterium sp.</i>	–
<i>Bacillus licheniformis</i>	–
<i>Paenibacillus sp.</i>	≤ 1 mM
<i>Mycobacterium sp.</i>	≤ 0.5 mM
unclassified bacteria	≤ 2 mM
<b>Eukaryotes</b>	
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	≤ 6 mM
<i>Exophilia sp.</i>	–
unclassified yeasts/fungi	≤ 1 mM

**ACKNOWLEDGEMENTS.** This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Project No 02NUK015F. The authors are grateful to A. Ritter for ICP-MS measurements and E. Christalle for SEM/EDX analyses. Thanks to S. Röder from Wismut GmbH to take samples.

[1] Gadd, G. M. (2010) *Microbiology* **156**, 609–643.



# Uranium contents in plants and mushrooms grown on a uranium-contaminated site near Ronneburg in Eastern Thuringia/Germany

Nils Baumann · Thuro Arnold · Götz Haferburg

Received: 28 March 2013 / Accepted: 5 June 2013 / Published online: 29 June 2013  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Uranium concentrations in cultivated (sunflower, sunchoke, potato) and native plants, plant compartment specimens, and mushrooms, grown on a test site within a uranium-contaminated area in Eastern Thuringia, were analyzed and compared. This test site belongs to the Friedrich-Schiller University Jena and is situated on the ground of a former but now removed uranium mine waste leaching heap. For determination of the U concentrations in the biomaterials, the saps of the samples were squeezed out by using an ultracentrifuge, after that, the uranium concentrations in the saps and the remaining residue were measured, using ICP-MS. The study further showed that uranium concentrations observed in plant compartment and mushroom fruiting bodies sap samples were always higher than their associated solid residue sample. Also, it was found that the detected uranium concentration in the root samples were always higher than were observed in their associated above ground biomass, e.g., in shoots, leaves, blossoms etc. The highest uranium concentration was measured with almost 40 ppb U in a fruiting body of a mushroom and in roots of butterbur. However, the detected uranium concentrations in plants and mushrooms collected in this study were always lower than in the associated surface and soil water of the test site, indicating that under the encountered natural conditions, none of the studied plant and mushroom species turned out to be a hyperaccumulator

for uranium, which could have extracted uranium in sufficient amounts out of the uranium-contaminated soil. In addition, it was found that the detected uranium concentrations in the sap samples, despite being above the sensitivity limit, proved to be too low—in combination with the presence of fluorescence quenching substances, e.g., iron and manganese ions, and/or organic quenchers—to extract a useful fluorescence signal, which could have helped to identify the uranium speciation in plants.

**Keywords** Uranium (VI) · Phytoremediation · Heavy metal-contaminated soil · TRLFS

## Introduction

Bioavailability of uranium to vegetation in general is already discussed in many scientific publications, e.g., in Punshon et al. (2003). Using plants in phytoremediation for cleaning up uranium-contaminated soils and waters are also debated in the literature in a broad manner. Rhizofiltration is one suggested way for using plants in removing uranium from water (Dushenkov et al. 1997; Tomé et al. 2008). However, in this case, it could be assumed that by far the biggest part of the uranium uptake by roots is attributed to strong sorption, including precipitation processes (Lee and Yang 2010), and would be possible to the same extent by lifeless material, which possesses a sufficiently large reactive surface area for sorption processes, e.g., roots. Using sorption processes onto biological material for removing uranium from contaminated waters are already described, e.g., in Ding et al. (2012).

Adding chelate forming substances, like citric acid to uranium-contaminated media for increasing the uptake of uranium by plants and so for improving the phytoremediation

Responsible editor: Stuart Simpson

N. Baumann (✉) · T. Arnold  
 Institute of Resource Ecology, Helmholtz-Zentrum  
 Dresden-Rossendorf, 01314 Dresden, Germany  
 e-mail: n.baumann@hzdr.de

G. Haferburg  
 Institute of Microbiology, Friedrich-Schiller-University Jena,  
 07743 Jena, Germany

efficiency, is discussed and also suggested in many papers (Ebbs et al. 1998; Huang et al. 1998; Shanhandeh and Hossner 2002; Chang et al. 2005; Lozano et al. 2011). However, in case of uranium-contaminated soils this would be counterproductive and not only lead to uranium organic acid complexes, which are able to pass the root barrier, but inevitably also lead to an increase in the uranium concentration in the ambient soil and groundwater (Lozano et al. 2011), and therefore would increase the uranium mobility, and thus would represent a hazard for the surrounding biosphere and people living in close proximity to the contaminated site. Additionally, some of the chelating agents cause toxic effects to plants and thus hamper plant growth, which would lead to a reduced phytoremediation efficiency (Duquène et al. 2008).

A high potential for extracting uranium (and arsenic) out of uranium- and arsenic-contaminated waters is described by Mkandawire et al. (2004) for *Lemna gibba* (duckweed). Even exceeded is this uranium extracting potential by *Callitriche stagnalis* (water-starworts) as described in Pratas et al. (2012) for contaminated waters from Central Portugal. But these latter plants are only applicable for mine tailing ponds and are not adaptable for uranium-contaminated soils.

The role of mycorrhiza in root uptake of uranium is studied by Fomina et al. (2008) and Gadd and Fomina (2011). The translocation of uranium from plant roots to plant shoots is described in Chen et al. (2005a). In another investigation, Chen et al. (2008) studied the phytostabilization of uranium from contaminated tailing waters by arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices*.

As a result of X-ray adsorption spectroscopy and transmission electron microscopy studies, Laurette et al. (2012a, b) report that endogenous phosphate immobilizes uranium in plant root epidermal cells by precipitation and absorption. However, ligands such as citrate could prevent this fixation and translocate the U into shoots and leaves.

Recently, tobacco plants were described as very effective in phytoremediation of uranium from mine tailings (Stojanović et al. 2012). In their study, the highest concentration of uranium in tobacco leaves was 4.18 ppm, and thus 60 times higher than previously reported for plant leaves grown under similar conditions. Although accumulation of Uranium has been reported for various plant species and tissues (Saric et al. 1995), the transport mechanisms for uranium ions and thus its respective speciation across the symplast are currently still not known.

The speciation of uranium in natural surface and soil waters from the investigated test site was already determined by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) (Baumann et al. 2012). In this study, the uranium concentration in plants and mushrooms, i.e., in the cell saps, obtained by centrifugation of collected plant and mushroom material grown on uranium-contaminated soil near Ronneburg in Eastern Thuringia/Germany is analyzed (Table 1). In addition, TRLFS is used, if it is possible to directly identify the uranium

speciation inside of the plant, and mushroom specimens collected from the above mentioned site is detectable also in biomaterial by this method. TRLFS is a very sensitive tool for studying the speciation of fluorescent heavy-metal ions in very low concentrations, e.g., as adsorbed uranium on gibbsite and muscovite surfaces (Baumann et al. 2005; Arnold et al. 2006).

### Site description

Test site Gessenwiese is located near Ronneburg between the villages Grobsdorf and Kauern (Figs. 1 and 2). It was installed on the ground of a former uranium-leaching heap, the so-called Gessenhalde, from the WISMUT company, piled up in 1970 (Fig. 3). Until 1989, uranium was extracted from the heap by irrigations with solutions from acid mine drainage (AMD). Later, the heap was removed, and the remaining land was renaturated within a recultivating program (Hamann and Schreiber 2007). However, the drainage waters within the “Gessenwiese”—the area where the mining heap was cumulated before—still have high concentrations of toxic heavy metals. After removing the heap, the area was covered by a layer of sandy silt soil. However, heavy metals come back into this surface layer by capillary rise and horizontal infiltration (Schindler et al. 2012). This contaminations and low pH is an environment for well-adapted microorganisms which thrive in these waters, and which have been identified (Haferburg and Kothe 2007; Haferburg et al. 2007). Since 1999, the test site is a part of a research program of the Friedrich-Schiller University Jena for investigations on AMD and heavy-metals retention, e.g., uranium, as well as for heavy metal uptake and accumulation into plants and plant compartments.

The test site exhibits selected areas with substrates denoted as “control”, “topsoil”, and compost. “Control” represents a layer of unamended sandy silt soil and represents the top soil on the “Gessenwiese” area. “Topsoil” represents a substrate on the test site, in which brought in topsoil was mixed with the original soil of the test site, i.e., the “control substrate”, to carry out selected experiments, and “compost” represents a substrate, in which brought in compost material was mixed with the original soil of the test site. The motivation for using these three different soil types was to increase plant growth (Schindler et al. 2012) and thus possibly the uptake of metals from contaminated soil into plants, which eventually should lead to a higher phytoremediation efficiency. In this study, sunflowers were cultivated on these three substrates. During their growth phase, uranium and other heavy metals could penetrate the root barrier and enter the plants. In subsequent experiments, petals, capitulum, blossoms, leaves, shoots, roots, and rootlets of sunflower plants were harvested at the end of the growth phase from the control substrate and later analyzed for their uranium concentration in the respective plant compartments. In addition,

blossoms, leaves, and shoots were harvested for sunflower plants cultivated on the topsoil and compost substrate, respectively. Sunchoke was only grown on the control substrate; and here, leaves, shoots, corn, roots, and rootlets were harvested. Potato plants were also only grown in control substrate, and respective tubers were harvested. In addition, various native, i.e., wild-growing, plant specimens were collected, which all grew on or in the control substrate. Leaves, shoots, and roots of butterbur, leaves of *Betula pendula* (birch tree), and above ground biomasses of *Taraxacum sect. Ruderalia* (dandelion), *Trifolium pratense* (red clover), and *Festuca rubra* were harvested in early autumn.

All mushrooms samples collected in this study occur naturally on the test field “Gessenwiese”, except *Lactarius deliciosus* (Saffron milk cap), which grew wild in a meadow on the ground of the Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR), and which was collected as reference for mushrooms growing in uncontaminated soil.

## Experimental methods

All plant, plant compartment, and mushroom samples collected on the test site were placed in plastic bags and were immediately transported to the laboratory and there further processed. Plants and mushrooms were thoroughly washed with deionized water. However, it could not be guaranteed that during this washing step, all potentially immobilized uranium, located in the rhizosphere of root samples, e.g., described by Fomina et al. (2008) as inorganic uranyl phosphate complexes, was completely removed. After the washing step, the samples were hacked by cutting and chaffing with a knife, and then separated into sap, and residuum fraction by centrifugation using an ultra-performance centrifuge “Optima XL-100 K” (Beckman Coulter) at  $285,000\times g$ . This was executed to determine if the incorporated uranium in the plant and mushroom specimens is rather located in the plant saps or bound to solid cell compartments.

Birch leaves were hacked by a food processor before centrifugation. For some samples, it was not possible to obtain sufficient sap by centrifugation at the specified conditions for the subsequent analyses, e.g., for the sample “sunflower roots, control” (Fig. 4) or the sample “*Telephora terrestris*” (mushroom earthfan) (Fig. 5). In these cases, no uranium contents could be specified for sap samples, and no values were thus shown in Figs. 4 and 5. Analyses of the solid bulk fraction, i.e., samples for which no sap at all could be retrieved, and solid residuum fraction were performed by digesting the solids with a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide solution. The wet digestions were carried out in a closed Teflon vessel, which was placed in a microwave “Floyd” (PerkinElmer) for half an hour. Elementary analyzes for sap samples and for the digested solid bulk and residuum fractions were made with an

inductively-coupled plasma mass spectrometer ICP-MS “ELAN 9000” (PerkinElmer). TRLFS experiments were carried out by using an excitation wavelength of 266 nm, generated by a Nd:YAG diode laser “Inlite” (Continuum), and the resulting fluorescence light was detected by a 0.5 m spectrograph model 1236 OMA (Princeton Applied Research) and a ICCD camera. More details about the TRLFS system are provided in Arnold et al. (2011). Low-temperature measurements (until 10 K) were performed by using a He-cryostat model “RDK 10-320”, a compressor unit “Coolpak 2000 A” (both Oerlikon Leybold Vacuum), and an oil vacuum pump “D 25 B” (Leybold Vacuum GmbH).

## Results and discussion

### Plants

In previously conducted studies (Baumann et al. 2012), it was found that the pore water concentrations in the soils ranged from 156 to 890 ppb, depending on the depth from which these samples were taken. At a depth of 30 cm below ground, uranium concentrations of 156 ppb (pH 4.02) were measured. With increasing depth, higher uranium concentrations were found in the soil water, e.g., 322 ppb (pH 3.40) were found at a depth of 60 cm, and 890 ppb (pH 3.27) were determined in a depth of 1 m below ground. Surface water on the test site, which is found in a little creek, ranged in uranium concentration from 75 to 291 ppb. Thus in first approximation, it can be concluded that the cultivated plants on the test site grew in soils with a soil water concentration of approximately 150 ppb. As the following tables and figures show, such high uranium concentration was not observed in any of the investigated samples of this study. A diagram, which illustrates the uranium concentrations in the investigated plants and plant compartments of the test site, is shown in Fig. 4. Three different types of soil, i.e., “control”, “topsoil,” and “compost”, were used to cultivate sunflowers on the test site. All other plants grew only on “control” soil. *Helianthus annuus* (sunflower) was, thus, dominating the cultivated plants growing on the test site. Therefore, a lot of sample material was available, and many plant compartments could be investigated for sunflower sample specimens. However, some plant compartments were dry, and even by centrifugation, no plant sap could be extracted. In these cases, the uranium concentration in the plant sample compartments could only be determined for the solid bulk and residuum fractions (Table 1). Whenever saps could be derived from respective sunflower compartment samples, the analyses showed that uranium concentration in the saps were always higher than uranium concentrations in the solid bulk and residuum fractions. However, no significant differences in the uranium concentrations were observed in plant compartment samples of sunflowers and the three soil types “control”, “topsoil,” and “compost,” indicating

**Table 1** Uranium concentrations measured in compartments of sunflower (*Helianthus annuus*), sunchoke (*Helianthus tuberosus*), and potato (*Solanum tuberosum*) all grown on the substrates “control,” “topsoil,” and “compost” of the test site. In addition, uranium concentrations in native plants, i.e., butterbur (*Petasites albus*), *Taraxacum sect. Ruderalia*, *Trifolium pratense*, and *Festuca rubra*, all growing on the substrates “control” of the test site, are shown. The analytical error of ICP measurements is 5 % for uranium

	U[ppb]	
	Bulk or solid residuum	Within sap
Sunflower, petals, control	0.21±0.01	
Sunflower, capitulum, control	0.10±0.005	1.28±0.06
Sunflower, blossoms mix, control	0.13±0.006	1.71±0.09
Sunflower, leaves, control	0.44±0.022	
Sunflower, shoots, control	0.09±0.004	3.55±0.18
Sunflower, roots, control	0.80±0.04	
Sunflower, rootlet, control	7.61±0.38	12.10±0.6
Sunflower, blossoms mix, topsoil	0.30±0.015	5.36±0.27
Sunflower, leaves, topsoil	0.37±0.018	
Sunflower, shoots, topsoil	0.09±0.004	
Sunflower, blossoms mix, compost	0.10±0.001	1.87±0.09
Sunflower, leaves, compost	0.12±0.001	8.74±0.44
Sunflower, shoots, compost	0.06±0.001	2.45±0.12
Sunchoke, leaves, control	0.22±0.01	
Sunchoke, shoots, control	0.17±0.008	
Sunchoke, corm, control	0.28±0.014	19.10±0.96
Sunchoke, roots, control	0.50±0.025	19.30±0.96
Sunchoke, rootlet, control	4.22±0.21	
Potato 1, control	0.11±0.005	9.74±0.5
Potato 2, control	0.13±0.006	3.05±0.15
Potato 3, control	0.06±0.003	3.95±0.2
Potato 4, control	0.13±0.006	3.49±0.17
Potato 5, control	0.21±0.01	18.9±0.9
Potato 6, control	0.06±0.003	5.84±0.27
Butterbur, leaves, control	1.04±0.05	2.98±0.15
Butterbur, shoots, control	0.60±0.03	1.80±0.1
Butterbur, roots, control	1.01±0.05	39.30±1.96
<i>Betula pendula</i> , leaves, control	0.10±0.005	17.00±0.85
<i>Taraxacum sect. Ruderalia</i> , above-ground biomass, control	0.55±0.28	2.13±0.11
<i>Trifolium pratense</i> , above-ground biomass, control	0.45±0.022	30.40±1.52
<i>Festuca rubra</i> , above-ground biomass, control	0.45±0.022	19.10±0.96

that the variation of the soil type is not substantially influencing its phytoremediation efficiency in respect to uranium. The highest uranium concentration of 12.1 ppb in the sunflower compartments was found for the sample representing the sap of rootlets grown on the “control” substrate. Similar observations were made for compartments of *Helianthus tuberosus*

(sunchoke). Here, the highest uranium concentrations were found in root and corm sap samples and reached values of approximately 19 ppb. In sunchoke rootlets, for which no sap could be generated, uranium concentrations of approximately 4 ppb were measured. These values were much higher than uranium concentrations detected in solid shoot and leave samples of sunchoke.

The uranium concentrations detected in saps of six *Solanum tuberosum* (potato) tubers ranged between 3 and 19 ppb, and again were thus much higher than in the solid residue. Here, the uranium concentrations reached only values between 0.06 and 0.21 ppb. The scatter in uranium concentration in these six potato tubers was found to be outside of the analytical error range. This is quite interesting, since the potato tubers were collected from different plants, but the tubers itself were only separated by approximately 10 cm.

Sunflowers, sunchoke, and potatoes were all cultivated plants grown on the test field. Other plants investigated in this study occurred as native plants on the test site.

The most obvious difference in uranium concentration in roots and above ground compartments was found for *Petasites albus* (butterbur). Approximately 39 ppb were detected in the sap of butterbur roots; however, only less than 3 ppb of uranium were found in shoots and in leaves. This relatively high uranium concentration in roots in comparison to the uranium concentrations found in shoots, leaves, and blossoms is also described by other authors, e.g., Tomé et al. (2008) and Caldwell et al. (2012).

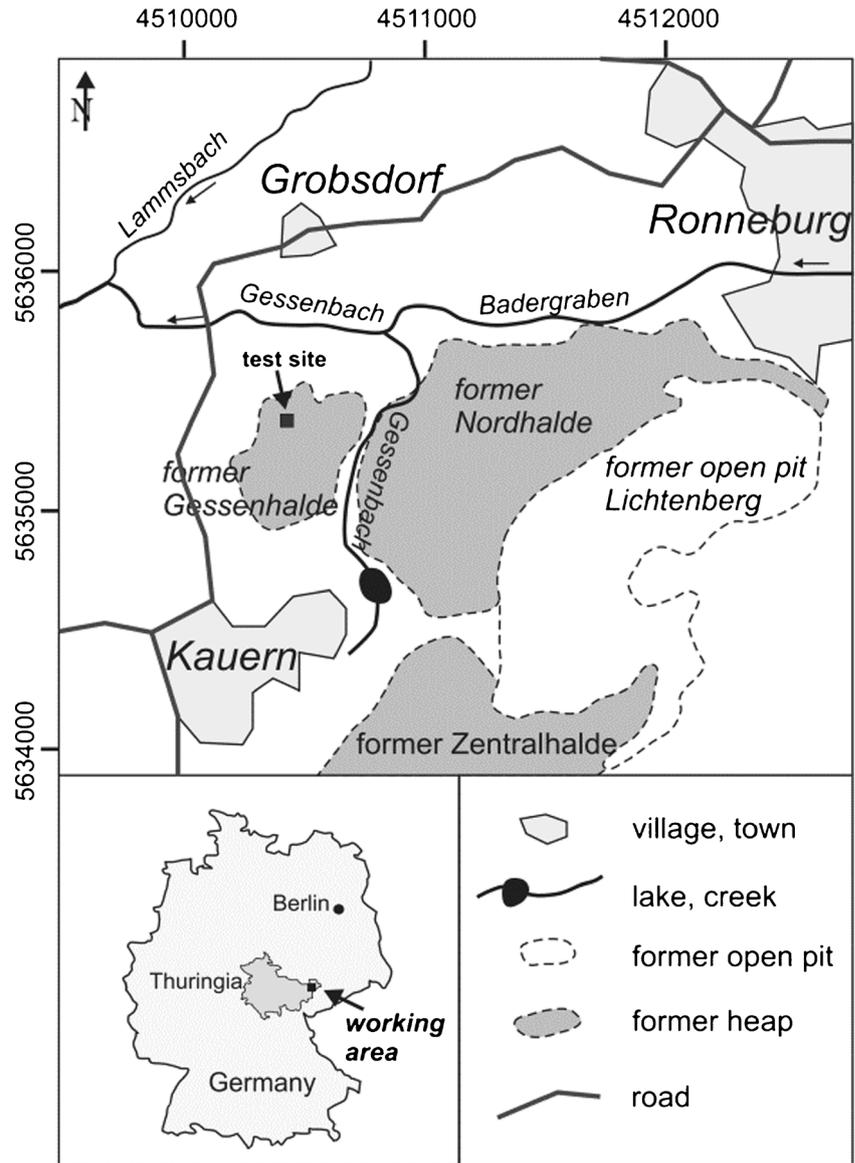
Biomining of uranium phosphate minerals located in the rhizosphere, on the surface of fungal hyphae, as described by Fomina et al. (2008), may explain the relatively high uranium concentrations detected in roots samples, in comparison with distinctively lower uranium concentrations found in above ground biomass.

The highest uranium concentration in saps of 30.4 ppb from above surface growing plant compartments was measured in above ground biomass, i.e., a mixture of shoots and leaves, of *T. pratense* (red clover). Why *T. pratense* showed much higher uranium concentrations in their sap extracted from above ground biomass in comparison with the three other plant samples, i.e., leaves of *B. pendula* and above ground biomass of *T. sect. Ruderalia* and *F. rubra*, studied in this work is not clear. However, Chen et al. (2005b) observed that in this plant species,  $^{238}\text{U}$  was translocated to the greatest percentage amount from roots to the shoots.

## Mushrooms

All studied mushroom fruiting body samples occurred naturally in the test field “Gessenwiese”, except for *L. deliciosus* (Saffron milk cap), which was collected as reference for a native mushroom growing on an uncontaminated site in a meadow on the ground of the HZDR in Dresden/Germany.

**Fig. 1** Map in which the test site Gessenwiese is shown. It is located in Thuringia/Germany; coordinates are in German grid (Gauß-Krüger zone 4)



The uranium concentration in mushrooms in general in our study was always lower than in plants, except for one sap sample of *Laccaria laccata* (waxy laccaria). However, this

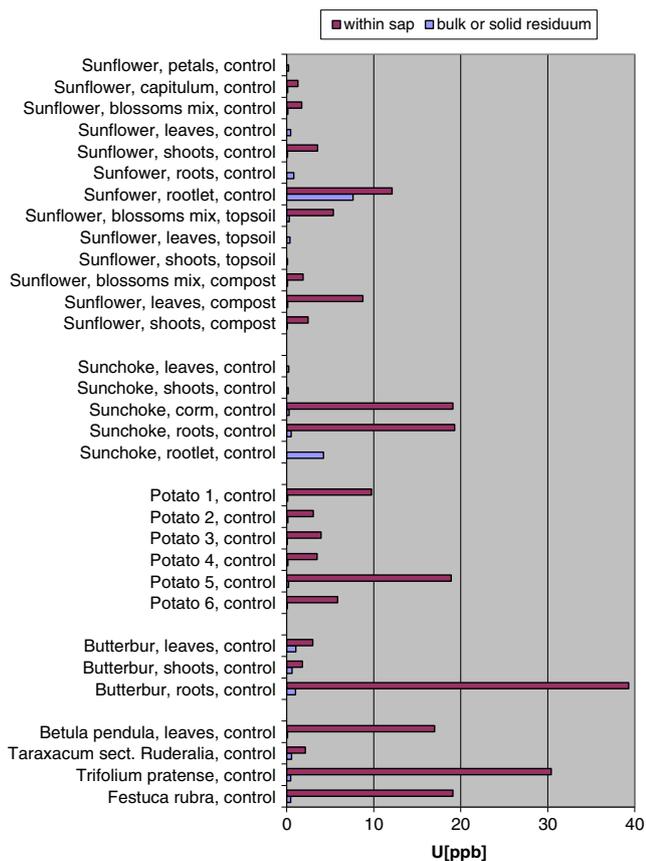
high uranium concentration could not be confirmed in a sample of another *L. laccata* specimen (Table 2). This is a remarkable result, since mushrooms are generally considered



**Fig. 2** Bird's-eye view of the former Gessenhalde. © Archive Wismut



**Fig. 3** Photograph of today's appearance of the “Gessenwiese”. The test site is bounded by a fence

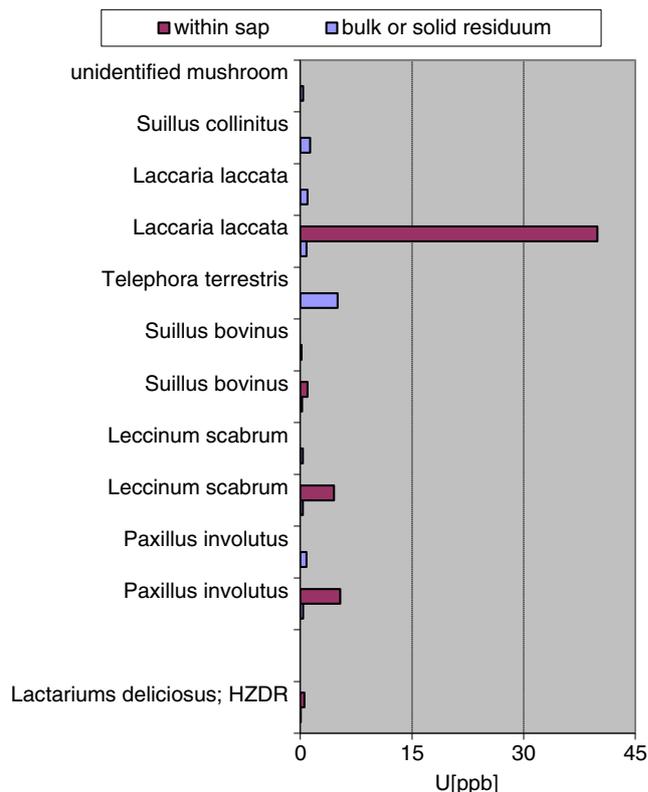


**Fig. 4** Uranium concentrations in plants and plant compartments from the test site Gessenwiese. The last three plant specimens show values for above-ground biomass (see Table 1)

as accumulators for many heavy metals. A reason for this could be linked to the very wet weather conditions prior to the sampling campaign.

Chemical analyses by ICP-MS of two different mushroom sample specimens of the same mushroom species, i.e., Jersey cow mushroom (*Suillus bovinus*), brown Birch bolete (*Leccinum scabrum*), and brown roll-rim (*Paxillus involutus*) showed slightly different results (Fig. 5). To analyze more samples would be helpful for a better statistic, but the number of mushroom samples on the test field was limited. However, in general, the detected uranium concentrations in the studied mushroom samples were higher than in a mushroom sample collected on the HZDR campus, i.e., a reference mushroom representing uncontaminated growth conditions. As before, in the analyzed plant compartment samples, it was found that the uranium concentrations in the saps of the analyzed mushroom samples were higher than in the residue fraction. Consequently, only a small proportion of the incorporated uranium was immobilized by the cell material.

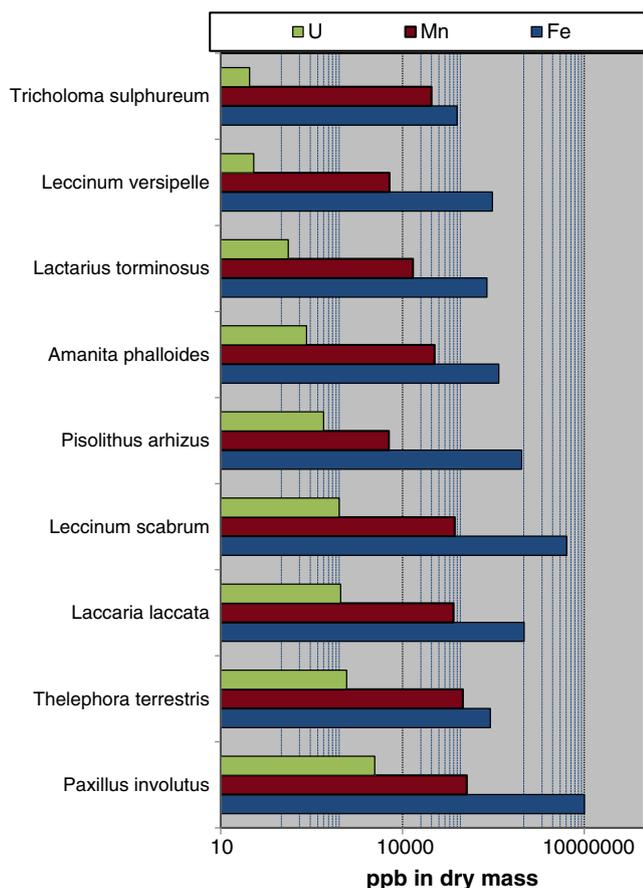
In Fig. 6 and Table 3, the uranium concentrations in dry masses from nine mushroom fruiting body samples, all collected from the test site, are confronted with their respective manganese and iron concentrations. The samples are shown in Table 3, with



**Fig. 5** Uranium contents of various mushrooms from the test site Gessenwiese. For comparison, the uranium concentration in a Saffron milk cap mushroom grown on an uncontaminated site (HZDR campus) is shown

**Table 2** Uranium concentrations in saps and bulk and residue from mushrooms collected from test site. The analytical error of ICP measurements is 5 % for uranium

	U[ppb]	
	Bulk or solid residuum	Within sap
Unidentified mushroom	0.38±0.02	
<i>Suillus collinitus</i>	1.31±0.07	
<i>Laccaria laccata</i> (waxy laccaria)	0.98±0.05	
<i>Laccaria laccata</i>	0.84±0.04	39.90±2
<i>Telephora terrestris</i> (earthfan)	5.01±0.25	
<i>Suillus bovinus</i> (Jersey cow mushroom)	0.14±0.01	
<i>Suillus bovinus</i>	0.21±0.01	0.95±0.05
<i>Leccinum scabrum</i> (birch bolete)	0.33±0.02	
<i>Leccinum scabrum</i>	0.35±0.02	4.50±0.2
<i>Paxillus involutus</i> (brown roll-rim)	0.81±0.04	
<i>Paxillus involutus</i>	0.37±0.02	5.37±0.27
<i>Lactarius deliciosus</i> (Saffron milk cap); HZDR	0.04±0.002	0.54±0.03



**Fig. 6** Uranium concentrations in ppb in dry masses of different mushrooms collected from the test site, together with concentrations in iron and manganese: In general—the more uranium is observed, the more iron and manganese is detected

increasing uranium concentrations in the dry mass. Because the water concentrations on fruiting bodies of mushrooms is about 90 % (Kalač 2010), the uranium concentrations in the dried masses are much higher than in saps and residue.

In good approximation, the higher the uranium concentration in the dried mushroom fruiting bodies, the higher is also the concentration of iron and manganese (see Table 3).

**Table 3** Uranium concentrations together with Mn and Fe concentrations in dry masses of different mushrooms collected from the test site. The analytical error of ICP measurements is 5 % for uranium, 5 % for manganese, and 10 % for iron

	U[ppb]	Mn[ppb]	Fe[ppb]
<i>Tricholoma sulphureum</i> (sulfur knight)	30 ± 1.5	30,040 ± 1,500	79,470 ± 800
<i>Leccinum versipelle</i> (orange birch bolete)	35 ± 1.75	6,070 ± 300	304,290 ± 3,040
<i>Lactarius torminosus</i> (wooly milkcap)	130 ± 6.75	14,870 ± 750	247,010 ± 2,470
<i>Amanita phalloides</i> (deathcap)	260 ± 13	33,770 ± 1,700	386,970 ± 3,900
<i>Pisolithus arhizus</i> (dyeball)	500 ± 25	5,970 ± 300	923,930 ± 92,400
<i>Leccinum scabrum</i> (brown birch bolete)	900 ± 45	72,480 ± 3,600	507,7520 ± 50,800
<i>Laccaria laccata</i> (deceiver)	950 ± 45	69,480 ± 3,500	1,017,270 ± 10,200
<i>Thelephora terrestris</i> (earthfan)	1,200 ± 60	98,950 ± 4,900	279,905 ± 2,800
<i>Paxillus involutus</i> (brown roll-rim)	3,470 ± 170	114,930 ± 5,750	10,020,450 ± 1,000,000

This trend was also observed for other heavy metals, e.g., Hg, Pb, Cd, and Cu in samples of edible mushroom fruiting bodies (Demirbaş 2000). However, since Fe and Mn are well-known fluorescence quenchers for uranium (Meinrath 1997), a higher uranium concentration in combination with simultaneously increasing Fe and Mn concentrations does not necessarily lead to better fluorescence signals. In addition, some organic components of the cell sap may also quench the fluorescence signal of uranium. The presence of these quenchers in the sap samples is probably the reason why we were not able to detect a useful fluorescence signal for uranium, despite the fact that the sensitivity of this method is much lower. The detection limit for aqueous uranium is described by Bernhard and Geipel (2007) as 0.2 µg L<sup>-1</sup>.

In all biological samples collected from test site “Gessenwiese”, uranium was detectable by ICP-MS. UO<sub>2</sub>SO<sub>4(aq)</sub>, the dominant uranium species in the surface and soil waters samples from the test site (Baumann et al. 2012) was obviously not transferred in significant amounts into the investigated plant materials, since the uranium concentrations detected in all studied plants and mushrooms sample specimens from the test site were always significantly lower than the uranium concentration in the surrounding soil water. As described in Baumann et al. (2012), the uranium concentration in the plant rooting zone, i.e., the soil water concentration in a depth of 30 cm, was specified as 150 ppb. So, none of the studied plant and mushroom species can be denoted as a hyperaccumulator in respect to uranium, and hence, it appears less promising to use the investigated plants and mushrooms for uranium phytoremediation.

An approach to improve the uranium uptake by plants and mushrooms and thus transfer more uranium into the plants and mushrooms would be to add organic acids to the soil, e. g., citric acid (Ebbs et al. 1998). These organic acids are able to break the uranium sulfate complex, which is the dominating uranium species in the surface and soil waters from this test site (Baumann et al. 2012), and thus change the uranium speciation in the soil water. The resulting uranium organic complex increases the amount of uranium which would pass the soil root boundary. Thus, more uranium would be transferred into the

plants and mushrooms, and in doing so, they would act more as hyperaccumulators for uranium. However, this would be no solution at all to increase the phytoremediation efficiency of plants and mushrooms, since such an approach would be extreme counterproductive, since in parallel, the uranium solubility in soil would be dramatically increased leading to a massive mobilization of the radioactive heavy-metal uranium and its transfer into a groundwater aquifer.

## Conclusion

The study showed that uranium concentrations observed in plant compartment and mushroom fruiting bodies sap samples, collected from the test site “Gessenwiese”, were always higher than their associated solid residue sample. It was also found that the uranium concentration detected in the studied root samples showed higher uranium concentrations that were observed in their above ground biomass, e.g., in blossoms, shoots, leaves, etc. In addition, the detected uranium concentrations in plants and mushrooms collected in this study were always lower than in the associated soil water, indicating that under the encountered natural conditions, none of the studied plant and mushroom species is considered to be a hyperaccumulator to extract uranium in sufficient amounts out of the uranium-contaminated soil.

Despite the fact that TRLFS is described as a very sensitive method, especially in case of uranium–phosphate speciation (Baumann et al. 2008), in which uranium should occur in roots (Chen et al. 2008), the detected uranium concentrations, despite being above the sensitivity limit, proved to be too low—in combination with the presence of fluorescence quenching substances, e.g., iron and manganese ions, and/or organic quenchers—to extract a useful fluorescence signal, which could have helped to identify the uranium speciation in plants.

**Acknowledgment** The authors thank the EU project “UMBRELLA” (using microbes for the regulation of heavy-metal mobility at ecosystem and landscape scale) GA no. 226870, project within FP7 topic “Recovery of degraded soil resources” for funding, and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), project no. 02NUK015F also for support. U. Schaefer, A. Ritter, S. Weiß, and M. Abt for technical support, M. Lonschinski for the map, E. Kothe, G. Büchel (both Friedrich-Schiller-Universität Jena) for getting access to test site “Gessenwiese”.

## References

- Arnold T, Utsunomiya S, Geipel G, Ewing TC, Baumann N, Brendler V (2006) Adsorbed U (VI) surface species on muscovite identified by Laser Fluorescence Spectroscopy and Transmission Electron Microscopy. *Environ Sci Technol* 40:4646–4652
- Arnold T, Baumann N, Krawczyk-Bärsch E, Brockmann S, Zimmermann U, Jenk U, Weiß S (2011) Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochim Cosmochim Acta* 75:2200–2212
- Baumann N, Brendler V, Arnold T, Geipel G, Bernhard G (2005) Uranium sorption onto gibbsite studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *J Colloid Interface Sci* 290:318–324
- Baumann N, Arnold T, Foerstendorf H, Read D (2008) Spectroscopic verification of the mineralogy of an ultra-thin mineral film on depleted uranium. *Environ Sci Technol* 42:8266–8269
- Baumann N, Arnold T, Lonschinski M (2012) TRLFS study on the speciation of uranium in seepage water and pore water of heavy metal contaminated soil. *J Radioanal Nucl Chem* 291:673–679
- Bernhard G, Geipel G (2007) Bestimmung der Bindungsform des Urans in Mineralwässern. *Vom Wasser* 105(3):7–10
- Caldwell EF, Duff MC, Ferguson CE, Coughlin DP, Hicks RA, Dixon E (2012) Biomonitoring for uranium using stream-side terrestrial plants and macrophytes. *J Environ Monitor* 14:968–976
- Chang P, Kim K-W, Yoshida S, Kim S-Y (2005) Uranium accumulation of crop plants enhanced by citric acid. *Environ Geochem Health* 27:529–538
- Chen B, Zhu Y-G, Zhang X, Jakobsen I (2005a) The influence of mycorrhiza on uranium and phosphorus uptake by barley plants from a field-contaminated Soil. *Environ Sci Pollut Res* 12:325–331
- Chen B, Zhu Y-G, Hu QH (2005b) Soil to plant transfer of  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ , and  $^{232}\text{Th}$  on a uranium mining-impacted soil from southeastern China. *J Environ Radioact* 82:223–236
- Chen B, Roos P, Zhu Y-G, Jakobsen I (2008) Arbuscular mycorrhizas contribute to phytostabilization of uranium in uranium mining tailings. *J Environ Radioact* 99:801–810
- Demirbaş A (2000) Accumulation of heavy metals in some edible mushrooms from Turkey. *Food Chem* 68:415–419
- Ding DX, Liu X-T, Hu N, Li G-Y, Wang Y-D (2012) Removal and recovery of uranium from aqueous solution by tea waste. *J Radioanal Nucl Chem* 293:735–741
- Duquène L, Tack F, Meers E, Baeten J, Wannijn J, Vandenhove H (2008) Effect of biodegradable amendments on uranium solubility in contaminated soils. *Sci Total Environ* 391:26–33
- Dushenkov S, Vasudev D, Kapulnik Y, Gleba D, Fleisher D, Ting KC, Ensley B (1997) Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environ Sci Technol* 31:3468–3474
- Ebbs DS, Brady DJ, Kochian LV (1998) Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J Exp Bot* 324:1183–1190
- Fomina M, Charnock JM, Hillier S, Alvarez R, Livens F, Gadd GM (2008) Role of fungi in the biogeochemical fate of depleted uranium. *Curr Biol* 9:R375–R377
- Gadd GM, Fomina M (2011) Uranium and fungi. *Geomicrobiol J* 28:471–482
- Haferburg G, Kothe E (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol* 47:453–467
- Haferburg G, Merten D, Büchel G, Kothe E (2007) Biosorption of metal and salt tolerant microbial isolates from a former uranium mining area. Their impact on changes in rare earth element patterns in acid mine drainage. *J Basic Microbiol* 47:474–484
- Hamann S, Schreiber W (2007) VOR ORT - Über den Uranerzbergbau bei Ronneburg, Thüringen. Bode Verlag GmbH, Haltern. ISBN 978-3-925094-41-5
- Huang JW, Blaylock MJ, Kapulnik Y, Ensley BD (1998) Phytoremediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ Sci Technol* 32:2004–2008
- Kalač P (2010) Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000–2009. *Food Chem* 122:2–15

- Laurette J, Larue C, Llorens I, Jaillard D, Jouneau P-H, Bourguignon J, Carriere M (2012a) Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: a XAS and TEM study. *Environ Exp Bot* 77:87–95
- Laurette J, Larue C, Mariet C, Brisset F, Khodja H, Bourguignon J, Carriere M (2012b) Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species: oilseed rape, sunflower, and wheat. *Environ Exp Bot* 77:96–107
- Lee M, Yang M (2010) Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium-contaminated groundwater. *J Hazard Mater* 173:589–596
- Lozano JC, Rodríguez PB, Tomé FV, Calvo CP (2011) Enhancing uranium solubilization in soils by citrate, EDTA, and EDDS chelating amendments. *J Hazard Mater* 198:224–231
- Meinrath G (1997) Uranium (VI) speciation by spectroscopy. *J Radioanal Nucl Chem* 224:119–126
- Mkandawire M, Taubert B, Dudel E (2004) Capacity of *Lemna gibba* L. (Duckweed) for uranium and arsenic phytoremediation in mine tailing waters. *Int J Phytoremediat* 6:347–362
- Pratas J, Fava PJC, Paulo C, Rodrigues N, Prasad MNV (2012) Uranium accumulation by aquatic plants from uranium-contaminated water in central Portugal. *Int J Phytoremediat* 14:221–234
- Punshon T, Gaines KF, Bertsch PM, Burger J (2003) Bioavailability of uranium and nickel to vegetation in a contaminated riparian ecosystem. *Environ Toxicol Chem* 22:1146–1154
- Saric MR, Stojanovic M, Babic M (1995) Uranium in plant species grown on natural barren soil. *J Plant Nutr* 18:1509–1518
- Schindler F, Gube M, Kothe E (2012) Bioremediation and heavy-metal uptake: microbial approaches at field scale. In: Kothe E, Varma A (eds) *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer, Heidelberg, pp 365–383
- Shanhandeh H, Hossner LR (2002) Enhancement of uranium phytoaccumulation from contaminated soils. *Soil Sci* 167:269–280
- Stojanović DM, Mihajlović ML, Milojković JV, Lopičić ZR, Adamović M, Stanković S (2012) Efficient phytoremediation of uranium mine tailings by tobacco. *Environ Chem Lett* 10:377–381
- Tomé FV, Rodríguez BP, Lozano JC (2008) Elimination of natural uranium and  $^{226}\text{Ra}$  from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. *Sci Total Environ* 393:351–357



**Charakterisierung der Mikroorganismen  
im sauren Grubenwasser  
des ehemaligen Uranbergwerks Königstein.**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

**Diplom-Biologin Isabel Zirnstern**

geboren am 01.08.1983 in Dresden

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. I. Röske (Technische Universität Dresden)
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. E. Kothe (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Tag der Einreichung: 31.03.2015

Datum der Verteidigung: 29.06.2015



Was wir wissen, ist ein Tropfen;  
was wir nicht wissen, ein Ozean.

*Isaac Newton*



# I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	1
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
IV. TABELLENVERZEICHNIS	11
V. TABELLENVERZEICHNIS ANHANG	13
VI. ZUSAMMENFASSUNG	15
1. EINLEITUNG	19
1.1. Sanierung der Uranerzgewinnungsanlagen durch die Wismut GmbH	19
1.2. Einführung Uran	19
1.3. Bedeutende Mikroorganismen in sauren Grubenwässern	21
1.3.1. Schwefel- und Eisen-oxidierende Bakterien	22
1.3.2. Sulfat-reduzierende Bakterien	24
1.4. Einfluss von Mikroorganismen auf die Mobilität von Metallen bzw. Radionukliden (direkt/indirekt)	25
1.5. Biofilme	28
1.6. Einfluss von Biofilmen auf die Mobilität von Metallen/Radionukliden	29
1.7. Biodiversität der Grube Königstein vor der Flutung	31
2. ZIELSTELLUNG	35
3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1. Untersuchungsgebiet Königstein	37
3.2. Biofilmsysteme	39
3.2.1. Die Flusszelle	39
3.2.2. Die Reaktor-Anlage	40
3.3. Entnahme von Wasser- und Biofilmproben	41
3.4. Transport/Lagerung der Proben	42

<b>3.5. Chemische Analyse von Kationen/Anionen</b>	<b>42</b>
<b>3.6. Erstellung von Speziationsdiagrammen</b>	<b>43</b>
<b>3.7. Catalyzed reporter deposition fluorescence in-situ hybridization (CARD-FISH)</b>	<b>43</b>
3.7.1. Fixierung und Vorbehandlung der Proben	43
3.7.2. Permeabilisierung der Zellen	44
3.7.3. Hybridisierung und CARD-Signalamplifikation	45
3.7.4. Gegenfärbung mit Propidiumiodid	47
3.7.5. Auswertung	47
<b>3.8. Quantitative mikrobiologische Verfahren</b>	<b>48</b>
3.8.1. Gesamtzellzahl (GZZ)	48
3.8.2. Lebendzellzahl (LZZ)	48
3.8.3. Most Probable Number-Methode (MPN)	49
3.8.3.1. MPN für aerobe Mikroorganismen	49
3.8.3.2. MPN für anaerobe Sulfatreduzierer	50
<b>3.9. Klassische mikrobiologische Kultivierungsverfahren</b>	<b>50</b>
3.9.1. Isolierung und Kultivierung von aeroben Mikroorganismen aus dem Grubenwasser	50
3.9.1.1. Gewinnung von Reinkulturen aerober Mikroorganismen	51
3.9.2. Isolierung und Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen aus dem Grubenwasser	51
<b>3.10. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden</b>	<b>52</b>
3.10.1. DNA-Extraktion der Wasser- und Biofilmproben	52
3.10.2. DNA-Extraktion aus Isolaten	52
3.10.3. DNA-Extraktion aus acidophilen, eisenhaltigen Kulturen	52
3.10.4. Ethanol-Fällung von DNA-Lösungen	53
3.10.5. Messungen des DNA-Gehaltes/Reinheit	53
3.10.6. RNA-Extraktion	53
3.10.7. Ethanol-fällung von RNA-Lösungen	54
3.10.8. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
3.10.9. Nachweis des PCR-Produktes mit Agarosegelelektrophorese	57
3.10.10. Reinigung von PCR-Produkten	58
3.10.11. Pyrosequenzierung	58
3.10.12. Sanger-Sequenzierung der 16S rDNA aus Einzel-Isolaten	58
<b>3.11. Bioinformatik - Sequenzanalyse</b>	<b>59</b>
3.11.1. Sequenzen aus der Sanger Sequenzierung	59
3.11.2. Sequenzen aus der Pyrosequenzierung	59
<b>3.12. Statistik</b>	<b>60</b>
<b>3.13. Lichtmikroskopie</b>	<b>61</b>
<b>3.14. Darstellung der Biofilme</b>	<b>61</b>
3.14.1. Fixierung und Färbung der Biofilme	61
3.14.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	61
3.14.3. Digitale Bildbearbeitung	62
<b>3.15. Mikrokosmen Experimente mit Hilfe von Biofilmen</b>	<b>62</b>
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>65</b>

<b>4.1. Beschreibung des untersuchten Grubenwassers durch Analyse der chemisch-physikalischen Parameter vor und nach der Flutung</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Quantifizierung der Mikroorganismen</b>	<b>72</b>
4.2.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaften mittels CARD-FISH	72
4.2.1.1. Universelle Sonden	72
4.2.1.2. Spezifische Sonden	74
<b>4.3. Charakterisierung der Prokaryonten</b>	<b>78</b>
4.3.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Bakterien durch molekular-biologische Methoden	78
4.3.1.1. Auswirkung des Biofilm-Alters auf die mikrobielle Zusammensetzung	86
4.3.1.2. Bewertung des Artenreichtums der Bakterien durch Alpha-Diversitätscharakteristiken	86
4.3.1.3. Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft – planktonisch und im Biofilm	90
4.3.2. Vergleich der bakteriellen Biozönose aus CARD-FISH und Pyrosequenzierung	91
4.3.3. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Bakterien durch molekularbiologische Methoden	92
4.3.3.1. Bewertung des Artenreichtums stoffwechselaktiver Bakterien durch Alpha-Diversitätscharakteristiken	94
4.3.4. Häufigkeiten der Bakteriengruppen in den DNA/RNA-Proben untereinander	96
4.3.5. Einfluss der chemischen Parameter des Grubenwassers auf die bakterielle Gemeinschaft	98
4.3.6. Quantifizierung und Charakterisierung ausgewählter Mikroorganismen nach klassisch mikrobiologischen Methoden	102
4.3.6.1. Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl	102
4.3.6.2. Aerobe Eisen- und Schwefelbakterien	103
4.3.6.2.1. Most probable number der Eisen- und Schwefelbakterien	104
4.3.6.2.2. Isolierung der Eisen- und Schwefelbakterien	105
4.3.6.2.3. Identifizierung der aeroben Isolate mittels 16S rDNA Sequenzierung	107
4.3.6.3. Anaerobe Sulfat-reduzierende Bakterien	115
4.3.6.3.1. Most probable number der Sulfat-reduzierenden Bakterien	115
4.3.7. Molekularbiologische Charakterisierung ausgewählter Bakterien Gruppen	116
4.3.7.1. Amplifikation der dissimilatorischen Sulfitreduktase	116
4.3.7.2. Identifizierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien mittels Pyrosequenzierung	117
4.3.8. Bakteriengemeinschaft vor und nach Flutung der Grube Königstein	121
4.3.9. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Archaea durch molekularbiologische Methoden	124
4.3.9.1. Bewertung des Artenreichtums der Archaea durch Alpha-Diversitätscharakteristiken	128
4.3.10. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Archaea durch molekularbiologische Methoden	131
4.3.10.1. Bewertung des Artenreichtums der stoffwechselaktiven Archaea durch Alpha-Diversitätscharakteristiken	132
4.3.11. Untersuchung der RNA- und DNA basierten Archaeagemeinschaft	134
4.3.12. Einfluss der chemischen Grubenwasser-Parameter auf die archaeale Gemeinschaft	135
<b>4.4. Charakterisierung der Eukaryonten</b>	<b>138</b>
4.4.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Eukaryonten durch molekular-biologische Methoden	138
4.4.1.1. Bewertung des Artenreichtums der Eukaryonten	141
4.4.2. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Eukaryonten durch molekularbiologische Methoden	143
4.4.3. RNA- und DNA basierte Eukaryonten	146
4.4.4. Amplifizierung eines Kinetoplastea-spezifischen Fragments	146
4.4.5. Charakterisierung der Eukaryonten vor und nach Flutung der Grube Königstein	147
<b>4.5. BIOFILME</b>	<b>150</b>
4.5.1. Darstellung der Biofilme mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	150
4.5.2. Einfluss der Biofilme auf chemische Grubenwasser-Parameter im Hinblick auf Immobilisierung/Akkumulation	160

VII. LITERATUR	171
<b>Verwendete Internetseiten</b>	<b>191</b>
VIII. ANHANG	193
<b>A 1. Verwendete Lösungen und Puffer</b>	<b>193</b>
A 1.1. TE-Puffer	193
A 1.2. TAE (Tris-Acetat-EDTA)- Puffer als Lauf- und Gelpuffer der Agarosegelelektrophorese	193
A 1.3. TAE Agarosegel	193
<b>A 2. Verwendete Nährmedien</b>	<b>194</b>
A 2.1. Aerobe Mikroorganismen	194
A 2.1.1. Einschichtige Festmedien	194
A 2.1.2. Zweischichtige Festmedien	196
A 2.2. Anaerobe Mikroorganismen	197
<b>A 3. Anhang zur Charakterisierung der bakteriellen Biozönose</b>	<b>198</b>
<b>A 4. Charakterisierung der Bakterien mit klassisch mikrobiologischen Verfahren</b>	<b>201</b>
IX. DANKSAGUNG	203
X. ERKLÄRUNG	207

## II. Abkürzungsverzeichnis

16S rDNA	Ribosomale Desoxy-ribonukleinsäure der 16S Untereinheit	FISH	Fluorescence <i>In-Situ</i> Hybridization
		FITC	Fluorescein Isothiocyanate
3D	3-Dimensional	g	Gramm; Mittlere Erdbeschleunigung
A	Adenin	G	Guanin
a	autotroph	GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
Abb.	Abbildung		
ac	acidophil	ges	gesamt
AEC	Acidotolerant Eukaryote Cluster	GFI	Grundwasserforschungsinstitut
AMD	Acid Mine Drainage	GZZ	Gesamtzellzahl
AMP	Adenosinmonophosphat	h	Stunde
APC	Acidophilic Protist Clade	HDPE	High Density Polyethylen
API	Analytical Profile Index	hm	heterotroph/mixotroph
APR	APS-Reduktase	HRP	Horseradish Peroxidase
APS	Adenosin-5' -Phosphosulfat	ICP-MS	Massenspektrometrie mit Induktiv Gekoppeltem Plasma
aq.	aquatisch		
ATP	Adenosintri-phosphat	inv	invertiert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	kb	Kilobasen
bp	Basenpaare	KbE	Kolonie bildende Einheiten
Bq	Becquerel	K-PCA	Königstein-Plate Count Agar
BTX	Benzol, Toluol, Xylol	l	Liter
bzw.	beziehungsweise	LPE	Long Paired End
C	Cytosin	LSM	Laser Scanning Mikroskop
ca.	zirka	LZZ	Lebendzellzahl
CARD-FISH	Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence <i>In-Situ</i> Hybridization	m	Meter
cDNA	complementary DNA	µg	Mikrogramm
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	µl	Mikroliter
cm	Zentimeter	µm	Mikrometer
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	µS	Mikrosiemens
d.h.	das heißt	M	Molar
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol	max.	maximal
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate	Mbp	Mega Basenpaare
deion.	deionisiert	mg	Milligramm
Dendr.	Dendrogramm	min	Minute
DEPC	Diethyldicarbonat	ml	Milliliter
dest.	destilliert	mM	Millimolar
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	mm	Millimeter
dNTP	Nukleosidtriphosphate	MPN	Most Probable Number
DOC	Dissolved Organic Carbon, Gelöster Organischer Kohlenstoff	mS	Millisiemens
DSR	Dissimilatorische Sulfitreduktase	mV	Millivolt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MW	Mittelwert
Eh	Redoxpotential	n.b.	nicht bestimmt
EO	Eisenoxidierer	NCBI	National Center for Biotechnology Information
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen	ng	Nanogramm
ESO	Eisen- und/oder Schwefeloxidierer	NK	Negativkontrolle
et al.	und andere	nm	Nanometer
EU	Europäische Union	NMDS	Nonmetric Multidimensional Scaling
FBL	Förderbohrloch	np	nicht parametrisch
		nt	Nukleotide

Abkürzungsverzeichnis

---

OD	Optische Dichte	SRB	Sulfat-reduzierende Bakterien
OTU	Operational Taxonomic Unit	T	Thymin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	Tab.	Tabelle
PCA	Plate count Agar	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
PCR	Polymerasekettenreaktion	TBE	TRIS-Borat-EDTA
PE	Polyethylen	TE	TRIS-EDTA
PES	Polyethersulfon	TG	Trockengewicht
PFA	Paraformaldehyd	TNb	Total Nitrogen, Gesamt Stickstoff
pH	Potentia Hydrogeni	TNT	Trinitrotoluol
PHA	Polyhydroxyalkanoat	TOC	Total Organic Carbon = Gesamt Organischer Kohlenstoff
PHB	Polyhydroxybuttersäure	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PI	Propidiumiodid	TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
PPi	Pyrophosphat	TRLFS	Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy
PVC	Polyvinylchlorid	TSB	Tryptic Soja Broth
RDP	Ribosomal Database Project	TTA	Thenoyltrifluoraceton
RNA	Ribonukleinsäure	u.a.	unter anderem
rpm	rounds per minute	UFZ	Umweltforschungszentrum
rRNA	Ribosomale RNA	üNN	über Normalnull
RT	Raumtemperatur	UV	Ultraviolet
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase	V	Volt
s	Sekunde	v.a.	vor allem
SDS	Sodiumdodecylsulfat	WGA	Wheat Germ Agglutinin
SO	Schwefeloxidierer	WHO	World Health Organization
sog.	sogenannte	XRD	X-Ray Diffraction
SOX	Sry Related High Mobility Group Box	z.B.	zum Beispiel
sp.	Spezies (nur eine)		
spp.	Spezies (mehrere)		

### III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenspiel des Eisen-und Schwefelkreislaufs unter Einfluss verschiedener Mikroorganismen.....	23
Abbildung 2: Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Metallen (Lloyd, 2002). .....	26
Abbildung 3: Darstellung eines Biofilms in der Seitenansicht (Längsschnitt), modifiziert von [3].....	28
Abbildung 4: Der Schacht 390 der 50 m-Sohle (nicht gefluteter Bereich im Jahr 2010) der Uranlagerstätte Königstein mit Stalaktit-behangenen Decken (oben) und den Biofilmen der Drainagerinne (unten). .....	31
Abbildung 5: Phylogenetische Zusammensetzung der in den Biofilmen (Stalaktite und aus Drainagerinne) enthaltenen Domänen Bacteria (links) und Eukarya (rechts) aus dem ehemaligen Uranbergwerk Königstein vor der Flutung (2008-2010). .....	32
Abbildung 6: Geografische Lage des Untersuchungsstandortes Königstein (orange markiert) innerhalb Sachsens. ....	37
Abbildung 7: Schematischer Längsschnitt des ehemaligen Uranbergwerkes Königstein (Lutz Uebe, Wismut GmbH). ....	38
Abbildung 8: Darstellung der Biofilm-Flusszelle als Konstruktion (links) und als <i>in-situ</i> Flusszelle mit unterschiedlichen Objektträgern (rechts). ....	39
Abbildung 9: Konstruktion des Biofilm-Reaktors vor Ort in Königstein (links) mit Einsicht in den Reaktor (Mitte) und Detailansicht der Reaktorträger wsb®clean (rechts). ....	40
Abbildung 10: Probennahme der Wasserproben mittels Vakuumfiltration (links), Biofilm-Entnahme der bewachsenen Reaktor-Träger(Mitte) bzw. Flusszellen-Träger (rechts). ....	41
Abbildung 11: Darstellung des zweischichtigen Festmediums. ....	51
Abbildung 12: Laborversuche mit Reaktor-Biofilmen .....	62
Abbildung 13: Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Eisens als Funktion des pH-Wertes.....	69
Abbildung 14: Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Urans als Funktion des pH-Wertes.....	70
Abbildung 15: Hybridisierungssignale für die Domänen Eubakterien, Archaea und Eukaryonten des Grubenwassers (W9) und der Biofilme aus der Flusszelle (F11). ....	73
Abbildung 16: Mittels CARD-FISH ermittelte Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft der Prokaryonten mit den Biofilm-Proben (2011) aus der Flusszelle und dem Grubenwasser (2013). .....	75
Abbildung 17: Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Wasser- und Biofilmproben (Flusszelle und Reaktor) der Königstein Grube in den Jahren 2011, 2012 und 2013 nach DNA-Extraktion und Pyrosequenzierung. ....	79
Abbildung 18: „Rarefaction“-Kurven der bakteriellen Pyrosequenzierungsbibliotheken. ....	87
Abbildung 19: Zusammensetzung der Gemeinschaft stoffwechselaktiver Bakterien in der Wasserprobe W13RNA (03/2013) nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.....	93
Abbildung 20: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse durch Zuordnung der rel. Häufigkeiten der Bakterien-Gruppen (OTUs) zum Auftreten in den einzelnen Proben.....	97
Abbildung 21: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die bakteriellen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse.....	99
Abbildung 22: Dendrogramme der Clusteranalyse mit den ausgewählten Proben der DNA und RNA-basierten Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der Bakterien durch (A) relative OTU Anteile an der Gesamtsequenzanzahl und Bray-Curtis Unähnlichkeiten oder (B) standardisierte Messungen der Umweltparameter und Euclidean Entfernungen.....	101

Abbildung 23: Kolonien einiger ausgewählter identifizierter aerober Isolate. a) <i>Arthrobacter scleromae</i> b) <i>Thiomonas</i> sp. c) <i>Sediminibacterium</i> sp. d) <i>Bacillus licheniformis</i> e) <i>Paenibacillus</i> sp. f) <i>Mycobacterium mantenii</i> g) <i>Methylobacterium adhaesivum</i> h) <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	112
Abbildung 24: Kontrolle der Amplifikation des <i>dsrA</i> -Fragments. Aufnahme des Agarosegels der Gelelektrophorese. ....	117
Abbildung 25: Zusammensetzung der Sulfat-reduzierenden Bakterien in der Wasserprobe vom 09/2013 nach Extraktion der DNA aus den anaeroben MPN-Ansätzen und anschließender Pyrosequenzierung.....	118
Abbildung 26: Zusammenfassung der bakteriellen Gemeinschaften vor- und nach Flutung des Bergwerkes Königstein.....	122
Abbildung 27: Zusammensetzung der Archaea Gemeinschaft in den Wasser- und Biofilmproben der Probenjahre 2011, 2012 und 2013. ....	125
Abbildung 28: „Rarefaction“-Kurven der Pyrosequenzierungsbibliotheken für Archaea.....	129
Abbildung 29: Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft stoffwechselaktiver Archaea in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung. ...	131
Abbildung 30: Dendrogramme der Clusteranalyse mit den ausgewählten Proben der DNA und RNA-basierten Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der Archaea durch (A) relative OTU Anteile an der Gesamtsequenzanzahl und Bray-Curtis Unähnlichkeiten oder (B) standardisierte Messungen der Umweltparameter und Euclidean Entfernungen.....	136
Abbildung 31: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die archaealen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse.....	137
Abbildung 32: Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose der Eukaryonten in der Wasserprobe W11 (11/2011) und der Biofilmprobe der Flusszelle F12 (10/2012) nach DNA-Extraktion und Pyrosequenzierung. ....	139
Abbildung 33: „Rarefaction“-Kurven der Pyrosequenzierungsbibliotheken für Eukaryonten. ....	141
Abbildung 34: Zusammensetzung der Gemeinschaft stoffwechselaktiver Eukarya in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.....	143
Abbildung 35: Amplifikation des <i>Kinetoplastea</i> -Fragments.....	147
Abbildung 36: Zusammenfassung der Eukarya Gemeinschaften vor- und nach Flutung des Bergwerkes Königstein. ....	148
Abbildung 37: Objektträger Biofilm (links) aus der Grubenwasser gefluteten Flusszelle (rechts).. ...	152
Abbildung 38: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin AAL-Alexa488 (grün).....	153
Abbildung 39: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin PSA-FITC (grün). ....	154
Abbildung 40: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der EPS durch das Lektin WGA-FITC (grün). ....	155
Abbildung 41: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin WGA-FITC (grün).....	156
Abbildung 42: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch SybrGreen (grün) und der EPS mit dem Lektin WGA-TRITC (orange).....	157
Abbildung 43: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Proteine in den Zellen und in der EPS mit SyPro Orange.. ....	158
Abbildung 44: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Zellmembranen durch FM1-43.....	159
Abbildung 45: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Eisen an/in Reaktor-Biofilmen. ....	161
Abbildung 46: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Arsen an/in den Reaktor-Biofilmen. ....	163

Abbildung 47: Laborversuche (links) und Feldversuche (rechts) zur Akkumulation von Cadmium, Zink, Mangan und Nickel an/in den Reaktor-Biofilmen. .... 165

Abbildung 48: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Uran an/in den Reaktor-Biofilmen. .... 166

Abbildung 49: Feld- und Laborversuche zur Akkumulation von Europium an/in den Reaktor-Biofilmen. .... 168



## IV. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammenfassung der Probennahmedaten mit Art der Probe, Art der Analyse und Bezeichnung der Proben. ....	41
Tabelle 2: Verwendete Pufferlösungen für CARD-FISH.....	44
Tabelle 3: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für CARD-FISH.....	45
Tabelle 4: Zusammensetzung des Waschpuffers für CARD-FISH. ....	47
Tabelle 5: 5'-HRP gelabelte Sonden (Thermo Scientific), deren Sequenz und das Ziel-Gen mit den verwendeten Formamid-Konzentrationen. ....	46
Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit für die CARD-FISH verwendeten Filter für das Axioskop.....	47
Tabelle 7: Zusammensetzung der Nährböden für die Bestimmung der Lebendzellzahl. ....	49
Tabelle 8: Verwendete Primer zur Amplifikation der DNA/cDNA-Fragmente nach DNA/RNA-Extraktion. ....	55
Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen je PCR-Ansatz.....	56
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten PCR-Programme. ....	57
Tabelle 11: Zusammenfassung der gemessenen chemisch-physikalischen Parameter im Grubenwasser Königstein in den Jahren 2009 bis 2013.....	66
Tabelle 12: Zusammensetzung des Eisens und deren Anteil am Gesamt-Eisengehalt. ....	68
Tabelle 13: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der DNA-basierten bakteriellen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken.....	87
Tabelle 14: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der bakteriellen Sequenzen je Probe und Zuordnung der OTUs zu Taxonomie.....	89
Tabelle 15: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der RNA-basierten bakteriellen Pyrosequenzierungsbibliothek. ....	94
Tabelle 16: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der stoffwechselaktiven bakteriellen Sequenzen (W13RNA) je Probe und Zuordnung der OTUs zur Taxonomie. ....	95
Tabelle 17: Übersicht über die chemischen Parameter für die Proben, die für die Generierung der bakteriellen 16S rDNA Pyrosequenzierungs-Bibliothek genutzt wurden. ....	98
Tabelle 18: Selektive Eigenschaften der Nährmedien für Eisen- und Schwefeloxidierer, Acidophile und Heterotrophe mit der Anzahl an Isolaten. ....	106
Tabelle 19: Die mittels Sequenzierung identifizierten Isolate der auf selektiven Nährmedien gewachsenen Kolonien.....	109
Tabelle 20: Auflistung der OTUs der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) und Zuordnung zur Taxonomie nach anaerober Kultivierung und Pyrosequenzierung der DNA.. ....	121
Tabelle 21: Klassifizierung der vorkommenden Phyla vor und nach Flutung des Bergwerkes Königstein.....	123
Tabelle 22: Alpha-Diversitätscharakteristiken der Archaea Pyrosequenzierungsbibliotheken. ....	129
Tabelle 23: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der archaealen Sequenzen je Probe und Zuordnung der OTUs zu Taxonomie.....	130
Tabelle 24: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der RNA-basierten archaealen Pyrosequenzierungsbibliothek.....	132
Tabelle 25: Zusammenfassung der häufigsten OTUs aus der RNA-basierten Pyrosequenzierungsbibliothek (W13RNA, grau) mit Zuordnung der OTUs zu Taxonomie. ....	133
Tabelle 26: Klassifizierung der vorkommenden phylogenetischen Gruppen vor- und nach Flutung des Bergwerks Königstein. ....	149
Tabelle 27: Kombination der verwendeten Nukleinsäurefarbstoffe und Lektine zur Anfärbung der EPS in den Biofilmen der Flusszelle (F13) und deren Wirksamkeit (nach Quelle (Zippel & Neu, 2011)).....	151



## V. Tabellenverzeichnis ANHANG

Tabelle A 1: Zusammensetzung des TE-Puffers.....	193
Tabelle A 2: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers.....	193
Tabelle A 3: Zusammensetzung der Spurenelemente-SL (2000 fach). ....	194
Tabelle A 4: Zusammensetzung der Tryptic Soya-Boullion (30 g/l).....	194
Tabelle A 5: Zusammensetzung der einschichtigen Festmedien (Johnson et al., 1987).....	195
Tabelle A 6: Zusammensetzung des SO-Mediums. ....	196
Tabelle A 7: Zusammensetzung der zweischichtigen Festmedien zur Kultivierung von Eisen- und Schwefeloxidierern.....	196
Tabelle A 8: Zusammensetzung des GAYE-Mediums. ....	197
Tabelle A 9: Zusammensetzung des Nährmediums aSRB für die Anzucht von Sulfatreduzierern.....	197
Tabelle A 10: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Grubenwasserproben Königstein. ....	198
Tabelle A 11: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Biofilmproben Königstein. ....	199
Tabelle A 12: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Biofilmprobe des Reaktors Königstein und der Kleinkläranlage im Vergleich.....	200
Tabelle A 13: Charakterisierung und Identifizierung kultivierter Prokaryoten. ....	201
Tabelle A 14: Fortsetzung Charakterisierung und Identifizierung kultivierter Prokaryoten. ....	202



## VI. Zusammenfassung

Beim Bergbau werden bestehende Ökosysteme in großem Maße beeinflusst. Im ehemaligen Uranbergwerk Königstein (Sachsen) wurde die Umwelt durch den Einsatz von chemischen Säuren zur Lösung des Urans aus dem Erz (Laugung) in Folge der Verschiebung des pH-Wertes zusätzlich belastet. Durch diesen Prozess entstand eine Umgebung, die einen niedrigen pH-Wert und hohe Konzentrationen an gelösten Schwermetall-Ionen aufweist. Die komplexe mikrobielle Lebensgemeinschaft verschob sich daraufhin, indem sich bevorzugt säuretolerante und Schwermetall-tolerante Mikroorganismen durchsetzten. Diese Mikroorganismen wurden durch die Flutung der unter Tage Schächte im Jahr 2010 in ihrer Zusammensetzung erneut beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Biozönose nach Flutung der unter Tage Schächte des ehemaligen Uranbergwerkes Königstein charakterisiert und mit den Ergebnissen der mikrobiellen Diversität vor dem Flutungsprozess verglichen. Hierfür kam ein breites Spektrum an Methoden zum Einsatz, das klassische mikrobiologische Methoden und molekularbiologische Techniken umfasste. Die Analysen erfolgten dabei über mehrere Jahre hinweg, um die Variabilität der mikrobiellen Population im Grubenwasser planktonisch und im Biofilm zu erfassen.

Die Charakterisierung des Grubenwassers erfolgte durch Messungen chemisch-physikalischer Parameter durch die Wismut GmbH. Vor allem Eisen- und Sulfat-Ionen wurden in hohen Konzentrationen gemessen. Die Konzentrationen der meisten chemischen Parameter erhöhten sich durch den fortschreitenden Flutungsprozess, wodurch eine Beeinflussung der mikrobiellen Zusammensetzung zu erwarten war.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Prokaryoten mittels CARD FISH wies auf eine hohe Abundanz von Beta- und Gamma-Proteobakterien sowie Alpha-Proteobakterien und *Nitrospira* in den planktonischen Proben des Grubenwassers hin. Die Biofilm-Proben wurden von Alpha- und Beta-Proteobakterien, Firmicutes sowie Gamma-Proteobakterien und *Nitrospira* dominiert. Mit ausgewählten spezifischen Sonden wurden die typischen Vertreter „saurer Grubenwässer“ *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* und *Ferrovum myxofaciens* planktonisch und im Biofilm erfasst. Mit den angewendeten Sonden wurde eine Hybridisierbarkeit zwischen 59 % (planktonisch) und 69 % (Biofilm) von der Gesamtzellzahl erreicht. Die Mikroorganismen Gruppen Archaea und Eukaryoten wurden mit entsprechenden Sonden mit einem geringen Anteil von < 1,5 % und < 0,2 % hybridisiert.

Die Identifikation der Bakterien ergab durch die Erstellung von 16S rDNA Bakterien Pyrosequenzierungs-Bibliotheken eine Dominanz der Alpha-, Beta- und Gamma-Proteobakterien in den planktonischen und den Biofilmproben gleichermaßen. Erhebliche Anteile an der gesamten

Diversität wiesen weiterhin die phylogenetischen Gruppen Nitrospira, Firmicutes, Acidobacteria und TM7 auf. Vor allem die Gattungen Acidithiobacillus, Leptospirillum, Acidocella und Thiomonas waren in großer Anzahl in allen Proben vertreten. Variabilitäten im Zusammenhang mit dem Probenahmejahr in Abhängigkeit der Parameter Stickstoff, Chlorid und Natrium konnten gezeigt werden. Auch die Anzahl der identifizierten Phylotypen variierte und nahm innerhalb der Probenjahre von 2011 bis 2013 zu. Bei den Biofilmproben wurde dabei auch ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Biofilme und der Anzahl der Phylotypen festgestellt. Die bakterielle Lebensgemeinschaft im Biofilm wurde außerdem von einer großen Anzahl unklassifizierter Bakterien dominiert, im Vergleich zu den planktonischen Grubenwasserproben. Die Biodiversität war in allen Proben niedrig. Die größte bakterielle Biodiversität wurde in den planktonischen -und den Biofilmproben des Probenahmezeitpunktes 07/2013 erfasst. Die Art *Ferrovum myxofaciens*, die vor Flutung der Grube die bakterielle Gemeinschaft dominierte, wurde nach der Flutung mittels Pyrosequenzierung nicht mehr nachgewiesen und durch die Art *Acidithiobacillus spp.* verdrängt.

Die Identifizierung der stoffwechselaktiven Bakterien mittels RNA-basierter Analyse und anschließender Pyrosequenzierung ergab eine Dominanz der Beta-Proteobakterien. Außerdem wurden Nitrospira, Alpha- und Gamma-Proteobakterien mit hohen Abundanzen als metabolisch aktive Phyla nachgewiesen. Die Gattungen Acidithiobacillus, Leptospirillum, Acidocella und Thiomonas, die in den DNA-basierten Pyrosequenzierungsbibliotheken dominierten, waren im Grubenwasser Königstein stoffwechselaktiv und sind als Schwefel- und Eisen-oxidierende bzw. Eisen-reduzierende Bakterien bekannt.

Durch Anwendung der „most probable number“ (MPN)-Methode wurde für Eisen-oxidierende Mikroorganismen im Grubenwasser eine „wahrscheinliche Zellzahl“ von  $8 \times 10^3$  -  $25 \times 10^3$  MPN/ml ermittelt. Die „wahrscheinliche Zellzahl“ der Schwefeloxidierer fiel mit  $2 \times 10^3$  -  $6 \times 10^3$  MPN/ml geringer aus. In Bezug auf die ermittelte Gesamtzellzahl ( $1,46 \times 10^6$  Zellen/ml) im Grubenwasser wurde ein geschätzter Anteil von 0,6-1,7 % kultivierbarer Eisen-oxidierender Mikroorganismen, sowie 0,1-0,4 % Schwefel-oxidierender Mikroorganismen ermittelt.

Die Anwendung von verschiedenen Kultivierungstechniken und Nährmedien ermöglichte die Isolation von autotrophen Eisen- und Schwefelbakterien und heterotrophen Bakterien. Insbesondere Eisen- und Schwefel-oxidierende Bakterien der Gattungen Thiomonas und Acidithiobacillus und die Eisen-reduzierenden Bakterien Acidocella und Acidiphilium wurden kultiviert. Auch Sulfid-oxidierende, methylothrophe, Metall-tolerante, Sporen-bildende und humanpathogene Bakterien konnten identifiziert werden.

Trotz der Dominanz der oxidativen mikrobiellen Stoffwechselprozesse, wurden geringe „wahrscheinliche Zellzahlen“ für Sulfatreduzierer zwischen 0,21 MPN/ml und 1,5 MPN/ml ermittelt. Neben dem Nachweis der dissimilatorischen Sulfitreduktase wurden Sulfat-reduzierende Bakterien (SRB) durch Pyrosequenzierung charakterisiert. Insbesondere die Gattung *Desulfosporosinus*, die auch in den DNA- und RNA-Analysen nachgewiesen wurde, konnte aus den MPN-Mischkulturen als Sulfatreduzierer identifiziert werden. In den DNA- bzw. RNA- Analysen waren, insbesondere im Jahr 2013, weitere SRB: *Desulfitobacterium*, *Desulfatirhabdium*, *Desulfurella*, *Desulfovibrio* gefunden worden.

Neben den Bakterien, die die Biozönose dominierten, wurde die Lebensgemeinschaft der Archaea durch Pyrosequenzierung identifiziert. Die geringe archaeale Diversität ähnelte sich in den einzelnen planktonischen -und Biofilmproben, wobei die Gruppe Thermoplasmata in allen Proben die Gemeinschaft dominierte. Innerhalb der Thermoplasmata waren *Ferroplasma* und *Thermogymnomonas* besonders abundant, die auch als stoffwechselaktive Archaea dominierten. *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Halobacteria* sowie *Crenarchaeota* (Thermoprotei) spielten nur eine geringe Rolle in der archaealen Gemeinschaft.

Die Domäne Eukaryoten, die laut CARD-FISH den geringsten Anteil an der mikrobiellen Biozönose in Königstein einnimmt, wurde mittels Pyrosequenzierung näher charakterisiert. Die phylogenetischen Gruppen Fungi, Amoebozoa, Alveolata, Heterolobosea, Cercozoa, Ciliophora und Rotifera sind neben zahlreichen nicht identifizierten Eukaryoten vertreten. Dabei waren Fungi und unklassifizierte Eukaryoten dominant. Zwischen den RNA- und den DNA-Analysen gab es nur ein übereinstimmendes Taxon (Fungi), jedoch keine übereinstimmenden OTUs. Im Vergleich zur Zusammensetzung vor der Flutung, stimmten nur die gemeinsamen Klassen *Sordariomycetes* (Fungi) und *Naegleria* (Heterolobosea) mit den Proben nach der Flutung überein.

Die Biofilme, einschließlich der „Extrazellulären polymeren Substanzen“ (EPS), wurden mit Hilfe von Lektinen und der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) visualisiert und dargestellt. Es wurden sowohl Polysaccharide, als auch proteinreiche und hydrophobe Bereiche der Zellstrukturen und die Biofilm-Matrix dargestellt. In den sauren Biofilmen wurden, aufgrund geringer Organik, nur wenige EPS gebildet. Einige Zellen umgaben sich mit Schleimkapseln, um im toxischen Milieu zu überleben.

Bei Mikrokosmen-Studien konnte im Grubenwasser ein Einfluss der Biofilme auf Eisen und Arsen im Hinblick auf Immobilisierung/ Akkumulation gezeigt werden. Dabei bildete sich eine Biofilm-Mineral-Verbindung an den Biofilm-Aufwuchsträgern aus, dessen Entstehung insbesondere durch Eisen- und Schwefeloxidierende Bakterien gefördert wurde.



## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Sanierung der Uranerzgewinnungsanlagen durch die Wismut GmbH

Nach dem 2. Weltkrieg wurde in Ostdeutschland in großem Ausmaß Uranerz abgebaut. Abnehmer dafür war zum größten Teil die Sowjetunion (Enderle, 1995). Vergleichend war Ostdeutschland mit 231.000 Tonnen Uran der viertgrößte Uranproduzent der Welt [1]. Seit der Wiedervereinigung 1990 findet in Gesamtdeutschland kein Uranabbau mehr statt. Zu den Hinterlassenschaften der intensiven Urangewinnung in den 45 Jahren zählen urankontaminierte Betriebsflächen und Oberflächengewässer, eine Vielzahl an Abraumhalden, sowie offene Grubenbaue und radioaktive Schlämme. Diese radioaktiven Metalle und andere im Erz gebundene Verbindungen (Eisen, Zink) können sich z.B. durch die Bildung von sogenannten „Sauren Grubenwässern“ weiterhin aus dem Gestein lösen und durch unkontrollierte Flutungen ins Grundwasser gedrückt oder an die Oberfläche gespült werden. Auch die Abraumhalden beinhalten noch einen gewissen Anteil an Uran, welches ebenfalls herausgelöst und ins Oberflächen- bzw. Grundwasser freigesetzt werden kann. Uranerzminen stellen somit auch noch lange Zeit nach ihrer Stilllegung ein erhebliches Umweltrisiko dar. Die radioaktive -und die Schwermetall-Kontamination in den ehemaligen Urangewinnungs- und Uranaufbereitungsanlagen in Thüringen und Sachsen einzudämmen, ist eine Aufgabe der Wismut GmbH. Dabei sollen kontaminierte Bereiche wieder saniert und deren Landschaft rekultiviert werden. Bekannte Standorte dieses Großprojekts sind die ehemaligen Uranbergwerke in Ronneburg (Thüringen) sowie in Pöhla, Schlema und Königstein (Sachsen). Zu den gängigen Sanierungstätigkeiten der Wismut GmbH gehören u.a. die Stilllegung und kontrollierte Flutung der Bergwerke, die Wasseraufbereitung, die Sanierung der Halden und Schlammteiche, sowie die Demontage kontaminierter Gebäude und die langfristige Umweltüberwachung [1]. Bisher werden zur Aufbereitung kontaminierter Wässer ausschließlich chemische Verfahren genutzt, wobei erhebliche Kosten für Chemikalien benötigt werden. Nicht nur die Entfernung des Urans, sondern auch die Entfernung weiterer Metalle wie z.B. Eisen, Arsen und Mangan, die oftmals in hohen Konzentrationen in den „Sauren Grubenwässern“ vorkommen, ist kostenintensiv. Um für eine langfristige Rekultivierung der Uranabbaugebiete die Kosten gering zu halten, ist die Wismut GmbH an alternativen Sanierungsmethoden, wie z.B. an möglichen biologischen Ansätzen, interessiert.

### 1.2. Einführung Uran

Uran ist ein natürlich vorkommendes radioaktives Element, und gehört zur Gruppe der Actinoide. Diese Gruppe bezeichnet radioaktive Metalle. Uran stellt dabei das schwerste der natürlich vorkommenden Metalle (Schwermetalle) mit einer Atommasse von 238,0289 g/mol dar. 23 Isotope sind von Uran bisher bekannt (Magill, 2006), davon sind drei natürlichen Ursprungs. Zu 99,3 % kommt

Uran als  $^{238}\text{U}$  Isotop in der Natur vor. Weniger oft besteht es aus  $^{235}\text{U}$  (0,7 %) oder  $^{234}\text{U}$  (0,005 %). Die Halbwertszeit liegt je nach Isotop zwischen  $2,5 \cdot 10^5$  und  $4,5 \cdot 10^9$  Jahren (Hollemann, 1995b). Weitere Uranisotope können künstlich in Reaktoren hergestellt werden. Beim spontanen radioaktiven Zerfall der natürlichen Uranisotope entsteht  $\alpha$ -Strahlung. Die Zerfallsprodukte stellen weitere radioaktive Elemente dar. Am Ende der langen Zerfallskette des dominierenden Isotops  $^{238}\text{U}$  entsteht das stabile, nicht-radioaktive Element  $^{206}\text{Pb}$  (Mitchell, 2013). Uran kommt vorwiegend in der äußeren Erdkruste (1-10  $\mu\text{g/g}$ ) vor. Durch Verwitterungsprozesse kann es auch in Gewässer, Böden und ins Grundwasser gelangen. Natürlich liegt es nur in sehr geringen Konzentrationen in Gewässern vor (bis zu 10  $\mu\text{g/l}$ ) (Hollemann, 1995a). Gemäß dem Umweltbundesamt wurde für Trinkwasser eine Grenze von 10  $\mu\text{g/l}$  Uran festgelegt [2]. Die gesundheitsschädigende Wirkung von Uran wurde bereits mehrfach untersucht. Dabei geht in vielen Fällen die größere Gesundheitsgefährdung von der chemischen Toxizität als von dem radioaktiven Charakter dieses Schwermetalls aus (Domingo, 2001). Die Ausbreitung des Elements Uran erfolgt zum größten Teil in der wässrigen Phase. Die unterschiedliche Löslichkeit unter oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen in Lösungen spielt für die Bildung von Uranlagerstätten eine große Rolle (Holleman, 2007). Uran bildet eine Reihe von Verbindungen, in denen es in den Oxidationsstufen +2 bis +6 vorliegen kann (Lide, 1994). Je nach Oxidationszahl variiert die Farbe des Actinoids in wässriger Lösung ebenso wie in festen Verbindungen:  $\text{U}^{3+}$  (violett),  $\text{U}^{4+}$  (grün),  $\text{U(V)O}_2^+$  (blauschwarz) und  $\text{U(VI)O}_2^{2+}$  (gelb) (Holleman, 2007). In der Natur tritt Uran stabil überwiegend als vier (IV)- oder sechs (VI)-wertige Form auf, wobei die reduzierte Form vorwiegend schwerlösliches Urandioxid ( $\text{UO}_2$ , Uraninit, Pechblende) bildet, während die oxidierte Form meist als wasserlöslicher Uranylkomplex ( $\text{UO}_2^{2+}$ -Komplexe) vorliegt (Langmuir, 1978). Uranverbindungen, vor allem die löslichen Uranyl-Salze, sind giftig. Die Mobilität von Uran wird sowohl durch seine chemischen/physikalischen Eigenschaften bestimmt, als auch durch die Wechselwirkungen mit anderen Ionen, Gesteinen und Mineralen sowie mit Mikroorganismen. In wässrigen Lösungen ist es unter oxidierenden Bedingungen als freies Uranylion  $\text{UO}_2^{2+}$  relativ mobil. Als Uranylion  $\text{UO}_2^{2+}$  liegt es unter aeroben, sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 5$ ) dominant im wässrigen Milieu vor (Arey, 1999). Für natürliche Systeme ist bekannt, dass beispielsweise uranhaltige saure Wässer durch hohe Sulfatkonzentrationen gekennzeichnet sind (Jenk, 1995), dadurch wird die Speziation in solchen Umgebungen außerdem von Uranyl(VI)-Sulfatkomplexen bestimmt (Geipel, 1996, Tripathi, 1979). Bei höheren pH-Werten ( $\text{pH} > 5$ ) bildet Uran(VI) Komplexe mit sauerstoffhaltigen Partnern wie z.B. Phosphat, Sulfat, Carbonat oder Wasser (Jensen, 2002). Die Bildung von Urankomplexen erhöht die Löslichkeit der Uranminerale und die Mobilität in Oberflächen- und Grundwasser. Solche sogenannten Sekundärminerale (als Uran(VI)-Komplexe) kommen natürlich in der Umwelt vor und stellen den Haupteintrag der Uran-Gehalte in Wässern dar (Langmuir, 1978). Durch verschiedene Parameter hat neben dem pH-Wert auch das Redoxpotential sowie die Konzentration von Komplexpartnern Einfluss

auf gelöstes Uran(VI), das in unterschiedlichen Bindungsformen vorliegt. Die Konzentration von Liganden wie z.B. Sulfat im Wasser, CO<sub>2</sub> der Luft oder Huminstoffe (Křepelová, 2007, Langmuir, 1978) beeinflusst die Bildung von Urankomplexen maßgeblich.

Uran liegt unter reduzierenden Bedingungen als vierwertiges Uranmineral (Uraninit) vor (häufig als Oxid UO<sub>2-x</sub>) und ist unter umweltrelevanten pH/E<sub>n</sub>-Bedingungen (pH größer 2,0) nahezu unlöslich (Feststoff) und immobil. Vierwertiges Uran kann durch Oxidation zu Uran(VI) wieder mobilisiert werden (Langmuir, 1979). Das chemische Verhalten (u. a. die Löslichkeit) von Uran wird in erster Linie vom pH-Wert beeinflusst (Bernhard, 1998). Die Oxidation von vierwertigem zu sechswertigem Uran kann aber auch biotisch von Bakterien katalysiert werden, genauso wie die Umkehrreaktion (Reduktion). Solche Uran-reduzierenden (*Geobacter spp.*, *Shewanella spp.*, Sulfatreduzierer) und Uran-oxidierenden Bakterien werden z.B. von Lovley, Suzuki (Lovley, 1991a, Suzuki, 2002) und Wall (Wall, 2006) beschrieben. Indirekt wird vierwertiges Uran durch die Anwesenheit von Eisen(III)-Ionen (Agate, 1983, Guay, 1981, Vuorinen, 1985) oder Schwefelsäure (Bhatti, 1998, Kelly, 1979) durch Eisen- und Schwefeloxidierende Bakterien in sechswertige Uranyl-Ionen umgewandelt.

### 1.3. Bedeutende Mikroorganismen in sauren Grubenwässern

Saure Grubenwässer stellen ein großes Problem in der Umwelt dar und sind durch Biooxidation von Metallsulfiden oft das Produkt aus Bergbaubetrieben. Die ersten Mikroorganismen, die in Zusammenhang mit Sauren Grubenwässern gebracht wurden, waren *Thiobacillus thiooxidans* (Colmer, 1947, Waksman, 1922) und *Thiobacillus ferrooxidans* ((Colmer, 1950, Temple, 1951). Die Arten dieser Stämme wurden später in *Acidithiobacillus thiooxidans* bzw. *Acidithiobacillus ferrooxidans* umbenannt (Kelly, 2000). Diese Organismen sind acidophil, d.h. sie wachsen bei pH-Werten kleiner als pH 6. Da der für ihr Wachstum optimale pH-Wert unter pH 3 liegt (Harrison, 1984, Johnson, 1998b), werden sie sogar als extrem acidophil bezeichnet. Die genannten Acidithiobacilli gelten als mesophil, da ihre optimale Wachstumstemperatur im Bereich von 20 - 40 °C liegt. Weitere extrem acidophile, in die Erzlaugung involvierte Mikroorganismen, sind die extrem thermophilen Archaea *Acidianus spp.*, *Metallosphaera spp.*, *Sulfolobus spp.* und *Sulfurococcus spp.*, die moderat thermophilen Vertreter, darunter das Archaeum *Ferroplasma acidiphilum* sowie die Bakterien *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* und *Sulfobacillus spp.*, und die mesophilen Bakterien *Acidiphilium acidophilum*, *Acidithiobacillus albertensis*, *Leptospirillum ferrooxidans* und *Sulfobacillus disulfidooxidans* (Bosecker, 1997, Golyshina, 2000, Johnson, 1998b, Schwartz, 1977). Die genannten Schwefel- und Eisen-oxidierenden Mikroorganismen sind häufig mit acidophilen heterotrophen Vertretern assoziiert, die auch zur Erzlaugung beitragen und deren Vorkommen typisch für diese schwefelsauren Habitats ist (Bosecker, 1997, Harrison, 1984, Schwartz, 1977). Zu diesen heterotrophen Mikroorganismen gehören die moderat thermophilen Archaea *Thermoplasma spp.* und *Picrophilus spp.* und die mesophilen

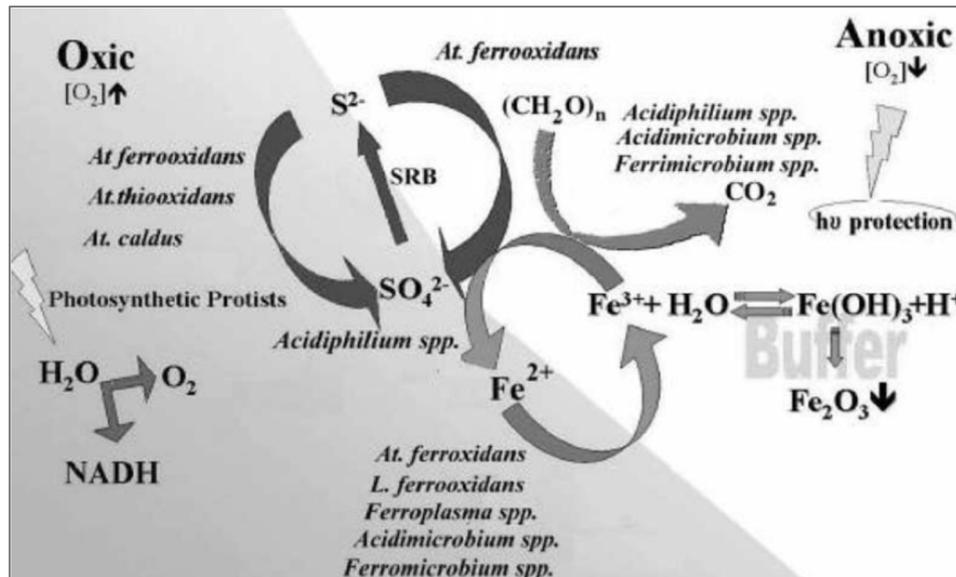
Bakterien *Acidisphaera rubrifaciens*, *Acidiphilium spp.*, *Acidobacterium capsulatum*, *Acidocella spp.* und *Acidomonas methanolica* (Hiraishi, 2000, Johnson, 1998b). Die oben genannten acidophilen Mikroorganismen kommen ebenfalls in natürlichen schwefelsauren Habitaten vor (Johnson, 1998a, Robbins, 2000). In diesen oft vulkanisch und geothermal aufgeheizten Lebensräumen, wie z. B. in heißen Schwefelquellen (Solfataren), liegen die Temperaturen weit über 40 °C, weshalb viele der extrem acidophilen Organismen thermophil sind. Die Besiedlung saurer Grubenwässer erfolgt neben prokaryotischen Mikroorganismen auch durch Eukaryonten z.B. acidophile Pilze, Algen (z.B. *Chlorella*, *Klebsormidium*), Flagellaten, Ciliaten (*Vorticella*, *Oxytricha*) und Amöben (*Naegleria*, *Vannella*, *Vahlkampfia*) (Gross, 2000, Johnson, 1998a, Leßmann, 2000, Marchlewitz, 1961, Packroff, 2000), jedoch liegt deren pH-Optimum meist bei neutralen oder alkalischen pH-Werten.

### **1.3.1. Schwefel- und Eisen-oxidierende Bakterien**

Für die Entwicklung der Grubenwässer spielen die Kreisläufe der abundanten Elemente Eisen und Schwefel eine große Rolle. Die Entstehung wird durch die Oxidation der Ionen aus Eisen- und Schwefelhaltigen Erzen z.B. Pyrit begründet, wobei die Reaktionsprodukte  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  im Wasser gelöst werden, sowie  $\text{Fe}^{2+}$  oxidiert wird und Fe(III)-Hydroxide bzw. Fe(III)-Hydroxosulfate ausfallen (Nordstrom, 1999, Singer, 1970). Eisen (III) Verbindungen (meist Hydroxide) sind bei neutralem pH-Wert schlecht löslich und fallen aus (Schmidt, 2008). Nur in der reduzierten Form (als  $\text{Fe}^{2+}$  bei reduzierenden Bedingungen), als organischer Komplex oder bei sehr niedrigem pH-Wert ist Eisen gut löslich. In diesem als Acid Mine Drainage (AMD) bezeichneten Prozess wurde den Schwefel- und Eisen-oxidierenden Mikroorganismen schon zeitig eine aktive Rolle zuerkannt (Colmer, 1947, Leathen, 1953a, Leathen, 1953b) (siehe Abbildung 1). Diese besteht aus der  $\text{H}^+$ -Freisetzung durch die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen sowie der Nachlieferung des Oxidanten  $\text{Fe}^{3+}$  durch die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ . Letztere Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Prozesses; er wird bei pH-Werten kleiner pH 3,5 durch die mikrobielle Katalyse stark beschleunigt (Singer, 1970). Der Angriff auf  $\text{FeS}_2$  (und andere Disulfide) erfolgt chemisch über  $\text{Fe}^{3+}$  (Luther III, 1987, Silverman, 1967, Singer, 1970), wobei als erste Reaktionsprodukte  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  entstehen, welche in anschließenden Reaktionen chemisch oder mikrobiell oxidiert werden (Schippers, 1999a, Schippers, 1999b). Die Auflösung und Oxidation säurelöslicher Sulfide z.B. Monosulfide ( $\text{FeS}$ ) erfolgt ebenfalls über die Oxidation mit  $\text{Fe}^{3+}$  oder über einen Protonenangriff und folgende chemische oder mikrobielle Oxidation der Lösungsprodukte (Schippers, 1999a).

Die an diesen Prozessen beteiligten Organismen sind Eisen- und/oder Schwefel-oxidierende Bakterien bzw. Archaea. Zu den Eisen-oxidierenden Vertretern zählen die mesophilen Bakterien *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Ferromicrobium acidophilus* und *Ferrovum myxofaciens*, die moderat thermophilen Vertreter *Leptospirillum thermoferrooxidans*, *Acidimicrobium ferrooxidans*,

*Sulfobacillus acidophilus*/thermosulfooxidans und *Ferroplasma spp.* (siehe Abbildung 1) sowie die extrem thermophilen Archaea *Acidianus spp.*, *Metallosphaera sedula*, *Sulfurococcus yellowstonii* (Bond, 2000, Johnson, 1998b, Johnson, 2014, Ziegler, 2009). Zu den Mikroorganismen, die bevorzugt reduzierte Schwefelverbindungen oxidieren, gehören die mesophilen Bakterien *Acidithiobacillus ferrooxidans*/*thiooxidans*/*albertis*/*acidophilus* (siehe Abbildung 1) und *Thiomonas cuprinus*, moderat thermophile *Acidithiobacillus caldus* sowie die extrem thermophilen Archaea *Sulfolobus spp.* und *Sulfurococcus mirabilis* (Johnson, 1998b).



**Abbildung 1: Zusammenspiel des Eisen- und Schwefelkreislaufs unter Einfluss verschiedener Mikroorganismen.** Beispielhaft sind die Kreisläufe des sauren Schwermetall-haltigen Flusses RioTinto abgebildet, die auf das Grubenwasser der Königstein Grube übertragbar sind (Amils, 2002).

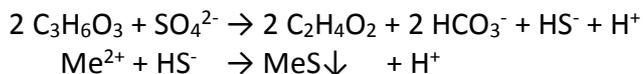
Bei der mikrobiellen Erzlaugung werden acidophile Eisen- und Schwefel-oxidierende Bakterien auch biotechnologisch genutzt, indem Metalle wie Kupfer, Zink, Nickel, Molybdän und Uran aus minderwertigen Erzen gewonnen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Gewinnung von Kupfer mit Hilfe des Bakteriums *Acidithiobacillus ferrooxidans*, das durch Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  die chemische Oxidation von Kupfer in Kupfersulfid ( $\text{CuS}$ ) indirekt ermöglicht. Diese Oxidation führt zur Solubilisierung des Kupfers (Madigan, 2001) und damit zum Herauslösen aus dem Erz. Mit diesem Leistungsspektrum ergeben sich Anwendungen zur Entfernung von Schwermetallen und Radionukliden (Weber, 2006) mit dem Ziel der Sanierung kontaminierter Flächen.

Die durch Eisenoxidierer anaerob gebildeten Eisen(III)oxide funktionieren als terminaler Elektronenakzeptor für eisenreduzierende Bakterien, wodurch ein dynamischer mikrobiell vermittelter Eisenredoxkreislauf aufrechterhalten wird (Weber, 2006). Einige Eisen/Schwefel-oxidierenden Mikroorganismen sind ebenfalls in der Lage reduzierenden Prozesse durchzuführen.

Dabei wird  $\text{Fe}^{3+}$  statt Sauerstoff als Elektronenakzeptor genutzt. Man spricht von der dissimilatorischen Eisenreduktion (Eisenatmung), wenn Eisen für die Verwertung organischer Verbindungen genutzt und dabei  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird. Acidophile Mikroorganismen, die gleichzeitig zur Eisen(III)-Reduktion befähigt sind und fakultativ anaerob leben, gehören zu *Acidiphilium spp.*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Sulfobacillus spp.* (Bridge, 1998, Johnson, 1991a) sowie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock, 1976, Pronk, 1992). Unter den Schwefel-reduzierenden Mikroorganismen sind ebenfalls acidophile Vertreter zu finden, wobei es sich durchweg um thermophile Archaea handelt.

### 1.3.2. Sulfat-reduzierende Bakterien

Natürliche Schwefelkreisläufe können sowohl auf chemischen Wege, als auch biologisch beeinflusst werden. Dabei ist der Schwefelkreislauf eng mit dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffkreislauf verbunden (Muyzer, 2008). Biologische Sulfatreduktionsverfahren sind auf die Stoffwechselaktivität Sulfat-reduzierender Bakterien (SRB) zurückzuführen, auch bezeichnet als Desulfurikanten. Sulfat kann dabei assimilatorisch und dissimilatorisch von den Bakterien genutzt werden. Bei der Assimilation wird Schwefel aus Sulfat genutzt um schwefelhaltige Aminosäuren und Enzyme zu synthetisieren. Auf dem dissimilatorischen Weg wird Sulfat als Elektronenakzeptor bei der Mineralisation organischer Substrate zur Energiegewinnung genutzt. Dabei wird Sulfat zu Sulfid (Odom, 1993) reduziert oder der Substratwasserstoff auf Sulfat übertragen und zu Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) reduziert (Heider, 2007a), was für viele Makroorganismen toxisch wirkt. In (Schwer)Metall belasteten Gewässern kann nach der mikrobiellen Sulfidogenese extrazellulär eine Schwermetallfällung als ionische Reaktion durch Bildung von Schwermetallsulfiden folgen. Die biochemischen, mikrobiell vermittelten, und die ionischen Reaktionen lassen sich prinzipiell durch zwei Gleichungen beschreiben, beispielsweise unter Annahme von Lactat als reduziertem Substrat und Acetat als oxidiertem Produkt.



Sulfatreduzierer sind obligat anaerob, verfügen über keine aeroben Atmungsketten (Heider, 2007a) und sind in anoxischen Habitaten (Sedimenten, Faulschlamm) ubiquitär verbreitet, wo Sulfat hinreichend vorhanden ist (Muyzer, 2008). Als terminaler Elektronenakzeptor können neben Sulfat auch Thiosulfat, Sulfit, elementarer Schwefel oder gar Nitrat-Verbindungen genutzt werden (Holmer, 2001). Der Sporenbildner *Desulfotomaculum reducens* wächst sogar mit Eisen(III), Mangan (IV), Uran(VI) oder Chrom (VI) als Elektronenakzeptoren (Tebo, 1998). Zur Eisen(III)-Reduktion sind ebenfalls manche Sulfat-reduzierende Bakterien z. B. der Gattung *Desulfovibrio* befähigt, sie sind jedoch häufig nicht in der Lage Energie über diesen Prozess zu gewinnen (Coleman, 1993, Lovley, 1995). Sulfat-reduzierende Bakterien zeigen eine hohe Diversität in Bezug auf mögliche Kohlenstoff-

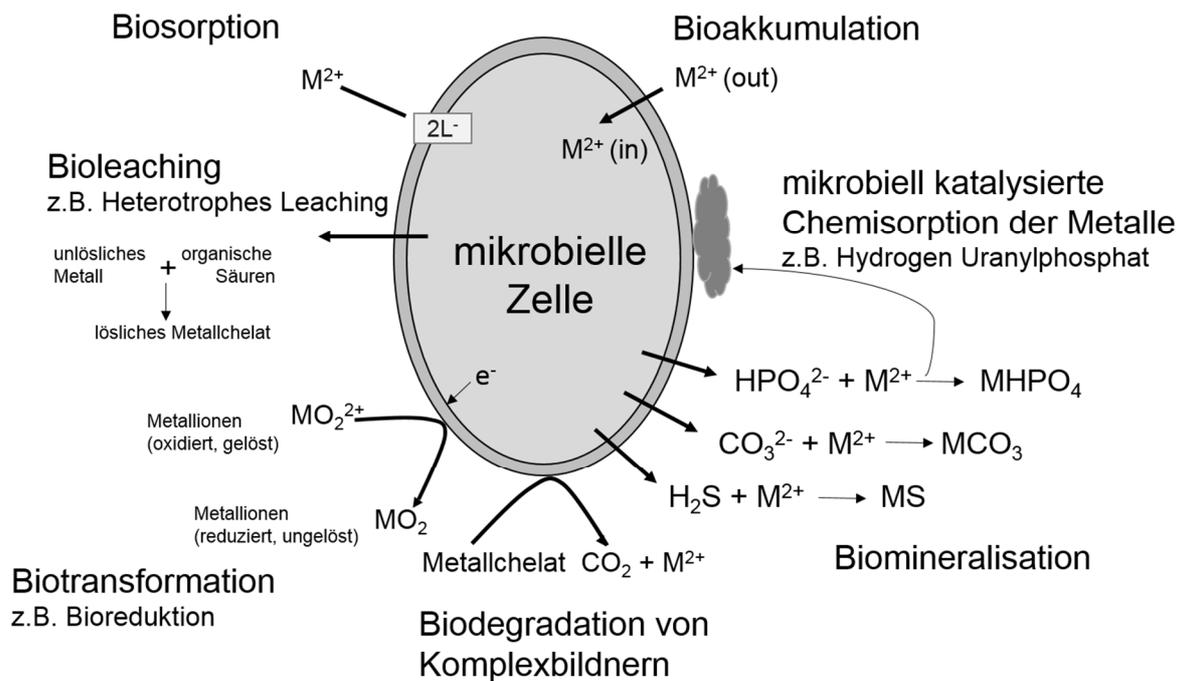
bzw. Energiequellen. Zu den verwertbaren Verbindungen zählen anorganische Verbindungen wie  $H_2$  und  $CO_2$  und organische Moleküle als Gärungsprodukte anderer Mikroorganismen wie z.B. Fettsäuren, Alkohole, Aminosäuren und Zucker (Hansen, 1993, Widdel, 1989). Die Gene für die Enzyme (aprAB und dsrAB), die an der Sulfatreduktion beteiligt sind, werden häufig als Marker zur Identifikation der Desulfurikanten genutzt (Friedrich, 2002, Zverlov, 2005).

Sulfatreduzierer findet man in verschiedenen Phyla der Domänen Bacteria und Archaea, da die Fähigkeit Sulfat zu reduzieren ein physiologisches Merkmal verschiedener anaerober Mikroorganismen ist. Vermutlich wurde diese Eigenschaft durch horizontalen Gentransfer ausgehend von den Delta-Proteobacteria und Firmicutes verbreitet (Friedrich, 2002, Mussmann, 2005). Die größte, Sulfat-reduzierende Bakterien enthaltende, Gruppe mit 23 Gattungen ist das Phylum Deltaproteobacteria z.B. Desulfovibrionaceae und Desulfobacteraceae. Weitere Desulfurikanten sind Desulfotomaculum und Desulfosporosinus (zu Clostridia), Thermodesulfovibrio (zu Nitrospira). Zwei Gruppen, die thermophile Sulfatreduzierer enthalten, sind die Phyla Thermodesulfobiaceae und Thermodesulfobacteria. Aber auch unter der Domäne Archaea verbergen sich Sulfat reduzierende Spezies z.B. Archaeoglobus (zu Euryarchaeota), Thermocodium und Caldivirga (Crenarchaeota) (Muyzer, 2008). Desulfurikanten haben aufgrund ihres breiten Abbauspektrums eine enorme ökonomische Bedeutung bei der biologischen Sanierung von kontaminierten Gewässern und Böden z.B. Neutralisierung, Korrosionsschäden, Abbau von toxischen Aromaten und Erdöl (Heider, 2007a). In AMD-belasteten Gewässern trägt neben der mikrobiellen Sulfatreduktion (Herlihy, 1987) auch die mikrobielle Eisen(III)-Reduktion bedeutend zur Alkalinitätsbildung und Neutralisierung bei (Vile, 1993). Auch technisch lassen sich die Stoffwechselprozesse der Sulfat-reduzierenden Bakterien nutzen. So können durch die sulfidogene Reduktion von gelöstem Sulfat Schwermetalle in sulfidischer Bindung aus der wässrigen Phase abgetrennt werden. Die Bindung verschiedener relevanter Schwermetalle in sulfidischer Form ist ein sehr effektiver Mechanismus zur Senkung der Schwermetallkonzentrationen. Mikrobielle Sulfatreduktion, d.h. Desulfurikation oder Sulfidogenese, als Möglichkeit zur biotechnologischen Reinigung von Bergbauwässern wird in zahlreichen Veröffentlichungen diskutiert (Glombitza, 2001, Höfer, 1998, Wakao, 1979).

#### **1.4. Einfluss von Mikroorganismen auf die Mobilität von Metallen bzw. Radionukliden (direkt/indirekt)**

Mikroorganismen und deren Stoffwechselprozesse beeinflussen die Mobilität von Metallen und Radionukliden in unterschiedlicher Weise und können für die Bioremediation dieser Umgebungen genutzt werden. Bakterien verfügen über verschiedene Mechanismen, um mit Radionukliden und Schwermetallen in Wechselwirkung zu treten. Diese können durch metabolische Aktivitäten direkt oder durch Metabolite indirekt beeinflusst werden und ermöglichen den Mikroorganismen die

Existenz in kontaminierten Habitaten. Einige der wichtigsten Mechanismen, mit denen z.B. die Bakterien Metalle und Radionuklide umwandeln und deren Mobilität oder Immobilisierung beeinflussen können, sind a) Biosorption, b) mikrobiell katalysierte Chemiesorption von Metallen, c) Bioakkumulation, d) Biotransformation und e) Biomineralisation (Lloyd, 2002). Diese werden im Folgenden näher erläutert und in Abbildung 2 dargestellt:



**Abbildung 2: Wechselwirkungen von Bakterien mit Radionukliden und Metallen (modifiziert aus Lloyd, 2002).**

Biosorption beschreibt die vom Stoffwechsel unabhängige Sorption (passive chemische Bindung) von Metallen und Radionukliden an der Biomasse. Lebende und tote Biomasse kann Schwermetalle und Radionuklide an funktionellen Gruppen der äußeren Zellmembran sorbieren. Liganden, an denen die Metalle binden sind z.B. Carboxyl-, Hydroxyl- und Phosphat-Gruppen (Lloyd, 2002, Merroun, 2001, Raff, 2000, Raff, 2002).

Bei der mikrobiell erhöhten Chemiesorption von Metallen fallen Mikroorganismen dabei zuerst ein Biomineral eines Metalls, welches dann als Ausgangspunkt für die Ablagerung des gewünschten Metalls dient. Die Ausfällung bewirkt eine stark geladene und reaktive Oberfläche des ausgefallenen Produkts (Bildung eines „Nucleus“) und beeinflusst die chemische Verteilung in der Umgebung durch Oxidation von organischen und anorganischen Komponenten genauso wie durch das Binden von Schwermetallen und Radionukliden aus der Lösung (Hem, 1978).

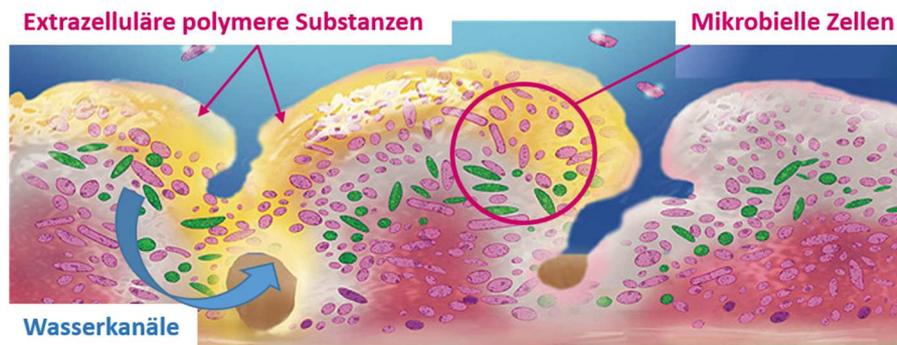
Unter Bioakkumulation versteht man die aktive stoffwechselabhängige Aufnahme von Metall-Ionen und einigen Radionukliden in die Zelle unter Nutzung von Transportsystemen (Lloyd, 2002). Die Metallspezies können in der Zelle gebunden, präzipitiert, in intrazellularen Strukturen oder Organellen lokalisiert oder translokalisiert an spezifische Strukturen in Abhängigkeit von dem Element und dem Organismus vorkommen (Gadd, 2002). Die Aufnahme von Uran wurde beispielsweise für *Sulfolobus acidocaldarius* nachgewiesen (Reitz, 2011).

Biotransformation beinhaltet die Bioreduktion und Biooxidation. Die mikrobielle Oxidation von Schwermetallen und Radionukliden spielt bei der mikrobiellen Erzlaugung eine wichtige Rolle. Sie ermöglicht die Gewinnung von Rohstoffen aus erzarmen Gesteinen, die auf klassischem Weg nicht verhüttet werden können (Pritsche, 1999). Bei der Biooxidation oxidieren Bakterien wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* Fe(II) zu Fe(III). Das mikrobiell gebildete Fe(III) wirkt als Oxidationsmittel auf ein breites Spektrum von Metallsulfiden und auch schwerlöslichen Uranoxiden (indirekte Laugung). Dies führt zu einer indirekten Auflösung der Metallsulfide (Bosecker, 1997) und Mobilisierung der Metalle. *Acidithiobacillus ferrooxidans* ist auch bei der direkten Oxidation von Uran (U(IV)) beteiligt (DiSpirito, 1982). Bei der Bioreduktion werden z.B. Uran(VI)-Verbindungen zu Uran(IV)-Verbindungen mikrobiell reduziert. Für verschiedene Spezies ist das bereits untersucht und nachgewiesen worden. So konnte die Uranreduktion zu unlöslichem biogenem Uraninit z.B. für die Spezies *Desulfovibrio desulfuricans* (Lovley, 1992) und *Geobacter metallireducens* GS-15 (Gorby, 1992) in Flüssigkulturversuchen nachweisen werden. Dabei gewinnt *Geobacter metallireducens* Energie aus der Reduktion von Uran(VI) durch gleichzeitige Oxidation von organischen Verbindungen (Lovley, 2002). Einige Sulfatreduzierer, wie z.B. *Desulfovibrio desulfuricans*, können den Prozess der Uranreduktion jedoch nicht energetisch zu nutzen (Lovley, 1993b). Die mikrobielle Uran(VI)-Reduktion wird durch die Entstehung unlöslicher Uranverbindungen als Möglichkeit in Betracht gezogen, Uran aus kontaminierten Wässern und Böden zu entfernen (Lovley, 1993a).

Bei der Biomineralisierung (auch Biopräzipitation oder Biokristallisation genannt) handelt es sich um die Bildung von Präzipitaten bzw. Mineralen ausgelöst durch mikrobiellen Stoffwechsel und Wechselwirkungen mit den Metaboliten (Francis, 1998). Durch enzymatisch erzeugte Liganden z.B. Phosphate, Sulfide, Carbonate können Metalle und Radionuklide ausgefällt werden (Lloyd, 2002). Für Sulfat-reduzierende Bakterien z.B. *Desulfovibrio spp.* wurde in reduzierenden Umgebungen eine Cadmiumausfällung (CdS) nachgewiesen, die durch den entstandenen Schwefelwasserstoff aus der dissimilatorischen Sulfatreduktion induziert wurde (Sharma, 2000). Kristalline Uranablagerungen im Bereich der Zellwände wurden z.B. bei *Bacillus sphaericus* JG7B und *Sphingomonas sp.* F115F11 (Merroun, 2011) sowie bei *Pseudomonas aeruginosa* J007 (Choudhary, 2011) nachgewiesen.

## 1.5. Biofilme

Biofilme sind die Lebensform, in der sich 99 % der Mikroorganismen (Costerton, 1987) als Gemeinschaft zusammen finden. Sie sind die Urform des Lebens. Die ältesten Fossilien, die man bisher gefunden hat, stammen von Mikroorganismen in Biofilmen, die vor 3,5 Milliarden Jahren gelebt haben (Schopf, 1983). Biofilme sind allgegenwärtig in Böden, Sedimenten, auf Gesteinen, Tieren, Pflanzen sowie im Menschen und treten insbesondere an Grenzflächen (fest/flüssig, flüssig/Luft, fest/Gas, flüssig/flüssig) auf (Flemming, 2001). Auch bei besonders extremen Bedingungen wie im Gletscher-Eis, in heißen Quellen, in der Wüste, in Öl- und Benzintanks und sogar in mit toxischen Schwermetallen beladenen sauren Grubenwässern (Bond, 2000) und mit Schwefelsäure gelaugten Uranminen (Panak, 1998) können Biofilme leben. Tatsächlich stellen Biofilme eine Lebensgemeinschaft verschiedenster Mikroorganismen dar, welche in eine meist schleimige Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind (siehe Abbildung 3), die sie selbst produzieren.



**Abbildung 3: Darstellung eines Biofilms in der Seitenansicht (Längsschnitt), modifiziert von [3].**

Diese schleimige Matrix (Film) enthält 50 bis 95 Prozent Wasser und besteht zum größten Teil aus Polysacchariden und Proteinen, sowie weiteren Bestandteilen wie Glycoproteinen, Lipiden, Phospholipiden, Glycolipiden und Nukleinsäuren. Neben Glucosederivaten können auch die Polysaccharide Zellulose, Dextran oder Alginat in der Matrix vorhanden sein (Flemming, 2002b). Ebenfalls zu den Bestandteilen eines Biofilmes gehören eingebettete Partikel abiotischen Materials und gelöste Substanzen (Flemming, 1994).

Vorteile, die das Leben im Biofilm mit sich bringen sind z.B. eine feste Verankerung an eine Nährstoffquelle, Schutz vor Abschwemmung und vor toxischen Substanzen (z.B. Antibiotika, Schwermetalle), vor Austrocknung oder pH-Extremen. Außerdem können die im Biofilm lebenden Organismen miteinander interagieren und Stoffaustausch betreiben (Wingender, 1999b). Je nach den besiedelnden mikrobiellen Spezies, der Aufwuchsoberfläche sowie den Umgebungsbedingungen (Strömung, Scherkräfte) ist ein Biofilm in Struktur, Dicke und Funktion unterschiedlich beschaffen. Obwohl die Bakterienspezies in Biofilmen zumeist als Primärbesiedler dominieren und die EPS-Bildung

initiieren, können je nach Standort auch Archaea und Eukarya, wie zum Beispiel Pilze, Algen und tierische Einzeller vorhanden sein (Flemming, 2001). Häufig sind Biofilme Habitate für einzellige eukaryotische Organismen, wie Mikropilze, Mikroalgen und Protozoen wie Flagellaten, Ciliaten und Amöben (Wingender, 1999a). Jedoch siedeln sich diese erst bei zunehmendem Alter und Dicke des Biofilms als Sekundärbesiedler an, da die meisten Einzeller Bakterienfresser sind und eine Nahrungsgrundlage in Form eines Bakterienbiofilms bevorzugen. Biofilme in nährstoffreicher und aerober Umgebung können auch von Metazoen wie Rotatorien, Nematoden, Anneliden, Insektenlarven oder Schnecken besiedelt sein, die sich von den Biofilmorganismen ernähren und damit helfen, die Biofilmdicke zu kontrollieren (Bitton, 1994). Heterotrophe polymerabbauende Mikroorganismen überwiegen häufig zahlenmäßig. Auch autotrophe Organismen wie Nitrifikanten (Nitrobacter, Nitrosomonas), photosynthetisch aktive Bakterien (Cyanobakterien) und Algen können in bedeutenden Mengen, in Abhängigkeit von den umgebenden physikochemischen Bedingungen, vorhanden sein (Geesey, 2000, Lemmer, 1994). Wenn aerobe Mikroorganismen an der Oberfläche den Sauerstoff schneller veratmen als er nachdiffundieren kann, kann es im Inneren des Biofilms zur Bildung von anoxischen/anaeroben Zonen kommen und somit zur Ansiedlung anaerober Mikroorganismen z.B. Sulfatreduzierer (De Beer, 1994). Biofilme haben enormen Einfluss auf ihre Umwelt und werden heutzutage auf verschiedene Weise technisch genutzt. In der Abwasserreinigung und Trinkwasseraufbereitung sorgen Biofilme als Filter für die Entfernung unerwünschter Inhaltsstoffe z.B. Geruchs- und Farbstoffe, Eisen und Mangan (Flemming, 1994). Auch bei der Erzlaugung werden Mikroorganismen in Form von Biofilmen durch die Lösung der Metallionen aus den Erzen aufgrund einer pH-Absenkung genutzt (Ehrlich, 1990).

## 1.6. Einfluss von Biofilmen auf die Mobilität von Metallen/Radionukliden

Metalle und Radionuklide können auf unterschiedliche Wege durch Biofilme sorbiert und somit immobilisiert werden: aktiv und passiv (Flemming, 2002a). Dabei gehen Bestandteile der Biofilme Wechselwirkungen mit den Schwermetallen ein. Vor dem Hintergrund, dass geeignete Mikroorganismen zur Bioakkumulation von Schadstoffen zur Reinigung kontaminierter Wässer/Böden dienen könnten, wird auf diesem Gebiet mehr in die Forschung investiert. Die Prozesse, die bei der Sorption von Metallen/Radionukliden eine Rolle spielen, können durch unterschiedliche Bestandteile des Biofilms verursacht werden: EPS, Zellwände, Cytoplasma, Cytoplasmamembran, Metabolite (Flemming, 2002a).

Innerhalb der EPS können Metalle durch eine passive Bindung mittels Ionenaustausch mit Biofilmkomponenten interagieren oder fallen aus. Dabei spielen geladene Gruppen ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) und unpolare Gruppen (Aromaten, Aliphaten, hydrophobe Regionen in Polysacchariden) eine

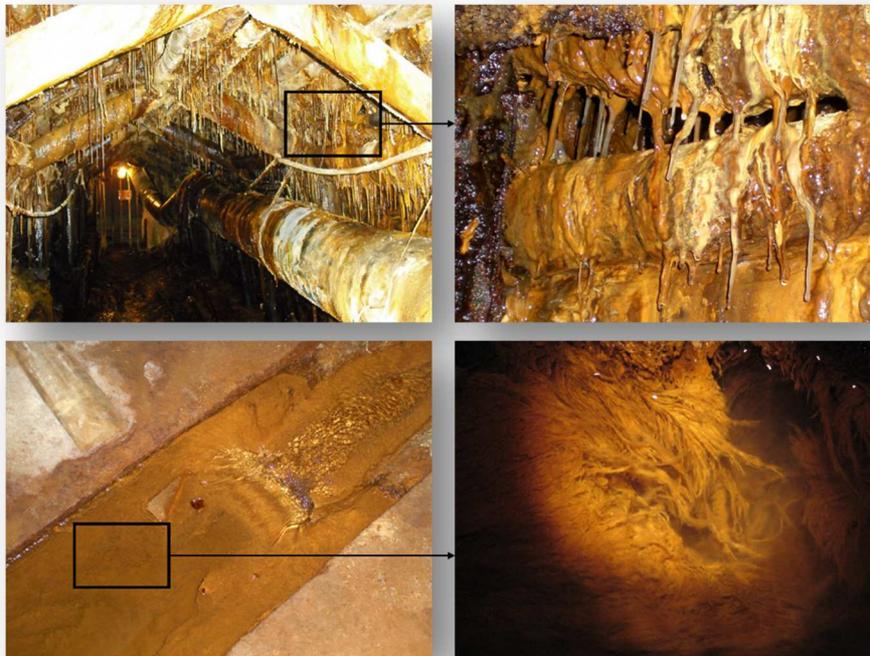
Rolle (Geesey, 1990, Wingender, 1999a), die in der EPS präsent sind und nicht als direkte Reaktion auf die gebundene Spezies gebildet werden. Da jeder Biofilm anders aufgebaut ist, ist die Bindung von Substanzen innerhalb der EPS abhängig von der Art der Substanz (z.B. Metall) und den beteiligten Mikroorganismen (Geesey, 1990). Die hohe Bindungskapazität durch verfügbare Carboxyl- und Hydroxylgruppen im Biofilm fördert die Affinität Substanzen zu binden (Flemming, 2002a, Mittelman, 1985, Scott, 1986). Die EPS kann zum einen eine breite Vielfalt an Metallen akkumulieren:  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ag^+$  und  $Fe^{2+}$  und zum anderen Aromaten wie Benzol, Toluol und Xylol (BTX) an die stark hydratisierte EPS-Matrix binden (Späth, 1998). Auch Wechselwirkungen von EPS-Bestandteilen mit Uran wurden schon nachgewiesen. So zeigten Koban et al. (Koban, 2003) eine Komplexbildung zwischen  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat und Uran. Auch Komplexbildungsreaktionen von Huminsäuren (Sachs, 2007) und von verschiedenen Nukleinsäuren und Proteinen mit Uran konnten bereits nachgewiesen werden (Chevari, 1969).

Auch die Adsorption durch bakterielle Oberflächen (Zellwände, äußere Membranen: Lipide/Murein/Teichonsäuren) ist ein passiver Prozess und geschieht durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der kationischen Substanz und den anionischen Gruppen auf der Zelloberfläche (Doyle, 1989). Für Schwermetalle sind einige Studien bekannt, bei denen Zn, Cd und Ni überwiegend an den Zellwänden gebunden wurde (Späth, 1998). Auch Uran wurde durch das aus Uranminen isolierte Bakterium *Thiobacillus ferrooxidans* nachweislich an der Zellwand gebunden (Panak, 1998). Dabei bildeten sich innersphärische Komplexe zwischen Uran und den Bakterien, die zu einer irreversiblen Bindung des Urans an die Biomasse führten (Panak, 1999).

Als aktive Prozesse werden die Aufnahme von Metallen ins Cytoplasma durch Stofftransportsysteme (Ford, 1992) und die Absonderung von Metaboliten, sogenannten Chelatbildnern bzw. Ausfällungsprodukten durch die Zelle als direkte Reaktion auf das Auftreten der Substanz verstanden. Die von Biofilmen sorbierten Substanzen sind entweder biologisch abbaubar, und können somit in den Metabolismus aufgenommen werden, oder werden vom Biofilm chemisch modifiziert, beziehungsweise unverändert gespeichert (Flemming, 2002a). Für die Art *Thiobacillus ferrooxidans* konnte für Uran auch eine Aufnahme ins Cytoplasma nachgewiesen werden (Panak, 1998). Das genannte Bakterium wurde ebenfalls durch DiSpirito (DiSpirito, 1982) hinsichtlich der Oxidation von Uran(IV) untersucht und bestätigte, dass die Reaktionskinetiken auf einen direkten biologischen Oxidationsmechanismus hinweisen. Durch die Oxidation von z.B. Eisen-Ionen auf metallische Materialien nehmen Biofilme Einfluss, indem sie Korrosion hervorrufen und somit an einer fortschreitenden Materialzerstörung z.B. in Wasserleitungen beteiligt sind (Gaylarde, 2002, Schweisfurth, 1989).

## 1.7. Biodiversität der Grube Königstein vor der Flutung

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Meierhöfer, 2009, Zirnstein, 2010) wurde die mikrobielle Diversität der Biofilme in der ehemaligen Uranmine Königstein durch molekularbiologische (DNA-Extraktion, PCR, Klonierung, Sequenzierung, Klonbibliotheken, FISH) und mikroskopische (Lichtmikroskopie) Methoden analysiert. Die 50 m-Sohle (50 m üNN) im Schacht 390 (ca. 250 m unter Tage) im ehemaligen Uranbergwerk Königstein war zur Zeit der Probenentnahme noch nicht geflutet. Durch den porösen Sandstein drang jedoch Flutungswasser durch die Poren des Gesteins und ließ an den Decken der Schächte Tropfstein-ähnliche Biofilme (Stalaktite) entstehen. Durch das Tropfwasser bildeten sich unter Tage außerdem mit saurem Flutungswasser gefüllte Drainagerinnen (siehe Abbildung 4).



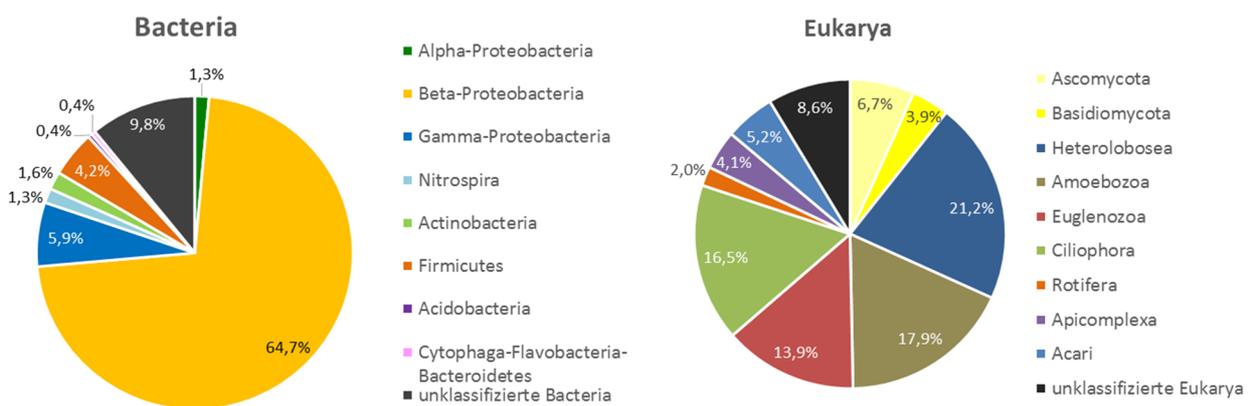
**Abbildung 4: Der Schacht 390 der 50 m-Sohle (nicht gefluteter Bereich im Jahr 2010) der Uranlagerstätte Königstein mit Stalaktit-behangenen Decken (oben) und den Biofilmen der Drainagerinne (unten).**

Somit bezogen sich die Diversitäts-Untersuchungen auf die beschriebenen Biofilme: Stalaktite und Drainagerinne (siehe Abbildung 4). Durch das enthaltene Eisenoxid sind die Biofilme teilweise rot-orange gefärbt. Die untersuchten schleimigen Tropfsteine, die durch Hose & Pisarowicz (Hose, 1999) und Bond (Bond, 2000) in einem anderen Milieu beschrieben wurden, bestanden im unteren (jüngeren) Bereich aus der Biomasse von Mikroorganismen (Biofilme, weiß und weich) und im oberen (älteren) Bereich zusätzlich aus mineralischen Ablagerungen (Eisen-Präzipitate, rot-orange und hart).

Die unter Tage Schächte wiesen eine relativ konstante Temperatur zwischen 20 und 23 °C auf, wurden durch ein Ventilationssystem belüftet und mit einer künstlichen Lichtquelle versehen.

Die chemische Zusammensetzung der Grubenwässer zeichnete sich besonders durch sehr hohe Sulfat- (845 mg/l für Drainagerinne und 2254 mg/l für Stalaktite) und Eisenkonzentrationen (74 mg/l für Drainagerinne und 330 mg/l für Stalaktite) aus. Auch Schwermetalle wie Arsen, Blei, Cadmium oder Nickel waren in erhöhten Konzentrationen enthalten. Die Urankonzentrationen an den Probenentnahmestellen schwankten zwischen 9 mg/l (Drainagerinne) und 69 mg/l (Stalaktite). Dabei fiel auf, dass die Konzentrationen für Metalle in den Stalaktit-Biofilmen teilweise um das zehnfache höher waren, als die in den Drainage-Biofilmen. Das könnte auf eine Akkumulation bzw. Sorption der metallischen Kationen in den Biofilmen hinweisen. Das Redoxpotential des Grubenwassers in der Drainagerinne und an den Stalaktiten bewegte sich im Bereich  $718 \pm 8$  mV (Krawczyk-Bärsch, 2011) bis  $728 \pm 9,5$  mV (Arnold, 2011). Der pH-Wert lag bei einem mittleren Wert von 2,9. Diese in den Grubenwässern vorgefundenen pH/E<sub>h</sub> Bedingungen liegen im Bereich der Präzipitation von Jarositen und Schwertmannit und stellen oxidierende Bedingungen dar (España, 2005). Solche Bedingungen begünstigen chemolithotrophe acidophile Schwefel- und/oder Eisen-oxidierende Bakterien wie zum Beispiel *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* (Arnold, 2011).

Zur besseren Übersicht der Diversität vor der Flutung der Schächte wurden die Ergebnisse der FISH-Analysen, der Klonbibliotheken und der mikroskopischen Techniken für Bacteria und Eukarya in den folgenden Diagrammen (Abbildung 5) zusammengefasst.



**Abbildung 5: Phylogenetische Zusammensetzung der in den Biofilmen (Stalaktite und aus der Drainagerinne) enthaltenen Domänen Bacteria (links) und Eukarya (rechts) aus dem ehemaligen Uranbergwerk Königstein vor der Flutung (2008-2010).**

Die Diversität der Bakterien war gering und beschränkte sich auf acht taxonomische Phyla (unklassifizierte Bacteria ausgenommen). Jedoch überwiegte mit 64,7 % die Gruppe der Beta-Proteobacteria, dabei waren (bis auf eine Sequenz, die zu *Thiomonas sp.* gehörte) alle Sequenzen aus

dem Phylum Beta-Proteobacteria der Spezies *Ferrovum myxofaciens* zuzuordnen. Diese Spezies zeigte in allen untersuchten Proben eine deutliche Dominanz gegenüber den anderen Bakterien Spezies und wurde schon in einigen sauren Grubenwässern gefunden. Jedoch konnte *F. myxofaciens* erst kürzlich näher beschrieben und in die Ordnung Ferrovaales und die Familie Ferrovaceae eingeordnet werden (Johnson, 2014). *F. myxofaciens* ist ein obligat chemolithotrophes Eisen-oxidierendes acidophiles Bakterium und sehr schwer als Reinkultur zu erhalten. Oft tritt es in Co-Kultur mit *Acidiphilium sp.* auf oder wird auf Nährmedien durch *Leptospirillum spp.* bzw. *Acidithiobacillus spp.* verdrängt (Johnson, 2014). *F. myxofaciens* wird auch als psychrotolerant und extrem acidophil bezeichnet, da es bei einem Temperaturoptimum von 32 °C und einem optimalen pH Wert von 3,0 wächst, bis hin zu einem pH Wert von 2,0 und einer Temperatur von 4 °C. Als Elektronendonator nutzt *F. myxofaciens* ausschließlich Fe(II) und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Bei einer optimalen Temperatur von 30 °C zeigt *F. myxofaciens* sogar höhere spezifische Eisenoxidationsraten als Acidithiobacilli bei gleicher Temperatur. Bei einem umgebenden pH-Wert > 2,3 bilden sich auf Grund der Eisenoxidation Präzipitate in den Ferrovum-Biofilmen. Die organischen EPS-Bestandteile in den Biofilmen bestehen größtenteils aus Polysacchariden (31 %) und Proteinen (17 %). Dabei wurden ausschließlich die Glucosederivate Glukose, Ribose, Rhamnose, Galaktose und Mannose unter den Polysacchariden nachgewiesen. Neben Eisen(II) können keine anderen reduzierten Verbindungen wie z.B. reduzierter Schwefel, Ammonium, Wasserstoff und verschiedene organische Verbindungen durch *F. myxofaciens* verwertet werden. Jedoch ist *F. myxofaciens* in der Lage Pyrit oxidativ aufzulösen. Anhand der Amplifikation der RubisCO (ccbL Typ I) Gene und nifH Gene steht fest, dass *F. myxofaciens* CO<sub>2</sub> und anorganische (und organische) Stickstoff-Verbindungen für seinen Stoffwechsel assimilieren kann (Johnson, 2014).

Die Gruppe der Gamma-Proteobacteria war die zweite dominante Gruppe mit 5,9 % in den Biofilmen des Bergwerkes Königstein, wobei die Sequenzen größtenteils der chemolithotrophen Eisen- und Schwefel-oxidierenden Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* zugeordnet wurden. *Acidithiobacillus ferrooxidans* weist im Gegensatz zu *Ferrovum myxofaciens* eine höhere Metall-Toleranz auf als *F. myxofaciens*, der vor allem empfindlich gegenüber hohen Nickel (< 5 mM) und Molybdat (< 0,5 mM)-Konzentrationen ist. *Ac. ferrooxidans* ist zusätzlich säuretoleranter und wächst auch bei pH-Werten < 2,0. *F. myxofaciens* dagegen wächst vorzugsweise bei pH-Werten zwischen 2,0 und 4,8 (Johnson, 2014). Zusätzlich wies eine Sequenz der Gamma-Proteobacteria Homologien zu Xanthomonadaceae auf.

Alpha-Proteobacteria waren mit den Vertretern *Acidocella spp.*, *Acidiphilium spp.* und *Sphingomonas spp.* mit einem geringen Anteil von 1,3 % vertreten, die größtenteils als heterotrophe und Eisen-reduzierende Bakterien bekannt sind (Coupland, 2008). Alle 4,2 % der Firmicutes Sequenzen wurden

der Gruppe der Clostridia zugeordnet. 1,3 % der bakteriellen Zusammensetzung wurden der Gruppe Nitrospira und insbesondere der Spezies *Leptospirillum ferrooxidans*, einem Eisen(II)-oxidierenden extrem acidophilen (pH <1) Bakterium zugeordnet (Schrenk, 1998). Die bakterielle Gemeinschaft setzte sich weiterhin aus 1,6 % Actinobacteria der Klassifizierung Acidimicrobiales zusammen. Acidimicrobiales ist eine Ordnung acidophiler Bakterien, zu denen Eisen-oxidierende und reduzierende Spezies gehören (Stackebrandt, 1997b). Einen geringen Anteil von jeweils 0,4 % wiesen die Gruppen Acidobacteria und Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes auf.

Den Hauptteil der bakteriellen Biozönose in den Biofilmen der ehemaligen Uranmine Königstein machen demnach acidophile Eisen- bzw. Schwefel-oxidierende Bakterien aus, die in Konkurrenz mit einigen Eisen-reduzierenden Arten stehen. Sie bilden einen Eisen -und Schwefelkreislauf, der die Geochemie des Flutungswassers beeinflusst.

Neben den Bakterien konnte eine ganze Reihe an Eukaryonten in den sauren Biofilmen identifiziert werden (siehe Abbildung 5). Dabei überwiegen Amöben-artige der Gruppen Heterolobosea (21,2 %) und Amoebozoa (17,9 %), Ciliaten (Ciliophora, 16,5 %) sowie Flagellaten der Gruppe Euglenozoa (13,9). Zusätzlich wurden abundante Anteile der Gruppe Fungi (Basidiomycota 3,9 % und Ascomycota 6,7 %) in den Biofilmen nachgewiesen. Milben-artige (Acari) der Gattung Schwiebea (5,2 %) und die Parasiten Apikomplexa (Eimeria, 4,1 %) wurden mit geringen Anteilen gefunden, die höchstwahrscheinlich durch die Bebauung mit Rattenkot kontaminierten Hölzern in die Schächte eingetragen wurden. Auch Rädertierchen (Rotifera, 2,0 %) waren Teil der Eukaryonten Gemeinschaft (Zirnstern, 2012). Dabei wurden die gefundenen Eukaryonten als Sekundärbesiedler in den Biofilmen identifiziert, da sie bevorzugt bestehende Bakterienbiofilme abgrasen und somit die Bakteriendichte im Biofilm kontrollieren (Johnson, 1993). Primärkonsumenten, die sich von der Bakterienbiomasse ernähren, sind vor allem Flagellaten (*Bodo saltans*, *Bodo angustus*, *Rhynchomonas nasuta*) aber auch Ciliaten (*Vorticella spp.*, *Oxytricha spp.*) und Rotifera. Sekundärkonsumenten stellen vor allem die Gruppen Ciliaten, Rotifera und Amöben (*Naegleria spp.*, *Vahlkampfia spp.*, *Paravahlkampfia spp.*, *Platyamoeba spp.*, *Vannella spp.*, *Thecamoeba spp.*, *Diplophrys archeri*) dar. Fungi (Sordariomycetidae, Kwoniella) fungieren dabei als Zersetzer und verwerten die organischen Bestandteile der Sekundärkonsumenten und der Bakterien (Zirnstern, 2012). Die identifizierten Protozoen sind jedoch keine Acidophilen, da sie auch in neutralen pH-Bereichen in Böden und Süßwasserseen vorkommen. Eukaryonten und Bakterien bilden zusammen einen Nahrungskreislauf, und haben Einfluss auf deren umgebende Geochemie und somit auch auf die darin vorkommenden Metall-Ionen.

## 2. ZIELSTELLUNG

Bergbau stellt für die Umwelt einen enormen Eingriff in das bestehende Ökosystem dar. Der Abbau von Uran aus Erzen war bis zur Einstellung im Jahr 1990 ein großer Eingriff in die Natur und verursachte eine Vielzahl urankontaminierter Gebiete. In Deutschland wurde in den Bundesländern Sachsen und Thüringen Uranbergbau betrieben. Vor allem durch die dort ausgeführte „Schwefelsaure Laugung“ der Bergwerke (auch „technical leaching“ genannt), bei der Uran und andere Schwermetalle aus dem Erz gelöst werden, wurde die Umgebung mit hohen Konzentrationen von gelösten Schwermetall-Ionen und einem niedrigen pH-Wert belastet. Die Sanierung und Rekultivierung der stillgelegten Uranabbaugebiete stellt ein langfristiges Großprojekt dar, welches die Umweltüberwachung auch noch Jahrzehnte oder länger nach der Schließung der Anlagen mit einschließt. In Thüringen und Sachsen ist dafür die Wismut GmbH zuständig. Um die Kosten für die Sanierung urankontaminierter Gebiete möglichst gering zu halten, ist die Wismut GmbH an alternativen, nachhaltigen und kostengünstigeren Methoden im Vergleich zu den herkömmlich genutzten chemischen Verfahren interessiert. Wesentliche Grundlage für die Uranbeseitigung und die Einschränkung der Uranausbreitung in der Umwelt ist die Vermeidung des Transportes des Schwermetalls unter natürlichen Bedingungen. Neben verschiedenen abiotischen Reaktionen beeinflussen Mikroorganismen die Mobilität von Uran in der Umwelt wesentlich. Sie können dabei direkt an Reaktionen mit Uran beteiligt sein oder indirekt die chemischen Bedingungen für abiotische Reaktionen mit Uran gewährleisten. Eine wichtige Grundlage zur Generierung eines mikrobiologischen Sanierungsansatzes ist die Kenntnis der mikrobiellen Diversität am Standort, sowie das Verständnis der Interaktion der dort vorherrschenden Mikroorganismen mit Uran und den anderen chemischen Parametern des Grubenwassers. Auch durch deren Stoffwechselleistungen können die chemischen Parameter der sauren Grubenwässer („acid mine drainages“ genannt) beeinflusst werden. Viele chemische Prozesse in solchen sauren, Metall-haltigen Grubenwässern sind bereits gut untersucht. Auch typische mikrobielle Vertreter der Grubenwässer sind bekannt. Im Hinblick auf die Diversität der Mikroorganismen, insbesondere im ehemaligen Uranbergwerk Königstein, gibt es jedoch Forschungsbedarf. Das ehemalige Uranbergwerk in Königstein der Wismut GmbH stellt durch seine kontrollierte Flutung ein interessantes und durch einen anhaltenden sauren pH-Wert (~ 3,0) sowie die hohen Uran- und Metallkonzentrationen einen idealen Untersuchungsort mikrobieller Biozönosen in sauren kontaminierten Grubenwässern dar.

Bereits vor der Flutung der ehemaligen Uranmine Königstein wurde die mikrobielle Diversität in Biofilmen der Gesteinsformationen unter Tage bestimmt. Die kontrollierte Flutung der Mine schränkt die Verfügbarkeit von Sauerstoff im Habitat ein, wodurch ein neuer Selektionsdruck auf die Mikroorganismen ausgeübt wird. Die Auswirkungen der Flutung sollten im Rahmen dieser Arbeit

anhand der Charakterisierung der mikrobiellen Diversität sowie der potentiellen Wechselwirkungen der vorhandenen Mikroorganismen mit Metallen und Radionukliden untersucht werden.

Im ersten Schritt sollten die Lebensgemeinschaften aus Bakterien, Archaea und Eukaryonten der Biozönose im Grubenwasser der ehemaligen Uranmine Königstein charakterisiert werden und eine Aussage über das Vorhandensein lebensfähiger Mikroorganismen getroffen werden. Dazu dienen die molekularbiologischen Methoden Catalyzed reporter deposition fluorescence *in-situ* hybridisation (CARD-FISH), Extraktionen der DNA und RNA aus den Zellen und Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Pyrosequenzierung. Weiterhin sollten lebensfähige Mikroorganismen aus dem Grubenwasser isoliert, ausgewählte Isolate identifiziert und die Ergebnisse mit den kultivierungsunabhängigen Analysen verglichen werden. Dabei richtete sich der Schwerpunkt der Kultivierung, basierend auf der chemischen Zusammensetzung des Grubenwassers und der sanierungstechnischen Relevanz, auf acidophile Eisen- und Schwefel-oxidierende, sowie Sulfat-reduzierende Mikroorganismen. Eine Abschätzung der Anzahl kultivierbarer Eisen- und Schwefeloxidierer, sowie Sulfatreduzierer in den Grubenwasserproben sollte mit der „Most Probable Number“ Methode (MPN) ermittelt werden. Dabei können Mikroorganismen in Form von planktonischen Zellen oder als Biofilme die Chemie und somit die im Grubenwasser enthaltenen Metall-Ionen beeinflussen. Die Biofilme, die auf Aufwuchsträgern im Grubenwasser gewachsen waren, sollten mittels Lektinen auf ihre Struktur bzw. Zusammensetzung aus Zellen und Matrix geprüft und durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) dargestellt werden. Mit den Biofilmen sollten zudem die Wechselwirkungen mit ausgewählten Metallen (Fe, Zn, Ni, Cd, As), Lanthanoiden (Eu) und Radionukliden (U) mit Hilfe von Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durchgeführt werden.

Diese Daten sollen die Grundlage für die Untersuchung des Einflusses von Umweltveränderungen z.B. Flutung eines Bergwerkes auf das Vorkommen spezifischer Mikroorganismen sein und wiederum den Einfluss der Mikrobiologie auf die umgebenden chemischen Parameter näher bringen. Ziel dieser Untersuchungen ist das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Grubenwasser-Mikroorganismen und Umweltfaktoren zu erweitern. Dieses Wissen kann einen Beitrag zur Nutzung der Mikroorganismen zur Sanierung kontaminierter Grubenwässer leisten und den Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Stoffkreislauf unter Tage aufzeigen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Untersuchungsgebiet Königstein

Die ehemalige Urangewinnungsanlage Königstein, von der die Grubenwasserproben dieser Arbeit stammen, befindet sich in Sachsen (Deutschland) südlich der Elbe (siehe Abbildung 6). Sie liegt in 100 m bis 280 m Tiefe und erstreckt sich auf einer Breite von 600 m bis 1000 m über 4700 m Länge (Tonndorf, 1999).



**Abbildung 6: Geografische Lage des Untersuchungsstandortes Königstein (orange markiert) innerhalb Sachsens.**

Die Geologie des Standortes ist durch Kalksandstein und Granit gekennzeichnet. Seit 1967 wurde an diesem Standort Uranerz abgebaut. Seit 1984 wurde begonnen die vergleichsweise geringen Uranvorkommen mithilfe von *in-situ* Laugungstechnologien aus dem Gestein herauszulösen. Dabei kamen große Mengen an Schwefelsäure zum Einsatz. Noch bis heute sind Reste der Säure in den Gesteinsporen verblieben, die dort weiterhin zu einer Lösung des restlichen Urans sowie anderer Schwermetalle führen [1]. Aus sanierungstechnischen Gründen wird das Bergwerk seit 2001 kontrolliert geflutet. Aufgrund eines Grundwasserleiters (140 m üNN) liegt die derzeitige Anstauhöhe des Flutungsraums bei 139,5 m über Normalnull. In Abbildung 7 ist ein schematischer Längsschnitt durch das ehemalige Uranbergwerk gezeigt, in dem die derzeitige Anstauhöhe eingezeichnet ist. Das Grubenwasser wird kontinuierlich an die Oberfläche gepumpt (siehe Abbildung 7, FBL B) und verschiedenen Reinigungsprozessen unterzogen, bevor es in die Elbe entlassen wird („Pump and Treat“-Verfahren) [1]. Aufgrund des Einsatzes der Schwefelsäure während der Uranlaugung weist das Grubenwasser einen niedrigen pH-Wert von 2,8-3,2, sowie einen hohen Gehalt an Sulfat (973 mg/l, MW 2013; siehe Tabelle 11) auf. Die derzeitige Urankonzentration von 11 mg/l entspricht etwa dem tausendfachen des maximalen Urangehalts in Oberflächengewässern von 10 µg/l (Holleman, 1995a). Mithilfe der „Time Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy“ (TRLFS) wurde für den

Standort Königstein die Speziation des Urans bestimmt und dabei  $UO_2SO_4$  (aq.) als vorherrschende Bindungsform identifiziert (Arnold, 2011, Bernhard, 1996). Weiterhin weist das Grubenwasser einen hohen Eisengehalt (56 mg/l, MW 2013), sowie weitere (Schwer)metalle auf (Mangan 7 mg/l; Arsen 70 µg/l, Zink 6 mg/l). Sauerstoff ist zu einem geringen Anteil von ca. 2-3 mg/l vorhanden. Die Werte der chemischen Analyseparameter der Wismut GmbH sind in Kapitel 4.1. Beschreibung des untersuchten Grubenwassers durch Analyse der chemisch-physikalischen Parameter vor und nach der Flutung in Tabelle 11 zu finden.

Betrachtet man den Längsschnitt (siehe Abbildung 7) der Grube Königstein, so erkennt man die aktuelle Einstauhöhe, von 139,5 m üNN und die Förderbohrlöcher (FBL A und B), durch die das kontaminierte Grubenwasser nach über Tage gepumpt wird. Durch diese Förderbohrlöcher wurden die, in dieser Arbeit untersuchten, Proben gewonnen - planktonisch und als Biofilm (durch installierte Aufwuchssysteme). Bis 2010 waren die Schächte der 25 m Sohle (siehe Abbildung 7), in denen die Biofilme entdeckt wurden, zur Probenahme zugänglich. Die Beschreibung der Biofilme aus den unter Tage Schächten vor der Flutung ist in Kapitel 1.7. detailliert aufgeführt.

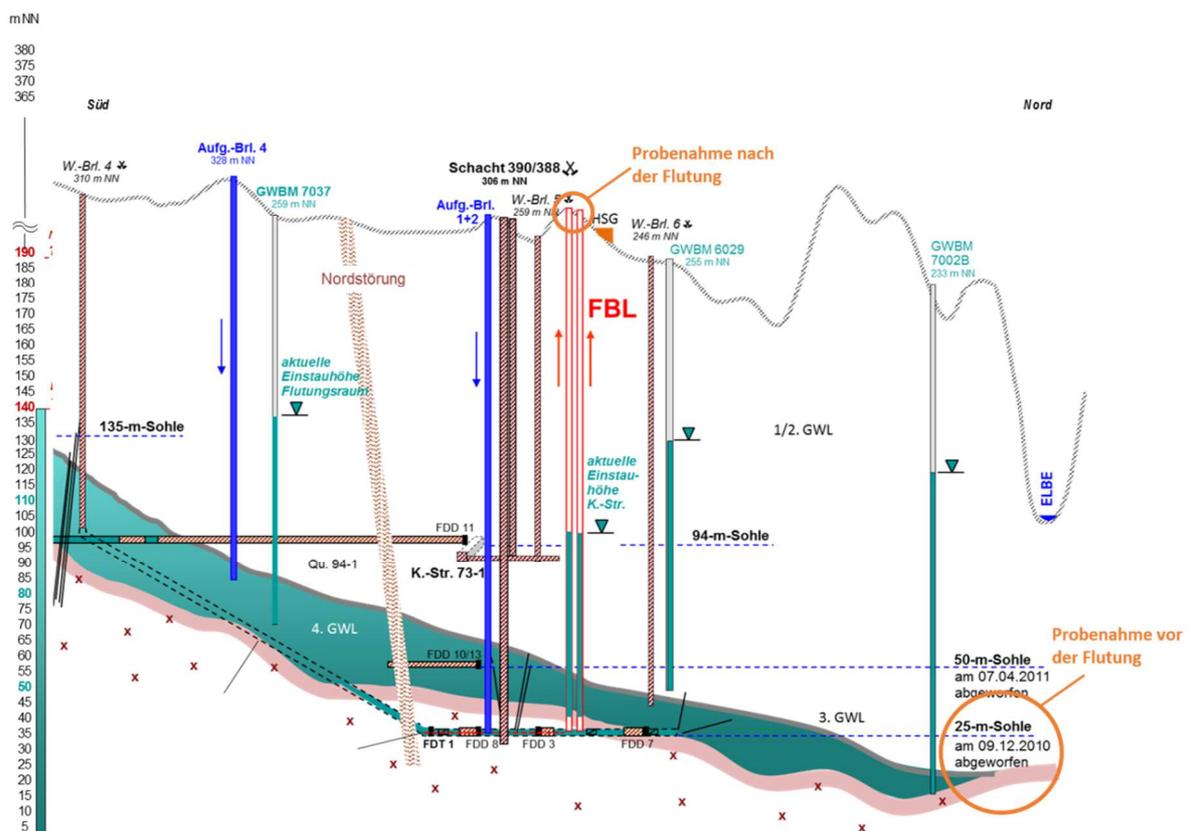


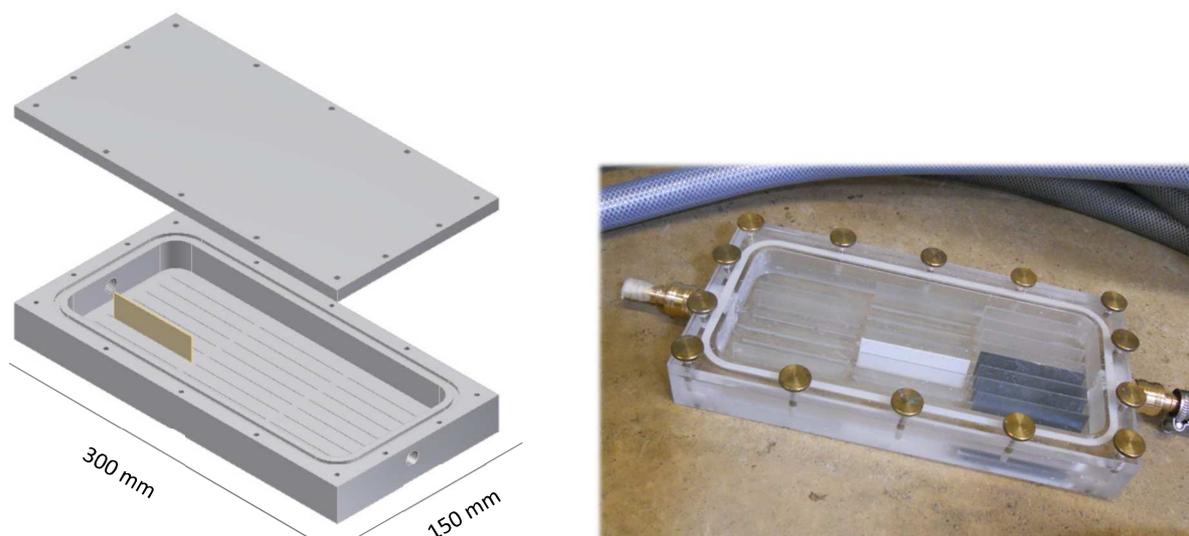
Abbildung 7: Schematischer Längsschnitt des ehemaligen Uranbergwerkes Königstein (Lutz Uebe, Wismut GmbH).

## 3.2. Biofilmsysteme

Neben der Untersuchung der Diversität der im Grubenwasser lebenden planktonischen Mikroorganismen, sollte auch die Zusammensetzung von Biofilmen in solch einem extremen Milieu mikrobiell analysiert werden. Aufgrund der Flutung der Schächte unter Tage sind die Biofilme, die bis zum Jahr 2010 auf Sohle 25 m üNN (250 m unter der Erdoberfläche) gewachsen waren, nicht mehr zur Analyse zugänglich. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene *in-situ* Systeme genutzt, um die Biofilm-Bildung durch die Grubenwasser-Mikroorganismen zu fördern: ein Flusszell-System und eine Reaktor-ähnliche Anlage.

### 3.2.1. Die Flusszelle

Die Flusszelle zur Züchtung der Grubenwasser-Biofilme bestand aus Plexiglas und bot mit 300 x 150 mm Außenmaß Platz für 24 Objektträger (siehe Abbildung 8), die als Aufwuchsoberfläche dienen sollten. Um ein optimales Anheften der Mikroorganismen an die Trägeroberfläche zu gewährleisten, wurden vier verschiedene Materialien getestet: Glas, Plexiglas, Polyethylen (PE) und Polyvinylchlorid (PVC). Zusätzlich wurden die Oberflächen angeraut. Einige der Glas-Objektträger wurden mit Agarose, Paraffin oder Gelatine beschichtet, um den Anheftungsprozess zu beschleunigen. Zur Optimierung der Flusszelle wurde je ein Sieb für einen gut verteilten Zu- und Abstrom eingebaut und Füße zum Schrägstellen der Flusszelle montiert.

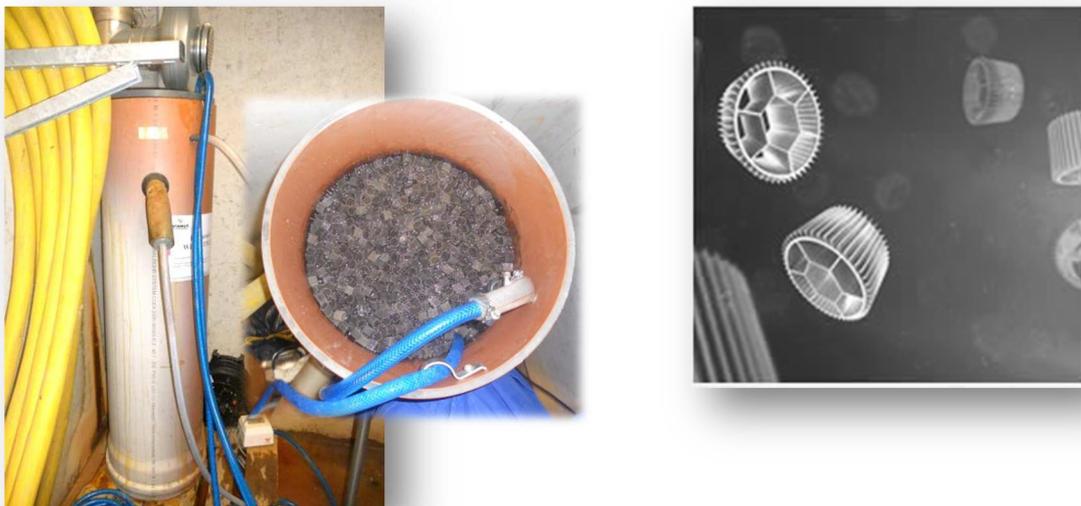


**Abbildung 8:** Darstellung der Biofilm-Flusszelle als Konstruktion (links) und als *in-situ* Flusszelle mit unterschiedlichen Objektträgern (rechts).

Um die Unterschiede in der Diversität anhand unterschiedlich langer Wachstumszeiträume feststellen zu können, wurden mehrere Flusszellen hintereinander geschaltet und nach verschiedenen Zeiträumen wieder entnommen (siehe Tabelle 1 in Kapitel 3.3. Entnahme von Wasser- und Biofilmpflanzen - Probenübersicht). Das Grubenwasser von unter Tage wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 l/min direkt durch die Flusszelle geleitet, ohne Sauerstoff- oder Lichteintrag. Während der Biofilmbildung wurden die Flusszellen abgedunkelt.

### 3.2.2 Die Reaktor-Anlage

Die Reaktor-Anlage (siehe Abbildung 9) wurde von der Firma wsb<sup>®</sup>clean [4] zur Verfügung gestellt und für die Biofilm-Bildung genutzt. Als Durchlaufgefäß diente die 165 x 37 cm große zylinder-förmige Polyethylen (PE)-Apparatur. Die verwendeten Aufwuchsträger bestanden aus high density Polyethylen (HDPE) und maßen 9 mm im Durchmesser. Die Oberfläche war mit einem dünnen Kläranlagen-Biofilm (mündliche Überlieferung Dr. Schmalz, [4]) überzogen, das sollte zum besseren Anheften der Grubenwasser-Mikroorganismen dienen. Insgesamt 60 Liter der Aufwuchsträger schwammen im Reaktor, durch welchen das Grubenwasser von unter Tage geleitet wurde. Die Apparatur fasste ca. 100 Liter Wasser, welches bei einem Wasserstand von 145 cm abfloss. So wurde ein ständiger Zustrom des Grubenwassers gewährleistet. Zur Fernhaltung von phototrophen Mikroorganismen wurde die Reaktor-Anlage mit einem Deckel abgedunkelt.



**Abbildung 9: Konstruktion des Biofilm-Reaktors vor Ort in Königstein (links) mit Einsicht in den Reaktor (Mitte) und Detailansicht der Reaktorträger wsb<sup>®</sup>clean (rechts).**

### 3.3. Entnahme von Wasser- und Biofilmproben

Zur Bestimmung der Diversität planktonischer Zellen wurden jeweils 10 Liter mittels Vakuumfiltration (Bottle Top-System, PES, Gewinde 45 mm, Nalgene®) durch eine Celluloseacetat-Membran (0,2 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, satorius stedim biotech) filtriert. Vor der Filtration des Grubenwassers bei anschließender Verwendung zur RNA-Analyse wurden die Filter mit RNase away (Carl Roth) behandelt. Für die Untersuchung der Biofilm-Gemeinschaft wurden Träger aus der Reaktor-Anlage, sowie Objektträger aus der Flusszelle entnommen (siehe Abbildung 10). Wasser- und Biofilmproben für die Diversitäts-Bestimmung wurden in drei Jahren je einmal jährlich am Förderbohrloch B beprobt (siehe Abbildung 7 und Tabelle 1).



**Abbildung 10: Probenahme der Wasserproben mittels Vakuumfiltration (links), Biofilm-Entnahme der bewachsenen Reaktor-Träger(Mitte) bzw. Flusszellen-Träger (rechts).**

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Probenahmedaten mit Art der Probe, Art der Analyse und Bezeichnung der Proben. Die Abkürzungen stehen für unterschiedliche Arten der Proben: F=Flusszelle, W= Grubenwasser, R=Reaktor, K=Kläranlage.**

Datum	Art der Probe	Analyse	Bez.
25.11.2011	1. Flusszelle (5 Monate)	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">CARD-FISH</a> , <a href="#">Pyro</a>	F11
25.11.2011	Vakuumfiltration von 6 Liter Grubenwasser	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">Pyro</a>	W11
03.07.2012	5 Aufwuchsträger aus Reaktor (vorher)	DNA-Extraktion, PCR, Färbungen, <a href="#">Pyro</a>	K12
18.10.2012	4. Flusszelle (8 Monate)	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">CARD-FISH</a> , <a href="#">Pyro</a>	F12
18.10.2012	Vakuumfiltration von 10 Liter Grubenwasser	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">Pyro</a>	W12
18.10.2012	7 Aufwuchsträger aus Reaktor (3 Monate)	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">Pyro</a>	R12
07.02.2013	Grubenwasserprobe 20 Liter	LZZ	W4
20.03.2013	Vakuumfiltration von 15 Liter Grubenwasser	RNA-Extraktion, <a href="#">Pyro</a>	W13RNA
28.05.2013	Vakuumfiltration von 5 Liter Grubenwasser	LZZ, Kultivierung auf PCA	W7
28.05.2013	Vakuumfiltration von 5 Liter Grubenwasser	Kultivierung Eisen- und Schwefeloxidierer	W8
17.06.2013	Vakuumfiltration von 2 Liter Grubenwasser	<a href="#">CARD-FISH</a>	W9
31.07.2013	Vakuumfiltration von 10 Liter Grubenwasser	DNA-Extraktion, PCR, <a href="#">Pyro</a>	W13
31.07.2013	5. Flusszelle (17 Monate)	DNA/RNA-Extraktion, PCR, <a href="#">Pyro</a> , LM	F13
30.08.2013	Grubenwasserprobe 1 Liter	MPNs Eisen- und Schwefeloxidierer	W15
06.09.2013	Grubenwasserprobe 200 ml	GZZ, MPNs Sulfatreduzierer	W16
06.09.2013	10 Aufwuchsträger aus Reaktor (14 Monate)	EPS Färbung, CLSM	R8
06.09.2013	4 Objektträger aus 5. Flusszelle	EPS Färbung, CLSM	F5
28.10.2013	30 Reaktor-Träger aus Reaktor (15 Monate)	Akkumulations-Laborversuche	R9
11.11.2013	Grubenwasserproben vor- und nach Reaktor	Akkumulations-Feldversuche	W20

Die Daten aller Probennahmen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ), Lebendzellzahl (LZZ) und die Isolierung/Kultivierung der Grubenwasser-Mikroorganismen wurden verschiedene Volumina des Grubenwassers in sterilen Gefäßen am Förderbohrloch B (siehe Abbildung 7) entnommen. EPS-Färbungen und die anschließende Darstellung der Biofilme mittels CLSM wurden mit entnommenen Flusszellen-Objektträgern und Reaktor-Trägern durchgeführt. Für die Analysen zu Wechselwirkungen der Biofilme mit verschiedenen chemischen Parametern des Grubenwassers wurden die Biofilme der Reaktor-Träger genutzt.

### **3.4. Transport/Lagerung der Proben**

Filter- und Biofilmproben für DNA-Analysen und für CARD-FISH wurden unter Kühlung bei 4 °C ins Labor transportiert und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Proben für RNA-Analysen wurden unmittelbar nach der Probennahme auf Trockeneis transportiert und bei -80 °C bis zur Bearbeitung gelagert. Wasserproben für die Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen wurden bei Umgebungstemperatur transportiert und spätestens 48 h nach der Entnahme aus Königstein verwendet. Proben für EPS-Färbungen und den Analysen zu Wechselwirkungen Biofilm/Metalle wurden bei 4 °C ins Labor transportiert und sofort weiter behandelt.

### **3.5. Chemische Analyse von Kationen/Anionen**

Die chemische Zusammensetzung der Wasserproben aus Königstein und einige physikalische Parameter (Temperatur, Eh) wurden in regelmäßigen Abständen (aller 3-4 Tage) durch die Wismut GmbH analysiert.

Für die Kationen erfolgte die Analyse mittels „Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma“ (ICP-MS; ELAN 9000 Typ ICP-MS Spektrometer Perkin Elmer SCIEX, Waltham, Massachusetts, USA). Die wässrigen Proben wurden zuvor mit konzentrierter hochreiner Salpetersäure angesäuert (15µl/ml). Die Kationen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> wurden mittels Atom Absorptions Spektrometrie (AAS; Perkin Elmer 4100 AAS) untersucht. Die Konzentration von Fe<sup>3+</sup> wurde mittels Graphitrohr-Atom Absorptions Spektrometrie (GFAAS; AAS-6F Zeenit 600s Graphite Furnace AAS mit Zeeman Untergrundkorrektur; Analytik Jena, Jena, Germany) bestimmt. Anionen, wie Chlorid-, Nitrat-, Phosphat- und Sulfationen wurden durch Ionen-Chromatographie (IC; IC-System 732/733, Metrohm, Filderstadt Germany) bestimmt. Die Messwerte für Gesamt-organischen-Kohlenstoff (TOC) und Gesamt-Stickstoff (TN<sub>b</sub>) wurden mit einem Multi-N/C 2100 (Analytik Jena, Jena, Germany) ermittelt (Fehleranalysen siehe Arnold (Arnold, 2011)).

### 3.6. Erstellung von Speziationsdiagrammen

Um Aussagen über vorliegende Spezies bestimmter chemischer Elemente im Grubenwasser Königstein zu treffen, wurden Speziationsdiagramme von Eisen, Uran und Europium durch Dr. Frank Bok (HZDR, Institut für Ressourcenökologie) errechnet. Dazu diente die Software Geochemist's Workbench(TM) Version 9.0.3, Modul "React". Für die Eisen- und Europium-Speziation wurde die enthaltene thermodynamische Datenbasis Ilnl.dat (Lawrence Livermore National Laboratory) verwendet, bei der Uran-Speziation die OECD-NEA Thermochemical Database. Die dazu verwendeten Werte stammen aus den chemischen Analysen der Wismut GmbH. Für die Berechnung der Speziationen wurden folgende chemischen Parameter berücksichtigt und die entsprechenden Ionen-Konzentrationen verwendet:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{U}^{4+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Neben den Ionen-Gehalten wurde zusätzlich das Redoxpotential (Eh) berücksichtigt und fixiert, der Ladungsausgleich per Variation des Sulfat-Gehaltes realisiert und die Ausfällung von mineralischen Festphasen unterdrückt (außer bei der Eisen-Speziation). Berechnet wurden die Speziationen für eine Temperatur von 25 °C.

### 3.7. Catalyzed reporter deposition fluorescence *in-situ* hybridization (CARD-FISH)

Für die modifizierte CARD-FISH nach Pernthaler (Pernthaler *et al.*, 2002) wurden Grubenwasser aus dem Jahr 2013 (W13) und Biofilme aus der Flusszelle des Jahres 2011 (F11) (Tabelle 1, Kapitel 3.3.) verwendet. Am Tag der Probenentnahme wurde entweder der gesamte Inhalt (500 ml) der Flusszellen oder nur die Biomasse der Objektträger durch Zentrifugation (30 min, 3500 x g) konzentriert. Das Grubenwasser (je 50 bzw. 100 ml) wurde durch Vakuumfiltration auf Membranfilter (0,2 µm Porengröße, GTTP, 47 mm, Millipore) filtriert. Die Biofilme der Flusszelle wurden in den folgenden Präparationsschritten mit der Objektträger-Methode behandelt, die Filtermembranen des Grubenwassers mit der Filter-Methode.

#### 3.7.1. Fixierung und Vorbehandlung der Proben

##### *Biofilme:*

Das Pellet wurde in 20 ml 1xPBS resuspendiert. 10 ml davon wurden durch Zugabe von 30 ml 3,5 % Formaldehyd (PFA) für 2 Stunden bei 4°C fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 1xPBS und nachfolgendes Zentrifugieren (10 min bei 3500 x g). Schließlich wurden die gewaschenen Pellets in 5 ml eiskaltem 1xPBS/Ethanol absolut (1:1) resuspendiert und bis zur Durchführung der CARD-FISH bei -20°C gelagert.

Die fixierten Proben wurden vor der Hybridisierung in einem Verhältnis 1:2 bzw. 1:10 (je nach Zelldichte und Trübung) mit 1xPBS verdünnt und mittels Ultraschallbehandlung für 4x5 s bei 50 % Intensität mit je 5 s Pause homogenisiert (BANDLIN SONOREX RK 100H). Anschließend wurden die Proben 1 min stehen gelassen, damit sich Schwebstoffe und Eisen am Boden absetzen konnten. 10 µl des Überstandes wurden auf beschichtete Objektträger (diagnostic microscope slides, 8 Wells, 6 mm, ThermoFisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) auftragen und im Trockenschrank bei 55 °C getrocknet. Es folgten die Dehydrierung der Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, je 1 min) und die anschließende Lufttrocknung.

*Grubenwasser:*

Die Filter wurden zur Fixierung mit 3,5 % Para-Formaldehyd (PFA) bedeckt und für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1xPBS. Bis zur Durchführung der CARD-FISH wurden die Filter bei -20 °C gelagert. Die Filter wurden zusätzlich eingebettet, indem die Oberseite des Filters in 0,1 - 0,2 % low melting Agarose („Metaphor“) getaucht und bei 35 °C (10 min) luftgetrocknet wurde. Es folgten das Dehydrieren der Probe in 96 % Ethanol (1 min, RT) und die Lufttrocknung.

**Tabelle 2: Verwendete Pufferlösungen für CARD-FISH.**

Name	Zusammensetzung
Lysozymlösung 1 ml	10 mg Lysozym; 100 µl 0,5 M EDTA pH 8,0; 100 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5; 800 µl Aqua deion.
Achromopeptidaselösung 60 Units/ml, 10 ml	4,99 ml 0,01 M NaCl; 4,99 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; 20 µl 600 Units Achromopeptidase; aliquotiert zu je 1 ml bei -20°C lagern
Blocking Reagent 10 ml	10 ml Maleinsäurepuffer; pH 7,5; 1 g Blocking Reagent (ROCHE); autoklavieren und bei -20 °C aliquotiert lagern
Maleinsäurepuffer 50 ml	0,58 g Maleinsäure; 1,5 ml 5 M NaCl; add. Aqua deion. 50 ml
Hybridisierungspuffer 10 ml	1,8 ml 5 M NaCl; 0,2 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5; Formamid und Aqua deion. (Vgl. Tab. 3); 1 ml 10 % Blocking Reagent; 10 µl 10 % SDS; 1 g Dextransulfat; aliquotiert zu je 1,2 ml bei -20°C lagern
Amplifikationspuffer 20 ml	2 ml 10x PBS; 200 µl 10 % Blocking Reagent; 8 ml 5 M NaCl; add. 20 ml Aqua deion.; 2 g Dextransulfat; Lagerung bei 4 °C
Wasserstoffperoxidlösung 200 µl	200 µl 1xPBS mit 1 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %) vermischen; frisch herstellen
Substratmix 1 ml	990 µl Ampl. Puffer mit 10 µl Wasserstoffperoxidlösung und 1 µl FITC-Tyramid mischen

**3.7.2. Permeabilisierung der Zellen**

Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch eine Lysozym-Achromopeptidase-Behandlung. Zunächst wurden für die Lysozymbehandlung 20 µl Lysozymlösung (siehe Tabelle 2) pro Well

aufgetragen bzw. die Filterstreifen in Lysozym-Lösung gelegt und 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert (UVP Laboratory Products HB-1000 Hybridizer). Nach dem 1-minütigen Waschen mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) wurden die Objektträger bzw. Filter mit Achromopeptidase-Lösung (siehe Tabelle 2) überschichtet und erneut 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Aqua dest. (1 min) wurden die Objektträger bzw. Filter für weitere 30 min in Methanol absolut mit 0,15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inhibieren. Danach folgte ein Waschschriff mit Aqua dest. (1 min) und die Dehydrierung der Proben in 96 % Ethanol.

### 3.7.3. Hybridisierung und CARD-Signalamplifikation

Bei der Objektträger-Methode wurden 9 µl des Hybridisierungspuffers (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3) auf jedes Well pipettiert und anschließend 1 µl der entsprechenden Sonde (50 ng/µl).

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für CARD-FISH.**

Formamid im Puffer [%]	Formamid [ml]	Aqua deion. [ml]
0	0	7
20	2	5
30	3	4
35	3,5	3,5
40	4	3

Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 4 aufgelistet. Neben den universellen Sonden zur Detektion der Domänen Eubacteria, Archaea und Eukarya, wurden spezifische Sonden zur Erfassung einzelner phylogenetischer Gruppen verwendet, die die mikrobielle Lebensgemeinschaft detaillierter charakterisieren sollen. Die Auswahl der verwendeten Sonden erfolgte entsprechend der im zu untersuchenden Grubenwasser vermuteten Ordnungen, die höchstwahrscheinlich den größten Anteil der Mikroorganismen ausmachen. Zusätzlich zu den Sonden, die Klassen und Phyla hybridisieren (siehe Tabelle 4), wurden spezifische Sonden zur Detektion von einzelnen Spezies ausgewählt.

Die Filterstreifen wurden in 400 µl Hybridisierungspuffer, gemischt mit 1,3 µl Sonde, gegeben. Bei den Sonden BET42a und GAM42a kam zusätzlich 1 µl des Kompetitors hinzu. Die Proben wurden bei 46 °C für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert (UVP Laboratory Products HB-1000 Hybridizer). Es folgten ein Spülschritt und ein Waschschriff mit 48 °C warmen Waschpuffer (siehe Tabelle 5) für 5 min. Auf diesen Schritt folgte eine Inkubation in 1x PBS für 15 min. Die Filter und Objektträger wurden mit Substratmix (siehe Tabelle 2) versetzt und in einer feuchten Kammer bei 46 °C für 45 min inkubiert. Es folgten Waschschriffe für 10 min in 1x PBS und zweimal für je 1 min in deionisiertem Wasser. Bei allen

weiteren Schritten wurden die Proben im Dunkeln behandelt. Bei einer erneuten Inkubation von 1 min in 96 % Ethanol wurden die Proben dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

**Tabelle 4: 5'-HRP gelabelte Sonden (Thermo Scientific), deren Sequenz und das Ziel-Gen mit den verwendeten Formamid-Konzentrationen.**

Zielgen	Sonde	Sequenz (5' → 3')	Formamid-konzentration [%]	Referenz
Eubakterien 16S rRNA	EUB338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0	Amann et al. 1990
Planctomycetes 16S rRNA	EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	0	Daims et al. 1999
Verrucomicrobia 16S rRNA	EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	0	Daims et al. 1999
Negativkontrolle Kompetitor für EUB	NONEUB	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	0	Wallner et al. 1993
Archaea 16S rRNA	Arch915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	35	Stahl & Amann 1991
Eukaryonten 18S rRNA	EUK1209	ACC AGA CTT GCC CTC C	40	Lim et al. 1993
Alpha-Proteobakterien 16S rRNA	ALF968	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	20	Neef et al. 1997
Beta-Proteobakterien 23S rRNA	BET42a Kompetitor	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	Manz et al. 1992
		GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	
Gamma-Proteobakterien 23S rRNA	GAM42a Kompetitor	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	Manz et al. 1992
		GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	
Actinobacteria 23S rRNA	HGC69a	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	20	Roller et al. 1994
Firmicutes 16S rRNA	LGC355	GGA AGA TTC CCT ACT GCT G	35	Hallberg et al. 2006
Sulfat reduzierende Bakterien 16S rRNA	SRB385Db	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	35	Amann & Fuchs 2008
Desulfovibrio 16S rRNA	DSV1292	CAA TCC GGA CTG GGA CGC	35	Manz et al. 1998
Anaerobe Ammonium- oxidierende Bakterien 16S rRNA	Amx1900	CAT CTC CGG CTT GAA CAA	30	Schmid et al. 2001
Acidithiobacillus ferrooxidans 16S rRNA	TF539	CAG ACC TAA CGT ACC GCC	20	Mahmoud et al. 2005, Bond & Banfield 2001
Leptospirillum ferrooxidans 16S rRNA	LF655	CGC TTC CCT CTC CCA GCC T	35	Bond & Banfield 2001
acid mine drainage clones related to Gallionella ferruginea 16S rRNA	GALTS0084	CCA CTA ACC TGG GAG CAA	40	Hallberg et al. 2006
phylum Chloroflexi (Grüne Nicht- Schwefel Bakterien) 16S rRNA	GNSB	AAA CCA CAC GCT CCG CT	35	Gich et al. 2001
Ferrovum myxofaciens 16S rRNA	FER440	GTT ATT CGC CTG AAC CTT	20	C. Meierhoefer 2009

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Waschpuffers für CARD-FISH.**

% Formamid im Hybridisierungspuffer	5M NaCl [µl]	1M Tris-HCl pH 7,5 [µl]	0,5M EDTA pH 8,0 [µl]	Aqua deion.	10 % SDS [µl]
0	9000	1000	-	Add. 50ml	50
20	2150	1000	-	Add. 50ml	50
30	1020	1000	-	Add. 50ml	50
35	700	1000	500	Add. 50ml	50
40	460	1000	500	Add. 50ml	50

### 3.7.4. Gegenfärbung mit Propidiumiodid

Für die Gegenfärbung aller Zellen wurde Propidiumiodid (PI) mit einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Für die Objektträger wurden 20 µl PI pro Well aufgetragen, die Filterstreifen wurden mit 100 µl PI überschichtet und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Abspülen mit Aqua dest. und Lufttrocknen wurden die CARD-FISH Proben mit Citifluor (Citifluor Ltd.) auf dem Objektträger mit Deckgläschen konserviert.

### 3.7.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung einer 1000-fachen Vergrößerung (10xOkular, 100x Öl-Objektiv). Dabei wurden für jede Sonde pro Well insgesamt 500-1000 Zellen in der Gegenfärbung über acht Zählfelder ausgezählt.

**Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit für die CARD-FISH verwendeten Filter für das Axioskop.**

Filter	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
FITC (für das Sondersignal)	BP 450/90	FT 510	LP 515/50
Cy3 (für Propidiumiodid)	HQ 545/30	Q 565 LP	HQ 610/75

Pro Filterstreifen wurden 1000 Zellen ausgezählt, wobei für jede Sonde zwei Filterstreifen auf einem Objektträger angeordnet waren. Für jedes einzelne Zählfeld (Gitternetz 50 x 50 µm Okular) wurde der prozentuale Anteil an Sondersignal gegenüber dem Gesamtzellzahl-Signal mit Propidiumiodid bestimmt. Der errechnete Mittelwert gibt dabei die relative Häufigkeit der mit den Sonden hybridisierten Zellen an. Aufnahmen einzelner Proben wurden mit der Kamera AxioCam MRcTM (Carl Zeiss, Oberkochen) und der Software AxioVision Software (Carl Zeiss, Oberkochen) realisiert (siehe Tabelle 6).

## 3.8. Quantitative mikrobiologische Verfahren

### 3.8.1. Gesamtzellzahl (GZZ)

Zur mikrobiologischen Charakterisierung der Grubenwasser-Proben wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Dabei wurden in unabhängigen Zählungen (in den Jahren 2013 und 2014) unterschiedliche Volumina der Proben (5 ml, 10 ml, 30 ml) durch ein Bottle Top Filter-System (15-ml-Glasfilterhalter, 25 mm, Edelstahl-Stützsieb; Reiss Laborbedarf) auf eine Membran (Polycarbonat, 0,22 Porengröße, d=25, schwarz; Carlroth) mittels Vakuumfiltration gebracht und mit 3,7 % iger PFA-Lösung fixiert. Zur Färbung wurden die Zellen auf den Membranen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (5 µg/ml) versetzt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Propidiumiodid interkaliert mit Nukleinsäuren toter Zellen. Anschließend wurden die Filtermembranen auf Objektträger in Citifluor-Lösung eingebettet und durch Auszählen von stochastisch unabhängigen Zählfeldern ausgewertet. Die Auszählung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen), mit folgender Filterkombination: Anregung: HQ545/30, Strahlteiler: Q565LP, Emission: HQ610/75.

### 3.8.2. Lebendzellzahl (LZZ)

Die Lebendzellzahl gibt die Anzahl lebender Mikroorganismen in einer Population an. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurde das Vollmedium PCA (plate count agar) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen genutzt und durch variierende Inokula sowie zwei verschiedenen pH-Werten und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Verschiedene Volumina (1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, 1 l) des Grubenwassers wurden durch sterile Cellulosenitrat-Filtermembranen (0,45 Porengröße, d=47 mm, weiß mit Gitternetz, CarlRoth) mittels Filter-System (PES, Gewinde 45 mm, Nalgene®) filtriert. Diese Filtermembranen wurden anschließend auf Nährböden in Petrischalen (steril, 94x16 mm) gelegt, und bei 28 °C und 45 °C im Inkubator inkubiert. Zur Unterscheidung aerober und anaerober Mikroorganismen, wurden die Nährmedien zur anaeroben Kultivierung in Anaerobier-Töpfen (je 2,5 l mit je 12 Petrischalen, Merck Milipore) mit CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Zusammensetzung der Nährböden für „plate-count Agar“ und „Königstein-plate-count Agar“ bei verschiedenen pH-Werten (2 und 7) und unterschiedlichen C-Quellen (Hefeextrakt und Glucose), auf denen die Filtermembranen aufgelegt wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet. Neben den auf Membranen filtrierten Proben, wurde Grubenwasser zur Bestimmung der LZZ auch direkt eingesetzt. Dafür wurden 100 µl Grubenwasser (unverdünnt und 1:10 verdünnt) auf den Nährböden ausplattiert und äquivalent verfahren, wie bei den Filtermembran-Ansätzen.

Die aufgelisteten Komponenten der Nährmedien (siehe Tabelle 7) wurden mit je 1 Liter der angegebenen Flüssigkeit (sterilfiltriert, 0,2 µm Porengröße) vermischt, auf einen pH Wert von 7,0 (± 0,2) eingestellt und durch Erhitzen gelöst. Anschließend erfolgte die Sterilisierung der Medien durch

Autoklavieren (15 min bei 121 °C). Bei Herstellung der Nährböden mit einem pH-Wert von 2,0 ( $\pm$  0,2) wurden die Medienbestandteile und die Agarlösung getrennt hergestellt und einzeln autoklaviert, erst danach erfolgte die Vermengung bei einer Temperatur der Lösungen von 55 °C.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Nährböden für die Bestimmung der Lebendzellzahl.**

Plate count Agar (PCA)	Königstein plate-count Agar (K-PCA)	
PCA 7 / PCA 2	K-PCA 7 H / K-PCA 2 H	K-PCA 7 G / K-PCA 2 G
5 g/l Pepton aus Casein	-	-
1 g/l Glucose	-	2,5 g/l Glucose
2,5 g/l Hefeextrakt	2,5 g/l Hefeextrakt	-
15 g/l Agar	15 g/l Agar	15 g/l Agar
sterilfiltriertes MilliQ Wasser	sterilfiltriertes Grubenwasser aus Königstein	sterilfiltriertes Grubenwasser aus Königstein

### 3.8.3. Most Probable Number-Methode (MPN)

#### 3.8.3.1. MPN für aerobe Mikroorganismen

Zur Abschätzung der Quantität verschiedener Gruppen kultivierbarer Mikroorganismen in den Grubenwasserproben wurde die MPN-Methode angewandt (Best, 1990). Hierzu wurde die Ausgangsprobe in einem flüssigen Nährmedium (FeTSB, Fe-Medium und Fe-komplex für Eisenoxidierer; SO-Medium für Schwefeloxidierer) verdünnt. Die Zusammenstellung der Nährmedien-Bestandteile ist im Anhang in den Tabellen A5 und A6 zu finden. Bei jedem MPN-Versuch wurden fünf parallele Verdünnungsreihen in Dezimalschritten bis  $10^{-8}$  angelegt. Eine Verdünnungsreihe mit autoklavierter Probe diente jeweils als Negativkontrolle. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von mindestens vier Wochen entnommen und jeweils am selben Tag als Inokulum für die MPN-Ansätze verwendet.

Die Inkubation der Verdünnungsreihen erfolgte bei 28 °C im Inkubationsschrank (Thermoshake der Firma Gerhardt). Die Ansätze wurden sechs Wochen inkubiert, bevor sie hinsichtlich des Wachstums von Mikroorganismen untersucht wurden. Dabei erfolgte eine Beurteilung der einzelnen Verdünnungsstufen zwischen positiv d.h. Wachstum von Mikroorganismen und negativ d.h. kein Wachstum von Mikroorganismen. Für das Wachstum von eisenoxidierenden Mikroorganismen wurde die Bildung von Eisenhydroxiden (orange-brauner Niederschlag) als Indikator genutzt. Das Wachstum von schwefeloxidierenden Mikroorganismen wurde anhand des Farbumschlags des Farbindikators Methylorange im SO-Medium bewertet. Bei der Oxidation des Tetrathionat durch die Mikroorganismen wird das Medium angesäuert, was durch den Farbumschlag des Methylorange von

orange nach rot ab einem pH-Wert von 4,4 sichtbar wird. Aus der Anzahl der positiven Verdünnungsstufen der fünf parallelen Verdünnungsreihen lässt sich mithilfe von statistischen Methoden die „wahrscheinliche Zellzahl“ [MPN/ml] in der Ausgangsprobe ermitteln. In dieser Arbeit wurde der Most Probable Number (MPN) Calculator der U.S. Environmental Protection Agency Version 3.0 (August 2012) zur Auswertung verwendet [5]. Dieses Programm wurde auf der Grundlage der statistischen Berechnungen von (Klee, 1993) entwickelt.

### *3.8.3.2. MPN für anaerobe Sulfatreduzierer*

Zur Anzucht und Abschätzung der Quantität anaerober Sulfatreduzierer in den Grubenwasserproben wurde die MPN-Methode angewandt. Es wurden jeweils fünf parallele Verdünnungsreihen der Grubenwasserproben in 10er Schritten von  $10^0$  bis  $10^{-5}$  angelegt. Dabei wurden die Proben mit dem Nährmedium aSRB für Sulfatreduzierer verdünnt (siehe Tabelle A9, Anhang). Als Inokulum wurden Grubenwasserproben des Uranbergwerks Königstein (siehe Tabelle 1, Kapitel 3.3.) zugegeben. Eine Verdünnungsreihe mit autoklavierter Probe diente jeweils als Negativkontrolle. Diese MPN-Methode wurde semi-anaerob durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungsreihen mit sauerstoffhaltigem Medium in 15 ml-Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss angesetzt, welche mit insgesamt 16 ml Medium inkl. Probe befüllt wurden, sodass kein Luftraum in den Reaktionsgefäßen mehr vorhanden war. Die beimpften Verdünnungsreihen wurden bei Raumtemperatur in der Glovebox ( $\text{CO}_2\text{:H}_2$  80:20) anoxisch inkubiert. Der im Wasser gelöste Sauerstoff wird durch aerobe Mikroorganismen in der Probe verbraucht. Bei längerer Inkubation in der Glovebox stellen sich anaerobe Bedingungen in den Reaktionsgefäßen ein, da keine weitere Sauerstoffquelle vorhanden ist (Sen, 1999). Nach 12 Wochen Inkubation wurden die Verdünnungsreihen hinsichtlich des Wachstums von Mikroorganismen untersucht. Das Vorhandensein von Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen in den einzelnen Verdünnungsstufen wurde anhand der Eisensulfid-Bildung in Form eines schwarzen Niederschlags bestimmt. Die Auswertung der MPN-Versuche erfolgte wie unter Kapitel 3.8.3.1. beschrieben.

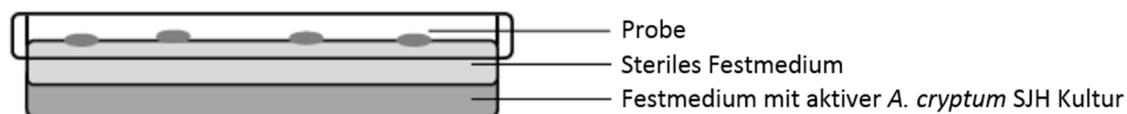
## **3.9. Klassische mikrobiologische Kultivierungsverfahren**

### ***3.9.1. Isolierung und Kultivierung von aeroben Mikroorganismen aus dem Grubenwasser***

Zur Anzucht von Mikroorganismen aus den Proben des Grubenwassers wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden jeweils 100 µl der unverdünnten Proben, sowie 100 µl einer 1:10-Verdünnung direkt mit einem sterilen Glasspatel auf den Festmedien ausplattiert. Zum anderen wurden jeweils 1 ml, 5 ml und 10 ml der Proben in einem sterilen „BottleTop-Filter“ (Gewinde 45 mm, Nalgene®) durch eine sterile Membran (Porengröße 0,2 µm, d=47 mm, GTTP, Milipore) filtriert. Die Membranen wurden anschließend auf die verschiedenen Festmedien gelegt. Alle Ansätze wurden als

Doppelbestimmung angelegt und bei 28 °C inkubiert (Inkubationsschrank: Thermoshake der Firma Gerhardt). Die Bildung der „Kolonie-bildenden Einheiten“ (KbE) wurde mindestens acht Wochen lang beobachtet.

Die verwendeten Festmedien waren sowohl einschichtige als auch zweischichtige Festmedien. Die Zusammensetzung der einschichtigen Festmedien: Fe-Medium, Fe-komplex, Fe-Thio, FeTSB, FeTSB-Thio und SO-Medium ist in den Tabellen A3 bis A6 im Anhang beschrieben und unterschied sich in der Art der Basalsalze und in der Kohlenstoffquelle. Die zweischichtigen Festmedien: Feo, Feso und Feto bestanden aus einer unteren Schicht, welche mit dem Bakterienstamm *Acidiphilium cryptum* SJH versetzt wurde, sowie einer oberen, sterilen Schicht, auf welche die Probe gegeben wurde (Abbildung 11). Der Bakterienstamm *A. cryptum* SJH verstoffwechselt die Hydrolyseprodukte der Agarose, die unter sauren Bedingungen entstehen und das Wachstum oligotropher Mikroorganismen hemmen. Über Diffusion wird in beiden Schichten die Konzentration der Hydrolyseprodukte gering gehalten. Das Volumenverhältnis der Ober- und Unterschicht entsprach 1:1. Die Zusammensetzung der zweischichtigen Medien Feo, Feso und Feto ist in Tabelle A7 und A8 im Anhang zu finden.



**Abbildung 11: Darstellung des zweischichtigen Festmediums.** Die untere Schicht (15 ml) wurde mit dem heterotrophen Bakterienstamm *A. cryptum* SJH versetzt. Die obere Schicht (15 ml) wurde mit der Probe beimpft.

### 3.9.1.1. Gewinnung von Reinkulturen aerober Mikroorganismen

Vom Festmedium wurden ausgewählte Kolonie-bildende Einheiten (KbE) möglichst unterschiedlicher Morphologie steril mit ausgeglühter und abgekühlter Impföse angestochen und mit den aufgenommenen Zellen ein Verdünnungsausstrich auf sterilem Festmedium (sterile Petrischalen, 55x15 mm, CarlRoth) angelegt. Nach Inkubation bei 28 °C wurde dies noch zweimal wiederholt um Reinkulturen zu gewinnen.

### 3.9.2. Isolierung und Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen aus dem Grubenwasser

Für die Kultivierung von anaeroben Sulfatreduzierern wurde das flüssige Nährmedium aSRB nach Sen und Johnson (Sen, 1999) verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle A9 im Anhang zu finden. Anoxische Bedingungen wurden bei diesem Medium durch den Sauerstoffverbrauch autochthoner, aerober Mikroorganismen im Inokulum generiert. Anschließend wurden die flüssigen Ansätze jeweils

in 20 ml-Reaktionsgefäße (Klarglas, DIN-Rollrand, flacher Boden, langer Hals, 20 ml) abgefüllt, gasdicht verschlossen (20 mm Butylhohlstopfen und 20 mm-Alu-Boerdelkappe) und für mindestens 16 Wochen bei 28 °C im Dunkeln inkubiert.

### **3.10. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden**

#### ***3.10.1. DNA-Extraktion der Wasser- und Biofilmproben***

Für die Extraktion der Nukleinsäuren kamen zwei verschiedene Kits für Wasser- und Biofilmproben zum Einsatz. Die DNA der Mikroorganismen der Reaktor-Träger und der Objektträger aus den Flusszellen wurde mit dem NucleoSpin for Soil Kit von Macherey-Nagel isoliert. Zuvor wurde die Biomasse mit Hilfe von Silica-Kügelchen (0,1 mm) bzw. Zellschabern (25 cm) von den Trägermaterialien gewonnen. Die DNA der Mikroorganismen aus dem Grubenwasser wurde mit dem PowerWater® DNA Isolation Kit von MO-BIO extrahiert, welches speziell für Filtermembranen geeignet ist. Die DNA-Extraktion mit den genannten Kits wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

#### ***3.10.2. DNA-Extraktion aus Isolaten***

Zur Isolation der DNA aus prokaryotischen Isolaten wurde das PowerSoil® DNA Isolation Kit der Firma MO BIO Laboratories nach Herstelleranweisungen genutzt. Als Ausgangsmaterial wurde Zellmaterial vom Festmedium abgenommen oder Zellmaterial einer Flüssigkultur abzentrifugiert. Die DNA wurde in je 100 µl LiChroSolv® Wasser eluiert.

#### ***3.10.3. DNA-Extraktion aus acidophilen, eisenhaltigen Kulturen***

Kulturen, bei denen die DNA nicht mit dem PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) isoliert werden konnten und sehr eisenhaltig waren, wurden mit dem Extraktionsprotokoll nach Johnson (Johnson, 2005) behandelt. Die in Lösung gebrachten Isolate (oder Flüssigkulturen) wurden in 2,0 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und 5 min bei 13.200 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG). Der Überstand wurde entfernt. Die im Pellet enthaltenen Eisenverbindungen, sowie der saure pH-Wert wirkten sich störend auf die anschließende PCR aus. Aus diesem Grund wurde das Pellet mehrmals mit 500 µl saurer PBS-Lösung (pH=1,2) gewaschen, bis eine deutliche Abnahme der Braunfärbung des Pellets zu beobachten war. Bei einem hohen Eisengehalt erfolgte dies mit 500 µl einer 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung (Johnson, 2005). Anschließend wurde mit neutraler PBS-Lösung gewaschen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von NaOH (Natriumhydroxid, Endkonzentration 0,05 M), sowie SDS (Sodiumdodecylsulfat, Endkonzentration 0,025 %) und der anschließenden Inkubation bei 96 °C für 15 min (Johnson, 2005). Nach 5 min

Zentrifugation bei 13.200 rpm wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die detaillierte Herstellung der verwendeten Lösungen und Puffer ist in Anhang Kapitel A 1. beschrieben.

#### **3.10.4. Ethanol-Fällung von DNA-Lösungen**

Unmittelbar nach der Gewinnung der DNA erfolgte eine Ethanol-Fällung, die der Reinigung der DNA bzw. dem Konzentrieren von DNA aus großen Volumina dient. Die gesamte eluierte DNA aus der DNA-Extraktion wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 6,0) versetzt und kräftig gemischt. Anschließend wurden 2,5 Volumenanteile eisgekühlter Ethanol absolut (96 %) zugegeben. Nach Homogenisierung der Probe wurde die DNA zur Ausfällung zwei Nächte bei -20 °C gelagert. Die Zugabe von Ethanol führt zu einem Wasserentzug an den hydratisierten Molekülen, wodurch die Löslichkeit der Nukleinsäuren abnimmt und die DNA ausfällt. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g für 30 min. Dabei wurde die schwerlösliche ausgefällte DNA als Pellet von den flüssigen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde entfernt, so dass nur das farblose Pellet am Boden des Tubes zurückblieb. Das Pellet im offenen Tube wurde unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl LichroSolv® Wasser (Merck Millipore) gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

#### **3.10.5. Messungen des DNA-Gehaltes/Reinheit**

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion der DNA-Lösung mit Hilfe des Gerätes NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer gemessen. Dazu wurden 1 µl DNA-Lösung eingesetzt und die Extinktion bei den Wellenlängen 230 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von RNA) bestimmt. Die Konzentration wurde mittels Koeffizienten  $OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$  ( $OD = \text{Optische Dichte}$ ) berechnet. Durch Ermittlung des Quotienten  $OD_{260 \text{ nm}}/_{280 \text{ nm}}$  wurde die Reinheit der DNA-Lösung ermittelt. Eine reine DNA-Lösung sollte dabei einen Quotienten zwischen 1,8 und 1,9 aufweisen. Ein Wert höher als 1,9 zeigt dabei eine Kontamination mit RNA an. Aus dem Quotient  $^{260 \text{ nm}}/_{230 \text{ nm}}$  konnte die Verschmutzung der DNA-Lösung mit Proteinen, Huminsäuren oder Zuckern ermittelt werden. Für eine reine DNA sollte der Quotient  $^{260 \text{ nm}}/_{230 \text{ nm}}$  idealerweise über 2,0 liegen, ein Wert zwischen 1,5 und 2,0 ist noch akzeptabel. Als Referenzlösung diente DNase freies LiChroSolv Wasser.

#### **3.10.6. RNA-Extraktion**

Um während der RNA-Extraktion den RNA-Verdau durch Kontamination zu vermeiden, wurden vor RNA-Arbeiten alle Oberflächen und Geräte im Labor mit RNase away (Carl Roth) gereinigt und alle zu benutzenden Behältnisse nach dem Autoklavieren mit 0,1 % DEPC-Wasser behandelt. Alle Lösungen, die nicht im Kit enthalten waren z.B. TBE-Puffer, Agarosegele, Ethidiumbromid-Bad, TE-Puffer, wurden

frisch mit RNase freiem 0,1 %igen DEPC Wasser hergestellt. Während der gesamten RNA-Isolierung wurde auf Eis gearbeitet. Die RNA der Reaktor-Träger und des Grubenwassers wurden mit dem PowerWater RNA Isolation Kit von MO-BIO isoliert. Um die RNA der Objektträger aus der Flusszelle zu extrahieren wurde das innuprep RNA mini Kit (analytik Jena) nach Anleitung des Herstellers genutzt.

Um sicherzustellen, dass keine DNA mehr im RNA-Extrakt vorhanden war, wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau nachgeschaltet. Dabei wurden 100 µl des RNA-Extrakts mit 2 µl DNase I (Pqqlab) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden zur Lösung 20 µl 25 mM EDTA (Pqqlab) hinzugefügt und 10 min bei 65 °C inkubiert.

### **3.10.7. Ethanolfällung von RNA-Lösungen**

Um die Reinheit der RNA-Extrakte nach der Extraktion und dem Verdau zu erhöhen, wurde nach dem DNase-Verdau eine Ethanolfällung durchgeführt. Zu den RNA-Lösungen wurde dafür das 2,5 fache Volumen Ethanol absolut gegeben und 30 min bei -20 °C inkubiert. Das Gemisch wurde danach 30 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Die reine RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Um sicherzustellen, dass die RNA nicht degradiert vorliegt, wurde die gereinigte RNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.10.9.) überprüft.

Bei der anschließenden Kontroll-PCR mit dem Primerpaar 27F-1492R (siehe Tabelle 8) sollte kein PCR-Produkt detektierbar sein, damit eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden kann (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

Beim Vorliegen von reiner RNA wurde im nächsten Schritt die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das Reverse Transkriptase Kit (25Units/µl, analytik jena) mit Random Hexamer Primern genutzt. Bei der gesamten Durchführung, bei der nach Anleitung des Herstellers für das Kit gearbeitet wurde, war eine Kühlung aller verwendeten Lösungen mit Eis notwendig. Die cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

### **3.10.8. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur Sequenzanalyse der mikrobiellen Population wurden sowohl spezifische Fragmente der 16/18S rDNA als auch Genfragmente von Schlüsselenzymen eines charakteristischen Stoffwechselweges amplifiziert. Dazu wurde die extrahierte DNA und cDNA der entnommenen Proben (siehe Tabelle 1) verwendet. Primer der zu amplifizierenden DNA-Lösungen wurden von der Firma Thermo Scientific bezogen und sind mit deren Sequenz und Referenz in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete Primer zur Amplifikation der DNA/cDNA-Fragmente nach DNA/RNA-Extraktion.**

Bezeichnung	Zielgen/Verwendung	DNA-Sequenz (5'→3')	Referenz
<b>Eubacteria</b>			
U341F	16S rDNA V2/V3 Region Bakterien für Pyrosequenzierung	5'-CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG-(MID-10nt)- <u>CCTACGGGRSGCAGCAG</u> -3'	Hansen et al., 1998, Qian et al. 2011
R4	16S rDNA V4 Region Bakterien für Pyrosequenzierung	5'-TACNVGGGTATCTAATC-3'	Zhang et al. 2011
27F	16S rRNA Bakterien spezifisch	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Bond et al. 2000
1492R	16S rRNA Bakterien spezifisch	5'-GGTACCTGTTACGACTT-3'	Bond et al. 2000
<b>Archaea</b>			
U519F	16S rDNA V4 Region universell für Pyrosequenzierung	5'-GCCTCCCTCGGCCATCAG-(MID-10nt)- <u>CAGYMGCCRCGGKAAHACC</u> -3'	Porat et al. 2010
958R	16S rDNA V5 Region für Pyrosequenzierung	5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'	La Duc et al. 2012
<b>Eukarya</b>			
3NDf	18S rDNA universell Eukarya für Pyrosequenzierung	5'-CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG-(MID-10nt)- <u>GGCAAGTCTGGTGCCAG</u> -3'	Liu et al. 2012
V4_euk_R2	18S rDNA universell Eukarya für Pyrosequenzierung	5'-ACGGTATCT(AG)ATC(AG)TCTTCG-3'	Liu et al. 2012
Euk 20F	18S rRNA universell Eukarya	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	Aguilera et al. 2010; Euringer und Lueders, 2008
Kineto_651R	18S rDNA Kinetoplastea-spezifisch	5'-TTGGTCGCRCTTYTTTAGTCACAG-3'	Glaser et al. 2014
Kineto_80F	18S rDNA Kinetoplastea-spezifisch	5'-CATCAGACGYAATCTGCCGC-3'	Glaser et al. 2014
<b>Stoffwechselgene</b>			
DSR_F1	Dissimilatorische Sulfitreduktase dsrA-Gen (Sulfatreduzierer)	5'- ACS CAC TGG AAG CAC G -3'	Ben- Dov et al. 2007
RH3	Dissimilatorische Sulfitreduktase dsrA-Gen (Sulfatreduzierer)	5'- GGT GGA GCC GTG CAT GTT -3'	Ben- Dov et al. 2007

Zur Analyse der Diversität mittels Pyrosequenzierung wurden spezielle Primer zur Amplifizierung der 16S/18S rRNA Gene genutzt. Die Analyse der Bakterien erfolgte mit dem Primerpaar U341 - R4 (Sequenz siehe Tabelle 8), das ein 444 bp großes Genfragment in der V2/V3-V4 Region erfasst. Die Archaea spezifischen Primer U519F - 958R wurden zur Amplifizierung eines 252 bp großen Fragments in der V3-V4 hypervariablen Region genutzt. Das 456 bp große Fragment, das mit den Eukarya spezifischen Primern 3NDf - V4\_euk\_R12 amplifiziert wurde, sollte einen Überblick über die Eukarya Diversität geben. Die Forwärtsprimer der genannten Primerpaare wurden modifiziert, indem sie spezifische Tags durch Einfügen eines Fusionslinkers (5'-CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG-3') und

einer 10 Nukleotid (MID10-nt) Barcode Sequenz am 5' Ende tragen. Die Barcode Sequenz variiert in ihrer Sequenz je nach Probe und Primer und dient nach dem Poolen der Proben zur Zuordnung der Sequenzen zu den Proben. Die Primer für die Fragmente, die später mittels Pyrosequenzierung analysiert werden sollten, wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) hergestellt. Alle weiteren Primer wurden durch die Firma Thermo Fisher Scientific bereitgestellt.

Zur Identifizierung der isolierten Prokaryoten wurde ein ca. 1500 bp-großes Fragment der 16S rDNA mittels Primerpaar 27F - 1492R für die anschließende Sequenzierung amplifiziert. Als DNA-Vorlage für die PCR wurde entweder ein DNA-Isolat verwendet (siehe Kapitel 3.10.2) oder Zellmaterial der Isolate vom Festmedium abgenommen (Kolonie-PCR). Zum qualitativen Nachweis von Sulfatreduzierern wurde ein 222 bp-großes Fragment des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der dissimilatorischen Sulfitreduktase amplifiziert (dsrA-spezifische PCR). Hierfür wurde das Primerpaar DSK12-F/RH3\_R verwendet. Der Bakteriennachweis positiver MPN-Sulfatreduzierer Verdünnungsreihen erfolgte mit dem Primerpaar U341F-R4, wobei ein 444 bp-großes Fragment der 16S rDNA amplifiziert wurde.

Die Kinetoplastea (auch *Bodo saltans* zugehörig) spezifische seminested PCR besteht aus zwei ineinander verschachtelten PCRs, die mittels den Primerpaaren EUK20F - Kineto\_651R und Kineto\_80F - Kineto\_651R 630 bp bzw. 570 bp große Fragmente amplifizieren. Diese PCR sollte der Identifizierung von Kinetoplastea Arten dienen, die mit der universellen Eukarya PCR eventuell nicht erfasst wurden.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen je PCR-Ansatz.**

Zielorganismen		5 x PCR Puffer farblos	MgCl <sub>2</sub> [25mM]	dNTP's [10mM]	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	DNase freies Wasser	Tag-Polymerase [5 U/µl]	Template DNA
Bakterien U341F-R4 und Eukarya 3Ndf-V4_euk_R2	Volumen/Ansatz	20 µl	4 µl	2 µl	2 µl (100 µM)	2 µl (100 µM)	65,5 µl	0,5 µl	1 µl (30 ng)
	Endkonzentration	1x	2,5 mM	0,2 mM	2 µM	2 µM		2,5 U (0,025 U/µl)	
Archaea U519F-958R	Volumen/Ansatz	20 µl	4 µl	2 µl	2 µl (10 µM)	2 µl (10 µM)	65,5 µl	0,5 µl	1 µl (30 ng)
	Endkonzentration	1x	2,5 mM	0,2 mM	0,2 µM	0,2 µM		2,5 U (0,025 U/µl)	
Bakterien 27F-1492R	Volumen/Ansatz	5 µl	1 µl	0,5 µl	0,5 µl (10 pmol)	0,5 µl (10 pmol)	16,375 µl	0,125 µl	1 µl (30 ng)
	Endkonzentration	1x	2,5 mM	0,2 mM	0,2 µM	0,2 µM		2,5 U (0,025 U/µl)	
Diss. Sulfitreduktase DSRF1-RH3	Volumen/Ansatz	5 µl	1 µl	0,1 µl (12,5mM)	1 µl (10 pmol)	1 µl (10 pmol)	15,8 µl	0,1 µl	1 µl (1-25 ng)
	Endkonzentration	1x	2,5 mM	0,1 mM	1 µM	1 µM		0,5 U (0,02 U/µl)	
Kinetoplastea I EUK20F-Kineto651R	Volumen/Ansatz	2 µl	0,6 µl	0,1 µl (12,5mM)	0,5 µl (10µM)	0,5 µl (10µM)	4,1 µl	0,2 µl	1 µl (0,1ng/ml)
	Endkonzentration	1x	1,5 mM	0,1 mM	0,5 µM	0,5 µM		1,0 U (0,1 U/µl)	
Kinetoplastea II Kinteo80F-Kineto651R	Volumen/Ansatz	2 µl	1 µl	0,1 µl	0,2 µl (10µM)	0,2 µl (10µM)	5,4 µl	0,1 µl	1 µl (0,1ng/ml)
	Endkonzentration	1x	2,5 mM	0,1 mM	0,2 µM	0,2 µM		0,05 U (0,5 U/µl)	Kineto. I 1:10

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze mit allen Primerpaaren ist in Tabelle 9 zusammengefasst, dabei wurden die Komponenten 5xPCR Puffer farblos, MgCl<sub>2</sub>, PCR Nucleotide Mix (dNTP) und die GoTag® Flexi Polymerase von der Firma Promega verwendet. Die verwendeten PCR-Programme, die mit dem BioRad Thermal Cycler (MyCycler™ Thermal Cycler, SerialNo. 580BR 08350, ALPHA, Gradient

option activated) durchgeführt wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Bildung des jeweiligen PCR-Produkts mit der erwarteten Fragmentgröße wurde mithilfe der Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Kapitel 3.10.9.).

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten PCR-Programme.**

Zielgen Primerpaar	Bacteria universell U341FF-R4	27F-1492R	Archaea universell U519F-958R	Eukarya universell 3NdF-V4_euk_R2	Kinetoplastea spezifisch Euk20F-Kineto651R	Kineto80F-Kineto651R	Diss. Sulfitreduktase DSRF1-RH3	
Initiale °C	94	94	95	94	94	95	95	
Denaturierung min	5	12	5	5	5	3	2	
Zyklen	29	30	30	20	20	30	35	
Deanurierung	°C	94	94	95	94	94	95	96
	min	0:50	1	0:30	0:45	0:30	0:45	1
Anealing	°C	56	51	55	54	55	58	58
	min	0:50	0:45	0:40	0:45	0:30	0:30	1
Elongation	°C	72	72	72	72	72	72	72
	min	0:50	1:30	1	0:50	1	1:10	1:30
Finale °C	72	72	72	72	72	72	72	
Elongation min	6	20	10	10	10	10	10	

### 3.10.9. Nachweis des PCR-Produktes mit Agarosegelelektrophorese

Zur Verifizierung der Nukleinsäurekonzentration und Nachweis der Fragmentlänge wurden jeweils 5 µl der PCR-Produkte auf ein 1,5 % iges [w/v] TAE-Agarosegel (siehe Anhang A 1.3.) aufgetragen und die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese nach unterschiedlicher Länge und Ladung aufgetrennt. Bei der Analyse der erzeugten Amplifikate wurden die Fragmente vor dem Auftragen mit 2 µl Ladepuffer (6 x loading dye, Fermentas) gemischt. Als Größen-Standard wurde der Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder (0,5 µg/µl, Fermentas) mitgeführt. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in einer mit 1 x TAE befüllten Elektrophoresekammer (PerfectBlue Gelsystem Maxi S Plus, PEQLAB, Model 40-1214) für 55 min bei einer konstanten Spannung von 120 V (PEQLAB Power Supply EV231). Zur Visualisierung der DNA wurde das Agarosegel nach Beendigung der Elektrophorese für ca. 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (100 µl/l, Firma Roth) gefärbt und im Anschluss kurz in Wasser geschwenkt. Die DNA-Banden wurden unter einem UV-Transilluminator („Dunkelhaube DH 30/32“ der Firma Biostep®) mit der Geldokumentationssoftware „Intas GDS“ detektiert. Stimmt die Größen der untersuchten Proben mit den erwarteten Werten überein und sollten die Amplifikate für eine Pyrosequenzierung weiter verwendet werden, wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (siehe Kapitel 3.10.10.). Amplifikate, die mit „Sanger-Sequenzierung“ sequenziert werden sollten, wurden durch die Firma GATC aufgereinigt.

### **3.10.10. Reinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte, deren Sequenzen mittels Pyrosequenzierung ermittelt werden sollte, wurden zuvor mit dem innuPREP PCRpure Kit (analytik jena) gereinigt. Ziel war die Trennung der Fragmente von Primern, Nukleotiden, Polymerase und Puffersalzen. Das genannte Reinigungskit ist für DNA-Amplifikate mit einer Größe von 60 bp und 30 kb geeignet. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl destillierten Wasser (LichroSolv®) eluiert.

### **3.10.11. Pyrosequenzierung**

Die Sequenzierung von gereinigten PCR-Produkten der DNA-Extrakte von Bacteria, Archaea, Eukarya und der Sulfat-reduzierenden Bakterienkulturen der MPNs wurde von der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg) durchgeführt. Alle Amplifikate der Proben, die maximal eine Fragmentlänge von 550 bp aufwiesen, wurden dafür auf eine DNA-Konzentration von 80 ng/µl angeglichen und mit je 1 µl gepoolt. Dieser Amplicon-Pool wurde mittels Roche 454 GS FLX Titan Technologie analysiert. Roche GS FLX++ Sequenzierung ist die Technologie der Wahl für die novo-Sequenzierung von Bakterien- und Pilzgenomen. Die FLX++ -Technologie produziert ein qualitativ hochwertiges Gerüst langer Contigs zur präzisen de novo-Genomsequenzierung (Einzelsequenziergenauigkeit >99,5 %). Vor allem durch die Kombination von langen Leseweiten und die Erfahrung bei der Herstellung von Long Paired End (LPE)-Banken (3 kbp bis 40 kbp) wird eine hohe Assemblierungsqualität garantiert. Die sogenannte FLX++ -Technologie ermöglicht eine Read-Ausbeute von bis zu 1 Millionen Reads (700 Mbp) pro Sequenzierlauf mit Leselängen, die mit der Sanger-Sequenzierung vergleichbar sind (bis zu 1.100 bp) [6]. Im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung wird die DNA-Polymerase durch ein ausgeklügeltes Enzymsystem unter Beteiligung einer Luziferase dabei beobachtet, wie sie ein Nukleotid nach dem anderen an den neusynthetisierten DNA-Strang anhängt. Die zu sequenzierende DNA dient als Matrize und liegt auch hier einzelsträngig vor. Bei dieser Enzymreaktion handelt es sich um eine Kettenreaktion, bei der bei Zugabe des passenden Nukleotids zur Matrize  $PP_i$  von den dNTPs abgespalten wird, welches durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgewandelt wird. ATP wiederum treibt die Luziferase-Reaktion an, wodurch Luziferin in Oxyluziferin verwandelt wird und einen Lichtblitz hervorruft, der von einem Detektor erkannt und aufgezeichnet wird (Margulies & Jarvie, 2005).

### **3.10.12. Sanger-Sequenzierung der 16S rDNA aus Einzel-Isolaten**

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente der 16S rDNA der Isolate wurde von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Dazu wurden jeweils 20 µl des PCR-Produktes in 1,5 ml Reaktionsgefäße oder in 96 Well-Mikrotiterplatten, sowie je 20 µl des Sequenzierprimers in

entsprechenden Reaktionsgefäßen versendet. Die Reinigung des PCR-Amplifikats erfolgte vor der Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem von Sanger (Sanger, 1977) entwickelten Prinzip der Kettenabbruchmethode. Dabei sind in dem Reaktionsansatz fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP's) und nicht-markierte Desoxynukleotide (dNTP's) in einem bestimmten Verhältnis vorhanden. Während der Sequenzierreaktion werden bei der Strang-Synthese mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit statt dNTP's ddNTP's eingebaut, die zum Kettenabbruch führen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die an ihrem Ende fluoreszenzmarkierte ddNTP's tragen. Diese Fragmente werden elektrophoretisch in einem Sequenziergerät aufgetrennt. Je nach ddNTP kommen dabei vier verschiedene Farbstoffe zur Geltung, so dass unterschieden werden kann, welche Base eingebaut wurde und nachvollzogen werden kann, wie sich die untersuchte DNA-Sequenz zusammensetzt. Am Ende dieser Analyse erhält man die DNA-Sequenz.

### **3.11. Bioinformatik - Sequenzanalyse**

#### ***3.11.1. Sequenzen aus der Sanger Sequenzierung***

Die von GATC-biotech ermittelten Basen-Reihenfolgen wurden mit dem Programm Chromas LITE Version 1.45 (Technelysium Pty Ltd) gelesen und bearbeitet. Anschließend erfolgte der Vergleich mit den Einträgen in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, [7]) und „Ribosomal database project“ (RDP, [8]) unter Verwendung des Suchalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, 1990) bzw. RDP Klassifizierer: Seqmatch. Die eingegebenen Sequenzen wurden den gelisteten Nukleotidsequenzen der Datenbanken zuordnet. Die Gattungs- und Artnamen der sequenzierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der angegebenen Ähnlichkeits-Wahrscheinlichkeit bestimmt. Dabei wurden die beiden ersten Treffer mit der höchsten Sequenz-Identität berücksichtigt. Anhand der Daten aus dem Sequenzabgleich mit den Datenbanken NCBI und RDP wurden die Sequenzen in phylogenetische Gruppen eingeteilt.

#### ***3.11.2. Sequenzen aus der Pyrosequenzierung***

Nach der Bestimmung der Sequenz der Amplicon-Poole führte Eurofins MWG Operon bereits einen ersten Qualitätscheck der Sequenzen durch. Die daraus resultierenden Sequenzdaten der mikrobiellen Gemeinschaft wurden mit Hilfe der Software MOTHUR 1.33.3 (Schloss *et al.*, 2009) durch Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig) automatisiert analysiert. Im ersten Schritt wurden die Sequenzen einem Qualitätscheck unterzogen, indem Homopolymere auf eine Anzahl von 8 limitiert wurden und Sequenzen mit unspezifischen Basen oder abnormer Leselänge entfernt wurden. Nur Sequenzen mit drei (Bakterien und Eukarya) bzw. sieben (Archaea) oder weniger

Abweichungen im Vergleich zur korrekten Primer Sequenz (aufgrund der Wobble-Basen) und maximal ein Unterschied zur korrekten Barcode-Sequenz wurden zugelassen. Nach dem Qualitätscheck wurden sowohl die Primersequenzen als auch Fragmente mit einer Sequenzlänge von weniger als 200 bp (Bacteria und Eukarya) bzw. weniger als 150 bp (Archaea) entfernt. Die bearbeiteten Sequenzen wurden durch Mothur unter Nutzung des „SILVA Referenz Alignments“ für Bacteria, Archaea und Eukarya entsprechend angepasst (Schloss, 2011). Alle Sequenzen, die als Chimära, Mitochondrien, Chloroplasten und unbekannte Domänen identifiziert wurden, wurden aus der Datenbank entfernt und in dieser Studie nicht berücksichtigt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von MOTHUR in taxonomische Gruppen, sogenannte OTUs (operational taxonomic units) mit einem cutoff value von 3 % Verschiedenheit, unter Verwendung der Datenbank RDP (Ribosomal database project, [9]), eingeteilt. Es wurden nur Bootstrap Werte von über 80 % genutzt. Dabei bildeten Fragmente mit der gleichen Sequenz ein OTU. Anhand der Daten aus dem Sequenzabgleich mit den Datenbanken NCBI und rdp wurden die Sequenzen bzw. OTUs in phylogenetische Gruppen eingeteilt (Excel-Pivot Tabellen). Die prozentualen Anteile der Sequenzen einer phylogenetischen Gruppe zur Gesamtsequenzzahl einer Probe wurden durch Balken -oder Kreisdiagramme grafisch dargestellt.

### **3.12. Statistik**

Die Chao, ACE, Shannon und Simpson Indizes der OTU basierten Diversität, sowie die „Coverage“ und die „Rarefaction“ Kurven wurden bei 3 % Unähnlichkeit als Parameter der Alpha-Diversitätscharakteristika mit der Software MOTHUR kalkuliert.

Um die mikrobiellen Gemeinschaftsstrukturen untereinander und mit den chemischen Parametern des Grubenwassers zu vergleichen, wurden hierarchische Cluster und „Nonmetric multidimensional scaling“ Diagramme (Cox, 1994, Kruskal, 1964) mit Hilfe des „Vegan package“ (Oksanen, 2011) der „R“ Umgebung für Statistik OTU basiert erstellt (R. Development, 2010). Dazu wurden die chemischen Parameter (in Tabelle 11) des Grubenwassers hinzugezogen. Das erste Cluster Dendrogramm der hierarchischen Cluster-Analyse (gekennzeichnet mit A) basiert auf Bray-Curtis Unähnlichkeiten der OTU Zusammensetzung aller Proben. Das zweite Cluster Dendrogramm der hierarchischen Cluster-Analyse (gekennzeichnet mit B) basiert auf der Euclidean Unähnlichkeitsmatrix mit standardisierten Umweltparametern und wurde mit dem Dendrogramm (A), basierend auf der OTU Verteilung, verglichen. Um innerhalb der NMDS-Diagramme das Potential der schwankenden Variablen zu erkennen, wurde ein „Vector-fitting“ auf Basis der Umweltparameter (Oksanen, 2010) angewendet und mittels Richtungspfeilen in die NMDS Koordinaten eingetragen. Die Visualisierung der Cluster von spezifischen Phyla wurde durch Einzeichnung von Streuungs-Ellipsen in die NMDS Diagramme, unter Nutzung der Standardabweichung der Spezies-Bewertungen, realisiert.

Die genannten Statistiken wurden in Kooperation mit Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig) durchgeführt.

### **3.13. Lichtmikroskopie**

Für die optische Charakterisierung der Eukaryonten auf den Objektträgern aus der Flusszelle wurde das Lichtmikroskop „Olympus BX 61“ verwendet. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Eukaryonten wurden mit einer 630-fachen oder 1000-fachen Vergrößerung und Phasenkontrast durchgeführt.

### **3.14. Darstellung der Biofilme**

#### ***3.14.1. Fixierung und Färbung der Biofilme***

Zur Färbung der Biofilmbestandteile mit Lektinen und Nukleinsäurefarbstoffen, wurden frische und fixierte Königstein-Biofilme aus Reaktor und Flusszelle verwendet. Die frischen Biofilme wurden in Greinerröhrchen mit Grubenwasser bei 4 °C gekühlt gelagert. Die anderen frischen Biofilme wurden 1:1 mit 3,7 %iger Paraformaldehyd (PFA) Lösung zwei Stunden bei 4 °C fixiert. Nach Entfernen der PFA-Lösung und Spülen mit steril filtriertem Grubenwasser, wurden die fixierten Biofilme in steril filtriertem Grubenwasser bei 4 °C gelagert und transportiert.

Alle verwendeten fluoreszierenden Lektine (EY Laboratories Inc., Vector Laboratories Inc., Sigma) waren TRITC oder FITC gelabelt und stammten aus dem Repertoire von Thomas Neu (UFZ Magdeburg). Die Übersicht mit den verwendeten Farbstoffen ist in Kapitel 4.5.1. in Tabelle 27 dargestellt. Zur Anfärbung der EPS (Lektin-Bindungs-Analyse) und der Nukleinsäure wurden die Biofilme mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Farbstoffen (100 µg/ml) benetzt, die anschließend 20 Minuten im Dunkeln einwirkten. Die Biofilm-Proben wurden anschließend drei Mal mit sterilfiltriertem Wasser gewaschen, um nicht gebundene Lektine abzuspülen.

#### ***3.14.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie***

Die gefärbten Biofilme wurden unter Nutzung eines TCS SP1 Konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Leica, Heidelberg, Germany) geprüft. Die folgenden in Wasser-versenkbaren Objektive wurden zur Beobachtung genutzt: 25wi, 0.95 und 63wi, 0.9. Emissionssignale wurden in folgenden Kanälen erfasst: Grün (Anregung, 488 nm; Emission, 500 bis 550 nm) für Syto9, SybrGreen, Fluorescein isothiocyanate (FITC)-, oder Alexa 488-gelabelte Lektine. Im roten Kanal (Anregung, 561 nm; Emission, 585 bis 625 nm) wurden mit Syto64, SyPro und mit Fm43\_1 gefärbte Komponente sowie Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)- gelabelte Lektine detektiert. Die mit Laser Scanning Mikroskopie (LSM)

aufgenommenen Datensätze wurden im „sequential“ Modus aufgenommen, um zu vermeiden, dass die Fluorochrome in anderen Kanälen detektiert werden (Zippel & Neu, 2011).

### 3.14.3. Digitale Bildbearbeitung

Zur Bearbeitung und Darstellung der aufgenommenen Bildausschnitte wurde das Softwareprogramm IMARIS V5.2 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) unter Verwendung der 3D trans, „Isosurface“, 3D pseudo, „xyz-Shadow“ und 3D ortho Einstellungen genutzt. Das heißt, die sequenziell aufgenommenen Bildausschnitte der Biofilme wurden zu XYZ-Projektionen eines 3-dimensiolen Bildes zusammengesetzt.

## 3.15. Mikrokosmen Experimente mit Hilfe von Biofilmen

### Laborversuche

Für die Laborversuche wurden Reaktor-Biofilme (Probe R9) aus dem Biofilm-Reaktor in Königstein entnommen und in Königstein Grubenwasser (pH = 3,0) und unter unterschiedlichen Bedingungen im Labor bei Raumtemperatur gelagert. Unterschiedliche Bedingungen wurden erreicht, indem eine variierende Anzahl an Reaktor-Biofilmen in einem Glas (Schott, 1L Flasche) gegeben wurde (1 Stück oder 12 Stück). Zu zwei Gläsern wurde Uran in Form von 1 mM Uranylнитrat ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ) gegeben (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Laborversuche mit Reaktor-Biofilmen**

Die Mikrokosmen-Experimente wurden in einem Zeitraum von 14 Tagen (336 Stunden) durchgeführt. In einem Zeitabstand von 24 h, wurde ein Biofilm bzw. Umgebungswasser entnommen und die Konzentration der Elemente Eisen, Arsen, Zink, Cadmium, Mangan, Nickel, Uran und Europium mittels ICP-MS (siehe Kapitel 3.5.) gemessen. Um die Konzentration der genannten Elemente in den Biofilmen messen zu können, wurden sie in Lösung gebracht. Dazu wurden die Biofilme in 10 ml 30 %iger Salpetersäure 12 Stunden geschwenkt. Zur Messung der Kationen im Umgebungswasser wurden die Proben mit Salpetersäure (10 µl/ml) angesäuert.

### *Feldversuche*

Die Feldversuche erfolgten in Königstein am *in-situ* Biofilm-Reaktor (siehe Abbildung 9). Dazu wurden jeweils 15 ml Grubenwasser vom Zu- und Abfluss des Reaktors entnommen (Probe W20) und die Elemente Eisen, Arsen, Zink, Cadmium, Mangan, Nickel, Uran und Europium nach Ansäuerung der Proben mit Salpetersäure (10 µl/ml) mittels ICP-MS (siehe Kapitel 3.5.) analysiert. Nachdem der Zufluss des Grubenwassers in den Reaktor für einen Zeitraum von 14 Tagen abgestellt wurde, und somit keine Durchmischung erfolgte sowie die Einspeisung von Grubenwasser ausblieb, erfolgten weitere Probenentnahmen von Zu- und Abfluss des Reaktors.



## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1. Beschreibung des untersuchten Grubenwassers durch Analyse der chemisch-physikalischen Parameter vor und nach der Flutung

Die chemisch-physikalischen Parameter des Grubenwassers Königstein am Förderbohrloch A und B (siehe Abbildung 7, Kapitel 3.1.) wurden regelmäßig (aller drei Tage) durch die Wismut GmbH analysiert. Die Mittelwerte der Messungen der Jahre 2009 bis 2013 sind in Tabelle 11 zusammengefasst. In den Jahren 2009 und 2010 waren die Stollen der 25 m Sohle des ehemaligen Bergwerkes (Beprobungsstrecke 390) noch zugänglich, die Ergebnisse der Jahre 2011 bis 2013 spiegeln die Werte nach Erhöhung des Flutungsstandes (bis 139,5 m üNN) in der Grube wieder.

#### *pH-Wert*

Der pH-Wert des Grubenwassers hat sich im Laufe der fünf analysierten Jahre kaum geändert und liegt bei einem Mittelwert von 3,0. Der niedrige pH-Wert des Grubenwassers ist zum einen durch die schwefelsaure Laugung zur Mobilisierung des Urans aus dem Erz begründet, zum anderen tragen oxidierende Mikroorganismen dazu bei, Schwefel-Verbindungen zu Sulfat (in Form von Schwefelsäure) zu oxidieren (Nordstrom, 1997) und somit den pH-Wert abzusenken. Sogenannte „Saure Grubenwässer“ bilden sich bei der weltweiten Gewinnung von Uranerz und weiteren metallischen Erzen (z.B. Kupfer, Eisen, Silber, Gold) sowie in Kohleminen durch mikrobielle Oxidation sulfidischer Erze oder durch schwefelsaure Laugung (Aguilera *et al.*, 2006, Fernandes, 2001, Underhill, 1998). In diesem extremen Habitat hat sich eine acidophile Lebensgemeinschaft gebildet, die an diese Bedingungen angepasst ist und die Bedingungen durch ihren mikrobiellen Stoffwechsel aufrechterhält. Nicht nur die Gemeinschaft der Mikroorganismen wird durch den pH-Wert beeinflusst, sondern auch die in diesem Habitat vorkommenden Metalle wie z.B. Eisen oder Mangan. Bei einem niedrigen pH-Wert (< 3,5) liegen diese gelöst und in reduzierter Form vor (z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ). Bei oxidierenden Bedingungen wird das saure Wasser durch mikrobielle Aktivität aufoxidiert und es entstehen  $\text{Fe}^{3+}$ -Verbindungen - und Minerale z.B. Schwertmannit und Jarosit. Ohne die Aktivität der Mikroorganismen, d.h. abiotisch, würde die Oxidation zu  $\text{Fe}^{3+}$  unter sauren Bedingungen sehr langsam ablaufen (Singer, 1970). Erhöht sich der pH-Wert (> 4,2) im Wasser, so läuft die chemische Oxidation unter oxidierenden Bedingungen schneller ab und gelöste Metall-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) werden abiotisch oxidiert (z.B. zu  $\text{Fe}^{3+}$  oder Fe(III)-oxyhydroxide). Dabei fallen Eisen-Minerale wie z.B. Ferrihydrit, Goethit und Hämatit im Wasser aus, weil die Verbindungen schwer löslich sind.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der gemessenen chemisch-physikalischen Parameter im Grubenwasser Königstein in den Jahren 2009 bis 2013, (Mittelwerte des entsprechenden Parameters des jeweiligen Jahres; analysiert durch die Wismut GmbH; n.b. = nicht bestimmt; n.n. = nicht nachweisbar).**

Parameter / Jahr	2009	2010	2011	2012	2013	Tendenz
Qf [m³/h]	238,3	211,0	185,0	115,7	112,2	↓
pH-Wert	3,2	3,2	3,3	3,0	3,0	
Redoxpotential [mV]	625,7	620,5	601,5	640,2	642,9	
Leitfähigkeit [mS/cm]	1,2	1,2	1,3	1,9	2,3	↑
O <sub>2</sub> [mg/l]	1,8	2,4	2,3	2,3	3,0	↑
Temperatur [°C]	13,9	13,9	13,5	14,0	13,8	
Na [mg/l]	20,0	24,7	32,8	67,2	108,3	↑
K [mg/l]	6,9	9,4	12,5	9,9	8,8	
Mg [mg/l]	8,8	9,3	8,0	10,9	15,4	↑
Ca [mg/l]	92,2	96,3	91,6	169,0	246,5	↑
Fe [mg/l]	68,6	52,0	52,1	85,1	56,2	
Mn [mg/l]	3,0	3,3	2,5	3,1	7,2	↑
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [mg/l]	1,5	1,9	1,7	2,2	2,8	↑
Cl <sup>-</sup> [mg/l]	18,9	24,6	28,4	79,1	140,3	↑
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	495,5	504,6	489,8	781,8	973,1	↑
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	n.n.	0,0	0,0	n.n.	n.n.	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,6	
o-PO <sub>4</sub> [mg/l]	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	
U [mg/l]	5,1	6,2	6,1	10,7	7,8	
N gesamt [mg/l]	n.b.	1,5	1,4	1,8	2,5	
P gesamt [mg/l]	n.b.	0,0	0,2	0,1	0,1	
TOC [mg/l]	0,9	0,3	0,8	1,0	0,3	
Zn [µg/l]	4897,5	4879,0	3517,5	4085,4	5859,6	↑
Sr [µg/l]	520,5	471,0	456,3	618,0	683,0	↑
As [µg/l]	62,5	46,0	62,8	99,3	70,8	
Ba [µg/l]	37,5	38,0	34,2	20,3	19,3	↓
Cd [µg/l]	22,4	45,2	19,5	56,1	73,4	↑
Co [µg/l]	178,0	144,0	114,7	167,0	181,0	
Cr [µg/l]	n.b.	24,1	16,3	29,7	35,5	↑
Cu [µg/l]	66,0	37,7	6,9	33,7	41,0	
Ni [µg/l]	385,0	298,3	242,5	354,8	454,1	↑
Pb [µg/l]	75,5	281,7	79,2	356,8	304,0	
Ce [µg/l]	92,3	117,0	87,7	111,0	143,5	↑
Eu [µg/l]	1,8	2,3	1,5	2,5	3,1	
Ra226 [mBq/l]	10200,0	10900,0	11450,0	8285,0	6950,0	↓
Ra223 [mBq/l]	5800,0	7100,0	10100,0	7600,0	5900,0	
Ra228 [mBq/l]	170,0	300,0	260,0	205,0	260,0	
Ra224 [mBq/l]	780,0	950,0	970,0	915,0	840,0	
<b>gesamt</b>	<b>16950,0</b>	<b>19250,0</b>	<b>22780,0</b>	<b>17005,0</b>	<b>13950,0</b>	

### *Redoxpotential und Sauerstoffkonzentration*

Der Oxidationszustand der Eisen-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ist neben dem pH-Wert auch vom Redoxpotential abhängig (Uhlmann, 2001). Das Redoxpotential des Grubenwassers, das das Konzentrationsverhältnis von oxidierten und reduzierten Stoffen beschreibt, kann zwischen +800 mV (stark oxidierendes Milieu) und -300 mV (stark reduzierendes Milieu) variieren. Im Grubenwasser Königstein schwankte das Redoxpotential in den letzten fünf Jahren nur geringfügig zwischen 600 und 645 mV (siehe Tabelle 11), so dass konstant oxidierende Bedingungen herrschten. Die Grube Königstein wurde bisher nicht vollständig geflutet (bis Flutungspegel von 139,5 mm üNN) und somit dissoziiert  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  durch die angrenzende Luftschicht bzw. durch ständige Wasserzufuhr durch die Bohrlöcher (Wasserzufuhr: 120 m<sup>3</sup>/h durch Bohrloch 4, 120 m<sup>3</sup>/h durch Bohrlöcher 1/2) ins Grubenwasser. Daher lag der Sauerstoffgehalt im Grubenwasser Königstein in den letzten fünf Jahren zwischen 1,6 und 2,9 mg/l. Einen großen Anteil der Sauerstoffkonzentration im Grubenwasser nehmen oxidierende Verbindungen z.B. Sulfat ein. In Bezug auf die Mikroorganismen lässt das Redoxpotential auf eine oxidierende mikrobielle Gemeinschaft als dominante Gruppe schließen. Unter Tage erfährt das Grubenwasser unter dem Flutungspegel von 139,5 m üNN keine Durchmischung mit Luftsauerstoff und nach Aufbrauchen des Sauerstoffs durch mikrobielle Prozesse könnten sich anoxische Zonen ausbilden. Die Ausbildung einer Reduktionszone, wie es bei Schadstoff-belastetem Grundwasser als Folge von Abbauprozessen organischer Substanzen (Lewandowski, 1997) der Fall ist, ist in Königstein aufgrund ständiger Wasserzu- und abfuhr nicht zu erwarten. Somit sind strikt anaerobe Mikroorganismen z.B. methanogene Archaea in diesem Habitat nicht zu erwarten, denn sie benötigen neben einem niedrigen Redoxpotential (Zinder, 1993) anaerobe Bedingungen für ihr Wachstum.

### *Leitfähigkeit*

Die durchschnittlichen Werte der elektrischen Leitfähigkeit im Grubenwasser Königstein lagen zwischen 1,2 und 2,2 mS/cm, wobei das Grubenwasser eine konstante Temperatur von etwa 14 °C aufwies. Die Parameter der Leitfähigkeit, die über >750  $\mu\text{S}/\text{cm}$  liegen, deuten auf stark anthropogen beeinflusstes Wasser hin (Kunkel, 2002). Der Anstieg der Leitfähigkeit von 2009 bis 2013 (um ca. 83 %) ist im zunehmenden Flutungspegel der Grube und somit in der Auswaschung von Ionen aus dem Erz begründet.

Neben den beschriebenen unterschiedlichen chemisch-physikalischen Wasserparametern wurden die Konzentrationen verschiedener Kationen und Anionen im Grubenwasser der letzten fünf Jahre bestimmt, die ebenfalls in Tabelle 11 zusammengefasst sind. Aufgrund der hohen Anzahl an analysierten chemischen Parametern werden nur einige ausgewählte Parameter, in Bezug auf die Geochemie und die mikrobielle Gemeinschaft, betrachtet.

*Eisen*

Eisen-Ionen und andere Eisen-Verbindungen, die durch den sauren pH-Wert aus dem Erz herausgelöst wurden, kamen im Verlauf der letzten fünf Jahre als Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen im Grubenwasser mit einer durchschnittlichen Gesamt-Konzentration von 51 bis 85 mg/l vor (siehe Tabelle 11). In Gewässern mit niedrigem Sauerstoffgehalt können sich Eisen-Ionen z.B. aus angrenzenden Gesteinen/Erzen lösen. Das im sauerstoffarmen Grubenwasser enthaltene zweiwertige Eisen wird bei Sauerstoff- bzw. Luftzufuhr und niedrigen pH-Wert (< 3,5) unter Einfluss Eisen-oxidierender Bakterien in dreiwertige Eisenverbindungen oxidiert und fällt als Fe(III)-oxid-hydrat (Schwertmannit - rötlich-braun bzw. Jarosit - gelb) aus. Bei diesem Vorgang können auch andere im Grubenwasser enthaltene Schwermetalle (Pb, Zn, Mn) als Anionen mit ausgefällt (sorbiert) werden (Sasaki, 2003).

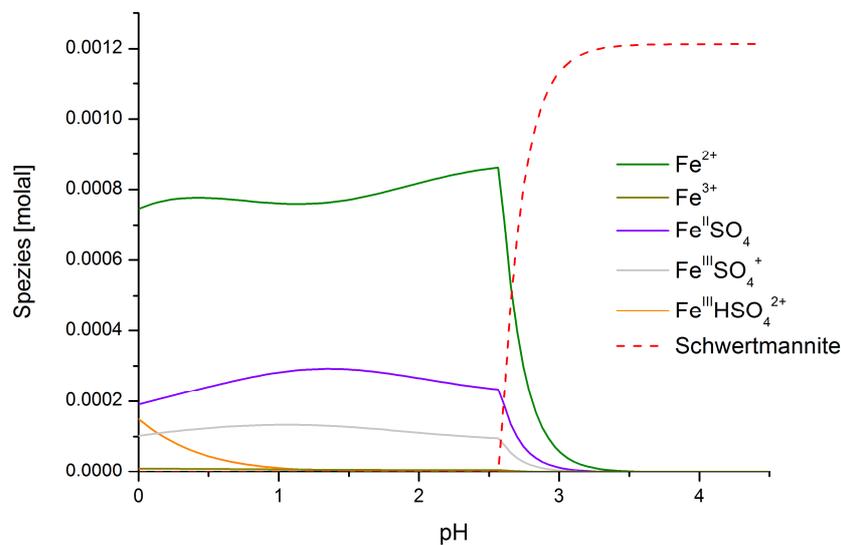
Die Zusammensetzung des Eisens im Grubenwasser Königstein bei einem pH-Wert von 3,0 wurde von der Wismut GmbH analysiert und ist in Tabelle 12 abgebildet. Dabei liegen 70 % des Gesamt-Eisens gelöst als zweiwertiges Eisen im Wasser vor, 30 % als dreiwertige Eisen-Ionen (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Eisens und deren Anteil am Gesamt-Eisengehalt.**

Parameter	Wert	Einheit	Anteil von Fe_gesamt [%]
Fe_gesamt	73,5	mg/l	
Fe(II)	51,5	mg/l	70,1%
Fe(III)	22,0	mg/l	29,9%

Die Eisen-Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Eisens in Abhängigkeit des pH-Wertes ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Erstellung der Speziationsdiagramme ist in Kapitel 3.6. beschrieben. Die Abbildung 13 zeigt deutlich, dass das Grubenwasser bis zu einem pH-Wert von 2,6 von freien Fe<sup>2+</sup>-Ionen (grüne Kurve) mit einer Molalität von 0,75 mmolal dominiert wird und bestätigt die Zusammensetzung des Eisen, die in Tabelle 12 gezeigt wurde. Weitere zweiwertige Eisenspezies liegen als Eisensulfat-Verbindungen (Fe<sup>II</sup>SO<sub>4</sub>, violette Kurve) mit einem Gehalt von 0,2 mmolal vor, die durch Reaktion von Eisen aus dem Gestein mit Schwefelsäure entstanden sind. Dreiwertige Eisen-Verbindungen, die mit 0,1 mmolal im Grubenwasser als Fe<sup>III</sup>SO<sub>4</sub><sup>+</sup> (Abbildung 13, graue Kurve) im Wasser enthalten sind, machen den größten Anteil der dreiwertigen Eisenverbindungen aus. Ab einem pH-Wert von 2,5 fallen Eisen-Ionen durch Bildung eines Schwertmannit-Mineral (Fe<sub>16</sub><sup>3+</sup>[O<sub>16</sub>|(OH)<sub>10</sub>|(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>] x 10 H<sub>2</sub>O) aus, welcher bei einem pH-Wert von 3,0 gesättigt ist. Ab einem pH-Wert von 3,0 dominiert Schwertmannit mit 1,2 mmolal. Die anderen Eisen-Verbindungen sind dabei nur noch mit einer Konzentration von weniger als 0,1 mmolal im Grubenwasser enthalten. Durch den hohen Eisen(II)-gehalt und die oxidierenden Bedingungen im Grubenwasser lässt sich vermuten, dass säureliebende Eisenbakterien hier einen Lebensraum finden, indem sie Eisen(II)-Ionen zu

Eisen(III)-Ionen oxidieren, was zur Schwertmannit-Bildung beiträgt bzw. Eisen(III)-Ionen aus der Schwertmannit-Verbindung reduziert.



**Abbildung 13: Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Eisens als Funktion des pH-Wertes.**

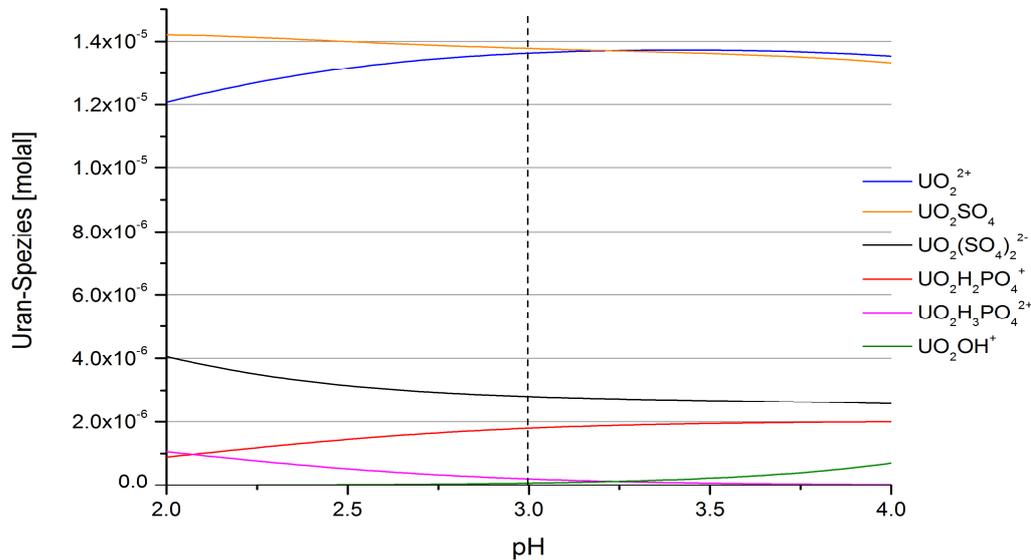
#### Schwefel/Sulfat

Das Grubenwasser des Standortes Königstein ist infolge von Sulfidoxidation durch schwefelsaure Laugung mit einem hohen Sulfatgehalt zwischen 495 und 505 mg/l vor der Flutung und zwischen 538 und 842 mg/l nach der Flutung (siehe Tabelle 11) charakterisiert. Der Schwefel ist fast vollständig in Sulfat-Ionen gebunden. Die höheren Sulfatkonzentrationen nach der Flutung sind auf die Rücklösung der Schwefel-Ionen aus dem Gestein zurückzuführen und lassen auf die Aktivität von Schwefel-oxidierenden Mikroorganismen schließen, die Sulfid-Ionen und reduzierte Schwefel-Verbindungen zu Sulfat-Ionen oxidieren (Bos, 1983). Natürlich können „Saure Grubenwässer“ nur durch Kopplung von abiotischer und mikrobieller Oxidation sulfidischer Minerale entstehen, die die Ansäuerung des Milieus bewirken und weitere Schwermetall-Ionen aus dem Gestein/Erz (z.B. Uranyl-sulfat, Eisensulfat) lösen. Beide Prozesse müssen dabei zusammenwirken. Eine rein abiotische Oxidation, d.h. ohne die speziellen Mikroorganismen, verläuft etwa 10.000 mal langsamer (Gleisner, 2005).

#### Uran und Radium

Das Grubenwasser wurde Säure-induziert mit dem radioaktiven Schwermetall Uran zwischen 5,1 mg/l (2009) und 10,7 mg/l (2012) angereichert (siehe Tabelle 11). Die Schwankungen der Uran-Konzentration in den einzelnen Jahren sind auf die unterschiedlichen Flutungspegel zurückzuführen. Bei saurem pH-Wert (3,0) und Sauerstoff-Anwesenheit liegt Uran im Grubenwasser größtenteils gelöst als mobile sechswertige Uranspezies  $\text{UO}_2\text{SO}_4$  und  $\text{UO}_2^{2+}$  vor (siehe Speziationsdiagramm in Abbildung

14, orange und blaue Kurve) (Arnold, 2011). In geringer Konzentration sind weitere sechswertige Uran-Spezies z.B.  $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$  (Abbildung 14, schwarze Kurve) und  $\text{UO}_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$  (Abbildung 14, rote Kurve) im Grubenwasser vorhanden.



**Abbildung 14: Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Urans als Funktion des pH-Wertes.**

Erst bei Absinken des Sauerstoffgehaltes und Einstellung von anaeroben Bedingungen im Wasser oder der Anwesenheit von reduzierenden Mikroorganismen würden sechswertige Uranverbindungen reduziert und als unlösliche vierwertige Uranverbindungen immobilisiert (Lovley, 1991b, Veeh, 1967).

Uranisotope gehen, im Rahmen der natürlichen Zerfallsreihen, über Tochternuklide letztlich in die stabilen Blei-Isotope  $^{207}\text{Pb}$  und  $^{206}\text{Pb}$  über. Als aktive strahlende Tochterelemente des Uranzerfalls gelten z.B. das Uranisotop  $^{234}\text{U}$ , die Radiumisotope  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  und  $^{223}\text{Ra}$  sowie die Radonisotope  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{220}\text{Rn}$  und  $^{219}\text{Rn}$  (Schwab, 1987). Die Radioaktivität des Grubenwassers wird somit größtenteils durch die Tochternuklide des Uranzerfalls hervorgerufen. Steigt der Uran-Gehalt an, erhöht sich auch die Konzentration der Tochternuklide, sofern sich ein radioaktives Gleichgewicht eingestellt. In Tabelle 11 ist ersichtlich, dass im Jahr 2012 der durchschnittlich höchste Urangehalt der letzten fünf Jahre gemessen wurde. Das korreliert mit dem Blei-Gehalt, der im gleichen Jahr ebenfalls die höchste Konzentration aufwies. Für die Radium-Isotope kann dieser Zusammenhang im Grubenwasser Königstein nicht nachgewiesen werden. Radium war im Vergleich zu Uran ein Kontaminant mit geringer Konzentration im Grubenwasser. Eine Ursache dafür könnte die geringere Halbwertszeit der Radiumisotope, im Vergleich zu den Uranisotopen, sein. Das Wasser wies eine Aktivität aller Radiumisotope zwischen 14 Bq/l (2013) und 23 Bq/l (2011) auf, was einer Konzentration von 0,0004 bis 0,0006  $\mu\text{g/l}$  entspricht.

### *Spurenelemente*

Neben Schwermetallen wie z.B. Uran und Eisen wurden zusätzlich Spurenelemente wie Zink, Mangan, Kobalt, Chrom, Nickel sowie Arsen im Grubenwasser Königstein nachgewiesen. Auch in anderen ehemaligen Bergbaugebieten wurden erhöhte Mengen an Eisen, Kobalt, Arsen, Cadmium und Chrom in den abfließenden Wässern gemessen (Aguilera et al., 2006). Der Anstieg des Ionengehalts nach der Flutung für Natrium, Magnesium, Calcium, Mangan, Chlor, Cadmium, Blei und Strontium ist im Vergleich zu den Werten vor der Flutung auf den fortschreitenden Flutungsprozess (Ende des Jahres 2010) und folglich mit einer Zunahme der gelösten Ionen aus den neu gefluteten Gesteinsschichten, zu begründen.

### *Phosphor, Stickstoff, Kohlenstoff*

Die Elemente Phosphor, Stickstoff und Kohlenstoff waren in geringen Konzentrationen in Grubenwasser nachgewiesen wurden. Phosphor ist essentiell für den Energiestoffwechsel (ATP) und war mit einer Konzentration von  $< 0,3$  mg/l im Grubenwasser vorhanden. Stickstoffverbindungen in Form von Ammonium wurden mit Konzentrationen zwischen 1,5 mg/l (2009) und 2,4 mg/l (2013) im Grubenwasser gemessen. Nitrit und Nitrat wiesen dagegen geringe Konzentrationen von  $< 0,2$  mg/l auf. Der durchschnittliche Gehalt des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) im Grubenwasser Königstein ist in Tabelle 11 dargestellt und reichte von 0 mg/l (2011) bis maximal 1,1 mg/l (2013). Kohlenstoffverbindungen in Form von Huminstoffen, organischen Säuren, Kohlenhydraten bis hin zu Aminosäuren stellen für Mikroorganismen einen wichtigen Energielieferanten dar. Dabei kann der Kohlenstoff in unterschiedlicher Form in wässrigen Systemen vorliegen: gelöst, partikulär, organisch oder anorganisch z.B. als  $\text{CO}_2$  bzw.  $\text{HCO}_3^-$  oder  $\text{CO}_3^{2-}$  (Uhlmann, 2001). Da Phosphor, Stickstoff, und Kohlenstoff-Verbindungen wichtig und notwendig für die Zellstruktur der Mikroorganismen (RNA, DNA, Phospholipide) (Giri, 2005) und somit auch limitierende Faktoren sind, könnte man aufgrund deren geringen Konzentrationen mit einer geringen Zellzahl rechnen.

Durch zurückliegende Sprengarbeiten zur Urangewinnung wurden zusätzlich Bestandteile von Sprengstoffen z.B. Nitrotoluol-Verbindungen in sehr geringen Mengen im Grubenwasser nachgewiesen (1-2  $\mu\text{g/l}$ ). Sie stellen zwar auch eine Kohlenstoffquelle dar, jedoch sind diese Nitrotoluole durch ihre aromatische Struktur nicht optimal für Mikroorganismen verfügbar.

Durch den geringen Gehalt an Kohlenstoffverbindungen im Grubenwasser steht dieser als Energielieferant für den Stoffwechsel der Mikroorganismen nur sehr begrenzt zur Verfügung. Diese Erkenntnis lässt auf eine stark autotroph geprägte Mikrobengemeinschaft schließen, die alternative Energiequellen (S/N/Fe-Verbindungen) nutzen. Insbesondere chemoautotrophe Mikroben können

ihre Energie durch Umsetzung von anorganischem Stoffen zum Aufbau ihrer Baustoffe nutzen z.B. Schwefel-oxidierende Bakterien und einige Methanbildner (Stanier, 1986).

## 4.2. Quantifizierung der Mikroorganismen

### 4.2.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaften mittels CARD-FISH

Die Methode der „Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In-situ Hybridization“ (CARD-FISH) ermöglicht kulturunabhängig und ohne Polymerasekettenreaktion (kurz PCR) die Zusammensetzung einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft quantitativ zu erfassen. Der Vorteil gegenüber der FISH-Methode ist, dass die CARD-FISH Methode durch die Thyramid-Signalamplifikation unabhängig vom Ribosomengehalt der Mikroorganismen ist. Auch Mikroorganismen mit einem geringen Ribosomengehalt, bis hin zum Nachweis der Sondenbindung an eine 16S rRNA je Zelle, sind detektierbar (Braissant, 1998). Es können auch Mikroorganismen nachgewiesen werden, die sich in Entwicklungsstadien mit geringer Stoffwechselaktivität befinden, wie es in nährstoffarmen Milieus wie z.B. dem Grubenwasser Königstein der Fall ist.

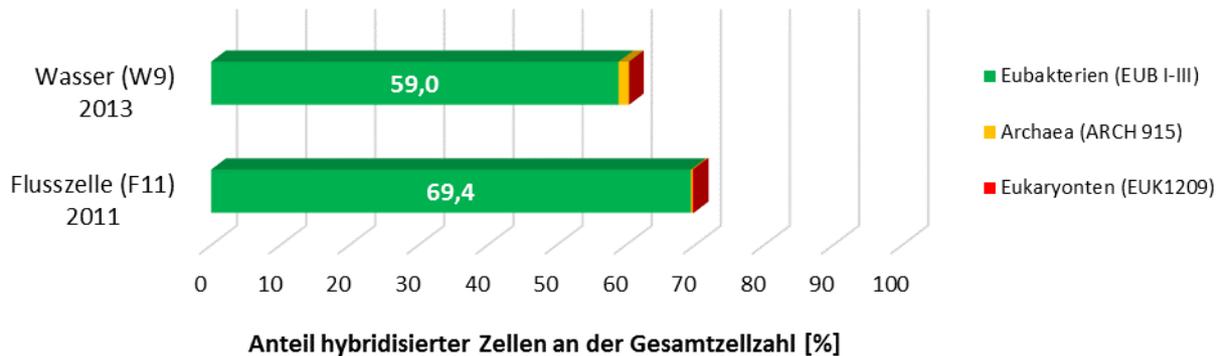
#### 4.2.1.1. Universelle Sonden

Für eine Aussage über die allgemeine Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft mittels CARD-FISH wurde das Sondengemisch EUB338 I bis III für die Erfassung aller Eubakterien, das gleichzeitig ein Indiz für die Hybridisierbarkeit einer Probe ist, die Sonden Arch915 (Archaea) und EUK1209 (Eukaryonten), sowie die Sonde NONEUB (Negativkontrolle) verwendet (siehe Abbildung 15). Mit der Sonde NONEUB wurde die Hintergrundfluoreszenz detektiert. Die errechneten Durchschnittswerte aus diesen Zählungen wurden von den Mittelwerten der Zählungen aller anderen Sonden abgezogen.

Die Verteilung der drei Domänen Bacteria, Archaea und Eukarya in den Wasser- und Biofilmprouben der Grube Königstein ist in Abbildung 15 dargestellt. Dabei waren die Biofilmprouben aus der Flusszelle besser hybridisierbar als die planktonischen Mikroorganismen aus den Wasserproben. Aus den Biofilmprouben der Flusszelle konnten die Bakterien mit einem Anteil von ca. 69 % von der Gesamtzellzahl hybridisiert werden, aus den Wasserproben ca. 59 %. Bakterien heften vorzugsweise an Oberflächen bzw. an andere Mikroorganismen an, daher stellen Biofilme die bevorzugte Lebensform v.a. für Bakterien dar. Planktonische Zellen im Grubenwasser können aus anderen Gesteinsschichten gespült worden sein und können aufgrund des sich verschiebenden Milieus und wechselnden Nahrungsangebots nicht stoffwechselaktiv oder tot sein. So ist es nicht verwunderlich, dass die Zellen im Biofilm besser hybridisierbar sind als die planktonischen Zellen im Grubenwasser.

Zudem wurde im Biofilm ein größeres Volumen an Grubenwasser durch die Flusszelle geleitet als das analysierte Volumen Grubenwasser und die darin lebenden planktonischen Zellen.

Die Abundanzen für Archaea betragen durchschnittlich 1,5 % im Wasser und 0,3 % im Biofilm der Flusszelle. Eukaryonten-Zellen wurden mit der entsprechenden Sonde im Wasser und im Biofilm mit < 0,2 % hybridisiert. Die Standardabweichungen betragen für das Eubakterien-Sondengemisch ca. 9,9 %, für die Archaea ca. 1,3 % und Eukarya ca. 0,4 % (hier nicht gezeigt).



**Abbildung 15: Hybridisierungssignale für die Domänen Eubakterien, Archaea und Eukaryonten des Grubenwassers (W9) und der Biofilme aus der Flusszelle (F11).**

Die Summe der Abundanzen, ermittelt mit dem Eubakteriensondengemisch, der Sonde für Archaea und der Sonde für Eukaryonten sollte theoretisch ca. 100 % hybridisierbare Zellen ergeben. Das war sowohl für die Biofilm-Probe (69,8 %), als auch für die Wasserprobe (60,5 %) nicht zutreffend (Abbildung 15). Der Grund der unzureichenden Hybridisierbarkeit beider Proben ist auf Eisen-Ablagerungen, die mikroskopisch zu erkennen waren, zurückzuführen und verhinderte somit das Eindringen der Sonden in die Zellen. Auch Clusterbildung einiger Bakterien, die durch Homogenisation der Proben nicht vollständig vereinzelt werden konnten, könnte eine Ursache für das Hybridisierungsergebnis sein. Denn der Grat zwischen Homogenisierung der Probe und Zerstörung der Zellen ist sehr schmal. Eine weitere Ursache für eine Hybridisierung < 100 % ist die unzureichende Erfassung aller Bakteriengruppen mit den EUB338-Sonden. Es werden nur 77 % der Datenbankeinträge der Eubakterien in der Datenbank „Ribosomal Database Project“ (RDP) [10] mit der universellen Sonde EUB338 I erfasst. Mit der EUB338 I Sonde werden die Stämme Proteobacteria (75 %), Nitrospira (61 %), Firmicutes (85 %) und Actinobacteria (86 %) laut RDP Datenbank nicht umfassend detektiert, die womöglich einen großen Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft in den zu untersuchenden Proben ausmachen. Die im EUB-Sondengemisch zusätzlich verwendeten Sonden EUB338 II und III detektieren spezifisch, die von EUB338 I nicht erfassten Bakterien-Gruppen, Planctomyces (35 %, EUB II) und Verrucomicrobia (74 %, EUB III) sowie Chloroflexi (12 %, EUB III). Diese Bakterien-Gruppen machen höchstwahrscheinlich einen sehr geringen Anteil in der mikrobiellen Gemeinschaft aus. Das lässt

darauf schließen, dass in den untersuchten Königstein-Proben Bakterien existieren, die mit dem genutzten EUB I-III-Sondengemisch nicht detektiert werden konnten.

Die ARCH-Sonde zur Quantifizierung der Archaea in der Probe erkennt 62 % der Archaea Datenbankeinträge (RDP, probe match). Die EUK1209-Sonde zur Detektion von Eukaryonten erfasst 85 % Eukaryonten Datenbankeinträge der SILVA Datenbank [11]. Archaea und Eukaryonten machen jedoch im Wasser und im Biofilm nur einen kleinen Anteil aus (Abbildung 15).

Die Ergebnisse weisen möglicherweise auf ein höheres Artenreichtum v.a. für Eubakterien hin, als es mit den Sonden erfasst werden konnte. In vergleichbaren „acid mine drainage“ Lebensräumen wiesen die Sonden für die Domäne Bacteria gegenüber Archaea und Eukarya ebenfalls höhere Abundanzen auf. Die sauren Minen „Frasassi cave“ in Italien (pH 0-1) und die Schwefel Mine „Cae Coch“ in Wales (pH 1,8-2,3) wurden mit einer deutlichen Dominanz von Eubakterien gegenüber der Gruppe der Archaea mittels FISH-Analyse beschrieben (Johnson, 2012), vergleichbar mit den CARD-FISH Ergebnissen aus Königstein.

#### 4.2.1.2. Spezifische Sonden

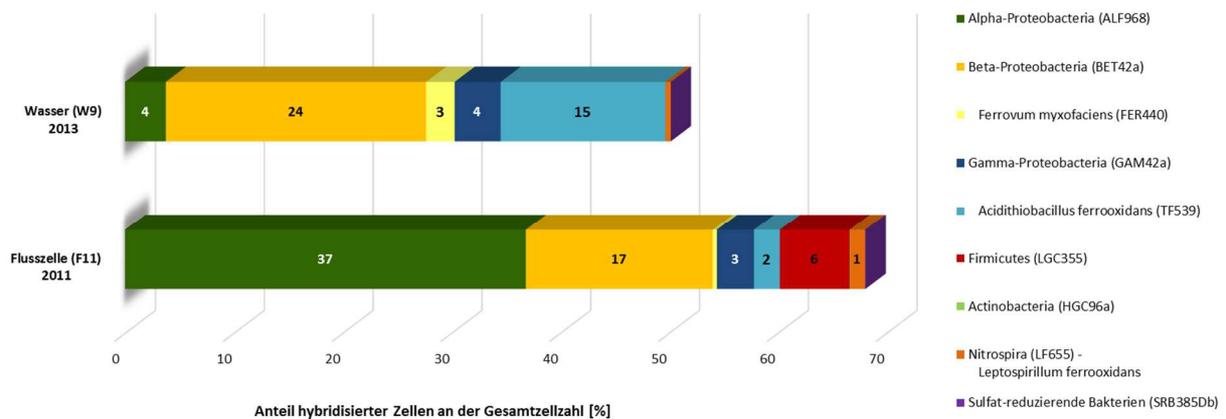
Neben den universellen Sonden zur Detektion der Domänen Eubacteria, Archaea und Eukarya, wurden spezifische Sonden zur Erfassung einzelner phylogenetischer Gruppen verwendet, um die mikrobielle Lebensgemeinschaft detaillierter zu charakterisieren. Der Einsatz von spezifischen Sonden für einzelne phylogenetische Gruppen der Domänen Archaea und Eukarya war nicht sinnvoll, da die Hybridisierungsergebnisse mit den universellen Sonden gering ausfielen (< 1,5 %; Abbildung 15). Die Hybridisierungsergebnisse mit den spezifischen Sonden für Archaea und Eukarya würden noch geringer ausfallen bzw. wären nicht zählbar. Letztendlich wurden spezifische Sonden ausschließlich für verschiedene Bakteriengruppen (phylogenetische Gruppen, funktionelle Gruppen und einzelne Gattungen) ausgewählt (siehe Tabelle 4, Kapitel 3.7.3.).

Die mittels CARD-FISH ermittelte Zusammensetzung der Bakterien variierte wie zu erwarten zwischen Biofilm- und Grubenwasser-Probe der untersuchten Jahre 2011 und 2013 und diente lediglich zur Abschätzung der relativen Anteile der phylogenetischen Gruppen in den beiden Proben-Arten (Biofilm und Grubenwasser) und Probenjahren (2011 und 2013). Zur detaillierten Charakterisierung der Spezies wurde daher die Pyrosequenzierung nach 16S- und 18S rRNA basierten Techniken im Anschluss an die CARD-FISH Analyse angewendet.

Ammonium-oxidierende Bakterien, *Desulfovibrio*, *Gallionella ferruginea* und Chloroflexi wurden mit den in Tabelle 4 genannten Sonden in keiner Königstein Probe nachgewiesen.

*Planktonische Zellen*

Insgesamt wurden im Grubenwasser (W9) vier phylogenetische Gruppen mittels CARD-FISH analysiert. Bei Betrachtung der Abbildung 16, in der der prozentuale Anteil hybridisierter Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl dargestellt ist, werden die planktonischen Zellen im Wasser (W9) im Jahr 2013 von Beta-Proteobakterien (27 %) (siehe Abbildung 16, hellgelb + dunkelgelb) dominiert. Die Beta-Proteobakterien wurden mit Hilfe der BET42a-Sonde hybridisiert, die 32 % der Beta-Proteobakterien und 3 % der Gamma-Proteobakterien Datenbankeinträge (SILVA, testprobe) erfasst. Neben den Beta-Proteobakterien war die Gruppe Gamma-Proteobakterien (Abbildung 16, hellblau + dunkelblau) die zweite dominierende Bakterienpopulation mit 20 % in der Wasserprobe (siehe Abbildung 16, hellblau + dunkelblau). Die Sonde GAM42a erfasst 49 % der Gamma-Proteobakterien Datenbankeinträge (Silva, testprobe). Alpha-Proteobakterien machen dagegen nur einen geringen Anteil (4 %) im Grubenwasser (W9, siehe Abbildung 16, grün) aus. Die Analyse des Detektionspektrums der Alpha-Proteobakterien Sonde (ALF968) zeigt eine Abdeckung von 45 % der in der rdp Datenbank hinterlegten Alpha-Proteobakterien Sequenzen. Neben dem geringen Detektionspektrum erfasst die ALF968-Sonde zusätzlich 14 % der Klasse Delta-Proteobacteria und 44 % des Phylums Fibrobacteres durch Ausbildung unspezifischer Bindungen.



**Abbildung 16: Mittels CARD-FISH ermittelte Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft der Prokaryonten mit den Biofilm-Proben (2011) aus der Flusszelle und dem Grubenwasser (2013). Verwendete Sonden: ALF968 (Alpha-Proteobakterien), BET42a (Beta-Proteobakterien), GAM42a (Gamma-Proteobakterien), LGC355 (gram positive Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt), HGC69a (gram positive Bakterien mit hohem G+C Gehalt), TF539 (Acidithiobacillus ferrooxidans), FER440 (Ferrovum myxofaciens), LF655 (Leptospirillum species der Nitrospira Gruppe) und SRB (Sulfat-reduzierende Bakterien).**

*Biofilm*

Insgesamt konnten sechs phylogenetische Gruppen mit den ausgewählten Sonden im Biofilme der Flusszelle (F11) nachgewiesen werden. Es dominierten im Analysejahr 2011 die Alpha-Proteobakterien mit 37 %. (Abbildung 16, grün) und nahmen somit ungefähr die Hälfte der hybridisierbaren

Bakterienzellen im Biofilm (69 %) ein. In der Biofilm-Probe spielten die Beta-Proteobakterien mit 17 % (Abbildung 16, gelb) als zweite dominierende Gruppe neben den Alpha-Proteobakterien eine große Rolle, die fast ein Drittel der gesamten Bakterien darstellten. Im Biofilm der Flusszelle machten die Gamma-Proteobakterien im Vergleich zu Alpha- und Beta-Proteobakterien einen kleineren Teil (5 %, Abbildung 16, dunkelblau + hellblau) aus. Die Gruppe der Firmicutes, die mit der Sonde LGC355 erfasst wurde und 35 % der Firmicutes-Datenbankeinträge (RDP, probe match) beinhaltet, konnte nur in der Biofilm-Probe der Flusszelle (2011) nachgewiesen werden. Die Firmicutes-Gruppe wurde im Biofilm mit 6 % hybridisiert (Abbildung 16, rot). Die HGC96a-Sonde, die 45 % der Actinobacteria Datenbankeinträge (Silva, testprobe) detektiert, hatte zu einem sehr geringen Anteil (< 1 %, Abbildung 16, hellgrün) im Biofilm (2011) die entsprechenden Zellen gebunden. Im Wasser (2013) wurden dagegen keine Zellen der Actinobacteria hybridisiert.

Die Spezies *Leptospirillum ferrooxidans*, *Ferrovum myxofaciens*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* sowie die funktionelle Gruppe der Sulfat-reduzierenden Bakterien, die Desulfurikanten aus verschiedenen phylogenetischen Gruppen enthalten, wurden durch spezifische Sonden zur Detektion einzelner Spezies hybridisiert.

Für den Nachweis der Nitrospira-Gruppe wurde die Sonde LF655 genutzt, die 29 % der Nitrospira Dateneinträge (RDP, probe match) erfasst. Die Sonde LF655 erfasst 88 % der *Leptospirillum* Spezies, darunter hauptsächlich *Leptospirillum ferrooxidans* und *Leptospirillum ferriphilum* (RDP, probe match). Die Spezies *Leptospirillum ferrooxidans*, enthält ausschließlich *Leptospirillum*-Arten, die aerobe acidophile Eisen-oxidierende Arten sind und zum industriellen Bioleaching genutzt werden (Sand, 1999). Hinsichtlich der vorkommenden *L. ferrooxidans* in Königstein war die Abundanz im Biofilm (2011) höher (1,3 %) als im Wasser 2013 (0,5 %) (siehe Abbildung 16). Der Anteil der Nitrospira sollte wahrscheinlich höher liegen, als der hier ermittelte, da keine Sonde eingesetzt wurde, die alle Klassen des Phylums Nitrospira erfasst.

Die Sonde FER440 erfasst 0,1 % der unklassifizierten Beta-Proteobakterien (RDP, probe match), wozu neben zahlreichen unkultivierten Beta-Proteobakterien auch die Eisen-oxidierende Art *Ferrovum myxofaciens* gehört (Johnson, 2014). Die Spezies *Ferrovum myxofaciens* war mit 0,4 % im Biofilm (2011) und mit 2,6 % im Wasser (2013) enthalten (siehe Abbildung 16, hellgelb). In den CARD-FISH Analysen und DNA-basierten Sequenzierungen vor dem Flutungsprozess waren *F. myxofaciens* in den Biofilmen dominant (siehe Abbildung 5, Kapitel 1.7.). Der detaillierte Vergleich der bakteriellen Biodiversität vor und nach der Flutung der Grube wird in Kapitel 4.3.8. diskutiert.

Mit der Sonde TF539 werden etwa 76 % der Gattung *Acidithiobacillus* Datenbankeinträge (RDP, probe match) erfasst. Dabei werden neben den Arten *Acidithiobacillus ferrooxidans* eine Reihe von unkultivierten *Acidithiobacilli* und *Acidithiobacillus ferrivorans* der RDP Datenbankeinträge erfasst.

Arten der Gattung *Acidithiobacillus* gehören zu den acidophilen Vertretern der Schwefel- und Eisenoxidierenden Bakterien, die zur Sulfat-Bildung beitragen. Die daraus entstehende Ansäuerung der Umgebung fördert den sogenannten Bioleaching-Prozess (Sreekrishnan, 1993). Acidithiobacilli selbst tolerieren hohe Säurekonzentrationen bis zu einem pH Wert von 1,0 (Plumb *et al.*, 2008). Die Vertreter *Acidithiobacillus ferrooxidans* decken im Untersuchungsort Königstein zu einem großen Anteil die Gamma-Proteobakterien in der CARD-FISH ab. Die *A. ferrooxidans* stellten im Biofilm (2011) mit 2,4 % knapp 70 % der gesamten Gamma-Proteobakterien im Biofilm dar. Im Grubenwasser (2013) sind die *A. ferrooxidans* mit einem Anteil von 15,1 % (Abbildung 16, hellblau) vertreten und haben einen Anteil von 78 % der gesamten vorkommenden Gamma-Proteobakterien im Grubenwasser.

Aufgrund der hohen Sulfatgehalte im Grubenwasser Königstein (vgl. Tabelle 11, Kapitel 4.1.) wurde mittels der Sonde SRB385Db überprüft, ob Sulfat-reduzierende Bakterien im Grubenwasser enthalten sind. Die Sonde erfasst zahlreiche Vertreter unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen, die Sulfat dissimilatorisch verwerten können und ermittelt einen großen Anteil der Deltaproteobacteria, die mehrere Sulfat-reduzierende Gruppen enthalten, z.B. 63 % der Desulfuromonadales und 42 % der Desulfobacterales. Außerdem werden weitere Gruppen z.B. Chlorobi (27 %), Nitrospira (10 %), Chloroflexi (6,6 %), Proteobakterien (3,4 %), Acidobacteria (1,6 %), Firmicutes (1,6 %) und Actinobacteria (3,5 %) unspezifisch erfasst (RDP, probe match). Desulfurikanten verbergen sich nicht nur in der Gruppe der Deltaproteobacteria, sondern kommen über den Stammbaum verteilt auch z.B. in den Gruppen Firmicutes (Desulfotomaculum, Desulfosporosinus) und Nitrospira (Thermodesulfovibrio) vor. Im Biofilm (2011) war eine geringe Anzahl (< 1 %) hybridisierter SRB-Signale detektiert worden (siehe Abbildung 16, violett) und weist somit auf Sulfat-reduzierende Bakterien im Biofilm hin. Unter den planktonischen Zellen im Grubenwasser (2013) konnten mittels CARD-FISH Analyse keine Sulfatreduzierer nachgewiesen werden.

Extreme Acidophile sind innerhalb der drei Domänen Bacteria, Archaea und Eukarya weit verbreitet (Johnson, 2009). Innerhalb der Domäne Bacteria sind die extremen Acidophilen hauptsächlich in den Phyla Proteobacteria (Alpha, Beta und Gamma Klassen), Nitrospira, Firmicutes, Actinobacteria, und Acidobacteria vertreten (Johnson, 2012), vergleichbar mit den Ergebnissen der Königstein Proben. Innerhalb dieser Gruppen variieren die dominierenden Spezies abhängig von der Temperatur, pH-Wert, und den chemischen Parametern (Johnson, 2012). In vergleichbaren Habitaten: Richmond Mine (Iron mountain), Frasassi cave, Drei Kronen/Ehrt Mine, Cae Coch Mine und Mynydd Parys Mine (Johnson, 2012, Schrenk, 1998) korrelierte die dort gefundene Bakteriengemeinschaft mit den Ergebnissen der bakteriellen Zusammensetzung in dieser Arbeit. Ähnlich wie im Grubenwasser Königstein dominierten Spezies der Domäne Bacteria das Milieu. In den drei Minen Frasassi, Cae Coch und Mynydd Parys waren *Acidithiobacillus ferrooxidans/ferrovorans/thiooxidans* dominant. In den

Minen Drei Kronen/Ehrt Mine und Richmond Mine überwiegen *Leptospirillum spp.* und *Ferroplasma myxofaciens*. In der Wasser-Probe (W9) der Königstein Mine waren die Spezies *Ac. ferrooxidans* und *F. myxofaciens* vor *Leptospirillum ferrooxidans* (siehe Abbildung 16) dominant. Damit stellt die Königstein Mine ein weiteres Habitat für extrem Acidophile dar und ist vergleichbar mit den genannten Habitaten mit ähnlichen chemischen Parametern (saurer pH Wert und hoher Schwermetallgehalt).

Um konkrete, statistisch gesicherte Aussagen zum Zusammenhang von mikrobieller Zusammensetzung und Probenart bzw. Probenjahres treffen zu können, müssten weitere CARD-FISH Analysen mit Königstein-Proben in verschiedenen Jahren und mit unterschiedlichen Probenarten durchgeführt werden. Die CARD-FISH Ergebnisse sind eine Abschätzung der mikrobiellen Gemeinschaft, da methodische Fehler z.B. nicht 100 % ige Spezifität der Sonden, unzureichende Permeabilisierung oder Hemmung des Eindringens der Sonden in die Zelle durch inhibitorische Substanzen zu Ungenauigkeiten führen können. Weiterhin können Abspülungen der Proben vom Objektträger während der Waschschriffe oder Sonden, die unspezifisch an Eisenbestandteile binden (Hintergrundfluoreszenz) Gründe für Verschiebungen der mikrobiellen Biozönose sein. Ein weiterer Selektionsgrund sind die ausgewählten Sonden für verschiedene Phyla und Gattungen, die keinesfalls vollständig die existierende Lebensgemeinschaft abdecken. Um die Ergebnisse der CARD-FISH Methode zu unterstützen, wurden weitere kultivierungsunabhängige Methoden z.B. Pyrosequenzierung hinzugezogen. Der Vergleich der Ergebnisse der Methoden CARD-FISH und Pyrosequenzierung ist in Kapitel 4.3.2. beschrieben.

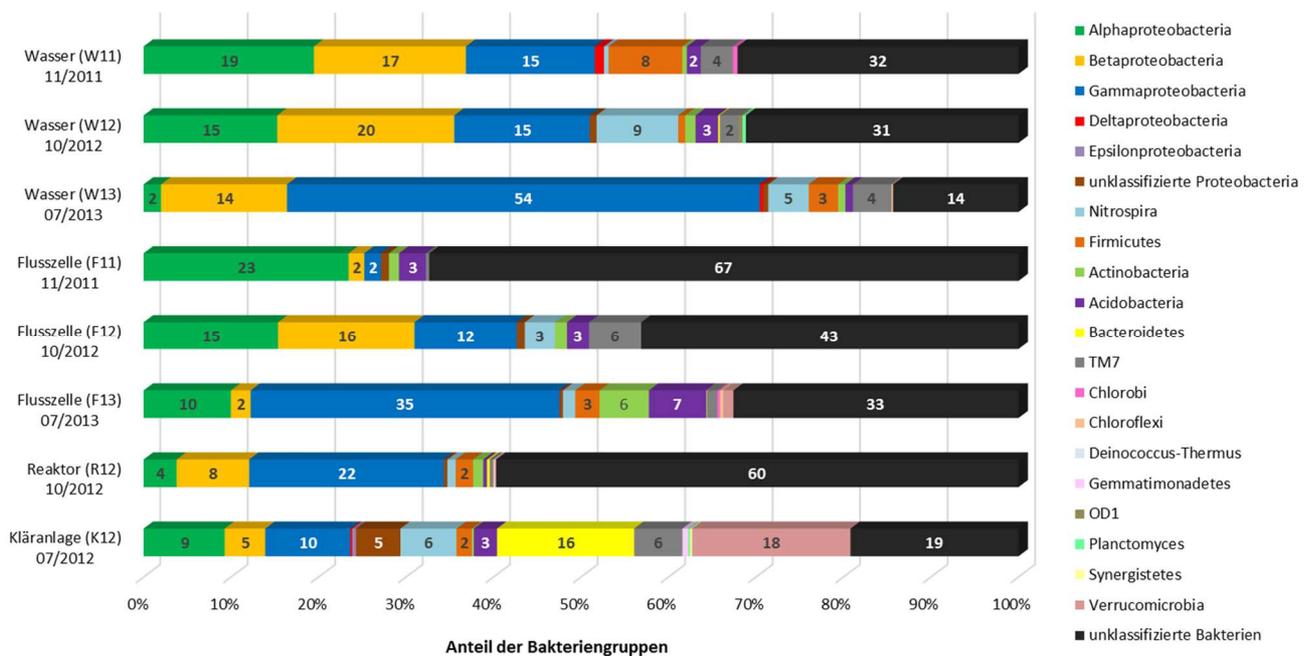
### 4.3. Charakterisierung der Prokaryonten

#### 4.3.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Bakterien durch molekular-biologische Methoden

Mit CARD-FISH konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft zwischen den Probenarten- und jahren unterscheidet. Jedoch konnte die Biozönose der Mikroorganismen in den ausgewählten Königstein-Proben nicht vollständig dargestellt werden. Mit der kultivierungsunabhängigen Methode der Pyrosequenzierung kann im Gegensatz zur CARD-FISH eine Charakterisierung der gesamten mikrobiellen Vielfalt erfolgen, die mit den gewählten Primersystemen (siehe Kapitel 3.10.8.) nachweisbar sind. Mit der Generierung einer Sequenzdatenbank sollten nun die Dynamiken der mikrobiellen Populationen auf das Vorhandensein oder Fehlen einzelner phylogenetischer Gruppen zurückzuführen sein. Es sollte untersucht werden, in wieweit die mikrobielle Lebensgemeinschaft im Grubenwasser abhängig von den chemischen Parametern im Grubenwasser, der Probenart und des Probenahmezeitraums variiert. Für die Durchführung der Pyrosequenzierung wurde je eine Probe des Grubenwassers der Jahre 2011, 2012

und 2013 ausgewählt und mit den Biofilm-Proben der Flusszelle (2011, 2012 und 2013) und des Reaktors (2012) verglichen.

Die Methode der Pyrosequenzierung wurde ausgewählt, da im Gegensatz zur Sequenzierung ein Vielfaches an Sequenzen (mindestens 200-fach mehr) ohne den Zwischenschritt der Klonierung generiert werden kann (Chowdhury, 2012). Nach der direkten Sequenzierung der zuvor amplifizierten V3-V4-Region der Eubakterien 16S rDNA wurden insgesamt für das Wasser 190 (W11-2011), 504 (W12-2012), 5.081 (W13-2013), für die Flusszelle 781 (F11-2011) 436 (F12-2012), 12.021 (F13-2013) und für den Reaktor 453 (K12-2012) und 953 (R12-2012) Sequenzen erhalten. Die Sequenzen wurden, entsprechend der Angaben im Kapitel 3.11.2., bearbeitet, um qualitativ hochwertige Sequenzen zu erhalten. Der relative Anteil der ermittelten phylogenetischen Gruppe je Sequenzbibliothek ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Wasser- und Biofilmproben (Flusszelle und Reaktor) der Königstein Grube in den Jahren 2011, 2012 und 2013 nach DNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.**

Sofort ersichtlich ist der große Anteil an unklassifizierten Bakterien (Abbildung 17, schwarz), der je nach Probe zwischen 14 % und 67 % beträgt. Diese Sequenzen konnten keiner bisher bekannten Bakteriengruppe zugeordnet werden. Den höchsten Anteil nicht klassifizierbarer möglicherweise unbekannter Sequenzen zeigten die Resultate der Biofilme aus der Flusszelle, insbesondere der Probe F11 im Jahr 11/2011 (Abbildung 17, schwarz). In den Biofilm-Proben (Flusszelle und Reaktor) konnten durchschnittlich weniger Sequenzen einer Bakterien-Gruppe zugeordnet werden im Vergleich zu den

Wasser-Proben. Daraus ergibt sich, dass in allen Biofilm-Proben im Mittelwert 51 % und in den Wasser-Proben 26 % unklassifizierte Sequenzen auftreten.

Nach Auswertung der Pyrosequenzierung konnten die Sequenzen in 19 unterschiedliche Phylotypen (ohne nicht klassifizierte Bakterien) eingeordnet werden. Dabei wurden die Sequenzen innerhalb einer Probe zu höchstens 7 bis 15 Phylotypen zugeordnet. Im Vergleich mit ähnlichen „Sauren Grubenwässern“, bei denen die Zahl der Phylotypen zwischen 4 und 28 liegt (Baker, 2003), ordnet sich die Anzahl der Phylotypen im Grubenwasser Königstein im mittleren Bereich ein. Die Anzahl der Phylotypen in den Wasserproben stieg innerhalb der Jahre von 2011 bis 2013 (10; 12; 13) an. In den Flusszell-Biofilmen erhöhte sich die Anzahl der Phylotypen (7; 8; 15) ebenfalls innerhalb des Zeitraumes von 2011-2013 mit Zunahme des Biofilm-Alters. Die meisten Phylotypen wurden deshalb in den Proben vom Juli 2013 (15 in Flusszelle-F13; 13 im Wasser-W13) erfasst, die wenigsten im Jahr 2011. Die Anzahl der Phylotypen der Reaktorprobe R12 nimmt eine Sonderstellung ein, da der Reaktor-Biofilm durch die Phylotypen des Kläranlagen-Biofilms, der auf den Reaktor-Trägern zur besseren Anheftung der Grubenwasser Bakterien diente, beeinflusst wurde. Bei dem Kläranlagen-Biofilm wurden 16, bei dem Königstein-Biofilm 13 Phylotypen unterschieden.

Unter Nicht-Berücksichtigung der unklassifizierten Bakterien schwankten die dominierenden Phylotypen innerhalb der zugeordneten Sequenzen zwischen Alpha-Proteobakterien im Jahr 2011 (Wasser und Flusszelle), Beta-Proteobakterien im Jahr 2012 (Wasser und Flusszelle) und Gamma-Proteobakterien im Jahr 2013 (Wasser und Flusszelle). Die Proben des Reaktors des Jahres 2012 wurden, anders als die Proben von Wasser und Flusszelle des Jahres 2012, von Gamma-Proteobakterien dominiert (Abbildung 17, blau). Der Anteil an Alpha-Proteobakterien nahm im Lauf der untersuchten Jahre von 2011 bis 2013 stetig ab, der Anteil an Gamma-Proteobakterien dagegen stieg zu. Die detaillierten Häufigkeiten der bakteriellen Zusammensetzung bis hin zur Gattung sind in den Tabellen A10 bis A12 im Anhang zusammengefasst.

Besonders häufig innerhalb der Gamma-Proteobakterien war in allen untersuchten Proben die Gattung *Acidithiobacillus*, in einigen Proben war der Anteil der *Acidithiobacilli* sogar dominierend, z.B. im Wasser (W13) 07/2013. Insgesamt waren im Wasser (2011-2013) durchschnittlich mehr (22 %) *Acidithiobacillus* Spezies gefunden worden, als im Durchschnitt (4 %) in den Biofilm Proben (Reaktor und Flusszelle 2011-2013). Dagegen wurden in den Biofilm-Proben (14 %) im Mittel mehr unklassifizierte Gamma-Proteobakterien detektiert, im Vergleich zu den Wasser-Proben (7 %). Da „acid mine drainage“ Umgebungen oft mit hohen Konzentrationen an Schwermetallen einhergehen, sind die Mikroorganismen mit Metall- und Säuretoleranz angepasst. Die Vertreter der Gattung *Acidithiobacillus* sind typische Bewohner der „acid mine drainage“ Habitats (Duquesne, 2003) und oft sogar dominant in diesen extremen Umgebungen (Leduc, 2002). Die acidophile und chemolithotrophe

Art *A. ferrooxidans*, die von Deneff (Deneff, 2010) schon im Labor kultiviert wurde, ist resistent gegenüber hohen Schwermetallkonzentrationen (Duquesne, 2003) und oxidiert Eisen(II)- oder reduzierte Schwefelverbindungen (Mahmoud, 2005). *A. ferrooxidans* wird als wichtigste Spezies im Hinblick auf die Zersetzung von metallischen Erzen und die Oxidation von Eisen-Spezies in AMDs betrachtet. Zudem wird die Entstehung einer AMD größtenteils durch den Anteil von *A. ferrooxidans* und *L. ferrooxidans* beeinflusst (Long, 2003, Nordstrom, 1997). Weiterhin, zu den Gamma-Proteobacteria gehörend, konnten in sehr geringen Anteilen (< 1 %) Legionellen ausschließlich in den Flusszellen der Jahre 2012 und 2013 detektiert werden. Legionellen sind bisher mit AMDs weniger in Zusammenhang gebracht worden, da sie neutrophile (pH 6,8-7,0) chemoorganotrophe Bakterien sind und in feuchten Umgebungen vorkommen: sowohl in natürlich vorkommenden Habitaten z.B. in Feuchtgebieten, Böden, Weihern, Flüssen oder in durch den Menschen künstlich hergestellten Umgebungen z.B. Ventilationssystemen und Verdunstungskondensatoren (Hao, 2010). Jedoch wurde in der Studie von Hao (Hao, 2010) von Legionellen in AMD aus einer Sulfid Mine in China berichtet. Die Autoren dieser Studie stellten dabei die These auf, dass das Auftreten der Legionellen mit den dort gefundenen Ciliaten und den Amöben-Populationen gekoppelt war. Denn Legionellen sind bekannt für ihre Standhaftigkeit gegenüber Verdauung und ihrer Fähigkeit sich innerhalb Vakuolen von Amöben und Ciliaten zu replizieren. Dabei lebten die Legionellen in einer endosymbiotischen Gemeinschaft mit diesen Eukaryonten Zellen (Murga, 2001). Durch diese Art des "Versteckens" in eukaryotischen Wirten konnten die Legionellen in diesen extremen AMD Umgebungen überleben (Hao, 2010). In Kapitel 4.4.1 wird auch die Zusammensetzung der Eukaryonten im Königstein Grubenwasser beschrieben, wobei Einzeller (v.a. Amöben) unter den identifizierten Eukarya waren. Ob diese Gemeinschaft zwischen Legionellen und Einzellern im Habitat Königstein existiert, ist nicht untersucht worden, aber denkbar, aufgrund der extremen Bedingungen, unter denen Legionellen normalerweise nicht überleben könnten.

Innerhalb der Alpha-Proteobakterien (Abbildung 17, grün) waren in allen Königstein-Proben Vertreter der Gattung *Acidocella* zu finden. Besonders häufig waren sie planktonisch im Wasser in den Jahren 2011 (4 %) und 2012 (5 %) beobachtet worden. *Acidocella spp.* sind heterotrophe mesophile Bakterien, die hohe Säure- und Metallkonzentrationen (z.B. Zink, Nickel, Cadmium, Kupfer) tolerieren (Ghosh, 1997). Sie sind in der Lage Eisen (III) zu Eisen(II) zu reduzieren und somit Eisen(III)-Minerale (auch in Form von Schwertmannit) umzuwandeln (Jones, 2013). *Acidocella spp.* wirken den Eisen-oxidierenden Bakterien *Acidithiobacillus ferrooxidans* entgegen. Zusätzlich wies das Wasser im Jahr 2013 (07/2013) Gattungen der Alpha-Proteobacteria auf, die in den Jahren zuvor im Wasser nicht nachgewiesen wurden: *Azospirillum*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, und *Telmatospirillum*. Vereinzelt kamen *Rhodoblastus*, *Methylocystis* und *Hyphomicrobium* in den Biofilmen der Flusszelle und des Reaktors vor, aber nicht in den Wasserproben. Die genannten Gattungen sind keine typischen Vertreter

mikrobieller Lebensgemeinschaften in sauren Grubenwässern, trotzdem wurden einige von ihnen schon in sauren Milieus nachgewiesen z.B. anaerobe *Rhodoblastus spp.* in sauren Feuchtgebieten (Imhoff, 2001), *Sphingomonas spp.* im sauren metallhaltigen Fluss RioTinto (Lopez-Archilla *et al.*, 2001), Stickstoff-fixierende *Azospirillum spp.* in einer sauren Kupfermine (Yang, 2008) und acidotolerante fakultativ anaerobe *Telmatospirillum spp.* (Sizova, 2007). Die eher in neutralen Gewässern und Böden lebenden *Methylocystis spp.* (Dedysh, 2001) und *Methylobacterium spp.* (Dedysh, 2011) sowie denitrifizierende *Hyphomicrobium spp.* (Sperl, 1971) können Methanol, Methan oder Methylamin-Verbindungen verwerten.

Die Klasse der Beta-Proteobacteria war, wie schon erwähnt, im Jahr 2012 am häufigsten in den Königstein-Proben zu finden, in den Wasserproben häufiger als im Biofilm (Abbildung 17, gelb). Auffällig ist die geringe Anzahl an Beta-Proteobacteria in den Flusszellen der Jahre 2011 (F11) und 2013 (F13). Neben zahlreichen unklassifizierten Beta-Proteobacteria spielt auch die Gattung *Thiomonas* innerhalb der Beta-Proteobacteria eine Rolle in allen Proben. *Thiomonas spp.* gehören zu den extrem acidophilen (Johnson, 1998a) mixotrophen Schwefel-oxidierenden Bakterien, die aus sauren Wässern einer Kupfermine in Norwegen isoliert wurden (Johnson, 2001). Deren Fähigkeit Schwefel-Verbindungen zu Sulfat zu oxidieren und folglich die Ansäuerung des Milieus beschleunigt den Prozess des Bioleachings in der Königstein Mine, indem metallische Verbindungen aus dem Erz gelöst/gewonnen werden.

Die Klasse der Delta-Proteobacteria (Abbildung 17, rot) spielt eine untergeordnete Rolle, denn der Anteil an Delta-Proteobacteria (<1 %) an der gesamten Sequenzanzahl ist im Gegensatz zu den anderen genannten Klassen der Proteobakterien gering. Einige Vertreter der Delta-Proteobacteria mit den Gattungen *Desulfatirhabdium*, *Desulfurella* und *Geobacter* sind ausschließlich im Jahr 2013 des Wassers (W13) und der Flusszelle (F13) gefunden worden. Erstmals wurden Delta-Proteobacteria als AMD Vertreter in der Richmond Mine (Bond, 2000) nachgewiesen. Seitdem wurden Delta-Proteobacteria in sauren Habitaten häufig gefunden, vor allem in anoxischen oder anaeroben Zonen. In anaeroben Sedimenten der „acid mine drainage“ Anhui (China) stellen sie sogar die dominierende Gruppe dar (Hao, 2006). Innerhalb der Delta-Proteobacteria befindet sich ein Großteil der Schwefel/Sulfat-reduzierenden Bakterien, die neben Sulfat Metalle wie z.B. Mangan und Uran reduzieren können (Chang, 2001). *Desulfurella spp.* (Schwefelreduzierer) und *Desulfatirhabdium spp.* (Sulfatreduzierer), die zu den Desulfurellaceae und Desulfobacteraceae gehören, sind anaerobe Bakterien (Balk, 2008, Bonch-Osmolovskaya, 1990) und beeinflussen den Schwefelkreislauf, indem sie aus Schwefel/Thiosulfat bzw. Sulfat  $H_2S$  bilden. *Desulfurella spp.* sind zudem thermophile Bakterien (Bonch-Osmolovskaya, 1990). Ein Bakterium, welches U(VI) als einzigen Elektronenakzeptor nutzen kann und dabei auch Wachstum zeigt, ist *Geobacter metallireducens* der Geobacteraceae (Lovley,

1991b). Die DNA von *Geobacter spp.* wurde mit nur einer Sequenz im Biofilm F13 (07/2013) in der Königstein Grube nachgewiesen. *Geobacter spp.* sind vorrangig anaerobe Eisen-reduzierende Bakterien und leben bei einem neutralen pH-Wert, wurden jedoch auch schon in „Sauren Grubenwässern“ nachgewiesen (*G. sulfureducens*, (Rahman, 2014)). Ob die DNA-Sequenz der Gattung *Geobacter* im Grubenwasser Königstein von einem stoffwechselaktiven acidophilen *Geobacter sp.* stammt, ist nicht bekannt.

Eine weitere hoch abundante Gruppe stellte der Stamm der *Nitrospira*, insbesondere im Wasser (W12) und der Flusszelle (F12) im Jahr 2012, besonders der Gattung *Leptospirillum*, dar (Abbildung 17, hellblau). Alle *Leptospirillum* Spezies (v.a. *L. ferrooxidans*, *L. ferriphilum*) sind autotrophe Eisenoxidierer und typische Bakterien in sauren Minenwässern und Bioleaching Systemen (Bond, 2000, Druschel, 2004, Sand, 1992). *Leptospirillum spp.* können bei höheren Temperaturen (> 30°C) und niedrigeren pH-Werten (< pH 2) wachsen, im Vergleich zum autotroph wachsenden Eisen-oxidierenden *Acidithiobacillus* (Baker, 2003). Im Grubenwasser Königstein tragen *Leptospirillum* Arten dazu bei, die im Wasser gelösten oder im Eisenerz vorliegenden Fe(II)-Ionen als Elektronendonator mit Hilfe von Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu Eisen(III)-Verbindungen zu oxidieren und treiben somit die Eisenfreisetzung aus dem Gestein/Erz voran.

Sequenzen mit Homologie zu Firmicutes (Abbildung 17, dunkel-orange) wurden in vielen Proben (außer im Biofilm der Flusszelle (F11) 2011 und (F12) 2012) gefunden. Im Jahr 2013 (Flusszelle und Wasser) sind die Anteile der Firmicutes am höchsten, wobei besonders die Gattungen *Desulfosporosinus*, *Desulfitobacterium* und *Clostridia* vorkommen. Weiterhin stimmen die Sequenzen mit *Sulfobacillus*-, *Thermodesulfobium*- und *Ethanoligenens*-Datenbankeinträgen in den Proben des Jahres 2013 überein und kommen dort vereinzelt vor. Der Vertreter *Turcibacter* des Stammes Firmicutes kam nur in der Sequenzdatenbank des Reaktor-Biofilms (R12; 10/2012) vor, der Vertreter *Alicyclobacillus* dagegen nur im Wasser (W13) des Jahres 2013. Der prozentuale Anteil an Firmicutes in allen Wasserproben ist in der Summe größer als in den Biofilm-Proben der Flusszelle und des Reaktors. Nach Proteobacteria und *Nitrospira* gehören einige Vertreter der Firmicutes ebenfalls zu den extremen Acidophilen (Johnson, 2012). Innerhalb der Firmicutes zählen die im Königstein Grubenwasser gefundenen Schwefel- und Eisen-oxidierenden Bakterien *Sulfobacillus spp.* dazu (Johnson, 1998a). *Sulfobacillus spp.* sind typische Bakterien saurer Minenwässer z.B. in der Cae Coch Schwefelmine in Wales (Johnson, 2012), in der Frasassi Cave in Italien (Macalady, 2007) und in der Richmond Mine in Kalifornien (Bond, 2000). Die fakultativ heterotrophen *Sulfobacillus spp.* nutzen reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronendonator und werden in die Gruppe der gram-positiven *Alicyclobacillaceae* eingeordnet, ebenso wie *Alicyclobacillus*. Obwohl *Alicyclobacillus spp.* keine typischen Bewohner von AMD Habitaten sind, wurden sie schon in ähnlichen Umgebungen mit extrem

niedrigem pH-Wert und hohen Metallkonzentrationen gefunden (Guo, 2009, Johnson, 2007, Lopez-Archilla *et al.*, 2004). Die Spezies *Alicyclobacillus ferrooxidans* ist als Schwefel- und Eisen-oxidierende Art bekannt (Jiang, 2008). Andere Vertreter von *Alicyclobacillus* sind z.B. thermo-acidophile, Sporenbildende, heterotrophe Organismen und leben bei einem pH-Wert zwischen 2 und 6 (Guo, 2009, Jiang, 2008, Johnson, 1998a). Obwohl die meisten *Alicyclobacillales* thermoacidophile sind und in sauren heißen Quellen z.B. im Yellowstone National Park (USA) (Guo, 2009, Mavromatis *et al.*, 2010) leben, können einige Spezies z.B. *Alicyclobacillus tolerans*, *Alicyclobacillus disulfidooxidans*, und *Alicyclobacillus ferrooxidans* nicht nur Eisen, sondern auch Schwefel und Sulfid oxidieren (Dufresne, 1996, Jiang, 2008, Kovalenko, 1983). Außerdem wurden *Alicyclobacillus* Spezies schon in sauren Kupferminen gefunden (Guo, 2009, Johnson, 2007) und scheinen gegenüber einigen Metallen eine Toleranz entwickelt zu haben.

Die in Königstein nachgewiesenen zu den Firmicutes gehörenden *Desulfosporosinus spp.*, *Desulfitobacterium spp.* und *Thermodesulfobium spp.* sind Bakterien, die bei pH 3 metabolisch aktiv sind (Kimura, 2006, Ñancuqueo, 2012). Sie zeichnen sich durch die Funktion der Sulfatreduktion aus, indem sie Sulfat/Thiosulfat als Elektronenakzeptor nutzen. In verschiedenen sauren metallhaltigen Habitaten, wie z.B. dem RioTinto in Spanien (Sánchez-Andrea, 2012) wurden sie bereits im Sediment als anaerobe Acidophile nachgewiesen. In den Königstein Proben sind die genannten Arten *Desulfosporosinus*, *Desulfitobacterium*, *Thermodesulfobium*, *Alicyclobacillus* und *Sulfobacillus* mit einem geringen Anteil von jeweils < 1 % gefunden worden. Ursache ist die fehlende anoxische Zone im oxidierenden Milieu des Grubenwassers, in der reduzierende Firmicutes Vertreter eine Nische finden würden.

Der Stamm *Acidobacteria*, der vorher schon in anderen AMD Habitaten (Hallberg, 2003, Yang, 2008) identifiziert wurde, war in allen Königstein-Proben vertreten (Abbildung 17, violett), insbesondere Sequenzen, die Homologien zur Gattung *Geothrix* aufwiesen. Hierbei siedelten sich mehr Vertreter in den Biofilmen (vor allem in den Flusszelle-Proben) an, als im Wasser in Form von planktonischen Zellen detektiert worden sind. Die anaeroben Eisen-reduzierenden *Geothrix spp.* (Coates, 1999, Klueglein *et al.*, 2013) könnten in den Biofilmen der Flusszelle anoxische/anaerobe Zonen ausgenutzt haben, die sich im ständig durchmischten Grubenwasser unter Tage nicht ausbildeten. Insbesondere in der Langzeitbox (F13 im Jahr 2013), die 17 Monate mit einer sehr geringen Flussrate mit Grubenwasser durchströmt wurde, hatte sich die höchste Anzahl *Geothrix spp.* auf den Objektträgern angesiedelt. Auch weitere Vertreter der *Acidobacteria* wurden schon in sauren Minen identifiziert z.B. *Acidobacterium capsulatum* (Kishimoto, 1991), die jedoch in den Königstein Proben nicht nachgewiesen wurden. Im vergleichbaren Milieu der Mynydd Parys Kupfer-Mine (Nord-Wales) wurde mittels 16S rDNA Sequenzierung eine Vielzahl an *Acidobacteriaceae* identifiziert (Johnson, 2012).

Acidobacteria sind acidophil, psychrotolerant, heterotroph, leben bei niedrigen pH-Werten (3.0–7.5) und bei einem breiten Temperaturspektrum (2–33 °C), passend zu den Bedingungen im Königstein Grubenwasser (pH ~ 3; Temperatur ~ 14°C).

Bei der Gruppe der Actinobacteria (Abbildung 17, hellgrün) ist der Anteil, wie bei den Acidobacteria, im Biofilm ebenfalls höher im Vergleich zum Anteil im Wasser. In allen Proben dominierten unklassifizierte Actinobacteria den Stamm. Zusätzlich konnte im Reaktor-Biofilm (R12; 10/2012) eine Sequenz mit Homologie zu *Mycobacterium spp.* gefunden werden. Im unterirdischen sauren Fluss der Mynydd Parys Kupfer-Mine (Nord-Wales), in der schon eine Reihe Acidobacteria als Acidophile nachgewiesen wurden, konnten auch Actinobacteria identifiziert werden (Johnson, 2012). Innerhalb der Actinobacteria befinden sich einige acidophile heterotrophe Eisen-oxidierende Bakterien z.B. *Ferromicrobium acidophilus* oder die moderat thermophilen *Acidimicrobium ferrooxidans* (Johnson, 1997), die nicht explizit in der Königstein Mine nachgewiesen wurden. Unter den unklassifizierten Actinobacteria könnten sich durchaus weitere acidophile Eisenoxidierer verbergen.

Die hoch abundante Gruppe TM7 war mittels Pyrosequenzierung in allen Probenahmestellen mit einem Anteil zwischen 0,4 % (Reaktor (R12)-10/2012) und 6 % (Flusszelle (F12)-10/2012) nachgewiesen worden. Außer in der Probe F12 wurde in den Biofilmen durchschnittlich ein geringerer Anteil an TM7 detektiert als in den Wasserproben. Sequenzen der TM7 wurden schon in diversen Habitaten wie z.B. Böden, Rhizosphäre, Grundwasser, Meerwasser, Sedimenten im Meer oder in der menschlichen Mundhöhle (Hugenholtz, 2001) detektiert. Auch in „Sauren Grubenwässern“ von Anhui (China) wurde TM7 bereits als abundante Gruppe nachgewiesen (Hao, 2006). Die genaue Funktion und der Einfluss auf die Geochemie des Grubenwassers sind nicht bekannt.

Alle anderen, in den Königstein Proben detektierten, Stämme Chlorobi (Gattung Ignavibacterium), Chloroflexi (Gattungen: Thermosporothrix und Sphaerobacter), Gemmatimonadetes (Gattung Gemmatimonas), OD1, Planctomyces (Gattung Singulisphaera) und Verrucomicrobia (Gattung Prosthecobacter) machten weniger als 1 % der identifizierten Sequenzen aus und werden deshalb hier nicht näher diskutiert, da sie höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Chemie des Grubenwassers haben. Die genannten Gruppen sind bisher nicht mit „acid mine drainage“ Habitaten in Zusammenhang gebracht wurden. Auffällig bei den eben genannten weniger abundanten Gruppen ist, dass sie vorwiegend im Jahr 2013 zu finden waren bzw. in der Probe des Reaktor Biofilms 2012.

Drei Gattungen, die nur im Biofilm des Reaktors (R12) vorkamen, waren Terrimonas (Bacteroidetes), Gemmatimonas (Gemmatimonadetes) und Rhodanobacter (Gamma-Proteobacteria) und wurden mit einem Anteil < 1 % nachgewiesen (siehe Tabelle A12, Anhang). Die genannten Gattungen stammen aus

dem Kläranlagen-Biofilm (K12), der, wie zu erwarten, aufgrund neuer Umweltbedingungen durch die Grubenwasser Bakterien innerhalb von 3 Monaten verdrängt wurde (siehe Abbildung 17).

#### *4.3.1.1. Auswirkung des Biofilm-Alters auf die mikrobielle Zusammensetzung*

Die Biofilm-Proben (Flusszelle und Reaktor) unterscheiden sich neben dem Jahr (2011-2013) und der Art der Probe (Flusszelle, Reaktor) zusätzlich durch das Alter der Biofilme. Nach 3 Monaten (Reaktor-R12), 5 Monaten (Flusszelle-F11), 8 Monaten (Flusszelle-F12) und 17 Monaten (Flusszelle-F13) wurden die Biofilme beprobt (siehe Tabelle 1-Probennahmen). Je länger die Biofilm-Systeme mit dem Grubenwasser durchströmt wurden, desto mehr Grubenwasser-Mikroorganismen konnten sich an den Objektträger-Oberflächen anheften. Das spiegelt sich in der Anzahl der Phylotypen wieder, die mit dem Alter der Biofilme zunahm. Es wurden zudem verschiedene Gattungen ausschließlich in den 17 Monate alten Biofilm-Proben (Flusszelle F13) gefunden: *Geothrix*, *Desulfitobacterium*, *Ethanoligenens*, *Thermodesulfobium* und *Geobacter* (vgl. Tabelle A11 im Anhang), die sonst in keiner anderen Probe nachgewiesen wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es einen Zusammenhang zwischen der Diversität bzw. den vorkommenden Arten im Biofilm und dem Biofilm-Alter gibt (Peter, 2011, Zirnstein, 2012). Die Anzahl der Phylotypen war jedoch auch vom Probenahmejahr abhängig. Unabhängig von der Bildung der Biofilme wurde im Jahr 2013 eine höhere Anzahl Phylotypen innerhalb der planktonischen Bakterien im Grubenwasser festgestellt, als 2011 und 2012. Auch einzelne Gattungen, wie z.B. *Thermosporothrix*, *Desulfosporosinus*, *Clostridium*, *Telmatospirillum* konnten ausschließlich im Jahr 2013 in den Wasser- und Biofilmproben nachgewiesen werden (vgl. Tabellen A10 und A11 im Anhang). Letztendlich erhöhte sich die Artenvielfalt durch das zunehmende Alter der Biofilme sowie durch das Probenahmejahr, das durch wechselnde chemische Parameter beeinflusst wurde.

#### *4.3.1.2. Bewertung des Artenreichtums der Bakterien durch Alpha-Diversitätscharakteristiken*

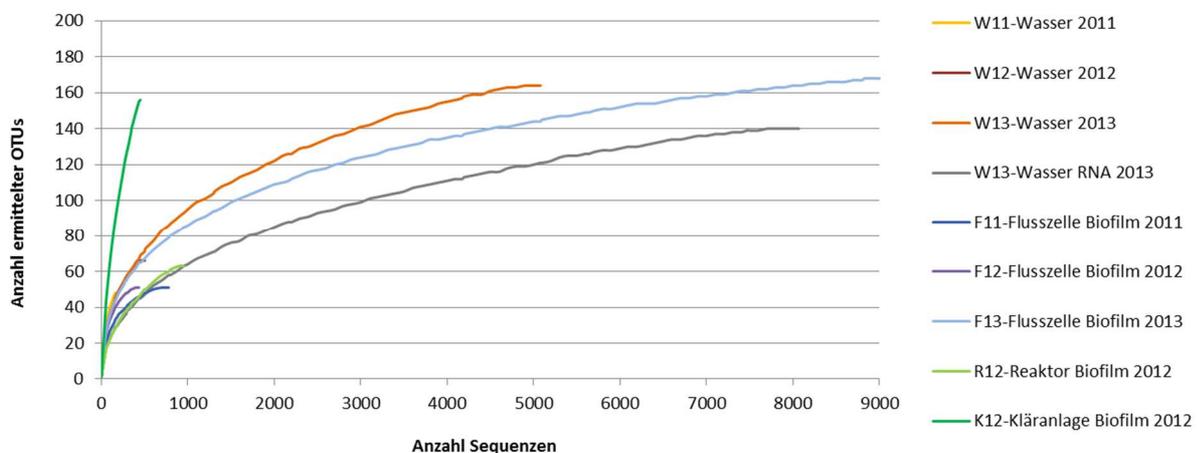
Zur Beurteilung der Diversität einer mikrobiellen Gemeinschaft und zum Vergleich mehrerer Gemeinschaften untereinander können diverse „Richness“- und Diversitätsindizes berechnet werden. Dafür wurden die Sequenzinformationen aus den Pyrosequenzierungsbibliotheken zuvor gruppiert. Das bedeutet, es wurde ein Schwellenwert von 97 % festgelegt, der die Sequenzhomologie, zum Vergleich verschiedener Sequenzen für die Definition einer Spezies, bei diesem Wert beschreibt. Die Berechnung der Indizes ist OTU basiert und wurde mit dem Programm Mothur (Schloss et al., 2009) durch Dr. Kerstin Röske durchgeführt (vgl. Kapitel 3.11.2). Insgesamt wurden 20.419 bakterielle Sequenzen in 775 OTUs gruppiert. Auf der Basis dieser OTUs erfolgte die Berechnung der Alpha-Diversitätscharakteristiken (siehe Tabelle 13) und der „Rarefaction“ Kurven (siehe Abbildung 18: „Rarefaction“-Kurven der bakteriellen Pyrosequenzierungsbibliotheken.).

Mit den erstellten Pyrosequenzierungsbibliotheken wurden zwischen 90 % (W11) und 99,6 % (F13) der bakteriellen Gemeinschaft mit den ausgewählten Primersystemen erfasst (vgl. „Coverage“ in Tabelle 15). Die Werte der bakteriellen Zusammensetzung des Kläranlagen-Biofilms 2012 (K12) wurden vollständigshalber in Tabelle 13 aufgeführt, jedoch nicht diskutiert, da es sich nicht um eine Probe aus Königstein handelt.

**Tabelle 13: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der DNA-basierten bakteriellen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken.** *a* Definiert als Sequenzen mit einer Ähnlichkeit  $\geq 97$  %. *b* Errechnet unter Verwendung des „Good’s Coverage“ Index. *c* Nicht parametrische „Richness“ Schätzer. *d* Invertierter Shannon Index.

Art der Probe	Datum der Probennahme	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs <sup>a</sup>	Coverage [%] <sup>b</sup>	"Richness" <sup>c</sup>		"Diversity" <sup>d</sup>	
					ACE	Chao	npShannon	invSimpson <sup>d</sup>
Grubenwasser	11/2011 (W11)	190	48	90,0%	105,2	87,5	3,4	23,4
	10/2012 (W12)	504	66	94,4%	173,7	154,2	3,3	17,5
	07/2013 (W13)	5081	164	98,6%	414,9	572,5	2,8	5,2
Flusszelle Biofilm	11/2011 (F11)	781	51	97,8%	94,5	105,2	2,4	4,7
	10/2012 (F12)	436	51	96,1%	113,3	87,0	3,3	18,9
	07/2013 (F13)	12021	176	99,6%	265,8	309,2	3,3	16,6
Reaktor Biofilm	10/2012 (R12)	953	63	96,2%	306,5	214,0	1,9	3,1
Kläranlage Biofilm	07/2012 (K12)	453	156	77,9%	821,4	688,0	4,4	43,1
<b>gesamt</b>		<b>19966</b>	<b>619</b>					

Die Proben W13 und F13 wurden mit einer Coverage > 98 % (Tabelle 13) im Jahr 2013 beprobt und deuten auf eine fast vollständige Beschreibung der mikrobiellen Biozönose hin. Das deckt sich auch mit den „Rarefaction“-Kurven (vgl. Abbildung 18), die sich bei den Proben W13 und F13 einer asymptotischen Linie nähern, was darauf hinweist, dass die Mikroorganismen mit den generierten Sequenzen beinahe komplett analysiert wurden.



**Abbildung 18: „Rarefaction“-Kurven der bakteriellen Pyrosequenzierungsbibliotheken.**

Der Grund für die hohe Abdeckung der beiden Proben liefert die hohe Anzahl an generierten Sequenzen (5.081 und 12.021) (siehe Tabelle 13). Bei den Proben W11, W12, F11, F12 und R12 wurden zwischen 190 und 953 Sequenzen analysiert und somit eine Abdeckung über 90 % erreicht (vgl. Tabelle 13). Anhand der steigenden „Rarefaction-Kurven“ (Abbildung 18) ist erkennbar, dass die Gesamtheit der mikrobiellen Gemeinschaft mit den generierten Sequenzen nicht vollständig erfasst wurde. Zhang et al. zeigte, dass bei der Pyrosequenzierung von Belebtschlammproben aus Kläranlagen selbst über 16.000 Sequenzen nicht ausreichten, um die mikrobielle Biozönose vollständig zu erfassen (Zhang et al., 2012).

Zur Bewertung der Alpha-Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft wurden Spezies-basierte Berechnungen der Alpha-Diversität genutzt. Die qualitative Spezies-basierte Berechnung durch die Indizes Chao (Chao, 1984) und ACE (abundance-based coverage estimator) (Chao, 1992), sowie die quantitative Spezies-basierte Berechnung durch die Shannon (Shannon, 1949) und Simpson (Simpson, 1949) Indizes wurden in dieser Arbeit angewendet. Die ermittelten „Richness“ Indizes schwankten für ACE zwischen ca. 94 (Probe F11) und ca. 415 (W13) bzw. für Chao zwischen ca. 87 (Proben W11 und F12) und ca. 583 (Probe W13) (siehe Tabelle 13). Dabei bezieht sich ACE auf die seltenen Klassen, bei denen Spezies weniger als 10 Mal in der Probe vorkommen, Chao dagegen auf die Spezies, die öfter als 10 Mal je Probe auftreten. Beim Vergleich der Chao- und ACE-Werte in Tabelle 13 wird ersichtlich, dass die Bibliotheken des Jahres 2013 (W13 und F13) die Proben mit dem größten Artenreichtum sind. Außerdem weisen hohe ACE- und Chao Indizes auf eine Ungleichverteilung der Arten in dem Habitat hin, bei dem low-abundance Organismen sich auf einige wenige beschränken und eine Art die Probe dominiert. In den Proben W13 und F13 ist die Art *Acidithiobacillus* dominierend mit 44 % und 12 % (Tab. A10 und A11, siehe Anhang). Die Proben mit dem geringsten geschätzten Artenreichtum sind nach den genannten „Richness“ Indizes die Bibliotheken des Jahres 2011 (F11 und W11). Die ermittelten Werte der „Diversity“ - Indizes zeigen Schwankungen zwischen den Bibliotheken mit Werten zwischen 1,9 bis 3,4 (npShannon) bzw. zwischen 3,1 und 23,4 (invSimpson) (Tabelle 13). Diese Indizes kombinieren „diversity“ mit „evenness“-Kriterien. Für den Shannon-Index ist der Wert umso höher, je gleich verteilter die Spezies je Probe sind. Die Shannon Werte in Tabelle 13 sind für die Königstein-Proben allgemein niedrig, was auf eine Ungleichverteilung der Spezies in allen Proben hinweist. Der Grund dafür könnte der große Anteil unklassifizierter Bakterien in fast allen Proben sein, die größtenteils einer OTU zugeordnet wurden. Der invSimpson Index zeigt hohe Werte, wenn die Diversität hoch ist. Laut Tabelle 13 wäre die Bibliothek W11 die Wasserprobe des Jahres 2011 mit dem höchsten invSimpson Index (23,4) und somit die Probe mit der höchsten Artenvielfalt. Die Probe mit dem geringsten Wert von 3,1 ist R12, die auch den geringsten npShannon Index aufweist (1,9) (Tabelle 13). Das spricht für eine starke Dominanz von ein oder zwei Spezies sowie für eine geringe Diversität. Die OTU basierten Daten bestätigen diese Indizes-basierte Vermutung, da allein 56 % aller Sequenzen

der Probe R12 zu einer OTU (unklassifizierte Bakterien) gehören und weitere 19 % der Sequenzen zu einer OTU, die Homologie zu unklassifizierten Gamma-Proteobacteria aufweist (siehe Tabelle 14).

Die OTUs, denen die meisten bakteriellen Sequenzen zugeordnet worden, sind in der nachfolgenden Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der bakteriellen Sequenzen je Probe und Zuordnung der OTUs zu Taxonomie. OTUs, die in allen Königstein-Proben gefunden wurden, sind orange markiert.**

Gruppe	W11	W12	W13	F11	F12	F13	R12	K12	Phylum	Klasse	Ordnung	Genus
Otu0003	14	88	433	8	56	32	78	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0004	26	35	2191	1	19	1381	3	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillus
Otu0012	15	34	189	357	54	442	530	0	unklassifiziert			
Otu0014	4	18	36	18	24	1412	1	0	unklassifiziert			
Otu0015	5	16	81	64	23	1258	1	0	unklassifiziert			
Otu0018	0	25	225	5	14	692	180	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria		
Otu0020	24	45	47	109	24	720	4	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	
Otu0021	1	39	204	0	13	144	1	0	Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Leptospirillum
Otu0023	0	8	138	3	6	864	7	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	
Otu0024	0	0	53	0	0	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0025	1	2	66	0	7	851	4	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria		
Otu0036	0	0	0	0	0	519	0	0	Acidobacteria	Holophagae	Holophagales	Geothrix
Otu0037	3	28	78	11	18	283	0	0	unklassifiziert			
Otu0038	0	1	3	6	3	38	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	
Otu0039	5	25	63	25	34	226	10	0	unklassifiziert			
Otu0040	0	0	0	0	2	300	0	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystis
Otu0043	8	25	34	4	35	124	13	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acidocella
Otu0052	0	3	24	2	3	247	1	0	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	
Otu0056	1	1	95	0	0	2	0	0	unklassifiziert			
Otu0057	2	8	153	3	17	75	4	0	TM7	TM7	TM7	TM7
Otu0062	0	0	7	1	0	216	0	0	Actinobacteria	Actinobacteria		
Otu0063	0	3	39	0	0	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0065	1	1	37	4	5	127	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	
Otu0066	0	0	41	4	0	169	0	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria		
Otu0070	3	10	80	22	12	46	1	0	unklassifiziert			
Otu0072	0	3	10	4	2	170	1	0	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteria_Gp1	Gp1
Otu0080	0	3	43	1	2	53	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Thiomonas
Otu0083	10	3	47	0	0	0	1	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	
Otu0091	0	0	1	0	0	139	0	0	Verrucomicrobia	Subdivision3	Subdivision3	
Otu0097	0	2	15	0	1	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0099	0	0	2	0	0	124	0	0	Actinobacteria	Actinobacteria		
Otu0100	3	5	10	16	9	49	13	0	Actinobacteria	Actinobacteria		
Otu0107	13	0	79	0	0	1	0	0	Firmicutes			
Otu0109	2	2	30	0	8	63	0	0	TM7	TM7	TM7	TM7
Otu0144	0	7	5	0	2	22	0	0	Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Leptospirillum

Schaut man sich die Verteilung der Sequenzen je OTU an, so wird ersichtlich, dass die geringe Diversität (im Vergleich zu Bodenproben oder Sedimenten) dadurch begründet ist, dass in einer OTU meist mehr als eine Sequenz enthalten sind. Beispielsweise OTU0004, welche in allen untersuchten Königstein-Proben vorkam, und der Gattung Acidithiobacillus zugeordnet wurde, enthielt in der Probe W13 (Wasser 07/2013) 2191 Sequenzen (Tabelle 14, siehe W13). Auch einige unklassifizierte Bakterien (OTU0012, OTU0014 und OTU0015) waren in großer Sequenzanzahl pro OTU je Königstein-Probe (K12

ausgenommen, Tabelle 14 grau markiert) vertreten. Das bestätigt die Dominanz der unklassifizierten Bakterien in einigen Proben (W11, W12, F11, F12 und R12) aufgrund der großen Sequenzanzahl pro OTU und die geringe Diversität. Elf der insgesamt 775 bakteriellen OTUs wurden in allen DNA-basierten Königstein Proben mit unterschiedlicher Sequenzanzahl gefunden. Diese elf OTUs sind in Tabelle 14 orange markiert und gehören zu Gattungen der Gruppen Alpha-, Beta-, Gamma-Proteobacteria, unklassifizierten Bakterien, Actinobacteria und TM7.

Neben der höheren Anzahl an generierten Sequenzen durch die Pyrosequenzierung im Vergleich zur durchschnittlichen Sequenzanzahl der Methode der Sangersequenzierung, weist die Pyrosequenzierung weitere Vorteile auf. Die Pyrosequenzierung ist 10 - 30mal billiger als die Sangersequenzierung und der Schritt der Klonierung entfällt (Edwards *et al.*, 2006). Einziger Nachteil bei der Pyrosequenzierungs-Technologie ist die kurze Sequenzlänge der Fragmente (< 500 bp in dieser Arbeit), die dadurch eine Zuordnung der Spezies mit den Referenzsequenzen in den Datenbanken erschweren. Trotz der höheren Anzahl an generierten Sequenzen konnte die bakterielle Biozönose nicht in allen Königstein Proben vollständig erfasst werden. Und das obwohl die Diversität in „acid mine drainage“ Habitaten eher niedrig ist, wenn man sie mit Sedimenten oder Böden vergleicht.

#### 4.3.1.3. Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft – planktonisch und im Biofilm

Biofilme bilden sich bevorzugt zwischen Gas-Flüssig-Phasen (z.B. Luft-Wasser) oder Flüssig-Fest-Grenzflächen (z.B. Wasser/Gestein) (Costerton, 1995) bei vorhandener optimaler Fließgeschwindigkeit zwischen 0,065 und 0,2 m/s (Stoodley, 1994). Im Bergwerk Königstein wurden durchschnittlich 134 m<sup>3</sup>/h (2011), 115 m<sup>3</sup>/h (2012) und 112 m<sup>3</sup>/h (2013) nach über Tage gefördert (siehe Tabelle 11, Kapitel 4.1.), das entspricht einer Fließgeschwindigkeit zwischen ca. 0,44 m/s und 0,53 m/s. Aufgrund der hohen Fließgeschwindigkeit wurde angenommen, dass die Bakterien nicht als Biofilm, sondern überwiegend als planktonische Zellen im Grubenwasser vorkommen. Das wurde auch von den Wismut-Mitarbeitern bestätigt, die makroskopisch keine Biofilme in den Rohrleitungen entdeckt haben, in denen das Grubenwasser gefördert wird. Die Biofilmentstehung wurde beschleunigt, indem das Grubenwasser durch eine Flusszelle mit einer Geschwindigkeit von 0,3 cm/s geleitet wurde. Dabei konnten die Zellen sich an die ihnen angebotene Objektträger-Oberfläche aus Glas anheften (vgl. Kapitel 3.2.1.). Hierbei sollte die Selektivität bzw. der Einfluss der Oberfläche auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft betrachtet werden. Beim direkten Vergleich planktonischer Zellen mit denen im Biofilm der jeweiligen Jahre ist eine ähnliche Mikrobengemeinschaft zu verzeichnen. In allen Biofilmen der Flusszellen war der Anteil an Beta- und Gamma-Proteobacteria geringer, als im Grubenwasser in Form von planktonischen Zellen. Auch die Gruppen Firmicutes und Nitrospira sind nicht so häufig im Biofilm gefunden worden, wie im Grubenwasser. Dagegen konnte eine höhere Anzahl an Alpha-Proteobacteria sowie an unklassifizierten Bakterien im Biofilm erfasst werden. Im

Biofilm der Flusszelle F13 (2013), der über 17 Monate beobachtet wurde, waren Anhäufungen bestimmter Mikroorganismen, insbesondere anaerober Sulfat-reduzierender Bakterien, auf den Objektträgern im Vergleich zum Grubenwasser zu verzeichnen. Das liegt womöglich an der langen Verweilzeit der Flusszelle F13 (2013), im Vergleich zu den Flusszellen in den Jahren 2011 (5 Monate) und 2012 (8 Monate), in der die Flusszelle dem Grubenwasser ausgesetzt war. Höchstwahrscheinlich haben sich anaerobe Zonen z.B. in den Randbereichen der Flusszelle oder im „unteren Teil“ des Biofilms ausgebildet und so die Vermehrung von anaeroben Bakterien v.a. Sulfatreduzierer gefördert (Santegoeds, 1998). Die Biofilme der Flusszelle sind im Kapitel 4.5.1. mit mikroskopischen Methoden bildlich dargestellt.

#### **4.3.2. Vergleich der bakteriellen Biozönose aus CARD-FISH und Pyrosequenzierung**

Beim Vergleich der Daten aus der Pyrosequenzierung und der CARD-FISH Analyse sind deutlich Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede festzustellen. Obwohl die Methoden quantitative (CARD-FISH) und qualitative (Pyrosequenzierung) Resultate erzielen, werden sie oft bei Untersuchungen zur Diversität (Cruaud, 2014, Lenchi, 2013, Roske *et al.*, 2012) verglichen bzw. miteinander ergänzt. Der Vorteil der Pyrosequenzierung gegenüber der CARD-FISH Methode ist die Analyse unbekannter Proben durch die Zuordnung von Sequenzen bis hin zur Gattung bzw. zur Art. Bei der CARD-FISH macht man sich den Einsatz gruppenspezifischer Sonden zur allgemeinen Einschätzung der mikrobiellen Zusammensetzung, insbesondere im Vergleich von verschiedenen Proben zu Nutze. Dabei kommt es auf die Auswahl der Sonden an. Bei der Pyrosequenzierung wird die Identifizierung der vorkommenden Arten durch die Wahl der Primer beschränkt, die nicht die gesamte Bandbreite der Mikroorganismen erfassen (Vgl. Kapitel 4.3.1.).

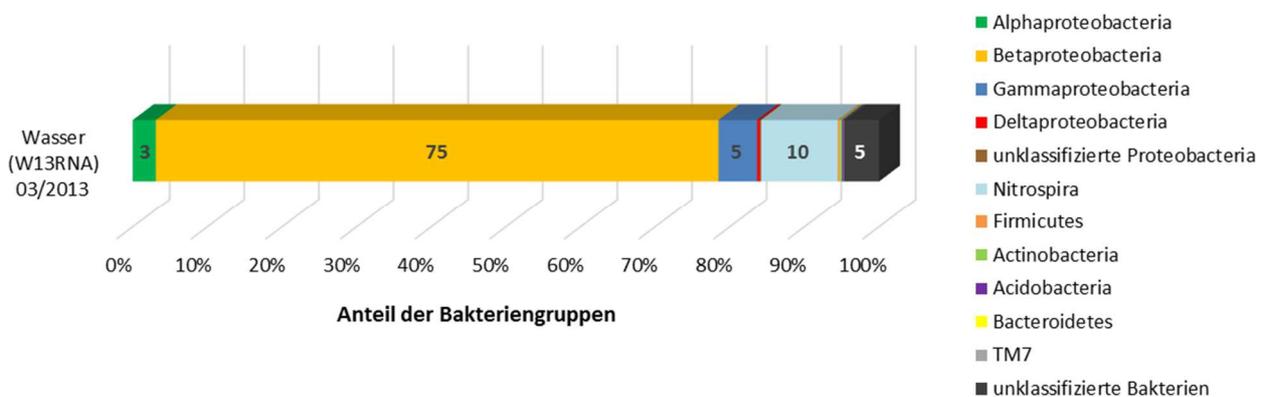
Mit der Pyrosequenzierung wurden insgesamt 19 (ohne unklassifizierte Bakterien) und mit der CARD-FISH insgesamt 6+1 Phylotypen (vgl. Kapitel 4.2.1. und 4.3.1.) nachgewiesen. Wobei mittels CARD-FISH, neben Arten-spezifischen Sonden, lediglich Sonden für 10 Phylotypen getestet wurden. Dabei konnten in den einzelnen Proben mit der Pyrosequenzierung 7 bis 15 (ohne unklassifizierte Bakterien) und mit der CARD-FISH 5 bis 6+1 Phylotypen gefunden werden. Bei der CARD-FISH zählt die Sonde SRB für Sulfat-reduzierende Bakterien als Phylotyp (deshalb +1), obwohl es keine eigene phylogenetische Gruppe ist, denn Sulfatreduzierer sind in mehreren phylogenetischen Gruppen vertreten. Der Informationsgehalt der Pyrosequenzierungsergebnisse ist zwar größer, dennoch gibt die Pyrosequenzierung nur eine Abschätzung über die Häufigkeit der einzelnen Arten und Gruppen. Die Häufigkeiten der natürlichen Mikrobienzusammensetzung wurden z.B. durch DNA-Extraktion, DNA-Reinigung, Fragment-Amplifikation beeinflusst und verschoben diese möglicherweise. Die Ursachen für eine bevorzugte PCR-Amplifikation können vielfältig sein. Neben der Genomgröße und der Anzahl der *rrn*-Genkopien (Klappenbach, 2000) sind der G+C-Gehalt der rDNA (Reysenbach, 1994), die

Konzentration des Templates (Chandler, 1997) und die Wahl der für die Amplifikation verwendeten Primer (Suzuki, 1996) als mögliche Ursachen beschrieben. Eine Ergänzung mit der CARD-FISH-Methode ist demnach sinnvoll. Nach der CARD-FISH Methode dominieren die Beta- und Gamma-Proteobakterien die bakterielle Gemeinschaft der Wasserprobe 2013 (vgl. Kapitel 4.2.1., Abbildung 16). Das korreliert eng mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung, bei denen ebenfalls Gamma- und Beta-Proteobacteria die planktonischen Zellen im Wasser 2013 (W13) dominieren (Vgl. Kapitel 4.3.1., Abbildung 17). Alpha-Proteobacteria, sowie die anderen detektierten Gruppen spielen in der Wasserprobe 2013 bei beiden Methoden eine untergeordnete Rolle. In der Biofilmprobe der Flusszelle (2011) ist dagegen die Gruppe der Alpha-Proteobacteria dominant (Vgl. Abbildung 16 und Abbildung 17), dabei bestätigte die Pyrosequenzierung die Anteile der mit der CARD-FISH ermittelten Resultate. Die Beta-Proteobacteria nahmen jedoch bei der CARD-FISH wesentlich größere Anteile in der Flusszelle 2011 ein, als dies nach der Pyrosequenzierung der Fall war. Gamma-Proteobacteria waren in dieser Probe sowohl bei der CARD-FISH, als auch bei der Pyrosequenzierung in geringer Anzahl nachgewiesen worden. Die Phylotypen Acidobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Delta-Proteobacteria, Epsilonbacteria, Gemmatimonadetes, OD1, Planctomycetes, TM7 und Verrucomicrobia wurden nur durch Pyrosequenzierung nachgewiesen, da keine entsprechenden Sonden für CARD-FISH verwendet wurden bzw. keine Zellen für die genannten Gruppen gezählt werden konnten. Weitere Unterschiede zwischen der CARD-FISH und Pyrosequenzierung, die sich auf unterschiedliche Detektionsspektren der verwendeten Sonden bzw. Primer zurückführen lassen, können folgendermaßen zusammengefasst werden: Firmicutes wurden nach CARD-FISH nur im Biofilm der Flusszelle (2011), nicht im Wasser 2013 gefunden. Nach Pyrosequenzierung konnten Firmicutes nur im Wasser (2013) nachgewiesen werden. Der mittels CARD-FISH in Biofilm (2011) und Wasserprobe (213) gefundene Stamm *Nitrospira* (insbesondere *Leptospirillum ferrooxidans*) konnte mittels Pyrosequenzierung nur in der Wasserprobe (2013) identifiziert werden. Sowohl Actinobacteria, als auch Sulfat-reduzierende Bakterien sind mittels CARD-FISH in sehr geringem Anteil (ca. 0,1 %) ausschließlich im Biofilm der Flusszelle (2011) detektiert worden. Diese Gruppen wurden durch die Pyrosequenzierung in der Wasser- und Biofilmprobe ebenfalls in geringen Anteilen (< 1 %) nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Primer bzw. Sonden ähneln sich somit die Aussagen der Pyrosequenzierung und der CARD-FISH im Hinblick auf die abundanten Taxa und zeigen gleichzeitig Unterschiede besonders bei den gering abundanten Taxa.

#### **4.3.3. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Bakterien durch molekularbiologische Methoden**

Nach Abschätzung der Häufigkeit stoffwechselaktiver Mikroorganismen im Grubenwasser des ehemaligen Uranbergwerks Königstein mittels CARD-FISH und detaillierter Charakterisierung der

bakteriellen Gemeinschaft mittels Pyrosequenzierung werden im Folgenden die stoffwechselaktiven bakteriellen Gruppen bis hin zur Gattung vorgestellt, die aktiv Einfluss auf die Geochemie des Grubenwassers nehmen können. Zur Charakterisierung stoffwechselaktiver Mikroorganismen im Grubenwasser wurde wie bei der DNA-basierten Analyse die Pyrosequenzierung angewendet. Statt DNA wurde die RNA der Mikroorganismen isoliert und vor der PCR-Amplifikation in DNA umgeschrieben (Vgl. Kapitel 3.10.6.). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den DNA-basierten Sequenzen, wurden die gleichen Primer verwendet. Hierbei wurde eine Wasserprobe 03/2013 (W13RNA) ausgewählt. Die RNA der Biofilme wurde nicht analysiert, weil angenommen wurde, dass die Mikroorganismen im Biofilm alle stoffwechselaktiv waren bzw. sind. Da sich nur lebende Zellen an eine Oberfläche heften, um eine Gemeinschaft in Form eines Biofilmes zu bilden (Dunne, 2002). Insgesamt konnten 11 Phylotypen (außer unklassifizierte Bakterien) mittels Pyrosequenzierung in der RNA-Wasserprobe (W13RNA) nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Gruppen und Gattungen ist detailliert in der Tabelle A10 im Anhang A3 dargestellt. Den größten Anteil nahmen die Beta-Proteobacteria mit 75 % ein. Davon waren mehr als 74 % unklassifizierte Beta-Proteobacteria und 1 % *Thiomonas spp.* vertreten. Die mögliche Überrepräsentation einiger Taxa (hier Beta-Proteobacteria) in Genbibliotheken wurde unter anderem als Folge der Abhängigkeit der Amplifikation vom G+C Gehalt des Templates beschrieben (Reysenbach, 1994). Die zweitgrößte Gruppe, die als stoffwechselaktiv identifiziert wurde, war Nitrospira mit 10 % (Abbildung 19), insbesondere *Leptospirillum spp.* Unter einigen analysierten Phylotypen verbarg sich eine große Anzahl von Gruppen, die nur Homologien zu unklassifizierten Vertretern aufwiesen. Diese Gruppen waren Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, TM7, die jeweils einen Anteil von weniger als 1 % der gesamten RNA-basierten Sequenzen ausmachten. Stoffwechselaktive Alpha- und Gamma-Proteobacteria waren in der Wasserprobe (03/2013) mit einem Anteil von 3 % und 5 % vertreten (Abbildung 19). Zu den Vertretern der Alpha-Proteobacteria gehörten *Acidocella spp.* (0,5 %) und eine ganze Reihe unklassifizierter Alpha-Proteobacteria (2,5 %).



**Abbildung 19: Zusammensetzung der Gemeinschaft stoffwechselaktiver Bakterien in der Wasserprobe W13RNA (03/2013) nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.**

Der Großteil der Gamma-Proteobacteria wurde neben unklassifizierten Gamma-Proteobacteria (0,9 %) von *Acidithiobacillus species* (4,2 %) dominiert.

Delta-Proteobacteria gehörten zu der phylogenetischen Gruppe, die zu einem kleinem Teil (< 1 %) in der Wasserprobe als stoffwechselaktiv verzeichnet wurde. Neben der Mehrzahl von unklassifizierten Arten gehörten auch *Geobacter* Spezies zu Vertretern der Delta-Proteobacteria. Die Gruppe der Firmicutes war ebenfalls mit einer geringen Anzahl an Sequenzen vertreten (< 1 %), darunter befanden sich sowohl unklassifizierte als auch *Desulfosporosinus* und *Desulfovibrio species*. Einen Anteil von ca. 5 % nehmen die unklassifizierten Bakterien ein, die nicht genau zu einer phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden konnten.

#### 4.3.3.1. Bewertung des Artenreichtums stoffwechselaktiver Bakterien durch Alpha-Diversitätscharakteristiken

Zur Beurteilung der Diversität und zum Vergleich der Biozönosen untereinander wurde, wie bereits in dem Kapitel 4.3.1.2. der 16S rDNA Pyrosequenzierung erwähnt, auch hier der Schwellenwert zur Definition einer Spezies mit 97 % festgelegt. Die nachfolgenden Analysen zur Alpha-Diversität erfolgten wie im Kapitel 3.11.2 beschrieben. Die Alpha-Diversitätscharakteristiken und die „Rarefaction Kurve“ der Wasserprobe W13RNA sind in Tabelle 15 bzw. in Abbildung 18 (Kapitel 4.3.1.2.) dargestellt.

**Tabelle 15: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der RNA-basierten bakteriellen Pyrosequenzierungsbibliothek.** a Definiert als Sequenzen mit einer Ähnlichkeit  $\geq 97\%$ , b Errechnet unter Verwendung des „Good’s Coverage“ Index. c Nicht parametrische „Richness“ Schätzer. d Nicht parametrischer Shannon Index.

Art der Probe	Datum der Probennahme	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs <sup>a</sup>	"Coverage" [%] <sup>b</sup>	"Richness" <sup>c</sup>		"Diversity"	
					ACE	Chao	npShannon	invSimpson <sup>d</sup>
Grubenwasser	03/2013 (W13RNA)	8070	140	99,2%	455,1	447,3	2,1	3,3

Die insgesamt 8070 Sequenzen der RNA-basierten Pyrosequenzierungsbibliothek wurden in 140 OTUs gruppiert und erreichten damit eine Abdeckung der vorhandenen Biodiversität der stoffwechselaktiven Bakterien im Grubenwasser des ehemaligen Bergwerks Königstein von 99,2 % (Index „Coverage“, Tabelle 15). Damit erfasst die Bibliothek die vorhandene Biodiversität der stoffwechselaktiven Bakterien zum Zeitpunkt 03/2013 nahezu vollständig, was sich ebenfalls anhand der flachen asymptotischen „Rarefaction“ Kurve erkennen lässt (Abbildung 18, Kapitel 4.3.1.2.). Anhand der Schätzer für die „Richness“ (ACE und Chao) und Diversität (npShannon und Simpson) der Bakterien in den DNA und RNA-Proben lässt sich die mikrobielle Artenvielfalt darstellen und bewerten. Im Vergleich mit den DNA-basierten Bibliotheken (siehe Tabelle 13) weist die RNA-basierte Bibliothek (ACE: 455; Chao: 447) ein größeres Artenreichtum der Bakterien auf als die anderen DNA-Bibliotheken

(ACE: 95-415; Chao: 87-309), außer W13 (Chao: 572) (Tabelle 13). Aufgrund eines höheren Chao Wertes, weist die Wasserprobe W13 (07/2013) ein größeres Artenreichtum als die Bibliothek W13RNA (03/2013) auf. Somit ordnet sich die Wasserprobe W13RNA (03/2013) im Hinblick auf das Artenreichtum größenordnungsmäßig zwischen die Wasserprobe 10/2012 und die Wasserprobe 07/2013 ein (Tabelle 13). Die Diversitätsindizes npShannon und Simpson zeigen wiederum eine geringere Diversität für die RNA-Bibliothek an (npShannon: 2,1; invSimpson: 3,3) (Tabelle 15), als alle anderen DNA-Bibliotheken (npShannon: 2,4-3,4; invSimpson: 5,2-23,4), außer R12 (npShannon: 1,9; invSimpson: 3,1) (Vgl. Tabelle 13). In den Kernaussagen widersprechen sich demnach die Charakteristiken der Diversität und des Artenreichtums für die RNA-Probe im Vergleich zu den DNA-Proben. Dass die Artenvielfalt der RNA-Wasserprobe W13RNA niedriger ist als die meisten der DNA-basierten Proben, wird jedoch neben den Indizes npShannon und invSimpson zusätzlich durch die Erkenntnis bestätigt, dass allein 53 % aller Sequenzen der Wasserprobe W13RNA zu einer OTU (OTU0003, Betaproteobacteria, siehe Tabelle 16) gehören. In Tabelle 16 sind die OTUs zusammengefasst, denen die meisten Sequenzen der Probe W13RNA zugeordnet werden konnten.

**Tabelle 16: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der stoffwechselaktiven bakteriellen Sequenzen (W13RNA) je Probe und Zuordnung der OTUs zur Taxonomie.**

Gruppe	W11	W12	W13	W13RNA	F11	F12	F13	R12	Phylum	Klasse	Ordnung	Genus
Otu0003	14	88	433	4292	8	56	32	78	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0004	26	35	2191	334	1	19	1381	3	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidithiobacillales	Acidithiobacillus
Otu0012	15	34	189	35	357	54	442	530	unklassifiziert			
Otu0014	4	18	36	34	18	24	1412	1	unklassifiziert			
Otu0015	5	16	81	9	64	23	1258	1	unklassifiziert			
Otu0018	0	25	225	15	5	14	692	180	Proteobacteria	Gammaproteobacteria		
Otu0020	24	45	47	180	109	24	720	4	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	
Otu0021	1	39	204	760	0	13	144	1	Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Leptospirillum
Otu0024	0	0	53	941	0	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0037	3	28	78	33	11	18	283	0	unklassifiziert			
Otu0039	5	25	63	29	25	34	226	10	unklassifiziert			
Otu0043	8	25	34	43	4	35	124	13	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acidocella
Otu0056	1	1	95	165	0	0	2	0	unklassifiziert			
Otu0063	0	3	39	188	0	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0064	0	0	8	224	0	0	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	
Otu0065	1	1	37	53	4	5	127	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	
Otu0070	3	10	80	24	22	12	46	1	unklassifiziert			
Otu0080	0	3	43	62	1	2	53	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Thiomonas
Otu0083	10	3	47	101	0	0	0	1	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	
Otu0097	0	2	15	110	0	1	0	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0100	3	5	10	9	16	9	49	13	Actinobacteria	Actinobacteria		
Otu0107	13	0	79	16	0	0	1	0	Firmicutes			
Otu0111	0	0	0	60	0	0	0	1	Verrucomicrobia	Subdivision3	Subdivision3	Subdivision3
Otu0144	0	7	5	40	0	2	22	0	Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Leptospirillum

Dabei konnten 10 OTUs (in Tabelle 16, orange markiert) in der RNA-basierten Probe W13RNA nachgewiesen werden, die auch in allen anderen DNA-basierten Königstein Proben erfasst wurden. Die Bakterienklasse, die innerhalb der OTUs mit den größten Sequenzanzahlen auftrat, war die Klasse

der Beta-Proteobacteria (OTU0003, OTU0024, OTU0063, OTU0064, OTU0065, OTU0080, OTU0083 und OTU0097). Das bestätigt die Dominanz der Betaproteobacteria in der Probe W13RNA.

Insgesamt wurden 49 OTUs in der RNA-basierten Probe W13RNA detektiert, die in keiner DNA-basierten Königstein Probe nachgewiesen wurden (nicht gezeigt). Unter den 49 OTUs befinden sich hauptsächlich Betaproteobacteria, aber auch vereinzelt Deltaproteobacteria (*Desulfovibrio*), Alpha- und Gammaproteobacteria (*Acidithiobacillus*, *Legionella*) sowie Actinobacteria, Acidobacteria, Nitrospira (*Leptospirillum*) und Bacteroidetes. Überwiegend (42 von 49 OTUs) enthielten die OTUs, die nicht in den DNA-Analysen gefunden worden, nur eine Sequenz.

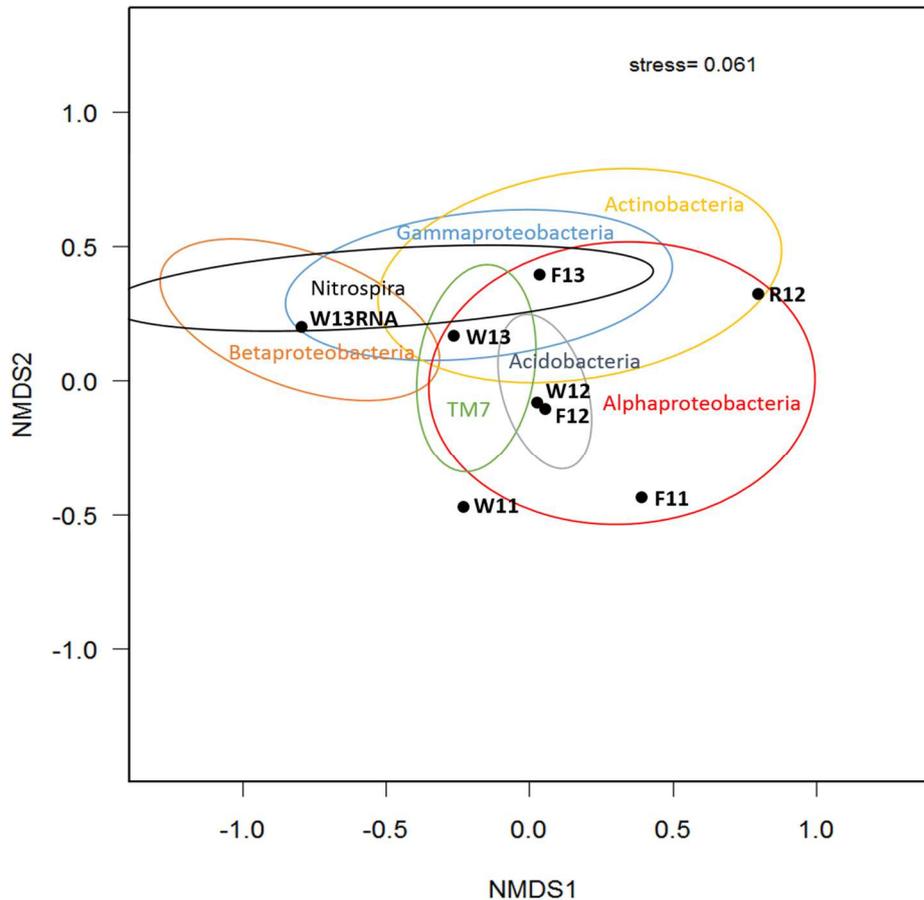
#### **4.3.4. Häufigkeiten der Bakteriengruppen in den DNA/RNA-Proben untereinander**

Um das Auftreten der verschiedenen Bakteriengruppen untereinander zu vergleichen, wurde eine Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (Cox, 1994, Kruskal, 1964) mit Hilfe des Programms R (R. Development, 2010) OTU basiert ermittelt. Die NMDS-Analyse, in der die relativen Häufigkeiten der OTUs der Bakteriengruppen in den einzelnen Proben verglichen wurden, ist in Abbildung 20 dargestellt. Dabei zeigen die Ellipsen (Phyla oder Klassen) an, in welcher Probe die größte Anzahl OTUs (und somit die Anzahl unterschiedlicher Sequenzen) der jeweiligen Bakterien-Gruppe gefunden wurde. Wie viele bakterielle Sequenzen in jeder einzelnen OTU auftraten, wurde dabei nicht berücksichtigt. Das heißt, eine Probe 1 mit vielen unterschiedlichen OTUs innerhalb eines Taxons, jedoch mit nur einer Sequenzanzahl pro OTU ist somit in diesem Taxon diverser als eine Probe 2 mit nur einer OTU mit 1000 Sequenzen. Jedoch dominiert in Probe 2 dieses Taxon, da die Sequenzanzahl hoch ist.

In Abbildung 20 zeigt die Ellipse der Alphaproteobacteria, dass die Alphaproteobacteria am häufigsten (angelehnt an die Anzahl unterschiedlicher OTUs) in den Proben F11 (11/2011), F12, W12 und R12 (10/2012), sowie W13 und F13 (07/2013) nachgewiesen wurden. In den Proben F11 und W11 (11/2011) dominierten auch anhand der Sequenzanzahl die Alphaproteobacteria (Abbildung 17, Kapitel 4.3.1.). In den Proben R12 (10/2012) sowie W13 und F13 (07/2013), in denen die häufigste Anzahl verschiedener Bakterien-Sequenzen den Alpha-Proteobacteria zugeordnet wurden (Abbildung 20), wiesen laut Pyrosequenzierung die geringste Sequenzanzahl für Alpha-Proteobacteria insgesamt auf (siehe Abbildung 17, Kapitel 4.3.1.). Das zeigt, dass die Vielzahl der OTUs einer Bakteriengruppe, in den genannten Proben aus Königstein nicht entscheidend ist, um die Biozönose bakteriell zu dominieren.

Obwohl W11 (11/2011), im Vergleich zu den anderen Proben zusammen mit F11 (11/2011) laut Pyrosequenzierung die meisten Alpha-Proteobacteria umfasste (Abbildung 17, Kapitel 4.3.1.), wurde W11 nicht eindeutig zu den Alpha-Proteobacteria zugeordnet (Abbildung 20). Das bedeutet, es konnten keine OTUs in der Probe W11 einem Phylum dominierend zugeordnet werden. Die

Wasserprobe (W11) und die Biofilm-Probe (F11) des Jahres 2011 liegen jedoch deutlich auf einer imaginären Linie durch die Ellipse der Alpha-Proteobacteria.



**Abbildung 20: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse durch Zuordnung der rel. Häufigkeiten der Bakterien-Gruppen (OTUs) zum Auftreten in den einzelnen Proben.**

Die Proben W12 (Wasser) und F12 (Flusszelle) des Probenahmejahres 2012 (10/2012) liegen im Diagramm (Abbildung 20) dicht beieinander, was auf eine ähnliche mikrobielle Zusammensetzung schließen lässt, und werden durch die häufigste Anzahl an OTUs der Acidobacteria dominiert. Der größte Anteil an OTUs (verschiedene Sequenzen) der Beta-Proteobacteria wurde ausschließlich in der RNA-basierten Probe W13RNA (03/2013) detektiert (Abb. 19), in der sie auch die dominante Gruppe darstellten (Abbildung 17, Kapitel 4.3.1.). Gamma-Proteobacteria, die mit der größten Vielfalt an OTUs in den Proben W13 und F13 (07/2013) gefunden wurden (Abbildung 20), konnten auch mittels Pyrosequenzierung als dominante Gruppe in den beiden Proben erfasst werden (siehe Abbildung 17, Kapitel 4.3.1.). Generell spiegelt jedoch die Vielzahl verschiedener OTUs pro Probe nicht gleichzeitig die Dominanz der phylogenetischen Gruppe in dieser Probe wider, denn die Anzahl der Sequenzen pro OTU ist ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Dominanz einer phylogenetischen Gruppe innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft beiträgt. Die Probe W13 (07/2013), die in Abbildung 20 zusätzlichen

neben den häufigsten Gruppen der Alphaproteobacteria und Gammaproteobacteria die häufigste OTU-Anzahl in den Gruppen TM7 und Actinobacteria aufwies, erreichte laut Chao und ACE (Tabelle 13, Kapitel 4.3.1.2.) auch das größte Artenreichtum und die höchste Anzahl an OTUs im Vergleich mit den anderen Königstein Proben. Ein Grund dafür könnte jedoch die höhere analysierte Anzahl an Sequenzen im Jahr 2013 sein, die im Vergleich zu den Proben aus den Jahren 2011 und 2012 durchschnittlich zehn Mal höher ist. In der Biofilm-Probe F13 wurden, wie in der Wasserprobe W13 (Abbildung 20) vier Klassen mit der größten Anzahl an OTUs nachgewiesen: Alpha- und Gamma-Proteobacteria sowie Nitrospira und Actinobacteria. Auch anhand der Anzahl der Sequenzen sind die Gamma-Proteobacteria und Actinobacteria am häufigsten im Biofilm F13 gefunden worden.

#### 4.3.5. Einfluss der chemischen Parameter des Grubenwassers auf die bakterielle Gemeinschaft

Um zu vergleichen, ob die chemischen Parameter des Grubenwassers Königstein Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft haben, wurden Korrelations-Diagramme anhand der OTU-basierten Analysen der Pyrosequenzierung und ausgewählter chemischer Parameter der entsprechenden Probenahmedaten erstellt (Kerstin Röske). Die chemischen Parameter des Grubenwassers zu den ausgewählten Probenahmedaten sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

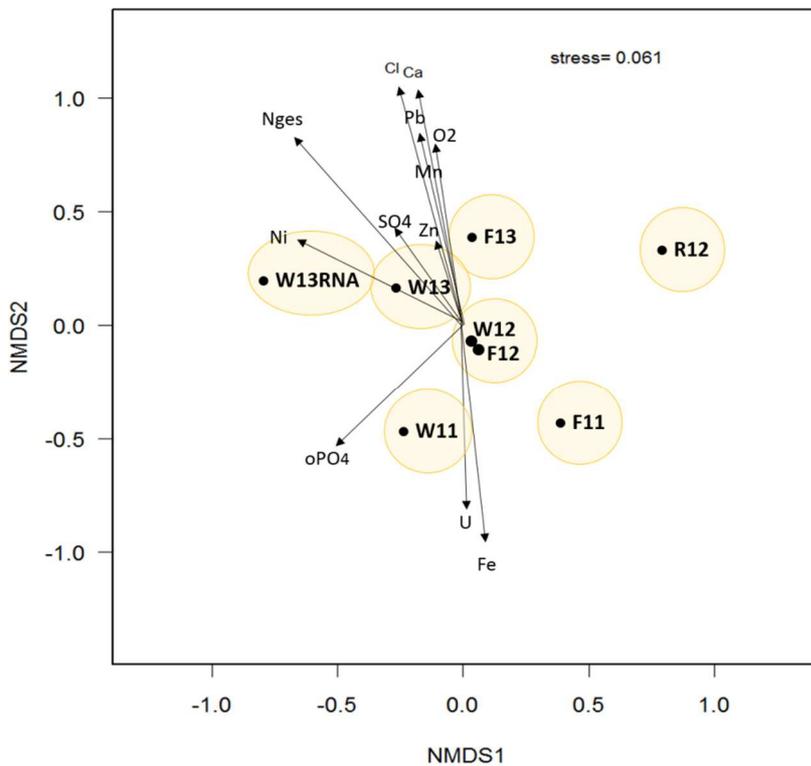
**Tabelle 17: Übersicht über die chemischen Parameter für die Proben, die für die Generierung der bakteriellen 16S rDNA Pyrosequenzierungs-Bibliothek genutzt wurden.**

Probe	Datum	pH-Wert	O <sub>2</sub> [mg/l]	Ca [mg/l]	Fe [mg/l]	Mn [mg/l]	NH <sub>4</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	Cl <sup>-</sup> [mg/l]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	Zn [mg/l]	Ni [mg/l]	Pb [mg/l]	U [mg/l]	N_ges [mg/l]	P_PO <sub>4</sub> [mg/l]	TOC [mg/l]
Wasser (W11) Flusszelle (F11)	11/2011	2,8	1,9	103,0	149,0	2,6	1,9	36,0	823,0	4,4	0,3	0,1	17,0	1,5	0,241	1
Wasser (W12) Flusszelle (F12) Reaktor (R12)	10/2012	3,2	2,6	194,0	52,9	2,6	2,1	97,0	745,0	3,7	0,3	0,2	5,7	1,6	0,188	0,1
Wasser (W13) Flusszelle (F13)	07/2013	2,9	4,7	261,0	57,3	6,9	2,5	145,0	977,0	6,3	0,4	0,5	9,6	2,0	0,214	0,0
Wasser (W13RNA)	03/2013	3,1	2,5	213,0	50,1	2,7	2,4	127,0	810,0	3,6	0,4	0,2	6,5	2,5	0,244	0,0

Einige der dargestellten chemischen Parameter (Tabelle 17), der für die Erstellung der Pyrosequenzierungs-Bibliotheken ausgewählten Proben, zeigten Unterschiede zwischen den Probenahmestellen. Die Calcium-Konzentration stieg von 103 mg/l im Jahr 2011 auf 261 mg/l im Jahr 2013 an, genauso wie die Werte für O<sub>2</sub>, Mn, Cl<sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>-</sup> und SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, die 07/2013 die höchste Konzentration aufwiesen. Uran sowie Eisen wurden zum Probenahmezeitpunkt 11/2011 mit der höchsten Konzentration (17 mg/l und 149 mg/l) gemessen. Die Elemente Ni und Pb und Zn waren zwischen den Proben nur geringen Schwankungen ausgesetzt. Der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) nahm von 2011 bis 2012 ab, am Probenahmezeitpunkt 07/2013 konnte kein TOC gemessen werden. Welcher

dieser chemischen Parameter die Zusammensetzung der Bakterien je Probe beeinflusst, wurde durch eine Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (Cox, 1994, Kruskal, 1964) mit Hilfe des Programms R (R. Development, 2010) auf der Basis der relativen Häufigkeit jeder Sequenz je OTU (0,03 Sequenz Divergenz) und der chemischen Parameter (Stressfaktoren) je Probenahmestelle ermittelt und gegenübergestellt (Abbildung 21).

Im NMDS-Diagramm (Abbildung 21) wurden die analysierten Proben gelb eingekreist, um sie von den chemischen Parametern hervorzuheben.



**Abbildung 21: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die bakteriellen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse.** *Eingekreist sind die verwendeten Proben dargestellt W11: Wasser 2011, W12: Wasser 2012, W13: Wasser 2013, W13RNA: Wasser 2013 RNA, F11: Flusszelle 2011, F12: Flusszelle 2012, F13: Flusszelle 2013, R12: Reaktor 2012.*

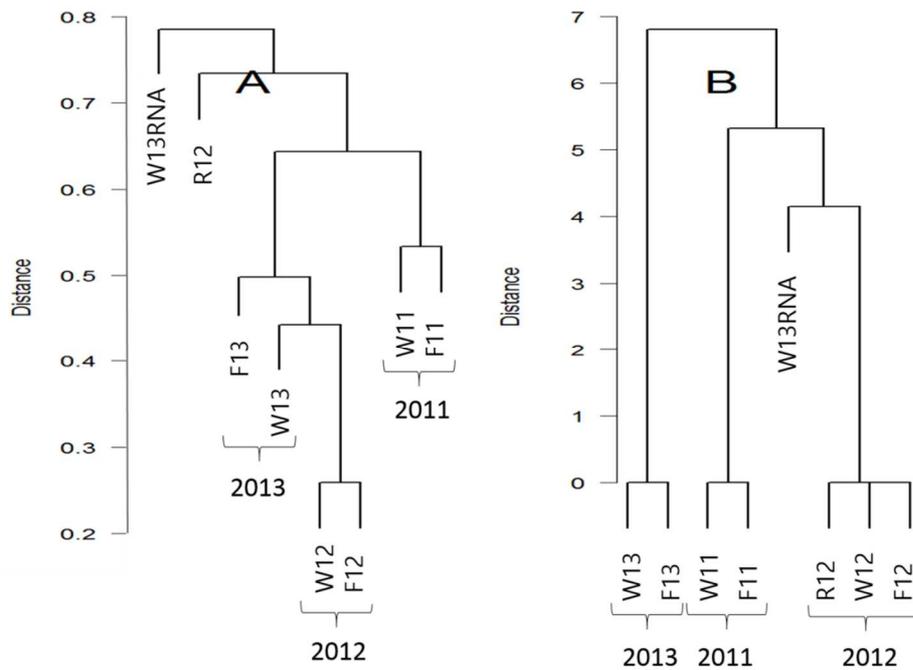
Die Koordination der NMDS zeigt, dass W12 und F12 (beide 2012 beprobt) dicht nebeneinander liegen, und somit sehr ähnlich zu einander waren (Abbildung 21). D.h. die Biofilme der Flusszelle und das Wasser der Grube im Jahr 2012 unterlagen den gleichen chemischen Faktoren. Das resultierte in einer sich sehr ähnelnden Bakterienzusammensetzung. Die NMDS-Analyse zeigt für die Biofilmprobe 2013 (W13) eine positive Korrelation, für die Biofilmprobe 2011 (F11) eine negative Korrelation (Abbildung 21) zum Stickstoff- (Nges bzw.  $\text{NH}_4^-$ ) und Nickelgehalt (Ni). Die Probenpunkte, die innerhalb der Pfeilkoordinaten des NMDS-Diagramms zentral liegen z.B. W12 und F12 korrelieren mit keinem Parameter (Abbildung 21). Nur Proben, die auf einem Pfeil bzw. eher am Pfeilende eines Parameters

im NMDS-Diagramm liegen, unterliegen stärker dem Einfluss der chemischen Faktoren. Die chemischen Parameter, die laut Berechnung signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in allen untersuchten Proben hatten, waren der Stickstoffgehalt (Nges bzw.  $\text{NH}_4^-$ ) (Signifikanz  $P < 0,0001$ ), sowie  $\text{Cl}^-$  (Signifikanz  $P = 0,001$ ) und Ca (Signifikanz  $P = 0,01$ ). Die Konzentrationen der signifikanten chemischen Parameter stiegen im Laufe der Jahre von 2011 und 2013 stetig an: Nges (1,5 bis 2,5 mg/l),  $\text{Cl}^-$  (36 bis 145 mg/l), Ca (103 bis 161 mg/l) (siehe Tabelle 17). Betrachtet man dazu die Position der Probenpunkte im NMDS-Diagramm (Abbildung 21) im Verlauf der Jahre von 2011, 2012 bis 2013, so wird ersichtlich, dass sich der Einfluss der Parameter Nges, Ca und  $\text{Cl}^-$  von 2011 bis 2013 verändert. 2011 hatten die genannten Parameter negativen Einfluss, 2012 keinen Einfluss und 2013 einen geringen positiven Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft. Die höheren Ca- und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen im Jahr 2013 im Vergleich zu 2011 beruhen auf der Neu-Flutung des Erzgesteins und somit der Freisetzung von höheren Konzentrationen an Calcium- und Chlorid-Ionen. Steigende Konzentrationen an Stickstoff bzw. Ammonium-Ionen in den Proben aus dem Jahr 2013 (F13 und W13) könnten auf anoxische Zonen im Wasser hinweisen, was den Anstieg von Sulfat-reduzierenden Bakterien (Deltaproteobacteria und Firmicutes) im Jahr 2013 im Vergleich zu den Jahren 2011 und 2012 erklären könnte. Einige Sulfat-reduzierende Bakterien z.B. *Desulfovibrio* sind als Stickstoff-fixierende Bakterien von Bach (Bach, 1955) beschrieben worden. Heterotrophe *Desulfovibrio* Arten sind sogar in der Lage Trinitrotoluol (TNT) als einzige Stickstoff-Quelle zu nutzen (Boopathy, 1992). Im Grubenwasser Königstein sind einige Nitrotoluol-Verbindungen nachgewiesen (siehe Kapitel 4.1.) worden und könnten somit als Stickstoff-Quelle für Sulfatreduzierer fungieren. Ein sicherer Nachweis für Stickstoff-fixierende Bakterien wäre die Amplifizierung der Nitrogenase Gene *nif* die für den Enzymkomplex Nitrogenase codieren und Stickstoff durch Reduktion bioverfügbar machen (z.B.  $\text{N}_2$  zu Ammonium-Verbindungen). Desai (Desai *et al.*, 2013) wies in ihrer Studie über das „Frasassi cave“ Ökosystem *nifH* in *Desulfovibrio spp.* und *Geobacter spp.* nach und bestätigte somit die Funktion der Stickstofffixierung in den genannten Bakterien, die auch im Grubenwasser und den Biofilmen in Königstein im Jahr 2013 nachgewiesen wurden.

Für die Beurteilung der Ähnlichkeit der Populationen zwischen den Proben wurde eine Clusteranalyse basierend auf den chemischen Umweltparametern (B) und den OTU basierten Analysen der Pyrosequenzierungs-Bibliotheken (A) erstellt und in Abbildung 22A und B dargestellt.

Die Clusteranalyse B (Abbildung 22B) gibt an, welche Proben sich im Hinblick auf die chemischen Parameter am ähnlichsten sind. Dabei sind, wie zu erwarten, drei ausgeprägte Cluster zu erkennen, die alle mit dem jeweiligen Probenahmezeitpunkt korrelierten bzw. den gleichen chemischen Einflussfaktoren unterlagen (Tabelle 17: Übersicht über die chemischen Parameter für die Proben, die für die Generierung der bakteriellen 16S rDNA Pyrosequenzierungs-Bibliothek genutzt wurden.,

Abbildung 22). Das erste Cluster bildeten W13 und F13 (07/2013), ein zweites Cluster W11 und F11 (11/2011) und ein drittes Cluster R12, W12 und F12 (10/2012). Die Probe W13RNA unterschied sich anhand der chemischen Parameter am deutlichsten von den Proben, lag jedoch innerhalb des Clusters der Proben aus dem Jahr 2012: R12, W12 und F12 (Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Dendrogramme der Clusteranalyse mit den ausgewählten Proben der DNA und RNA-basierten Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der Bakterien durch (A) relative OTU Anteile an der Gesamtsequenzanzahl und Bray-Curtis Unähnlichkeiten oder (B) standardisierte Messungen der Umweltparameter und Euclidean Entfernungen.**

Zeigen sich Ähnlichkeiten des Dendrogramms B mit A in der Clusterzusammensetzung, so deutet das auf einen Einfluss der chemischen Faktoren im Grubenwasser auf die bakterielle Zusammensetzung hin. Im Dendrogramm A (Abbildung 22A) der Clusteranalyse erkennt man, dass die Probe W11 Ähnlichkeiten zu Probe F11 aufwies und gemeinsam ein Cluster bildeten, wie in Dendrogramm B. Das ist nicht verwunderlich, da die Proben des Jahres 2011 den gleichen chemischen Einflussfaktoren unterlagen. Ein weiteres Cluster im Dendrogramm A bildeten F12 und W12, die sich in der mikrobiellen Zusammensetzung ähnelten und auch in Dendrogramm B in einem Cluster zu finden waren (Abbildung 22A und B). Die Umweltparameter des Grubenwassers haben somit einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung der beiden genannten Cluster der Jahre 2011 und 2012 (W11-F11 und W12-F12). Auch die Proben des Jahres 2013 (W13 und F13) bildeten ein Cluster, zusammen mit den Proben des Jahres 2012. Das heißt, hier war der Einfluss der Umweltparameter auf die Zusammensetzung der Bakterien nicht so ausgeprägt, wie in den Jahren 2011 und 2012. Alle weiteren Proben (in Dendr. A)

R12 und W13RNA separierten sich und bildeten nicht die gleichen Cluster, wie in Dendr. B. Für diese Proben konnte kein eindeutiger Zusammenhang zu den wechselnden chemischen Faktoren des Grubenwassers festgestellt werden. Sie unterlagen weiterhin die bakterielle Zusammensetzung beeinflussenden Faktoren. Für die Probe R12 (Reaktor Biofilm 10/2012) könnte die Ursache darin liegen, dass sich auf dem Reaktor-Träger ein Kläranlagen-Biofilm befand, der noch nicht vollständig von der Grubenwasser Population verdrängt wurde und zur Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft bzw. des Ergebnisses führte. W13RNA könnte unter dem Einfluss der Extraktionsmethode gestanden haben, da die RNA, anstatt DNA (wie bei allen andern Proben) isoliert wurde.

#### **4.3.6. Quantifizierung und Charakterisierung ausgewählter Mikroorganismen nach klassisch mikrobiologischen Methoden**

Die Charakterisierung der mikrobiellen Diversität eines Habitats schließt die Charakterisierung der physiologischen Leistungen der darin vorkommenden Mikroorganismen ein. Die bisher durchgeführten molekularbiologischen Methoden beruhten auf der Analyse der RNA und DNA. Diese Untersuchungen erlauben jedoch keinen Rückschluss auf die Physiologie und damit die Funktion einzelner Mikroorganismen innerhalb einer Biozönose. Aufgrund der hohen Eisen- und Sulfat-Gehalte im Grubenwasser sollte der Fokus insbesondere auf der Isolierung und Kultivierung von Eisen-oxidierenden, Schwefel-oxidierenden und Sulfat-reduzierenden Bakterien liegen. Die Kulturen sollten anschließend morphologisch charakterisiert werden. Die Arbeitsaufgabe der Kultivierung und Charakterisierung der Kolonien wurde unter meiner Anleitung im Rahmen einer Masterarbeit durch Sandra Köppchen durchgeführt und interpretiert.

##### *4.3.6.1. Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl*

Die Gesamtzellzahl gibt die Zahl der lebenden und toten Mikroorganismen in einem bestimmten Volumen an und gibt Auskunft darüber, wie dicht besiedelt ein Habitat ist. Der Durchschnittswert für die Gesamtzellzahl aus den Zählungen betrug für das Königstein Grubenwasser  $1,46 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Zellzahl erscheint im Vergleich zu „acid mine drainages“ an Abraumhalden mit einer Zellzahl bis zu  $1 \times 10^9$  Zellen/g TG (Kock, 2008) niedrig. Jedoch vor dem Hintergrund, dass Bodenproben bzw. Sedimente generell eine höhere Zellzahl aufweisen als Wasserproben. Das Grubenwasser aus Königstein stellt durch die sehr geringen Gehalte an organischer Substanz (TOC), Stickstoff und Phosphor ein sehr nährstoffarmes Milieu dar im Gegensatz zu Bodenproben von Abraumhalden. Das könnten weitere limitierende Faktoren, zusätzlich zu dem niedrigen pH-Wert und dem hohen Schwermetallgehalt, sein. Im Fluss „RioTinto“ in Spanien, der anhand des niedrigen pH-Wertes und der hohen Schwermetallkonzentrationen mit dem Königstein-Milieu vergleichbar ist, wurden Zellzahlen

von  $10^5$  bis  $10^7$  ermittelt (Gonzalez-Toril *et al.*, 2003), abhängig von dem jahreszeitlichen Einfluss. Die Zellzahl im AMD-Milieu „Lower Red Eye“ in Pennsylvania dagegen betrug ca.  $10^4$  Zellen/ml (Brown *et al.*, 2011) und ist damit geringer, als die des Grubenwassers Königstein. Die Zellzahlen verschiedener AMD-Umgebungen variieren trotz scheinbar ähnlicher Bedingungen stark, liegen jedoch unter den Zellzahlen, die in Sedimenten der entsprechenden Probestellen ermittelt wurden (Brown *et al.*, 2011).

Die Lebendzellzahl gibt die Anzahl lebender Mikroorganismen in einer Population an. Die Lebendzellzahl der aerob lebenden Mikroorganismen wurde mit einem maximalen Wert von  $3,3 \times 10^3$  KbE/ml Grubenwasser ermittelt, was einem Anteil aerob kultivierbarer Mikroorganismen von 0,23 % an der Gesamtzellzahl entspricht. Für anaerob lebende Mikroorganismen ist die Lebendzellzahl mit einem Wert von bis zu 0,24 KbE/ml Grubenwasser errechnet worden. Allerdings gibt die so errechnete Lebendzellzahl nicht die gesamte Zellzahl der lebenden Zellen im Grubenwasser an, sondern nur die, die auf den getesteten Nährmedien kultivierbaren Zellen. Der wirkliche Wert der absoluten Lebendzellzahl liegt vermutlich weit höher. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Lebendzellzahl ist die Zählung der lebenden Zellen mittels CARD-FISH wie z.B. in der Studie von Kock und Schippers (Kock, 2008), in der mittels CARD-FISH eine Lebendzellzahl von bis zu  $1 \cdot 10^7$  Zellen/g TG in „acid mine drainage“ Proben einer Abraumhalde erreicht wurde. Das entspricht ca. 13 % lebende Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Würde man dieses Verhältnis auf die Gesamtzellzahl des Königstein Grubenwassers anwenden, so läge die Anzahl lebender Zellen bei  $1,8 \cdot 10^5$  Zellen/ml.

#### 4.3.6.2. Aerobe Eisen- und Schwefelbakterien

Im Grubenwasser Königstein wurden im Laufe der Jahre konstant oxidierende Bedingungen gemessen, die auf eine aerob lebende mikrobielle Biozönose hinweisen. Daher wurde der Fokus vorrangig auf aerobe Mikroorganismen gelegt. Die Sulfatkonzentrationen stiegen im Grubenwasser mit zunehmender Flutung der Grube im Zeitraum von 2009 bis 2013 stetig an. Betrug die Konzentration im Jahr 2009 im Durchschnitt noch 495 mg/l, so hat sich der Gehalt an Sulfat-Ionen im Jahr 2013 mit 843 mg/l fast verdoppelt. Der Anstieg des Sulfats durch neu geflutete Gesteinsschichten und mikrobielle Einflüsse können mögliche Ursachen sein. Auch die Tatsache, dass Eisen-Ionen im Grubenwasser bei einem pH-Wert von ca. 3,0 teilweise als Eisen(III) vorliegen, weist auf einen Einfluss durch Eisen-oxidierende Mikroorganismen hin. Die Fähigkeit Schwefel zu Sulfat und/oder Eisen (II) zu Eisen (III) zu oxidieren besitzen eine große Anzahl von aeroben Mikroorganismen verschiedenster Gattungen. Die meisten acidophilen Schwefel- und Eisen-oxidierenden Bakterien sind innerhalb der Proteobakterien zu finden (Hedrich *et al.*, 2011). Entsprechend den Ergebnissen der Pyrosequenzierung (siehe Kapitel 4.3.1.) zur Bestimmung der bakteriellen Biozönose anhand der 16S rDNA machen Proteobakterien (28-71 %), insbesondere Gamma-Proteobacteria, gefolgt von Alpha-

und Beta-Proteobacteria den Großteil in den Königstein Proben aus. Aus diesem Grund wurden die Eisen- und Schwefelbakterien näher untersucht.

#### 4.3.6.2.1. *Most probable number der Eisen- und Schwefelbakterien*

Zur quantitativen Untersuchung der Grubenwasserproben Königstein auf aerobe Eisen- und Schwefeloxidierer wurden MPN-Versuche durchgeführt (Durchführung siehe Kapitel 3.8.3.). Mithilfe der Ermittlung der „most probable number“ kann die Zahl spezifischer Mikroorganismen in Umweltproben abgeschätzt werden. Dabei ist zu bedenken, dass es sich um einen geschätzten Wert handelt, der auf statistischen Berechnungen beruht (Best, 1990). Der tatsächliche Gehalt der Mikroorganismen in der Umwelt kann von den berechneten Werten abweichen. Zur Abschätzung des Gehalts an Eisenoxidierern wurden jeweils drei unabhängige MPN-Versuche mit den Nährmedien FeTSB, Fe-Medium, Fe-komplex (Johnson, 1987, Johnson, 1991) in flüssiger Form durchgeführt (siehe Kapitel 3.8.3.). FeTSB enthielt für das Wachstum von heterotrophen und mixotrophen Eisenoxidierern eine organische C-Quelle in geringer Konzentration. Die Nährmedien Fe-Medium und Fe-komplex waren selektiv für autotrophe Eisenoxidierer. Zur Quantifizierung autotropher Schwefeloxidierer wurden ebenfalls drei MPN-Versuche mit dem SO-Medium [12] durchgeführt.

Für Eisen-oxidierende Mikroorganismen im Grubenwasser wurde die „wahrscheinliche Zellzahl“ von  $8 \times 10^3$  -  $25 \times 10^3$  MPN/ml ermittelt. Die „wahrscheinliche Zellzahl“ der Schwefeloxidierer fiel mit  $2 \times 10^3$  -  $6 \times 10^3$  MPN/ml geringer aus. In Bezug auf die ermittelte Gesamtzellzahl ( $1,46 \times 10^6$  Zellen/ml) im Grubenwasser (Kapitel 4.3.6.1.) wurde ein geschätzter Anteil von 0,6 - 1,7 % kultivierbarer Eisenoxidierender Mikroorganismen, sowie 0,1 - 0,4 % Schwefel-oxidierender Mikroorganismen ermittelt. Es ist zu berücksichtigen, dass bei den Anteilen auch Mikroorganismen doppelt erfasst wurden, da einige Eisenoxidierer gleichzeitig Schwefel oxidieren können. Die prozentualen Anteile können somit nicht summiert werden. Beim Vergleich der Lebendzellzahl und deren Anteil aerob kultivierender Mikroorganismen an der Gesamtzellzahl von 0,23 % und den geschätzten Anteilen der MPNs für Eisen- und Schwefeloxidierer, sollte Anteil der Lebendzellzahl höher liegen, als der Anteil an Schwefel- und Eisenoxidierern im Grubenwasser. Der Anteil kultivierbarer Eisenoxidierer (0,6-1,7 %) liegt jedoch weit über dem Anteil für alle aeroben Mikroorganismen (0,23 %). Eine Ursache dafür könnte die Ermittlung der Lebendzellzahl mit einem Vollmedium sein, auf dem autotrophe Eisen- und Schwefeloxidierende Mikroorganismen durch heterotrophe Arten im Wachstum gehemmt werden. Ein weiterer Grund ist die geschätzte Zellzahl mittels MPN, die von den ermittelten Werten abweichen kann. Im Vergleich dazu sind in der Literatur Daten aus einer Uranmine in Brasilien mit vergleichbaren Bedingungen zu finden (pH-Wert: ~3,4; Sulfat: 1,4 g/l; Eisen: 19,98 mg/l, Uran: 8,72 mg/l) (Campos, 2010). In vergleichbaren Versuchen wurden dabei für Schwefeloxidierer Konzentrationen von bis zu  $\sim 6 \times 10^3$  MPN/ml ermittelt, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar ist. Für Eisenoxidierer

wurden mit Konzentrationen bis zu  $\sim 2,5 \times 10^3$  MPN/ml deutlich geringere Zellzahlen ermittelt, als im Grubenwasser Königstein. In der Uranmine in Brasilien dominieren die Schwefeloxidierer vor den Eisenoxidierern. Dies verdeutlicht die Dominanz der Eisenoxidierer im Grubenwasser Königstein. Bei der Ermittlung der MPN im vergleichbaren Habitat „RioTinto“, einem sauren (pH  $\sim 2,5$ ) Eisen (5,7 g/l)- und Sulfat (15,98 g/l)-haltigen Fluss in Spanien, war eine pH-Wert abhängige Schwankung der MPNs für Eisen- und Schwefeloxidierer beobachtet worden (Lopez-Archilla, 1999). In dem pH-Intervall zwischen 2,5 und 3,0 betrug die MPN für Schwefel-oxidierende Bakterien des RioTinto zwischen  $2,5 \times 10^2$  und  $5 \times 10^7$  Zellen/ml, für Eisenoxidierer lag die Zellzahl zwischen  $3,5 \times 10^1$  und  $2,8 \times 10^9$  Zellen/ml. Die Werte sind vergleichbar mit den MPNs des Königstein Grubenwassers, die im Mittelfeld der „wahrscheinlichen Zellzahlen“ des RioTinto liegen. Die höheren Zellzahlen des RioTinto wurden vorwiegend bei pH-Werten  $< 3,0$  gemessen. Bei steigendem pH-Wert sinkt die Zahl lithoautotropher Bakterien dagegen ab. Bei einem pH-Wert größer 3,0 wurde nur noch eine „wahrscheinliche Zellzahl“ von  $0,0 \times 10^0$  bis  $1,4 \times 10^4$  Zellen/ml für Sulfatreduzierer und von  $0,0 \times 10^0$  bis  $9 \times 10^4$  für Eisenreduzierer ermittelt (Lopez-Archilla, 1999). In dem Habitat des RioTinto spielen neben dem pH-Wert auch die Temperatur, die schwankende Konzentration an Metallionen und der saisonale Einfluss eine Rolle. Da eine saisonale Schwankung im Grubenwasser Königstein keinen Einfluss hat, und eine konstante Temperatur von ca.  $14^\circ\text{C}$  vorliegt, waren die Schwankungen der MPNs für Eisen- und Schwefeloxidierer im Königstein Grubenwasser im Vergleich zum RioTinto Habitat gering. Die Ergebnisse der MPN-Versuche wiesen auf den Unterschied zwischen den Konzentrationen von Eisen- und Schwefeloxidierern im Grubenwasser hin. Das größere Potential der indirekten Uranmobilisierung durch die Oxidation anorganischer Bestandteile (Francis, 1998) scheint hier von Eisen-oxidierenden Bakterien auszugehen.

#### 4.3.6.2.2. Isolierung der Eisen- und Schwefelbakterien

Eisen- und Schwefeloxidierer leisten in ehemaligen Bergbauminen aller Art einen Beitrag zur Entstehung von sog. „Sauren Grubenwässern“. Die Stoffwechsellleistungen der Mikroorganismen führen zu einer Ansäuerung der Umgebung und begünstigen somit die sukzessive Lösung von Metallen aus dem Gestein (Baker, 2003). Auch die Mobilisierung von Uran wird in der Umwelt durch die mikrobielle Bildung von Schwefelsäure und Eisen(III)-Ionen vorangetrieben (Pal, 2010). Um das vorhandene Potential der Uranmobilisierung von Eisen- und Schwefeloxidierern im Grubenwasser der ehemaligen Uranmine Königstein abschätzen zu können, wurde neben der quantitative Analyse (MPN), auch die Isolierung und Charakterisierung der metabolisch aktiven Mikroorganismen durchgeführt.

Zur Identifizierung der metabolisch aktiven Eisen- und Schwefeloxidierer im Grubenwasser Königstein wurden die Mikroorganismen auf allgemeinen und selektiven Festmedien kultiviert. Die

Zusammensetzung der Nährmedien (siehe Kapitel A 2.) für die Kultivierung orientierte sich an den chemischen Parametern des Grubenwassers (Tabelle 11, Kapitel 4.1.). Dieses ist neben dem Vorhandensein von Uran durch eine hohe Eisen- und Sulfatkonzentration, sowie durch einen pH-Wert von < 3 gekennzeichnet. Eine Übersicht der selektiven Eigenschaften der einschichtigen Nährmedien K-PCA, PCA, Fe-Medium, Fe-komplex, Fe-Thio, FeTSB, FeTSB-Thio und SO-Medium, sowie der zweischichtigen Nährmedien Feo, Feso und Feto ist im Anhang in den Kapiteln A 2.1.1. und 2.1.2. zu finden.

**Tabelle 18: Selektive Eigenschaften der Nährmedien für Eisen- und Schwefeloxidierer, Acidophile und Heterotrophe mit der Anzahl an Isolat.**

<sup>1</sup>: *ac* = acidophile; *a* = autotroph; *hm* = heterotroph/mixotroph; *EO* = Eisenoxidierer; *ESO* = Eisen- und/oder Schwefeloxidierer; *SO* = Schwefeloxidierer

Nährmedium	Elektronendonator	zusätzl. Basalsalze	Nährstoffzusatz	Zielorganismen <sup>1</sup>	Anzahl isolierter Prokaryoten
Fe-Medium	FeSO <sub>4</sub>	-	-	ac a EO	3
Fe-Komplex	FeSO <sub>4</sub>	+	-	ac a EO	3
Fe-Thio	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	-	ac a ESO	8
K-PCA 3	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	-	ac a ESO	6
K-PCA 3 Filter	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	-	ac a ESO	5
FeTSB	FeSO <sub>4</sub>	-	TSB	ac hm EO	17
FeTSB-Thio	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	TSB	ac hm ESO	10
Feo	FeSO <sub>4</sub>	-	TSB	ac EO	1
Feso	FeSO <sub>4</sub>	-	TSB	ac ESO	1
Feto	FeSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	TSB	moderate ac ESO	3
K-PCA 7 G	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	Glukose	moderate hm ESO	2
K-PCA 7 H	FeSO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	Hefeextrakt	moderate hm ESO	4
SO	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	SO	1
PCA 2	-	-	Hefeextrakt, Glukose	ac hm	3
PCA 2 H	-	-	Hefeextrakt	ac hm	1
PCA 7	-	-	Hefeextrakt, Glukose	moderate hm	11
PCA 7 Filter	-	-	Hefeextrakt, Glukose	moderate hm	4

Die Anzahl isolierter Prokaryonten variierte stark zwischen den einzelnen Nährmedien (Tabelle 18). Auf dem FeTSB-Medium konnte mit 17 Isolat die größte Anzahl an Isolat mit visuell unterschiedlicher Kolonimorphologie isoliert werden. Die Medien PCA 7 und FeTSB-Thio wiesen ebenfalls zweistellige Zahlen morphologisch unterschiedlicher Kolonien auf. Die drei genannten Nährmedien mit den meisten Kolonien wiesen alle einen Nährstoffzusatz in Form einer Kohlenstoffquelle auf, der insbesondere heterotrophe Mikroorganismen im Wachstum fördert. Dagegen war auf den zweischichtigen Festmedien Feo und Feso die Dominanz von Kolonien mit nur einer charakteristischen Morphologie auffällig. Die Morphologie der Kolonie wies eine schwarze

Färbung auf und bildete einen orange-gefärbten Hof durch oxidierte Eisen(II)-Ionen. Die Kolonieoberfläche war fest und matt. Das Profil war flach. Auf dem Fe- und FeTSB-Medium konnten ebenfalls Kolonie-bildende Einheiten dieser Morphologie isoliert werden (siehe Abbildung 23 b). Mikroskopisch wurden Stäbchenbakterien identifiziert. Auch auf den Medien SO, für Schwefeloxidierer und PCA 2 H, für heterotrophe Acidophile konnten jeweils nur Kolonien mit einer Morphologie erfasst werden. Die Medien Fe-Medium und Fe-Komplex zur Isolierung von acidophilen autotrophen Eisenoxidierern unterschieden sich lediglich in zusätzlichen Basalsalzen (Fe-Komplex), was aber keine Auswirkungen auf die Zahl der KbE hatte. In beiden Medien wurden jeweils drei unterschiedliche Kolonietypen kultiviert. Insgesamt stand die Isolierung von heterotrophen Acidophilen im Hintergrund. Der niedrige pH-Wert erschwerte die Kultivierung und Isolierung v.a. von autotrophen Mikroorganismen auf Festmedien mit den gebräuchlichen Gelierkomponenten Agar bzw. Agarose. Diese hydrolysieren bei sauren pH-Werten. Dabei entsteht vorwiegend das Monosaccharid Galaktose. Monosaccharide und andere organische Substanzen in hohen Konzentrationen können das Wachstum von autotrophen Mikroorganismen hemmen, die natürlicherweise in oligotrophen Habitaten leben (Harrison, 1984). Durch die Verwendung der zweischichtigen Nährmedien sollte die Effizienz der Kultivierung acidophiler Mikroorganismen erhöht werden (Johnson, 1991). Dabei wurde ein heterotropher Bakterienstamm (*Acidiphilium sp.*) in die untere Schicht eingebettet, der Galaktose verstoffwechselt. Bei kontinuierlicher Diffusion sollten somit auch in der Oberschicht oligotrophe Bedingungen aufrechterhalten werden (Johnson, 1991). Entgegen der Erwartungen konnten auf den zweischichtigen Nährmedien Feo, Feso und Feto weniger Isolate mit visuell unterschiedlicher Morphologie gewonnen werden, als auf den einschichtigen Festmedien. Die Dominanz eines Isolats auf dem Feo- und Feso-Medium führte anscheinend zu einer Hemmung des Wachstums anderer Mikroorganismen, wodurch die Vielfalt der Isolate auf den zweischichtigen Nährmedien stark eingeschränkt wurde. Die Kultivierung von acidophilen Mikroorganismen auf zweischichtigen Festmedien schien sich für den Standort Königstein somit nicht zu eignen. Das Medium Fe-Thio zur Isolierung von acidophilen autotrophen Eisen- und Schwefeloxidierern war am besten geeignet, um die größtmögliche Anzahl autotropher Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie (8 KbE, siehe Tabelle 18) zu isolieren. Die ausführliche Kolonie-Morphologie aller Isolate ist in Tabelle A13 und A14 im Anhang aufgeführt.

#### 4.3.6.2.3. Identifizierung der aeroben Isolate mittels 16S rDNA Sequenzierung

Von ausgewählten Isolaten wurden über dreimalige Verdünnungsausstriche Reinkulturen gewonnen (siehe Kapitel 3.9.1.1.) und die Gesamt-DNA isoliert (siehe Kapitel 3.9.2. und 3.10.3.). Mit der isolierten DNA wurde zur Identifizierung der Isolate eine 16S rDNA-spezifische PCR für Bakterien mittels des Primerpaares 27F\_1492R (Bond, 2000) durchgeführt (siehe Kapitel 3.10.8.). Nach Aufreinigung und

Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Firma GATC [13] wurden die erhaltenen Sequenzen mit Referenzsequenzen der Datenbanken NCBI [7] und RDP [8] verglichen und zugeordnet. In den Tabellen A13 und A14 (Anhang) ist das Ergebnis der Sequenzierung zusammen mit der Charakterisierung der Koloniemorphologie der Prokaryoten detailliert aufgeführt. Zusammenfassend dient die nachfolgende Tabelle 19 zur Übersicht, welche Bakterien mittels Sequenzierung identifiziert worden sind.

Insgesamt wurden 53 Sequenzen identifiziert und in 39 OTUs gruppiert (nicht gezeigt). Die Gattung *Thiomonas* (Abbildung 23 b) war mit 15 Sequenzen die häufigste phylogenetische Gruppe unter den identifizierten Kolonien. Die *Thiomonas* Kolonien konnten sich auf mehreren Nährmedien isolieren und kultivieren lassen: dem heterotrophen FeTSB-Medium, dem autotrophen Fe-Komplex und dem zweischichtigen Feto (siehe Tabelle 19). Da *Thiomonas*-Arten mixotrophe Schwefeloxidierer sind (Arsène-Ploetze, 2010) und sowohl heterotroph als auch autotroph leben können, setzten sie sich in diesem Kultivierungsansatz auf vielen Festmedien als dominierende Spezies durch. *Thiomonas spp.* wurden oft aus Habitaten der „Sauren Grubenwässer“ isoliert (Arsène-Ploetze, 2010). Unter den isolierten *Thiomonas* Arten des Königstein Grubenwassers befanden sich zwei Sequenzen, die der Art *Thiomonas arsenivorans* zugeordnet wurden (siehe Tabelle 19). Diese Spezies können Arsenit (AsIII) zu Arsenat (AsV) oxidieren (Dastidar, 2012). Aufgrund der reduzierten Toxizität und Mobilität von Arsenat im Vergleich zu Arsenit stellt die mikrobielle Arsenoxidation ein Ansatzpunkt für die biotechnologische Sanierung arsenkontaminierter Umgebungen dar (Bruneel, 2003). Im Grubenwasser Königstein wurde Arsen in einer Konzentration von 46-99 µg/l ermittelt (siehe Tabelle 11). Ob die in dieser Arbeit isolierten *Thiomonas*-verwandten Bakterien in der Lage wären Arsenit zu verstoffwechseln, könnte mit der Kultivierung in NaAsO<sub>2</sub>-haltigem Nährmedium und anschließendem KMnO<sub>4</sub>-Screening Assay geklärt werden (Fan, 2008). Die mikrobielle Arsenitoxidation durch *Thiomonas arsenivorans* wurde bereits dokumentiert (Dastidar, 2012). Dagegen ist die mikrobielle Eisenoxidation durch *Thiomonas spp.* in der Literatur noch umstritten. Eine schwarz-braune Koloniefärbung aufgrund von Eisen(III)-Ausfällungen wird als Indiz für die mikrobielle Eisen(II)-Oxidation interpretiert (Slyemi, 2011). Das *Thiomonas*-verwandte Isolat in Abbildung 23 b zeigt diese Koloniemorphologie. Für *Thiomonas sp.* sind schwarz-braune Eisen(III)-Ausfällungen in Flüssigkultur, sowie auf Festmedium bekannt (Battaglia-Brunet, 2006). Durch Slyemi et al. 2011 wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Eisen(III)-Ausfällungen bei *Thiomonas sp.* indirekt durch die abiotische Eisen(II)-Oxidation aufgrund eines Anstiegs des pH-Wertes im Nährmedium entstehen. In einem pH-regulierten Bioreaktor könnte die mikrobielle Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III)-Verbindungen durch die in dieser Arbeit gewonnenen *Thiomonas* Isolate unabhängig vom pH-Wert geprüft werden (Slyemi, 2011).

**Tabelle 19: Die mittels Sequenzierung identifizierten Isolate der auf selektiven Nährmedien gewachsenen Kolonien. Die Art der Kohlenstoffversorgung und die Anzahl der identifizierten Isolate der jeweiligen Art wurden zusätzlich angegeben.**

Name	zugehörig zum Taxon	Nährmedium	C-Quelle	Anzahl der Isolate
<b>Schwefel-oxidierende Bakterien</b>				
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	Beta-Proteobacteria	FeTSB, Fe-Komplex	mixotroph	2
unterschiedliche <i>Thiomonas sp.</i>	Beta-Proteobacteria	FeTSB, Fe-Komplex, Feto	mixotroph	13
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Gamma-Proteobacteria	FeTSB	autotroph	1
<b>Schwefel/Eisen-oxidierende Bakterien</b>				
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Gamma-Proteobacteria	FeTSB, SO-Medium	autotroph	5
<i>Sulfobacillus sp.</i>	Firmicutes	FeTSB-Thio	mixotroph	2
<b>Eisen-reduzierende Bakterien (fakultativ)</b>				
<i>Acidocella sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	FeTSB	heterotroph	2
<i>Acidiphilium cryptum</i>	Alpha-Proteobacteria	FeTSB	heterotroph	1
<i>Acidiphilium sp.</i>	Alpha-Proteobacteria	Fe-Komplex	heterotroph	1
<b>Eisen-oxidierende Bakterien</b>				
<i>Sediminibacterium sp.</i>	Bacteroidetes	K-PCA 7	heterotroph	1
<b>Sulfit-oxidierende Bakterien</b>				
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	Actinobacteria	K-PCA 7	heterotroph	1
<b>Methylotrophe Bakterien</b>				
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Alpha-Proteobacteria	K-PCA 7 G	heterotroph	1
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	Alpha-Proteobacteria	PCA 7	heterotroph	1
<b>Metall-tolerante Bakterien</b>				
<i>Streptomyces sp.</i>	Actinobacteria	PCA 7	heterotroph	1
<b>Sporen-bildende Bakterien</b>				
<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	PCA 7	heterotroph	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Firmicutes	K-PCA 7	heterotroph	1
<i>Paenibacillus sp.</i>	Firmicutes	PCA 7	heterotroph	1
<b>Humanpathogene Bakterien</b>				
<i>Mycobacterium mantenii</i>	Actinobacteria	PCA 2	heterotroph	1
<i>Arthrobacter scleromae</i>	Actinobacteria	PCA 7	heterotroph	4
<b>Weitere Bakterien</b>				
<i>Mycobacterium sp.</i>	Actinobacteria	PCA 2, PCA 7	heterotroph	2
unkultivierte Bakterien	Bakterien	PCA 7	heterotroph	10

Eine weitere dominante Gruppe unter den Kolonien war die Gattung *Acidithiobacillus* mit insgesamt 6 identifizierten Isolaten (Tabelle 19). Die *Acidithiobacilli* waren die einzigen autotrophen Isolate, die auf den Nährmedien gezüchtet werden konnten. *Acidithiobacillus spp.* sind typischerweise in Habitaten der „Sauren Grubenwässer“ zu finden und wurden im Hinblick auf den Beitrag zu deren Entstehung bereits umfassend untersucht (Baker, 2003). Die Arten der Gattung *Acidithiobacillus* leben autotroph unter Nutzung des CO<sub>2</sub> aus der Luft und Oxidation von Eisen- und/oder Sulfat-Ionen. Durch hohe Konzentrationen organischer Substanzen, die heterotrophe Mikroorganismen produzieren, werden autotrophe Eisen- oder Schwefeloxidierer im Wachstum gehemmt (Berthelot, 1997). Trotz zusätzlicher Kohlenstoffquelle konnten zwei verschiedene *Acidithiobacillus* Arten auf dem FeTSB und dem SO-Medium wachsen. 5 Isolate wiesen enge Verwandtschaft zu der Eisen- und Schwefel-

oxidierenden Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* (siehe Abbildung 23 h) auf. Ein weiteres Isolat konnte beim Vergleich mit der Sequenz-Datenbank der Art *Acidithiobacillus thiooxidans* zugeordnet werden. Beide Arten sind für die Fähigkeit Metallsulfide zu oxidieren bekannt. Das macht sie seit vielen Jahren für Bioleaching-Verfahren interessant, indem sie Metalle aus Erzen durch Oxidation von Eisen- bzw. Schwefelverbindungen herauslösen (Sand, 2001). Innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* ist *A. ferrooxidans* allerdings die bisher einzige bekannte Art, die neben reduzierten Schwefelverbindungen und elementarem Schwefel auch Eisen(II) als Elektronendonator verwenden kann (Hallberg, 2010). Die Reaktionsprodukte dieser Stoffwechsellösungen ( $H_2SO_4$  und Eisen(III)) treiben die Mobilisierung von Uran durch die abiotische Oxidation zu Uranylsulfat voran (Pal, 2010, Panak, 1998). *A. ferrooxidans* wurde aus diesem Grund bereits für Untersuchungen zum Bioleaching von Uran aus Minen mit geringem Urangehalt genutzt (Pal, 2010). Zudem kann *A. ferrooxidans* auch direkt mit dem Schwermetall in Form von Biosorption oder Bioakkumulation interagieren. Sowohl *Acidithiobacillus*-, als auch *Thiomonas Spezies* konnten durch die molekularbiologische Methode Pyrosequenzierung als dominante und stoffwechselaktive Gattungen nachgewiesen werden und bestätigen die Dominanz in dem Kultivierungsansatz. Auch in anderen ähnlichen Habitaten, wie z.B. in der ehemaligen Uranmine Ronneburg (Thüringen) dominierten sie die mikrobielle Diversität (Schippers, 1995).

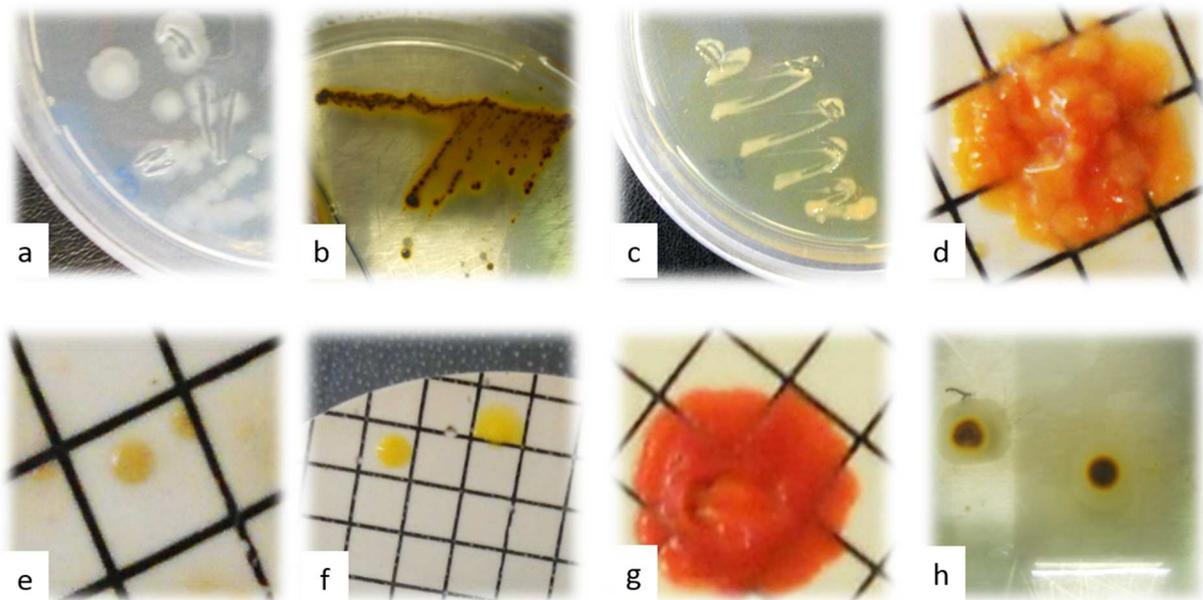
*Sulfobacillus sp.* sind bekannte Vertreter „Saurer Grubenwässer“ (Banks, 1997) und stellen weitere typische Vertreter der acidophilen, Metallsulfid-oxidierenden Bakterien dar (Baker, 2003). In einigen DNA-Proben wurde *Sulfobacillus spp.* bereits mittels Pyrosequenzierung im Grubenwasser Königstein nachgewiesen. Einige Arten können organoheterotroph oder mixotroph mit Eisen(II)- oder elementarem Schwefel als Elektronendonator wachsen. Nach Tabelle 19 wurden *Sulfobacillus sp.* auf dem FeTSB-Thio Medium isoliert, das zur Kultivierung von heterotrophen Eisen- und Schwefeloxidierern diente. *Sulfobacillus* Arten leben entweder autotroph, wie die Arten der Gattung *Acidithiobacillus*, oder mixotroph, wobei sie zusätzlich zur Oxidation von Eisen- und sulfidischen Verbindungen organischen Kohlenstoff z.B. Hefeextrakt oder TSB verwerten (Norris P.R., 1996). Die autotrophe Eisen(II)-Oxidation konnte für *S. acidophilus* und *S. thermosulfidooxidans* nachgewiesen werden (Baker, 2003). Die *Sulfobacillus*-verwandten Isolate dieser Arbeit konnten keiner Art zugeordnet werden. Einige, in der Literatur beschriebene, *Sulfobacillus spp.* konnten bereits in Uran-kontaminierten Habitaten, wie auch in dem ehemaligen Uranbergwerks Königstein, nachgewiesen werden (Ghauri, 2003).

Je zwei Isolate, die mit den Bakterien *Acidiphilium sp.* und *Acidocella sp.* verwandt waren, wurden auf den Nährmedien FeTSB oder Fe-Komplex isoliert (Tabelle 19) Bei beiden Gattungen handelt es sich um acidophile, heterotrophe/mixotrophe Bakterien, die bereits mehrfach aus Habitaten der „Sauren Grubenwässer“ isoliert wurden (Johnson, 2003). Für Vertreter beider Gattungen konnte die

heterotrophe Reduktion von Eisen(III)-Verbindungen nachgewiesen werden (Bridge, 2000, Coupland, 2008). Die Oxidation von Eisen(II) wurde dagegen bisher noch nicht dokumentiert. An den hier isolierten Kolonien wurden auch keine Eisen(III)-Ausfällungen beobachtet, die auf eine Eisen-Oxidation hinweisen würden. *Acidocella sp.* und *Acidiphilium sp.* sind bekannte Vertreter saurer Umgebungen und wurden bereits in „acid mine drainages“ mit hohen Schwermetall-Konzentration (z.B. Kupfer, Nickel, Zink) identifiziert (Gurung, 2009, Hallberg, 2006, Zhang, 2007). Zudem wurde *Acidiphilium sp.* bereits aus Uranminen isoliert (Berthelot, 1997). Während die beiden *Acidocella*-Isolate dieser Arbeit keiner Art zugewiesen werden konnten, wies eine Sequenz der *Acidiphilium* Kolonie Homologien zu der Art *Acidiphilium cryptum* auf (Tab. 21). *Acidiphilium cryptum* wurde erstmals aus einem sauren (pH 3,0) Eisen-haltigen See-Sediment einer Kohlenmine (Ost-Deutschland) isoliert (Küsel, 1999). Der aerobe, heterotrophe *Acidiphilium cryptum* kann durch O<sub>2</sub>-Aufzehrung und Pyrit-Auflösung zur Fe(III)-Reduktion induziert werden. (Baker, 2003). *A. cryptum* kann die Fe(III)-Reduktion mit der Oxidation verschiedener Substanzen z.B. H<sub>2</sub> und Glucose koppeln (Küsel, 2002). Bridge und Johnson beschreiben, dass *A. cryptum* in der Lage ist eine Reihe von Eisen-Mineralen (Akageneit, Goethit, Jarosit, Natrojarosit und Magnetit) durch Reduktion rückzulösen (Bridge, 2000). *Acidiphilium spp.* wären demzufolge Gegenspieler der Eisen-oxidierenden Bakterien *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Sediminibacterium sp.* im Grubenwasser Königstein, vorausgesetzt es bilden sich anoxische oder mikroaerophile Bedingungen im Wasser aus. Im Gegensatz zu *Acidocella* Spezies, die mittels DNA- und RNA-Analyse in allen untersuchten Königstein Proben nachgewiesen wurden, sind *Acidiphilium* Spezies mittels molekularbiologischen Untersuchungen nicht gefunden worden.

Methylobakterien gehören zu den Alpha-Proteobacteria und wurden in den Kultivierungsexperimenten durch 2 Kolonien auf PCA und K-PCA 7G Nährböden isoliert. Jeweils einer dieser Isolate wies Homologien zu Sequenzen von *Methylobacterium extorquens* und zu *Methylobacterium adhaesivum* auf (siehe Tabelle 19). Sie gehören zu fakultativ methylotrophen Bakterien, die reduzierte Kohlenstoffverbindungen z.B. Methanol oder Methylamine für ihren Energiestoffwechsel nutzen können (Green, 1992). Die Isolate wurden aerob gezüchtet und zeigten eine auffällig pink/rote Koloniefärbung (siehe Abbildung 23 g), aufgrund der Anwesenheit von Carotinoiden. *Methylobacterium*-Verwandte sind weit verbreitet und kommen in natürlichen und künstlichen Umgebungen vor (Hiraishi, 2000, Trotsenko, 2001). Einige *Methylobacteria* sind resistent gegen Austrocknung, Frost, Chlor, UV- und ionisierende Strahlung und erhöhte Temperaturen (Trotsenko, 2001), sowie gegen Schwermetalle wie z.B. Zn, Ni, Cu, Pb, Cd, Cr (Koo, 2007). Aus diesem Grund werden sie zur Bioremediation von verschmutzten Umgebungen genutzt (Van Aken, 2004). Neben den hier gezeigten Isolaten, wurden *Methylobacterium* Spezies auch durch die DNA-basierte Pyrosequenzierung im Grubenwasser Königstein nachgewiesen (siehe Kapitel 4.3.1.). Jedoch wurde weder Methanol noch Methan als Grundlage für Methylotrophe im Grubenwasser nachgewiesen. Aber

auch aerobe mesophile Schwefel-oxidierende Bakterien sind unter der Gattung *Methylobacterium* (Kelly, 1990) vertreten. *Methylobacterium extorquens*, der aus dem Grubenwasser Königstein isoliert wurde, besitzt in seinem Genom essentielle SOX Proteine zur Befähigung reduzierte Schwefel-Verbindungen (v.a. Thiosulfat) zu Sulfat zu oxidieren (Anthony, 1982, Friedrich *et al.*, 2001). Dadurch wird die Bildung von Sulfat mikrobiell vorangetrieben und erhöht die Ansäuerung des Grubenwassers im ehemaligen Uranbergwerk Königstein. Die Lösung von Uran und anderen Metallen aus dem metallhaltigen Erz wird dadurch begünstigt. Zuvor wurden *Methylobacterium*-Verwandte nicht mit „acid mine drainage“-ähnlichen Habitaten in Zusammenhang gebracht.



**Abbildung 23: Kolonien einiger ausgewählter identifizierter aerober Isolate.** a) *Arthrobacter scleromae* b) *Thiomonas* sp. c) *Sediminibacterium* sp. d) *Bacillus licheniformis* e) *Paenibacillus* sp. f) *Mycobacterium mantenii* g) *Methylobacterium adhaesivum* h) *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Die isolierten aerob lebenden Bakterien der Gattung *Arthrobacter* sind hauptsächlich als Bodenbewohner bekannt (Hagedorn, 1975) und wurden aus dem Königstein Grubenwasser in 5 Isolaten, als weiß erscheinende Kolonien (Abbildung 23a), auf den heterotrophen Medien PCA7 und K-PCA 7 bei neutralem pH Wert isoliert (siehe Tabelle 19). In wenigen Studien wurden *Arthrobacter* Spezies bisher in unterirdischen Habitaten z.B. in tiefen Gesteinsschichten (Ekendahl, 1994) oder Grundwassersystemen nachgewiesen (Pedersen, 1996b). *Arthrobacter* spp. sind auch als opportunistische pathogene Bakterien bekannt (Huang *et al.*, 2005). 4 Isolate erwiesen sich in dieser Arbeit als *Arthrobacter scleromae*, einem Vertreter, der in menschlichen entzündeten Haut-Proben entdeckt wurde (Huang *et al.*, 2005). Eine weitere Sequenz wurde im Vergleich mit der Datenbank *Arthrobacter sulfonivorans* zugewiesen. *A. sulfonivorans* wurde als fakultativ methylo-trophe Art

beschrieben (Borodina, 2002) und ist in der Lage Sulfit mittels APS-Reduktase und Sulfit-Dehydrogenase zu Sulfat zu oxidieren. Auch in einem sauren Fluss in Frankreich mit einem pH-Wert zwischen 2,7 und 3,4 sowie hohen Arsen- (<350 mg/l) und Eisen-konzentrationen (<2,7 g/l) wurden *Arthrobacter sp.* schon beschrieben (Delavat, 2012). Darüber hinaus sind *Arthrobacter sp.* zur Degradation einer Vielzahl toxischer Bestandteile z.B. Herbizide und Chlorphenol befähigt (Nordin, 2005) und werden daher zur Remediation von verschmutzten Böden genutzt.

*Streptomyces sp.*, die wie *Arthrobacter sp.* zu den Actinobacteria gehören, sind hauptsächlich als Boden- und Süßwasserbewohnende Mikroorganismen bekannt (Kharel, 2010) und bilden verschiedene Duftstoffe (z.B. Geosmin) (Gerber, 1965). Außerdem produzieren viele *Streptomyces spp.* Stoffe, die als Antibiotika genutzt werden (Emerson de Lima Procópio, 2012). Aus dem Grubenwasser Königstein konnten *Streptomyces sp.* als Kolonie auf dem PCA-Medium für heterotrophe neutrophile Bakterien isoliert werden (siehe Tabelle 19). In Studien von Amoroso wurden *Streptomyces Spezies* in einem ehemaligen Uranabbaugebiet in Thüringen mit hohen Metallkonzentrationen nachgewiesen und isoliert (Amoroso, 2000). Die *Streptomyces* Isolate wiesen dabei eine hohe Nickel-Resistenz (10 mM) auf. Einige sporenbildende und filamentöse *Streptomyces species* übernahmen die Funktion Aluminium und Uran zurückzuhalten (Haferburg *et al.*, 2007). Dabei konnten hohe Konzentration (< 2,2 mg/g) der Metalle Al, Cu und U in der Biomasse gebunden werden. Für einige *Streptomyces* Arten ist die Bildung von so genannten Siderophoren (Eisenträgern) typisch (Imbert, 1995). Diese ausgeschleusten Liganden-artigen Verbindungen binden außerhalb der Zelle selektiv Eisen(III)-Ionen, die dann in die Zellen transportiert werden und in der Zelle zu Eisen(II) reduziert werden (Crosa, 2002). Einige komplex aufgebaute Siderophore können z.B. als Chelatoren für Schwermetalle wie Uran und Thorium fungieren (Brainard, 1992). Die Rolle von *Streptomyces sp.* im Grubenwasser Königstein und deren Einfluss auf verschiedene chemische Parameter ist jedoch unklar. Die Existenz der Streptomyceten im Königstein Grubenwasser bestätigt jedoch die hohe Toleranz gegenüber (Schwer-)Metallen, da im Grubenwasser hohe Konzentration z.B. von Zn, Ni, Fe, Pb, Cd, Co und Uran gemessen wurden (siehe Tabelle 11, Kapitel 4.1.).

Eine auf dem heterotrophen neutralen Medium K-PCA 7 isolierte Kolonie wurde nach Sequenzanalyse als *Sediminibacterium sp.* identifiziert (siehe Tabelle 19). *Sediminibacterium species* gehören zum Phylum Bacteroidetes und sind mit einigen Vertretern als Eisen-oxidierende Bakterien beschrieben worden (Qu, 2008, Wang, 2011). *Sediminibacterium spp.*, die aus dem Grubenwasser Königstein isoliert wurden, sind auf dem Nährmedium als beige/gelb/orange pigmentierte Kolonien gewachsen (siehe Abbildung 23c).

4 Isolate aus dem Königstein Grubenwasser konnten der Gruppe der Firmicutes zugeordnet werden. Die Firmicutes Isolate wurden ausschließlich auf Nährmedien (PCA und K-PCA) mit neutralen pH-

Werten für aerobe heterotrophe Bakterien gezüchtet (siehe Tabelle 19). Dabei wurden die Sequenzen drei unterschiedlichen Referenzorganismen zugeordnet: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* und *Paenibacillus sp.*. In Abbildung 23d) und e) sind die Kolonien von *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus sp.* abgebildet. Die Koloniemorphologie von *Bacillus licheniformis* ist auffällig orange pigmentiert und leicht runzlig, schleimig und unregelmäßig (Abbildung 23d). *Paenibacillus sp.* zeigte eine beige, glatte und runde Kolonie (Abbildung 23e). Einige Vertreter der Gattung *Bacillus* wurden aufgrund enzymatischer Reaktionen oder der Produktion von organischen Säuren zum Bioleaching genutzt (Bosecker, 1997). Das würde einer Sanierungsstrategie im Grubenwasser Königstein, bei dem die unlöslichen Metall-Verbindungen abgetrennt werden könnten, entgegenwirken. Einige *Bacillus* Arten sind auf ihre Fähigkeit der Biosorption von Schwermetallen aus Boden/Wasser untersucht worden (Marandi, 2012). Dabei konnte festgestellt werden, dass *Bacillus licheniformis* als Biosorbent fungiert und sowohl Chrom (VI) als auch Thorium und Uran sorbiert (Srinath, 2002). Auch die in dieser Arbeit isolierten *Paenibacillus sp.*, die schon aus Endlager-relevanten Tonformationen (Mont Terri, Schweiz) isoliert wurden, besitzen die Fähigkeit Metalle, wie z.B. Uran (VI) zu binden (Lütke, 2013). *Paenibacillus sp.* leben fakultativ anaerob und bilden Endosporen. Da *Bacillus* und *Paenibacillus*-Vertreter weder in der DNA- noch in der RNA-Analyse nachgewiesen worden (siehe Kapitel 4.3.1.), ist unklar ob diese tatsächlich im sauren Grubenwasser aktiv sind oder ob sich die identifizierten Kolonien aus Sporen entwickelt haben (Lopez-Archilla et al., 2001), die aus Oberflächenwasser oder tieferen Gesteinsschichten ins Grubenwasser geschwemmt worden sind.

Die einzigen Kolonien, die auf dem sauren heterotrophen PCA-Nährmedium gewachsen sind, zeigten Homologien zu Sequenzen von *Mycobacterium sp.* (2 Isolate) und *Mycobacterium mantanii* (1 Isolat) (siehe Tabelle 19). Mykobakterien sind heterotrophe Bakterien, die zur gram-positiven Gruppe der Actinobacteria zugeordnet werden. Die Kolonien der *Mycobacterium*-Isolate zeigten sich in einer grell gelb pigmentierten Färbung mit einer kleinen runden glatten Morphologie (siehe Abbildung 23f). Mykobakterien sind in der Umwelt weit verbreitet z.B. in Süß- und Salzwasser, Trink- und Abwasser, können aber auch opportunistische Pathogene sein (Griffith, 2007). *Mycobacterium mantanii* wurde im Menschen in Lymphknoten gefunden und ist ein pathogener Vertreter (Van Ingen et al., 2009). Durch ihre einzigartige Zellwand (aufgrund von Mycolsäuren) besitzen Mykobakterien eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika und können längere Zeit in sauren oder alkalischen Umgebungen überleben.

Weiterhin wurden 10 Isolate als unkultivierte Bakterien identifiziert (siehe Tabelle 19). Die Kultivierung erfolgte auf dem Vollmedium PCA bei einem pH Wert von 7,0. Womöglich sind die Isolate, die keiner bestimmten Klasse zugeordnet werden konnten, neutrophile heterotrophe Bakterien, die bisher noch nicht näher analysiert und beschrieben wurden. In weiterführenden Arbeiten könnte diese Bakterien

auf ihre physiologischen Merkmale z.B. mittels API-System oder auf verschiedene Stoffwechselprozesse getestet werden, um sie näher zu beschreiben, insbesondere im Hinblick auf Metallimmobilisierung.

Bei Kultivierungsansätzen wurden die Nährmedien auch bei einer Temperatur von 45 °C inkubiert, um moderat thermophile Mikroorganismen zu isolieren. Mit den Kultivierungsansätzen konnten bei dieser Temperatur jedoch keine Kolonien erfasst werden.

#### *4.3.6.3. Anaerobe Sulfat-reduzierende Bakterien*

Vor der Flutung der ehemaligen Uranmine im Jahr 2010 waren anoxische Schlamm und Sandstein-Proben für eine Untersuchung der mikrobiellen Diversität zugänglich. Dabei konnten durch kultivierungsunabhängige Analysen DNA-Sequenzen von Sulfat-reduzierenden Bakterien im anoxischen Schlamm nachgewiesen werden (Seifert, 2008). Nach der Flutung wurde die Diversität des Grubenwassers durch molekulargenetische Analysen untersucht. Die hohen Sulfat-Konzentrationen im untersuchten Grubenwasser ließen vermuten, dass sich trotz oxidierender Bedingungen Sulfatreduzierer unter den Mikroorganismen befinden könnten. Bei der Pyrosequenzierung der 16S rDNA konnten Firmicutes und Delta-Proteobacteria Sequenzen als Sulfat-reduzierende Mikroorganismen nachgewiesen werden z.B. *Desulfosporosinus*, *Desulfitobacterium*, *Desulfovibrio* und *Desulfatirhabdium* (siehe Kapitel 4.3.1.).

##### *4.3.6.3.1. Most probable number der Sulfat-reduzierenden Bakterien*

Zum quantitativen Nachweis anaerober Sulfatreduzierer in den Grubenwasserproben wurden zwei unabhängige MPN-Versuche mit dem Nährmedium aSRB durchgeführt (siehe Kapitel 3.8.3.2.). Das Wachstum von Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen wurde anhand der Bildung von Eisensulfid (FeS) in Form eines schwarzen Niederschlags beobachtet. Die Auswertung erfolgte nach 12 Wochen Inkubation bei Raumtemperatur.

Bei den MPN-Ansätzen wurde eine Schwarzfärbung in Form von Eisensulfid in einzelnen Verdünnungsstufen beobachtet. Aus der Anzahl der positiven Verdünnungsstufen mit schwarzem Niederschlag wurden die „wahrscheinlichen Zellzahlen“ in MPN/ml ermittelt (siehe Kapitel 3.8.3.2.). Die „wahrscheinlichen Zellzahlen“ der beiden MPN-Ansätze schwankten stark zwischen 0,21 MPN/ml und 1,5 MPN/ml. Damit wurde gezeigt, dass metabolisch aktive heterotrophe Sulfatreduzierer im Grubenwasser Königstein vorhanden sind. Die „wahrscheinlichen Zellzahlen“ der Sulfatreduzierer waren wesentlich geringer als die der Eisen- ( $8 \times 10^3$ - $25 \times 10^3$  MPN/ml) und Schwefeloxidierer ( $2 \times 10^3$ - $6 \times 10^3$  MPN/ml) (siehe Kapitel 4.3.6.2.1.). Dies verdeutlicht die Dominanz der oxidativen mikrobiellen Stoffwechselprozesse im untersuchten Habitat, die eine Mobilisierung von Uran begünstigen. Im

Gegensatz zu der ehemaligen sächsischen Uranmine in Pöhla ist das Uranbergwerk Königstein nicht vollständig geflutet. Die Wasseroberfläche kommt somit noch mit Sauerstoff in Kontakt, der sich zu einem gewissen Teil im Wasser löst. Der derzeitige Sauerstoffgehalt des Grubenwassers beträgt 2-4 mg/l (siehe Tabelle 11). Eine vollständige Flutung der Mine würde zur Generierung von anoxischen Bedingungen beitragen, was das Wachstum und den Stoffwechsel anaerober Sulfatreduzierer und somit die Immobilisierung des Urans begünstigen würde. Dies ist jedoch aufgrund eines nahegelegenen Grundwasserleiters nicht möglich (Herr Röder, Wismut GmbH, persönliche Kommunikation).

### **4.3.7. Molekularbiologische Charakterisierung ausgewählter Bakterien Gruppen**

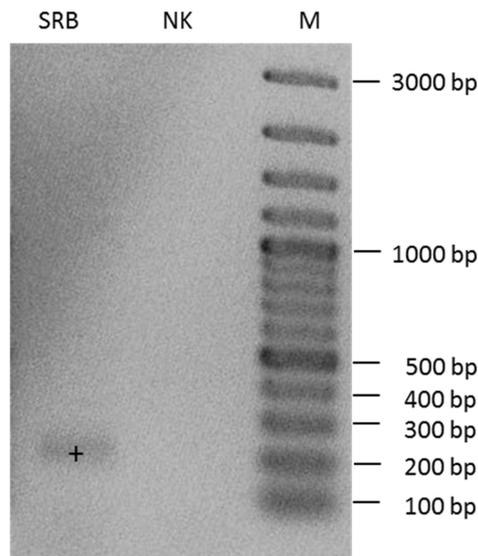
#### *4.3.7.1. Amplifikation der dissimilatorischen Sulfitreduktase*

Als zusätzlicher Nachweis von Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen diente, neben den MPNs für Sulfatreduzierer, die PCR-Amplifikation eines Fragments des Gens *dsrA*, welches die  $\alpha$ -Untereinheit der dissimilatorischen Sulfitreduktase codiert. Die Sulfitreduktase stellt ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel der Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen dar und kann für deren Nachweis herangezogen werden (Ben-Dov, 2007). Die aus den positiven MPN-Ansätzen (siehe Kapitel 4.3.6.3.1.) extrahierte Gesamt-DNA diente als Vorlage für die *dsrA*-spezifische PCR (siehe Kapitel 3.10.8.). Mithilfe der Gelelektrophorese wurde die Bildung des PCR-Produktes mit der korrekten Größe von 222 bp kontrolliert. Im Gelbild in Abbildung 24 ist das PCR-Produkt zu sehen (Spur SRB). Bei dem Vergleich der Laufweite des PCR-Produkts mit dem Größenmarker (Spur M) ist zu erkennen, dass das PCR-Produkt die erwartete Größe aufwies.

Es waren keine unspezifischen Banden zu erkennen. In der Negativkontrolle (Spur NK) wurde wie erwartet kein PCR-Produkt amplifiziert.

Die Amplifikation des *dsrAB* Gens ist im Zusammenhang mit der Identifizierung Sulfatreduzierer weit verbreitet. Da Sulfat-reduzierende Bakterien (SRB) eine große Rolle bei der Kopplung des Schwefelkreislaufs mit Schwefel-assoziierte (Halb)Metallen (Moreau, 2010) spielen, können sie einen starken Einfluss auf die Speziation und die Mobilität von Metallen bzw. Radionukliden ausüben.

In Untersuchungen einer Langzeit-„acid mine drainage“ nahe San Francisco, USA (Moreau, 2010) wurde die Amplifikation mit anschließender Sequenzierung des *dsrAB* Gens genutzt, um die Sulfatreduzierer-Population in diesem Habitat zu identifizieren. Daraufhin konnte in dem genannten Habitat ein hoch dynamischer durch mikrobielle Aktivität induzierter Schwefelkreislauf ermittelt werden, der die Speziation und die Mobilität Schwefel-assoziiertes Metalle beeinflusst. Das *dsrA*-Amplifikat der Königstein-Proben konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich sequenziert werden.



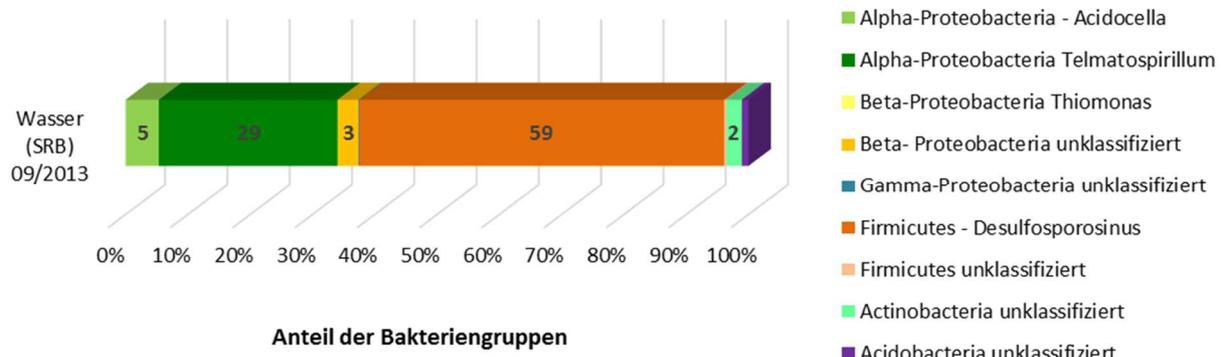
**Abbildung 24: Kontrolle der Amplifikation des *dsrA*-Fragments. Aufnahme des Agarosegels der Gelelektrophorese. Spur SRB: PCR-Ansatz mit isolierter DNA aus positiven MPN-Verdünnungsstufen. Spur NK: Negativkontrolle. Spur M: DNA-Marker GeneRuler® 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Die DNA-Bande mit korrekter Größe wurde mit einem Kreuz markiert.**

#### 4.3.7.2. Identifizierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien mittels Pyrosequenzierung

Aus den MPN-Ansätzen (siehe Kapitel 4.3.6.3.1.) konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Reinkulturen gewonnen werden. Jedoch erfolgte die Identifizierung der Bakterien aus der MPN-Mischkultur mithilfe der Pyrosequenzierung. Aus den positiven MPN-Ansätzen wurde die Gesamt-DNA isoliert. Die Sulfat-reduzierenden Bakterien wurden durch eine 16S rDNA-spezifische PCR mit dem Primerpaar U341F-R4 (siehe Tabelle 8) und anschließender Pyrosequenzierung identifiziert. Die Sequenzen wurden, entsprechend der Angaben im Kapitel 3.11.2., bearbeitet. Der relative Anteil der ermittelten phylogenetischen Gruppe je Sequenzbibliothek ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Einteilung der Sequenzen in Phyla ergab für die Bibliotheken sechs Taxa, wobei die Sequenzen mit Homologien zu nicht klassifizierbaren Sequenzen mit berücksichtigt worden sind. Insgesamt wurden 1310 Sequenzen aus den MPN-Ansätzen für Sulfatreduzierer analysiert.

Die Zusammensetzung der kultivierten Sulfat-reduzierenden Bakterien im Königstein Grubenwasser 09/2012 wurde dabei durch die zu den Firmicutes gehörende Gattung der *Desulfosporosinus* mit 59 % dominiert (Abbildung 25, orange). *Desulfosporosinus* (in der Literatur früher auch als *Desulfotomaculum* bezeichnet) zählen zu den streng anaeroben Sulfatreduzierern (Campbell, 1986) und bilden Sporen (Stackebrandt, 1997a). *Desulfosporosinus* Arten unterscheiden sich untereinander in der Physiologie z.B. leben einige Arten autotroph, andere wachsen durch Fermentation von Glucose oder anderen organischen Substanzen. Einige wenige Spezies führen Homoacetogenese durch, indem sie  $H_2$  und  $CO_2$  zu Acetat umwandeln (Klemps, 1985, Widdel, 1992). Zwei Vertreter von

Desulfosporosinus wurden bereits aus „acid mine drainage“ Sedimenten isoliert: *D. acidiphilus* (Alazard, 2010) und *D. youngiae* (Lee, 2009). Einige Desulfosporosinus Spezies (z.B. *D. reducens*) sind neben der Reduktion von Sulfat zu Sulfid in der Lage Metalle als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen z.B. Mn(IV), Fe(III), U(VI) oder Cr(VI) (Tebo, 1998).



**Abbildung 25: Zusammensetzung der Sulfat-reduzierenden Bakterien in der Wasserprobe vom 09/2013 nach Extraktion der DNA aus den anaeroben MPN-Ansätzen und anschließender Pyrosequenzierung.**

Im Hinblick auf das Uran-kontaminierte Grubenwasser Königstein könnten die nachgewiesenen *Desulfosporosinus species* wasserlösliche Uran(VI)-Verbindungen zu schwerlöslichen Uran(IV)-Verbindungen reduzieren. Durch diese Stoffwechsellistung wird die Mobilität von Uran herabgesetzt. Eine mögliche Uran(VI)-Reduktion durch die in dieser Arbeit isolierten *Desulfosporosinus spp.* könnte in Flüssigkultur mit dem Nachweisverfahren nach Gorby & Lovley (Gorby, 1992) oder der TTA-Extraktion (Bertrand, 1982) überprüft werden. Dadurch lässt sich einschätzen, inwiefern sich diese Gruppe autochthoner Mikroorganismen für biotechnologische Sanierungsstrategien am Standort Königstein eignet. Die Sanierung ehemaliger Uranminen nach dem „Pump & Treat“-Verfahren ist wie bei allen „Sauren Grubenwässern“ kostenintensiv, da für die Reinigung der Abwässer große Mengen an Chemikalien notwendig sind (Johnson, 2005). Eine mikrobielle Immobilisierung von Uran bzw. weiteren Schwermetallen durch Biosorption oder Bioakkumulation könnte langfristig die Kosten der Sanierung senken. Um das Verständnis dieser genannten Prozesse zu erweitern, sollte der Fokus bei anknüpfenden Untersuchungen nach einer möglichen mikrobiellen Uranimmobilisierung mit Uran-toleranten Isolaten (z.B. *Desulfosporosinus*) aus dem Uran-kontaminierten Grubenwasser durchgeführt werden. Denn für autochthone Bakterien, die aus Uran-kontaminierten Habitaten isoliert wurden, ist eine höhere Bioakkumulation von Uran beschrieben als für Vertreter ihrer Art ohne bisherigen Urankontakt (Panak, 1998). Es wäre denkbar das Grubenwasser in Königstein in abgeschlossenen, anoxischen Systemen mikrobiell zu reinigen. Im Labormaßstab wurde für den Standort Königstein bereits versucht den Stoffwechsel autotropher Sulfatreduzierer für den

Schadstoffrückhalt zu nutzen (Hoffmann, 2008). Dabei wurden Uran und weitere Schadstoffe in den gebildeten Eisensulfiden gebunden und somit indirekt durch die Bakterien immobilisiert. Eine direkte Immobilisierung von Uran durch die mikrobielle Reduktion wurde mit autochthonen Bakterien aus dem Grubenwasser Königstein bisher noch nicht getestet.

Mit 29 % ist *Telmatospirillum* (zu Alpha-Proteobacteria gehörend) die zweite dominierende Gruppe unter den kultivierten Sulfat-reduzierenden Bakterien im Grubenwasser Königstein (siehe Abbildung 25, dunkel-grün). Die Gattung *Telmatospirillum* wurde bereits im Grubenwasser der bakteriellen Pyrosequenzierung der Proben des Jahres 2013 nachgewiesen. Jedoch wurden *Telmatospirillum* Spezies bisher wenig in der Literatur beschrieben. Als Sulfat-reduzierendes Bakterium ist *Telmatospirillum* bisher nicht bekannt. Sizova bezeichnet *Telmatospirillum* als neue Art, die im Sibirischen Moor (Sizova, 2007) oder in Russischen Feuchtgebieten (Dedysh, 2011) gefunden wurde und fakultativ anaerob lebt. *Telmatospirillum* ist aber auch aerotolerant und säuretolerant (Sizova, 2007). Durch die anaeroben Bedingungen im Kultivierungsansatz für Sulfatreduzierer in dieser Arbeit konnten sich *Telmatospirillum* spp. vermehren, da sie wenig Konkurrenten hatten. Außerdem vermögen *Telmatospirillum* spp. verschiedene Stoffwechselwege zu nutzen: Sie wachsen chemoorganotroph bei anoxischen Bedingungen auf verschiedenen organischen Säuren und Glukose oder chemolithoautotroph mit  $H_2:CO_2$ . Einige Vertreter können auch Stickstoff fixieren (Dedysh, 2011). Im Kultivierungsansatz für Sulfatreduzierer aus dem Grubenwasser Königstein waren sowohl Hefeextrakt, als auch Glycerol (siehe Kapitel A 2.2.) als Kohlenstoffquelle vorhanden und boten einen optimalen Nährboden für anaerobe chemoorganotrophe Bakterien wie *Telmatospirillum*. Dabei wurde die anaerobe Kultivierung bei einem pH Wert von 4,0 durchgeführt (siehe Kapitel A 2.2.). Laut Literatur wächst *Telmatospirillum* bei pH 4,0-7,0 (Sizova, 2007). *Telmatospirillum* wurde in dieser Arbeit im anaeroben Kultivierungsansatz für Sulfatreduzierer gefunden, ist jedoch nicht eindeutig als Sulfat-reduzierendes Bakterium identifiziert worden.

Weitere Taxa, die im Kultivierungsansatz des MPNs für anaerobe Sulfatreduzierer nachgewiesen wurden, waren *Acidocella* (5 %), *Thiomonas* (< 0,1 %) und ein geringer Anteil unklassifizierter Beta-Proteobacteria (3 %) sowie Gamma-Proteobacteria (0,2 %), Firmicutes (0,4 %), Actinobacteria (2 %) und Acidobacteria (1 %) (siehe Abbildung 25). Spezies der genannten Taxa sind in der Literatur nicht explizit als Sulfatreduzierer bekannt. Bei *Acidocella* handelt es sich um heterotrophe Eisen-reduzierende Bakterien (Coupland, 2008), bei *Thiomonas* um Schwefeloxidierer (Moreira D., 1997), was erstaunlich ist, da die Proben mit einer Gasatmosphäre  $N_2:CO_2$  im Verhältnis 80:20 strikt anaerob behandelt wurden. Es ist anzunehmen, dass *Thiomonas* spp. aus dem Inokulum des MPN-Ansatzes stammen und nicht aktiv im anaeroben Milieu überleben können. Innerhalb der identifizierten unklassifizierten Bakteriengruppen könnten sich durchaus Sulfat-reduzierende Vertreter befinden. Die

Sulfatreduzierer stellen keine homogene phylogenetische Gruppe dar. Stattdessen ist die Sulfatreduktion ein physiologisches Merkmal anaerober Mikroorganismen, das man bei verschiedenen Spezies der Bakterien beobachtet und welches durch horizontalen Gentransfer vermutlich ausgehend von den Delta-Proteobacteria und Firmicutes verbreitet wurde (Friedrich, 2002, Mussmann, 2005). Am häufigsten sind Vertreter unter den Delta-Proteobacteria zu finden. Aber auch Spezies der *Nitrospira* und Firmicutes (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Thermodesulfobacteria*) können Sulfat reduzieren (Muyzer, 2008). Wenngleich die Tatsache, dass sich das *dsrAB* Gen durch horizontalen Gentransfer ausgehend von den Delta-Proteobacteria und Firmicutes auf viele andere Taxa verbreitete (Mussmann, 2005, Zverlov, 2005), beruhte die Analyse nicht auf der Amplifizierung des *dsrAB* Gens, sondern auf der Gesamt-DNA, die bei den positiven MPN-Kulturen isoliert wurde. Darunter befand sich auch DNA aller Mikroorganismen aus dem Inokulum, die unter den anaeroben Bedingungen überlebten, sich anfangs noch vermehrten und in diesem Ansatz mit identifiziert wurden. Das könnte das Auftreten der identifizierten Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Actinobacteria und Acidobacteria als Sulfatreduzierer erklären (siehe Abbildung 25). Bei den Eisen-reduzierenden *Acidocella spp.* ist anzunehmen, dass sie zwar kein Sulfat reduzieren, aber unter den anaeroben Bedingungen überlebten. Höchstwahrscheinlich nutzten *Acidocella spp.* die organischen Bestandteile im Medium, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und sich zu vermehren. Einige Studien belegen die Ausbildung einer Co-Kultur von *Acidocella* und *Desulfosporosinus* in einem anaeroben Medium für Sulfatreduzierer (Bittner, 2010). Ein ähnlicher „Lebensstil“ könnte der Grund für das gemeinsame Auftreten sein.

Die 1310 Sequenzen wurden in 16 OTUs eingruppiert. Die Auflistung der 16 detektierten OTUs der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) mit der entsprechenden Sequenzanzahl und Zuordnung zur Taxonomie ist in Tabelle 20 (SRB grau markiert) aufgeführt. 763 (58,2 %) der identifizierten 1310 Sequenzen gehören zu nur einer OTU (OTU0026) der Gattung *Desulfosporosinus* (von insgesamt 58,55 %) und alle (376 entspricht 28,7 %) als *Telmatospirillum* identifizierten Sequenzen sind zu einer weiteren OTU (OTU0042) zugehörig (siehe Tabelle 20).

Die in Tabelle 20 orange markierten OTUs, heben die Sequenzen hervor, die sowohl in den DNA-Analysen, der RNA-Analyse (W13RNA) und der Analyse für Sulfatreduzierer (SRB) gefunden wurden. Diese zwei hervorgehobenen OTUs sind einem unklassifizierten Beta-Proteobakterium und einer *Acidocella sp.* zugeordnet worden. Die drei grün markierten OTUs in Tabelle 20 gehören zu Sequenzen, die in keiner anderen Probe außer bei den Sulfatreduzierern detektiert worden sind. Zwei OTUs davon gehören zu Sequenzen, die Homologien zu *Desulfosporosinus spp.* aufweisen, ein OTU konnte der Ordnung Actinomycetales zugeordnet werden. Die errechnete MPN für Sulfatreduzierer (Kapitel

4.3.6.3.1.) zeigte, dass die Zellzahl an Sulfat-reduzierenden Bakterien im Grubenwasser sehr gering ist und wird mit einer niedrigen Artenvielfalt ergänzt.

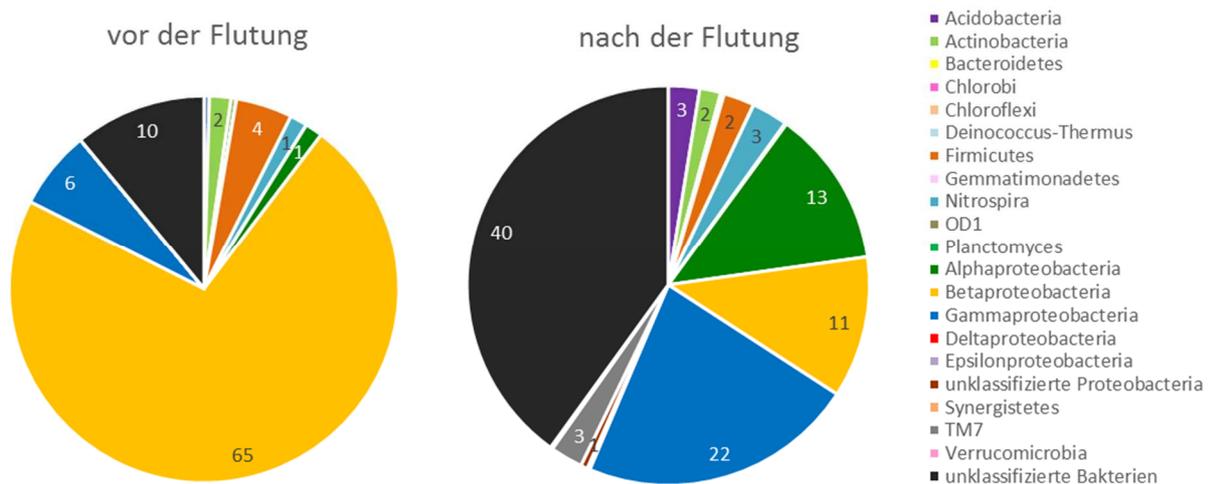
**Tabelle 20: Auflistung der OTUs der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) und Zuordnung zur Taxonomie nach anaerober Kultivierung und Pyrosequenzierung der DNA. Orange markiert = OTUs, die in der DNA-, RNA-, und Sulfatreduzierer basierten Pyrosequenzierung gemeinsam auftraten; grün markiert = OTUs, die nur in der Pyrosequenzierung der Sulfatreduzierer nachgewiesen wurden.**

Gruppe	W11	W12	W13	W13RNA	F11	F12	F13	R12	SRB	Phylum	Klasse	Ordnung	Genus
Otu0003	14	88	433	4292	8	56	32	78	1	Proteobacteria	Betaproteobacteria		
Otu0026	0	0	0	1	0	0	17	0	763	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Desulfosporosinus
Otu0042	0	0	2	0	0	0	1	0	376	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Telmatospirillum
Otu0043	8	25	34	43	4	35	124	13	70	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acidocella
Otu0080	0	3	43	62	1	2	53	0	1	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Thiomonas
Otu0107	13	0	79	16	0	0	1	0	5	Firmicutes	unklassifiziert		
Otu0185	0	1	4	1	1	0	44	0	1	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteria_Gp1	Gp1
Otu0198	0	0	3	3	0	1	0	0	42	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	
Otu0280	0	0	0	0	0	0	0	0	32	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	
Otu0302	1	2	4	3	3	1	3	0	10	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteria_Gp1	Gp1
Otu0487	0	0	1	3	0	2	7	0	1	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteria_Gp1	Gp1
Otu0490	0	0	6	0	1	0	5	0	2	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteria_Gp1	Gp1
Otu1173	0	0	2	0	0	0	0	0	2	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	
Otu1588	0	0	0	0	0	0	1	0	2	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Desulfosporosinus
Otu3966	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Desulfosporosinus
Otu3995	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Desulfosporosinus

Zusammenfassend wurden mittels MPN-Ansatz und nachfolgender Pyrosequenzierung ein Taxon: *Desulfosporosinus spp.* identifiziert, dass als Sulfat-reduzierendes Bakterium bekannt ist. Die Identifizierung der Isolate aus den Grubenwasserproben Königstein in dieser Arbeit, sowie die parallel geführte Identifizierung der 16S rDNA-Sequenzen durch Pyrosequenzierung wiesen auf eine vergleichsweise geringe mikrobielle Diversität im Grubenwasser Königstein hin. Für Habitate der „Sauren Grubenwässer“ war dies zu erwarten (Baker, 2003). Der niedrige pH-Wert, die hohen Konzentrationen an Uran und anderen Metallen wie Aluminium, Mangan und Zink, sowie die limitierte Zahl an verfügbaren Elektronendonatoren üben einen starken Selektionsdruck auf die Mikroorganismen aus.

#### 4.3.8. Bakteriengemeinschaft vor und nach Flutung der Grube Königstein

Beim Vergleich der bakteriellen Gemeinschaft der Biofilme vor der Flutung (2009/2010) und nach kontrollierter Flutung des Uranbergwerks wird in Abbildung 26 ersichtlich, dass sich die Zusammensetzung stark verschoben hat. Zur besseren Übersicht und Darstellung der Diversität wurden alle entnommenen Proben vor der Flutung (Stalaktite und Drainagerinne) und nach der Flutung (Grubenwasser und Biofilm) vereinigt und in Kreisdiagrammen zusammengefasst. Die Zusammensetzung der Phyla und die Klassifizierung in Gattungen (siehe Tab. 24) unterscheiden sich durch den Prozess der Flutung deutlich.



**Abbildung 26: Zusammenfassung der bakteriellen Gemeinschaften vor- und nach Flutung des Bergwerkes Königstein.**

In allen Proben vor der Flutung dominierten die Beta-Proteobacteria (Abbildung 26, 65 %) die Bakterien-Gemeinschaft, wobei 99 % der Beta-Proteobacteria den Spezies *Ferrovum myxofaciens* zuzuordnen waren. Nach der Flutung waren Beta-Proteobacteria nur noch mit 11 % zu finden (Abbildung 26). Dabei dominierten hier *Acidithiobacillus* Spezies. *Ferrovum myxofaciens* wurden nach der Flutung mittels CARD-FISH lediglich mit einem Anteil von < 1 % detektiert (Tabelle 21). Warum *Ferrovum myxofaciens* von *Acidithiobacillus* spp. verdrängt wurden, ist nicht eindeutig klar. Beide Arten sind chemolithotrophe Eisenoxidierer, die Eisen(II)-Ionen und Sauerstoff nutzen, um Energie zu gewinnen. *Acidithiobacillus* kann neben Eisen(II) auch Schwefelverbindungen als Elektronendonator nutzen. Diese Fähigkeit besitzt *F. myxofaciens* nicht. Jedoch sind im Grubenwasser ausreichend Eisen(II)-Ionen und Sauerstoff vorhanden (siehe Kapitel 4.1., Tabelle 11), der pH-Wert hat sich innerhalb des untersuchten Zeitraums kaum geändert, nur einige Schwermetall-konzentrationen bzw. chemische Parameter haben sich erhöht z.B. Sulfatgehalt, Mn-, Ni-, oder Cd-Konzentration. Da *Acidithiobacillus* spp. toleranter gegenüber Schwermetallen sind (Johnson, 2014), hat diese Spezies somit einen Selektionsvorteil. *Ferrovum myxofaciens* ist laut Johnson auch in der Lage Stickstoff und Kohlendioxid aus der Luft zu fixieren, so bevorzugt er vermutlich auch Sauerstoff aus der Luft. Jedoch existiert nach der Flutung keine Grenzschicht zur Luftschicht mehr, da die Schächte unter Tage mit Wasser geflutet wurden. Höchstwahrscheinlich ist der gelöste Sauerstoff im Grubenwasser für *F. myxofaciens* nicht zugänglich oder nicht ausreichend, um die Eisenoxidation als einzigen Energielieferant zu initiieren.

Einige *Thiomonas* spp. innerhalb der Beta-Proteobacteria wurden vor und nach der Flutung nachgewiesen. Auffällig ist der große Anteil (40 %) an unklassifizierten Bakterien nach der Flutung, der vor der Flutung mit 10 % geringer ausfällt (siehe Abbildung 26). Neben den unklassifizierten Bakterien

dominiert nach der Flutung die Gruppe der Gamma-Proteobacteria (22 %), gefolgt von Alpha-Proteobacteria (13 %). Vor der Flutung nahmen die Gamma-Proteobacteria (6 %) und Alpha-Proteobacteria (1%) nur einen kleinen Teil der bakteriellen Biozönose ein. Die Zusammensetzung der beiden Phyla vor und nach der Flutung ähnelt sich dennoch (siehe Tabelle 21). In Tabelle 21 sind vergleichend die vorkommenden Phyla und Klassen vor und nach der Flutung des Uranbergwerkes Königstein zusammengefasst. Dabei sind die Phyla, die vor der Flutung nicht nachgewiesen wurden orange markiert. Die Phyla, die in der Zusammensetzung die größten Unterschiede aufwiesen, sind in der Tabelle 21 grün markiert.

**Tabelle 21: Klassifizierung der vorkommenden Phyla vor und nach Flutung des Bergwerkes Königstein. Rot markiert: Phyla wurden vor der Flutung nicht nachgewiesen, Grün markiert: größter Unterschied in der Zusammensetzung des Phylums.**

vor der Flutung	Phylum	nach der Flutung
unklassifiziert	Acidobacteria	unklassifiziert, Geothrix
Acidimicrobiales	Actinobacteria	unklassifiziert, Mycobacterium
unklassifiziert	Bacteroidetes	unklassifiziert, Terrimonas
-	Chlorobi	Ignavibacterium
-	Chloroflexi	Thermosporothrix, Sphaerobacter
Clostridium	Firmicutes	unklassifiziert, Alicyclobacillus, Desulfosporosinus, Desulfobacterium, Clostridium, Ethanoligenens, Thermodesulfobium, Turcibacter, Sulfobacillus
-	Gemmatimonadetes	Gemmatimonas
Leptospirillum ferrooxidans	Nitrospira	unklassifiziert, Leptospirillum
-	OD1	unklassifiziert
-	Planctomycetes	Singulisphaera
-	Proteobacteria	unklassifiziert
Acidocella, Acidiphilium, Sphingomonas	Alpha	unklassifiziert, Acidocella, Azospirillum, Methylobacterium, Sphingomonas, Telmatospirillum, Hyphomicrobium, Methylocystis, Rhodoblastus
Ferrovum myxofaciens, Thiomonas	Beta	unklassifiziert, Thiomonas
Acidithiobacillus ferrooxidans, Xanthomonadaceae	Gamma	unklassifiziert, Acidithiobacillus, Rhodanobacter, Legionella
-	Delta	unklassifiziert, Desulfatirhabdium, Desulfurella, Desulfovibrio, Geobacter
-	TM7	unklassifiziert
-	Verrucomicrobia	Prostheco bacter
unklassifiziert	Bakterien	unklassifiziert

Sowohl *Acidithiobacillus spp.* (Gamma-Proteobacteria), als auch *Acidocella spp.* und *Sphingomonas spp.* waren in beiden Flutungsstadien nachgewiesen worden (siehe Tabelle 21). Nach der Flutung setzte sich die bakterielle Diversität jedoch aus einer größeren Anzahl an Spezies zusammen, die vor der Flutung nicht gefunden wurden. Das ist höchstwahrscheinlich auf die angewandten Methoden zurückzuführen. Vor der Flutung wurden die CARD-FISH Technik und die Sequenzierung mit vorangegangener Klonierung genutzt, nach der Flutung CARD-FISH und Pyrosequenzierung. Mit der Klonierung/Sequenzierungsmethode vor der Flutung wurde nur ein Bruchteil von den Sequenzen analysiert im Vergleich zu nach der Flutung mittels Pyrosequenzierung. Somit konnten gerade seltene Arten mittels Klonierung nicht erfasst werden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Phyla Chlorobi, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, OD1, Planctomyces, Delta-Proteobacteria, TM7 und Verrucomicrobia, die nach der Flutung in sehr geringer Anzahl gefunden wurden, vor der Flutung mittels Klonierung und einer geringeren Anzahl an analysierten Sequenzen nicht detektiert wurden

(siehe Tabelle 21, rot markiert). Acidobacteria, Actinobacteria und Bacteroidetes wurden vor und nach der Flutung größtenteils als unklassifizierte Spezies zu geringen Anteilen gefunden. Auch Firmicutes der Klasse Clostridia konnten in beiden Zeiträumen nachgewiesen, wobei nach der Flutung noch andere Gattungen (vor allem Sulfatreduzierer) sequenziert wurden (siehe Tabelle 21). Durch die Flutung der Grube bis auf 140 m üNN wurde die Existenz von Sulfatreduzierern durch Ausbildung von anoxischen Zonen im Grubenwasser gefördert. Die Gruppe Nitrospira beinhaltet die Eisenoxidierende Gattung Leptospirillum, die sowohl vor als auch nach der Flutung Teil der bakteriellen Biozönose war.

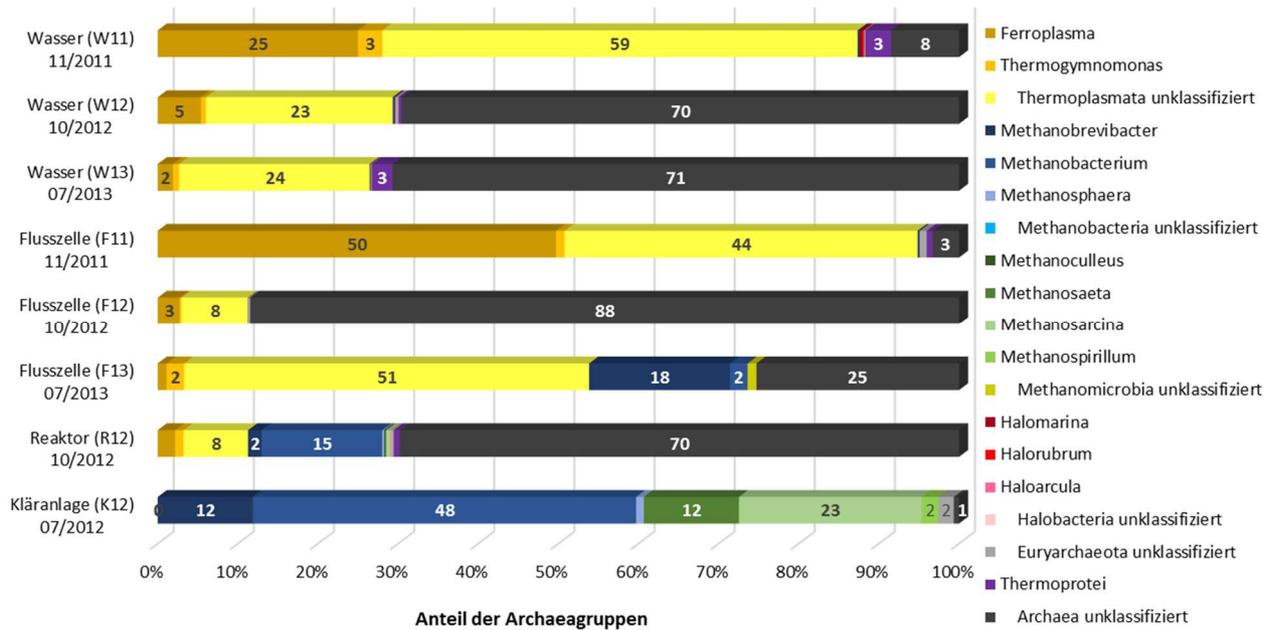
#### **4.3.9. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Archaea durch molekularbiologische Methoden**

Neben Bakterien spielen auch Archaea im Grubenwasser Königstein eine Rolle, wenn auch nur mit geringer Abundanz, da sie laut CARD-FISH (vgl. Kapitel 4.2.1.) nur einen Anteil von < 1 % ausmachen. Trotzdem sind sie womöglich an verschiedenen Reaktionen und Redox-Prozessen, die in der Grube ablaufen, beteiligt und sollten deshalb mittels Pyrosequenzierung identifiziert werden. Vergleichbar mit den Proben der Bakterien sollte die Abhängigkeit der Archaea von den chemischen Parametern im Grubenwasser, der Probenart und des Probenahmezeitraums untersucht werden. Für die Durchführung der Pyrosequenzierung wurde je eine Probe des Grubenwassers der Jahre 2011, 2012 und 2013 ausgewählt und mit den Biofilm-Proben der Flusszelle (2011, 2012 und 2013) und des Reaktors (2012) verglichen. Die hier durchgeführten molekularbiologischen Analysen beruhen auf der Untersuchung eines mit Archaea-spezifischen Primern amplifizierten Genabschnittes der 16S rDNA. Dafür wurde das Primerpaar U519F/958R (Tabelle 8) eingesetzt, um die Gesamtheit der Archaea zu charakterisieren. Mit dem genannten Primerpaar können insgesamt 71 % aller Archaea Datenbankeinträge der rdp-Datenbank (RDP, probe match) erfasst werden. Innerhalb der Archaea erfassen die Primer 76 % der Crenarchaeota, 69 % der Euryarchaeota und 74 % der Korarchaeota Datenbankeinträge. Nano-, oder Thaumarchaeota werden mit dem eingesetzten Primerpaar nicht detektiert.

Nach der direkten Sequenzierung der zuvor amplifizierten V4-V5-Region der Archaea 16S rDNA wurden insgesamt für das Wasser 4.920 (W11-2011), 2.751 (W12-2012), 8.362 (W13-2013), für die Flusszelle 1.241 (F11-2011), 3.377 (F12-2012), 91 (F13-2013) und für den Reaktor 623 (K12-2012) und 2.013 (R12-2012) Sequenzen erhalten. Die Sequenzen wurden, entsprechend der Angaben im Kapitel 3.11.2. bearbeitet, um qualitativ hochwertige Sequenzen zu erhalten. Der relative Anteil der ermittelten phylogenetischen Gruppe je Sequenzbibliothek ist in Abbildung 27 dargestellt.

Die Taxa der Kläranlageprobe K12 nehmen hier eine Sonderstellung ein, da diese Probe nicht die Archaea Gemeinschaft des Grubenwassers Königstein widerspiegelt. Vollständigkeitshalber wird sie in Abbildung 27 mit dargestellt, jedoch nicht diskutiert.

Ähnlich wie bei den Bakterien, war bei den meisten Proben ein großer Anteil an unklassifizierten Archaea (Abbildung 27, dunkelgrau) zu verzeichnen, der je nach Probe zwischen 3 % (F11 - Flusszelle 2011) und 88 % (F12 - Flusszelle 10/2012) betrug (K12 – Kläranlage ausgenommen). Diese unklassifizierten Sequenzen konnten keiner bisher bekannten phylogenetischen Gruppe der Archaea zugeordnet werden. Den geringsten Anteil nicht klassifizierbarer, möglicherweise unbekannter Sequenzen zeigten die Resultate des Probenahmejahres 11/2011 des Wassers (W11) und der Flusszelle (F11), mit 8 % bzw. 3 % (Abbildung 27, schwarz). In den Jahren 2012 und 2013 der Wasser- und Biofilmproben konnten durchschnittlich weniger Sequenzen einer Archaea-Gruppe zugeordnet werden.



**Abbildung 27: Zusammensetzung der Archaea Gemeinschaft in den Wasser- und Biofilmproben der Probenjahre 2011, 2012 und 2013.**

Die Anzahl der ermittelten Taxa reichte von 6 bis 13 je Probe inklusive der nicht-identifizierten Euryarchaeota-Vertreter, wobei die Bibliothek des Biofilms im Reaktor (R12- 10/2012) die meisten Taxa zeigte. In allen Bibliotheken war der Anteil der Euryarchaeota größer (12 - 96 %), als der Anteil an Crenarchaeota (0 - 3 %). Das Taxon der Crenarchaeota war ausschließlich durch die Gattung Thermoprotei vertreten, wobei der größte Anteil an *Thermoprotei Spezies* im Wasser 11/2011 (W11) mit 3,2 % und im Wasser 07/2013 (W13) mit 2,6 % nachgewiesen wurde (Abbildung 27, violett). In den anderen Proben lagen die prozentualen Anteile der Crenarchaeota bei < 1 % bis hin zu 0 % bei der

Biofilmprobe der Flusszelle F13 (07/2013). Die Ergebnisse sind nicht verwunderlich, denn Crenarchaeota sind bisher nicht als typische Vertreter von Habitaten mit niedrigem pH Wert bekannt, in den meisten „acid mine drainage“ Umgebungen wurden keine Crenarchaeota nachgewiesen (Bruneel *et al.*, 2008, Yelton, 2013). Arten, die zu Crenarchaeota gehören, kommen vorwiegend in Sedimenten (Porat *et al.*, 2010) oder heißen Quellen (Barns, 1994) vor. Die, zu den Crenarchaeota gehörenden, Vertreter Thermoprotei wurden aufgrund ihrer großen Hitzebeständigkeit sogar in Vulkanen in Nicaragua bei 400 °C und einem pH Wert zwischen 0 und 5 gefunden (Rogers, 2011). Die Ordnung Sulfolobales, die zur Gruppe der Thermoprotei gehören, ist vor allem durch die Fähigkeit Sulfid- und reduzierte Eisen-Verbindungen zu oxidieren bekannt und wurde bereits in Minen und Sulfid-Erz Lagerstätten nachgewiesen (Golyshina, 2005, Rawlings, 2002). Da eine weitere Klassifizierung der Thermoprotei bis hin zum Gattung in den Königstein Proben nicht erfolgte, bleibt es Spekulation, ob die genannten Sulfid-oxidierenden Vertreter sich hinter den Sequenzen verbergen und somit Einfluss auf den Schwefel-Kreislauf ausüben. Aufgrund der Eigenschaft, dass ein Vielzahl der Thermoprotei hyperthermophil (>65 °C) sind, ist es unklar, ob sie im Grubenwasser Königstein stoffwechselaktiv sind oder aus tieferen, eventuell wärmeren, Gesteinsschichten ins Grubenwasser gespült wurden.

Bei den Euryarchaeota wiesen die verschiedenen Königstein-Proben große Schwankungen bei der Anzahl der Sequenzen auf. Die archaeale Lebensgemeinschaft des Biofilms der Flusszelle 11/2011 wurde durch 96 % Euryarchaeota dominiert. Dagegen wies der Biofilm der Flusszelle aus dem Jahr 10/2012 die geringste Anzahl Euryarchaeota-Sequenzen (391 entspricht 12 %) auf. Alle Bibliotheken der Wasser- und Flusszellenproben wurden, abgesehen von den unklassifizierten Archaea, von der Klasse Thermoplasmata dominiert (Abbildung 27, gelb-Töne). In den Biofilm- und Wasserproben des Jahres 2011 (F11 und W11) nimmt die Thermoplasmata-Gruppe sogar einen Anteil von 95 % bzw. 87 % ein (Abbildung 27). Innerhalb der Klasse Thermoplasmata sind, neben einer großen Anzahl unklassifizierter Thermoplasmata, die Gattungen *Ferroplasma* und *Thermogymnomonas* dominierend vertreten (Abbildung 27, ocker und mittel-gelb). Der Anteil an *Ferroplasma* nimmt im Laufe der Jahre von 2011 (25-50 %) bis 2013 (1-2 %) sowohl in den Wasser-, als auch in den Biofilm-Proben ab. Laut Literatur sind die archaealen Gruppen Thermoplasmatales (Euryarchaeota) und Sulfolobales (Crenarchaeota) typische Vertreter von AMD Umgebungen (Bond, 2000, Druschel, 2004). Der detektierte hohe Anteil an Thermoplasmata in den Königstein Proben bestätigt die Angaben in der Literatur. Insbesondere die chemolithotrophen autotrophen Arten *Ferroplasma acidiphilum* und *Ferroplasma acidarmanus* sind als mesophile Eisen(II)-oxidierende Archaea bereits in AMDs isoliert und beschrieben worden (Edwards, 2000, Golyshina, 2000). Archaea Gemeinschaften sind durch den Aufbau ihrer Zellwandstruktur oft besser an niedrige pH-Werte, hohe Konzentrationen an Eisen-Ionen oder andere Metall-Ionen angepasst als mesophile Bakterien und eignen sich somit zum Bioleaching

in extremen Milieus (Bruneel et al., 2008, Dopson et al., 2004). Golyshina and Timmis (2005) beschreiben *Ferroplasma sp.* sogar als wichtigsten Mikroorganismus im biogeochemischen Kreislauf von Schwefel- und Sulfid-Metallen in sauren Umgebungen und könnte somit hohes Potential für biotechnologische Anwendungen wie z.B. Bioleaching (bei Schwermetallsulfid-Mineralen) unter extremen Bedingungen aufweisen (Golyshina, 2005). Diese Aussagen bestätigen die Ergebnisse von Edwards (2000), bei dessen Untersuchungen am sauren Probenahmeort Iron Mountain (USA) die Gattung *Ferroplasma* mit 85 % die mikrobielle Gemeinschaft dominierte (Edwards, 2000). Für diese Autoren weist die Präsenz dieser genannten Gattungen und anderer naher Verwandter der Thermoplasmatales darauf hin, dass diese Acidophilen wichtige Bestandteile in „Sauren Grubenwässern“ sind und erheblichen Einfluss auf den Eisen- und Schwefel-Kreislauf haben können. Die acidophilen, organotrophen *Thermogymnomonas spp.*, die ebenfalls mit hoher Abundanz in den Königstein Proben vertreten sind, leben, im Gegensatz zu *Ferroplasma spp.* (Temperaturoptimum zwischen 15 und 45 °C, (Golyshina, 2000)), thermophil (38-68°C), aber sind im Vergleich zu *Ferroplasma* nicht in der Lage Eisen(II) zu oxidieren (Itoh et al., 2007, Volant, 2012). *Thermogymnomonas* wurden bereits in Sedimenten der Carnoulès Mine (Frankreich), einer Arsen- und Eisen-haltigen sauren Grube gefunden (Volant, 2012) und zeigt, dass *Thermogymnomonas spp.* Vertreter Metall-haltiger Habitats mit niedrigem pH-Wert sind.

Die Klasse Methanobacteria ist eine weitere dominierende Klasse, neben den Thermoplasmata-Vertretern. In den Reaktor-Proben (K12 und R12) dominiert die Klasse Methanobacteria, im Gegensatz zu den Wasser- und Flusszellen-Proben, bei denen die Methanobacteria die zweite dominierende Klasse in den Proben des Probenahmejahres 07/2013 (Abbildung 27, blau) darstellt. Insbesondere die Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera* dominieren die Methanobacteria im Biofilm 07/2013 mit 17 % insgesamt, die zu den Methanogenen zugeordnet werden. Methanogene Gemeinschaften spielen im globalen Kohlenstoffkreislauf eine wichtige Rolle, indem sie organischen Kohlenstoff, durch Nutzung der bakteriellen Stoffwechselprodukte CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Acetat und Formiat und andere Methylverbindungen, zu Methangas umwandeln (Sanz, 2011). Methanobacteria leben anaerob und sind nicht nur in „acid mine drainage“ Umgebungen (Volant, 2012), sondern auch in marinen Sedimenten (Moser et al., 2005), Abwasserbehandlungs-Anlagen (Tabatabaei, 2010) und im Verdauungstrakt von Säugetieren (Lengeler, 1999) vorhanden. Man findet Methanogene in anoxischen Habitats, in denen NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> als Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen (Offre, 2013). In keiner der entnommenen Proben wurden durch die Wismut GmbH Methan oder Methanol nachgewiesen, der die Existenz der methanogenen Archaea bestätigen könnte. In allen weiteren Königstein-Proben (außer 07/2013) wurden die Klassen Methanobacteria und Methanomicrobia nicht nachgewiesen. Die Reaktor-Proben (R12) sind dabei nicht einbezogen, da die mikrobielle Zusammensetzung der Reaktor-Träger durch den Kläranlagen Biofilm (K12) beeinflusst wurde. Die in

K12 zur dominierenden Gruppe der Methanobacteria gehörenden Gattungen Methanobrevibacter, Methanobacterium und Methanosphaera wurden auch in R12 nachgewiesen, aber in viel geringeren Anteilen. Das zeigt, dass die Methanobacteria des Kläranlagen-Biofilms teilweise durch das neue Habitat verdrängt wurden und die Thermoplasmata aus dem Grubenwasser sich im Biofilm verstärkt ansiedelten. Die zweite dominierende Klasse Methanomicrobia aus dem Kläranlagen-Biofilm K12 (mit 37 %) wurde in dem Reaktor innerhalb von 3 Monaten fast vollständig (0,8 % in R12) durch die neue Mikrobengemeinschaft verdrängt. Dabei konnten noch geringe Anteile der Gattungen Methanosaeta und Methanosarcina auf den Reaktor-Trägern (R12) nachgewiesen werden.

Die Gruppe der Halobacteria wurde vereinzelt in den Wasser-Proben des Jahres 2011 und 2012 mit einem Anteil < 1 % identifiziert (Abbildung 27, rot). Dabei sind insbesondere Homologien zu den Gattungen Halomarina, Halorubrum und Haloarcula gefunden worden. Typischerweise werden Halobacteria in salinen Gewässern oder salinen Gesteinsformationen gefunden (DasSarma, 2012), jedoch nicht in „acid mine drainage“ Umgebungen. In den Biofilmproben spielen Halobacteria keine Rolle, das lässt den Schluss zu, dass sie womöglich keinen Stoffwechsel betreiben und nicht aktiv an Reaktionen im Grubenwasser Königstein beteiligt sind.

Für eine Bewertung der Diversität der archaealen Lebensgemeinschaft in den einzelnen Bibliotheken wurden im Folgenden OTU basierte Analysen durchgeführt.

#### *4.3.9.1. Bewertung des Artenreichtums der Archaea durch Alpha-Diversitätscharakteristiken*

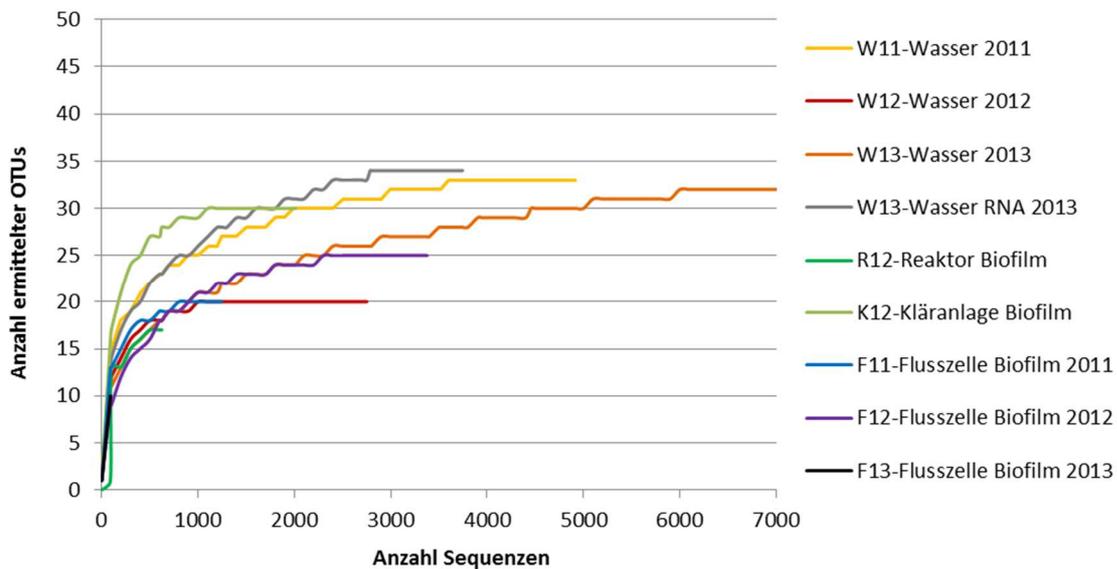
Zur Beurteilung der Diversität der archaealen Biozönose und zum Vergleich der Biozönosen untereinander wurde, wie bereits für die OTU basierten Analysen der 16S rDNA Bakterien Bibliotheken (vgl. Kapitel 4.3.1.2), der Schwellenwert der Sequenzhomologie für die Definition einer Spezies mit 97 % festgelegt. Die nachfolgenden Analysen erfolgten wie im Kapitel 3.11.2. beschrieben. Die insgesamt 23.379 Sequenzen aus 8 Bibliotheken wurden in 187 OTUs gruppiert (vgl. Tabelle 22). Auf der Basis dieser OTUs erfolgte die Berechnung der Alpha-Diversitätscharakteristiken (Tabelle 22) und der „Rarefaction“ Kurven (Abbildung 28).

Die hohe Anzahl von 624 bis 8362 Sequenzen je Probe, mit Ausnahme von F13, bei der nur 91 Sequenzen detektiert wurden, konnte in eine vergleichsweise niedrige Anzahl an OTUs gruppiert werden. Zwischen 10 und 33 OTUs je Probe führten zur Erfassung der archaealen Diversität von 97,8 % (F13-Flusszelle 07/2013) bis 99,9 % (W12, W13, R12) („Coverage“, vgl. Tabelle 22).

**Tabelle 22: Alpha-Diversitätscharakteristiken der Archaea Pyrosequenzierungsbibliotheken.**

Art der Probe	Datum der Probennahme	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs <sup>a</sup>	"Coverage"	"Richness" <sup>c</sup>		"Diversity"	
				[%] <sup>b</sup>	ACE	Chao	npShannon	invSimpson <sup>d</sup>
Grubenwasser	11/2011 (W11)	4920	33	99,8%	56,3	55,5	2,0	5,2
	10/2012 (W12)	2751	20	99,9%	21,0	20,5	1,2	2,0
	07/2013 (W13)	8362	32	99,9%	63,6	50,3	1,2	2,0
Flusszelle Biofilm	11/2011 (F11)	1241	20	99,5%	45,9	35,0	1,7	3,3
	10/2012 (F12)	3377	25	99,8%	31,8	30,3	0,6	1,3
	07/2013 (F13)	91	10	97,8%	11,3	10,3	1,8	4,7
Reaktor Biofilm	07/2012 (R1)	624	17	99,2%	22,4	22,0	1,7	3,9
Kläranlage Biofilm	10/2012 (R2)	2013	30	99,9%	31,6	30,6	1,5	2,2
<b>gesamt</b>		<b>23379</b>	<b>187</b>					

In den „Rarefaction“-Kurven, die in Abbildung 28 gezeigt sind, wird die Anzahl der OTU jeder Probe in Abhängigkeit von der Sequenzanzahl dargestellt. Sie zeigen einen Verlauf, der sich einer Asymptote nähert und auf eine Sättigung der Diversität durch die analysierten Sequenzen hinweist. Die Kurve der Biofilmprobe F13 (07/2013) zeigt einen ansteigenden Verlauf (Abbildung 28, schwarz), was durch die geringe Sequenzanzahl (91) begründet ist.



**Abbildung 28: „Rarefaction“-Kurven der Pyrosequenzierungsbibliotheken für Archaea.**

Anhand der „Rarefaction“ Kurven (Abbildung 28) und der „Coverage“ Schätzungen (Tabelle 22) ist erkennbar, dass die archaeale Diversität, außer bei der Probe F13 (Flusszelle Biofilm 2013) vollständig erfasst wurde.

Besonders hervorzuheben ist hier die Bibliothek der Biofilmprobe F13 (07/2013). Hier wurden die wenigsten Sequenzen ausgewertet, wobei die archaeale Diversität am schlechtesten erfasst wurde.

Das verdeutlichen auch die „Richness“ Indizes ACE und Chao (Tabelle 22), die bei der Probe F13 am geringsten waren (ACE:11; Chao:10). Die Proben mit dem größten Arten-Reichtum waren laut „Richness“ Indizes die Wasserproben W11 (11/2011) und W13 (07/2013). Sie wiesen die höchsten Werte für ACE und Chao (Richness) sowie für npShannon und invSimpson (Diversität) auf, und zeigten bei der größten Anzahl analysierter Sequenzen die meisten OTUs. Die Bibliotheken mit der niedrigsten Artenvielfalt („diversity“) anhand der npShannon und invSimpson Werte waren die Wasser- und Flusszellen-Proben (W12 und F12) des Probenahmejahres 2012 (Tabelle 22).

Die OTUs, denen die meisten archaealen Sequenzen zugeordnet wurden, sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Schaut man sich die Verteilung der Sequenzen je OTU an, so wird ersichtlich, dass die geringe Diversität dadurch begründet ist, dass in einem OTU häufig sehr viele Sequenzen enthalten sind.

**Tabelle 23: Zusammenfassung der häufigsten OTUs mit Anzahl der archaealen Sequenzen je Probe und Zuordnung der OTUs zu Taxonomie.**

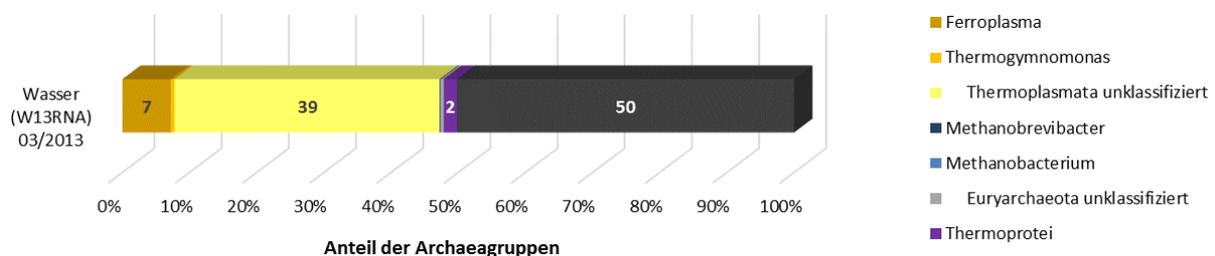
Gruppe	W11	W12	W13	F11	F12	F13	R12	K12	Phylum	Klasse	Genus
Otu0001	0	0	0	0	0	2	106	31	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacterium
Otu0002	4	3	7	1	7	0	41	1	unklassifiziert		
Otu0003	12	8	11	3	1	16	19	0	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobrevibacter
Otu0005	335	1905	5825	27	2957	23	1345	0	unklassifiziert		
Otu0012	1398	298	1050	212	140	30	83	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0017	1228	149	158	617	92	1	44	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Ferroplasma
Otu0018	964	217	639	111	73	11	40	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0034	222	45	203	54	38	2	15	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermogymnomonas
Otu0046	223	41	45	141	12	0	11	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0048	0	0	0	0	0	0	194	262	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacterium
Otu0050	157	10	215	9	3	0	15	0	Crenarchaeota	Thermoprotei	
Otu0066	149	17	64	13	8	2	18	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermogymnomonas
Otu0079	61	5	63	11	1	0	9	0	unklassifiziert		
Otu0108	36	15	18	13	3	3	7	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0118	44	9	8	11	8	0	5	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0131	15	13	18	0	2	0	1	0	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0161	6	5	1	10	4	0	5	0	Euryarchaeota		

Beispielsweise OTU005, welches in allen untersuchten Königstein-Proben vorkam, und einem unklassifizierten Archaeum zugeordnet wurde, enthielt in der Probe W13 (Wasser 07/2013) 5825 Sequenzen (Tabelle 23, siehe W13). Auch Thermogymnomonas (OTU0034 und OTU0066), Ferroplasma (OTU0017) und unklassifizierte Thermoplasmata (OTU0012, OTU0018, OTU0046, OTU0108, OTU0118 und OTU0131) waren in großer Sequenzanzahl pro OTU je Königstein-Probe (K12 ausgenommen, Tabelle 23 grau markiert) vertreten. Das bestätigt die Dominanz der Thermoplasmata und deren untergeordneter Gattungen aufgrund der großen Sequenzanzahl pro OTU sowie die geringe Diversität. OTUs, die der Klasse Methanobacteria zugeordnet wurden (OTU0001, OTU0003 und OTU0048), waren hauptsächlich in den Proben K12 und R12 zu finden (Tabelle 23, siehe K12 und R12).

Acht der insgesamt 187 archaealen OTUs wurden in allen DNA-basierten Königstein Proben mit unterschiedlicher Sequenzanzahl gefunden. Die OTUs sind in der Tabelle 23 orange markiert. Diese OTUs enthielten außerdem die höchste Anzahl an Sequenzen und stellten gleichzeitig die dominanten Gruppen dar.

#### 4.3.10. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Archaea durch molekularbiologische Methoden

Die Pyrosequenzierung des DNA-Amplikons ermöglichte die Identifizierung der Archaea Spezies in den untersuchten Proben eines Zeitpunktes. Die chemischen Parameter variieren in den verschiedenen Probenahmestellen nur geringfügig, trotzdem wurden Schwankungen in der archaealen Zusammensetzung der unterschiedlichen Proben festgestellt. Mit der Charakterisierung der archaealen Lebensgemeinschaft anhand eines DNA-basierten Sequenzierungsexperimentes wurde eine in der Umweltmikrobiologie weit verbreitete Methode angewendet, von der jedoch einige Limitationen berücksichtigt werden müssen. Insofern ist es nicht eindeutig, inwieweit die isolierte DNA die reelle mikrobielle Zusammensetzung repräsentiert. Darüber hinaus stellt die isolierte DNA nicht nur die tatsächliche aktive mikrobielle Gemeinschaft dar, sondern repräsentiert auch tote Biomasse oder inaktive Zellen. Zur Abschätzung, welche, der analysierten Archaea Spezies der DNA-basierten Pyrosequenzierung stoffwechselaktiv waren und die reelle Zusammensetzung widerspiegeln, wurde die Pyrosequenzierung zusätzlich mit zuvor isolierter RNA durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gleichen Primer zur Amplifikation des Fragments gewählt, wie bei der DNA-basierten Pyrosequenzierung. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der stoffwechselaktiven Archaea und deren prozentuale Anteile in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung sind in der Abbildung 29 dargestellt. Insgesamt konnten 7 phylogenetische Gruppen (unklassifizierte Archaea ausgenommen) mittels Pyrosequenzierung in der Wasserprobe (W13RNA) nachgewiesen werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft stoffwechselaktiver Archaea in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.**

Den größten Anteil nahmen die unklassifizierte Archaea (Abbildung 29, dunkelgrau) mit 50 % zusammen mit der Klasse Thermoplasmata (Abbildung 29, gelb-Töne) mit 47 % ein. Dabei wiesen unter den unklassifizierte Archaea 48 % von 50 % Homologien zu einer einzigen OTU auf (OTU0005, siehe Tabelle 25). Innerhalb der Klasse Thermoplasmata sind neben unklassifizierte Thermoplasmata (40 %, siehe Abbildung 29, hellgelb) auch *Ferroplasma spp.* (7 %, Abbildung 29, ockergelb) und *Thermogymnomonas spp.* (0,5 %, Abbildung 29, gelb) als stoffwechselaktive Archaea im Grubenwasser nachgewiesen worden. Das bestätigt die DNA-Analysen der Königstein-Proben, in denen die acidophilen und metalltoleranten Thermoplasmata Vertreter ebenfalls als dominierende Gruppe hervorging. Zusätzlich zur dominanten Anzahl der Euryarchaeota (48 %) wurden 2 % Crenarchaeota als stoffwechselaktiv identifiziert. Alle Crenarchaeota Sequenzen wiesen Homologien zur Klasse der thermophilen Thermoprotei (Abbildung 29, violett) auf, jedoch konnten die Sequenzen innerhalb der Crenarchaeota keiner Gattung zugeordnet werden, was womöglich auf die Länge der untersuchten Sequenzen (~ 250 bp) zurückzuführen ist. Stoffwechselaktive Methanobacteria waren in der Wasserprobe (03/2013) mit geringer Abundanz von < 1 % vertreten (Abbildung 29, blau). Zu den Vertretern der Methanobacteria gehörten *Methanobrevibacter spp.* (0,4 %) und *Methanobacterium spp.* (0,0003 %). Sie gehören zu der Archaea Gruppe, die im Grubenwasser eine untergeordnete Rolle spielte.

#### 4.3.10.1. Bewertung des Artenreichtums der stoffwechselaktiven Archaea durch Alpha-Diversitätscharakteristiken

Die nachfolgenden Analysen zur Alpha-Diversität erfolgten wie im Kapitel 3.11.2. beschrieben. Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der Archaea und die „Rarefaction Kurve“ der Wasserprobe W13RNA sind in Tabelle 24 bzw. in Abbildung 28 (Kapitel 4.3.9.1.) dargestellt.

Die insgesamt 3.745 Sequenzen aus der RNA-Pyrosequenzierungsbibliothek wurden in 34 OTUs gruppiert. Auf der Basis dieser OTUs erfolgte die Berechnung der Alpha-Diversitätscharakteristiken (Tabelle 24) und der „Rarefaction“ Kurve (Abbildung 28, Kapitel 4.3.9.1.).

**Tabelle 24: Die Alpha-Diversitätscharakteristiken der RNA-basierten archaealen Pyrosequenzierungs-bibliothek.** *a* definiert als Sequenzen mit einer Ähnlichkeit  $\geq 97$  %. *b* errechnet unter Verwendung des „Good’s Coverage“ Index. *c* nicht parametrische „Richness“ Schätzer. *d* nicht parametrischer Shannon Index

Art der Probe	Datum der Probennahme	Anzahl Sequenzen	Anzahl OTUs <sup>a</sup>	Coverage [%] <sup>b</sup>	"Richness" <sup>c</sup>		"Diversity" <sup>d</sup>	
					ACE	Chao	npShannon	invSimpson
Grubenwasser	03/2013 (W13RNA)	3745	34	99,7%	47,1	39,6	1,7	3,4

Ausgehend von der Einteilung der Sequenzen in OTUs wurde eine Abdeckung der vorhandenen Biodiversität der stoffwechselaktiven Archaea in den Königstein Wasserproben von 99,7 % erreicht (Index „Coverage“, siehe Tabelle 24). Damit wurde mit den analysierten Sequenzen der isolierten RNA die archaeale Diversität fast vollständig erfasst. Das bestätigt auch der Verlauf der „Rarefaction“-Kurve der RNA-Probe W13RNA in Abbildung 28 (Kapitel 4.3.9.1., grau), der flach und asymptotisch verläuft. Anhand der „Richness“ und „Diversity“- Indizes in Tabelle 24 lässt sich ablesen, dass die RNA der untersuchten Probe eine geringe Diversität aufwies.

Um zu vergleichen, welche RNA-basierten Sequenzen mit denen der DNA-Analysen übereinstimmten, wurden die häufigsten OTUs der RNA-Probe mit den DNA-Proben verglichen und in Tabelle 25 zusammenfassend dargestellt.

Die acht orange markierten Reihen in Tabelle 25 sind die häufigsten OTUs, die in allen DNA-Proben vorkamen und laut Zuordnung auch in der RNA-Analyse (W13RNA) detektiert worden sind. Dabei wird ersichtlich, dass 1807 Sequenzen, die als unklassifizierte Archaea in der Probe W13RNA detektiert wurden, zu einer OTU (OTU0005) gehören und den dominierenden Anteil an der gesamten Archaea Gemeinschaft ausmachten. Auch in den DNA-Proben wurde diese OTU0005 zu einem großen Anteil generiert. Die weiteren OTUs, die in jeder Probe nachgewiesen wurden und auch in großer Sequenzanzahl je OTU vorhanden waren, gehörten größtenteils zur Klasse Thermoplasmata (Ferroplasma, Thermogymnomonas) und eine OTU gehörte zur Klasse Methanobacteria (Methanobrevibacter) (siehe Tabelle 25).

**Tabelle 25: Zusammenfassung der häufigsten OTUs aus der RNA-basierten Pyrosequenzierungs-bibliothek (W13RNA, grau) mit Zuordnung der OTUs zu Taxonomie.**

Gruppe	W11	W12	W13	F11	F12	F13	R12	W13RNA	Phylum	Klasse	Genus
Otu0002	4	3	7	1	7	0	41	29	unklassifiziert		
Otu0003	12	8	11	3	1	16	19	4	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobrevibacter
Otu0005	335	1905	5825	27	2957	23	1345	1807	unklassifiziert		
Otu0012	1398	298	1050	212	140	30	83	744	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0017	1228	149	158	617	92	1	44	270	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Ferroplasma
Otu0018	964	217	639	111	73	11	40	423	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0034	222	45	203	54	38	2	15	204	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermogymnomonas
Otu0046	223	41	45	141	12	0	11	46	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0050	157	10	215	9	3	0	15	74	Crenarchaeota	Thermoprotei	
Otu0066	149	17	64	13	8	2	18	18	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermogymnomonas
Otu0079	61	5	63	11	1	0	9	29	unklassifiziert		
Otu0108	36	15	18	13	3	3	7	18	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0118	44	9	8	11	8	0	5	8	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0131	15	13	18	0	2	0	1	26	Euryarchaeota	Thermoplasmata	
Otu0161	6	5	1	10	4	0	5	12	Euryarchaeota		

11 der insgesamt 34 OTUs der Probe W13RNA waren einzigartig in dieser Probe und sind in keiner DNA-Probe zuvor detektiert worden (hier nicht gezeigt). Die 11 OTUs enthielten entweder jeweils nur

eine oder zwei Sequenzen und gehörten hauptsächlich zu unklassifizierten Archaea und zur Klasse Thermoplasmata (Gattung *Thermogymnomonas*).

#### **4.3.11. Untersuchung der RNA- und DNA basierten Archaeegemeinschaft**

Der Vergleich der Pyrosequenzierungsbibliotheken der DNA- und der RNA-Analyse soll verdeutlichen, welche der mittels DNA nachgewiesenen Archaea Spezies stoffwechselaktiv waren. Dafür wurden die Arten in der Wasserprobe 03/2013 mittels RNA-Analyse identifiziert, die zum Zeitpunkt der Probennahme Stoffwechsel betrieben haben. Die 7 nachgewiesenen phylogenetischen Gruppen der RNA-Analyse (03/2013) bewegten sich im Vergleich zu den 6 - 13 Archaea Taxa der DNA-basierten Pyrosequenzierung im unteren Bereich. Ebenfalls 7 Taxa wiesen die DNA-Proben des Grubenwassers W12 (10/2012) und W13 (07/2013) auf. Vergleicht man die nachgewiesenen RNA-basierten Taxa mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung der 16S rDNA, fällt eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten auf. Die dominierenden Archaea sind in der RNA- und DNA-Analyse die Klasse Thermoplasmata und die Gruppe der unklassifizierten Archaea. Unterschiedlich sind dabei lediglich die prozentualen Anteile in den einzelnen Proben. Thermoplasmata, darunter *Ferroplasma spp.* und *Thermogymnomonas spp.*, nahmen in der RNA-Probe (W13RNA-03/2013) einen Sequenz-Anteil von 47 % ein, in den DNA-Proben bewegten sich die Anteile je nach Probe zwischen 11 und 95 %. Die unklassifizierten Archaea dominierten die RNA-Probe mit 50 %, wohingegen in den DNA-Proben die Anteile der unklassifizierten Archaea von 3 bis 88 % variierten und sich je nach Probe mit den Thermoplasmata als dominierende Gruppe abwechselten. Bei der RNA-Probe könnte man eher von einer Co-Dominanz sprechen, da unklassifizierte Archaea und Thermoplasmata jeweils fast 50 % der archaealen Gemeinschaft ausmachten. Ähnlich wie in den DNA-Proben spielten in den RNA-Proben die anderen Klassen nur eine untergeordnete Rolle. Die Crenarchaeota, die in allen DNA-Proben (außer F13) als Thermoprotei gefunden worden, sind mittels RNA-Analyse ebenfalls als stoffwechselaktiv detektiert worden. Die prozentualen Anteile der Thermoprotei Klasse an der Gesamt-Sequenzzahl ähnelten sich bei der DNA- (von 0 bis 3 %) und RNA-Analyse (2 %). Den geringsten Anteil an stoffwechselaktiven Archaea stellte die Klasse Methanobacteria dar, die mit den Gattungen *Methanobrevibacter* und *Methanobacteria* auch in den DNA-Proben nachgewiesen wurde. Die Gruppe Methanomicrobia, die nur in der DNA-Probe R12 (Reaktor Biofilm 10/2012) detektiert wurde, konnte nicht als stoffwechselaktive Klasse mittels RNA-Analyse bestätigt werden. Nachweislich war die Gruppe Methanomicrobia nicht im Grubenwasser enthalten, sondern stammte noch aus dem Kläranlagen-Biofilm, der an den Reaktor-Trägern als Initiator diente (siehe Kapitel 3.2.2.). Ebenso wie die Methanomicrobia wurden auch Halobacteria in zwei DNA-Proben vereinzelt detektiert, jedoch nicht als stoffwechselaktive Mikroorganismen identifiziert.

Insgesamt konnten sehr starke Ähnlichkeiten der archaealen Biozönose in den DNA- und RNA-Proben anhand der analysierten Taxa verzeichnet werden. Durch beide Analysen wurden unklassifizierte Archaea und Thermoplasmata, insbesondere *Ferroplasma spp.*, als dominierende stoffwechselaktive Taxa beschrieben. Außerdem sind in Übereinstimmung mit den DNA-Analysen Thermoprotei und Methanobacteria als stoffwechselaktiv detektiert worden. Halobacteria und Methanomicrobia waren zwar in vereinzelt DNA-Proben gefunden worden, wiesen jedoch keine Stoffwechselaktivität auf.

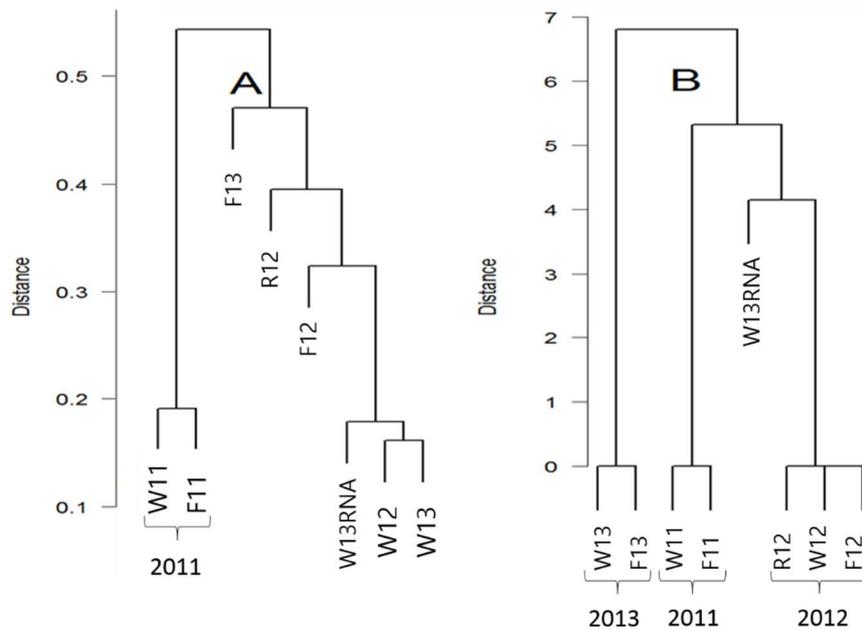
Um die DNA- und RNA-basierten Analysen detailliert zu vergleichen, sollte in zukünftigen Analysen die gleiche Anzahl an Proben und Sequenzen untersucht und ausgewertet werden.

#### **4.3.12. Einfluss der chemischen Grubenwasser-Parameter auf die archaeale Gemeinschaft**

Um zu vergleichen, ob die chemischen Parameter des Grubenwassers Königstein Einfluss auf die Zusammensetzung der archaealen Gemeinschaft hatten, wurden Korrelations-Diagramme anhand der OTU basierten Analysen der Pyrosequenzierung und der chemischen Parameter der entsprechenden Probenahmedaten erstellt. Die Probenahmezeitpunkte der Archaea und der Bakterien waren gleich und wiesen somit die gleichen Messwerte auf. Die chemischen Parameter des Grubenwassers zu den ausgewählten Probenahmedaten sind in Tabelle 17 in Kapitel 4.3.5. zusammengefasst und werden hier nicht dargestellt.

Zur Beurteilung der Ähnlichkeit der Archaea Populationen zwischen den Proben wurde eine Clusteranalyse der Proben basierend auf den chemischen Umweltparametern (B) und den OTU basierten Analysen der Bibliotheken (A) erstellt und in Abbildung 30 dargestellt. Die Ähnlichkeit der Proben spiegelt sich in der Ausbildung von Clustern wieder.

In Abbildung 30 im Dendrogramm B sind dabei drei ausgeprägte Cluster zu erkennen, die alle mit dem jeweiligen Probenahmezeitpunkt korrelieren, da sie innerhalb eines Clusters die gleichen Umweltparameter aufwiesen (Tabelle 17, Abb. 4.3.5.). Ähnliche Clusterbildung innerhalb des Dendrogramms A mit B deuten auf einen Einfluss der chemischen Parameter des Grubenwassers auf die archaeale Zusammensetzung hin. Im Dendrogramm A der Clusteranalyse erkennt man, dass die Probe W11 mit Probe F11 ein Cluster bildet, genauso wie in Dendrogramm B. Dieses Cluster, welches die Flusszell- und Wasserprobe des Jahres 2011 beinhaltet, wurde durch die Umweltparameter im Grubenwasser beeinflusst.



**Abbildung 30: Dendrogramme der Clusteranalyse mit den ausgewählten Proben der DNA und RNA-basierten Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der Archaea durch (A) relative OTU Anteile an der Gesamtsequenzanzahl und Bray-Curtis Unähnlichkeiten oder (B) standardisierte Messungen der Umweltparameter und Euclidean Entfernungen.**

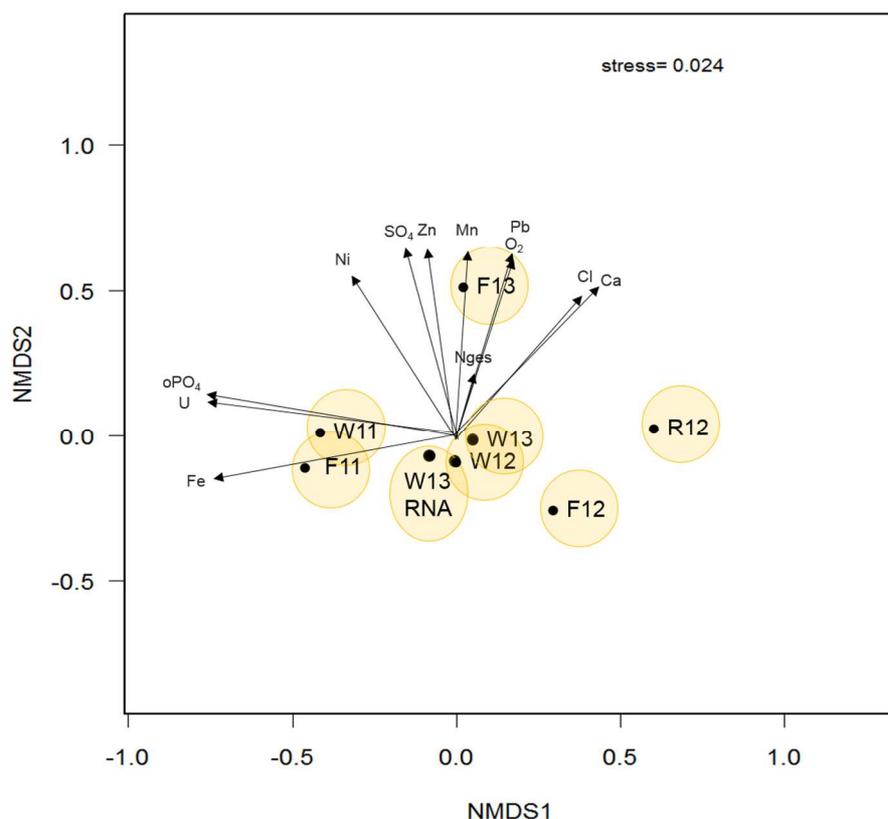
Alle weiteren Proben (außer W11 und F11) in Dendr. A stimmen mit den Clustern in Dendr. B nicht überein und werden somit zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst. Neben geringen methodischen Abweichungen, aber auch durch die Neubildung und das Absterben von archaealen Zellen im Grubenwasser können Schwankungen in der Zusammensetzung der archaealen Population entstehen, die nicht durch die chemischen Parameter de Grubenwassers begründet sind. Des Weiteren können Archaea von chemischen und physikalischen Faktoren beeinflusst werden, die nicht gemessen wurden bzw. in den Korrelationsdiagrammen nicht berücksichtigt wurden. Ein großes Cluster im Dendrogramm A im Hinblick auf die archaeale Biozönose bildeten die Wasser- und Flusszellenproben der Jahre 2012 und 2013. Ein Subcluster darin bildeten die Wasserproben der Jahre 2012 und 2013 (W12 und W13), die sich in der mikrobiellen Zusammensetzung ähnelten. Die OTU basierte größte Ähnlichkeit zur RNA-Probe W13RNA (03/2013) wiesen die Wasserproben W13 und W12 anhand der Archaea Gemeinschaft auf (Abbildung 30A). Die Biofilm-Proben der Jahre 2012 und 2013 (F12, R12, F13) separierten sich von den Wasserproben der gleichen Jahre und bildeten kein deutlich ausgeprägtes Cluster.

Welcher der chemischen Parameter die spezifische Zusammensetzung der Archaea je Probe beeinflusst hat, wurde durch eine Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (Cox, 1994, Kruskal, 1964) mit Hilfe des Programms R (R. Development, 2010) auf der Basis der relativen Häufigkeit jeder Sequenz je OTU (0,03 Sequenz Divergenz) und der chemischen Parameter (Stressfaktoren) je

Probenahmestelle ermittelt und gegenübergestellt (Abbildung 31). Hierbei wurde der direkte Zusammenhang zwischen dem umweltfaktorabhängigen Auftreten eines OTUs in Bezug zur jeweiligen Probenahmestelle dargestellt, so dass ein spezifischer Einfluss eines Umweltfaktors auf die Zusammensetzung einer Lebensgemeinschaft an einer Stelle visualisiert werden konnte. Im NMDS-Diagramm (Abbildung 31) wurden die analysierten Proben gelb eingekreist, um sie von den chemischen Parametern zu unterscheiden.

Die Koordination der Umweltparameter (durch Pfeile angegeben) in der NMDS zeigt, dass die archaeale Zusammensetzung der Proben durch die chemischen Parameter kaum beeinflusst wird (siehe Abbildung 31).

Kein chemischer Parameter wirkt einem anderen in Bezug auf die archaeale Verteilung in den Proben entgegen. Die NMDS-Analyse der Pyrosequenzierungs-Bibliotheken gibt für die Archaea Biozönose einen positiven Zusammenhang für Probe W11 (Flusszelle 11/2011) und einen negativen Zusammenhang für W13 (Wasser 07/2013) zu den Faktoren Phosphat (Abbildung 31, oPO<sub>4</sub>) und Uran (Abbildung 31, U) an, deren Pfeilrichtungen übereinander liegen.



**Abbildung 31: Nichtmetrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) für die archaealen Pyrosequenzierungs-Bibliotheken der RNA und DNA Analyse.** *Eingekreist sind die verwendeten Proben dargestellt W11: Wasser 2011, W12: Wasser 2012, W13: Wasser 2013, F11: Flusszelle 2011, F12: Flusszelle 2012, F13: Flusszelle 2013, R12: Reaktor 2012.*

Jedoch zeigt die Berechnung des Signifikanz Faktors, dass nur Phosphor einen signifikanten (Signifikanz-Faktor  $P=0,01$ ) Einfluss auf die Archaea ausübte. Aufgrund der sehr geringen Phosphorkonzentration (siehe Tabelle 17 in Kapitel 4.3.5.) im Grubenwasser ist ein Einfluss des Phosphors auf die Zusammensetzung der Archaea nicht realistisch. Zwar wurden in der Literatur Zusammenhänge von der Phosphatkonzentration der Umgebung mit crenarchaeotalen 16S rRNA Genkopien beschrieben (Herfort, 2007), jedoch kann dieser Zusammenhang zwischen Ammonium-oxidierenden Archaea und den Phosphatkonzentrationen im Grubenwasser Königstein nicht nachgewiesen werden.

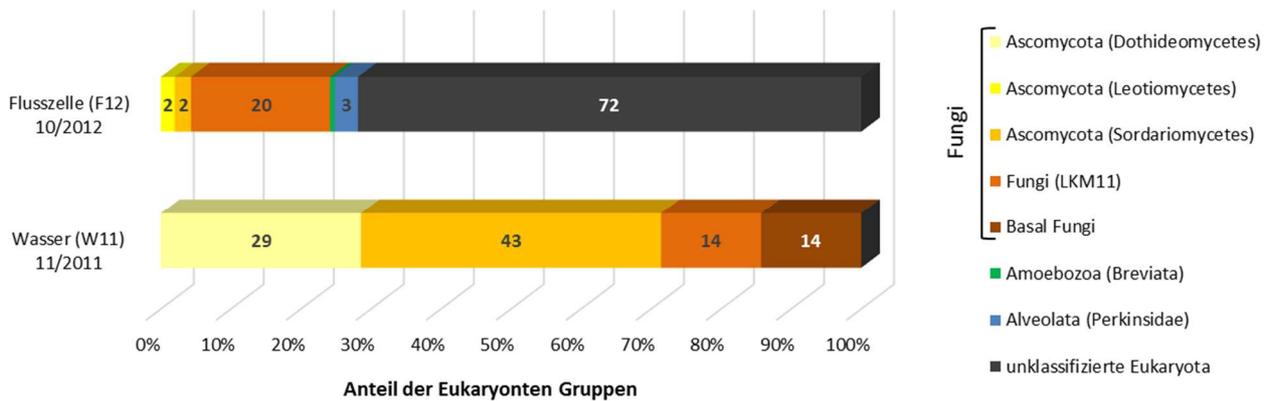
Alle anderen Korrelation zwischen den Umweltparametern im NMDS Diagramm in Abbildung 31 und den Archaea Zusammensetzungen der jeweiligen Proben wurde nicht als signifikant für die Zusammensetzung der Archaea-Gemeinschaft in Königstein bewertet.

## 4.4. Charakterisierung der Eukaryonten

### 4.4.1. Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Eukaryonten durch molekular-biologische Methoden

Mit CARD-FISH konnte gezeigt werden, dass Eukaryonten sowohl in den Grubenwasserproben, als auch in den Biofilmproben existierten. Im Gegensatz zu den Bakterien, die den größten Anteil der mikrobiellen Biozönose ausmachten, war der Anteil der Eukaryonten an der Gesamtzellzahl mit  $< 0,2\%$  (siehe Abbildung 15, Kapitel 4.2.1.1.) der geringste. Durch die CARD-FISH wurden die Eukaryonten quantitativ erfasst. Um eine qualitative Beurteilung der Eukaryonten im Grubenwasser zur vollständigen Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu erzielen, wurde zusätzlich die Methode der Pyrosequenzierung genutzt. Dabei wurden nach Isolierung der Gesamt-DNA, die 18S rDNA-Fragmente mit Hilfe des Primersystems 3NDf/V4\_Euk\_R12 (Liu et al., 2012) amplifiziert (Tabelle 8, Kapitel 3.10.8.) und sequenziert. In jeder Probe (Biofilme und Grubenwasser, 2011 bis 2013) konnten Eukaryonten-Fragmente als PCR-Produkte detektiert werden. Da das Augenmerk in dieser Arbeit auf den (dominanten) Bakterien lag, wurden lediglich zwei Proben zur Sequenzierung ausgewählt. Für die Durchführung der Pyrosequenzierung wurde je eine Probe des Grubenwassers des Jahres 11/2011 (W11) und des Biofilms der Flusszelle 10/2012 (F12) analysiert. Insgesamt wurden für das Wasser (W11-11/2011) 14 und für die Flusszelle (F12-10/2012) 302 Sequenzen generiert. Die Sequenzen wurden, entsprechend der Angaben im Kapitel 3.11.2., bearbeitet. Der relative Anteil der ermittelten phylogenetischen Gruppe je Sequenzbibliothek ist in Abbildung 32 dargestellt.

Das ausgewählte Primerpaar 3NDf - V4\_Euk\_R12 erfasst dabei 62 % der Eukaryonten, laut SILVA-Datenbank (SILVA, TestPrime). In der Wasserprobe W11 (11/2011) konnte nur ein Taxon (Fungi) identifiziert werden, im Biofilm der Flusszelle F12 (10/2012) dagegen waren drei Taxa vertreten (unklassifizierte Eukaryonten ausgenommen) (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Zusammensetzung der Eukaryoten in der Wasserprobe W11 (11/2011) und der Biofilmprobe der Flusszelle F12 (10/2012) nach DNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.**

Im Biofilm der Flusszelle (F12-10/2012) dominierte neben einer großen Anzahl von unklassifizierten Eukaryoten (72 %, Abbildung 32, dunkelgrau) die Gruppe Fungi die Eukaryoten Gemeinschaft mit 24 % (Abbildung 32, gelb-orange Töne). Innerhalb der Fungi waren die Phyla Ascomycota, Basal Fungi und LKM11 vertreten. Dabei wurden mit dem ausgewählten Primerpaar 77 % der Fungi der SILVA Datenbank (SILVA, TestPrime) erfasst. Die drei gefundenen Klassen Dothideomycetes, Sordariomycetes und Leotiomycetes des Phylums Ascomycota sind in sauren Milieus weit verbreitet z.B. in sauren Böden der Tschechischen Republik (Hujšlova, 2014). Die Dothideomycetes, Vertreter der Fungi, die vorwiegend im Königstein Wasser (W11) zu finden waren, wurden schon in anderen Habitaten mit niedrigem pH-Wert nachgewiesen (Baker, 2004) und kultiviert. Dabei waren sie in Milieus z.B. in Richmond Mountain mit weitaus niedrigeren pH-Werten im Vergleich zum Königstein Grubenwasser gefunden worden und tolerierten pH-Werte bis zu 0,76 (Baker, 2004). Die Klassen Dothideomycetes und Sordariomycetes, die im Grubenwasser W11 (11/2011) zu einem großen Anteil gefunden wurden, im Biofilm dagegen nur einen kleinen Anteil ausmachten, konnten auch in einer sauren Schwermetallhaltigen Mine in Pennsylvania (USA) nachgewiesen werden (Santelli *et al.*, 2010). Dabei wurden innerhalb der beiden Klassen Mangan(II)-oxidierende Fungi identifiziert. Basal Fungi, zu denen die morphologisch und ökologisch diversen Gruppen Chytridiomycetes, Zygomycetes, AMF und Microsporidia gehören (Tanabe, 2005), wurden ausschließlich in der Wasserprobe der Königstein Mine nachgewiesen (Abbildung 32). Die Gruppe LKM11, die durch die Primer zu 93 % erfasst wird, wurde in den Wasser- und Biofilmpuben mit einem erheblichen Anteil identifiziert (14 % und 20 %, Abbildung 32). Pilzhyphen machen einen signifikanten aber variablen Anteil der gesamten Biomasse in vielen Biofilm Gemeinschaften aus. Pilz Filamente, die hier z.B. als Dothideomycetes, Sordariomycetes und LKM11 identifiziert wurden, geben dem Biofilm Festigkeit und Organisation und verankern ihn (v.a. in fließenden AMD Systemen) auf Oberflächen oder in Gesteinen (Sedimenten) (Baker, 2003).

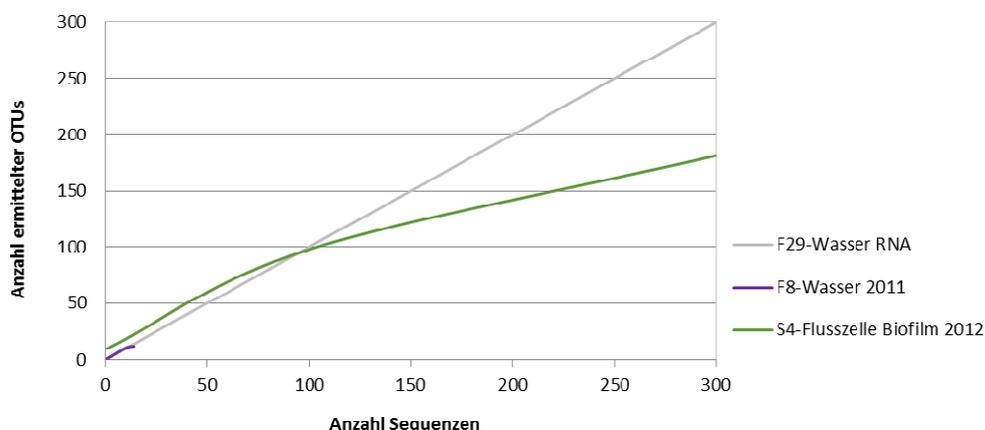
Fungi beeinflussen außerdem die Biofilmstruktur, indem sie organische Ausscheidungen/Abfälle verwerten und organische Polymere (auch Antibiotika) produzieren (Baker, 2004). Damit halten Pilze das Level an organischen Verbindungen niedrig und produzieren unlösliche Kohlenstoff-Verbindungen, die für das Wachstum von chemolithoautotrophen acidophilen Prokaryonten wichtig sind. Große Pilzfilamente helfen den Prokaryonten beim ersten Anheften an Oberflächen.

Zusätzlich zu den identifizierten Fungi wurden Vertreter der Gruppen Alveolata mit 3 % und Amoebozoa mit < 1 % im Biofilm der Flusszelle nachgewiesen (Abbildung 32, blau und grün), die zu den komplexen Einzellern gehören. Innerhalb der Gruppe Alveolata wurden Perkinsidae nachgewiesen, in der Gruppe der amöboiden Einzeller, der Amoebozoa, wurden die Sequenzen den Breviata zugeordnet. Der ausschließliche Nachweis der Einzeller (Amoebozoa und Alveolata) im Biofilm der Königstein Proben ist durch das Nahrungsverhalten der Einzeller (Protozoa) begründet. Protozoa fressen Prokaryonten (Ehrlich, 1963), die in großer Anzahl vorhanden sind und beeinflussen damit die Zellzahl der Prokaryonten (und somit auch die Oxidationsraten) (Baker, 2004). Protisten können durch selektive Auswahl der Nahrungsquelle aus der Biofilmgemeinschaft (z.B. Archaea) gezielt Einfluss auf die AMD Biofilm Gemeinschaft ausüben (Baker, 2004). Da die Bakteriendichte in den Biofilmen höher ist als im Grubenwasser Königstein, bevorzugen die Einzeller die Besiedlung der Biofilme. Protisten kommen fast überall in AMD Biofilmen vor, sind jedoch bis jetzt noch wenig untersucht worden, da ausschließlich Prokaryonten durch ihren Einfluss im Eisen- und Schwefelkreislauf für die Wissenschaft interessant schienen (Bond, 2000, Druschel, 2004). Außerdem tolerieren viele Protozoa einen sauren pH-Wert und hohe Konzentrationen von (Schwer)metallen z.B. Eisen (McGinness, 1992) und grasen vorzugsweise die acidophilen *Acidithiobacillus spp.* ab. Die mobileren *Leptospirillum spp.* werden daher nur an zweiter Stelle als Nahrungsquelle durch die Einzeller ausgewählt (Johnson, 1993). Auch in anderen "acid mine drainage" Habitaten wie z.B. im RioTinto wurden Eukarya nachgewiesen, vorzugsweise Algen, Ciliaten, Flagellaten, Amöben und Fungi (Amaral-Zettler, 2002, Baker, 2003, Baker, 2004). Baker (Baker, 2004) zeigte, dass die mikrobiellen Gemeinschaften in „acid mine drainages“ aus Fungi und Protisten in Formation eines Biofilms aus Bacteria und Archaea bestehen. In den Analysen von Baker (Baker, 2004, Baker *et al.*, 2009), in denen die 18S rRNA Genbibliotheken der unterirdischen mikrobiellen Eisen- und Schwefel-oxidierenden Gemeinschaft der sehr sauren (pH < 0,9) Richmond Mine im Iron Mountain (Nord Kalifornien, USA) analysiert wurde, gehörte die Mehrheit der Eukaryonten Sequenzen zur Gruppe der Fungi und zu Protisten (Vahlkampfiidae). Dieses Ergebnis wird durch die Resultate der Königstein-Analysen bestätigt, bei dem ebenfalls Fungi und Protisten die Eukaryonten Biozönose dominieren.

#### 4.4.1.1. Bewertung des Artenreichtums der Eukaryonten

Aufgrund der geringen Probenanzahl und der unterschiedlichen Sequenzanzahlen der Proben untereinander wurde die Bewertung des Eukaryonten-Artenreichtums nicht wie in den Kapiteln 4.3.1.2. und 4.3.9.1. mittels Alpha-Diversität beurteilt. Die Bewertung der Eukaryonten Biozönose erfolgte durch die Errechnung der „Rarefaction Kurven“ (wie im Kapitel 3.12. beschrieben) und anhand der Taxa in Korrelation zur OTU -und Sequenzanzahl. Die Rarefaction-Kurven der Eukaryonten-Proben sind in Abbildung 33 dargestellt. Die insgesamt 14 analysierten Sequenzen für die Wasserprobe W11 (11/2011) und 302 Sequenzen für die Biofilmprobe der Flusszelle F12 (10/2012) wurden in 12 bzw. 182 OTUs gruppiert. Anhand der Rarefaction Kurven in Abbildung 33 ist zu erkennen, dass die Anzahl der ausgewerteten Sequenzen nicht ausreichte, um die gesamte Eukaryonten Diversität zu erfassen. Die Kurve der Wasserprobe W11 (dunkel-violett) scheint steil anzusteigen, anhand der wenigen Sequenzen ist das jedoch schwer zu beurteilen. Die Kurve der Biofilmprobe F12 (grün) zeigt in Abbildung 33 einen flacheren Verlauf, dennoch nähert sich der Kurvenverlauf keiner Asymptote.

Die Anzahl der OTUs im Vergleich zu den analysierten Sequenzen (12 OTUs von 14 Sequenzen und 182 OTUs von 302 Sequenzen) ist sehr hoch, was auf eine hohe Diversität hinweist. Im Vergleich dazu weisen die Bakterien nur 48-176 OTUs von 190-12021 Sequenzen auf und die Archaea beinhalten lediglich 10-33 OTUs von 91-8362 Sequenzen. Das heißt bei 12021 Bakterien Sequenzen, die in 176 OTUs gruppiert wurden, wurde die Gemeinschaft fast vollständig erfasst, im Gegensatz zu den Eukaryonten Sequenzen, bei denen 302 Sequenzen, die in 182 OTUs gruppiert wurden, nicht ausreichten, um die Gemeinschaft vollständig zu beschreiben. Die Artenvielfalt der Eukaryonten im Königstein Habitat scheint vermutlich hoch zu sein, auch wenn die Domäne Eukarya laut CARD-FISH den geringsten Anteil an der Biozönose ausmacht.



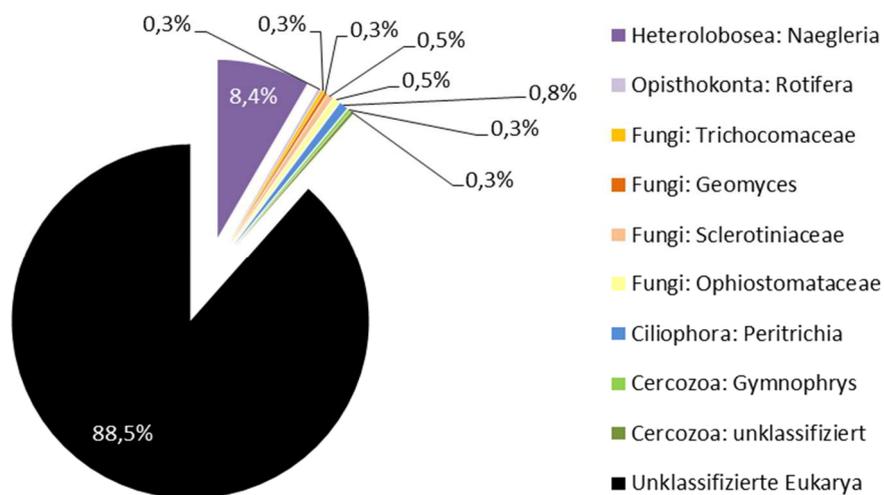
**Abbildung 33:** „Rarefaction“-Kurven der Pyrosequenzierungsbibliotheken für Eukaryonten.

Beim Vergleich der Wasserprobe W11 (11/2011) und der Biofilmprobe F12 (10/2012) im Hinblick auf die Anzahl detektierter Taxa (eins und drei) sind die Unterschiede zwischen den Proben auf die Anzahl der analysierten Sequenzen zurückzuführen. In der Wasserprobe W11 konnten nur 14 Sequenzen ausgewertet werden, folglich ist die die Anzahl der Taxa geringer als in der Biofilmprobe. Auch Baker (Baker, 2004) hat in dem ähnlichen Milieu Richmond Mine (Iron Mountain) eine geringe Taxa-Anzahl von 3 (Fungi, Heterolobosea und Algen) beschrieben. Dagegen berichtet Amaral-Zettler (Amaral-Zettler, 2002) über eine hohe Eukaryonten Diversität in dem AMD beeinflussten Fluss „RioTinto“. Das ist nicht verwunderlich, da der RioTinto ein Oberflächenwasser, im Vergleich zur Richmond Mine und Königstein Mine, ist und somit von phototrophen Organismen (z.B. Algen) besiedelt wird. In den unter Tage Habitaten Richmond Mine und der Königstein Mine wurden solche phototrophen Organismen nicht nachgewiesen. In der Richmond Mine (Baker, 2004) wurden, ähnlich wie in den Königstein Proben, zwei Typen von Protisten nachgewiesen, die zu Vahlkampfia und Rhodophyta gehörten. Im Biofilm der Königstein Grube wurden die identifizierten Protisten zu Perkinsidae (Alveolata) und Breviata (Amoebozoa) zugeordnet. Anhand von mikroskopischen Aufnahmen konnten jedoch in der Richmond Mine fünf Protisten Typen identifiziert werden, die mittels molekularbiologischen Methoden nicht ermittelt werden konnten (Baker, 2004). Auch in Königstein wurden im Biofilm aus der Flusszelle F12 Eukaryonten mittels Lichtmikroskopie nachgewiesen, vor allem die hyphenartigen Strukturen der Fungi und auch einige Flagellaten konnten identifiziert werden. Diese wurden jedoch nicht nach Typen sortiert oder näher bestimmt. Die Lichtmikroskopie diente lediglich der makroskopischen Kontrolle, ob sich Eukarya im Biofilm befanden. Im Kapitel 4.5.1. sind einige mikroskopische Aufnahmen abgebildet, bei denen vor allem die Pilzstrukturen zu erkennen sind. Die Studie von Baker zeigt jedoch, dass selbst die modernen molekularbiologischen Methoden nicht effizient genug sind, um vor allem Eukaryonten zu identifizieren, da sie im Aufbau sehr unterschiedlich sind und schon bei der Zellyse besondere Behandlung benötigen. Auch bei der Nutzung von unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden und unterschiedlichen Primersets ist es Baker nicht gelungen die vollständige Zusammensetzung der Eukaryonten zu detektieren (Baker, 2004). Auch in den Königstein Proben könnte die geringe Effizienz der molekularbiologischen Techniken ein Grund für die geringe Anzahl an detektierten Sequenzen sein. Das Zurückgreifen auf die Methode der Lichtmikroskopie ist durchaus sinnvoll, die jedoch sehr viel Erfahrung des Mikroskopierenden voraussetzt. Neue Methoden der DNA-Extraktion, neue Primer und die Optimierung der PCR-Bedingungen sind notwendig, um die Protisten Gemeinschaft in AMD Habitaten molekularbiologisch vollständig zu charakterisieren (Baker, 2004).

#### 4.4.2. Charakterisierung der stoffwechselaktiven Eukaryonten durch molekularbiologische Methoden

Die Pyrosequenzierung des DNA-Amplikons ermöglichte die Identifizierung der Eukarya Spezies in den untersuchten Wasser und Biofilmprouben. Um die stoffwechselaktiven Eukarya im Grubenwasser Königstein zu identifizieren, wurde die Pyrosequenzierung mit zuvor isolierter RNA durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gemeinschaft stoffwechselaktiver Eukarya und deren prozentuale Anteile in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung sind in der Abbildung 34 dargestellt.

Insgesamt konnten 5 Taxa (außer unklassifizierte Eukarya) mittels Pyrosequenzierung in der Wasserprobe (W13RNA) nachgewiesen werden: Heterolobosea, Fungi, Opisthokonta, Cercozoa und Ciliophora, (Abbildung 34). Dabei wurde der größte Anteil (88,5 %) der Sequenzen keiner Klasse zugeordnet und ist in Abbildung 34 (schwarz) als Gruppe „unklassifizierte Eukarya“ gekennzeichnet. Diese Gruppe der acidophilen Eukaryonten wurde von Baker (Baker et al., 2009) „acidophilic protist clade“ (kurz APC) genannt. Da keine nähere Zuordnung (Protisten, Algen, oder Fungi) bekannt ist, werden sie, wie durch Zirnstein (Zirnstein, 2012) als „acidotolerant eukaryote cluster „ (AEC) bezeichnet.



**Abbildung 34: Zusammensetzung der Gemeinschaft stoffwechselaktiver Eukarya in der Wasserprobe W13RNA vom 03/2013 nach RNA-Extraktion und Pyrosequenzierung.**

Die insgesamt 383 Sequenzen wurden 383 OTUs zugeordnet, so dass jede Sequenz nur einmal bei der Analyse identifiziert wurde. Das lässt auf eine sehr hohe Diversität schließen, die auch mittels der steil ansteigenden Rarefaction-Kurve in Abbildung 33 bestätigt werden kann. Im Vergleich zu den DNA-basierten Eukaryonten Sequenzen zeigt die RNA-Probe die größte Diversität, die mit weiteren Sequenzanalysen näher charakterisiert werden könnte. Unter den restlichen 11,5 % der klassifizierten

Sequenzen dominiert die Gruppe Heterolobosea mit 8,4 % (Abbildung 34, dunkel-violett) die Eukaryonten Gemeinschaft. Heterolobosea bilden eine Gruppe amöbenartiger Einzeller, die überwiegend amöboide Lebensformen als auch Flagellaten-Stadien, durch Ausbildung eines Mikrotubuli Zellskeletts, einnehmen können. Alle Heterolobosea Sequenzen wurden zur Gattung Naegleria (zur Familie der Vahlkampfiidae) zugeordnet (siehe Abbildung 34). Naegleria Verwandte sind weit verbreitet und leben bevorzugt in Süßwasser-Habitaten oder Böden, sind jedoch in einigen Lebensräumen mit niedrigem pH-Wert nachgewiesen worden. In der Studie von Baker (Baker et al., 2009), in der ein metallhaltiges AMD-Milieu charakterisiert wurde, konnten ebenfalls Naegleria nachgewiesen werden, insbesondere in Biofilmen. Im Fluss RioTinto (Spanien), einem durch hohe Eisen- und Sulfatkonzentrationen geprägten sauren Gewässer wurden Naegleria als amöbenartige Einzeller identifiziert (Aguilera et al., 2006, Amaral-Zettler, 2002).

Alle weiteren Taxa wurden mit einem geringen Anteil von < 2 % detektiert. Die Gruppe Fungi, die mit insgesamt 1,6 % als stoffwechselaktive Gruppe identifiziert wurde, konnte in vier verschiedene Gattungen bzw. Familien eingeordnet werden: Geomyces, Trichocomaceae, Sclerotiniaceae sowie Ophiostomataceae, die alle zu ascomycotischen Fungi gehören. Fungi sind vor allem in der Funktion als Zersetzer in vielen unterschiedlichen Milieus vertreten. In „acid mine drainages“ sind Fungi häufig zu finden, jedoch nicht als strikt Acidophile, eher als acidotolerant. Um trotzdem im sauren Milieu überleben zu können, pumpen Fungi Protonen aus den Zellen in die Umgebung und schaffen eine niedrige Protonenmembranpermeabilität (Nicolay, 1987). In der Richmond Mine (Iron Mountain, CA, USA) dominieren Fungi sogar die saure schwermetallhaltige Eukaryonten Gemeinschaft (Baker et al., 2009). Fungi spielen ebenfalls in der Untersuchung des Gewässers RioTinto (Amaral Zettler, 2003) eine große Rolle, da sie metallresistent sind und Metalle an ihrer Zellwand oder in ihrem EPS- (Extrazelluläre polymere Substanzen) Schleim adsorbieren können (Das, 2009, Durán, 1999). Es erlaubt die Existenz von weniger toleranten Organismen in Habitaten mit toxischen Metallen. Das bestärkt die Annahme, dass die identifizierten Fungi im Metall-haltigen Milieu des Grubenwassers Königstein die Biozönose durch Aufnahme der Metalle beeinflussen. Außerdem könnten Fungi durch Anreicherung der Umgebung mit organischen Verbindungen (als Quelle) heterotrophen Sulfat-reduzierenden Bakterien helfen sich in anaeroben Umgebungen zu etablieren (Das, 2009). Eine weitere Methode stoffwechselaktive Eukaryonten zu identifizieren, ist die Untersuchung der Beta-Tubulin Gene, wie in der Studie von Baker (Baker, 2004). In der Studie wurden die Beta-Tubulin Sequenzen mit den Sequenzen der 18S rRNA gegenübergestellt. Dabei wurden vor allem Eurotiomycetes, die auch als stoffwechselaktive Fungi (Familie Trichocomaceae) im Grubenwasser Königstein gefunden wurden, in den Beta-Tubulin und den 18S rRNA Sequenzen identifiziert (Baker, 2004).

Die Eukaryonten Vertreter Ciliophora (Peritrichia), Cercozoa (Gymnophrys) und Opisthokonta (Rotifera) sind im Grubenwasser Königstein mit einem sehr geringen Anteil von < 1 % als stoffwechselaktive Organismen identifiziert worden (siehe Abbildung 34). Die Gruppe Ciliophora, die sich von Flagellaten und Bakterien ernährt, ist durch kurze borstenartige Ausstülpungen um den Körper gekennzeichnet, die zur Fortbewegung genutzt werden. Ähnlich wie Fungi, kommen Ciliophora in verschiedenen Habitaten z.B. in Süß- und Salzwasser oder Böden vor, aber wurden auch in einigen sauren Milieus gefunden. Im spanischen Fluss RioTinto wurden Ciliophora bereits bei einem pH Wert von ca. 2 nachgewiesen (Aguilera et al., 2006). Die im Grubenwasser Königstein detektierte, zu den Ciliophora gehörende, Subklasse Peritrichia ist, insbesondere mit dem Vertreter Vorticella, in AMD Habitaten weit verbreitet (Packroff, 2000). Die Art *Vorticella microstoma* ist metallresistent und sogar in der Lage Chrom, Zink und Blei-Verbindungen zu reduzieren (Rehman, 2010, Shakoori, 2004). Sie kann damit zur Bioremediation von mit toxischen Metallen verschmutzten Habitaten eingesetzt werden.

Cercozoa ist eine weit verbreitete (Böden, Süß- und Salzwasser) Gruppe Einzeller, zu der ein Großteil der Flagellaten sowie der nicht-photosynthetischen Amöben gezählt werden. Sie wurden mit einem Anteil von 0,6 % in Königstein detektiert und ernähren sich heterotroph, d.h. sie grasen Bakterien idealerweise in Biofilmen ab. Biofilme sind auch die bevorzugte Lebensform für einzellige eukaryotische Organismen, wie Mikropilze, Mikroalgen und Protozoen wie Flagellaten, Ciliaten und Amöben (Wingender, 1999a), in der die Überlebenschancen gegenüber extremen Bedingungen wie z.B. niedrigen pH-Werten und toxischen Metallen höher sind. Auch im sauren RioTinto sind Cercozoa als *Euglypha* oder *Nuclearia* identifiziert worden (Aguilera, 2010). Ihre morphologische, ökologische und genetische Diversität ist enorm groß und sie kommen in einem breiten Habitat-Spektrum vor (Keeling, 2001). Im Königstein Grubenwasser konnten Cercozoa Sequenzen dagegen zur Gattung *Gymnophrys* zugeordnet werden, die in „acid mine drainages“ noch nicht bekannt ist und auch mit Uran-kontaminierten Umgebungen bisher nicht in Zusammenhang gebracht wurde. *Gymnophrys spp.*, die normalerweise in Süßwasser-Habitaten zu finden sind, zählen eher zu den amöboiden Vertretern innerhalb der Cercozoa und besitzen lediglich reduzierte Flagellen.

Die, zu Opisthokonta gehörenden, Rotifera (früher Rotatoria) werden auch Rädertierchen genannt und gehören zu den mehrzelligen Organismen. Die sich mit ihrem Räderorgan sehr schnell fortbewegenden Rotifera konnten mit 0,3 % in den RNA-Wasserproben detektiert werden. Das Räderorgan ist ein Wimpernaparat und dient durch Erzeugung von Wasserwirbeln zum rotierenden Schwimmen im freien Wasser (Streble, 2006). Sie können eine Größe von bis zu 1000 µm erreichen und fressen eine Vielzahl von Einzellern (Ciliophora, Flagellaten, Amöben-artige) und strudeln Bakterien ein. Sie leisten damit einen Beitrag, um die Biofilmdicke zu kontrollieren (Bitton, 1994). Rotifera kommen ubiquitär

auf der Erde vor und sind als Extremophile sowohl im Packeis in der Arktis (Chengalath, 1985), in hydrothermalen Quellen (Wallace, 2005), in extremen Trockengebieten (Toyosi, 2011) oder in extrem sauren Habitaten (Deneke, 2000, Horvath, 1972) nachgewiesen worden. Auch im vergleichbaren Milieu RioTinto sind Rotifera (als *Rotaria sp.*) als Bewohner des sauren Flusses anhand von lichtmikroskopischen Methoden identifiziert worden (Aguilera et al., 2006).

In den Proben aus dem Grubenwasser Königstein findet man Arten wie Cercozoa: Gymnophrys, Heterolobosea: Naegleria, Ciliophora und Fungi, die auch in anderen Habitaten zu beobachten sind. Man kann schlussfolgern, dass nicht nur die Prokaryonten sondern auch Eukaryonten in extremen Habitaten weiter verbreitet sind als oft vermutet. Die Artenvielfalt ist dabei habitatspezifisch.

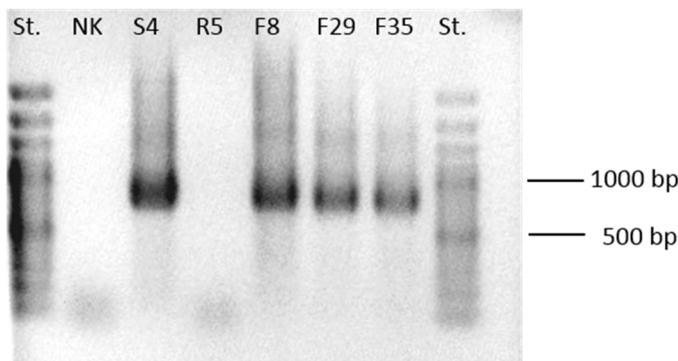
#### **4.4.3. RNA- und DNA basierte Eukaryonten**

Bei der Gegenüberstellung der Eukaryonten Sequenzen aus DNA und RNA-Analysen konnten keine gemeinsamen OTUs identifiziert werden. Das heißt, keine Sequenz, die in den DNA-Analysen gefunden wurde, wurde auch mit der RNA-Analyse detektiert. Ein Grund dafür könnte die geringe Anzahl an analysierten Sequenzen sein, die vor allem bei den DNA-Proben generiert wurden. Somit sind die DNA- und RNA-Analysen eher ergänzend zueinander zu betrachten. In Abbildung 36 in Kapitel 4.4.5. ist die Zusammensetzung der Eukaryonten Gemeinschaft der RNA- und DNA Analysen zusammengefasst dargestellt. Jedoch dominieren weiterhin die unklassifizierten Eukarya das Habitat. Zwar waren Fungi sowohl in DNA- und RNA-Analysen gefunden worden, jedoch wurden diese zu unterschiedlichen Familien zugeordnet. Alle anderen identifizierten Taxa der RNA-Analyse sind von den Taxa der DNA-Analyse verschieden. Eine lichtmikroskopische Charakterisierung der Eukarya würde die Ergebnisse abrunden und vervollständigen.

#### **4.4.4. Amplifizierung eines Kinetoplastea-spezifischen Fragments**

Anhand der Kinetoplastea spezifischen seminested PCR sollte überprüft werden, ob Kinetoplastea Spezies im Grubenwasser Königstein vorhanden waren. Die Primer EUK20F, Kineto651R und Kineto80F (Euringer & Lueders, 2008, Glaser, 2014) dienen zur Amplifizierung der gesuchten Eukaryonten Gruppe. Die Gruppe Kinetoplastea gehört zur Gruppe der Euglenozoa und beinhaltet die Untergruppen Prokinetoplastina und Metakinetoplastina (Moreira, 2004), wobei die ausgewählten spezifischen Primer nur die Gruppe Metakinetoplastina erfasst (Silva, TestPrime). Arten, die von den Primern innerhalb der Metakinetoplastina erfasst werden, sind z.B. *Trypanosoma spp.*, *Neobodo spp.*, *Parabodo spp.*, *Strikomonas spp.*, *Rhynchomonas spp.* und verschiedene Bodo Spezies (*Bodo saltans*, *Bodo edax*). Der Hintergrund dieser Untersuchung liegt bei der Tatsache, dass vor der Flutung des Schachtes, in dem die Biofilme gewachsen waren, eine dominante Anzahl von *Bodo saltans* innerhalb

der Eukaryonten gefunden wurde. Nach der Untersuchung konnte diese Art mittels Pyrosequenzierung nicht nachgewiesen werden. Die Amplifizierung eines Kinetoplastea-spezifischen Fragments sollte detaillierte Hinweise auf die Existenz der *Bodo saltans* liefern. Dazu wurden die DNA/cDNA-Extrakte der Proben F12 (Flusszelle 10/2012), W11 (Wasser 11/2011), W12RNA (Wasser 03/2012), W13 (Wasser 07/2013) und R13 (Reaktor 07/2013) mit den genannten Primern getestet. Das 570 bp große Fragment konnte in allen getesteten DNA-Extrakten außer in der Probe des Reaktor-Trägers R13 durch Generierung eines PCR-Produktes nachgewiesen werden (siehe Gelbild in Abbildung 35). Auch in der RNA-Probe W12RNA, wurde dieses spezifische Fragment amplifiziert, was bedeutet, dass die Arten der Kinetoplastea stoffwechselaktiv im Grubenwasser sind.



**Abbildung 35: Amplifikation des Kinetoplastea-Fragments.**

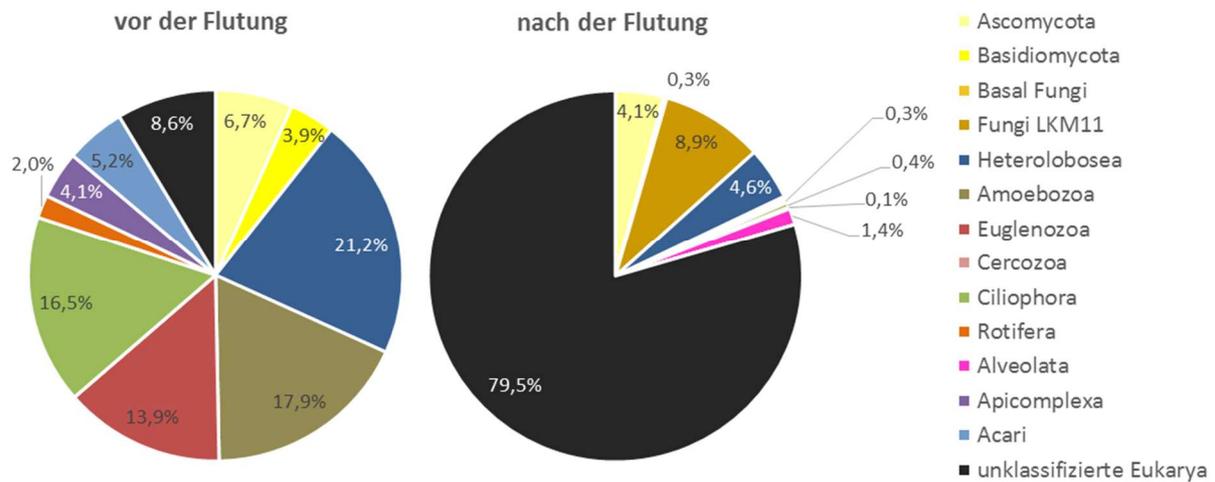
Die Identifizierung der einzelnen Spezies konnten mittels Klonierung und Sequenzierung aus Zeitgründen nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

#### **4.4.5. Charakterisierung der Eukaryonten vor und nach Flutung der Grube Königstein**

Beim Vergleich der Eukarya Gemeinschaft der Biofilme vor der Flutung (2010) und nach der Flutung (2011/12/13) wird in Abbildung 36 ersichtlich, dass die Zusammensetzung deutliche Unterschiede aufweist. Zur besseren Übersicht und Darstellung der Gemeinschaft wurden die relativen Anteile der Eukarya aller entnommenen Proben vor der Flutung (Stalaktite und Drainagerinne) und nach der Flutung (Grubenwasser und Biofilm) vereinigt und in Kreisdiagrammen zusammengefasst. Die Verteilung der Phyla, aber auch die Zusammensetzung der Phyla und Klassifizierung in Gattungen (siehe Tabelle 26) unterscheiden sich durch den Prozess der Flutung deutlich.

In den Proben nach der Flutung überwogen unklassifizierte Eukarya mit 79,5 % die Gemeinschaft (siehe Abbildung 36). Vor der Flutung war die Verteilung der einzelnen phylogenetischen Gruppen gleichmäßiger und nicht allein auf eine dominante Gruppe beschränkt. Die unklassifizierten Eukarya nahmen hier lediglich einen Anteil von 8,6 % ein. Vor der Flutung dominierten die Gruppen Heterolobosea (21,2 %), Amoebozoa (17,9 %) und Ciliophora (16,5 %), die nach der Flutung auch

Bestandteil der Gemeinschaft waren, jedoch zu wesentlich geringeren Anteilen und in anderer Zusammensetzung (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36: Zusammenfassung der Eukarya Gemeinschaften vor- und nach Flutung des Bergwerks Königstein.**

Gemeinsamer Vertreter innerhalb der Heterolobosea war die Gruppe der Naegleria (siehe Tabelle 26). Vor der Flutung wurden zusätzlich die Klassen Vahlkampfia und Paravahlkampfia detektiert, die nach der Flutung nicht mehr nachgewiesen wurden. Innerhalb der Amoebozoa sind keine Übereinstimmungen der detektierten Klassen/Arten festgestellt worden: vor der Flutung waren *Platyamoeba*, *Vannella*, *Thecamoeba* und *Diplophrys archeri* und nach der Flutung war *Breviata* Teil der Amöben Gemeinschaft. Auch bei Ciliophora konnten keine Arten klassifiziert werden, die vor und nach der Flutung gleichermaßen detektiert wurden. Vor der Flutung waren *Oxytricha* und *Vorticella* vorhanden, nach der Flutung *Peritrichia* (siehe Tab. 29). Fungi spielten in beiden Zeiträumen eine Rolle (siehe Abbildung 36, gelb-Töne), wobei es lediglich bei der Gruppe Ascomycota Überschneidungen gab, bei der *Sordariomycetidae* gefunden wurden. Die Zusammensetzung der Fungi vor und nach der Flutung unterschied sich ansonsten deutlich voneinander (siehe Tabelle 26). Beim Auftreten von Flagellaten, die vor der Flutung einen großen Teil (13,9 %) einnahmen, ist der Unterschied in der Zusammensetzung deutlich zu sehen. Vor der Flutung waren *Bodo saltans*, *Bodo angustus* und *Rhynchomonas nasuta* (zu den Euglenozoa gehörend) im Biofilm vorhanden, nach der Flutung fehlte die Gruppe der Euglenozoa ganz und Flagellaten der Gruppe Cercozoa (*Gymnophrys*) wurden nur zu geringen Anteilen (< 1 %) nachgewiesen (siehe Tabelle 26). Diese Unterschiede können auch eine Ursache der unterschiedlich angewendeten Methoden sein. Vor der Flutung wurden die Eukarya mittels Lichtmikroskopie und Sequenzierung identifiziert, nach der Flutung ausschließlich mittels Pyrosequenzierung. Da Eukarya untereinander einen unterschiedlichen Aufbau der äußeren Membran aufweisen, ist es möglich, dass mit den Methoden zur DNA-Extraktion nicht alle Eukarya-Membranen

aufgeschlossen werden konnten und somit nicht identifiziert wurden. Die Methode der Lichtmikroskopie ist eine zusätzliche Methode, die auch nach der Flutung, wertvolle Erkenntnisse über die vorkommenden Eukarya Gruppen geliefert hätte. Das Problem dabei war die Färbung der Biofilme durch Eisen-Präzipitate, die eine detaillierte Identifizierung durch Mikroskopie erschwerte.

**Tabelle 26: Klassifizierung der vorkommenden phylogenetischen Gruppen vor- und nach Flutung des Bergwerks Königstein.**

vor der Flutung	phylogenetische Gruppe	nach der Flutung
<b>Sordariomycetidae</b>	Ascomycota	<b>Sordariomycetidae</b> , Leotiomyces, LKM11, Dothideomycetes, Basal Fungi
Kwoniella	Basidiomycota	unklassifiziert
-	Basal Fungi	unklassifiziert
-	Fungi LKM11	unklassifiziert
<b>Naegleria</b> , Vahlkampfia, Paravahlkampfia	Heterolobosea	<b>Naegleria</b>
Platyamoeba, Vannella, Thecamoeba, (Diplophrys archeri)	Amoebozoa	Breviata
Bodo saltans, Bodo angustus, Rhynchomonas nasuta	Euglenozoa	-
-	Cercozoa	Gymnophrys
Oxytricha, Vorticella	Ciliophora	Peritrichia
unklassifiziert	Rotifera	unklassifiziert
-	Alveolata	Perkinsidae
Eimeria	Apicomplexa	-
Schwiebea	Acari	-
unklassifiziert	Eukarya	unklassifiziert

Weitere phylogenetische Gruppen, die nur vor der Flutung in den Biofilmen nachgewiesen wurden, waren Apikomplexa (Eimeria) und Milbenartige der Gruppe Acari (Schwiebea) (siehe Tab. 29), die Parasiten bzw. Bewohner in/auf Ratten darstellten. Nach Flutung der Grube ist ein Überleben der Ratten in den gefluteten Schächten unwahrscheinlich und somit auch das Verschwinden der Apikomplexa und Acari begründet. Dagegen sind die parasitischen Protozoen Perkinsidae (zu Alveolata) nur in den Proben nach der Flutung detektiert worden. Rotifera (Rädertierchen), die jedoch nicht näher klassifiziert wurden, sind sowohl vor als auch nach der Flutung in den Biofilmen zu geringen Anteilen nachgewiesen worden (siehe Tabelle 26).

Dabei ist es nicht verwunderlich, dass die gefundenen Protozoen vor allem in den Biofilmen der Flusszellen nachgewiesen wurden und nur selten planktonisch im Grubenwasser. In Habitaten mit niedrigem pH-Wert grasen Protozoen bevorzugt Bakterienbiofilme mit den Arten *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* ab (Johnson, 1993), wohingegen Fungi auch im Grubenwasser als Zersetzer fungieren können. Da die Biofilme nach der Flutung jedoch künstlich erzeugt wurden, und im Alltag des Bergwerks nicht existieren, fehlt den Protozoa die Bakterienansammlung in Form von Biofilmen, um sich anzusiedeln. Vor der Flutung waren Biofilme als Stalaktite und in der Drainagerinne im Übermaß in den Schächten gewachsen. Das könnte den

Rückgang der Protozoen als Euglenozoa, Cercozoa, Ciliophora, Heterolobosea und Amoebozoa durch fehlende Biofilme begründen.

Insgesamt konnten 5 phylogenetische Gruppen (unklassifizierte Eukarya ausgenommen) sowohl vor als auch nach der Flutung gefunden werden. Jedoch unterschied sich die Zusammensetzung der Gruppen deutlich voneinander. Lediglich zwei Klassen: Sordariomycetidae (zu Fungi) und Naegleria (zu Heterolobosea) waren in den Biofilmen vor und nach Flutung des Bergwerks Königstein identisch, als Teil der Eukarya Gemeinschaft, identifiziert worden.

## **4.5. BIOFILME**

Für die weitaus überwiegende Anzahl der Mikroorganismen auf der Erde ist der Biofilm die bevorzugte Lebensform (Costerton, 1987). Durch extrazelluläre polymere Substanzen (kurz EPS) werden die Mikroorganismen im Biofilm zusammengehalten. Die EPS bestehen aus Biopolymeren, die in der Lage sind, Hydrogele zu bilden. Dabei handelt es sich um ein weites Spektrum von Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Geesey, 1982). Diese Matrix bietet eine gewisse mechanische Stabilität sowie Schutz vor äußeren Einflüssen wie z.B. Austrocknung, hohe Konzentrationen an Schwermetallen, Strahlung oder anderen toxischen Einflüssen.

### ***4.5.1. Darstellung der Biofilme mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie***

Im Rahmen der Arbeiten sollten die Biofilme, die sich ausgehend von den Grubenwasser Mikroorganismen in Königstein, mit Hilfe des Flusszellen-Systems und des Reaktor-Systems, gebildet haben, visualisiert werden. Dazu wurde die mikroskopische Technik der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (kurz CLSM) in Kooperation mit Dr. Thomas Neu (UFZ Magdeburg) genutzt.

Für eine selektive Visualisierung von EPS-Komponenten in der Matrix von Biofilmen ist es notwendig, Farbstoffe bzw. Sonden mit einer hinreichenden Spezifität für die Bindung an die entsprechende Zielkomponente einzusetzen. Die eingesetzten Farbstoffe sollten sowohl die Nukleinsäuren in den Zellen anfärben als auch die Polysaccharide-Bestandteile in der EPS. Zur Bindung der Polysaccharide wurden Lektine (Proteine) verwendet, die spezifische Kohlenhydratstrukturen erkennen. Die in dieser Arbeit verwendeten nichtfluoreszierenden Lektine wurden mit den fluoreszierenden Farbstoffen Alexa488 oder FITC markiert, um sie im CLSM sichtbar zu machen. Die verwendeten Lektine, mit entsprechendem gelabeltem Fluoreszenz-Farbstoff, sind zusammen mit der daraus resultierenden Fluoreszenz und der Kohlenhydrate-Struktur, die das Lektin in der EPS bindet (Lektin-Spezifität), in Tabelle 27 dargestellt. Zusätzlich wurden die Lektine mit den Nukleinsäurefarbstoffen Syto9, Syto64 oder SybrGreen kombiniert. Sowohl die Flusszellen-Biofilme auf den Glas-Objektträgern, als auch die Reaktor-Biofilme wurden mit den in Tabelle 27 aufgeführten Farbstoffen analysiert.

Dabei waren die Biofilme aus dem Reaktor nicht für die Darstellung mittels CLSM geeignet, da die Biomasse zu groß und die Eisenausfällungen zwischen den Zellen zu stark waren. Die Farbstoffe wurden dadurch in ihrer Bindung an die Zielstrukturen gehemmt. Somit waren bei dieser Art von Biofilmen keine Fluoreszenzsignale der Zellen und der EPS detektiert worden.

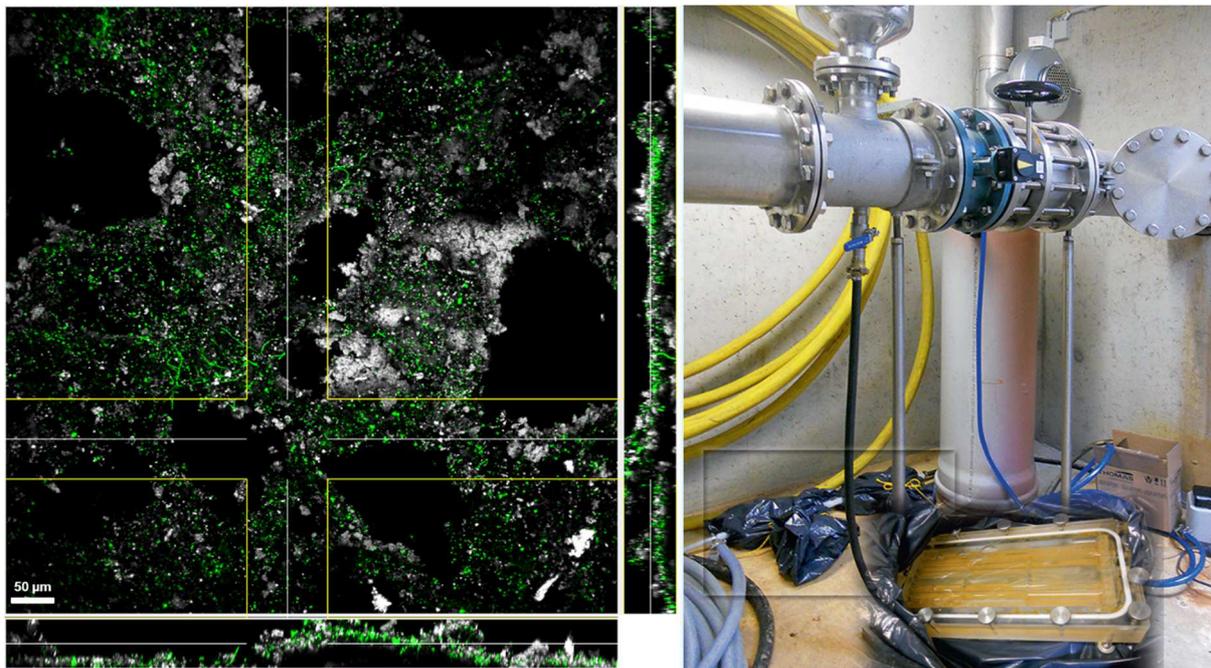
**Tabelle 27: Kombination der verwendeten Nukleinsäurefarbstoffe und Lektine zur Anfärbung der EPS in den Biofilmen der Flusszelle (F13) und deren Wirksamkeit (nach Quelle (Zippel & Neu, 2011)).**

Nukleinsäurefarbstoff	Lektine (Quelle)	Lektin-Label	Fluoreszenz	Lektin-Spezifität	Färbung
Syto 9	-	-	grün		+
-	AAL ( <i>Aleuria aurantia</i> )	Alexa 488	grün	Fuc	(+)
Syto 64	AAL ( <i>Aleuria aurantia</i> )	Alexa 488	rot/grün	Fuc	-
-	PSA ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	FITC	grün	Gal	(+)
Syto 64	PSA ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	FITC	rot/grün	Gal	-
-	WGA ( <i>Triticum vulgare</i> )	FITC	grün	(glcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc	+
Syto 64	WGA ( <i>Triticum vulgare</i> )	FITC	rot/grün	(glcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc	+
SybrGreen	WGA ( <i>Triticum vulgare</i> )	TRITC	grün/orange	(glcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc	+
-	UEA ( <i>Ulex europaeus</i> )	FITC	grün	α-L-fuc, (glcNAc) <sub>2</sub>	-
-	GS-1 ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	FITC	grün	α-gal, α-galNAc	-
Syto 64	Con-A ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	FITC	rot/grün	Man, Glc	-
Syto 64	HMA ( <i>Homarus americanus</i> )	FITC	rot/grün	Sialinsäuren	-
Syto 64	HAA ( <i>Helix aspersa</i> )	FITC	rot/grün	galNAc	-
-	SyPro	-	orange	Proteine	+
-	FM1-43	-	rot	aliphatische Amine, Plasmamembran	+

Die Biofilme aus der Flusszelle, die auf den Glasobjektträgern gewachsen waren, eigneten sich besser zur Visualisierung und Darstellung der Struktur, da die Dicke der Biofilme im Vergleich zu den Reaktor-Biofilmen, weniger kompakt war. Höchstwahrscheinlich förderte die verwinkelte Oberfläche des Reaktor-Trägers die Anheftung der Mikroorganismen und Bildung eines Biofilms im Vergleich zur Oberfläche des glatten Objektträgers (Teughels, 2006). Das führte dazu, dass sich auf dem Reaktor-Träger ein Biofilm von größerer Biomasse und Dichte in kürzerer Zeit bilden konnte, als es in der Flusszelle auf dem Objektträger der Fall war. Der Basisbiofilm auf den Objektträgern wurde dabei mit einer Dicke von 30 µm gemessen, einzelne Biofilm-„Türme“ erstreckten sich bis zu einer Dicke von 300 µm.

### Syto9

Um die Dichte der Zellen abzuschätzen und die Verteilung der Zellen im Biofilm darzustellen wurden im ersten Schritt Nukleinsäurefärbungen mit Syto9 durchgeführt (Tabelle 27). Wie in Abbildung 37 (großes Bild) ersichtlich, sind bei der Übersichtsaufnahme des Biofilms mit einer 250fachen Vergrößerung die Zellen der Mikroorganismen grün abgebildet, wobei hyphenartige Strukturen und einzelne Zellen zu erkennen sind.

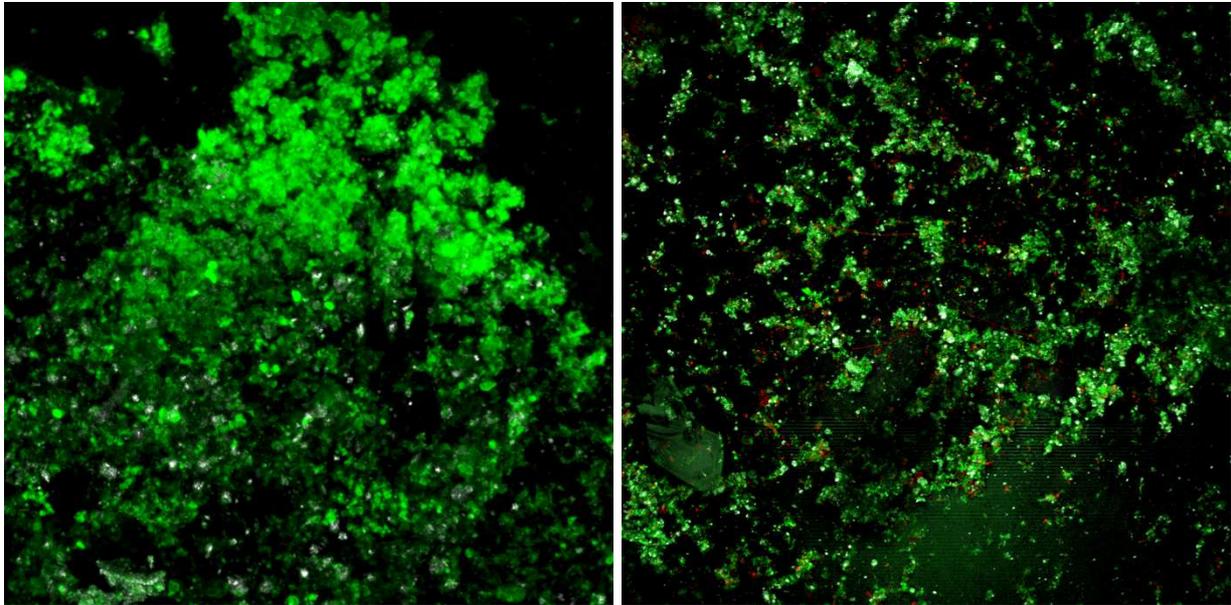


**Abbildung 37: Objektträger Biofilm (links) aus der Grubenwasser gefluteten Flusszelle (rechts).** Das Objekt wurde 250fach vergrößert und die Zellen mit dem grünfluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff Syto9 markiert. Dabei wurde ein sequentielles Übersichtsbild aus der Draufsicht und zwei Seitenansichten des Biofilms aus zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt.

Die grauen Bereiche sind Reflektionen von Zellbestandteilen (Lipiden, Granula), von dichter unsichtiger Biofilmstruktur oder von Eisen -bzw. metallischen Präzipitaten (Weissbrodt *et al.*, 2013). Die schwarzen Bereiche in Abbildung 37 stellen den Untergrund, also den Objektträger und somit die Anheftungsoberfläche für die Mikroorganismen dar. Aufgrund der stark orangen Färbung der Objektträger (siehe Abbildung 37, rechts) liegt die Vermutung nahe, dass Eisen(II)-Ionen an den Objektträgern durch die anhaftenden Mikroorganismen zu Eisen(III)-Ionen oxidiert wurden und sich im Biofilm als Eisen-Präzipitate anhefteten und als orange-braune Schicht erschienen (Hedrich, 2011a, Tuhela, 1993). Die kleineren Abschnitte rechts und unter dem Übersichtsbild in Abbildung 37 (links) stellen Längsschnitte und somit die Seitenansicht des Biofilms in den markierten Bereichen dar. Die Dicke des Biofilms in Abbildung 37 betrug in diesem Abschnitt maximal 53 µm. In der Seitenansicht der Biofilmausschnitte ist die unterschiedliche Dicke am Verlauf der grauen Bereiche und der grün dargestellten Zellen zu erkennen. So zeigt sich der Biofilm in einer ungleichmäßigen wellenförmigen Verteilung auf dem Objektträger. Bei Biofilmen, die eine hohe Biomasse erreichen, spricht man auch von einer sogenannten Pilzstruktur, da die turmartigen dickeren Bereiche des Biofilms der Morphologie eines Ständerpilzes ähneln (Costerton, 1995). Diese bekannte Pilzmorphologie ist hier nicht so ausgeprägt. Das liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die Biomasse durch die angelagerten Eisenpräzipitate in ihrem Wachstum gehemmt wurde.

*Syto64 – AAL (Alexa488 gelabelt)*

Bei der Anwendung des Lektins AAL traten unspezifische Bindungen des Lektins zu den Biofilm-Strukturen auf, so dass alle Biofilmstrukturen grün angefärbt waren (Abbildung 38, links).



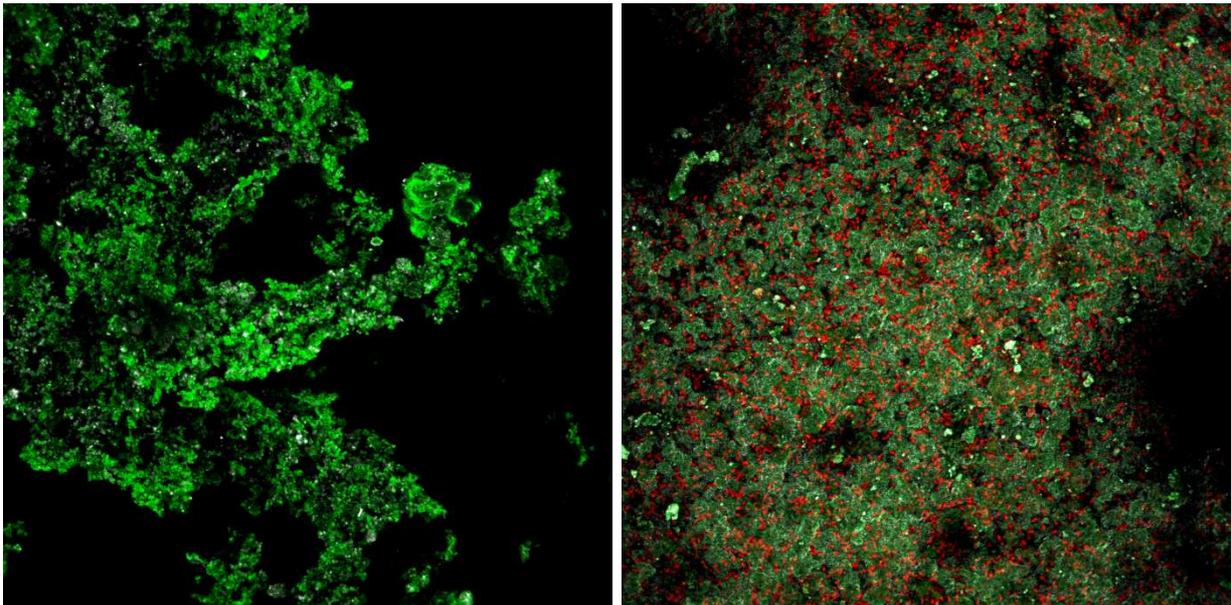
**Abbildung 38: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin AAL-Alexa488 (grün).** Links: Markierung der EPS. Rechts: Markierung der EPS und der Nukleinsäure. Die Abbildungen wurden mit einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die unspezifischen Bindungen des Lektins zeigten sich in einer flächigen dunkelgrünen Farbe. Spezifische Bindungen, die die Kopplung an die Kohlenhydrategruppe Fucose der EPS widerspiegeln, waren leuchtend grün (Abbildung 38 links).

In Kombination mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto64 (Abbildung 38, rechts) konnten nur sehr wenige leuchtend grüne Bereiche detektiert werden, das könnte auf eine sehr geringe Bildung von EPS in den Biofilmen hinweisen oder auf eine unzureichende Bindung des Lektins AAL an die Fucosebestandteile der EPS. Womöglich wirken der saure pH-Wert der Biofilm-Umgebung und die hohe Schwermetallkonzentration auf einige Lektine hemmend. Nicht alle Lektine und Nukleinsäurefarbstoffe sind zur Anfärbung von Biofilmen/Mikroorganismen aus sauren Umgebungen geeignet. Brockmann et al. beschrieb in ihrer Studie, dass dieses Problem durch Waschen der Biofilme mit Leitungswasser oder durch Nutzung von acidostabilen Farbstoffen umgangen werden kann (Brockmann *et al.*, 2010). Auch nach Waschen der Biofilme verbesserte sich die Qualität der EPS Färbung mit AAL in dieser Arbeit nicht. Trotz der guten Nukleinsäurefärbung durch Syto 64 (siehe Abbildung 38, rechts), wurde das Lektin AAL in Kombination mit Syto 64 nicht weiter zur Darstellung der Biofilmstruktur verwendet.

*Syto64-PSA (FITC gelabelt)*

Das Lektin, das Galactose in der EPS der Biofilme binden kann, ist PSA, welches in Kombination mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto64 angewendet wurde. Ähnlich, wie bei dem Lektin AAL traten bei dessen Verwendung unspezifische Bindungen zu allen Biofilmstrukturen und den Eisenpräzipitaten auf, wenn man ausschließlich das Lektin einsetzte (Abbildung 39, links). Bei Kombination von Syto64 und PSA, wurden Zellsignale (durch Syto64) detektiert (Abbildung 39, rechts, rot), jedoch kaum bzw. gar kein Signal, welches aus der Bindung des EPS Bestandteils Galactose (durch PSA) hervorging (Abbildung 39, rechts, grün).



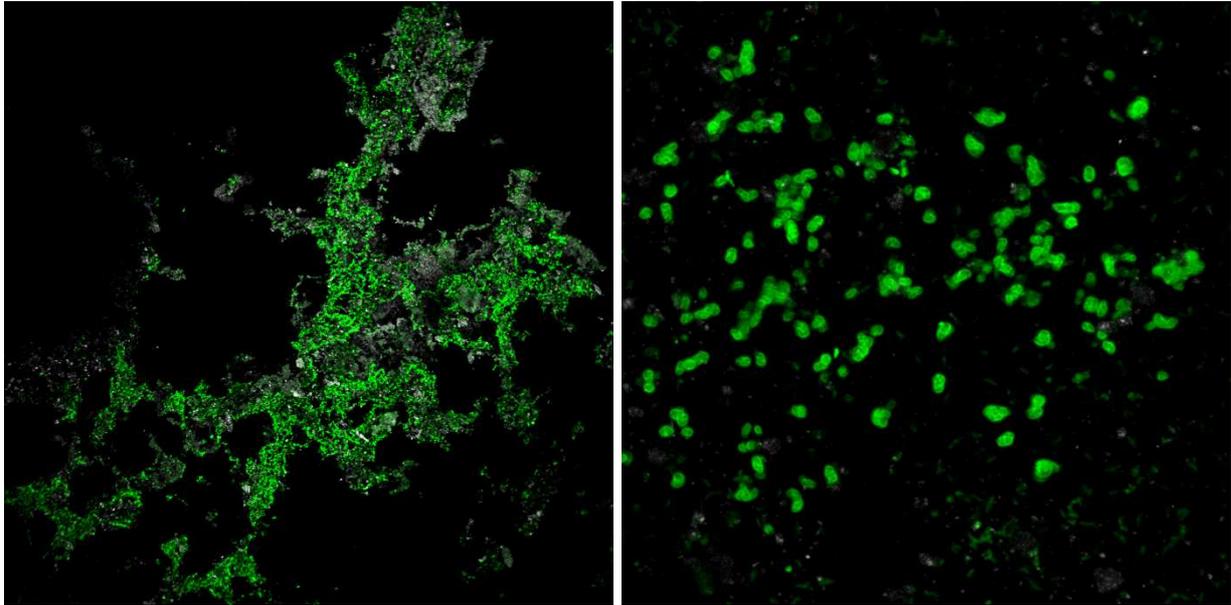
**Abbildung 39: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin PSA-FITC (grün).** Links: Markierung der EPS. Rechts: Markierung der EPS und der Nukleinsäure. Die Abbildungen wurden mit einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

*Syto64 – WGA (FITC)*

Das Lektin WGA, das in mehreren Kombinationen mit verschiedenen Nukleinsäurefarbstoffen und verschiedenen fluoreszierenden Labels (siehe Tabelle 27) eingesetzt wurde, bindet an Glucosederivate der EPS im Biofilm.

Die Glucosederivate, die von WGA hauptsächlich erkannt und gebunden werden, sind N-Acetyl-D-glucosamine (glcNAc) und N-Acetylneuraminsäuren (NeuNAc). Diese Glucosederivate werden von den Mikroorganismen produziert und befinden sich teilweise in der Zellwand. Wenn sie nicht mehr gebraucht werden, werden sie in die umgebende Matrix (EPS) entlassen und bilden so ein Netzwerk

zwischen den einzelnen Zellen (Wingender, 1999b). In der folgenden Abbildung 40 wird die EPS des Objektträger-Biofilms aus der Flusszelle mittels WGA-FITC Färbung grün dargestellt.

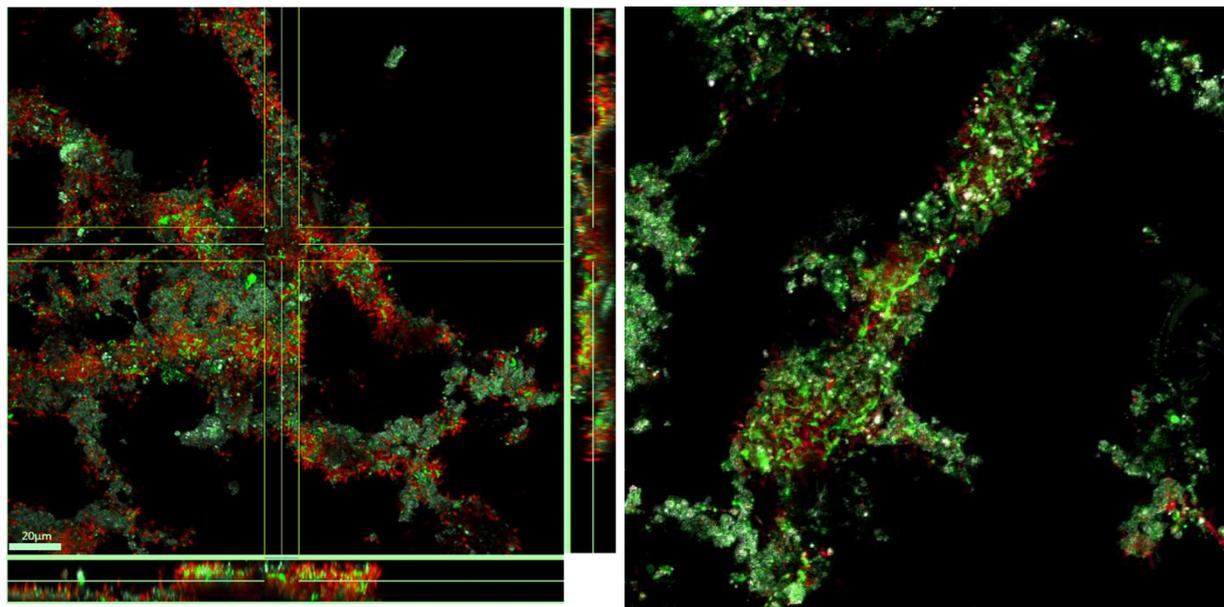


**Abbildung 40: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der EPS durch das Lektin WGA-FITC (grün).**

*Links: Markierung der EPS mit 250facher Vergrößerung. Rechts: Markierung der EPS mit 630fachen Vergrößerung.*

Im Übersichtsbild Abbildung 40 links sind die zusammenhängenden hellgrünen Bereiche der EPS zu erkennen. In der rechten Abbildung 40 wurde ein Bereich eines Übersichtsbildes 630fach vergrößert, wobei darin detaillierter zu erkennen ist, dass die einzelnen angefärbten EPS Bestandteile keine Verbindung zwischen den einzelnen Zellen darstellen. Die WGA-Färbung der EPS findet unmittelbar um die Zelle herum statt, und es scheint so, als bildete die EPS um jede einzelne Zelle eine Art Kapsel.

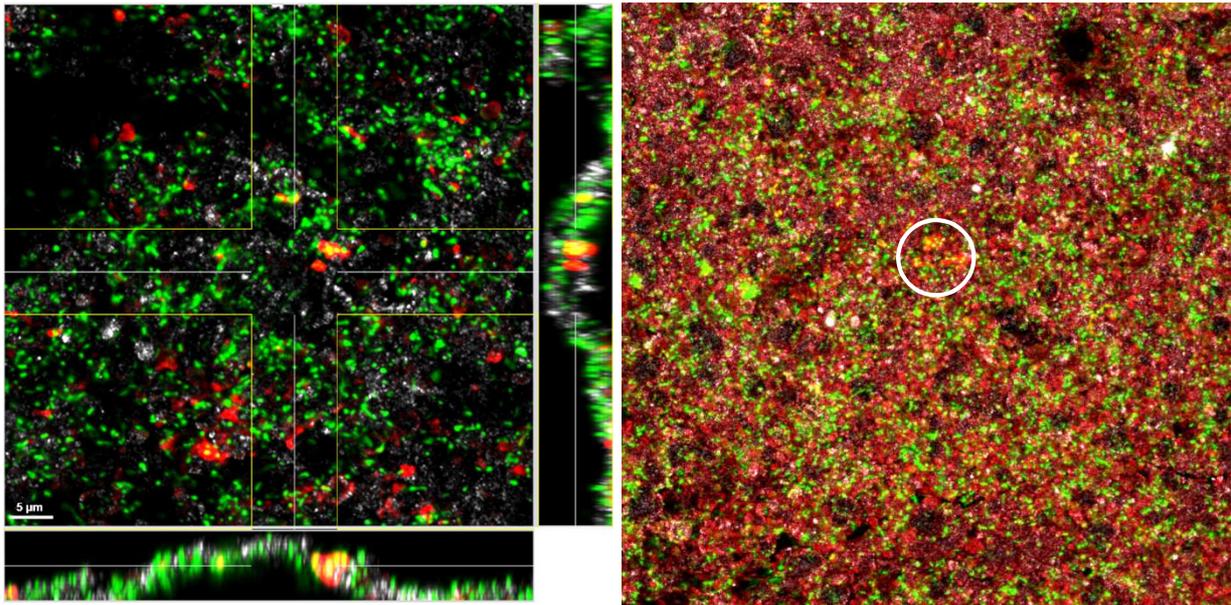
Bei der Kombination des Lektins WGA (FITC) mit dem Nukleinsäurefarbstoff Syto64 sind in Abbildung 41 die wenigen Bereiche der EPS (grün) zwischen den Zellen (rot) zu erkennen. Dabei wird in Abbildung 41 links eine sequentielle Aufnahme des Biofilms mit zwei Seitenansichten dargestellt. Die Biofilmdicke in diesem Ausschnitt betrug 19  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz zu Abbildung 40 zeigen die Biofilmausschnitte in Abbildung 41 rechts deutlich, dass die Zwischenräume zwischen den Zellen durch WGA (FITC) grün angefärbt wurden und somit die EPS darstellen. Hier zeigen sich die Zellen in einem „gemeinsamen“ Schleim, während in Abbildung 40 jede Zelle ihre eigene Schleimkapsel darstellte. Es scheint somit zwei verschiedene Zell-Schleimtypen zu geben, die einen Mix aus eingekapselten Zellen und Zellen mit gemeinsamen Schleim bilden.



**Abbildung 41: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch Syto64 (rot) und der EPS mit dem Lektin WGA-FITC (grün).** Links: sequentielle Aufnahme eines Übersichtsbildes aus der Draufsicht mit den Seitenansichten des Biofilms aus zwei verschiedenen Perspektiven. Rechts: detaillierte Aufnahme des Übersichtsbildes. Die Abbildungen wurden mit einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

#### *SybrGreen – WGA (TRITC)*

Das wird auch in der Abbildung 42 verdeutlicht, wobei hier größtenteils mehrere Zellen (grün) von EPS (rot) umgeben und eingebettet sind. Die Zellen wurden in der Abbildung 42 mit SybrGreen markiert (grün) und die EPS erscheint durch TRITC-gelabeltes WGA rot. Dabei kam es zu unspezifischen Bindungen aufgrund der dichten Biomasse und der Erkennung von dichten Hintergrundstrukturen, die über die gesamte Biofilmstruktur verteilt waren (Abbildung 42, rechts, schwaches dunkelrot). Ausschließlich hellrot leuchtende rote Bereiche sind als spezifische Bindungen an EPS Bestandteile zu definieren (Abbildung 42, rechts eingekreist). Beim Übereinanderliegen von Zellen und EPS erschienen die Bereiche gelb, so dass man davon ausgehen kann, dass die Zellen, die gelb aussahen in einer EPS Schicht eingebettet waren (Abbildung 42). In dem Übersichtsbild mit Seitenansichten des Biofilms (Abbildung 42, links) war die Färbung mit SybrGreen - WGA (TRITC) besser gelungen und sowohl die Zellen (grün), als auch die wenigen roten Bereiche, in denen die EPS angefärbt wurde, sind zu erkennen. Dabei war der Biofilm an dieser Stelle des Objektträgers lediglich 8 µm dick, dadurch konnten kaum Hintergrund-Bestandteile unspezifisch angefärbt werden und das Bild erschien klar.

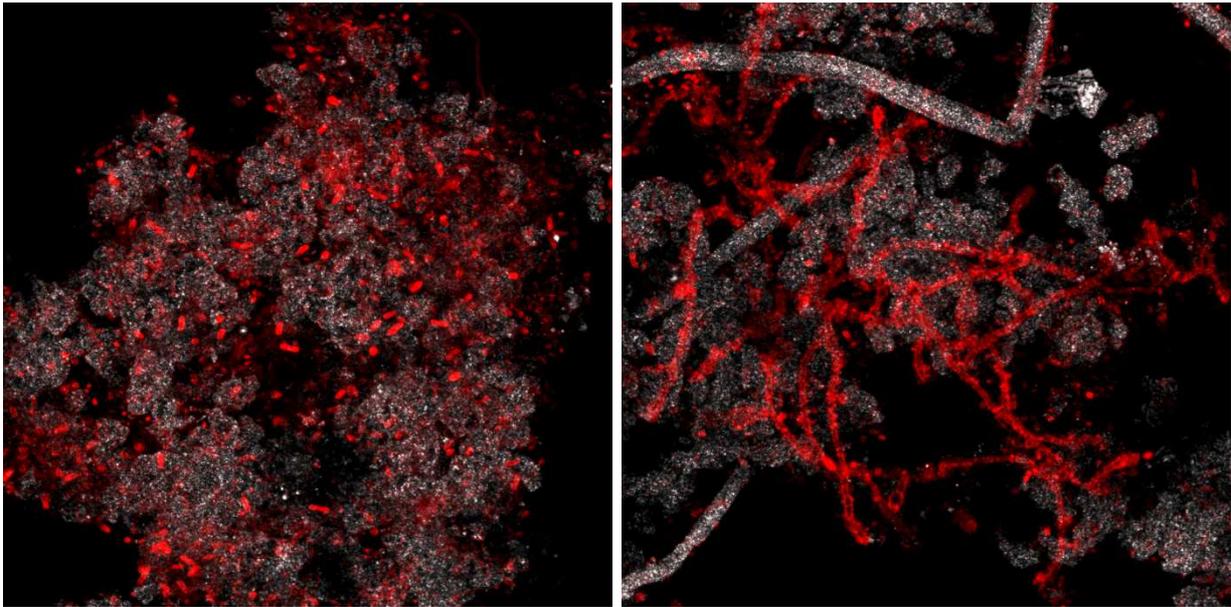


**Abbildung 42: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Nukleinsäure durch SybrGreen (grün) und der EPS mit dem Lektin WGA-TRITC (orange).** Links: sequentielle Aufnahme eines Übersichtsbildes aus der Draufsicht mit den Seitenansichten des Biofilms aus zwei verschiedenen Perspektiven. Rechts: Aufnahme des Übersichtsbildes (630fache Vergrößerung).

Die in Tabelle 27 aufgeführten FITC-gelabelten Lektine UEA, GS-1, Con-A, HMA und HAA zeigten nach Anfärbung der Polysaccharide-Bestandteile keine zufriedenstellenden fluoreszierenden Signale der EPS-Bestandteile. GS-1 wies eine große Anzahl unspezifischer Bindungen auf und färbte zusätzlich Zellen höherer Lebewesen z.B. Einzeller und Pilze an. Für die Visualisierung und Darstellung der Biofilmstruktur sowie der EPS wurden diese Lektine nicht weiter angewendet.

#### *SyPro*

Es wird angenommen, dass Polysaccharide die mengenmäßig bedeutendste Komponente der EPS in jungen Biofilmen ist (Costerton, 1981). Trotzdem haben sowohl Proteine und Nukleinsäuren (Nielsen, 1997, Platt, 1985), als auch amphiphile Bestandteile inklusive Phospholipide (Neu, 1996) signifikante Anteile an der EPS von Biofilmen. Die genannten Komponenten werden durch die Mikroorganismen selbst produziert und in die interzellulären Zwischenräume der mikrobiellen Aggregate transportiert. Für die Visualisierung der Struktur und Lokalisation von Proteinen in der Biofilmmatrix wurde in dieser Arbeit der kommerzielle fluoreszierende Farbstoff SyPro Orange verwendet (siehe Tabelle 27). Hiermit können sowohl zelluläre Proteine sowie distinkte Protein-Strukturen in extrazellulären Bereichen angefärbt werden, aber keine Nukleinsäuren oder Lipopolysaccharide.



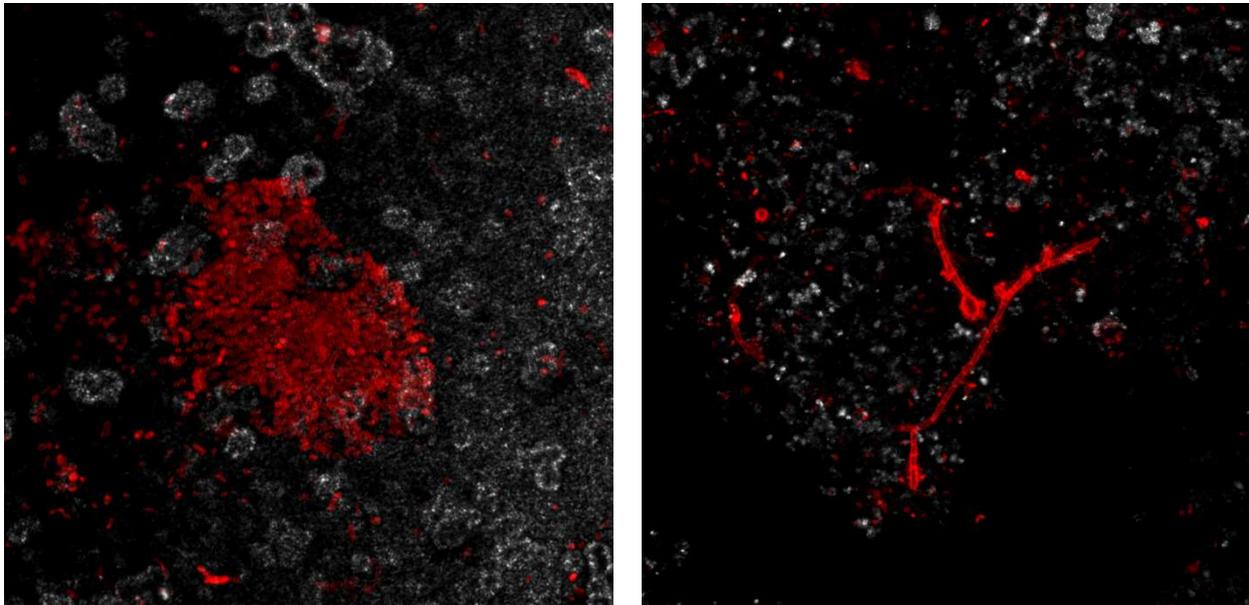
**Abbildung 43: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Proteine in den Zellen und in der EPS mit SyPro Orange.** Links: Übersichtsbild mit angefärbten einzelnen Zellen. Rechts: Übersichtsbild mit angefärbten hyphenartigen Strukturen (630fache Vergrößerung; 2facher Zoom).

Auf den Objektträgern wurden die Proteine sowohl in der EPS dicht um die Zellen herum, als auch als Zellwand- und Membranbestandteile der Mikroorganismen markiert und in Abbildung 43 (links) dargestellt. Vereinzelt sind auch Zellen im Inneren durch SyPro rot gefärbt, das ist vom Proteingehalt des Zellinneren abhängig. Proteine sind in der Zelle größtenteils membrangebunden. Im Inneren erscheinen einige Zellen grau durch die Reflektion von Granula (evtl. gefüllt mit PHB, Schwefel, Calcium, Lipiden). Dabei scheinen die einzelnen Zellen nicht durch Proteinbestandteile miteinander verbunden zu sein. Auch hyphenartige Strukturen wie z.B. Pilze wurden mit Hilfe von SyPro Orange angefärbt und erwiesen sich als proteinreiche Strukturen (siehe Abbildung 43, rechts). Dabei sind vor allem die Zellwände der Pilze markiert, die in den Zellen den proteinreichsten Bereich darstellen (aufgrund von Glykoproteinen).

#### *FM1-43*

Mit dem rotfluoreszierenden hydrophoben Farbstoff FM1-43 gelang eine Markierung von hydrophoben Bereichen z.B. Plasmamembranen in den Biofilmen. Mit dem Farbstoff wurden fast ausschließlich Zellstrukturen angefärbt, wobei die Bindung des Farbstoffes größtenteils an der Zellmembran oder an der Zelloberfläche erfolgte (siehe Abbildung 44). Bei einigen Zellen in Abbildung 44 links konnten zusätzlich kleine intrazelluläre Bereiche hellfluoreszierend angefärbt werden, wobei es sich möglicherweise um eingelagerte Speicherstoffe wie z.B. Polyhydroxyalkanoate (PHAs) handelt (Campisano, 2008). Sowohl einzelne Zellen (Archaea, Bacteria) als auch hyphenartige Strukturen (Pilze)

wurden mit Hilfe des FM1-43 markiert und dargestellt (Abbildung 44). Die Färbung von extrazellulären globulären Lipiden (Membranvesikel), welche von den Zellen während des normalen Wachstums abgegeben werden, wurde nicht/kaum nachgewiesen.



**Abbildung 44: Objektträger Biofilm mit Fluoreszenz der Zellmembranen durch FM1-43.**

*Links: Übersichtsbild mit angefärbten einzelnen Zellen. Rechts: Übersichtsbild mit angefärbten hyphenartigen Strukturen (630fache Vergrößerung; 3 bzw. 2facher Zoom).*

Zusammenfassend wurden verschiedene Farbstoffe genutzt, um Polysaccharide in den sauren Biofilmen sichtbar zu machen. Dabei eignete sich insbesondere das Lektin WGA. Die getesteten Nukleinsäurefarbstoffe Syto9, Syto64 und SybrGreen zeigten alle gute Fluoreszenzsignale, um die Zellen zu visualisieren. Die beste Färbung wurde jedoch mit SybrGreen erreicht. Eine Behandlung der Biofilmproben mit SyPro Orange zeigte, dass Proteine in der EPS-Matrix der untersuchten Biofilme vorhanden sind, aber keine strukturbildende Funktion in der EPS-Matrix haben. Die gefärbten Pilzstrukturen haben im Biofilm eine stützende Funktion, um das Biofilmgerüst aufrecht zu erhalten. Pilze, die zusammen mit Bakterien in den Objektträger-Biofilmen der Flusszellen identifiziert wurden, leben möglicherweise in Symbiose und verwenden die EPS als Mittel, um in räumlicher Nähe bleiben zu können (aufgrund des Nährstoffaustauschs). Dagegen nutzen fadenförmige Bakterien die EPS als Stützgerüst (Flemming & Wingender, 2010). Die EPS-Matrix ist ein komplexes Strukturelement mit verschiedenen Komponenten, jedoch ist die Bildung von EPS in den Königstein-Biofilmen aufgrund des Substratmangels eingeschränkt. Denn EPS werden nur dann gebildet, wenn ein Überfluss an Nährstoffen (vor allem Organika) in der Umgebung vorhanden ist (Sutherland, 2001). Bei einem ungünstigen Verhältnis von C:N:P (im Königstein Grubenwasser 6:17:1) oder einem notwendigen Schutz vor Schwermetallen werden Scheiden/Kapseln aus EPS gebildet, die um die Zelle als

Schleimkapsel angelagert sind. Die identifizierten Kapseln, um die Mikroorganismen weisen auf ungünstige Nahrungsverhältnisse und toxische Einflüsse aus der Umgebung hin. Dabei werden EPS-Kapseln als Schutzschild verwendet, indem die toxischen Substanzen an die EPS adsorptiv oder adsorptiv gebunden werden und damit nicht in das Zellinnere vordringen (Flemming & Wingender, 2010). Bakterienarten, die unter Substratmangel aufwachsen, und die zur Deckung ihres Substratbedarfs hochmolekulare Stoffe mit Hilfe von Exoenzymen spalten müssen, lagern die Exoenzyme in die EPS ein, um sie nahe an der Zellmembran zu halten. Die EPS wird in diesem Fall als Diffusionsbarriere genutzt (Flemming & Wingender, 2010).

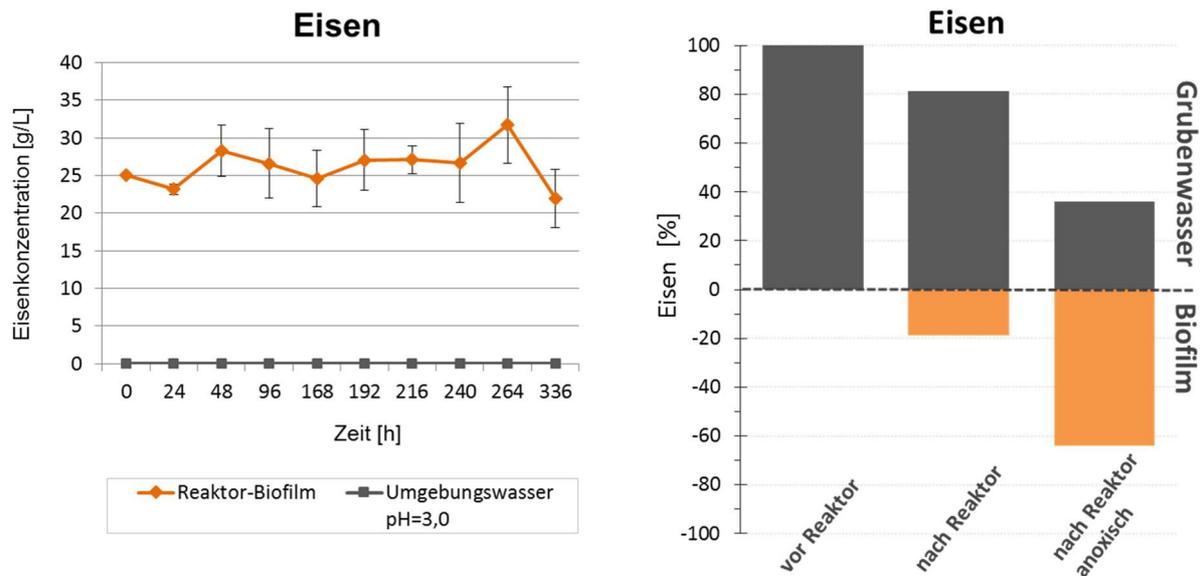
#### **4.5.2. Einfluss der Biofilme auf chemische Grubenwasser-Parameter im Hinblick auf Immobilisierung/Akkumulation**

Biofilme sind abhängig von der Umgebung und den darin enthaltenen Nährstoffen und Substraten. Das Nährstoffangebot bestimmt, welche Mikroorganismen in einem Habitat leben, beeinflusst die Artenvielfalt und die Produktion der EPS zur Biofilmbildung. Biofilme interagieren mit der Umwelt und beeinflussen diese im Gegenzug. Inwieweit die Biofilme im Grubenwasser Königstein Einfluss auf einige Metalle, Schwermetalle und Radionuklide haben, sollte durch Mikrokosmen-Analysen untersucht werden. Dabei wurden die Biofilme aus dem Reaktor für Feld- und Laborversuche genutzt. Versuchsaufbau als auch Versuchsablauf sind in Kapitel 3.15. beschrieben. Für die Konzentrations-Analysen der untersuchten chemischen Elemente wurde die Methode ICP-MS (Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie) verwendet (siehe Kapitel 3.5.).

##### *Eisen*

Aufgrund des hohen Eisengehaltes (ca. 52-85 mg/L) im Grubenwasser Königstein und dem damit verbundenen hohen Reinigungsaufwand sowie den damit resultierenden Kosten wurde untersucht, ob die gelösten Eisen(II)-Ionen durch die Biofilme beeinflusst werden und sich im Biofilm akkumulieren. Ob Biofilme damit zur biologischen Reinigung von sauren Eisen-kontaminierten Gewässern nützlich sind, sollte mit diesen Analysen näher betrachtet werden. Dabei wurden Feldversuche im Reaktor *in-situ* in Königstein (Abbildung 45, rechts.) und Laborversuche (Abbildung 45, links) bezüglich der Eisen-Ionen durchgeführt.

Die Laborversuche erstreckten sich über 336 Stunden, in denen alle 24 h eine Probe entnommen und der Eisengehalt in den Biofilmen und im Umgebungswasser mittels ICP-MS gemessen wurde. In Abbildung 45 links ist die Verteilung der Eisenkonzentration im Biofilm und im Umgebungswasser im angegebenen Zeitraum dargestellt. Nach Entnahme der Biofilme aus dem Reaktor und Analyse im Labor hatte eine Akkumulation des Eisens im/am Biofilm schon vor Beginn der Experimente im Reaktor begonnen (Startkonzentration ca. 25,0 g/L).



**Abbildung 45: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Eisen an/in Reaktor-Biofilmen.**

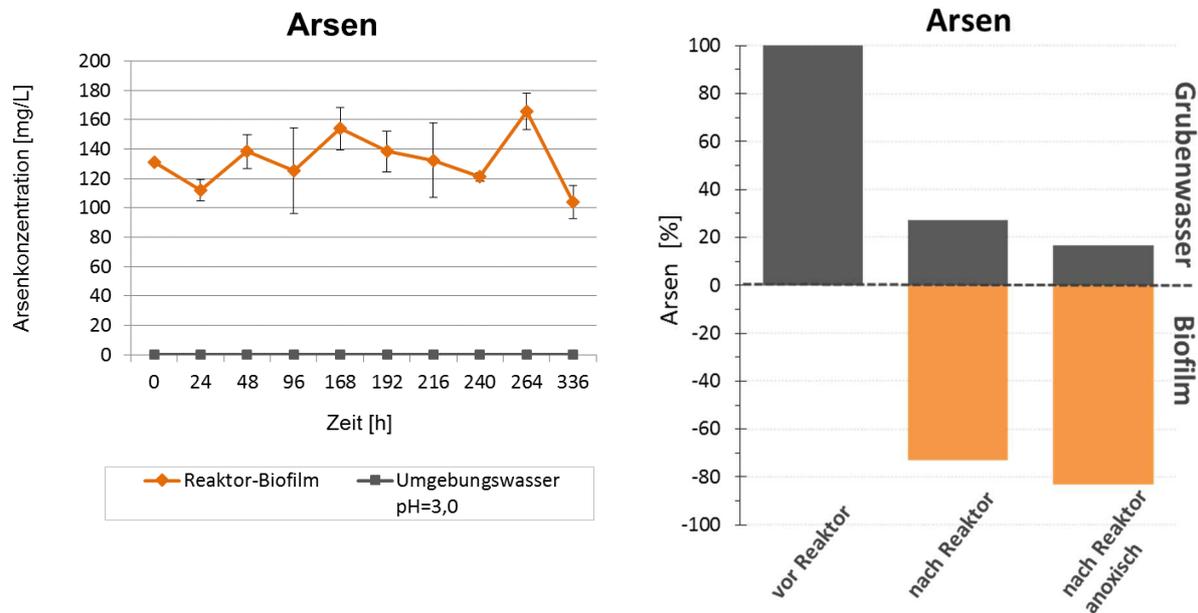
Die akkumulierten Eisen-Ionen blieben ab Zeitpunkt 0 relativ konstant (Abbildung 45, links). Im Laborversuch erhöhte sich die Eisenkonzentration im Biofilm im Durchschnitt nicht mehr. Die Eisenkonzentration schwankte lediglich im Laufe der 336 h zwischen 20 und 38 g/L im Biofilm. Die Schwankungen können auf die einzelnen Reaktor-Biofilme zurückgeführt werden, die natürlicherweise nicht identisch waren. Auch eine Messungenauigkeit der ICP-MS Methode könnte die Ursache für geringe Schwankungen sein. Im Umgebungswasser konnte dagegen ein geringerer Eisengehalt verzeichnet werden. Die Konzentration im Umgebungswasser lag dabei zwischen 24-38 mg/L und somit 1000fach geringer als im Biofilm. Im Labor wurde keine Durchmischung der Biofilme mit dem Umgebungswasser vorgenommen. Es könnte sich somit eine anoxische Zone ausgebildet haben. Doch zur Eisenoxidation wird Sauerstoff durch die Eisen-oxidierenden Mikroorganismen benötigt. Das führte womöglich dazu, dass kein weiteres Eisen aus dem Umgebungswasser durch die Mikroorganismen oxidiert und akkumuliert wurde. Im Reaktor dagegen wurde ein Durchmischen durch das ständige Einleiten des Grubenwassers von unter Tage gewährleistet. Vergleicht man die Konzentration an gelösten Eisen-Ionen im Grubenwasser bevor es durch den Biofilm-Reaktor floss mit der Konzentration im Ausfluss des Biofilm-Reaktors, so verringert sich die Eisen-Konzentration (siehe Abbildung 45, rechts) im Grubenwasser. Dabei wurden im Biofilm im Durchschnitt 20 % der Eisenionen aus dem Grubenwasser akkumuliert, bei einer längeren Verweilzeit des Grubenwassers im Reaktor sogar über 60 %. Das abfließende Grubenwasser enthielt nach dem längeren Aufenthalt (ohne Durchmischung) im Reaktor und womöglich der Ausbildung einer anoxischen Zone nur noch 37 % Eisen-Ionen. Die Zurückhaltung von Eisen in den Biofilmen des Reaktors durch

Akkumulation/Immobilisierung verursachte diese Verringerung von Eisen im umgebenden Wasser. Eisen-oxidierende Mikroorganismen bilden in Zusammenhang mit einem hohen Sulfatgehalt und einem niedrigen pH-Wert Präzipitate, sogenannte Eisen-hydroxosulfate: Schwertmannit (Bigam, 1990, Kawano, 2001, Schwertmann, 1995) und Jarosit. Diese Minerale bilden in „sauren Grubenwässern“ braun/rot-gelbe Einkrustungen, wie sie auf den Oberflächen der Reaktor-Träger zusammen mit den Biofilmen zu beobachten waren. Diese Eisen(III)-hydroxosulfate Präzipitate bieten wiederum Eisen- und Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen ein Habitat in den „verkrusteten“ Biofilmen (Bridge, 2000). Eisen-reduzierende Mikroorganismen wie z.B. *Acidiphilium spp.* tragen zur Reduktion des Mineral-Biofilm-Präzipitats bei. Um das Mineral zu identifizieren wurden XRD (X-Ray Diffraction)-Messungen durchgeführt. Diese Untersuchungen lieferten jedoch keine detaillierte Auskunft über das entstandene Mineral, da es als amorph identifiziert wurde. Auch Hedrich et al. beschreibt, dass die Bakterienart *Ferrovum myxofaciens*, die vor der Flutung dominierende Spezies im Grubenwasser Königstein war, befähigt ist Schwertmannit Minerale zu bilden (Hedrich et al., 2011). Dazu wurden die *F. myxofaciens* aus ihrem Habitat isoliert und kultiviert und bildeten in einer Pilot Anlage mineralische Verbindungen aus Schwertmannit ( $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$ ) und Jarosit ( $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ). Diese Pilot Anlage wurde in der Lausitz eingesetzt und fungierte als „Biologisches Eisenoxidations-System“. Darin wurden stielartige Träger in ein Oxidationsbecken gehangen und das kontaminierte Wasser durchgeleitet. Die dominierenden Mikroorganismen *Ferrovum myxofaciens* und *Gallionella ferruginea* beschleunigten die Bildung der genannten Eisen-Sulfat Minerale (Schwertmannit) an den Trägern (Heinzel, 2009), so dass im Abfluss weniger Eisen(II)-Ionen zu finden waren. Der Biofilm-Reaktor in Königstein ist vergleichbar mit der genannten Pilot Anlage in der Lausitz. Dennoch unterscheidet sich die mikrobielle Zusammensetzung beider Anlagen deutlich voneinander (Königstein: *Acidithiobacillus spp.* und *Leptospirillum spp.*; Lausitz: *Ferrovum myxofaciens* und *Gallionella ferruginea*). Trotzdem bilden Eisen-oxidierende Bakterien den dominanten Anteil an der Biozönose und eignen sich zur Eisen-Sulfat-Mineral-Bildung an den eingesetzten Trägern zur Reinigung der Eisen- und Sulfat-belasteten Grubenwässer. In Anbetracht dessen wäre es denkbar, dass eine Pilot-Anlage in größerem Maßstab auch in Königstein getestet werden könnte, um den Aufwand der Wasseraufbereitung mit den verbundenen hohen Kosten der Chemikalien zu verringern.

### Arsen

Arsen kommt natürlich in der Erdkruste vor und gelangt durch Auswaschungen aus arsenhaltigen Erzen in Form von drei- (Arsenit  $[\text{AsO}_3]^{3-}$ ) und fünfwertigen (Arsenat  $[\text{AsO}_4]^{3-}$ ) Anionen in unterirdische Wässer (Wang, 2006, Williams, 2001). Eine tägliche Arsenaufnahme durch Nahrungsmittel zwischen 5 und 50  $\mu\text{g}$  ist unbedenklich und wird vom Körper aufgenommen (Zhang, 1996). Höhere Dosen Arsen sind für Menschen toxisch. Im Grubenwasser Königstein ist Arsen in geringen Mengen zwischen 46 und

99 µg/L enthalten (siehe Tabelle 11, Kapitel 4.1.). In den durchgeführten Labor- und *in-situ* Feldversuchen ist, nach Bestimmung der Arsenkonzentration in den Biofilmen im Vergleich zum Grubenwasser, aufgefallen, dass sich Arsen in/an den Biofilmen in sehr hohen Konzentration akkumuliert (Abbildung 46).



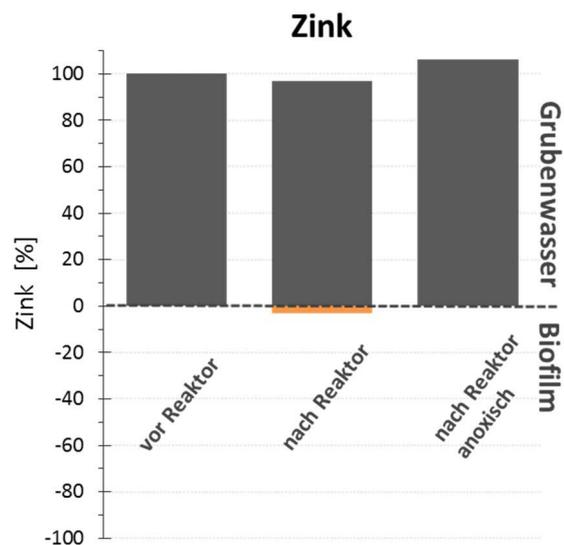
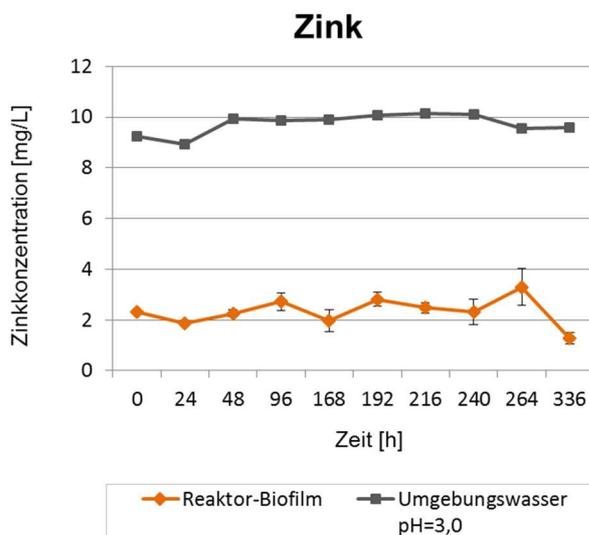
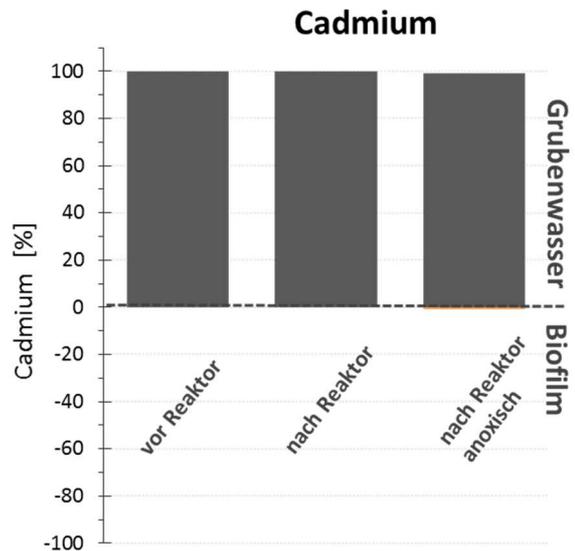
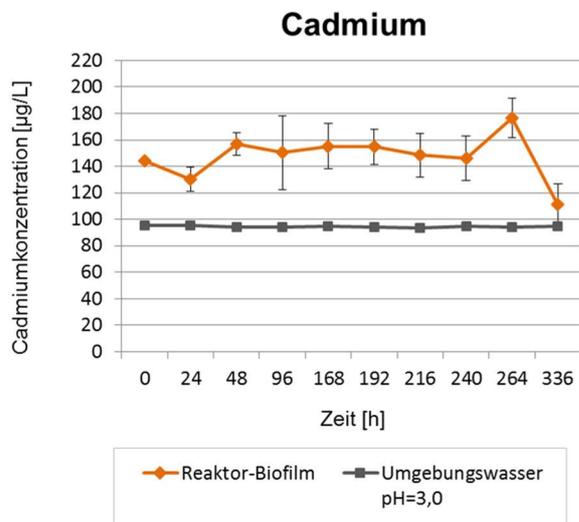
**Abbildung 46: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Arsen an/in den Reaktor-Biofilmen.**

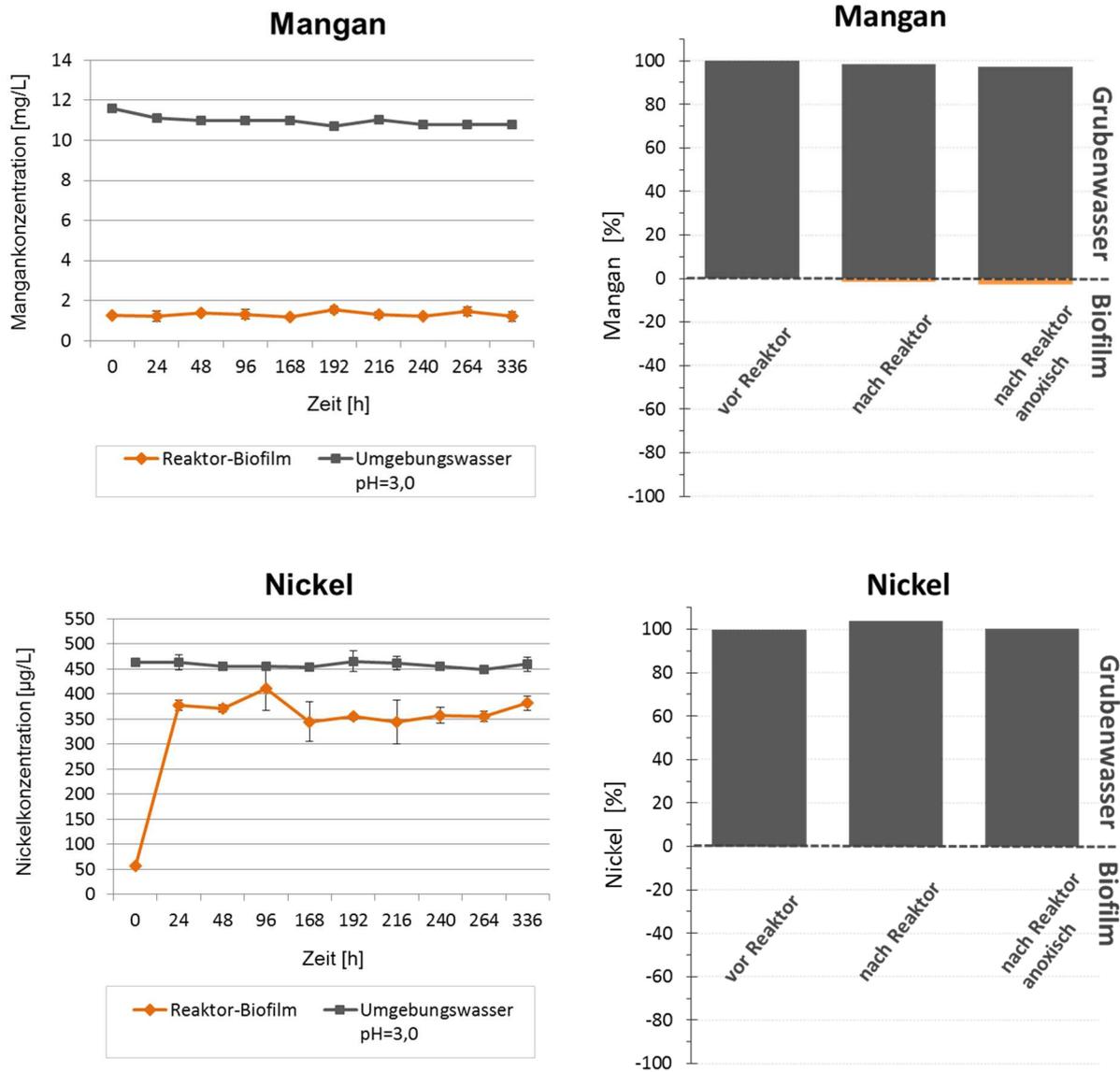
Dabei ist die Konzentration des Arsens im Biofilm (90-180 mg/L) um das 1000 bis 4000 fache höher als im Grubenwasser (siehe Abbildung 46, links). Das entspricht einer Arsenkonzentration von ca. 2,6 mg/g Biomasse. Im Grubenwasser dagegen konnten, nach dem Durchfließen des Grubenwassers durch den Biofilm-Reaktor, nur noch geringe Mengen Arsen (< 10 µg/L) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 46, rechts). Damit hat das Grubenwasser Trinkwasserqualität im Hinblick auf Arsen, da die EU und WHO einen Grenzwert für Arsen im Trinkwasser von maximal 10 µg/L vorschreibt (Richtlinie). Die Biofilme tragen demnach zur Entfernung des Arsens im sauren Grubenwasser Königstein bei. Höchstwahrscheinlich wird das Arsen nicht im Biofilm oder an den Mikroorganismen gebunden, sondern am Eisen-hydroxosulfat Präzipitat, das sich an den Reaktor-Trägern durch die Mikroorganismen im Biofilm gebildet hat. Es ist bekannt, dass Arsen (III und V) an die Eisen-hydroxosulfat-Verbindung Schwertmannit adsorbiert, ohne die Mineralstruktur aufzubrechen (Burton, 2009, Waychunas, 1995). Schwertmannit/Jarosit und die indirekt beteiligten Bakterien beeinflussen somit die Mobilität von Metallen und Radionukliden (z.B. Radium), indem sie Kupfer, Zink, Nickel, Arsen, Selen adsorbieren bzw. in Kristallform überführen (Sidenko, 2004, Waychunas, 1995). Diese Fähigkeit der gebildeten Eisen-hydroxosulfate zur Anionen-Adsorption an den Reaktor-Biofilmen in Königstein könnte bei der Reinigung des kontaminierten Grubenwassers behilflich sein. So ist es mit

Hilfe von Pilot Anlagen gelungen neben Arsen (in Form von Anionen) weitere Bestandteile wie Chromat oder Phosphat, Vanadat an Schwertmannit/Jarosit zu binden und aus kontaminierten Grubenwässern zu entfernen (Dutrizac, 1987, Janneck, 2010).

*Cadmium, Nickel, Mangan, Zink*

Die Metalle Cadmium, Zink, Mangan und Nickel sind im Grubenwasser Königstein in geringen Konzentrationen vorhanden. Während Nickel (242-454 µg/L) und Cadmium (19-73 µg/L) nur in Spuren vorkommen, liegen die Konzentrationen für Mangan (2,5-7,2 mg/L) und Zink (3,5-5,9 mg/L) im Grubenwasser höher (siehe Tabelle 11, Kapitel 4.1.). Da die Konzentrationen der genannten Elemente im Jahr 2013 im Grubenwasser gestiegen sind und in der Wasseraufbereitung damit größere Beachtung verlangen, wurden sie in dieser Arbeit näher betrachtet.





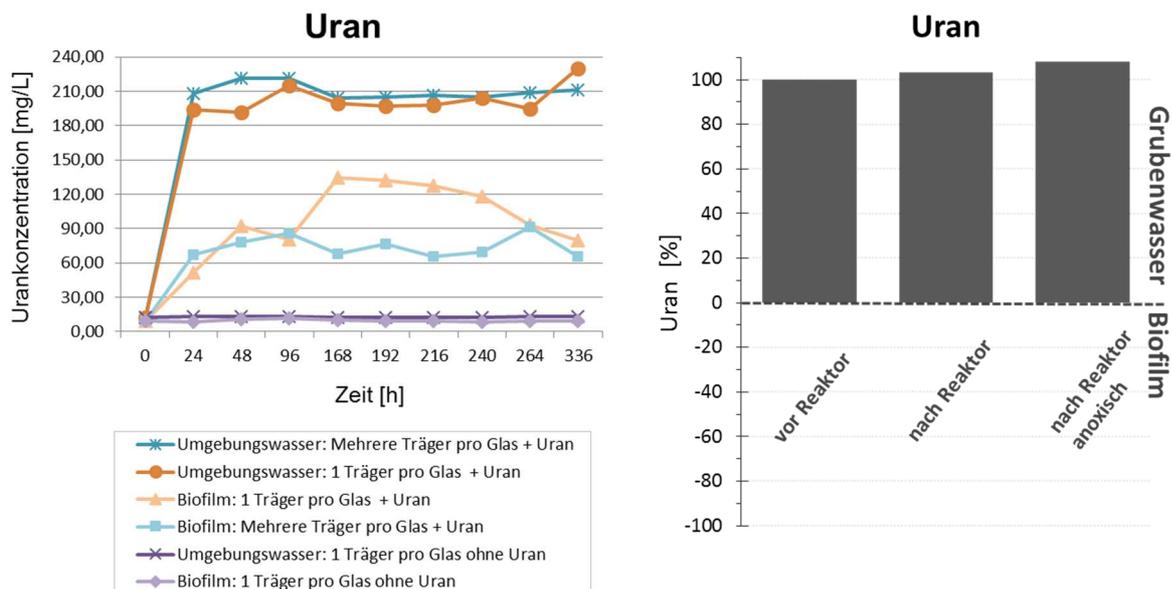
**Abbildung 47: Laborversuche (links) und Feldversuche (rechts) zur Akkumulation von Cadmium, Zink, Mangan und Nickel an/in den Reaktor-Biofilmen.**

Der Anstieg der Konzentrationen wurde durch neu geflutete Bereiche verursacht und wird durch Auswaschungen aus dem umliegenden Erz begründet. In den Labor- und Feldversuchen konnte eine Akkumulation mit den vier Metallen am/im Biofilm wie bei Arsen und Eisen nicht beobachtet werden. Da im Biofilm-Eisenhydroxosulfat-Präzipitat nur Anionen adsorbieren und die Metalle Cadmium, Nickel, Mangan und Zink als Kationen im Grubenwasser vorlagen. In den Feldversuchen (Abbildung 47, rechts) ist zu erkennen, dass sich die Konzentrationen von Cadmium, Zink, Nickel und Mangan im Grubenwasser nicht oder nur unwesentlich verändern. Im Biofilm wurden keine nennenswerten Konzentrationen zurückgehalten. Im Laborversuch konnte lediglich für Cadmium eine Akkumulation im Biofilm bzw. im Biofilm-Mineral Präzipitat festgestellt werden (Abbildung 47, links), die über denen der Konzentrationen im Umgebungswasser lagen. Die Konzentration für Mangan, Nickel und Zink war

im Umgebungswasser höher als im Biofilm (Abbildung 47, links). Das bedeutet, das Cadmium zwar in den Biofilmen gebunden ist, jedoch durch das Cadmium-belastete zulaufende Grubenwasser im Reaktor nicht so stark akkumuliert wird, dass es aus dem Grubenwasser zurückgehalten wird. Der Biofilm-Reaktor eignet sich somit zur Rückhaltung von Mangan, Zink, Cadmium und Nickel ohne Eingriff in die chemische Zusammensetzung des Grubenwassers durch Chemikalien nicht.

### Uran

Uran spielt als Schwermetall eine große Rolle im Grubenwasser Königstein, da es zusätzlich ein radioaktives Element ist und mit 5,1 bis 10,7 mg/L Uran-Konzentration im Grubenwasser die geforderten Grenzwerte für Oberflächenwasser (< 100 µg/L) weit übersteigt. Bis 1990 wurde im ehemaligen Uranbergwerk durch die Wismut GmbH Uran aus dem Erz gewonnen. Heutzutage werden die urankontaminierten Grubenwässer aus Königstein einer aufwendigen und kostenintensiven Wasseraufbereitung unterzogen. Durch die Kontamination mit Uran benötigt das Wasser zur Abtrennung von Uran einen gesonderten Reinigungsschritt durch Einsatz eines Anionenaustauschers. Um die Biologie im Grubenwasser in der Wasseraufbereitung zukünftig zu nutzen, lag der Fokus in dieser Arbeit insbesondere auf dem Verhalten des Urans in Zusammenhang mit den Biofilmen.



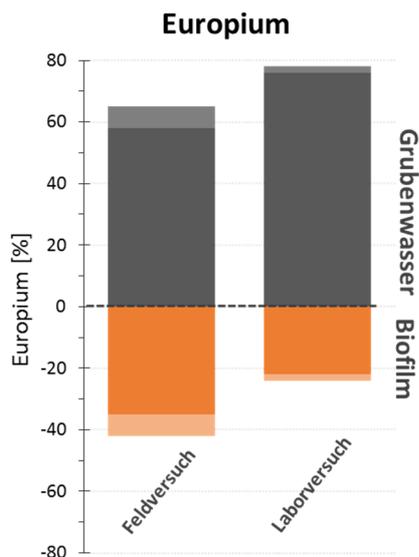
**Abbildung 48: Laborversuch (links) und Feldversuch (rechts) zur Akkumulation von Uran an/in den Reaktor-Biofilmen.**

Die Feld- und Laborversuche, deren Resultate in Abbildung 48 dargestellt sind, sollten zur Aufklärung der Fragestellung dienen. In den Feldversuchen (Abbildung 48, rechts) konnte anhand der Urankonzentration vor und nach dem Biofilm-Reaktor keine Verringerung des Urangehaltes im Grubenwasser festgestellt werden. Die Urankonzentration nach Durchfließen des Biofilm-Reaktors ist,

abgesehen von geringen Schwankungen, in etwa gleich geblieben, so dass man davon ausgehen kann, dass sich kein Uran im Biofilm akkumuliert hat oder gebunden wurde. In den Laborversuchen (Abbildung 48, links) konnte ebenfalls keine Uran-Akkumulation in den Biofilmen bzw. im Biofilm-Mineral Präzipitat nachgewiesen werden. In den Versuchsreihen, in denen kein zusätzliches Uran zum Grubenwasser gegeben wurde, lag die Konzentration des Urans in den Biofilmen zwischen 8-11 mg/L, im Umgebungswasser bei 12-13 mg/L (Abbildung 48, violett). In den zwei Versuchsreihen, in denen zusätzlich 1 mM Uran (als  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ) hinzugefügt wurde, konnte eine höhere Urankonzentration in den Biofilmen verzeichnet werden (Abbildung 48, hell-orange, hell-blau). Dabei lag die Urankonzentration in den Biofilmen in dem Glas mit nur einem Biofilmträger höher (51-134 mg/L) als die in den Gläsern mit mehreren Biofilmträgern (65-91 mg/L). Dennoch war der Urangehalt des Umgebungswassers (Abbildung 48, dunkel-orange, dunkel-blau) bei beiden Versuchsreihen doppelt so hoch (191-230 mg/L), im Vergleich zu den Biofilmen. Das heißt, wenn die Konzentration an Uran im Umgebungswasser steigt, steigt auch die Urankonzentration im Biofilm. Ursachen dafür könnten die Poren und Kanäle in den Biofilmen sein, die mit dem Umgebungswasser durchzogen sind und dadurch gespeist werden. Eventuell werden geringe Mengen gelöstes Uran (VI) in die Zellen mit dem Wasser aufgenommen und der Nachweis von Uran im Biofilm ist dadurch begründet. Die Eisen-hydroxosulfat-Präzipitate wurden hinsichtlich der Uransorption mit Hilfe von TRLFS (Time Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy) auf den Biofilm-Trägern untersucht. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass Uran in diesem Präzipitat sorbiert war. Es konnten jedoch Spektren mit dieser Technik ermittelt werden, dessen Peaks auf Uranylsulfat-Verbindungen hinweisen. Die Vermutung liegt nahe, dass die identifizierten Uranylsulfate, die die Uranspeziation im Grubenwasser dominierten, aus den Wasserkanälen des Biofilms stammten. Die Uranylsulfate lagen somit nicht im Biofilm oder der Biofilm-Matrix gebunden vor, da sich das in einer Peak-Verschiebung geäußert hätte. Diese geringen assoziierten Mengen Uran im Biofilm eignen sich jedoch nicht, um das Umgebungswasser davon zu reinigen. Der Biofilm-Reaktor ohne Eingriff in die Chemie des Grubenwassers hat sich zur Beseitigung von Uran aus dem Grubenwasser als nicht effizient erwiesen. Andere Versuche mit anaeroben Reaktoren, die z.B. anaerobe Mikroorganismen wie Sulfatreduzierer beherbergen, könnten da effizienter sein.

### *Europium*

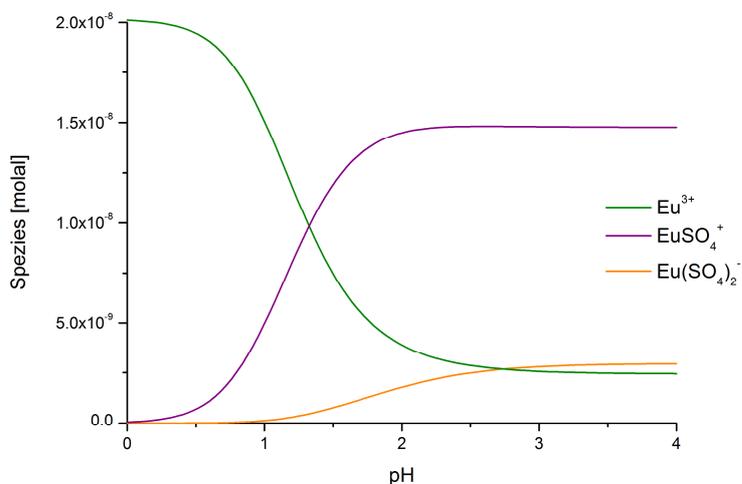
Europium ist ein Element der Seltenen Erden und kommt in der Erdkruste in geringen Mengen vor (Cotton, 1991). Das als Schwermetall und Lanthanid bezeichnetes Element ist auch im Grubenwasser Königstein in geringer Konzentration von 1,8 bis 3,1  $\mu\text{g/L}$  enthalten (Tabelle 11, Kapitel 4.1.).



**Abbildung 49: Feld- und Laborversuche zur Akkumulation von Europium an/in den Reaktor-Biofilmen.**

In Abbildung 49, in der die Labor- und Feldversuche mit Europium und den Königstein Biofilmen dargestellt sind, ist zu erkennen, dass Europium in den Biofilmen adsorbiert, jedoch nicht akkumuliert wird. Im Biofilm des Laborversuches wurde eine Adsorption von 22-24 % Europium nachgewiesen. Im Umgebungswasser verblieben somit 76-78 % des gesamten Europiums.

Im Feldversuch lag die Adsorptionsrate im Biofilm höher, dabei wurden 35-42 % des im Grubenwasser vorkommenden Europiums durch die Biofilme zurückgehalten. Nachdem das Grubenwasser den Biofilm-Reaktor durchflossen hatte, wurden im abfließenden Grubenwasser nur noch 58-65 % der Europiumkonzentration im Vergleich zum einfließenden Wasser gemessen.



**Abbildung 50: Speziation des im Grubenwasser Königstein vorliegenden Europiums als Funktion des pH-Wertes.**

Europium besitzt die Fähigkeit an unlösliche Huminstoffe zu binden (Terashima, 2012), die auch Bestandteile von EPS in Biofilmen sein können (Flemming & Wingender, 2010). In anderen Studien (Moll, 2014, Texier, 2000) wurde gezeigt, dass Bakterien z.B. *Ps. aeruginosa* und *Sporomusa sp.* selektiv Lanthanide z.B.  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ , und  $\text{Yb}^{3+}$  in einem wässrigen System adsorbieren können. Auch im Grubenwasser Königstein liegt Europium als dreiwertiges Ion als Europiumsulfat ( $\text{EuSO}_4^+$  und  $\text{Eu}(\text{SO}_4)_2^-$ ) bzw. als freies  $\text{Eu}^{3+}$ -Ion vor (siehe Abbildung 50).

Ob das Europium, welches im Biofilm detektiert wurde, an den Zellwänden der Mikroorganismen bindet, durch die EPS-Bestandteilen der Biofilm-Matrix akkumuliert wird, oder durch eine andere Funktion im Biofilm zurückgehalten wird, ist nicht bekannt.

Zusammenfassend wurde ein Einfluss der Biofilme auf die (Schwer)metalle im Königstein Grubenwasser für die Elemente Eisen, Arsen und Europium betrachtet, der durch Akkumulation der genannten Ionen im Biofilm gezeigt wurde. Eine mögliche biologische Reinigung der kontaminierten Grubenwässer mittels Biofilmen könnte für diese Elemente in Betracht gezogen werden. Ein erster Schritt wäre dabei, das Verfahren mit einer Pilot-Anlage vor Ort in größerem Maßstab zu testen. Dabei ist es wichtig, dass das Grubenwasser durch die Biofilme fließt und gut durchlüftet wird, so dass Eisen-oxidierende Mikroorganismen die Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen oxidieren und sich ein Schwertmannit-Mineral ausbildet, an dem Arsen ebenfalls adsorbieren kann. Der hohe Gehalt an Eisen-Ionen im Grubenwasser könnte somit deutlich reduziert werden. Damit werden auch die Kosten für die Aufbereitung des Wassers gesenkt, da ein Großteil der Chemikalien für die Neutralisierung und somit die Ausfällung von Eisen aufgebraucht wird.



## VII. Literatur

- Agate, A. D., 1983: Bioleaching of Indian uranium ores. *In: Recent Progress in Biohydrometallurgy. (G.Rossi und A.E.Torma, eds), pp. 325-329. Associazione Funerary Sarda, Italy.*
- Aguilera, A., S. C. Manrubia, F. Gomez, N. Rodriguez and R. Amils, 2006: Eukaryotic community distribution and its relationship to water physicochemical parameters in an extreme acidic environment, Rio Tinto (southwestern Spain). *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5325-5330.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., González-Toril, E., Rendueles, O., Amils, R., 2010: Eukaryotic microbial diversity of phototrophic microbial mats in two Icelandic geothermal hot springs. *International Microbiology*, 13, 21-32.
- Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J.-L., Ollivier, B., 2010: *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions.*, 14, 305-312.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990: Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 339-348.
- Amann, R. I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990: Combination of 16S Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow-Cytometry for Analyzing Mixed Microbial-Populations. *Applied and environmental microbiology*, 56, 1919-1925.
- Amaral-Zettler, L. A., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., Sogin, M.L., 2002: Eukaryotic diversity in Spain's river of fire. *Nature*, 417, 137.
- Amaral Zettler, L. A., Messerli, M.A., Laatsch, A.D., Smith, P.J., Sogin, M.L., 2003: From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *The Biological Bulletin*, 204, 205-209.
- Amils, R., Gonzalez-Toril, E., Fernandez-Remolar, D., Gomez, F., Rodriguez, N., Duran, C., 2002: Interaction of the sulfur and iron cycles in the Tinto River ecosystem. *Environmental Science & Bio/Technology*, 1, 299-309.
- Amoroso, M. J., Schubert, D., Mitscherlich, P., Schumann, P., Kothe, E., 2000: Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces spec.* *Journal of basic microbiology*, 40, 295-301.
- Anthony, C., 1982: The biochemistry of the methyloprophs. *Academic Press, New York, N.Y.*
- Arey, J. S., Seaman, J.C., Bertsch, P.M., 1999: Immobilization of Uranium in Contaminated Sediments by Hydroxyapatite Addition. *Environmental Science & Technology*, 33, 337-342.
- Arnold, T., Baumann, N., Krawczyk-Barsch, E., Brockmann, S., Zimmermann, U., Jenk, U., Weiss, S., 2011: Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 2200-2212.
- Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppée, J.-Y., Chandler, M., et al., 2010: Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas spp.* Geonome. *PLoS Genetics*, 6, e1000859.
- Bach, M. K., 1955: Studies of nitrogen fixation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *M.S. Thesis, University of Wisconsin, Madison, Wis., U.S.A.*
- Baker, B. J., Banfield, J.F., 2003: Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 139-152.
- Baker, B. J., Lutz, M.A., Dawson, S.C., Bond, P.L., Banfield, J.F., 2004: Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Applied and environmental microbiology*, 70, 6264-6271.
- Baker, B. J., G. W. Tyson, L. Goosherst and J. F. Banfield, 2009: Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2192-2199.
- Balk, M., Altinbas, M., Rijpstra, W.I., Sinnighe Damsté, J.S., Stams, A.J., 2008: *Desulfatirhabdium butyratorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *International Journal of Systematic Microbiology*, 58, 110-115.

- Banks, D., Younger, P.L., Arnesen, R.-T., Iversen, E.R., Banks, S. B., 1997: Mine-water chemistry: The good, the bad and the ugly. *Environmental Geology*, 32, 157-174.
- Barns, S. M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W., Pace, N.R., 1994: Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 1609-1613.
- Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Garrido, F., Dictor, M.C., Morin, D., Coupland, K., Johnson, D.B., Hallberg, K.B., Baranger, P., 2006: Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, 99-108.
- Ben-Dov, E., Brenner, A., Kushmaro, A., 2007: Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microbial ecology*, 54, 439-451.
- Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V. Nitsche, H., 1996: Speciation of uranium in seepage waters of a mine tailing pile studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta*, 74, 87-91.
- Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V. Nitsche, H., 1998: Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *Journal of Alloys and Compounds*, 271, 201-205.
- Berthelot, D., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 1997: Iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs from uranium mine environments. *Geomicrobiology Journal*, 14, 317-323.
- Bertrand, P. A., Choppin, G.R., 1982: Separation of actinides in different oxidation-states by solvent-extraction. *Radiochimica Acta*, 31, 135-137.
- Best, D. J., 1990: Optimal Determination Of Most Probable Numbers. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 159-165.
- Bhatti, T. M., Vuorinen, A., Lehtinen, M., Tuovinen, O.H., 1998: Dissolution of uraninite in acid solutions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73, 259-263.
- Bigham, J. M., Schwertmann, U., Carlson, L., Murad, E., 1990: A poorly crystallized oxyhydroxysulfate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54, 2743-2758.
- Bittner, N., 2010: Stable isotope probing-based ecophysiological analysis of sulphate-reducing microorganisms in an acidic fen. *Magisterarbeit, Universität Wien*.
- Bitton, G., 1994: Wastewater Microbiology. *Wiley-Liss, New York*.
- Bonch-Osmolovskaya, E. A., Sokolova, T.G., Kostrikina, N.A., Zavarzin, G.A., 1990: *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. —a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium. *Archives of Microbiology*, 153, 151-155.
- Bond, P. L., Banfield, J.F., 2001: Design and Performance of rRNA Targeted Oligonucleotide Probes for in Situ Detection and Phylogenetic Identification of Microorganisms Inhabiting Acid Mine Drainage Environments. *Microbial ecology*, 41, 149-161.
- Bond, P. L., Smriga, S.P., Banfield, J.F., 2000: Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and environmental microbiology*, 66, 3842-3849.
- Boopathy, R., Kulpa, C.F., 1992: Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Current Microbiology*, 25, 235-241.
- Borodina, E., Kelly, D.P., Schumann, P., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Wood, A.P., 2002: Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 177, 173-183.
- Bos, P., Kuenen, J.G., 1983: Microbiology of sulphur oxidizing bacteria. *Microbial Corrosion*, 18-27. The Metals Society, London.
- Bosecker, K., 1997: Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 591-604.
- Brainard, J. R., Strietelmeier, B.A., Smith, P.H., Langston-Unkefer, P.J. , 1992: Actinide binding and solubilization by microbial siderophores. *Radiochimica Acta*, 58-59, 357-363.

- Braissant, O., Wahli, W., 1998: A simplified *in-situ* hybridization protocol using nonradioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica*, 1, 10-16.
- Bridge, T. A. M., Johnson, D.B., 1998: Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64, 2181-2186.
- Bridge, T. A. M., Johnson, D.B., 2000: Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium SJH*. *Geomicrobiology Journal*, 17, 193-206.
- Brock, T. D., Gustafson, J., 1976: Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 32, 567-571.
- Brockmann, S., T. Arnold, B. Schweder and G. Bernhard, 2010: Visualizing acidophilic microorganisms in biofilm communities using acid stable fluorescence dyes. *Journal of fluorescence*, 20, 943-951.
- Brown, J. F., D. S. Jones, D. B. Mills, J. L. Macalady and W. D. Burgos, 2011: Application of a Depositional Facies Model to an Acid Mine Drainage Site. *Applied and environmental microbiology*, 77, 545-554.
- Bruneel, O., N. Pascault, M. Egal, C. Bancon-Montigny, M. S. Goni-Urriza, F. Elbaz-Poulichet, J. C. Personne and R. Duran, 2008: Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage at Carnoules (France). *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12, 563-571.
- Bruneel, O., Personne, J.C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B.J., Le Fleche, A., Grimont, P.A.D., 2003: Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas sp.* in acid-mine drainage (Carnoules, France). *Journal of Applied Microbiology*, 95, 492-499.
- Burton, E. D., Bush, R.T., Johnston, S.G., Watling, K.M., Hocking, R.K., Sullivan, L.A., Parker, G.K., 2009: Sorption of arsenic(V) and arsenic(III) to schwertmannite. *Environmental Science & Technology*, 43, 9202-9207.
- Campbell, L. L., Singleton, R. Jr., 1986: Genus *Desulfotomaculum*. *Campbell and Postgate 1965*, 61AL, p. 120C1202. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Campisano, A., Overhage, J., Rehm, B.H., 2008: The polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes are differentially regulated in planktonic- and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, 133, 442-452.
- Campos, M. B., de Azevedo, H., Lopes Nascimento, M.R., Roque, C.V., Rodgher, S., 2010: Environmental assessment of water from a uranium mine (Caldas, Minas Gerais State, Brazil) in a decommissioning operation. *Environmental Earth Sciences*, 62, 857-863.
- Chandler, D. P., Fredrickson, J.K. & Brockman, F.J., 1997: Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology*, 6, 475-482.
- Chang, Y. J., Peacock, A.D., Long, P.E., Stephen, J.R., McKinley, J.P., Macnaughton, S.J., Hussain, A.K., Saxton, A.M., White, D.C., 2001: Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Applied and environmental microbiology*, 67, 3149-3160.
- Chao, A., 1984: Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265-270.
- Chao, A., Lee, S.M., 1992: Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *Journal of the American Statistical Association*, 87, 210-217.
- Chengalath, R., 1985: The Rotifera of the Canadian Arctic sea ice, with description of a new species. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 2212-2218.
- Chevari, S., Likhner, D., 1969: A study of the interaction between uranium and certain biocomplexons. *Meditinskaia radiologija*, 14, 28-34.
- Choudhary, S., Sar, P., 2011: Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 336-343.

- Chowdhury, F., Chowdhury, A., 2012: Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8, 14-20.
- Coates, J. D., Ellis, D.J., Gaw, C.V., Lovley, D.R., 1999: *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 49, 1615-1622.
- Coleman, M. L., Hedrick, D.B., Lovley, D.R., White, D.C., Pye, K., 1993: Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 361, 436-438.
- Colmer, A. R., Hinkle, M.E., 1947: The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*, 106, 253-256.
- Colmer, A. R., Temple, K.L., Hinkle, M.E., 1950: An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *Journal of bacteriology*, 59, 317-328.
- Costerton, J. W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435-464.
- Costerton, J. W., Irvin, R.T., Cheng, K.-J., 1981: The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 35, 299-324.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995: Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
- Cotton, S., 1991: Lanthanides and actinides. *Oxford Univ. Press*, 192 p.
- Coupland, K., Johnson, D.B., 2008: Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 279, 30-35.
- Cox, T. F., Cox, M.A.A., 1994: Multidimensional Scaling, Chapman & Hall.
- Crosa, J. H., Walsh, C.T., 2002: Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 66, 223-249. PMID 12040125. PMC: 12120789.
- Cruaud, P., Vigneron, A., Lucchetti-Miganeh, C., Ciron, P.E., Godfroy, A., Cambon-Bonavita, M.-A., 2014: Influence of DNA extraction methods, 16S rRNA targeted hypervariable regions and sample origins on the microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 80, 4626-4639.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., Wagner, M., 1999: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and applied microbiology*, 22, 434-444.
- Das, B. K., Roy, A., Koschorreck, M., Mandal, S.M., Wendt-Potthoff, K., Bhattacharya, J., 2009: Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Research*, 43, 883-894.
- DasSarma, S., DasSarma, P., 2012: Halophiles. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Dastidar, A., Wang, Y.T., 2012: Modeling arsenite oxidation by chemoautotrophic *Thiomonas arsenivorans* strain b6 in a packed-bed bioreactor. *Science of the Total Environment*, 432, 113-121.
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z., 1994: Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1131-1138.
- Dedysh, S. N., 2011: Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps. *Frontiers in microbiology*, 2, 184.
- Dedysh, S. N., Derakshani, M., Liesack, W., 2001: Detection and enumeration of methanotrophs in acidic Sphagnum peat by 16S rRNA fluorescence *in-situ* hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4850-4857.
- Delavat, F., Lett, M.-C., Lièvreumont, D., 2012: Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biology Direct*, 7, 28.
- Denef, V. J., Mueller, R.S., Banfield, J.F., 2010: AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME Journal*, 4, 599-610.

- Deneke, R., 2000: Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values  $\leq 3$ . *Hydrobiologia*, 433, 167-172.
- Desai, M. S., K. Assig and S. Dattagupta, 2013: Nitrogen fixation in distinct microbial niches within a chemoautotrophy-driven cave ecosystem. *ISME Journal*, 7, 2411-2423.
- DiSpirito, A. A., Tuovinen, O.H., 1982: Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives of Microbiology*, 133, 33-37.
- Domingo, J. L., 2001: Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reproductive Toxicology*, 15, 603-609.
- Dopson, M., C. Baker-Austin, A. Hind, J. P. Bowman and P. L. Bond, 2004: Characterization of *Ferroplasma* Isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., Extreme Acidophiles from Acid Mine Drainage and Industrial Bioleaching Environments. *Applied and environmental microbiology*, 70, 2079-2088.
- Doyle, R., 1989: How Cell Walls of Gram-Positive Bacteria Interact with Metal Ions. In: Beveridge, T.J. and Doyle, R.J. (Eds.) *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley and Sons, New York, 275-293.
- Druschel, G. K., Baker, B.J., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 2004: Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical Transactions*, 5, 13-32.
- Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M., Guay, R., 1996: *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 46, 1056-1064.
- Dunne, W. M., 2002: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166.
- Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Morin, G., Bonnefoy, V., 2003: Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Applied and environmental microbiology*, 69, 6165-6173.
- Durán, C., Marín, I., Amils, R., 1999: Specific metal sequestering fungi from an acidic river. In: Amils R, Ballester A (eds) *Biohydrometallurgy and the Environment Towards the Mining of the 21st Century, Vol Part B*. Elsevier, Amsterdam, p 521-530.
- Dutrizac, J. E., Jambor, J.L., 1987: The behaviour of arsenic during jarosite precipitation: Arsenic precipitation at 97°C from sulphate or chloride media. *Canadian Metallurgical*, 26, 91-101.
- Edwards, K. J., Bond, P.L., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 2000: An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science*, 279, 1796-1799.
- Edwards, R. A., B. Rodriguez-Brito, L. Wegley, M. Haynes, M. Breitbart, D. M. Peterson, M. O. Saar, S. Alexander, E. C. Alexander, Jr. and F. Rohwer, 2006: Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC genomics*, 7, 57.
- Ehrlich, H. L., 1963: Microorganisms in acid drainage from a copper mine. *Journal of bacteriology*, 86, 350-352.
- Ehrlich, H. L., Brierley, C.L., 1990: Microbial mineral recovery. *Mc Graw-Hill, New York*.
- Ekendahl, S., Arlinger, J., Ståhl, F., Pedersen, K., 1994: Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S-rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiology*, 140, 1575-1583.
- Emerson de Lima Procópio, R., Reis da Silva, I., Kassawara Martins, M., Lúcio de Azevedo, J., Magali de Araújo, J., 2012: Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 466-471.
- Enderle, G. J., Friedrich, K., 1995: East-German Uranium miners (Wismut) - exposure conditions and health consequences. *Stem Cells*, 13, 78-79.
- Espana, J. S., Pamo, E.L., Santofimia, E., Aduvire, O., Reyes, J., Baretino, D., 2005: Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt (Odiel river watershed, Huelva, SW Spain): Geochemistry, mineralogy and environmental implications. *Applied Geochemistry*, 20, 1320-1356.
- Euringer, K. and T. Lueders, 2008: An optimised PCR/T-RFLP fingerprinting approach for the investigation of protistan communities in groundwater environments. *Journal of Microbiology Methods*, 75, 262-268.

- Fan, H., Su, C., Wang, Y., Yao, J., Zhao, K., Wang, Y., Wang, G., 2008: Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 529-539.
- Fernandes, H. M., Franklin, M.R., 2001: Assessment of acid rock drainage pollutants release in the uranium mining site of Poços de Caldas-Brazil. *Journal of Environmental Radioactivity*, 54, 5-25.
- Flemming, H.-C., 1994: Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. *Kommisionsverlag R. Oldenbourg, Stuttgart*.
- Flemming, H.-C., Leis, A., 2002a: Sorption properties of biofilms. In: *Bitton, G. (Ed.) The Encyclopedia of Environmental Microbiology. Vol. 5, John Wiley & Sons, New York, 2958-2967*.
- Flemming, H.-C. and J. Wingender, 2010: The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2002b: Extrazelluläre polymerische Substanzen (EPS): strukturelle, ökologische und technische Aspekte. In: *Bitton, G. (Ed.) The Encyclopedia of Environmental Microbiology. Vol. 3, John Wiley & Sons, New York, 1223-1231*.
- Flemming, H. C., Wingender, J., 2001: Biofilme—die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit*, 3, 169-180.
- Ford, T., Mitchel, R., 1992: Microbial transport of toxic metals. In: *Mitchel, R. (Ed.) Environmental Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 83-103*.
- Francis, A. J., 1998: Biotransformation of uranium and other actinides in radioactive wastes. *Journal of Alloys and Compounds*, 271-273, 78-84.
- Friedrich, C. G., D. Rother, F. Bardischewsky, A. Quentmeier and J. Fischer, 2001: Oxidation of reduced inorganischen Sulfurverbindungen durch Bakterien: Entstehung eines gemeinsamen Mechanismus? *Applied and environmental microbiology*, 67, 2873-2882.
- Friedrich, M. W., 2002: Phylogenetische Analyse zeigt multiple laterale Transfers von Adenosin-5'-Phosphosulfat-Reduktase-Genen unter Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen. *Journal of bacteriology*, 184, 278-289.
- Gadd, G. M., 2002: Microbial interactions with metals/radionuclides: the basis of bioremediation. In: *Interactions of bacteria with radionuclides (Keith-Roach, M. & Livens, F. Hrsg.) Elsevier Science, Oxford, UK, 179-204*.
- Gaylarde, C., Morton, G., 2002: Biodeterioration of mineral materials. In: *Bitton, G. (Ed) The Encyclopedia of Environmental Microbiology. Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 516-528*.
- Geesey, G. G., 1982: Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *American Society for Microbiology News*, 48, 9-14.
- Geesey, G. G., Jang, L., 1990: Extracelluläre Polymere für Metallbindung. In: *Ehrlich, H.C. and Brierley, C.L. (Eds.) Microbial Mineral Recovery, McGraw-Hill, New York, 223-247*.
- Geesey, G. G., Wigglesworth-Cooksey, B., Cooksey, K.E., 2000: Einfluss von Calcium und anderen Kationen auf die Oberflächenadhäsion von Bakterien und Diatomeen: eine Übersicht. *Biofouling*, 15, 195-205.
- Geipel, G., Brachmann, A., Brendler, V., Bernhard, G., Nitsche, H., 1996: Uranium(VI) Sulfat-Komplexierung durch zeitauflösende Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS). *Radiochimica Acta*, 75, 199-204.
- Gerber, N. N., Lechevalier, H.A., 1965: Geosmin, ein erdähnlich riechendes Substrat, isoliert von Actinomyceten. *Journal of Applied Microbiology*, 13, 935-938.
- Ghauri, M. A., Khalid, A.M., Grant, S., Heaphy, S., Grant, W.D., 2003: Phylogenetische Analyse von verschiedenen Isolaten von *Sulfobacillus* spp. isoliert von Uranium-reichen Umgebungen und Wiederherstellung von Genen unter Verwendung von Integron-spezifischen Primern. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 7, 341-345.
- Ghosh, S., Mahapatra, N.R., Banerjee, P.C., 1997: Metallresistenz in Acidocella-Strämen und plasmid-vermittelte Übertragung dieser Eigenschaft auf *Acidiphilium multivorum* und *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 63, 4523-4527.

- Gich, F., Garcia-Gil, J., Overmann, J., 2001: Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Archives of Microbiology*, 177, 1-10.
- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A., 2005: Microbial Diversity in Soils. In: F. Buscot & A. Varma (Eds) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (pp. 19-58). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Glaser, K., Kuppardt, A., Krohn, S., Heidtmann, A., Harms, H., Chatzinotas, A., 2014: Primer pairs for the specific environmental detection and T-RFLP analysis of the ubiquitous flagellate taxa Chrysophyceae and Kinetoplastea. *Journal of Microbiology Methods*, 100, 8-16.
- Gleisner, M., 2005: Quantification of mineral weathering rates in sulfidic mine tailings under water-saturated conditions. *Dissertation. Stockholm Universität, Schweden*.
- Glombitza, F., 2001: Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Management*, 21, 197-203.
- Golyshina, O. V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondratéva, T.F., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., 2000: *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp nov., an acidophilic, autotrophic, ferrousiron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 997-1006.
- Golyshina, O. V., Timmis, K.N., 2005: *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental Microbiology*, 7, 1277-1288.
- Gonzalez-Toril, E., E. Llobet-Brossa, E. O. Casamayor, R. Amann and R. Amils, 2003: Microbial Ecology of an Extreme Acidic Environment, the Tinto River. *Applied and environmental microbiology*, 69, 4853-4865.
- Gorby, Y. A., Lovley, D.R., 1992: Enzymatic Uranium Precipitation. *Environmental Science & Technology*, 26, 205-207.
- Green, P. N., 1992: The genus *Methylobacterium*. In *The Prokaryotes, 2nd edn. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.*, 2342-2349. .
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliot, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S.M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M.F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C.F., Wallace, R.J. Jr, Winthrop, K., 2007: An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175, 367-416.
- Gross, S., Robbins, E.I., 2000: Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia*, 433, 91-109.
- Guay, R., Silver, M., 1981: Uranium biohydrometallurgy. *Process Biochemistry*, 44, 8-11.
- Guo, X., You, X.-Y., Liu, L.-J., Zhang, J.-Y., Liu, S.-J., Jiang, C.-Y., 2009: *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 2415-2420.
- Gurung, A., Chakraborty, R., 2009: The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in alleviating the inhibitory effect of thiosulfate on the growth of acidophilic *Acidiphilium* species isolated from acid mine drainage samples from Garubathan, India. *Canadian journal of microbiology*, 55, 1040-1048.
- Haferburg, G., D. Merten, G. Buchel and E. Kothe, 2007: Biosorption of metal and salt tolerant microbial isolates from a former uranium mining area. Their impact on changes in rare earth element patterns in acid mine drainage. *Journal of basic microbiology*, 47, 474-484.
- Hagedorn, C., Holt, J.G., 1975: A nutritional and taxonomic survey of *Arthrobacter* soil isolates. *Canadian journal of microbiology*, 21, 353-361.
- Hallberg, K. B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, D.B., 2006: Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 72, 2022-2030.

- Hallberg, K. B., Gonzalez-Toril, E., Johnson, D.B., 2010: *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 14, 9-19.
- Hallberg, K. B., Johnson, D.B., 2003: Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy*, 71, 139-148.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 1998: Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 141-149.
- Hansen, T. A., 1993: Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. In: Odom, J.M. & Singleton Jr., R. (Hrsg.) *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer, New York Inc.: 21-40.
- Hao, C.-B., Zhang, H.X., Bai, Z.H., Zhang, B.-G., Zhang, X.X. and 27(11):2255-60., 2006: Biodiversity of acidophiles in the sediment at an acid mine drainage site. *Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China.* , 27, 2255-2260.
- Hao, C., Wang, L., Gao, Y., Zhang, L., Dong, H., 2010: Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 14, 465-474.
- Harrison, A. P., Jr., 1984: The acidophilic Thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annual Review of Microbiology*, 38, 265-292.
- Hedrich, S., Lünsdorf, H., Kleeberg, R., Heide, G., Seifert, J., Schlömann, M., 2011a: Schwertmannite Formation Adjacent to Bacterial Cells in a Mine Water Treatment Plant and in Pure Cultures of *Ferrovum myxofaciens*. *Environmental Science & Technology*, 45, 7685-7692.
- Hedrich, S., M. Schlömann and D. B. Johnson, 2011: The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*, 157, 1551-1564.
- Heider, J., 2007a: Anaerobe Atmung. In G. Fuchs (Ed) *Allgemeine Mikrobiologie (pp. 379-403)*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Heinzel, E., Janneck, E., Glombitza, F., Schlömann, M., Seifert, J., 2009: Population Dynamics of Iron-Oxidizing Communities in Pilot Plants for the Treatment of Acid Mine Waters. *Environmental Science & Bio/Technology*, 43, 6138-6144.
- Hem, J. D., 1978: Redox processes at surfaces of manganese oxide and their effects on aqueous metal ions. *Chemical Geology*, 21, 199-218.
- Herfort, L., Schouten, S., Abbas, B., 2007: Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 242-257.
- Herlihy, A. T., Mills, A.L., Hornberger, G.M., Bruckner, A.E., 1987: The importance of sediment sulfate reduction to the sulfate budget of an impoundment receiving acid mine drainage. *Water Resources Research*, 23, 287-292.
- Hiraishi, A., Matsuzawa, Y., Kanbe, T., Wakao, N., 2000: *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 1539-1546.
- Höfer, M., Hollmann, D., Karnatz, F., Löffler, R., Glombitza, F., 1998: Entwicklung, Aufbau und Erprobung einer kleintechnischen Versuchsanlage zur Behandlung saurer, sulfatreicher eisenhaltiger Wässer aus dem Braunkohlebergbau mit unterschiedlichen Technologien der Sulfatreduktion und der Biosorption. *Abschlußbericht. BMBF-Projekt O2WB9539/0, Karlsruhe 1998*.
- Hoffmann, M., Kassahun, A., Seifert, J., Kutschke, S., Jenk, U., 2008: Preliminary investigations to establish a reductive reaction zone in the flooded uranium mine Königstein. In: *International conference on soil-water systems*, E 1138.
- Holleman, A. F., Wiberg, N., 2007: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 102. Auflage, de Gruyter, ISBN 978-3-11-017770-1, 1956 Seiten.
- Holleman, A. F., 1995a: Lehrbuch der anorganischen Chemie. 102 edn. Berlin; New York: Hollemann A. F. ; Wiberg E.; Wiberg N.

- Holleman, A. F., Wiberg, E., 1995b: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. verb. und stark erw. Aufl. von N. Wiberg; Walter de Gruyter Berlin, New York.
- Holmer, M., Storkholm, P., 2001: Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshwater Biology*, 46, 431-451.
- Horvath, F. J., 1972: The Influence of Acid-mine Drainage on the Distribution of Fresh Water Planktonic Rotifers. *Ohio University, June, 1972, 78 Seiten*.
- Hose, L. D., Pizarowicz, J.A., 1999: Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: Reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. *Journal of Cave and Karst Studies*, 61, 13-21.
- Huang, Y., N. Zhao, L. He, L. Wang, Z. Liu, M. You and F. Guan, 2005: *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 43, 1451-1455.
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M., Blackall, L.L., 2001: Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 411-419.
- Hujsova, M., Kubatova, A., Kostovcik, M., Blanchette, R.A., de Beer, Z.W., Chudickova, M., Kolarik, M., 2014: Three new genera of fungi from extremely acidic soils. *Mycological Progress*, 13, 819-831.
- Imbert, M., Béchet, M., Blondeau, R., 1995: Comparison of the main siderophores produced by some species of Streptomyces. *Current Microbiology*, 31, 129-133.
- Imhoff, J. F., 2001: Transfer of *Rhodopseudomonas acidophila* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb.nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51, 1863–1866.
- Itoh, T., N. Yoshikawa and T. Takashina, 2007: *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57, 2557-2561.
- Janneck, E., Arnold, I., Koch, T., Meyer, J., Burghardt, D., Ehinger, S., 2010: Microbial synthesis of schwertmannite from lignite mine water and its utilization for removal of arsenic from mine waters and for production of iron pigments. *International Mine Water Association (IMWA) Symposium*, Cape Breton, Nova Scotia, 5–12 September.
- Jenk, U., 1995: Untersuchungen zu den chemischen und geochemischen Verhältnissen in der Uranlagerstätte Königsstein nach Einstellung der Urangewinnung durch schwefelsaure Untertagelaugung. *Dissertation. Technischen Universität Bergakademie Freiberg*.
- Jensen, K. A., Palenik, C.S., Ewing, R.C., 2002: U<sup>6+</sup> phases in the weathering zone of the Bangombe U-deposit: observed and predicted mineralogy. *Radiochimica Acta*, 90, 761-769.
- Jiang, C. Y., Liu, Y., Liu, Y.Y., You, X.Y., Guo, X., Liu, S.J., 2008: *Alicyclobacillus ferroxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58, 2898-2903.
- Johnson, D. B., 1995: Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 23, 205-218.
- Johnson, D. B., 1998a: Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 307-317.
- Johnson, D. B., 2012: Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 2-12.
- Johnson, D. B., Body, D.A., Bridge, T.A.M., Bruhn, D.F., Roberto, F.F., 1998b: Biodiversity of acidophilic moderate thermophiles isolated from two sites in Yellowstone National Park, and their roles in the dissimilatory oxido-reduction of iron. *Biodiversity, Ecology and Evolution of Thermophiles in Yellowstone National Park (Reysenbach, A.-L. and Mancinelli, R., Eds.)*. Plenum Press, New York, NY, in press.
- Johnson, D. B. and T. A. M. Bridge, 2002: Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 315-321.

- Johnson, D. B., Hallberg, K.B., 2003: The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154, 466-473.
- Johnson, D. B., Hallberg, K.B., 2007: Techniques for detecting and identifying acidophilic mineral-oxidizing microorganisms. In: Rawlings, D.E., Johnson, D.B. (Eds.), *Biomining*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 237–262.
- Johnson, D. B., Hallberg, K.B., 2009: Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 54, 201-255.
- Johnson, D. B., Macvicar, J.H.M., Rolfe, S., 1987: A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiology Methods*, 7, 9-18.
- Johnson, D. B., McGinness, S., 1991: A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 13, 113-122.
- Johnson, D. B., McGinness, S., 1991a: Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 57, 207-211.
- Johnson, D. B., Okibe, N., Hallberg, K.B., 2005: Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. *Journal of Microbiology Methods*, 63, 216-217.
- Johnson, D. B., Rang, L., 1993: Effects of acidophilic protozoa on populations of metaloxidizing bacteria during the leaching of pyritic coal. *Journal of General Microbiology*, 139, 1417-1423.
- Johnson, D. B., Roberto, F.F., 1997: Heterotrophic acidophiles and their roles in the bioleaching of sulfide minerals. *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes (Rawlings, D.E., Ed.)*, 259-280. Springer-Verlag/Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K.B., Iversen, E., 2001: Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environmental Microbiology*, 3, 630-637.
- Johnson, D. B. H., K.B.; Hedrich, S., 2014: Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium "*Ferrofum myxofaciens*". *Applied and environmental microbiology*, 80, 672-680.
- Jones, R. M., Hedrich, S., Johnson, D.B., 2013: *Acidocella aromatica* sp. nov.: an acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 17, 841-850.
- Kawano, M., Tomita, K., 2001: Geochemical modeling of bacterially induced mineralization of Schwertmannite and jarosite in sulfuric acid spring water. *American Mineralogist*, 86, 1156-1165.
- Keeling, P. J., 2001: Foraminifera and Cercozoa are related in actin phylogeny: two orphans find a home? *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1551-1557.
- Kelly, D. P., Norris, P.R., Brierly, C.L., 1979: Microbiological methods for the extraction and recovery of metals. In: *Microbial Technology, Current State, Future Prospects, Symposium of the Society for General Microbiology; 29 (A.T.Bull, D.C.Ellwood und C.Ratledge eds) pp. 263-308, Cambridge University Press Cambridge*.
- Kelly, D. P., Smith, N.A., 1990: Organic sulfur compounds in the environment. *Advances in Microbial Ecology*, 11, 345-385.
- Kelly, D. P., Wood, A.P., 2000: Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 511-516.
- Kharel, M. K., Shepherd, M.D., Nybo, S.E., Smith, M.L., Bosserman, M.A., Rohr, J., 2010: Isolation of *Streptomyces* species from soil. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 10:Unit 10E.4.
- Kimura, S., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2006: Sulfidogenesis in low pH (3.8–4.2) media by a mixed population of acidophilic bacteria. *Biodegradation*, 17, 57-65.

- Kishimoto, N., Kosako, Y., Tano, T., 1991: *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Current Microbiology*, 22, 1-7.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000: rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1328-1333.
- Klee, A. J., 1993: A Computer-Program For The Determination Of Most Probable Number And Its Confidence-Limits. *Journal of Microbiology Methods*, 18, 91-98.
- Klemps, R., Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N., 1985: Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum species*. *Archives of Microbiology*, 143, 203-208.
- Klueglein, N., T. Lösekann-Behrens, M. Obst, S. Behrens, E. Appel and A. Kappler, 2013: Magnetite Formation by the Novel Fe(III)-reducing *Geothrix fermentans* Strain H rad G1 Isolated from a Hydrocarbon-Contaminated Sediment with Increased Magnetic Susceptibility. *Geomicrobiology Journal*, 30, 863-873.
- Koban, A., Geipel, G., Bernhard, G., 2003: Complex formation between Uranium(VI) and  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. *Radiochimica Acta*, 91, 393.
- Kock, D., Schippers, A., 2008: Quantitative Microbial Community Analysis of Three Different Sulfidic Mine Tailing Dumps Generating Acid Mine Drainage. *Applied and environmental microbiology*, 74, 5211-5219.
- Koo, S.-Y., Cho, K.-S., 2007: Characterization of a heavy metal-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium, *Methylobacterium sp* SY-NiR1. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 58-65.
- Kovalenko, E. V., Malakhova, P.T., 1983: The spore-forming iron-oxidizing bacterium *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Mikrobiologiya*, 52, 962-966.
- 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. *Science of the Total Environment*, 409, 3059-3065.
- Křepelová, A., Brendler, V., Sachs, S., Baumann, N., Bernhard, G., 2007: U(VI)-kaolinite surface complexation in absence and presence of humic acid studied by TRLFS. *Environmental Science & Technology*, 41, 6142.
- Kruskal, J. B., 1964: Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29, 1-27.
- Kunkel, R., Hannappel, S., Voigt, H.-J., Wendland, F., 2002: Die natürliche Grundwasserbeschaffenheit ausgewählter hydrostratigrafischer Einheiten in Deutschland. *Bericht*, 97 S.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., 1999: 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. *Applied and environmental microbiology*, 65, 3633-3640.
- Küsel, K., Roth, U., Drake, H.L., 2002: Microbial reduction of Fe(III) in the presence of oxygen under low pH conditions. *Environmental Microbiology*, 4, 414-421.
- La Duc, M. T., P. Vaishampayan, H. R. Nilsson, T. Torok and K. Venkateswaran, 2012: Pyrosequencing-derived bacterial, archaeal, and fungal diversity of spacecraft hardware destined for Mars. *Applied and environmental microbiology*, 78, 5912-5922.
- Langmuir, A. D., 1979: Guillain-Barré syndrome: the swine influenza virus vaccine incident in the United States of America. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 72, 660-669.
- Langmuir, D., 1978: Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 2939-2955.
- Leathen, W. W., Braley, S.A., McIntyre, L.D., 1953a: The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal. I. *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied Microbiology*, 1, 61-64.
- Leathen, W. W., Braley, S.A., McIntyre, L.D., 1953b: The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. *Applied Microbiology*, 1, 65-68.

- Leduc, D., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 2002: Quantification of bacterial populations indigenous to acidic drainage streams. *Water Air Soil Pollution*, 6, 1-21.
- Lee, Y.-J., Romanek, C.S., Wiegel, J., 2009: *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a spore-forming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 2743-2746.
- Lemmer, H., Roth, D., Schade, M., 1994: Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge. *Water Research*, 28, 1341-1346.
- Lenchi, N., Inceoğlu, Ö., Kebbouche-Gana, S., Gana, M.L., Llirós, M., Servais, P., García-Armisen, T., 2013: Diversity of Microbial Communities in Production and Injection Waters of Algerian Oilfields Revealed by 16S rRNA Gene Amplicon 454 Pyrosequencing. *PloS one*, 8, e66588.
- Lengeler, J. W., 1999: Biology of the Prokaryotes. *Stuttgart: Thieme. p. 796.*
- Leßmann, D., Fyson, A., Nixdorf, B., 2000: Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH<3. *Hydrobiologia*, 433, 123-128.
- Lewandowski, J., Leitschuh, S., Koss, V., 1997: Schadstoffe im Boden. *Springer-Verlag, Bln., Heidelberg.*
- Lide, D. R., 1994: Uranium 74th ed. *Boca Raton, FL: CRC Press*, 31-32.
- Lim, E. L., Amaral, L.A., Caron, D.A., DeLong, E.F., 1993: Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protists. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1647-1655.
- Liu, R., Z. Yu, H. Guo, M. Liu, H. Zhang and M. Yang, 2012: Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Science of the Total Environment*, 435-436, 124-131.
- Lloyd, J. R., Macaskie, L.E., 2002: Biochemical basis of microbe-metal interactions. In: *Interactions of Microorganisms with Radionuclides (eds Keith-Roach MJ, Livens FR) Elsevier Sciences Ltd, Oxford, UK, pp. 313-342.*
- Long, Z. E., Huang, Y.H., Cai, Z.L., Cong, W., Fan, O.Y., 2003: Biooxidation of ferrous iron by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* in poly(vinyl alcohol) cryogel carriers. *Biotechnology Letters*, 25, 245-249.
- Lopez-Archilla, A. I., Amils, R., 1999: A Comparative Ecological Study of Two Acidic Rivers in Southwestern Spain. *Microbial ecology*, 38, 146-156.
- Lopez-Archilla, A. I., E. Gerard, D. Moreira and P. Lopez-Garcia, 2004: Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 221-228.
- Lopez-Archilla, A. I., I. Marin and R. Amils, 2001: Microbial Community Composition and Ecology of an Acidic Aquatic Environment: The Tinto River, Spain. *Microbial ecology*, 41, 20-35.
- Lovley, D. R., 1991a: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Reviews*, 55, 259-287.
- Lovley, D. R., 1993a: Dissimilatory Metal Reduction. *Annual Review of Microbiology*, 47, 263-290.
- Lovley, D. R., 1995: Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Advances in Agronomy*, 54, 175-231.
- Lovley, D. R., 2002: Dissimilatory metal reduction: from early life to bioremediation. *American Society for Microbiology News*, 68, 231-237.
- Lovley, D. R., Phillips, E.J.P., 1992: Reduction of Uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and environmental microbiology*, 58, 850-856.
- Lovley, D. R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Landa, E.R., 1991b: Microbial Reduction of Uranium. *Nature*, 350, 413-416.
- Lovley, D. R., Widman, P.K., Woodward, J.C., Phillips, E.J.P., 1993b: Reduction of uranium by cytochrome C3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied and environmental microbiology*, 59, 3572-3576.
- Luther III, G. W., 1987: Pyrite oxidation and reduction: Molecular orbital theory considerations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51, 3139-3199.
- 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 Transaction*, 42, 6979-6988.

- Macalady, J. L., Jones, D.S., Lyon, E.H., 2007: Extremely acidic, pendulous microbial biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*, 9, 1402-1414.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J., 2001: Mikrobiologie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Magill, J., Pfennig, G., Galy, J., 2006: Karlsruher Nuklidkarte 7. Auflage. ISBN 92-79-021753.
- Mahmoud, K. K., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 2005: Detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in acid mine drainage environments using fluorescent *in-situ* hybridization (FISH). *Journal of Microbiology Methods*, 61, 33-45.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H., 1992: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and applied microbiology*, 15, 593-600.
- Marandi, R., 2012: Bioextraction of Cu (II) Ions from Acid Mine Drainage by *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Engineering*, 1, 11-17.
- Marchlewitz, B., Schwartz, W., 1961: Untersuchungen über die Mikroben-Assoziation saurer Grubengewässer. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 1, 193-202.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., and T. P. Jarvie, Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005: Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.
- Mavromatis, K., J. Sikorski, A. Lapidus, T. Glavina Del Rio, A. Copeland, H. Tice, J. F. Cheng, S. Lucas, F. Chen, M. Nolan and D. Bruce, et al., 2010: Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* type strain (104-IA). *Standards in genomic sciences*, 2, 9-18.
- McGinness, S., Johnson, D.B., 1992: Grazing of acidophilic bacteria by a flagellated protozoan. *Microbial ecology*, 23, 75-86.
- Meierhöfer, C., 2009: Phylogenetische Analyse und In-Situ Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in Uran-kontaminierten Bodenproben. *Diplomarbeit. Technische Universität Dresden*.
- Merroun, M., Selenska-Pobell, S., 2001: Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI). *BioMetals*, 14, 171-179.
- Merroun, M. L., Nedelkova, M., Ojeda, J.J., Reitz, T., Fernandez, M.L., Arias, J.M., Romero-Gonzalez, M., Selenska-Pobell, S., 2011: Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses. *Journal of Hazardous Materials*, 197, 1-10.
- Mitchell, N., Perez-Sanchez, D., Thorne, M.C., 2013: A review of the behaviour of U-238 series radionuclides in soils and plants. *Journal of Radiological Protection*, 33, R17-R48.
- Mittelman, M. W., Geesey, G.G., 1985: Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 49, 846-851.
- Moll, H., Lütke, L., Bachvarova, V., Cherkouk, A., Selenska-Pobell, S., Bernhard, G., 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.
- Moreau, J. W., Zierenberg, R.A., Banfield, J.F., 2010: Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (dsrAB) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage. *Applied and environmental microbiology*, 76, 4819-4828.
- Moreira, D., López-García, P., Vickerman, K., 2004: An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54, 1861-1875.

- Moreira D., A. R., 1997: Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for Thiomonas gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 522-528.
- Moser, D. P., T. M. Gihring, F. J. Brockman, J. K. Fredrickson, D. L. Balkwill, M. E. Dollhopf, B. S. Lollar, L. M. Pratt, E. Boice and G. Southam, et al., 2005: *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault. *Applied and environmental microbiology*, 71, 8773-8783.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M., 2001: Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147, 3121-3126.
- Mussmann, M., Richter, M., Lombardot, T., Meyerdierks, A., Kuever, J., Kube, M., Glockner, F. O., Amann, R., 2005: Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer. *Journal of bacteriology*, 187, 7126-7137.
- Muyzer, G., Stams, A.J., 2008: The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 441-454.
- Ñancucheo, I., Johnson, D.B., 2012: Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microbial Biotechnology*, 5, 34-44.
- Neef, A., 1997: Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozöosen. *Doktorarbeit. Technische Universität München*.
- Neu, T. R., 1996: Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, 60, 151-166.
- Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A.C., Harder, W.A., 1987: <sup>31</sup>P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. *Archives of Microbiology*, 147, 37-41.
- Nielsen, P. H., Jahn, A., Palmgren, R., 1997: Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology*, 36, 11-19.
- Nordin, K., 2005: 4-chlorophenol biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Stockholm: Stockholm University, Department of Biochemistry and Biophysics. May 13, 2005*.
- Nordstrom, D. K., Alpers, C.N., 1999: Geochemistry of acid mine waters. In: Plumlee, G.S. & Logsdon, M.J. (Hrsg.) *The environmental geochemistry of mineral deposits. Part A: Processes, techniques, and health issues. Society of Economic Geologists, Littleton, CO: 133-160*.
- Nordstrom, D. K., Southam, G., 1997: Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals, Reviews in Mineralogy. Mineralogical Society of America, Washington, DC., 35* (eds. J. F. Banfield and K. H. Nealson), 361-390.
- Norris P.R., C. D. A., Owen J.P., Waterhouse S., 1996: Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 142, 775-785.
- Odom, J. M., 1993: *The Sulfate- Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives. New York: Springer Verlag*.
- Offre, P., Spang, A., Schleper, C., 2013: Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67, 437-457.
- Oksanen, J., 2010: Multivariate Analysis of Ecological Communities, R: vegan tutorial. <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2011: vegan: Community Ecology Package. [R package version 1.17-7]. Ref Type: Computer Program.
- Packroff, G., 2000: Protozooplankton in acidic mining lakes with special respect to ciliates. *Hydrobiologia*, 433, 157-166.
- Pal, S., Pradhan, D., Das, T., Sukla, B.L., Chaudhury, R.G., 2010: Bioleaching of low-grade uranium ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Indian. *Journal of Microbiology*, 50, 70-75.

- Panak, P., Hard, B. C., Pietzsch, K., Kutschke, S., Roske, K., Selenska-Pobell, S., Bernhard, G., Nitsche, H., 1998: Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U(VI). *Journal of Alloys and Compounds*, 271, 262-266.
- Panak, P., Selenska-Pobell, S., Kutschke, S., Geipel, G., Bernhard, G., Nitsche, H., 1999: Complexation of U(VI) with cells of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiomonas cuprina* of different geological origin. *Radiochimica Acta*, 84, 183-190.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Hallbeck, L., Pettersson, C., 1996b: Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Molecular Ecology*, 5, 427-436.
- Pernthaler, A., J. Pernthaler and R. Amann, 2002: Fluorescence *In-Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 68, 3094-3101.
- Peter, H., Ylla, I., Gudasz, C., Romani, A.M., Sabater, S., Tranvik, L.J., 2011: Multifunctionality and diversity in bacterial biofilms. *PloS one*, 6, e23225.
- Platt, R. M., Geesey, G.G., Davis, J.D., White, D.C., 1985: Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Canadian journal of microbiology*, 31, 675-680.
- Plumb, J. J., R. Muddle and P. D. Franzmann, 2008: Effect of pH on rates of iron and sulfur oxidation by bioleaching organisms. *Minerals Engineering*, 21, 76-82.
- Porat, I., T. A. Vishnivetskaya, J. J. Mosher, C. C. Brandt, Z. K. Yang, S. C. Brooks, L. Liang, M. M. Drake, M. Podar, S. D. Brown and A. V. Palumbo, 2010: Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microbial ecology*, 60, 784-795.
- Pronk, J. T., De Bruyn, J.C., Bos, P., Kuenen, J.G., 1992: Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and environmental microbiology*, 58, 2227-2230.
- Qian, P. Y., Wang, Y., Lee, O.O., Lau, S.C., Yang, J., Lafi, F.F., Al-Suwailem, A., Wong, T.Y., 2011: Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. *ISME Journal*, 5, 507-518.
- Qu, J. H., Yuan, H.L., 2008: *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58, 2191-2194.
- R. Development, C., Team., 2010: R: A Language and Environment for Statistical Computing., R *Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Raff, J., 2002: Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien in Uranabfallhalden mit Schwermetallen. *Wissenschaftlich-Technische Berichte FZR-358, Forschungszentrum Rossendorf*.
- Raff, J., Selenska-Pobell, S., Wahl, R., Mertig, M., Pompe, W., 2000: A novel S-layer protein from a uranium mining waste pile isolate *B. sphaericus* JG-A12 and its interaction with uranium and other metals. *Bacterial-metallRadionuclide interactions: basic research and bioremediation. Abstract book*, S. 26.
- Rahman, P. K. S. M., Bastola, S., 2014: Biological reduction of iron to the elemental state from ochre deposits of Skelton Beck in Northeast England. *Frontiers in Environmental Science*, 4.
- Rawlings, D. E., 2002: Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*, 56, 65-91.
- Rehman, A., Shakoory, F. R., Shakoory, A.R., 2010: Resistance and uptake of heavy metals by *Vorticella microstoma* and its potential use in industrial wastewater treatment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 29, 481-486.
- Reitz, T., Merroun, M.L., Rossberg, A., Steudtner, R., Selenska-Pobell, S., 2011: Bioaccumulation of U(VI) by *Sulfolobus acidocaldarius* under moderate acidic conditions. *Radiochimica Acta*, 99, 543-554.
- Reysenbach, A. L., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1994: Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2113-2119.

- Richtlinie, 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch.
- Robbins, E. I., 2000: Bacteria and Archaea in acidic environments and a key to morphological identification. *Hydrobiologia*, 433, 61-89.
- Rogers, K. L. H., B.M.; McCollom, T.M., 2011: Photosynthesis within Mars' volcanic craters?: Insights from Cerro Negro Volcano, Nicaragua. *American Geophysical Union, Fall Meeting 2011, Abstract P33B-1768*.
- Roller, C., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1994: In-Situ Probing of Gram-Positive Bacteria with High Dna G+C Content Using 235-Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotides. *Microbiology-Sgm*, 140, 2849-2858.
- Roske, K., R. Sachse, C. Scheerer and I. Roske, 2012: Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saidenbach (Saxonia, Germany). *Systematic and applied microbiology*, 35, 35-44.
- Sachs, S., Brendler, V., Geipel, G., 2007: Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Radiochimica Acta*, 95, 103-110.
- Sánchez-Andrea, I., Knittel, K., Amann, R., Amils, R., Sanz, J.L., 2012: Quantification of Tinto River sediment microbial communities: importance of sulfate-reducing bacteria and their role in attenuating acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4638-4645.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.-G., Schippers, A., 1999: Direct versus indirect bioleaching. In: Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century. *Process Metallurgy 9A*, A. Ballester, R. Amils (eds.) Elsevier, Amsterdam., Seite 27-49.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G., Schippers, A., 2001: (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59, 159-175.
- Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C., 1992: Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for Leaching. *Applied and environmental microbiology*, 58, 85-92.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977: DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.
- Santegoeds, C. M., Ferdelman, T.G., Muyzer, G., de Beer, D., 1998: Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3731-3739.
- Santelli, C. M., D. H. Pfister, D. Lazarus, L. Sun, W. D. Burgos and C. M. Hansel, 2010: Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coal mine drainage in passive treatment systems by diverse fungal and bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 76, 4871-4875.
- Sanz, J. L., Rodríguez, N., Díaz, E.E., Amils, R., 2011: Methanogenesis in the sediments of Rio Tinto, an extreme acidic river. *Environmental Microbiology*, 13, 2336-2341.
- Sasaki, K., Ogino, T., Endo, Y., Kurosawa, K., 2003: Field Study on Heavy Metal Accumulation in a Natural Wetland Receiving Acid Mine Drainage. *Materials Transactions*, 44, 1877-1884.
- Schippers, A., Hallmann, R., Wentzien, S., Sand, W., 1995: Microbial diversity in uranium-mine waste heaps. *Applied and environmental microbiology*, 61, 2930-2935.
- Schippers, A., Rohwerder, T., Sand W., 1999b: Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 104-110.
- Schippers, A., Sand, W., 1999a: Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and environmental microbiology*, 65, 319-321.
- Schloss, P. D., Gevers, D., Westcott, S.L., 2011: Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS one*, 6, e27310.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn and C.

- F. Weber, 2009: Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75, 7537-7541.
- Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., Wagner, M., 2001: 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology*, 3, 450-459.
- Schmidt, B., 2008: Physiologie und Phylogenie eisenoxidierender Bakterienisolate auf schadstoffhaltigen Medien. *Diplomarbeit. Institut für Technischen Umweltschutz, Fakultät III Prozesswissenschaften, Technische Universität Berlin, Berlin.*
- Schopf, J. W., Hayes, J.M., Walter, M.R. , 1983: Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In: J.W. Schopf (ed.): *Earth's earliest biosphere*, Princeton Univ Press, New Jersey, 361-384.
- Schrenk, M. O., Edwards, K.J., Goodman, R.M., Hamers, R.J., Banfield, J.F., 1998: Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generations of acid mine drainage. *Science*, 279, 1519-1522.
- Schwab, R. G., 1987: Die natürliche Radioaktivität der Erdkruste.- In: Natürliche und künstliche Strahlung in der Umwelt. Eine Bilanz vor und nach Tschernobyl. *Erlanger Forschungen, Reihe B*, 17, 25-43, Erlangen.
- Schwartz, W. H., 1977: Conference Bacterial Leaching. Schriftenreihe der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung. Heft 4. Verlag Chemie, Weinheim: 261 Seiten.
- Schweisfurth, R., Heitz, H. (Hrsg.), 1989: Mikrobiologische Materialzerstörung und Materialschutz. *DECHEMA, Frankfurt.*
- Schwertmann, U., Bigham, J.M., Murad, E., 1995: The first occurrence of schwertmannite in a natural stream environment. *European Journal of Mineralogy*, 7, 547-552.
- Scott, J. A., Palmer, S.J., Ingham, J., 1986: Microbial Metal Adsorption Enhancement by Naturally Excreted Polysaccharide Coatings. In: Eccles, H. and Hunt, S. (Eds.) *Immobilization of Ions by Bio-sorption*. Ellis Horwood, Chichester, U.K., 81-88.
- Seifert, J., Erler, B., Seibt, K., Rohrbach, N., Arnold, J., Schlömann, M., Kassahun, S., Jenk, U., 2008: Characterization of the microbial diversity in the abandoned uranium mine Königstein. In: *Uranium, Mining and Hydrogeology*, 733-742 Edited by B. Merkel & A. Hasche-Berger. Berlin: Springer. ISBN: 978-733-540-87745-87745.
- Sen, A. M., Johnson, B., 1999: Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage. *Process Metallurgy*, 9, 709-718.
- Shakoori, A. R., Rehman, A., Haq, R.U., 2004: Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 1046-1051.
- Shannon, C. E., Weaver, W., 1949: The mathematical theory of communication. *University of Illinois Press; Urbana*, II.
- Sharma, P. K., Balkwill, D.L., Frenkel, A., Vairavamurthy, M.A., 2000: A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-I) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Applied and environmental microbiology*, 66, 3083-3087.
- Sidenko, N. V., Sherriff, B.L., 2004: Attenuation of metals by ironphases from surface and ground water of Ni-Cu mine waste. *Applied Mineralogy edited by M. Pecchio et al., pp. 503– 506, Int. Counc. For Appl. Mineral., Fed. Inst. for Geosci. and Nat. Resour., Hannover, Germany.*
- Silverman, M. P., 1967: Mechanism of bacterial pyrite oxidation. *Journal of bacteriology*, 94, 1046-1051.
- Simpson, E. H., 1949: Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Singer, P. C., Stumm, W., 1970: Acidic Mine Drainage: The Rate-Determining Step. *Science*, 167, 1121-1123.
- Sizova, M. V., Panikov, N.S., Spiridonova, E.M., Slobodova, N.V., Tourova, T.P., 2007: Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Systematic and applied microbiology*, 30, 213-220.

- Slyemi, D., Moinier, D., Brochier-Armanet, C., Bonnefoy, V., Johnson, D.B., 2011: Characteristics of a phylogenetically ambiguous, arsenic-oxidizing *Thiomonas sp.*, *Thiomonas arsenitoxydans* strain 3As<sup>T</sup> sp. nov. *Archives of Microbiology*, 193, 439-449.
- Späth, R., Flemming, H.C., Wuerz, S., 1998: Sorption properties of biofilms. *Water Science & Technology*, 37, 207-210.
- Sperl, G. T., Hoare, D.S., 1971: Denitrification with Methanol: a Selective Enrichment for Hyphomicrobium Species. *Journal of bacteriology*, 108, 733-736.
- Sreekrishnan, T. R., Tyagi, R.D., Blais, J.F., Campbell, P.G.C., 1993: Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge - I: Effects of process parameters. *Water Research*, 27, 1641-1651.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., 2002: Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Journal of Chemosphere*, 48, 427-435.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997b: Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Microbiology*, 47, 479-491.
- Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F.A., Burghardt, J., Päuker, O., Hippe, H., 1997a: Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1134-1139.
- Stahl, D. A., Amann, R.I., 1991: Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In E.Stackebrandt and M.Goodfellow (Ed) *Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics* (pp. 205-248). Chichester, England: John Wiley and Sons.
- Stanier, R. Y., 1986: The microbial world. *The Microbial world*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall. ISBN 0-13-581042-6.
- Stoodley, P., deBeer, D., Lewandowski, Z., 1994: Liquid flow in biofilm systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2711-2716.
- Streble, H., Krauter, D., 2006: Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers. 10. Auflage. Ein Bestimmungsbuch, Franckh-Kosmos-Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart 2006, ISBN 3-440-10807-4.
- Sutherland, I. W., 2001: The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiology*, 9, 222-227.
- Suzuki, M. T., Giovannoni, S.J., 1996: Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.
- Suzuki, Y., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Banfield, J.F., 2002: Nanometre-size products of uranium bioreduction. *Nature*, 419, 134.
- Tabatabaei, M., Rahim, R.A., Wright, A.-D.G., Shirai, Y., Abdullah, N., Sulaiman, A., Sakai, K., Hassan, M.A., 2010: Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process Biochemistry*, 45, 1214-1225.
- Tanabe, Y., Watanabe, M.M., Sugiyama, J., 2005: Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 267-276.
- Tebo, B. M., Obratzsova, A.Y., 1998: Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, 162, 193-198.
- Temple, K. L., Colmer, A.R., 1951: The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of bacteriology*, 62, 605-611.
- Terashima, M., Nagao, S., Iwatsuki, T., Fujitake, N., Seida, Y., Iijima, K., Yoshikawa, H., 2012: Europium-binding abilities of dissolved humic substances isolated from deep groundwater in Horonobe area, Hokkaido, Japan. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 49, 804-815.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M., 2006: Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 2, 68-81.

- Texier, A.-C., Andrès, Y., Illemassene, M., Le Cloirec, P., 2000: Characterization of Lanthanide Ions Binding Sites in the Cell Wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*, 34, 610-615.
- Tonndorf, H., 1999: Die Uranlagerstätte Königstein: Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie. *Bergbau in Sachsen Band 7 (1. Auflage)*, 208 Seiten.
- Toyosi, I. R., Ngamarju, G.U., 2011: Rotifer fauna in Lake Alau, Arid Zone of Nigeria in West African. *Nature & Science*, 9, 261.
- Tripathi, V. S., 1979: Uranium solution mineral equilibria at low-temperatures with applications to sedimentary ore-deposits - comment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43, 1989-1990.
- Trotsenko, Y. A., Ivanova, E.G., Doronina, N.V., 2001: Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Mikrobiologiya*, 70, 725-736 (in Russian).
- Tuhela, L., Smith, S.A., Tuovinen, O.H., 1993: Microbiological Analysis of Iron-Related Biofouling in Water Wells and a Flow-Cell Apparatus for Field and Laboratory Investigations. *Ground Water*, 31, 982-988.
- Uhlmann, D., Horn, W., 2001: Hydrobiologie der Binnengewässer. *Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag*.
- Underhill, D., 1998: In situ leach uranium mining - current practice, potential and environmental aspects. *ABARE Outlook 98 Conference, Canberra*.
- Van Aken, B., Peres, C.M., Doty, S.L., Yoon, J.M., Schnoor, J.L., 2004: *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54, 1191-1196.
- Van Ingen, J., J. A. Lindeboom, N. G. Hartwig, R. de Zwaan, E. Tortoli, P. N. Dekhuijzen, M. J. Boeree and D. van Soolingen, 2009: *Mycobacterium mantenii* sp. nov., a pathogenic, slowly growing, scotochromogenic species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 2782-2787.
- Veeh, H. H., 1967: Deposition of uranium from the ocean. *Earth and Planetary Science Letters*, 3, 145-150.
- Vile, M. A., Wieder, R.K., 1993: Alkalinity generation by Fe(III) reduction versus sulfate reduction in wetlands constructed for acid mine drainage treatment. *Water Air Soil Pollution*, 69, 425-441.
- Volant, A., Desoeuvre, A., Casiot, C., Lauga, B., Delpoux, S., Morin, G., Personné, J.C., Héry, M., Elbaz-Poulichet, F., Bertin, P.N., Bruneel, O., 2012: Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoulès Mine, France. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 16, 645-657.
- Vuorinen, A., Hiltunen, P., Tuovinen, O.H., 1985: Speciation of ferrous and ferric iron associated with the indirect bacterial leaching of uranium ore materials. *Journal of Fermentation Technology*, 63, 337-342.
- Wakao, N., Takahashi, T., Sakurai, Y. & Shiota, H., 1979: A treatment of acid mine water using sulfate reducing bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, 5, 445-452.
- Waksman, S. A., Joffe, J.S., 1922: Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. *Journal of bacteriology*, 7, 239-256.
- Wall, J. D., Krumholz, L.R., 2006: Uranium Reduction. *Annual Review of Microbiology*, 60, 149-166.
- Wallace, R. L., Walsh, E.J., Arroyo, M.L., Starkweather, P.L., 2005: Life on the edge: rotifers from springs and ephemeral waters in the Chihuahuan Desert, Big Bend National Park (Texas, USA). *Developments in Hydrobiology*, 181, 147-157.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993: Optimizing Fluorescent Insitu Hybridization with Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Cytometry*, 14, 136-143.
- Wang, H., Hu, C., Hu, X., Yang, M., Qu, J., 2011: Effects of disinfectant and biofilm on the corrosion of cast iron pipes in a reclaimed water distribution system. *Water Research*, 46, 1070-1078.
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2006: Occurrence of Arsenic Contamination in Canada: Sources, Behavior and Distribution. *Science of The Total Environment*, 366, 701-721.

- Waychunas, G., Xu, N., Davis, J.A., Fuller, C.C. and Bigham, J., 1995: EXAFS study of AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Substituted Schwertmannites. *Physica B*, 208-209, 481-483.
- Weber, K. A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006: Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 752-764.
- Weissbrodt, D. G., T. R. Neu, U. Kuhlicke, Y. Rappaz and C. Holliger, 2013: Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Frontiers in microbiology*, 4.
- Widdel, F., 1989: Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder, A.J.B. (Hrsg.) *Biology of anaerobic microorganisms*, Wiley, New York: 469-585.
- Widdel, F., Hansen, T.A., 1992: The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In A. Balows, H. G. Trijper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, N.Y., 583-624.
- Williams, M., 2001: Arsenic in Mine Waters: An International Study. *Environmental Geology*, 40, 12.
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 1999a: Autoaggregation in flocs and biofilms. In: Winter, J. (Ed.): *Biotechnology*, 8, 63-86.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., 1999b: What are bacterial extracellular polymeric substances? p. 1–20. In J. Wingender, T. R. Neu, and H.-C. Flemming (ed.), *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function*. Springer, Berlin, Germany.
- Yang, Y., Shi, W., Wan, M., Zhang, Y., Zou, L., Huang, J., Qiu, G., Liu, X., 2008: Diversity of bacterial communities in acid mine drainage from the Shen-bu copper mine, Gansu province, China. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11.
- Yelton, A. P., Comolli, L.R., Justice, N.B., Castelle, C., Deneff, V.J., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2013: Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC genomics*, 14, 485.
- Zhang, T., M.-F. Shao and L. Ye, 2012: 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal*, 6, 1137-1147.
- Zhang, X., Cornelis, R., De Kimpe, J., Mees, L., Vanderbiesen, V., De Cubber, A., Vanholder, R., 1996: Speciation of arsenic in serum, urine and dialysate of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clinical Chemistry*, 43, 406-408.
- Zhang, Y. F., Yang, Y., Liu, J.S., Qiu, G.Z., 2007: Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Acidiphilium-Like Bacteria from Acid Mine Drainage. In: *Advanced Materials Research 20-21*, 473-476.
- Ziegler, S., Ackermann, S., Majzlan, J., Gescher, J., 2009: Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environmental Microbiology*, 11, 2329-2338.
- Zinder, S. H., 1993: Physiological ecology of methanogens. In: *Methanogens: Ecology, Physiology, Biochemistry, and Genetics*. Ferry, J.G. (ed.). New York: Chapman & Hall, pp. 129–206.
- Zippel, B. and T. R. Neu, 2011: Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 505-516.
- Zirnstien, I., 2010: Bestimmung der mikrobiellen Diversität von Biofilmen mit Schwerpunkt des Nachweises von Eukaryonten Mikroorganismen in Uran kontaminierten Milieus. *Diplomarbeit. Technische Universität Dresden*.
- Zirnstien, I., Arnold, T., Krawczyk-Bärsch, E., Jenk, U., Bernhard, G., Röske, I., 2012: Eukaryotic life in biofilms formed in a uranium mine. *MicrobiologyOpen*, 1, 83-94.
- Zverlov, V., Klein, M., Lucker, S., Friedrich, M. W., Kellermann, J., Stahl, D. A., Loy, A., Wagner, M., 2005: Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *Journal of bacteriology*, 187, 2203-2208.

## Verwendete Internetseiten

- [1] [www.wismut.de](http://www.wismut.de)
- [2] <http://www.umweltbundesamt.de/dokument/uran-im-trinkwasser-stellungnahme-twk-zu-sechs>
- [3] Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman
- [4] Bergmann-Abwassertechnik: <http://www.bergmann-gruppe.de/Start/Bergmann-Gruppe/Geschaeftsbereiche/Bergmann-Abwassertechnik/Abwasser-Einleitung.html>
- [5] [http://www.epa.gov/microbes/MPN\\_User\\_Manual\\_vs3.pdf](http://www.epa.gov/microbes/MPN_User_Manual_vs3.pdf)
- [6] <http://www.eurofinsgenomics.eu/de/next-generation-sequencing>
- [7] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [8] [http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)
- [9] <http://rdp.cme.msu.edu>
- [10] <http://rdp.cme.msu.edu/probematch>
- [11] <http://www.arb-silva.de/search/testprobe>
- [12] <http://www.dsmz.de>
- [13] <http://www.gatc-biotech.com/de/index.html>



## VIII. Anhang

### A 1. Verwendete Lösungen und Puffer

#### A 1.1. TE-Puffer

Zur Herstellung des TE-Puffers werden 10 ml einer 1 M Tris-Cl (pH 7,5) und 2 ml 500 mM EDTA (pH 8,0) gemischt und auf einen Liter mit sterilem Wasser aufgefüllt.

**Tabelle A 1: Zusammensetzung des TE-Puffers.**

Volumen	Komponente	Endkonzentration
10 ml	1 M Tris, pH 7,5	10 mM Tris, pH 7,5
2 ml	500 mM EDTA, pH 8,0	1 mM EDTA, pH 8,0

#### 1M TRIS (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan)

Für eine 1M TRIS-Lösung werden 121,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in einem Liter MilliQ Wasser gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

#### 0.5 M EDTA (Diaminoethane tetraacetic acid)

Für eine 0,5 M EDTA-Lösung werden 372,2 g Diaminoethane tetraacetic acid in einem Liter MilliQ Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

#### **A 1.2. TAE (Tris-Acetat-EDTA)- Puffer als Lauf- und Gelpuffer der Agarosegelelektrophorese**

Die Substanzen Tris-HCl und EDTA werden eingewogen und mit deion. Wasser auf 500 ml aufgefüllt, mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt und mit deion. Wasser bis auf 1000 ml aufgefüllt. Zum Gebrauch 1 Teil Puffer mit 49 Teilen deion. Wasser verdünnen (ergibt 1 x TAE).

**Tabelle A 2: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers.**

Komponente	Konzentration
Tris-HCL	242 g/l
EDTA	37,2 g/l
Eisessig	ca. 57,1 ml/l
pH-Wert	8,0

#### **A 1.3. TAE Agarosegel**

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels zur Überprüfung der korrekten Größe des Amplifikats werden 1,5 g Agarose (Pulver) in 100 ml 1xTAE Puffer unter Erwärmung gelöst. Nach Vollständigem

Lösen der Agarose und 5 minütigem Abkühlen der warmen Agarose wird diese in dafür vorbereitete Gelsysteme (Peqlab, PerfectBlue Gelsystem Mini L) mit entsprechendem Kamm zur Ausbildung von Kammern gegossen und 15 min bei RT ausgehärtet.

## A 2. Verwendete Nährmedien

### A 2.1. Aerobe Mikroorganismen

#### A 2.1.1. Einschichtige Festmedien

Bei der Herstellung eines Festmediums wurden alle Komponenten (Tabelle A5) als höher konzentrierte Stammlösungen (SL) hergestellt und einzeln autoklaviert oder steril filtriert. Anschließend wurden diese auf ca. 50 °C temperiert und zusammengefügt. Jeweils ca. 20 ml davon wurden in sterile Petrischalen verteilt.

**Tabelle A 3: Zusammensetzung der Spurenelemente-SL (2000 fach).**

Komponente	Konzentration
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,00 g/l
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,00 g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,00 g/l
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00 g/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,76 g/l
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,51 g/l
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
NaVO <sub>3</sub>	0,10 g/l
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,10 g/l

**Tabelle A 4: Zusammensetzung der Tryptic Soya-Boullion (30 g/l).**

Komponente	Konzentration
Bacto Trypton	17,0 g/l
Bacto Soyton	3,0 g/l
Glucose	2,5 g/l
NaCl	5,0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g/l

Die Basalsalze wurden als 1,4-fache Stammlösung (SL) mit der Tryptic Soya Bouillon (FeTSB, FeTSB-Thio) oder ohne (Fe, Fe-komplex, Fe-Thio) hergestellt. Der pH-Wert wurde auf  $2,5 \pm 0,1$  eingestellt und die Lösung autoklaviert. Die Zusammensetzung der Tryptic Soya Bouillon (TSB) ist in Tabelle A4 angegeben. Sie wurde als SL (30 g/l) steril filtriert. Die Spurenelemente-SL (2000-fach) wurde auf  $\text{pH} = 2 \pm 0,1$  eingestellt. Die Bestandteile wurden nach (Johnson, 1991) abgewandelt (Tabelle A3). Die Eisen(II)-Sulfat-SL (183 g/l = 0,6 M) wurde auf  $\text{pH} = 2,5 \pm 0,1$  eingestellt, und entweder sofort verwendet oder unter Sauerstoffausschluss gelagert, um eine vorzeitige Oxidation der Eisen(II)-Ionen mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Die Agarose wurde vor der Verwendung gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen, die das Wachstum acidophiler Bakterien behindern können (Johnson,

1995). Dabei wurden je 7 g Agarose in 400 ml Aqua dest. 30 min auf dem Schüttler geschwenkt. Nach 15 min Ruhe setzte sich die Agarose ab. Das Wasser wurde abgossen und erneut 400 ml frisches Aqua bidest. zugegeben. Diese Prozedur wurde 4mal wiederholt. Als 3,1 %ige SL (Fe-Thio, FeTSB-Thio) bzw. 2,8 %ige SL (Fe, Fe-komplex, FeTSB) wurde die Agarose autoklaviert. Bei der Herstellung aller Medien wurde 2-fach destilliertes Wasser verwendet.

**Tabelle A 5: Zusammensetzung der einschichtigen Festmedien (Johnson, 1987).**

*Alle Komponenten wurden als höher konzentrierte SL hergestellt und einzeln autoklaviert bzw. steril filtriert. Die angegebenen Werte stellen die Endkonzentration im Medium dar.*

*<sup>1</sup>: a = autotroph; hm = heterotroph/mixotroph, EO = Eisen-oxidierende Mikroorganismen; ESO = Eisen- und/oder Schwefel-oxidierende Mikroorganismen*

	Fe	Fe-komplex	Fe-Thio	FeTSB	FeTSB-Thio
Basalsalze:					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50 g/l	0,50 g/l	0,50 g/l	0,50 g/l	0,50 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10 H <sub>2</sub> O	-	0,15 g/l	-	-	-
KCl	-	0,05 g/l	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,05 g/l	-	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		0,014 g/l			
TSB	-	-	-	0,25 g/l	0,25 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9,17 g/l (33mM)	9,17 g/l (33 mM)	9,17 g/l (33 mM)	9,17 g/l (33 mM)	9,17 g/l (33 mM)
K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	-	0,76 g/l (2,5 mM)	-	0,76 g/l (2,5 mM)
Spurenelemente-SL	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Agarose	7,00 g/l	7,00 g/l	7,00 g/l	7,00 g/l	7,00 g/l
pH Endwert	= 2,7 ± 0,1	= 2,7 ± 0,1	= 2,7 ± 0,1	= 2,7 ± 0,1	= 2,7 ± 0,1
Zielorganismen <sup>1</sup>	a EO	a EO	a ESO	hm EO	hm ESO

Zur Kultivierung von Mikroorganismen, die reduzierte Schwefelverbindungen verstoffwechseln, wurde das SO-Medium verwendet, welches von dem Medium Nr. 71 der Datenbank des DSMZ [12] abgewandelt wurde. Die Zusammensetzung ist in Tabelle A6 zu finden. Methylorange diente als Farbindikator zum Nachweis der pH-Änderung in den sauren Bereich.

**Tabelle A 6: Zusammensetzung des SO-Mediums.**

Komponente	Konzentration
Basalsalze:	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5 g/l
Methylorange	0,008 g/l

*A 2.1.2. Zweischichtige Festmedien*

Alle Bestandteile wurden als höher konzentrierte Lösungen hergestellt, einzeln steril filtriert (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-SL, K<sub>2</sub>F<sub>12</sub>O<sub>6</sub>-SL, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SL, Spurenelemente-SL) oder autoklaviert (Basalsalz-SL, Agarose-SL) und anschließend vereinigt.

**Tabelle A 7: Zusammensetzung der zweischichtigen Festmedien zur Kultivierung von Eisen- und Schwefeloxidierern.** *Alle Werte geben die Endkonzentrationen an. Die Bestandteile wurden als höher konzentrierte SL hergestellt, einzeln steril filtriert bzw. autoklaviert und vereinigt.*

Komponente	Feo	Feso	Feto
Basalsalze:			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,25 g/l	1,25 g/l	1,25 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50 g/l	0,50 g/l	0,50 g/l
TSB	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9,17 g/l (33 mM)	9,17 g/l (33 mM)	1,39 g/l (5 mM)
K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-	0,76 g/l (2,5 mM)	-
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	-	0,79 g/l (5 mM)
Spurenelemente-SL	0,10%	0,10%	0,10%
Agarose	7,00 g/l	7,00 g/l	7,00 g/l
pH Endwert	= 2,7 ± 0,1	= 2,7 ± 0,1	= 3,9 ± 0,1

Für die Unterschichten wurden jeweils 200 ml Medium mit 5 ml einer aktiven, drei Tage alten *Acidiphilium cryptum*-Vorkultur angeimpft. Zur Stammhaltung des *A. cryptum* SJH diente das Festmedium GAYE, dessen Zusammensetzung in Tabelle A8 dargestellt ist. Im Unterschied zum Originalmedium GAYE (Johnson & Bridge, 2002) wurde hier Galaktose statt Glycerol als C-Quelle

verwendet. Die Kultur des *A. cryptum* SJH wurde von der Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie der Technischen Universität Bergakademie Freiberg zur Verfügung gestellt.

**Tabelle A 8: Zusammensetzung des GAYE-Mediums.**

Komponente	Konzentration
Basalsalze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,25 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
Galaktose	1,8 g/l
Spurenelemente-SL	0,05%
Hefeextrakt	0,2 g/l
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	12,25 g/l (25 mM)
Agarose	5 g/l
pH	= 2,7 ± 0,1

### **A 2.2. Anaerobe Mikroorganismen**

Für die Kultivierung von anaeroben Sulfatreduzierern wurde das flüssige Nährmedium aSRB verwendet. Das aSRB-Medium wurde nach Sen A. M. und Johnson D.B. (Sen, 1999) hergestellt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle A9 zu finden.

**Tabelle A 9: Zusammensetzung des Nährmediums aSRB für die Anzucht von Sulfatreduzierern.**

Komponente	Konzentration
Basalsalze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,45 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 g/l
KCl	0,05 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,014 g/l
Hefeextrakt	0,2 g/l
C-Quelle	Glycerol: 10 mM
Sulfatquelle	FeSO <sub>4</sub> : 10 mM
pH	= 4,0 ± 0,1
Anoxische Bedingungen	O <sub>2</sub> Verbrauch durch aerobe Mikroorganismen in der Probe

Anoxische Bedingungen wurden durch den Sauerstoffverbrauch autochthoner, aerober Mikroorganismen im Inokulum generiert. Anschließend wurden die flüssigen Ansätze jeweils in 20 ml-Reaktionsgefäße (Klarglas, DIN-Rollrand, flacher Boden, langer Hals, 20 ml) abgefüllt, gasdicht verschlossen (20 mm Butylhohlstopfen und 20 mm-Alu-Boerdelkappe) und für mindestens 16 Wochen bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

### A 3. Anhang zur Charakterisierung der bakteriellen Biozönose

**Tabelle A 10: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Grubenwasserproben Königstein. Dargestellt sind Phylotyp und Gattung mit Anzahl analysierter Sequenzen und Anteil an der bakteriellen Biozönose in Prozent.**

Bakterien	Phylotyp	Genus	Wasser				W13 RNA		gesamt	gesamt %		
			W11	W11 %	W12	W12 %	W13	W13 %	Wasser	Wasser		
Acidobacteria	unklassifiziert		3	4,92%	13	8,28%	43	5,91%	20	0,14%	59	6,37%
Acidobacteria	Geothrix		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	0	0,00%	1	0,05%
Actinobacteria	unklassifiziert		1	1,64%	6	3,82%	42	5,78%	26	0,18%	49	3,75%
Actinobacteria	Mycobacterium		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Bacteroidetes	unklassifiziert		0	0,00%	1	0,64%	0	0,00%	1	0,01%	1	0,21%
Bacteroidetes	Terrimonas		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Chlorobi	Ignavibacterium		1	1,64%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,55%
Chloroflexi	Thermosporothrix		0	0,00%	0	0,00%	6	0,83%	0	0,00%	6	0,28%
Chloroflexi	Sphaerobacter		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	unklassifiziert		16	26,23%	4	2,55%	151	20,77%	20	0,14%	171	16,52%
Firmicutes	Alicyclobacillus		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	0	0,00%	1	0,05%
Firmicutes	Desulfosporosinus		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	1	0,01%	1	0,05%
Firmicutes	Desulfitobacterium		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	Clostridium		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	0	0,00%	1	0,05%
Firmicutes	Ethanoligenens		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	Thermodesulfobium		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	Turicibacter		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	Sulfobacillus		0	0,00%	0	0,00%	17	2,34%	0	0,00%	17	0,78%
Gemmatimonadetes	Gemmatimonas		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Nitospira	unklassifiziert		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Nitospira	Leptospirillum		1	1,64%	47	29,94%	235	32,32%	827	5,83%	283	21,30%
OD1	unklassifiziert		0	0,00%	2	1,27%	2	0,28%	0	0,00%	4	0,52%
Planctomycetes	Singulisphaera		0	0,00%	2	1,27%	0	0,00%	0	0,00%	2	0,42%
Proteobacteria	unklassifiziert		0	0,00%	4	2,55%	28	3,85%	13	0,09%	32	2,13%
Alpha	unklassifiziert		27	44,26%	52	33,12%	52	7,15%	202	1,42%	131	28,18%
Alpha	Acidocella		8	13,11%	25	15,92%	34	4,68%	43	0,30%	67	11,24%
Alpha	Azospirillum		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	4	0,03%	1	0,05%
Alpha	Methylobacterium		0	0,00%	0	0,00%	7	0,96%	0	0,00%	7	0,32%
Alpha	Sphingomonas		0	0,00%	0	0,00%	5	0,69%	0	0,00%	5	0,23%
Alpha	Telmatospirillum		0	0,00%	0	0,00%	2	0,28%	0	0,00%	2	0,09%
Alpha	Hyphomicrobium		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Alpha	Methylocystis		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Alpha	Rhodoblastus		2	3,28%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	1,09%
Beta	unklassifiziert		30	49,18%	99	63,06%	685	94,22%	6006	42,32%	814	68,82%
Beta	Thiomonas		3	4,92%	3	1,91%	47	6,46%	79	0,56%	53	4,43%
Gamma	unklassifiziert		1	1,64%	42	26,75%	538	74,00%	75	0,53%	581	34,13%
Gamma	Acidithiobacillus		27	44,26%	36	22,93%	2208	303,71%	341	2,40%	2271	123,64%
Gamma	Rhodanobacter		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gamma	Legionella		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	0,01%	0	0,00%
Delta	unklassifiziert		2	3,28%	0	0,00%	19	2,61%	27	0,19%	21	1,96%
Delta	Desulfatirhabdium		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	0	0,00%	1	0,05%
Delta	Desulfurella		0	0,00%	0	0,00%	1	0,14%	0	0,00%	1	0,05%
Delta	Desulfovibrio		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,01%	0	0,00%
Delta	Geobacter		0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	0,01%	0	0,00%
TM7	unklassifiziert		7	11,48%	11	7,01%	224	30,81%	3	0,02%	242	16,43%
Verrucomicrobia	Prostheco bacter		0	0,00%	0	0,00%	2	0,28%	0	0,00%	2	0,09%
Bakterien	unklassifiziert		61	100,00%	157	100,00%	727	100,00%	377	2,66%	945	100,00%
gesamt			190	311,48%	504	321,02%	5081	698,90%	8070	56,87%	5775	443,80%

**Tabelle A 11: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Biofilmproben Königstein. Dargestellt sind Phylotyp und Gattung mit Anzahl analysierter Sequenzen und Anteil an der bakteriellen Biozönose in Prozent.**

Bakterien		R12	R12 %	F11	F11 %	F12	F12 %	F13	F13 %	gesamt	gesamt %
		Biofilm								Biofilm	Biofilm
Phylotyp	Genus										
Acidobacteria	unklassifiziert	4	0,42%	24	4,22%	11	2,09%	269	143,09%	308	37,45%
Acidobacteria	Geothrix	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	519	276,06%	519	69,02%
Actinobacteria	unklassifiziert	10	1,05%	9	1,58%	6	1,14%	677	360,11%	702	90,97%
Actinobacteria	Mycobacterium	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,03%
Bacteroidetes	unklassifiziert	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	6	3,19%	7	0,82%
Bacteroidetes	Terrimonas	2	0,21%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	0,05%
Chlorobi	Ignavibacterium	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	36	19,15%	36	4,79%
Chloroflexi	Thermosporothrix	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	44	23,40%	44	5,85%
Chloroflexi	Sphaerobacter	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,03%
Firmicutes	unklassifiziert	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	64	34,04%	64	8,51%
Firmicutes	Alicyclobacillus	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Firmicutes	Desulfosporosinus	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	93	49,47%	93	12,37%
Firmicutes	Desulfitobacterium	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	21	11,17%	21	2,79%
Firmicutes	Clostridium	18	1,89%	0	0,00%	0	0,00%	151	80,32%	169	20,55%
Firmicutes	Ethanoligenens	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	4	2,13%	4	0,53%
Firmicutes	Thermodesulfobium	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,53%	1	0,13%
Firmicutes	Turicibacter	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,03%
Firmicutes	Sulfobacillus	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Gemmatimonadetes	Gemmatimonas	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,03%
Nitrospira	unklassifiziert	7	0,73%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	7	0,18%
Nitrospira	Leptospirillum	2	0,21%	0	0,00%	15	2,85%	169	89,89%	186	23,24%
OD1	unklassifiziert	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,53%	1	0,13%
Planctomycetes	Singulisphaera	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Proteobacteria	unklassifiziert	4	0,42%	7	1,23%	4	0,76%	43	22,87%	58	6,32%
Alpha	unklassifiziert	20	2,10%	152	26,71%	30	5,70%	774	411,70%	976	111,55%
Alpha	Acidocella	13	1,36%	4	0,70%	35	6,65%	124	65,96%	176	18,67%
Alpha	Azospirillum	0	0,00%	2	0,35%	0	0,00%	0	0,00%	2	0,09%
Alpha	Methylobacterium	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Alpha	Sphingomonas	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Alpha	Telmatospirillum	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,53%	1	0,13%
Alpha	Hyphomicrobium	3	0,31%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	3	0,08%
Alpha	Methylocystis	0	0,00%	0	0,00%	2	0,38%	300	159,57%	302	39,99%
Alpha	Rhodoblastus	0	0,00%	25	4,39%	0	0,00%	0	0,00%	25	1,10%
Beta	unklassifiziert	79	8,29%	13	2,28%	66	12,55%	219	116,49%	377	34,90%
Beta	Thiomonas	0	0,00%	1	0,18%	2	0,38%	53	28,19%	56	7,19%
Gamma	unklassifiziert	208	21,83%	14	2,46%	31	5,89%	2859	1520,74%	3112	387,73%
Gamma	Acidithiobacillus	3	0,31%	1	0,18%	19	3,61%	1384	736,17%	1407	185,07%
Gamma	Rhodanobacter	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,03%
Gamma	Legionella	0	0,00%	0	0,00%	1	0,19%	1	0,53%	2	0,18%
Delta	unklassifiziert	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	4	2,13%	4	0,53%
Delta	Desulfatirhabdium	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Delta	Desulfurella	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Delta	Desulfovibrio	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Delta	Geobacter	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,53%	1	0,13%
TM7	unklassifiziert	4	0,42%	3	0,53%	26	4,94%	148	78,72%	181	21,15%
Verrucomicrobia	Prostheco bacter	1	0,10%	0	0,00%	0	0,00%	139	73,94%	140	18,51%
Bakterien	unklassifiziert	569	59,71%	526	92,44%	188	35,74%	3916	2082,98%	5199	567,72%
gesamt		953	100,00%	781	137,26%	436	82,89%	12021	6394,15%	14191	1678,57%

**Tabelle A 12: Detaillierte Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose der Biofilmprobe des Reaktors Königstein und der Kleinkläranlage im Vergleich. Dargestellt sind Phylotyp und Gattung mit Anzahl analysierter Sequenzen und Anteil an der bakteriellen Biozönose in Prozent.**

		K12	K12%	R12	R12 %
<b>Bakterien</b>		Kläranlage		Reaktor Königstein	
<b>Phylotyp</b>	<b>Genus</b>				
Acidobacteria	unklassifiziert	10	2,21%	4	0,88%
Acidobacteria	Geothrix	1	0,22%	0	0,00%
Acidobacteria	Holophaga	1	0,22%	0	0,00%
Actinobacteria	unklassifiziert	1	0,22%	10	2,21%
Actinobacteria	Mycobacterium	0	0,00%	1	0,22%
Bacteroidetes	unklassifiziert	58	12,80%	1	0,22%
Bacteroidetes	Terrimonas	1	0,22%	2	0,44%
Bacteroidetes	Bacteroides	1	0,22%	0	0,00%
Bacteroidetes	Paludibacter	2	0,44%	0	0,00%
Bacteroidetes	Chryseobacterium	2	0,44%	0	0,00%
Bacteroidetes	Ferruginibacter	7	1,55%	0	0,00%
Chloroflexi	Sphaerobacter	0	0,00%	1	0,22%
Firmicutes	unklassifiziert	3	0,66%	0	0,00%
Firmicutes	Clostridium	3	0,66%	18	3,97%
Firmicutes	Turicibacter	0	0,00%	1	0,22%
Firmicutes	Veillonellaceae	2	0,44%	0	0,00%
Gemmatimonadetes	Gemmatimonas	3	0,66%	1	0,22%
Nitrospira	unklassifiziert	29	6,40%	7	1,55%
Nitrospira	Leptospirillum	0	0,00%	2	0,44%
Planctomycetes	Singulisphaera	1	0,22%	0	0,00%
Proteobacteria	unklassifiziert	23	5,08%	4	0,88%
Alpha	unklassifiziert	39	8,61%	20	4,42%
Alpha	Acidocella	0	0,00%	13	2,87%
Alpha	Methylocystis	1	0,22%	0	0,00%
Alpha	Novosphingobium	1	0,22%	0	0,00%
Alpha	Sphingobium	1	0,22%	0	0,00%
Alpha	Hyphomicrobium	0	0,00%	3	0,66%
Beta	unklassifiziert	16	3,53%	79	17,44%
Beta	Thiomonas	2	0,44%	0	0,00%
Beta	Nitrosospira	3	0,66%	0	0,00%
Gamma	unklassifiziert	23	5,08%	208	45,92%
Gamma	Acidithiobacillus	0	0,00%	3	0,66%
Gamma	Rhodanobacter	5	1,10%	1	0,22%
Gamma	Arenimonas	1	0,22%	0	0,00%
Gamma	Pseudomonas	2	0,44%	0	0,00%
Gamma	Rhizobacter	1	0,22%	0	0,00%
Gamma	Thermomonas	12	2,65%	0	0,00%
Delta	Desulfobulbus	1	0,22%	0	0,00%
Epsilon	unklassifiziert	1	0,22%	0	0,00%
Epsilon	Sulfospirillum	1	0,22%	0	0,00%
Synergistetes	unklassifiziert	1	0,22%	0	0,00%
TM7	unklassifiziert	25	5,52%	4	0,88%
Verrucomicrobia	unklassifiziert	81	17,88%	0	0,00%
Verrucomicrobia	Prostheco bacter	0	0,00%	1	0,22%
Verrucomicrobia	Opitutus	1	0,22%	0	0,00%
unklassifizierte Bakterien		87	19,21%	569	125,61%
		<b>453</b>	<b>100,00%</b>	<b>953</b>	<b>210,38%</b>

## A 4. Charakterisierung der Bakterien mit klassisch mikrobiologischen Verfahren

**Tabelle A 13: Charakterisierung und Identifizierung kultivierter Prokaryoten.**

Isolat Nr.	Name	zugeordnetes Phylum	Koloniemorphologie	Accession Nr.
IZ 2, 6, 11	<i>Arthrobacter scleromae strain OS260</i>	Actinobacteria	dunkelgelb bis milchig beige, glänzend, schleimig, flach bis konvex	gb KF424312.1
IZ 10	<i>Arthrobacter scleromae strain OB149</i>	Actinobacteria	ocker/orange, matt, flach, schleimig	gb KF424307.1
IZ 7	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	Actinobacteria	braun/ocker, flach, fest, matt	S003745214
IZ 4	<i>Streptomyces sp. JJC-3</i>	Actinobacteria	hellbraun/ocker, runzelig-myzelartig, fest, flach, matt	gb GU132477.1
IZ 23	<i>Thiomonas sp. B1</i>	Beta-Proteobacteria	gelb/beige/grau, schleimig, glänzend, erhaben, rund, glatt	S000142328
IZ 14, 16, 17, SK 119	<i>Thiomonas intermedia K12</i>	Beta-Proteobacteria	rot/orange/rosa, glänzend, flach/erhaben, weich/schleimig,	ref NR_074593.1
SK 1	<i>Thiomonas sp. RCASK1</i>	Beta-Proteobacteria	schwarz mit orange-farbenen Hof, matt, flach, fest	S000539890
SK 3	<i>Thiomonas arsenivorans strain b6</i>	Beta-Proteobacteria	durchscheinend weiß, glänzend, konvex, cremig	gb AF460990.1
SK W6	<i>Thiomonas arsenivorans strain b6</i>	Beta-Proteobacteria	hellbraun, glänzend, konvex, cremig	gb AY950676.1
SK 21, 22, 55, 58, W4	<i>Thiomonas sp. nju-AMDS3</i>	Beta-Proteobacteria	rosé bis creme-weiß, leicht glänzend, konvex, cremig	gb FJ915155.1
Sk 42, 57	<i>Uncultured Thiomonas sp. clone S-K6-C18</i>	Beta-Proteobacteria	creme/weiß bis beige, glänzend, konvex, cremig	gb EF612428.1
IZ 25	<i>Sediminibacterium sp. nju-T3</i>	Bacteroidetes	rosa/orange, glänzend, schleimig, erhaben, unregelmäßiger Rand	gb FJ915158.1
IZ 29	<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	orange, konvex, rund, glatt	S002959146
IZ 32	<i>Bacillus licheniformis strain AK01</i>	Firmicutes	hellgrau, erhaben, unregelmäßig, rund, schleimig	gb JX286651.1
IZ 41	<i>Bacillus amyloliquefaciens XH7</i>	Firmicutes	Dunkelgelbe unrunde erhabene schleimige Kolonie	gb CP002927.1
IZ 33	<i>Paenibacillus sp. SCH-2</i>	Firmicutes	grau/braune, flach schleimig, rund	gb KC878877.1
IZ 42	<i>Mycobacterium mantenii</i>	Actinobacteria	gelb, rund, erhaben, glänzend, glatt, schleimig	S001170511
IZ 37, 47	<i>Mycobacterium sp. GR-4208</i>	Actinobacteria	gelb bis beige, flach/erhaben, rund, glatt, glänzend, schleimig	gb GU084181.1
IZ 45	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Alpha-Proteobacteria	rosa, flach, rund, glatt, schleimig	S000501591
IZ 48	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	Alpha-Proteobacteria	rot, rund, groß, runzelig, flach	dbj AB698698.1
SK 41	<i>Uncultured Sulfobacillus sp. clone K4-C07</i>	Firmicutes	weiß, glänzend, konvex, cremig	gb EF612371.1
SK 16	<i>Uncultured Sulfobacillus sp. clone K4-C07</i>	Firmicutes	gelb/orange, matt, flach, unregelmäßige Form	gb EU419138.1
SK 20, 24	<i>Uncultured Acidocella sp. clone II_1b_10</i>	Alpha-Proteobacteria	creme/weiß, leicht glänzend, konvex, cremig	gb EU755208.1
SK W5	<i>Acidiphilium sp. SX-F</i>	Alpha-Proteobacteria	creme/beige, glänzend, konvex, cremig	gb FJ194544.1
SK 53	<i>Acidiphilium cryptum strain PLS2</i>	Alpha-Proteobacteria	beige, glänzend, konvex, cremig	gb KC852081.1

**Tabelle A 14: Fortsetzung Charakterisierung und Identifizierung kultivierter Prokaryoten.**

Isolat Nr.	Name	zugeordnetes Phylum	Koloniemorphologie	Accession Nr.
SK 9	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> strain IEL001	Gamma-Proteobacteria	weiß, matt, konvex, cremig	gb FJ457628.1
SK 12	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Gamma-Proteobacteria	durchscheinend weiß, glänzend, konvex, cremig	S000966067
SK 50, 104	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Gamma-Proteobacteria	braun mit rotem Ring, matt, flach, fest	S001188488
SK 79	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Gamma-Proteobacteria	braun mit orange-farbenen Ring, matt, flach, fest	S000752040
SK 51	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> strain YW4	Gamma-Proteobacteria	weiß, leicht glänzend, konvex, cremig	gb JQ837900.1
IZ 34	Uncultured bacterium clone nbw1133g08c1	unklassifiziert	grau/braune, runzelig, erhaben, unrund, schleimig	gb GQ080096.1
IZ 19, 20	Uncultured bacterium clone H2SRC236x	unklassifiziert	grün bzw. rosa/pink, schleimig, glänzend, flach bis erhaben, rundlich,	emb FM213060.1
IZ 31	Uncultured bacterium clone CCW1_8F_b12	unklassifiziert	hellbraun, flach, unregelmäßig, schleimig	gb KC711337.1
IZ 30	Uncultured bacterium clone HC15::G9RAORH03F1O7R	unklassifiziert	rot, rund, glatt, konvex	gb JX797815.1
SK 44	Uncultured bacterium clone TF-I-22	unklassifiziert	orange, leicht glänzend, konvex, cremig	gb HM243743.1
SK 45	Uncultured bacterium clone Central-Bottom-cDNA_clone54	unklassifiziert	braun mit orange-farbenen Hof, flach, matt, fest	emb HE604015.1
IZ 50	uncultured bacterium; SJTU_E_09_62; EF400158	unklassifiziert	hellgelb, matt, flach, weich	S000812099
IZ 46	Uncultured bacterium clone: TakashiB-B12	unklassifiziert	gelb, unregelmäßig, rund, erhaben, hart	dbj AB254794.1
IZ 9	uncultured bacterium; gls251; KC286775	unklassifiziert	dunkelgelb/ocker, glänzend, schleimig, erhaben	S003649289

## IX. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf in Kooperation mit der Technischen Universität Dresden und wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF Förderkennzeichen: 02NUK015F) finanziert. Das Thema dieser Arbeit war innerhalb des Verbundprojektes „Strahlung und Umwelt II: Radionuklide in der Umwelt, ihr Transport in Nahrungsketten zum und im Menschen, Teilprojekt F“ integriert und wurde zum FuE-Programm des Arbeitspaketes 2.1: „Einfluss von Biofilmen auf das Migrationsverhalten von Uran, Americium und Europium in der Umwelt“ zugeordnet. Die Laufzeit des Vorhabens erstreckte sich vom 01.09.2010 bis 31.12.2013.

An dieser Stelle möchte ich mich für die Vergabe dieses interessanten und anspruchsvollen Themas sowie der Arbeitsmöglichkeit am Institut für Ressourcenökologie bei Herrn Professor Dr. Gert Bernhard, Herrn Professor Dr. Torsten Stumpf, Herrn Dr. Gerhard Geipel und Herrn Dr. Thuro Arnold des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf bedanken.

Frau Prof. Isolde Röske von der Technischen Universität Dresden möchte ich für die Unterstützung während der Promotionsphase, die hilfreichen und ermutigenden Worte sowie die Begutachtung der Arbeit danken.

Frau Professor Dr. Erika Kothe danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens seitens der Friedrich-Schiller Universität Jena sowie die sachdienlichen Hinweise während der Projekttreffen.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Isolde Röske, Herrn Dr. Sandro Wolf und Herrn Professor Dr. Michael Rother für die zusätzliche Arbeitsmöglichkeit am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Thuro Arnold für die Idee zu dieser interessanten Aufgabenstellung und die direkte wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit sowie die Unterstützung bei der Veröffentlichung der Daten. Die Vielzahl an intensiven Diskussionen und die zahlreichen Anregungen haben mich angespornt und ermutigt.

Frau Dr. Kerstin Röske danke ich ganz herzlich für die Hilfestellung und Auswertung der Sequenzen, die Erstellung der Pyrosequenzierungs-Bibliotheken sowie die Durchführung der Statistik. Die ständige Möglichkeit des Austauschs bei der CARD-FISH, der Pyrosequenzierung und der Statistik haben meine Arbeit vorangebracht und mich gestärkt.

Danke an die Wismut GmbH für die Möglichkeit der Beprobung des Grubenwassers aus dem ehemaligen Uranbergwerk Königstein und die Bereitstellung von Literatur durch Herrn Dr. Ulf Jenk.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Stefan Röder für die tolle Zusammenarbeit, die Begleitung bei jeder Probenentnahme und die Unterstützung meiner zahlreichen Konstruktionsvorschläge. Für viele hilfreiche Tipps und das Bereitstellen von fachlichem Material danke ich Herrn Lutz Uebe.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Axel Wobus der Technischen Universität Dresden und Frau Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf für die wissenschaftlichen Ratschläge und Anregungen sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt Corinna Gagell für die fachliche und organisatorische Zusammenarbeit im Labor und im Feld, die anregenden Vorschläge und Diskussionen, die aufmunternden Worte und die tolle Atmosphäre während der Laborarbeiten.

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

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. Frank Bok für die Speziationsanalysen, die Literaturrecherche und die vielen Tipps aus chemischer Sicht sowie die motivierenden Worte danken.

Herrn Dr. Thomas Neu vom Umweltforschungszentrum Magdeburg gilt ein besonderes Dankeschön für die Möglichkeit Biofilme mit Hilfe der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie abzubilden und darzustellen.

Ich möchte mich bei Frau Carola Eckardt, Frau Aline Stein und Frau Ina Keppler für die Durchführung der vielen Ionenanalysen am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Robin Steudtner für die zahlreichen Versuche der Uranlokalisierung und Mineralspeziation im Biofilm mittels TRLFS.

Für die unzähligen Korrekturlesungen meiner Arbeit möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. Carl-Georg Oertel der Technischen Universität Dresden danken.

Mein Dank richtet sich auch an die Kolleginnen Corinna Gagell, Katja Schulz, Dr. Laura Lütke, Juliane Schott, Ulrike Gerber, Dr. Sina Brockmann, Dr. Anne Heller, Dr. Claudia Joseph, Claudia Wilke, Siriwan Dulnee für zahlreiche anregende Diskussionen und nette Gesprächsrunden, welche nicht nur zu neuen Ideen, sondern auch zu einem angenehmen Arbeitsumfeld und einer freundschaftlichen Atmosphäre führten und somit maßgeblich zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank richtet sich an die Kollegen Dirk Falkenberg, Bernd Hiller und Steffen Henke, die geduldig meine Konstruktionsvorschläge der Biofilmsysteme umsetzten und weitere technische Hilfestellungen u.a. zur Nutzung der Inertgas-Boxen leisteten.

Schließlich möchte ich mich bei allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Ressourcenökologie herzlich bedanken, die mir bei mikrobiologischen/chemischen/physikalischen/geologischen oder organisatorischen Fragen eine Hilfe waren und mir wertvolle Tipps gaben sowie zum positiven Arbeitsklima beitrugen.

Meinen Freunden danke ich für die verständnisvolle Unterstützung und die immerwährenden Aufforderungen durchzuhalten. Meinem Freund Ralf danke ich für das Ertragen meiner wechselnden Launen in den letzten vier Jahren, seine unendliche Geduld, den Rückhalt und die vielen Ermunterungen, ohne die ich diese schwierige Zeit nicht gemeistert hätte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Besonders meinen Eltern danke ich an dieser Stelle, die mir durch ihre Unterstützung und Geduld diesen Lebensweg ermöglichten. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und haben mich ermutigt meinen Weg zu gehen, auch wenn er teilweise steinig war. Meiner Schwester Stefanie danke ich für die stetige gute Laune und die vielen schönen Stunden, in denen wir gemeinsam gelacht haben. Meinem Sohn Bruno möchte ich für sein Verständnis, seine Geduld und die Aufheiterung an stressigen Tagen sowie den Ansporn, die Doktorarbeit zu beenden, danken.



## **X. Erklärung**

Hiermit versichere ich, Isabel Zirnstein, 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 Arbeit wurde am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf in der Zeit vom Dezember 2010 bis Mai 2014 unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Dr. Thuro Arnold und Frau Professor Dr. Isolde Röske (Lehrstuhl Angewandte Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden) angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Isabel Zirnstein

Dresden, den