

Manja Vogel

**Zur Aufnahme und Bindung von Uran(VI) durch die
Grünalge *Chlorella vulgaris***

Dissertation

Zur Aufnahme und Bindung von Uran(VI) durch die Grünalge
Chlorella vulgaris

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 Manja Vogel
geboren am 08. Februar 1983 in Strausberg

Eingereicht am 04.03.2011

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2007 bis Juli 2010
im Institut für Radiochemie des Forschungszentrums Dresden-
Rossendorf angefertigt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Summary	VII
Abkürzungen und Symbole	X
1 Motivation und Zielstellung	1
2 Grundlagen.....	3
2.1 Uran.....	3
2.1.1 Chemie des Urans.....	4
2.1.2 Urankreislauf in der Natur.....	5
2.2 Algen.....	6
2.2.1 Taxonomie.....	7
2.2.2 Zellaufbau von Grünalgen.....	8
2.2.3 Wechselwirkung von Algen mit Schwermetallen.....	10
2.3 Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)	13
2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenz.....	14
2.3.2 Detektions- und Messprinzip	16
2.3.3 Die Fluoreszenzeigenschaften von Uran(VI).....	17
2.4 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)	19
2.4.1 Messprinzip	20
2.4.2 IR-Spektroskopie von Zellen	22
2.4.3 IR-Spektroskopie von Uran.....	22
2.5 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS).....	23
2.5.1 Prinzip der Methode	23
2.5.2 Messtechnik.....	27
2.5.3 Datenauswertung der EXAFS-Messung	28
2.5.4 EXAFS-Spektroskopie von Uran(VI)	29
3 Ergebnisse und Diskussion.....	31
3.1 Kultivierung von <i>Chlorella vulgaris</i> in Glucose-Glycin-Medium.....	31
3.2 Speziation von Uran in Medien und Wässern.....	32
3.2.1 Berechnung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium	33
3.2.2 Berechnung der gebildeten Uranspezies in umweltrelevanten Wässern.....	34
3.2.3 Nachweis der gebildeten Uranspezies in den Medien durch zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS).....	35
3.3 Bestimmung der funktionellen Gruppen auf der Algenzelloberfläche	40
3.4 Biosorption von Uran durch <i>C. vulgaris</i> im Mineralmedium	42
3.4.1 Sorption von Uran durch metabolisch aktive <i>Chlorella</i> -Zellen.....	42
3.4.2 Sorption von Uran durch tote <i>Chlorella</i> -Zellen.....	45
3.5 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen <i>Chlorella</i> und Uran in natürlichen Wässern	46
3.5.1 Sorption von Uran aus Leitungswasser	46
3.5.2 Sorption von Uran aus Oberflächenwasser der Gessenwiese	48
3.6 Einfluss der Stoffwechselaktivität auf die Uran(VI)-Sorption.....	50
3.7 Desorption von algengebundenem Uran durch stoffwechselrelevante Substanzen.....	51
3.8 Stabilität der gebildeten Uran(VI)-Algen-Komplexe.....	52
3.9 Laserspektroskopische Untersuchung von U(VI)-Modellkomplexen zur Interpretation von U(VI)-Algen-Komplexen	54
3.9.1 U(VI)-Acetat	54
3.9.2 U(VI)-Fructose-6-phosphat.....	55
3.9.3 U(VI)-Phosphothreonin.....	57

3.9.4	U(VI)-Komplexgemische	58
3.10	Charakterisierung der gebildeten Uran(VI)-Algen-Komplexe in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität der Algen	59
3.10.1	Charakterisierung von U(VI)-Komplexen mit metabolisch aktiven Algen-Zellen	59
3.10.1.1	TRLFS	59
3.10.1.2	EXAFS-Spektroskopie	63
3.10.1.3	ATR-FTIR-Spektroskopie	68
3.10.2	Charakterisierung von U(VI)-Komplexen mit metabolisch inaktiven Algen-Zellen	71
3.10.2.1	TRLFS	71
3.10.2.2	ATR-FTIR-Spektroskopie	73
3.11	Strukturmodelle für die Uranbindung an <i>Chlorella</i> in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität	76
3.12	Lokalisierung von Uran an/in Algenzellen	77
3.12.1	Transmissionselektronenmikroskopie von Algenzelldünnanschnitten	77
3.12.2	Urangehalt in Algenzellfraktionen	80
3.12.3	Laserfluoreszenzspektroskopie von U(VI)-Zellwand-Komplexen	82
4	Schlussfolgerungen & Ausblick	84
5	Experimentelle Einzelheiten	87
5.1	Algenstamm	87
5.2	Kulturmedien und Lösungen	87
5.2.1	Vollmedium (fest)	87
5.2.2	Glucose-Glycin-Medium	88
5.2.3	Mineralmedium	88
5.2.4	Leitungswasser (Rossendorf)	89
5.2.5	Oberflächenwasser der Gessenwiese	90
5.3	Kultivierung von <i>Chlorella vulgaris</i>	91
5.3.1	Ernte der Zellkultur	92
5.3.2	Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte	92
5.3.3	Bestimmung von Trockengewichten	93
5.4	Biosorptionsversuche	93
5.4.1	Sorptionsexperimente in Mineralmedium	94
5.4.2	Desorptionsexperimente in Mineralmedium	95
5.4.3	Sorptionsexperimente in natürlichen Wässern	95
5.5	Mechanischer Zellaufschluss	95
5.6	Fraktionierung des Zellhomogenats	96
5.7	Spektroskopische Methoden und entsprechende Probenpräparation	97
5.7.1	TRLFS	97
5.7.2	Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)	98
5.7.3	ATR-FT-IR Spektroskopie	99
5.8	Potentiometrische Titration	99
5.9	Mikroskopische Methoden und entsprechende Probenpräparation	100
5.9.1	Lichtmikroskopie	100
5.9.2	Transmissionselektronenmikroskopie	100
5.10	Thermodynamische Berechnung der Speziation	100
5.11	Elementaranalyse	101
5.12	Chemikalien	101
6	Anhang	102
6.1	Abbildungsverzeichnis	102
6.2	Tabellenverzeichnis	106

7	Literaturverzeichnis.....	108
	In Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandene Publikationen.....	120
	Danksagung.....	121
	Eidesstattliche Erklärung.....	122
	Versicherung.....	122

Zusammenfassung

Uran kann sowohl durch geogene als auch anthropogene Vorgänge in die Umwelt gelangen. Dazu zählen natürliche Uranerzvorkommen und deren Leaching sowie die Auswaschung von Uran aus den Hinterlassenschaften des ehemaligen Uranerzbergbaus. Die Aufklärung des Verhaltens von Uran in der Geo- und Biosphäre ist für eine Risikoabschätzung des Migrationsverhaltens von Radionukliden in der Umwelt notwendig. Algen sind in der Natur weit verbreitet und die wichtigste Organismengruppe in den aquatischen Lebensräumen. Durch ihre ubiquitäre Verbreitung in der Natur ist ihr Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in der Umwelt von grundlegendem Interesse z.B. um effektive und wirtschaftliche Remediationsstrategien für Wässer zu entwickeln. Außerdem stehen Algen am Beginn der Nahrungskette und spielen eine wirtschaftlich relevante Rolle als Nahrung beziehungsweise Nahrungsergänzungsmittel. Die Möglichkeit des Transfers von algengebundenem Uran entlang der Nahrungskette könnte eine ernsthafte Gesundheitsgefahr für den Menschen darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit war die quantitative und strukturelle Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Uran(VI) und der Grünalge *Chlorella vulgaris* im umweltrelevanten Konzentrations- und pH-Wertbereich unter besonderer Berücksichtigung der Stoffwechselaktivität. Dafür wurde zunächst ein definiertes Medium zusammengestellt, welches sowohl den Anforderungen an das Überleben/Wachstum der Alge als auch an die Berechnung der Uranspeziation in diesem Medium gerecht wurde.

Die Speziation von Uran in diesem Mineralmedium wurde berechnet und experimentell mittels der zeitaufgelösten laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS) verifiziert. Mit diesem Modellmedium wurden Sorptions- und Desorptionsexperimente mit Urankonzentrationen beginnend bei 5 μM in pH-Bereich von 4,4 bis 7,0 bis hin zu 1 mM Uran bei pH 4,4 durchgeführt. Die unterschiedlichen Urankonzentrationen wurden ausgewählt, um den Anforderungen der verschiedenen angewandten spektroskopischen Techniken gerecht zu werden. Dennoch wurde darauf geachtet, dass die Ausgangsbedingungen für jedes Experiment bezüglich der Wechselwirkung von Uran mit den Algenzellen für alle Proben vergleichbar waren. Die Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen wurde durch die Ergebnisse der Speziationsrechnungen für das Mineralmedium und der TRLFS-Messungen an der Algenbiomasse bestätigt.

Die Ergebnisse der Sorptionsexperimente zeigten, dass sowohl metabolisch aktive als auch inaktive Algenzellen Uran in signifikanten Mengen von 14 mg U/g Biomassetrockengewicht

bzw. 28 mg U/g Biomassetrockengewicht binden konnten. Ein weiteres interessantes Ergebnis brachte die Kultivierung von *Chlorella*-Zellen in Mineralmedium mit der umweltrelevanten Urankonzentration von 5 μM hervor. In diesem Fall trat im Verlauf der Kultivierung eine Mobilisierung des zuvor von den Algen gebundenen Urans auf. Wurden höhere Urankonzentrationen eingesetzt, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dies wird auf das Absterben der ursprünglich lebenden Zellen und einem damit verbundenen analogen Sorptionsverhalten wie bei bereits zu Beginn toten Zellen zurückgeführt.

Für die Desorption des Urans von den Algenzellen sind offensichtlich Stoffwechselprodukte der Algen wie z.B. organische Säuren und/oder phosphorylierte Verbindungen verantwortlich. Ob es sich bei der Mobilisierung des Urans durch die Algen um einen aktiven Entgiftungsmechanismus oder einen Nebeneffekt des normalen Wachstums handelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings wurde im Zuge der Desorptionsexperimente festgestellt, dass die gebildeten Uran-Algen-Komplexe weniger stabil sind als die mit den getesteten Desorptionssubstanzen. Für die Stabilität der gebildeten Komplexe mit Uran ergab sich folgende Reihenfolge: Algen < Oxalat < Citrat < Adenosintriphosphat (ATP).

Die in dieser Arbeit eingesetzten spektroskopischen Methoden erwiesen sich als wirkungsvolle Techniken für die Untersuchung von Uran(VI)-Komplexen, die sich mit den Algenzellen gebildet hatten. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen führten zur Identifikation der dominierenden und bindungsrelevanten funktionellen Gruppen unter den gegebenen Versuchsbedingungen. So zeigte der Vergleich gewonnener TRLF-Spektren von Uran-Algen-Komplexen an lebenden Zellen mit denen gebildeter Uran-Komplexe in Modelllösungen, die sowohl über Carboxyl- als auch organische Phosphatgruppen koordiniertes Uran enthielten, große Übereinstimmungen. Bestätigt wurde dies durch EXAFS-Analysen, die äquatoriale Sauerstoffe mit unterschiedlichen Bindungsabständen zum Uran ergaben und sich ebenfalls Uranwechselwirkungen mit Carboxyl- und organischen Phosphatgruppen zuordnen lassen. Hinweise auf eine Koordination von Uran durch lebende Algenzellen über anorganische Phosphate lieferten die EXAFS-Untersuchungen nicht. Die ATR-FTIR Messungen zeigten anhand von Differenzspektren, die zwischen mit Uran behandelten und unbehandelten lebenden bzw. toten Algenzellen berechnet wurden, ebenfalls Unterschiede zwischen lebender und toter Biomasse in der Beteiligung von bestimmten funktionellen Gruppen an der Urankoordination. Die spektroskopischen Untersuchungen zeigten insgesamt, dass im Fall von *Chlorella vulgaris* eine Mischung von unterschiedlichen funktionellen Gruppen für die Koordination von Uran(VI) verantwortlich ist. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde die Bindung von Uran hauptsächlich durch die

Stoffwechselaktivität der Zellen beeinflusst. Es wurden Modelle für die Struktur der gebildeten Uran(VI)-Algen-Komplexe in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität erstellt. Bei lebenden *Chlorella*-Zellen sind in erster Linie Carboxyl- und organische Phosphatgruppen für die Bindung von Uran(VI) verantwortlich. Dahingegen sind im Fall von toten *Chlorella*-Zellen zusätzlich anorganische Phosphatgruppen an der Koordination von Uran(VI) beteiligt.

Die Lokalisation der Uranbindungsstellen an/in den Algenzellen erfolgte auf verschiedene Art und Weise. Zum einen wurden mit Uran kontaminierte Algenzellen in feste und flüssige Zellbestandteile getrennt. In den festen Zellbestandteilen konnten ca. 80 % des gebundenen Urans nachgewiesen werden. Zum anderen wurden Zellwände von Algenzellen isoliert und anschließend die Uransorption analog den Experimenten mit intakten Zellen getestet. Die von den Zellwänden aufgenommenen TRLF-Spektren ähneln denen von intakten Zellen. Der Nachweis wo und in welcher Form das Uran an/in der Zelle gebunden wird, wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie und EDX-Analyse an Dünnschnitten der Algenzellen untersucht. Uran konnte an den zum Zeitpunkt des Urankontakts lebenden Algenzellen in Form von 30-70 nm großen nadelförmigen Ablagerungen in der Zellwand nachgewiesen werden. Akkumulate ähnlich geformter Uranablagerungen fanden sich vereinzelt auch im Inneren einiger Zellen. Dieses Erscheinungsbild ist jedoch auf tote Zellen mit beschädigter Zellwand beschränkt.

Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus Experimenten mit Mineralmedium auf natürliche mit dem Bergbau verbundene Wässer wurde exemplarisch an oberirdisch verlaufendem Wasser von der Gessenwiese (ehemalige Gessenhalde bei Ronneburg) überprüft.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Sorptionsexperimente zeigen deutlich den maßgeblichen Einfluss des Stoffwechselstatus von *Chlorella* auf die Wechselwirkung mit Uran. Deshalb sind Experimente mit getrockneter, inaktiver oder toter Biomasse nur bedingt für die Vorhersage der Wechselwirkungen zwischen Uran und Organismen in der Natur geeignet. Allerdings wurde durch die Experimente mit dem natürlichen Bergbauwasser bestätigt, dass neben der Stoffwechselaktivität die natürlichen Gegebenheiten des Mediums und die damit verbundene Speziation des Urans von entscheidender Bedeutung sind. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse tragen zur Vorhersage des Migrationsverhaltens von Uran unter umweltrelevanten Bedingungen, zur radiologischen Risikobewertung von geogen und anthropogen auftretendem Uran und zu einer verlässlicheren Abschätzung des Verhaltens von Uran in der Nahrungskette bei.

Summary

Uranium could be released into the environment from geogenic deposits and from former mining and milling areas by weathering and anthropogenic activities. The elucidation of uranium behavior in geo- and biosphere is necessary for a reliable risk assessment of radionuclide migration in the environment. Algae are widespread in nature and the most important group of organisms in the aquatic habitat. Because of their ubiquitous occurrence in nature the influence of algae on the migration process of uranium in the environment is of fundamental interest e.g. for the development of effective and economical remediation strategies for contaminated waters. Besides, algae are standing at the beginning of the food chain and play an economically relevant role as food and food additive. Therefore the transfer of algae-bound uranium along the food chain could arise to a serious threat to human health.

Aim of this work was the quantitative and structural characterization of the interaction between U(VI) and the green alga *Chlorella vulgaris* in environmental relevant concentration and pH range with special emphasis on metabolic activity. Therefore a defined medium was created which assures the survival/growth of the algae as well as the possibility to predict the uranium speciation. The speciation of uranium in the mineral medium was calculated and experimentally verified by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). In this model medium sorption and desorption experiments were carried out starting with a uranium concentration of 5 μM in the pH range of 4.4 to 7.0 up to 1 mM uranium at pH 4.4. The different uranium concentrations were chosen because of the different needs of the applied spectroscopic techniques. However, the experimental preconditions regarding the interaction of uranium with algae cells were for all samples comparable as confirmed by speciation calculation in mineral medium and TRLFS measurements of algae wet pastes.

The results of the sorption experiments showed that both metabolic active and inactive algal cells bind uranium in significant amounts of around 14 mg U/g dry biomass and 28 mg U/g dry biomass, respectively. Another interesting observation was made during the growth of *Chlorella* cells in mineral medium at the environmental relevant uranium concentration of 5 μM . Under these conditions and during ongoing cultivation a mobilization of the algae-bound uranium occurred. At higher uranium concentrations this effect was not observed due to the die off of the algae cells during the sorption experiment and a behavior analogue to initially heat killed cells.

Obviously, intermediates of algal metabolism like organic acids and/or phosphorylated compounds are responsible for desorption. Further investigations are necessary to distinguish

whether that is an active detoxification mechanism or a side effect of normal growth. It is certain that the formed uranyl algae complexes are less stable than those formed by the tested desorbing agents. From the results the following order of complex stability with uranium is deduced: algae < oxalate < citrate < adenosine triphosphate (ATP).

The spectroscopic techniques used in this study proved to be powerful tools for the investigation of uranium(VI) complexes formed with algal biomass and they complement each other to identify binding relevant functional groups under the given experimental conditions. The comparison of TRLF-spectra of uranyl-algae-complexes build with living cells showed great analogy to those of model complex solutions which contain uranyl complexes coordinating uranium by carboxylic as well as organic phosphate groups. The EXAFS-analysis confirmed the TRLFS-results as equatorial oxygen atoms with different radial distances occurred what is assigned to an interaction of uranium with carboxylic and organic phosphate groups. There was no hint from the EXAFS-results that living algae cells coordinate uranium by inorganic phosphates. Differences in the contribution of functional groups to the uranium binding depending on the metabolic activity of the algal biomass were also shown by the difference spectra of the ATR-FTIR measurements calculated between uranium contaminated and untreated biomass. All together the spectroscopic investigations showed in case of *Chlorella vulgaris* a mixture of functional groups is responsible for the coordination of U(VI). The metabolic activity of the cells influences the binding of uranium under the given experimental conditions. Models of the structure of the formed U(VI)-algae-complexes in dependence of the metabolic activity were created. For living algal cells, mainly carboxylic and organic phosphate groups are involved in the binding of uranium, whereas in dead algal biomass additionally inorganic phosphates are involved to some extent in the interaction of uranium with algal cells.

There were different strategies applied to localize the uranium binding sites on/in algal cells. On the one hand uranium contaminated algal cells were separated into solid and liquid cell components. In the solid cell components ca. 80% of the bound uranium could be detected. On the other hand algal cell walls were isolated and treated with uranium. The recorded TRLFS-spectra of uranyl-cell-wall-complexes are comparable to those of complexes with intact cells. The confirmation where and in which form uranium is bound on/in the algal cell was provided by transmission electron microscopy and EDX-analysis of algal cell thin sections. Under the given experimental conditions uranium was detected in form of 30-70 nm needle-like deposits in the cell wall of living algae at the time of uranium contact.

Additionally, accumulates of similar structures could be seen sporadically inside of some cells. This observation is limited dead algal cells with damaged cell walls.

The transferability of the obtained findings concerning the experiments in mineral medium to natural occurring mining related waters was verified exemplary with the surface water of “Gessenwiese” (former “Gessenhalde” at Ronneburg).

The obtained findings of the sorption experiments in this study demonstrate clearly, the interactions with uranium are heavily influenced by the status of the investigated *Chlorella* cells. Therefore, experiments with dried, inactive or dead biomass are suitable only to a limited extent for the prediction of the interaction of uranium with organisms in nature. However, the experiments with natural occurring mining related water confirmed besides metabolic activity the natural conditions in the medium and related to this the uranium speciation to be of great importance, too. The obtained results of this study contribute to the prediction of the migration behavior of uranium under environmental conditions, the radiological risk assessment of geogenic and anthropogenic appearing uranium and a reliable estimation of the accumulation of uranium in the food chain.

Abkürzungen und Symbole

A	Atomare Masse
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Energie
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ethylen-diamintetraessigsäure)
EDX	Energy Dispersive X-Ray (Energiedispersive Analyse der Röntgenstrahlung)
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure (Erweiterte Röntgenabsorptions-Feinstruktur)
F6P	Fructose-6-phosphat
FT	Fourier-Transformation
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
GS	Glutathion
\hbar	Plancksches Wirkungsquantum
I	Intensität
ICP-MS	Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Hochfrequenzplasma)
IR	Infrarot
k	Betrag des Wellenvektors vom Photoelektron
λ	Wellenlänge
μ	Absorptionskoeffizient
N	Koordinationszahl
NIR	Nahes Infrarot
ν	Frequenz
OD	Optische Dichte
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK_s	negativer dekadischer Logarithmus der Säuredissoziationskonstanten
pThr	Phosphothreonin (o-Phospho-L-threonin)
ρ	Dichte
R	Bindungslänge
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROBL	Rosendorf-Beamline
RT	Raumtemperatur

σ^2	Debye-Waller-Faktor
τ	Lumineszenzlebensdauer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TG	Trockengewicht
TOC	Total organic carbon (gesamt organischer Kohlenstoff)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volume per Volume (Volumen pro Volumen)
w/v	Weight per Volume (Gewicht pro Volumen)
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure (kantennahe Röntgenabsorptions-Struktur)
XAS	X-ray Absorption Spectroscopy (Röntgenabsorptionsspektroskopie)
$\chi(k)$	EXAFS-Funktion
$\chi(k) \cdot k^3$	k^3 -gewichtete EXAFS-Funktion
Z	Ordnungszahl / Kernladungszahl

Indizes

ax	axial
äq	äquatorial
anorg	anorganisch
L	lebende Algenzellen
org	organisch
T	tote Algenzellen
0	zum Zeitpunkt 0 / Ausgangsbedingung

1 Motivation und Zielstellung

Uran ist ein radioaktives und giftiges Schwermetall, welches sowohl durch geogene als auch anthropogene Vorgänge in die Umwelt gelangen kann. Eine Quelle des Urans sind natürliche Uranerzvorkommen. Insbesondere deren Leaching und die Auswaschung von Uran aus den Hinterlassenschaften des ehemaligen Uranerzbergbaus sorgen für einen Anstieg des Eintrags in die Umwelt. Die Verlagerung des Urans von der Geo- in die Biosphäre vor allem entlang des Wasserpfades durch Auswaschung erhöht das Risiko des Eintrages von Uran in den Lebensraum des Menschen. Die Aufklärung des Verhaltens von Uran in der Geo- und Biosphäre ist somit für eine verlässliche Risikoabschätzung des Migrationsverhaltens von Radionukliden in der Umwelt unbedingt erforderlich. Für die Migration von Uran in der Umwelt spielt Wasser eine zentrale Rolle. Neben gelöstem Uran können auch Uraneigenkolloide oder Uranpräzipitate mit Hilfe von Wasser aus der Geosphäre ausgespült und in Flüsse, Seen, Meere und das Grundwasser eingetragen werden. Die Immobilisierung des Urans aus der Wasserphase kann durch anorganische Materialien wie Gesteine und Mineralien ebenso erfolgen wie durch diverse Biosysteme. Zahlreiche Studien befassen sich bereits mit den Wechselwirkungen zwischen Uran und Mikroorganismen wie z.B. Bakterien, Pilzen und Algen (Günther et al., 2008; Kalin et al., 2005; Merroun et al., 2003; Merroun et al., 2005; Veglio & Beolchini, 1997; Volesky & Holan, 1995). Algen sind die wichtigste Organismengruppe in den aquatischen Lebensräumen und generell in der Natur weit verbreitet. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen ist ihr Einfluss auf das Migrationsverhalten von Uran in der Umwelt von grundlegendem Interesse, um z.B. effektive und wirtschaftliche Remediationsstrategien für Wässer zu entwickeln. Außerdem stehen Algen am Beginn der Nahrungskette und spielen eine wirtschaftlich relevante Rolle als Nahrung und Nahrungsergänzungsmittel. Die Möglichkeit eines Transfers oder einer Akkumulation von Uran entlang der Nahrungskette beginnend bei den Algen, könnte eine ernsthafte Gesundheitsgefahr für den Menschen darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die quantitative und qualitative Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Uran(VI) und der Grünalge *Chlorella vulgaris* im umweltrelevanten Konzentrations- und pH-Wertbereich unter besonderer Berücksichtigung der Stoffwechselaktivität der Alge. Dazu sollten zunächst Sorptionsexperimente mit lebender und toter Biomasse bei verschiedenen Urankonzentrationen und pH-Werten Aufschluss über die Mengen an gebundenem Uran an die Alge in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität und den gewählten Sorptionsbedingungen geben. Nach erfolgreicher Bindung von Uran an/in

den Algen sollten mittels zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS), Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) und Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) die zwischen Uran und der Alge gebildeten Komplexe charakterisiert werden. Insbesondere wurde nach Unterschieden in der Beteiligung von funktionellen Gruppen an der Urankoordination gesucht, wenn der Stoffwechselstatus und/oder die experimentellen Bedingungen variierten. Von weiterem Interesse ist der Ort der Urananbindung. Aufschluss darüber, ob das Uran nur oberflächlich an die Zellen bindet oder ins Innere gelangt, sollte die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Algenzelldünnschnitten gekoppelt mit EDX-Analysen geben. Die Fraktionierung von Algenzellen sollte parallel zu den TEM-Untersuchungen helfen die Zellbestandteile zu identifizieren, welche für die Uranbindung verantwortlich sind.

Die im Modellsystem erhaltenen Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkung von *Chlorella*-Zellen mit Uran sollten letztlich exemplarisch an einem natürlichen mit dem Uranbergbau in Verbindung stehenden Wasser überprüft werden.

2 Grundlagen

2.1 Uran

Uran ist mit einer Atommasse von 238,03 g/mol das schwerste natürlich vorkommende Element der Erde. Uran steht mit einem Massenanteil von $3,2 \cdot 10^{-4}$ % an der Erdhülle in der Elementhäufigkeit an 54. Stelle. Im Periodensystem der Elemente trägt es die Ordnungszahl 92.

Entdeckt wurde Uran 1789 von dem deutschen Chemieprofessor und Apotheker Martin Heinrich Klaproth (1743 – 1817), der es aus dem Mineral Pechblende in Form von Urandioxid (UO_2) isolierte. Das Element wurde nach dem Planeten Uranus benannt. Uran gehört zu der Gruppe der Actinoiden (Actinide), welche im Periodensystem die Elemente mit der Ordnungszahl 89 (Actinium) bis 103 (Lawrencium) umfasst. Wie alle Actinide ist Uran ein radioaktives Metall. Insgesamt gibt es 23 Isotope des Urans. In der Natur kommen allerdings nur drei Isotope mit ^{238}U zu 99,275 %, mit ^{235}U zu 0,720 % und mit ^{234}U zu 0,005 % vor (Holleman & Wiberg, 2007). Alle drei Isotope unterliegen dem radioaktiven Zerfall. Bei ^{238}U und ^{235}U handelt es sich um Ausgangsnuklide für die Uran-Radium-beziehungsweise Uran-Actiniumreihe, welche zwei der drei natürlich vorkommenden Zerfallsreihen darstellen. ^{234}U ist ein Zwischennuklid der Uran-Radiumreihe.

Uran kommt in der Natur in einer Vielzahl von Mineralen vor. Die Urankonzentration in der Erdkruste wird mit Werten von 2,0 – 4,0 mg U/kg angegeben (Craft et al., 2004; Enghang, 2004). Die Konzentrationen von Uran in wässrigen Systemen variieren je nach den natürlichen Gegebenheiten der beprobten Region beziehungsweise deren Nutzung stark voneinander. So finden sich im Meerwasser Urangelhalte zwischen 0,3 bis 3,3 $\mu\text{g U/l}$ (Spence, 1968; Stewart & Bentley, 1954). In Flüssen liegen die Werte im Mittel bei ca. 0,3 $\mu\text{g U/l}$. Sie können aber mit 0,03 $\mu\text{g U/l}$ auch um das zehnfache geringer oder mit 3,9 $\mu\text{g U/l}$ Uran pro Liter um das zehnfache erhöht sein. Deutsche Flüsse weisen in der Regel Urankonzentrationen zwischen ca. 1 und 3 $\mu\text{g U/l}$ auf (Mangini et al., 1979; Moore, W.S., 1967). Auch im Grundwasser finden sich regionalbedingt sehr unterschiedliche Urangelhalte. Bernhard und Geipel (2010) nennen Werte zwischen 0,4 – 2,4 $\mu\text{g U/l}$, wobei standortabhängig auch Maximalwerte von bis zu 100 $\mu\text{g U/l}$ auftreten können.

2.1.1 Chemie des Urans

Uran tritt in den Oxidationsstufen +2, +3, +4, +5 und +6 auf (Holleman & Wiberg, 2007). Am stabilsten sind die sechswertige Oxidationsstufe in Form von UO_2^{2+} (Uranylion) und die vierwertige Stufe in Form von U^{4+} . Die Oxidationsstufen des Urans besitzen neben verschiedenen Farben (UO_2^{2+} gelb, U^{4+} smaragdgrün) auch unterschiedliche chemische Eigenschaften. Die in natürlichen Wässern herrschenden physikalischen und chemischen Bedingungen, wie z.B. das Redoxpotential, der pH-Wert, die Temperatur und der CO_2 -Partialdruck, bestimmen das chemische Verhalten und damit auch die Mobilität des Urans. Bei den in natürlichen Wässern häufig vorkommenden pH-Werten zwischen 4 und 9 treten die stabilen Oxidationsstufen des Urans (U(VI), U(IV)) auf. Sechswertiges Uran ist sehr gut wasserlöslich und somit auch sehr mobil. Dahingegen ist vierwertiges Uran in seinen Verbindungen nur schwer löslich und führt somit zu einer Immobilisierung des Urans. Wässrige U(V)-Lösungen sind sehr instabil und neigen zur Disproportionierung, werden also zu U(VI) oxidiert beziehungsweise U(IV) reduziert.

Der Haupteintrag von Uran in wässrige Systeme unter oxischen Bedingungen erfolgt über die Auflösung der in der Natur weit verbreiteten U(VI)-Minerale (Langmuir, 1978). Das in natürlichen Wässern gelöste Uran(VI) kann dann in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie pH-Wert, Temperatur und der Konzentration von anderen Stoffen in verschiedenen Bindungsformen vorkommen. Die Löslichkeit und damit die Mobilität von Uran in natürlichem Wasser werden auch durch die Komplexbildung mit anorganischen und organischen Liganden beeinflusst. Es gibt bereits zahlreiche Untersuchungen zu der Komplexbildung von Uran mit anorganischen Liganden, wie z.B. Sulfat, Carbonat und Phosphat (Brendler et al., 1996; Geipel et al., 1996; Kato et al., 1994). Die Uransulfate spielen vor allem in sauren uranhaltigen Wässern eine dominante Rolle in der Uranspeziation (Bernhard et al., 1998). Dagegen treten Komplexbildungen mit Carbonat in der Regel bei neutralem bis leicht basischen pH-Werten auf, wenn die Wässer durch das Gleichgewicht mit dem CO_2 der Luft hohe Carbonatgehalte aufweisen. Zur Komplexbildung des Urans tragen jedoch auch organische Liganden, wie z.B. Huminsäuren, Aminosäuren, Carboxylsäuren und Mikroorganismen (Günther et al., 2006; Günther et al., 2007; Merroun et al., 2005; Moll et al., 2003; Sachs et al., 2007) bei.

2.1.2 Urankreislauf in der Natur

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben wird das Ausbreitungsverhalten von Uran im wässrigen System aufgrund des unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens von vierwertigen und sechswertigen Uranspezies (Suzuki & Banfield, 1999) maßgeblich durch Komplexierungs- und Redoxreaktionen bestimmt. Ein hypothetischer Urankreislauf im natürlichen aquatischen System ist in Abb. 2.1 dargestellt.

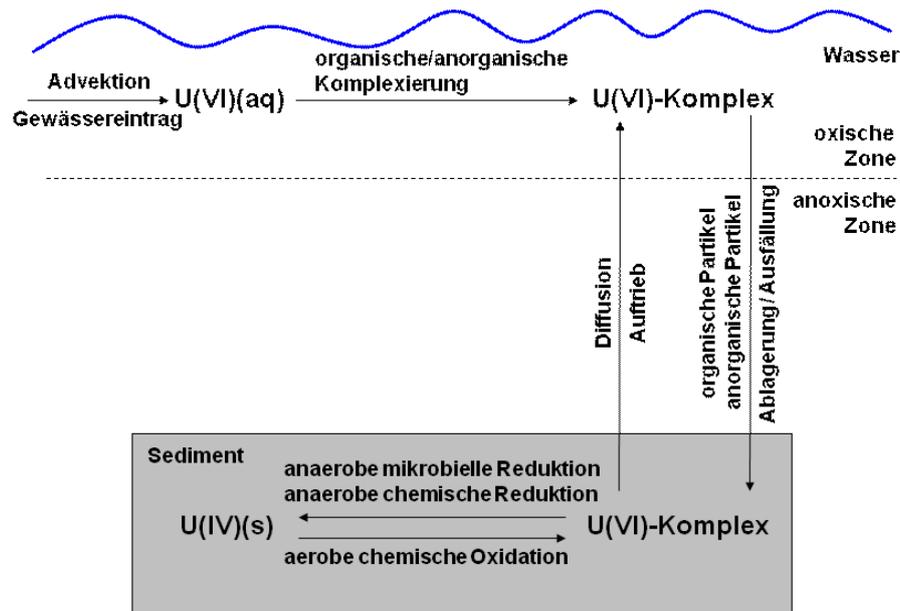


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Urankreislaufs in der Natur (nach Moore & DiChristina, 2002).

Die primären Quellen für den Eintrag von Uran(VI) in der Natur sind die Verwitterung von uranhaltigen Mineralien und anthropogene Prozesse. In den oberflächennahen aeroben Gewässern komplexiert U(VI) mit anorganischen oder organischen Liganden und bildet aquatische Uranylkomplexe. Bei Überschreitung des Löslichkeitsprodukts können diese Urankomplexe präzipitieren. Außerdem kann eine Sorption von Uran(VI) an anorganische oder organische Partikel zu einem Transfer in die anoxische Zone und zur Sedimentation führen. In tieferen Gewässerschichten nimmt die Sauerstoffsättigung aufgrund fehlender Wechselwirkung mit der Luft sowie fehlender Durchmischung des Gewässers ab. Im bodennahen Bereich können somit (nahezu) anoxische Bedingungen vorliegen, die eine Reduktion von U(VI) zu U(IV) durch Uran-reduzierende Bakterien ermöglichen. Das U(IV) fällt aufgrund der schlechten Löslichkeit im Sediment aus. Die Umwandlung kann des Weiteren durch chemische Reduktion, z.B. mit dem Redoxpartner Fe(II), erfolgen (Liger et al., 1999). Zufuhr von sauerstoffreichem Wasser kann das gebildete U(IV) erneut in U(VI) umwandeln, welches dann im gelösten Zustand zurück in den aquatischen Kreislauf gelangt. Das Uran, welches nicht durch natürliche Prozesse aus der wässrigen Phase entfernt wurde, kann direkt (Mineralwasser, Trinkwasser) oder indirekt über die Aufnahme in Pflanzen und

den Transfer entlang der Nahrungskette in den Nahrungsmittelkreislauf des Menschen gelangen (Abb. 2.2).

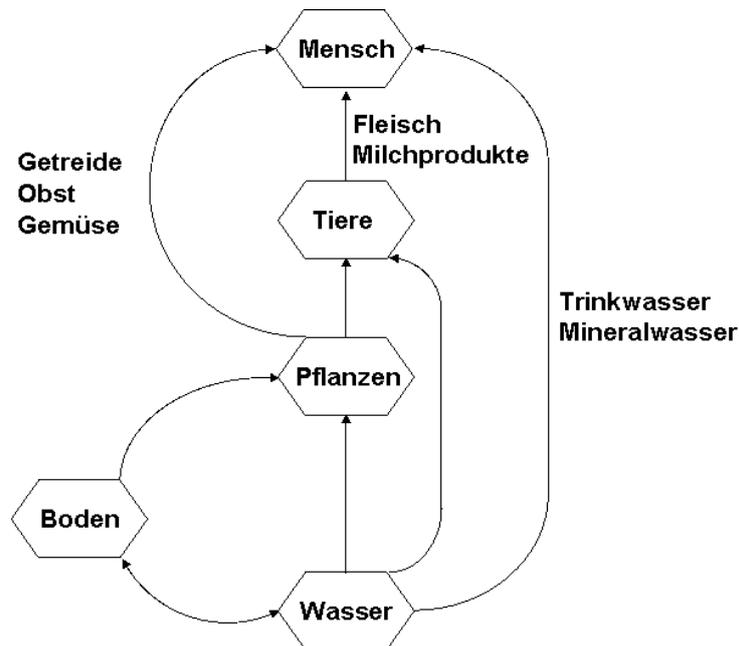


Abb. 2.2: Möglicher Weg des Urans entlang der Nahrungskette.

Um das Risiko einer Vergiftung mit Uran abzuschätzen beziehungsweise zu senken ist es wichtig, den Zustand des Urans in der natürlichen Umgebung zu kennen.

In dieser Arbeit stehen die Wechselwirkung zwischen U(VI) und einer Grünalge als Vertreter einer wichtigen aquatischen Organismengruppe, die das Migrationsverhalten von Uran im natürlichen wässrigen System beeinflussen kann, im Vordergrund.

2.2 Algen

Der Begriff Algen umfasst eine große und mannigfaltige Gruppe primär photoautotropher eukaryotischer Organismen. Traditionell wurden auch die prokaryotischen Cyanophyta (Blaualgen), heute besser bekannt als Cyanobakterien, den Algen zugeordnet. Nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen werden die Cyanophyta allerdings ins Reich der Eubakterien eingeordnet (Cyanobakterien). Die eukaryotischen Algen sind ein- bis vielzellige Pflanzen, die zum Großteil noch auf das Leben im Wasser angewiesen sind. In den aquatischen Lebensräumen sind sie zusammen mit den Cyanobakterien die dominierenden Primärproduzenten. Weiterhin gehören sie zu den Hauptsauerstofflieferanten auf der Erde.

2.2.1 Taxonomie

Die Einteilung der Algen in verschiedene Abteilungen und Gruppen kann nicht als endgültig betrachtet werden, da sich das System durch den Einsatz neuer Methoden verbunden mit neuen Erkenntnissen, insbesondere auf dem Gebiet der Molekulargenetik, in einem ständigen Wandel befindet. Auf eine detaillierte Klassifizierung der Algen wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Dennoch wird an dieser Stelle eine grundlegende Gliederung vorgestellt, die eine Einteilung in Abteilungen und Klassen vorsieht. Die Klassifizierung erfolgt anhand von Merkmalen wie dem Aufbau und der Zusammensetzung des Photosyntheseapparates, der chemischen Beschaffenheit von Reservestoffen, der Zellwandzusammensetzung, sowie weiteren morphologischen, cytologischen und entwicklungsgeschichtlichen Merkmalen. Innerhalb der Algenabteilungen spielen weitere Charakteristika, wie die Begeißelung der Zellen, sowie ähnliche Fortpflanzungs- und Ernährungsweisen, eine Rolle für die Gruppeneinteilung. In Tab. 2.1 sind eine Gliederung der Algen sowie einige wichtige Merkmale, die zur Einteilung beitragen, dargestellt.

Tab. 2.1: Algengliederung mit Übersicht der wichtigsten Merkmale der jeweiligen Gruppe (nach Hoek et al. (1993)).

Abteilung Klasse	Chlorophylle			Phycobiline	Carotine		Xanthophylle							Reservestoffe			Plastidentyp			
	a	b	c		α	β	Diadinoxanthin (C)	Diatoxanthin (C)	Fucoxanthin (D,B,A)	Heteroxanthin (C)	Vaucheriaxanthin (B)	Alloxanthin (C)	Peridinin (D,B)	Lutein	Zeaxanthin	Chrysolaminarin		Stärke	Florideenstärke	Paranylum
Glaucophyta	+	-	•	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Cyanellen
Rhodophyta	+	-	-	+	•	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Rhodoplasten
Heterokotophyta	+	-	+	-	-	+	±	±	±	±	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
Chloromonadophyceae	+	-	+	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Xanthophyceae	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Chrysophyceae	+	-	+	-	-	+	±	±	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Bacillariophyceae	+	-	+	-	•	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Phaeophyceae	+	-	+	-	-	+	•	•	+	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	
Haptophyta	+	-	+	-	-	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
Cryptophyta	+	-	+	+	+	•	-	±	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
Dinophyta	+	-	+	-	-	+	±	±	•	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Chlorophyta	+	+	-	-	•	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	x	-	-	Chloroplasten
Chlorarachniophyta	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Euglenophyta	+	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Streptophyta	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	x	-	-	

+ wichtiges Pigment oder Reservepolysaccharid; ± Pigment kommt vor; • Pigment selten oder in geringen Mengen; - Pigment oder Reservepolysaccharid kommt nicht vor; x im Chloroplast gelagert

Im Weiteren folgt eine kurze Vorstellung der Abteilung Chlorophyta, wobei die Klasse der Chlorophyceae näher betrachtet wird, da dieser Klasse der in dieser Arbeit verwendete Algenstamm *Chlorella vulgaris* zuzuordnen ist.

Die Chlorophyta (Grünalgen), bilden eine Hauptgruppe der Algen, welche in 11 Klassen unterteilt ist und ca. 7000 Arten umfasst. Grünalgen sind in vielen Lebensräumen verbreitet. Der größte Teil (ca. 90 %) lebt im Süßwasser, allerdings kommen auch Arten im Meer, in/auf feuchten Böden oder epiphytisch auf Baumstämmen vor. Die Formenvielfalt der Grünalgen erstreckt sich von mikroskopisch kleinen Einzellern, über verzweigte oder unverzweigte Büschel bildende Fadenalgen, bis hin zu komplexer gestalteten Organismen, die durch blattartige Thalli eine gewisse Ähnlichkeit mit höheren Pflanzen haben. Die Begeißelung der Zellen ist isokont, d.h. sie tragen meistens zwei oder vier Geißeln (selten viele), die gleich im Aufbau sind. Die Chloroplasten der Chlorophyta sind nur von einer Doppelmembran umgeben, was auf eine primäre Endocytobiose von prokaryotischen „Algen“ zurückzuführen ist. In den Chloroplasten sind die Photosynthesepigmente Chlorophyll a und b zusammen mit den akzessorischen Farbstoffen, den Carotinoiden und Xanthophyllen, enthalten. Die Abteilung Chlorophyta kann aufgrund der beschriebenen Merkmale gut von den anderen Algenarten unterschieden werden. Schwieriger gestaltet sich die Abgrenzung der Chlorophyta von Moosen und Grünpflanzen. Die größte Klasse der Abteilung Chlorophyta, zu der etwa 2650 Arten zählen, bilden die *Chlorophyceae*. Die Klasse enthält begeißelte und unbegeißelte, einzellige, koloniebildende und fädige Arten. Zu den bekanntesten Vertretern der *Chlorophyceae* gehören Arten (ca. 10) der Gattung *Chlorella*. Die in dieser Arbeit verwendete Art *Chlorella vulgaris* zeichnet sich durch ihre einfache Kultivierung und häufigen Einsatz für wissenschaftliche Experimente aus. Die Bezeichnung *Chlorella* leitet sich von dem griechischen Wort „*chloros*“ für grün und dem lateinischen „*ella*“ ,was klein bedeutet, ab (Graham & Wilcox, 2000; Hoek et al., 1993). Die Fortpflanzung von *Chlorella* erfolgt ungeschlechtlich durch Zellteilung innerhalb der Zellwand der Mutterzelle. Nach dem Aufreißen der Zellwand werden mehrere (meist vier) unbewegliche Tochterzellen (Autosporen) freigesetzt.

2.2.2 Zellaufbau von Grünalgen

Da Algen zu den Pflanzen gehören ist der Aufbau der Zellen ähnlich gestaltet. Zur Veranschaulichung des Aufbaus ist dieser schematisch am Beispiel einer *Chlorella*-Zelle in Abb. 2.3 dargestellt.

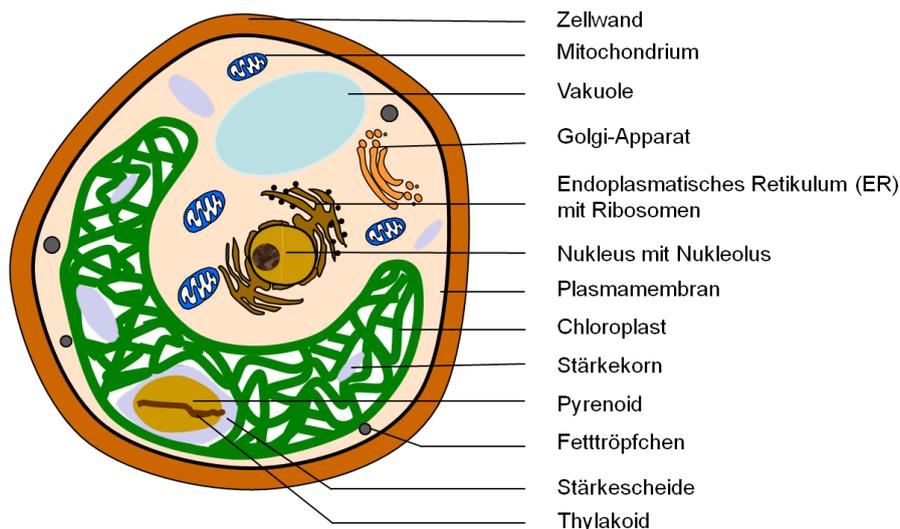


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau einer *Chlorella*-Zelle.

Die Grünalgenzellen werden von einer Zellwand umgeben und besitzen einen zentral gelegenen Zellkern, Chloroplasten (bei *Chlorella*-Zellen nur ein wandständiger Chloroplast) und andere Zellorganellen (siehe Abb. 2.3), die für eukaryotische Zellen im Allgemeinen typisch sind. Die Chloroplasten von Grünalgenzellen können Pyrenoide enthalten, welche oft von Thylakoiden durchdrungen und von einer Schicht aus Stärkeplättchen umgeben werden. Stärke ist das wichtigste Reservepolysaccharid der Chlorophyta, welches entweder in Form von Körnern im Chloroplast als Stromastärke verteilt ist oder angepresst an das Pyrenoid (wenn vorhanden) vorliegt. Neben Stärke kommen außerhalb und innerhalb der Chloroplasten fettartige Stoffe in Form von Fetttropfchen vor (Hoek et al., 1993).

Auf die Zellwand der Algenzellen im Allgemeinen sowie die von *Chlorella* im Speziellen wird im Folgenden noch etwas konkreter eingegangen. Die Zellwand bildet die Oberfläche der Algenzellen, welche permanent mit der Umgebung in Kontakt steht und aufgrund ihrer Bestandteile zahlreiche Bindungsstellen für Schwermetalle besitzt. Die Zellwandstruktur setzt sich aus einem Gemisch aus Polysacchariden und Proteinen zusammen. Je nach Algenart unterscheiden sich die Oberflächenstrukturen mehr oder weniger stark voneinander. Die nachfolgenden Ausführungen sollen einen Überblick über mögliche Bestandteile der Zelloberfläche geben.

Ganz allgemein lässt sich die Zellwand von Algen in zwei Schichten unterteilen, die kristalline Stützschiicht und die amorphe Matrixschicht. Die Stützschiicht wird aus linearen Polysacchariden gebildet, deren häufigste Vertreter α -Cellulose, β -1,4 Mannan und β -1,3 Xylan sind. Die Matrixschicht ist aus sauren, anionischen Polysacchariden aufgebaut, die sich im Gegensatz zu den Polysacchariden der Stützschiicht mit heißem Wasser extrahieren lassen.

Die ca. 210 Å dicke Zellwand von *Chlorella* besteht ebenso aus zwei Schichten, einer organisierten mikrofibrillären Struktur eingebettet in eine regelmäßige Matrix. Der Anteil der einzelnen Komponenten der Zellwand wurde mit 27 % Protein, 9,2 % Lipide, 15,4 % Cellulose, 31 % Hemicellulose, 3,3 % Glucosamin und 5,2 % anderer Stoffe bestimmt. Die Polysaccharide der Hemicellulose setzten sich neben Glucose aus Galactose, Mannose, Arabinose, Xylose und Rhamnose zusammen (Northcote et al., 1958). In der Zellwand von *Chlorella* sp. wurden acht Aminosäuren nachgewiesen: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Serin. Zusätzlich wurden in den Zellwänden auch die Aminozucker Glucosamin und Galaktosamin gefunden (Punnett & Derrenbacker, 1966).

2.2.3 Wechselwirkung von Algen mit Schwermetallen

Die weite Verbreitung von Mikroorganismen (Bakterien, Algen, Pilze) und das Wissen um ihre Fähigkeiten im Umgang mit toxischen, organischen und anorganischen Substanzen, haben sie zu einem Forschungsobjekt für die Entwicklung von innovativen Sanierungsstrategien gemacht. Für Algen(zellen) sind mehrere Prozesse bekannt, wie diese mit Schwermetallen in Wechselwirkung treten können (Gadd, 2009; Mehta & Gaur, 2005; Veglio & Beolchini, 1997; Volesky & Holan, 1995). Zu den Mechanismen gehören die Biosorption, Bioakkumulation, Biomineralisation und die Chelatbildung (siehe

Abb. 2.4).

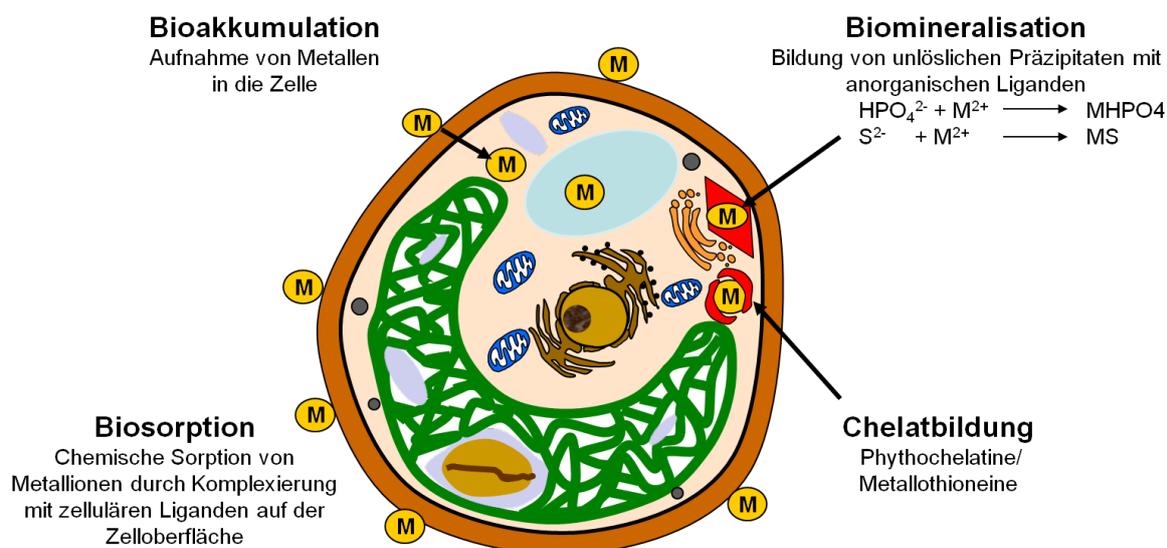


Abb. 2.4: Wechselwirkungsmechanismen von Algenzellen mit Schwermetallen.

Der Begriff Biosorption beschreibt physikalisch-chemische Wechselwirkungen von Metallen an der Zelloberfläche, die auf physikalischer Adsorption, Ionenaustausch, Chelatbildung und Komplexierung mit funktionellen Gruppen basieren. Diese passiv ablaufenden Prozesse treten sowohl an toter als auch an lebender Biomasse auf und sind vom pH-Wert, der Temperatur, vorhandenen Anionen und Kationen sowie von den Konzentrationen des Metalls und der Biomasse in der Lösung abhängig. Dahingegen werden bei der Bioakkumulation Schwermetalle im Inneren der Zelle angereichert, was in der Regel auf einen aktiven Transport der Stoffe über die Zellmembran in die Zelle zurückzuführen ist. In einigen Fällen können Metallionen infolge von durch das Metall induzierter erhöhter Permeabilität der Zellmembran auch durch passive Diffusion in die Zelle gelangen (Gadd, 1988). Innerhalb der Zelle kann das Schwermetall an intrazelluläre Komponenten binden oder präzipitieren. Die Entgiftung der Metalle kann dann durch Chelatbildung an Polypeptiden, den Phytochelatinen oder Metallothioneinen (Gekeler et al., 1988; Grill et al., 1987; Huang et al., 2009), und anschließenden Transport in die Vakuole erfolgen. Die Bildung von unlöslichen Präzipitaten aus Metallen und anorganischen Liganden (z.B. Phosphat, freigesetzt aus Polyphosphatkörpern) wird Biomineralisation genannt. Diese kann sowohl in Lösungen als auch direkt an der Zelloberfläche stattfinden. Außerdem können in Gegenwart der toxischen Metalle durch den Stoffwechsel der Algen Stoffe gebildet werden, die eine Präzipitation fördern. Allerdings kann die Mineralisation auch unabhängig vom Metabolismus der Zelle durch chemische Wechselwirkungen zwischen dem Metall und der Zelloberfläche erfolgen.

Zahlreiche Studien haben bereits bestätigt, dass die einzellige Grünalge *Chlorella* in der Lage ist Schwermetalle, wie z.B. Kupfer, Zink, Nickel, Cadmium und Blei, zu binden. Die Sorption an der Biomasse ist von der Biomassekonzentration, dem pH-Wert, der Temperatur, der Kultivierungszeit und der (Bio)Verfügbarkeit der Schwermetalle abhängig (Al-Rub et al., 2006; Cho et al., 1994; Fortin et al., 2007; Franklin et al., 2002; Franklin et al., 2000; Harris & Ramelow, 1990; Mehta et al., 2002; Sandau et al., 1996). In einigen Studien wurden auch die Wechselwirkungen zwischen *Chlorella* und Uran(VI) thematisiert. Somit ist bereits bekannt, dass *C. vulgaris* relativ große Mengen an Uran(VI) im pH-Wertebereich von 3 – 6 bindet (Günther et al., 2008). Horikoshi et al. (1979a) beschrieben den Vorgang der Uransorption an *Chlorella regularis* als sehr schnell und unabhängig von Temperatur, Licht oder Stoffwechsellinhibitoren ablaufenden Prozess. Demnach ist die Sorption von Uran ein vom Stoffwechsel unabhängiger Vorgang, der auf physikochemischer Adsorption an der Zelloberfläche beruht. Außerdem ist eine Komplexierung zwischen Uran und funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche denkbar, wie es für die Sorption von Cadmium und Nickel an

C. vulgaris beschrieben wurde (Saitoh et al., 2001). Wie dem vorangegangenen Absatz zu entnehmen ist, stellt die Zelloberfläche der Algen einen bedeutenden Faktor für die Sorption von Metallen dar. Die Zellwand von Algen besteht zum Großteil aus Heteropolysacchariden und Proteinen (vgl. Kap. 2.2.2), die zahlreiche Bindestellen für die Metalle bereitstellen. Dazu gehören funktionelle Gruppen, wie z.B. Carboxyl-, Hydroxyl-, Thiol-, Phosphoryl- und Aminogruppen, die für eine negative Ladung der Zelloberfläche sorgen (Crist et al., 1988; Crist et al., 1981). Dadurch werden Uranspezies in kationischer im Vergleich zu anionischer Form bevorzugt an die Zelloberfläche gebunden. Nakajima et al. (1979) schlussfolgerten, dass die Uranspezies UO_2^{2+} und UO_2OH^+ gut für die Biosorption durch *Chlorella* in Form von Protonenaustauschreaktionen mit organischen Liganden geeignet sind. Außerdem zeigten sie, dass die Uranverfügbarkeit für *Chlorella* durch gelöste Phosphat- und Carbonationen, durch die Bildung von stabilen gelösten Komplexen oder von Präzipitaten, eingeschränkt wird. Dahingegen werden die Wechselwirkungen nicht durch Kationen, Nitrate und Sulfate behindert.

In natürlicher Umgebung kommen lebende, tote und zersetzte Zellen vor und sind somit auch für die Vorhersage der Uranmigration in der Umwelt von Bedeutung. Es ist bekannt, dass trockene oder chemisch behandelte Zellen effizienter in der Rückgewinnung von Uran aus aquatischen Systemen sind als lebende Zellen (Horikoshi et al., 1979b). In lebenden Zellen wurden ca. 85 % des gebundenen Urans in der Zellwand detektiert. Außerdem wiesen Horikoshi et al. (1981) ein vergleichbares Bindungsverhalten zu Uran bei *Chlorella*-Zellen nach, die unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen angezogen wurden.

Mikroskopische Techniken haben sich bei anderen Mikroorganismen, wie z.B. *Lysinibacillus sphaericus* (früher *Bacillus sphaericus*) (Merroun et al., 2005), als mögliche Methode zum Nachweis des Bindungsortes von Uran an die Zelle erwiesen. Für *Chlorella* gibt es Informationen darüber, dass Uran zu einem Großteil an die Zellwand gebunden ist (Horikoshi et al., 1979a; 1979b). Mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von urankontaminierten *Chlorella*-Zellen konnte dieser Befund durch (Günther et al., 2008) bestätigt werden. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen, die ein Eindringen des Urans in die Zelle belegen, sind noch nicht bekannt.

Über die Struktur der zwischen Uran und den Algenzellen gebildeten Verbindungen ist bisher wenig bekannt. Erste Anhaltspunkte lieferten laserfluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von urankontaminierter *Chlorella*-Biomasse. So wurde Uran anhand der erhaltenen Spektren auf der Zelloberfläche in Form von U(VI) nachgewiesen. Unterschiede in

den Spektren je nach gewähltem pH-Wert wurden der Bindung von Uran über unterschiedliche funktionelle Gruppen zugeschrieben. So erfolgte die Bindung bei pH 3 primär über Carboxyl- und bei pH 5 sowie pH 6 hauptsächlich über Phosphatgruppen (Günther et al., 2008). Die Infrarotspektroskopie wurde ebenfalls eingesetzt um gebundenes Uran an Algenzellen nachzuweisen (Nakajima et al., 1981). Allerdings beschränkte sich die Interpretation auf den Nachweis der Uranyl-schwingung. Es wurden auf Basis des Spektrums keine Aussagen zur Art des gebildeten Komplexes gemacht. Mittels Einsatz verschiedener spektroskopischer Techniken (TRLF-, EXAFS-, ATR-FTIR- Spektroskopie) soll diese Arbeit nun einen entscheidenden Beitrag zur strukturellen Charakterisierung der Bindung von Uran an *Chlorella* leisten.

2.3 Zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (TRLFS = time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy) ist ein spektroskopisches Verfahren zur Analyse der chemischen Zusammensetzung von Stoffgemischen. In dieser Arbeit stellt TRLFS ein wichtiges Verfahren zur Analyse von Uran in umweltrelevanten chemischen Verbindungen und Konzentrationen dar. Die Methode hat sehr niedrige Nachweisgrenzen für UO_2^{2+} , die sich je nach eingesetztem Lasersystem und Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe im Bereich von $10^{-7} - 10^{-12}$ M bewegen (Brina & Miller, 1992; Moulin et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde die TRLFS hauptsächlich eingesetzt, um die Komplexe, die sich zwischen Algenbiomasse in unterschiedlichen metabolischen Zuständen und Uran(VI) im wässrigen System bilden konnten, zu charakterisieren. Außerdem wurden auch die Uranspezies in den Nährlösungen, welche potentiell mit der Algenbiomasse in Kontakt treten konnten, mit Hilfe der Laserfluoreszenzspektroskopie identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie sehr sensitiv auf Veränderungen der Elektronenstruktur des Urans reagiert. Durch die Wechselwirkung des Urans mit den funktionellen Gruppen z.B. der Algenbiomasse wird die Elektronenstruktur beeinflusst und führt zu einer Veränderung des Absorptions- und Emissionsverhaltens des komplexierten Uranyliions im Vergleich zum unkomplexierten. Die Fluoreszenzlebensdauer stellt neben der spektralen Information weitere Daten eines TRLFS-Spektrums dar, welches die gemessene Fluoreszenzintensität (Funktionswert) in Abhängigkeit der beiden unabhängigen Variablen Lichtwellenlänge und Zeit wiedergibt. Verschiedene Uran(VI)spezies sind anhand von unterschiedlichen Spektren und Fluoreszenzlebensdauern unterscheidbar.

2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz gehört zusammen mit der Phosphoreszenz zur Lumineszenz. Beide Prozesse können nach der Anregung von organischen oder anorganischen Verbindungen mit ultraviolettem (UV) oder sichtbarem Licht auftreten. Dabei nehmen die Verbindungen die Energie des Lichts auf, wobei Elektronen in ein energetisch höher gelegenes Orbital übergehen. Das Elektron kann dadurch unterschiedliche Energiezustände erreichen, welche durch verschiedene Elektronen-, Schwingungs- und Rotationszustände gekennzeichnet sind. Zwischen den Energiezuständen können verschiedene Übergänge stattfinden. Die wichtigsten Grundtypen dieser sogenannten photophysikalischen Primärprozesse, die nach der Absorption von Photonen zur Emission führen, werden mit Hilfe von Jablonski-Diagrammen veranschaulicht (Abb. 2.5).

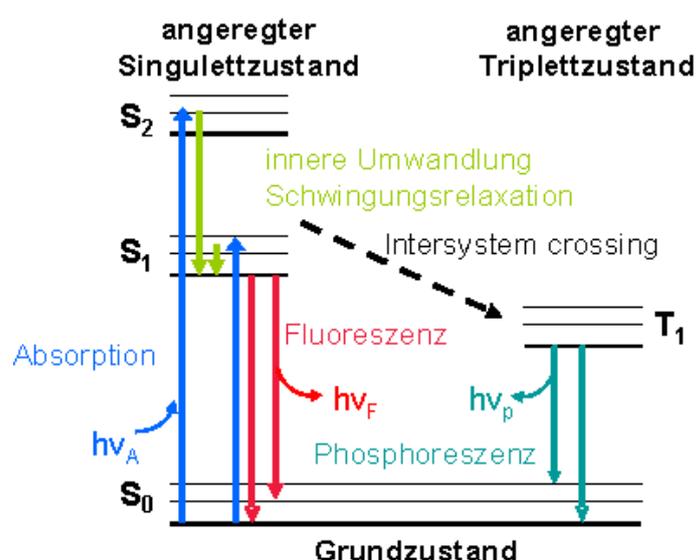


Abb. 2.5: Jablonski-Termschema für Fluoreszenz und Phosphoreszenz (nach Lakowicz (2006)).

Wie in Abb. 2.5 zu sehen, folgt auf die Absorption eines Photons nach Anregung eines Atoms oder Moleküls ein Übergang von Elektronen vom Grundzustand (S_0) in höhere Energiezustände (S_1 , S_2). Dieser Vorgang ist mit 10^{-15} s sehr schnell. Die höheren Energiezustände sind kurzlebig und die Rückkehr in den Grundzustand kann durch verschiedene Prozesse erfolgen. Dazu gehören strahlungslose Übergänge, die durch Energieabgabe ohne und mit Änderung des Elektronenzustandes erfolgen. Zu den Übergängen, deren Energieabgabe im gleichen Elektronenzustand stattfindet, gehören die Schwingungsrelaxation oder die thermische Äquilibrierung. Übergänge mit Änderung des Elektronenzustandes ($S_2 \rightarrow S_1$) werden als innere Umwandlung bezeichnet. Ändert sich neben dem Elektronenzustand auch der Spin, handelt es sich um ein sogenanntes Intersystem

Crossing ($S_1 \rightarrow T_1$). Die Emission von Strahlung bei der Rückkehr aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand wird entweder als Fluoreszenz oder als Phosphoreszenz bezeichnet. Bei Fluoreszenz handelt es sich um spinerlaubte Übergänge, d.h. Übergänge bei denen das Termsystem und der Spin des Elektrons beibehalten werden. Fluoreszenz findet in der Regel nur aus dem tiefsten elektronischen Anregungszustand (S_1 -Zustand) statt (Kasha-Regel). Bei der Phosphoreszenz treten im Unterschied zur Fluoreszenz Übergänge zwischen verschiedenen Termsystemen auf, die mit einer Spinumkehr verbunden sind ($T_1 \rightarrow S_0$). Diese Übergänge sind spinverbotene Übergänge (Lakowicz, 2006; Perkampus, 1993). Das Emissionsspektrum ist typischerweise ein Spiegelbild des Absorptionsspektrums vom Übergang aus dem S_0 - in den S_1 -Zustand. Diese Ähnlichkeiten treten auf, weil bei den Elektronenübergängen ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$) die entsprechenden Schwingungsniveaus in "umgekehrter" Reihenfolge erreicht werden. Allerdings wird nur annähernd ein Spiegelbild erzeugt, da die elektronischen Zustände S_0 und S_1 in Abhängigkeit von der Übergangsrichtung unterschiedlich hoch liegen. Aufgrund der strahlungslosen Energieverluste im angeregten Zustand ist die Energie des emittierten Photons immer niedriger als die des absorbierten Photons, was für eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzspektren gegenüber den Absorptionsbanden sorgt. Diese Verschiebung hin zu höheren Wellenlängen wird als Stokessche Verschiebung bezeichnet. Die Stokessche Verschiebung ist charakteristisch für jedes Molekül und ergibt sich aus der Differenz der Wellenmaxima von Anregung und Emission (Perkampus, 1993). Die Fluoreszenz tritt nur solange auf, wie die Probe angeregt wird. Die Abklingdauer bezeichnet man als Fluoreszenzlebensdauer. Diese ist stoffspezifisch und liefert neben der Spektralverteilung des emittierten Lichts und der Fluoreszenzquantenausbeute ein charakteristisches Merkmal der untersuchten Probe. Das Fluoreszenzspektrum resultiert aus der spektralen Zerlegung des Fluoreszenzlichtes einer Probe, wobei in der graphischen Darstellung die Fluoreszenzintensität als Funktion der Wellenlänge (λ) aufgetragen wird. Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die Abklingzeit der Fluoreszenz auf den Anteil e^{-1} ihrer Anfangsintensität. Das Zeitgesetz für den Fluoreszenzzerfall lautet:

$$\frac{dI}{dt} = -(k_a + k_b) \cdot I = -\lambda \cdot I. \quad (2.1)$$

Das Abklingen der Fluoreszenz wird über einen exponentiellen Zusammenhang beschrieben und durch Geschwindigkeitskonstanten für die emittierende (k_a) und strahlungslose (k_b) Relaxation sowie alternativ durch die Funktion der Wellenlänge λ charakterisiert.

Die Integration über die Zeit t führt zur Zerfallsgleichung der Fluoreszenz:

$$I = I_0 \cdot e^{-\lambda_m \cdot t} = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_m}} \quad (2.2)$$

wobei I und I_0 die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t bzw. t_0 , λ_m die intrinsische Zerfallskonstante, t die Zeit nach der Fluoreszenzanregung und τ_m die intrinsische Fluoreszenzlebensdauer sind. Die Fluoreszenzlebensdauer von einzelnen Spezies in einer Probe wird nach einem exponentiellen Zerfallsgesetz berechnet, welches in Gleichung 2.3 für die bei mehreren Spezies auftretende multiexponentielle Intensitätsabnahme dargestellt ist (Lakowicz, 2006):

$$E(t) = \sum_i A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.3)$$

Hierbei bezeichnen E die Gesamtfluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , A_i die Fluoreszenzintensität der Spezies i zum Zeitpunkt $t=0$ und τ_i die Fluoreszenzlebensdauer der Spezies i .

Die Fluoreszenzquantenausbeute ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl der pro Zeiteinheit emittierten Photonen und der Anzahl der pro Zeiteinheit absorbierten Photonen, wobei die Zahl der emittierten Photonen durch die Geschwindigkeitskonstante der strahlenden Deaktivierungen und durch die Konzentration der angeregten Moleküle bestimmt wird. Die Zahl der absorbierten Photonen pro Konzentrationseinheit ist durch die Intensität des eingestrahlten Lichts gegeben (Perkampus, 1993).

2.3.2 Detektions- und Messprinzip

Der Aufbau des in dieser Arbeit eingesetzten Lasersystems ist schematisch in Abb. 2.6 dargestellt. Die zu untersuchende Probe wird mit einem Laserimpuls fester Wellenlänge aus einem gepulsten Laser angeregt. Dabei wird von der Probe Energie aus dem Laserpuls absorbiert. Bei der Rückkehr der angeregten Spezies in den Grundzustand werden zusätzlich zu der Energieabgabe in Form von Wärme Photonen aus bestimmten, feststehenden Energieniveaus emittiert (siehe Kap. 2.3.3). Diese Energieniveaus werden durch die Komplexbildung des Zentralatoms (z.B. UO_2^{2+}) beeinflusst.

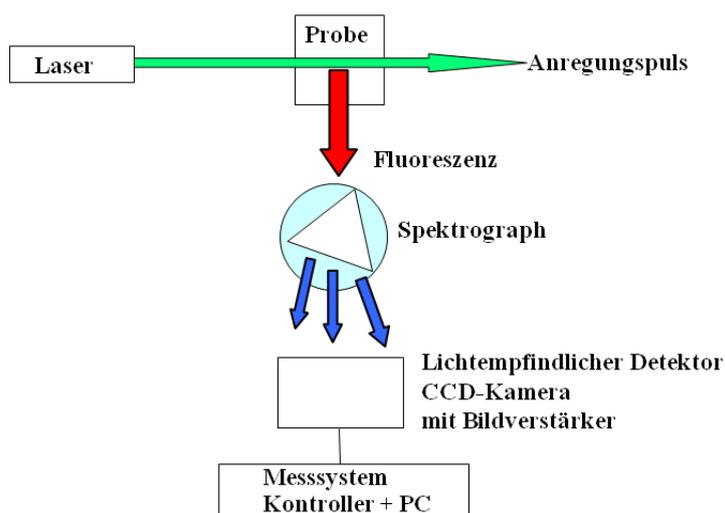


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau des Lasersystems für die TRLFS-Messung.

Das aus der Probe austretende Fluoreszenzlicht wird in einem Winkel von 90° von einem Spektrographen abgenommen und in seine wellenlängenabhängigen Teile zerlegt. Eine Detektionseinheit leitet die Signale aus dem Spektrographen an die Steuereinheit weiter. Über die Steuereinheit lassen sich die Belichtungszeit und deren Verzögerung gegenüber dem Laserpuls einstellen. Auf diese Weise ist es möglich eine Serie von Fluoreszenzspektren aufzunehmen, die sich untereinander durch eine Zeitdifferenz gegenüber dem Laserpuls unterscheiden. Diese Methode ermöglicht somit zeitaufgelöste Messungen, durch die in komplexen Systemen gemeinsam auftretende Spezies anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauer diskriminiert werden können.

2.3.3 Die Fluoreszenzeigenschaften von Uran(VI)

Uran besitzt im gasförmigen Zustand die Elektronenkonfiguration $[\text{Rn}] 5f^3 6d 7s^2$ (Seaborg, 1993) und ist neben anderen Actiniden wie z.B. Am(III) und Cm(III) (Beitz, 1994; Yusov, 1993) bekannt dafür, nach einer Anregung mit Licht im UV-Bereich Fluoreszenzlicht zu emittieren. Je nach Oxidationsstufe des Urans unterscheiden sich die Anregungswellenlänge und die Emission. Für das in dieser Arbeit verwendete Uran(VI) sind aus der Literatur diverse Anregungswellenlängen bekannt, welche Tab. 2.2 zusammenfasst.

Tab. 2.2: In der Literatur beschriebene Anregungswellenlängen für Uran in der Oxidationsstufe (VI).

Anregungswellenlänge (nm)	Referenz
266	Billard (2003)
407	Chisholm-Bause et al. (2001)
415	Chang et al. (2006)
420	Elzinga et al. (2004)
430	Kowal-Fouchard et al. (2004)

Die spektroskopischen Eigenschaften und die Elektronenstruktur des Uranylions wurden umfassend von Beitz (1980) beschrieben. Ein schematischer Überblick über die Prozesse, die bei der Anregung und Fluoreszenz von Uran(VI) ablaufen, ist in Abb. 2.7 dargestellt. Aus Abb. 2.7 ist zu entnehmen, dass das Uranylion durch Absorption von Licht je nach Wellenlänge in angeregte Zustände unterschiedlicher Energieniveaus gehoben wird. Das Absorptionsspektrum wird in 7 Bandengruppen, die wiederum aus 24 Einzelbanden bestehen, eingeteilt. In der Abbildung ist jedoch nur der Energiebereich angegeben, in dem sich die Absorptionsbanden befinden. Aus den angeregten Zuständen geht das Uranylion zunächst strahlungslos in niedriger gelegene Energieniveaus (21270 cm^{-1} und 20502 cm^{-1}) über. Von dort aus erfolgen Übergänge in den Grundzustand unter Aussendung von Fluoreszenzstrahlung. Beim Übergang von Niveau 21270 cm^{-1} in den Grundzustand wird eine Fluoreszenzlinie (470 nm) ausgesandt. Dahingegen werden beim Übergang vom Niveau 20502 cm^{-1} fünf verschiedene Banden erzeugt (488 nm, 509 nm, 533 nm, 558 nm, 585 nm). Die Restenergie im Grundzustand wird strahlungslos beispielsweise über Vibrations-schwingungen abgegeben.

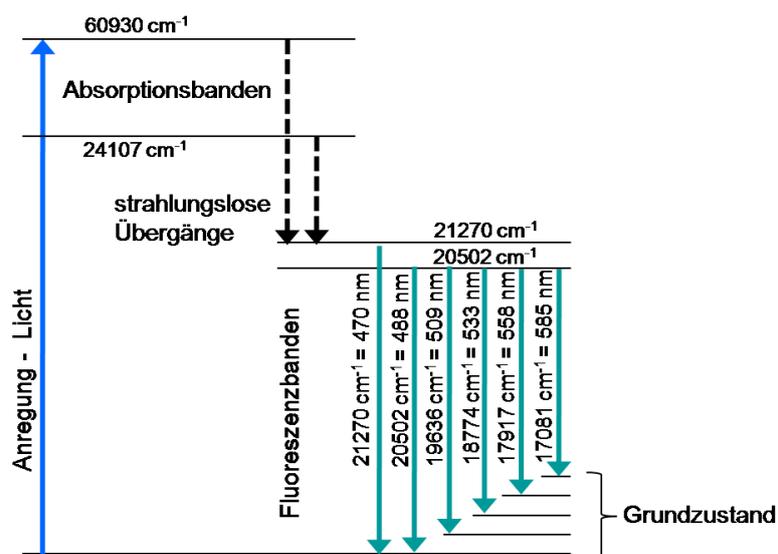


Abb. 2.7: Termschema der Absorptions- und Emissionsübergänge des Uranylions (nach Bell und Biggers (1968)).

Das Emissionsspektrum des aquatischen freien Uranylions ist zusammen mit den Emissionsbandenmaxima in Abb. 2.8a dargestellt. Diese Maxima sind für andere chemische Umgebungen des Uranylions, d.h. nach Komplexbildung mit anderen Liganden, verschoben. Unterschiedliche Urankomplexe weisen neben verschobenen Emissionsspektren auch unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern auf. Exemplarisch zeigt Abb. 2.8b den monoexponentiellen Fluoreszenzzerfall für das freie Uranylion mit einer ermittelten Fluoreszenzlebenszeit von $\tau = 1800 \pm 100\text{ ns}$ (Günther et al., 2007).

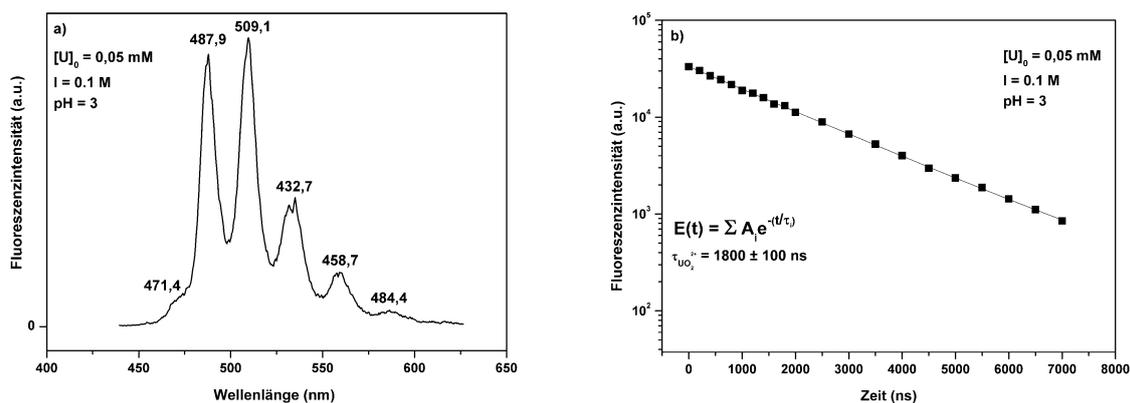


Abb. 2.8: Fluoreszenzemissionsspektrum (a) und monoexponentieller Fluoreszenzzerfall (b) von UO_2^{2+} bei pH3 (aus Günther et al. (2007)).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich aktuelle wissenschaftliche Diskussionen damit befassen, ob es sich bei dem emittierten Licht des angeregten Urans um Fluoreszenz- oder eher um Phosphoreszenzlicht handelt (Gosh et al., 2010). Um alle eventuelle auftretenden Emissionsprozesse, die mit dem Laserdetektionssystem erfassbar sind, mit einzuschließen, wird in dieser Arbeit im Folgenden der Begriff Lumineszenz zur Beschreibung der Emissionen des angeregten Uranions verwendet.

2.4 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie lassen sich über charakteristische Schwingungsfrequenzen von funktionellen Gruppen Informationen über die Struktur von Molekülen beziehungsweise Molekülkomplexen erlangen. Die IR-Spektroskopie beruht auf der Anregung der Molekülbindungen mittels infraroten Lichts. Dadurch werden Schwingungen beziehungsweise Rotationen in den Bindungen ausgelöst, die als Maxima in den gemessenen Spektren sichtbar und gegen die Wellenlänge (Wellenzahlen) aufgetragen werden. Nur Schwingungen, die ihr Dipolmoment ändern, sind IR-aktiv. In Abhängigkeit von der Wellenzahl des infraroten Lichts wird zwischen nahem Infrarot (NIR; $13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), mittlerem Infrarot (MIR, $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) und fernem Infrarot (FIR, $<400 \text{ cm}^{-1}$) unterschieden (Stuart, 2004). Die Fourier-Transform-IR-Spektroskopie ist eine besondere Form der IR-Spektroskopie, die sich im Vergleich zur dispersiven IR-Spektroskopie durch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis und eine hohe Frequenzgenauigkeit auszeichnet (Günzler & Gremlich, 2002).

2.4.1 Messprinzip

Den wichtigsten Teil der Optik eines FTIR-Spektrometers stellt das Michelson-Interferometer (Abb. 2.9) dar (Günzler & Gremlich, 2002).

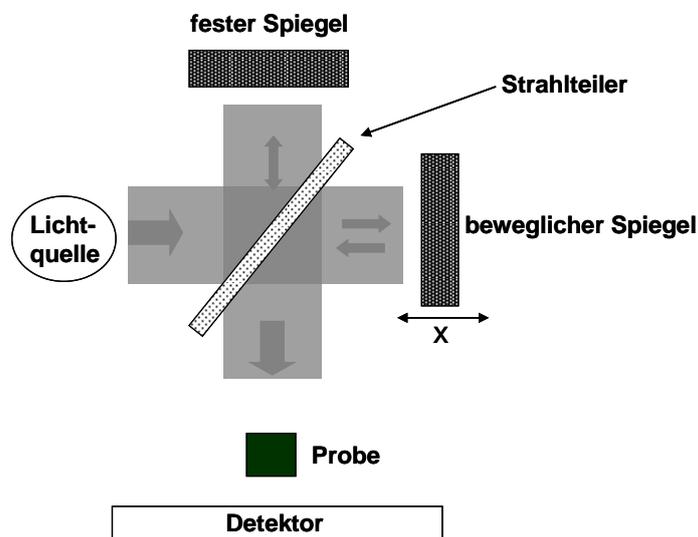


Abb. 2.9: Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers.

Im Interferometer wird die infrarote Strahlung am Strahlteiler in zwei Teilstrahlen geteilt. Ein Teilstrahl trifft einen beweglichen und der andere auf einen feststehenden Spiegel. Der Detektor nimmt die Intensität der rekombinierten Teilstrahlen, das sogenannte Interferogramm auf, welches alle infraroten Frequenzen enthält. Aus dem in Abhängigkeit von der Spiegelauslenkung aufgenommenen Interferogramm wird über die Computersteuerung mittels Fourier-Transformation direkt das Spektrum berechnet. Treffen die rekombinierten Teilstrahlen also auf eine Probe, ändert sich je nach den durch die funktionellen Gruppen in der Probe aufgenommenen Frequenzenergien das Aussehen des Interferogramms. Es entsteht ein charakteristisches Spektrum der Probe.

Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) Fourier-Transform (FT) Infrarot (IR)-Spektroskopie ist besonders für die Oberflächenanalyse von dicken oder zu stark absorbierenden Proben geeignet (Günzler & Gremlich, 2002). Von Vorteil ist außerdem, dass sich auch Messungen unter physiologischen Bedingungen, also im wässrigen System durchführen lassen. Bei dieser besonderen Form der Infrarot-Spektroskopie tritt der IR-Strahl im Gegensatz zu üblichen Transmissionsverfahren nicht direkt durch die Probe, sondern wird in einem bestimmten Winkel durch einen Kristall (ZnSe, Ge, Diamant) mit einem hohen Brechungsindex gelenkt. Der Strahlenverlauf im ATR-Kristall ist in Abb. 2.10 schematisch dargestellt.

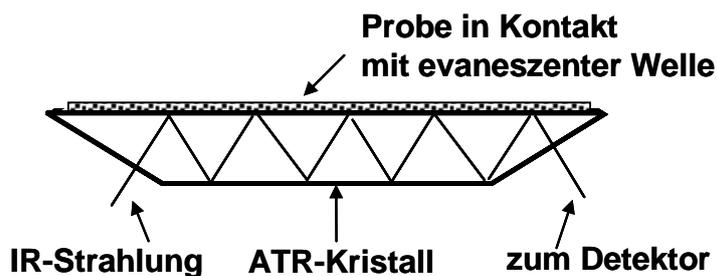


Abb. 2.10: Anordnung der Probe auf dem ATR-Kristall und möglicher Strahlengang.

Im Kristall treten je nach Länge und Dicke des Kristalls und dem Einstrahlwinkel 5 bis 10 Totalreflexionen auf. Dabei wird eine sogenannte evaneszente Welle an der Grenzfläche des Kristalls (optisch dichteres Medium) erzeugt, welche in die Probe (optisch dünneres Medium) übergeht. Die Eindringtiefe des IR-Strahls ist definiert als die Tiefe, in der die evaneszente Welle auf 36,8 % ($1/e$) ihrer ursprünglichen Intensität abgeschwächt wurde. Dies geschieht typischerweise zwischen $0,5\ \mu\text{m}$ und $5\ \mu\text{m}$. Die folgende Gleichung (2.4) beschreibt die Eindringtiefe (Smith, 1996):

$$d = \frac{\lambda}{2\pi n_1 (\sin^2 \theta - (n_2 / n_1)^2)^{1/2}} \quad (2.4)$$

mit d : Eindringtiefe; λ : Wellenlänge; n_1 : Brechungsindex Kristall; n_2 : Brechungsindex Probe; θ : Einfallswinkel des Strahls.

Somit ist die Eindringtiefe der evaneszenten Welle von der Wellenlänge und dem Einfallswinkel des Strahls, sowie dem Brechungsindex des ATR-Kristalls abhängig. In den Bereichen des IR-Spektrums, in denen die Probe Energie aufnimmt, wird die evaneszente Welle abgeschwächt oder verändert. Die abgeschwächte Strahlungsenergie wird zurück in den IR-Strahl übertragen und verlässt den ATR-Kristall auf der gegenüberliegenden Seite der Einstrahlung. Dort wird der Strahl vom Detektor des IR-Spektrometers aufgenommen. Da die ATR-Technik genauso wie die konventionelle Transmissions-IR-Spektroskopie auf der Abschwächung des IR-Strahls über Aufnahme und Umsetzung von Strahlungsenergie in Molekülschwingungen innerhalb der Probe beruht, sind die Bandenlagen beider Methoden direkt miteinander vergleichbar. Wichtig für den erfolgreichen Einsatz der Technik ist der direkte enge Kontakt zwischen Probe und ATR-Kristall, sowie die Notwendigkeit von einem deutlich höheren Brechungsindex des Kristalls gegenüber der Probe.

2.4.2 IR-Spektroskopie von Zellen

Mit Hilfe der abgeschwächten Totalreflexion FTIR-Spektroskopie können (lebende) Zellen sowie die mit Uran gebildeten Komplexe in wässrigen Systemen untersucht werden. Es ist somit möglich die funktionellen Gruppen der Zellen zu identifizieren, die für die Metallbindung verantwortlich sind. In allen Absorptionsspektren sind bekannte Funktionalitäten, welche bereits für verschiedene Mikroalgen spezie beschrieben wurden, sichtbar. Die für die Molekülgruppen von ganzen Zellen beschriebenen IR-Banden sind in Tab. 2.3 zusammengefasst.

Tab. 2.3: Frequenzen und IR-Banden der wichtigsten Molekülgruppen in Spektren von Zellen und deren makromolekulare Zuordnung nach (Benning et al., 2004; Heraud et al., 2007; Kansiz et al., 1999).

Wellenzahl (cm ⁻¹)	Molekülgruppe ^a	Bemerkungen
~ 1740	ν C=O von Estergruppen	Lipide, Fettsäuren
~ 1650	ν C=O assoziiert mit Proteinen	Amid I
~ 1540	δ N-H und ν C-N assoziiert mit Proteinen	Amid II
~ 1455	δ_{as} CH ₃ und δ_{as} CH ₂ von Proteinen	Amid III
~ 1398	ν_s C-O von COO ⁻ -Gruppen	Aminosäuren, Carboxylsäuren, Fettsäuren
~1240	ν_{as} P=O Gruppen von Phosphodiestern	DNA, RNA, und andere Phosphorylgruppen
~ 1200 – 950	ν C-O-C von Polysacchariden ν C-O von Polysacchariden	Sehr variabel, dominiert von Ringschwingung, überlappt mit Schwingung von Phosphodiestergruppen
~ 1080	ν_s P=O Gruppen von Phosphodiestern	DNA, RNA

a ν = Streckschwingung; δ = Deformationsschwingung; as = antisymmetrisch; s = symmetrisch

2.4.3 IR-Spektroskopie von Uran

Das UO₂²⁺-Kation zeigt eine antisymmetrische Streckschwingung bei 961 cm⁻¹. Durch die Komplexierung mit Liganden kommt es zu einer Schwächung der U–O Bindungskonstante, die in einer Verschiebung der charakteristischen Schwingungsfrequenz hin zu niedrigeren Wellenzahlen resultiert. In Tab. 2.4 wird eine Auswahl an U(VI)-Komplexen mit ihren entsprechenden Schwingungsbanden gezeigt.

Tab. 2.4: Antisymmetrische Streckschwingung von Uran(VI)-Komplexen.

Spezies	ν_3 [cm^{-1}]	Referenzen
UO_2^{2+}	961	Müller et al. (2008; 2009)
$\text{UO}_2(\text{OH})_2^0$	922	Müller et al. (2008)
$(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$	943	Quiles & Burneau (2000)
$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$	923	
$\text{UO}_2(\text{Acetat})$	925	Kakihana et al. (1987)

Durch Untersuchungen bei verschiedenen experimentellen Bedingungen, z.B. Variation der Konzentrationen an U(VI) oder des pH-Wertes, können strukturelle Aussagen über die jeweilig vorliegende Spezies getroffen werden.

2.5 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Der Begriff Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) umfasst mehrere röntgenspektroskopische Messverfahren, die alle auf der Messung der Absorption von Röntgenstrahlung im Bereich einer Absorptionskante beruhen. Die Methode ermöglicht die Lösung unterschiedlicher chemischer Fragestellungen. Zum einen liefert die Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (XANES) Auskunft über unbesetzte Elektronenzustände (Orbitale) für das untersuchte chemische Element und somit über den Oxidationszustand. Die in dieser Arbeit verwendete kantenferne Feinstruktur des Röntgenabsorptionsspektrums (EXAFS) ermöglicht die Aufklärung von Strukturparametern auf atomarer Ebene in verschiedensten Systemen. Es können die Art, die Bindungsabstände und Koordinationszahlen von Nachbaratomen eines bestimmten Elements in Molekülen einer Flüssigkeit oder eines Feststoffes bestimmt werden. Sie ist für die Charakterisierung umweltrelevanter Systeme sehr gut geeignet (Allen et al., 1996; Günther et al., 2003; Hennig et al., 2001; Merroun et al., 2005; Moll et al., 2003; Panak et al., 2002).

2.5.1 Prinzip der Methode

Bei der Röntgenabsorption wird beim Durchdringen von Materie die Intensität von monochromatischer Röntgenstrahlung geschwächt. Auf der Wegstrecke dx wird die Intensität I_0 um dI_0 durch die Wechselwirkung mit der Materie gemindert (Teo, 1986):

$$dI_0 = -\mu I_0 dx . \quad (2.5)$$

Es gilt das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 2.6). Nach Integration von Gleichung 2.5 ist:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot x} . \quad (2.6)$$

mit I_0 : Intensität der einfallenden Strahlung und I : Intensität der gedämpften Strahlung nach Durchlaufen der Probe mit der Dicke x und mit dem linearen Absorptionskoeffizienten μ , wobei μ wie folgt von der Dichte ρ , der Ordnungszahl Z und Atommasse A der Probe sowie von der Energie der Röntgenstrahlung E abhängig ist:

$$\mu \approx \rho Z^4 / AE^3 . \quad (2.7)$$

Die Prozesse, die bei der Wechselwirkung von Materie und Röntgenstrahlung auftreten, sind Streuung und Absorption. Der Beitrag der Streuung ist nur bei leichten Absorberatomen und kurzwelliger Strahlung relevant (Teo, 1986). Bei der Absorption von Röntgenstrahlung treten je nach Energie der Strahlung und der jeweiligen Bindungsenergie der Absorberelektronen diskrete Übergänge der Elektronen oder Photoionisation auf. Die Absorption von Röntgenstrahlung erfolgt entlang des Energiespektrums und verläuft meist kontinuierlich. An definierten Energiewerten kann es jedoch zu Diskontinuitäten kommen, bei denen die Absorption sprunghaft ansteigt. Bei diesen Energiewerten reicht die Energie der Strahlung aus, um ein Elektron aus einer inneren Schale (K-, L-, M-Schale) der Atomhülle des Absorberatoms anzuregen und in das Kontinuum zu schleudern (Photoemission). Der abrupte Anstieg des Absorptionskoeffizienten μ im Spektrum wird aufgrund seiner Erscheinung als Absorptionskante bezeichnet und nach dem absorbierenden Element sowie der angeregten Elektronenschale benannt.

Auf zwei Folgeprozesse der Röntgenabsorption wird im Folgenden näher eingegangen. Die freigesetzten Photoelektronen können quantenmechanisch als Kugelwelle aufgefasst werden, die durch Streuung an Nachbaratomen reflektiert wird. Die ursprüngliche und die reflektierte Elektronenwelle interferieren. Je nach Umgebung und zurückgelegter Weglänge können sich die Wellen verstärken oder auslöschen (Abb. 2.11 c, d). Der dabei gemessene Absorptionskoeffizient μ ist proportional zur Elektronendichte und er enthält in Abhängigkeit von der eingestrahlten Energie der Röntgenstrahlung Informationen über die geometrische Anordnung der Nachbaratome und die Elementverteilung in der Umgebung des angeregten Atoms. Dieser erste Effekt wird bei der Transmissions-Röntgenabsorptionsspektroskopie gemessen. Die bei der Anregung des Atoms entstandenen Elektronenlücken in den inneren Schalen werden durch Elektronen aus höheren Schalen aufgefüllt, die durch Relaxationsprozesse auf niedrigere Energieniveaus herunterfallen. Dies führt zur Freisetzung von Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung in einer für das Element, dessen Bindungszustand und Nachbaratomen

charakteristischen Art und Weise. Die Rekombinationseffekte sind proportional zum Absorptionskoeffizienten μ und liegen der Fluoreszenz-Röntgenabsorptionsspektroskopie zugrunde. Die Fluoreszenzstrahlung ist ungerichtet, enthält jedoch detaillierte Informationen über das angeregte Atom. Wegen ihrer Richtungsvielfalt sind Fluoreszenzsignale schwieriger zu messen als Transmissionssignale. Die Überlagerung jedes dieser beiden Effekte mit der eingestrahlenen, exponentiell gedämpften Röntgenstrahlung ergibt ein charakteristisches Spektrum. In diesem Röntgenabsorptionsspektrum ist die Röntgenabsorption $\ln I_0/I$ gegen die Energie E der anregenden Strahlung dargestellt. Ein typisches XAS-Spektrum ist in Abb. 2.11 an der Uran-L_{III}-Kante dargestellt.

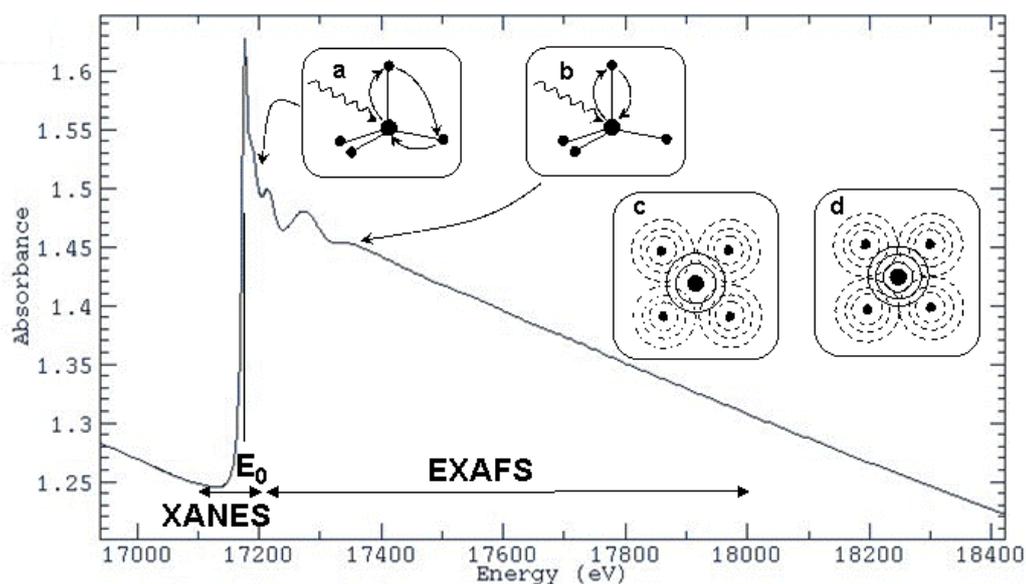


Abb. 2.11: Röntgenabsorptionsspektrum von einem Uran(VI)-Komplex an der Uran-L_{III}-Kante mit Unterteilung in den XANES- und den EXAFS-Bereich und der schematischen Darstellung des jeweils dafür verantwortlichen physikalischen Prozesses; a: Mehrfachstreuung, b: Einfachstreuung, c und d die sich auslöschende und die sich verstärkende Elektronenwelle.

Das Absorptionsspektrum wird in einen kantennahen (XANES) Bereich bis ca. 40 eV nach der Absorptionskante und einen kantenfernen (EXAFS) Bereich von 40 bis 1000 eV oberhalb der Absorptionskante unterteilt. Dieser EXAFS-Bereich des Spektrums zeichnet sich durch kleinere und scheinbar regelmäßige Schwingungen aus. Die Entstehung dieser Feinstruktur kann physikalisch durch die Interferenz der bei der Anregung entstandenen Kugelwelle mit den rückgestreuten Kugelwellen erklärt werden (Abb. 2.11 c, d). Der XANES-Bereich besitzt eine kompliziertere Struktur, die durch eine Vielzahl von Effekten (z.B. Mehrfachstreuungen, Abb. 2.11a) verursacht wird. Im Gegensatz dazu sind Mehrfachstreuungsprozesse in der EXAFS-Region relativ selten und dafür Einfachstreuungen (Abb. 2.11b) dominant. Die Feinstruktur gibt die Bindungs- und Koordinationsverhältnisse des absorbierenden Atoms wieder. Die Veränderung des Absorptionskoeffizienten μ im EXAFS-Bereich wird durch Rückstreuung

des herausgelösten Elektrons an der Elektronenhülle der Nachbaratome hervorgerufen. Für die mathematische Beschreibung wird die von der eingestrahlten Energie E abhängige Feinstruktur $\chi(E)$ als normierte relative Abweichung des Röntgenabsorptionskoeffizienten $\mu(E)$ vom Absorptionskoeffizienten des Absorberatoms $\mu_0(E)$ definiert:

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)}. \quad (2.8)$$

Da das Photoelektron als Welle betrachtet wird, lässt sich für die weiteren Betrachtungen der Energie-Raum E in den Wellenvektor-Raum k umrechnen, der durch den Wellenvektor k [\AA^{-1}] des Photoelektrons bestimmt wird. Der Wellenvektor k berechnet sich nach

$$k = \sqrt{\frac{2m_e(E - E_0)}{\hbar^2}}. \quad (2.9)$$

Dabei ist k die Wellenzahl, m_e die Masse des Elektrons, \hbar ($\hbar = h/2\pi$) das Plancksche Wirkungsquantum, E die Energie in eV und E_0 die Ionisationsenergie in eV. Bei der Streuung der Welle an den Nachbaratomen kommt es in Abhängigkeit von der Wellenlänge und dem Abstand zum Rückstreuatom zu konstruktiven (Abb. 2.11d) oder destruktiven (Abb. 2.11c) Interferenzen, welche die Maxima und Minima im EXAFS-Bereich des Absorptionsspektrums erzeugen. Die Frequenz der langwelligen Oszillationen des Absorptionskoeffizienten im EXAFS-Bereich korreliert mit dem Abstand zwischen dem untersuchten, absorbierenden Atom und den Nachbaratomen. Daraus lassen sich die Atomabstände R bestimmen. Die Amplitude gibt Auskunft über die Anzahl der Nachbaratome und somit über die Koordinationszahlen N .

Die EXAFS-Theorie wird vereinfacht durch folgende Gleichung (2.10) wiedergegeben (Newville, 2008):

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j f_j(k) e^{-2R_j/\lambda(k)} e^{-2k^2\sigma^2}}{kR_j^2} \sin(2kR_j + \delta_j(k)). \quad (2.10)$$

$\chi(k)$: EXAFS-Funktion; \sum : Summe über die Koordinationsschalen; j : Nachbaratome der Sorte j ; N_j : Anzahl der Nachbaratome; $f_j(k)$: Rückstreuamplitude; R_j : Abstand zwischen Nachbaratom und Absorberatom; $\delta_j(k)$: Phasenverschiebung; $e^{-2R_j/\lambda(k)}$: Dämpfungsterm mit der mittleren freien Weglänge λ des Elektrons; $e^{-2k^2\sigma^2}$: Dämpfungsterm mit dem Debye-Waller-Faktor σ^2 , der die thermische und statische Unordnung berücksichtigt.

Da die EXAFS-Funktion als Schwingungsfunktion im k -Raum zwar alle Informationen enthält jedoch nicht anschaulich für eine Interpretation ist, erfolgt für die weitere Auswertung

der Spektren eine Fourier-Transformation. Dadurch wird die Schwingungsfunktion in eine Ortsfunktion umgewandelt. Die Lage der Peaks im Fourier-transformierten Spektrum lässt sich den unterschiedlichen Rückstreuatomen, die das Absorberatom umgeben, zuordnen. Durch die Phasenverschiebung sind die Peaks im Spektrum um $0,2 - 0,5 \text{ \AA}$ zu kürzeren Atomabständen hin verschoben.

2.5.2 Messtechnik

Die zur Nutzung der Röntgenspektroskopie notwendige intensive Röntgenstrahlung wird durch ein Synchrotron bereitgestellt. In Abb. 2.12 ist schematisch der vereinfachte experimentelle Aufbau der Rossendorf-Beamline (ROBL) an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, Frankreich, dargestellt (Matz et al., 1999; Reich et al., 2000).

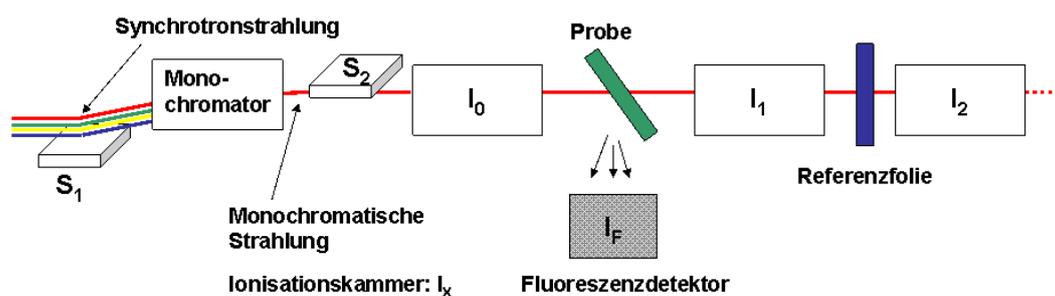


Abb. 2.12: Vereinfachter experimenteller Aufbau zur Messung von EXAFS-Spektren. Die Strahlung verläuft von links nach rechts.

Für die Röntgenabsorptionsspektroskopie von Metallen mit höherer Ordnungszahl (wie z.B. Uran) wird Strahlung mit Energien zwischen 5 keV und 40 keV verwendet. Bei der vom Synchrotronring bereitgestellten Strahlung handelt es sich um polychromatisches Licht, welches an der Beamline nach dem Passieren der Eintrittsblende von dem Spiegel S_1 fokussiert und auf einen Doppel-Kristall-Monochromator gelenkt wird. Der Monochromator besteht aus zwei parallel angeordneten Si-Kristallen (Si-111), die Braggsche Reflexe mit der auftreffenden Synchrotronstrahlung erzeugen, wodurch monochromatisches Licht entsteht. Die Wellenlänge des monochromatischen Lichts kann durch die Änderung der Kristallanstellwinkel verändert werden. Nach dem Monochromator wird das monochromatische Licht von dem Spiegel S_2 in eine gasgefüllte Ionisationskammer (I_0) gelenkt, mit der sich die Intensität der auftreffenden Strahlung messen lässt. Hinter dieser Ionisationskammer ist die Probe angeordnet, danach folgen zwei weitere Ionisationskammern I_1 und I_2 . In der Ionisationskammer I_1 erfolgt die Messung der Strahlungsintensität hinter der

Probe (Transmissionsmodus). Aus dem logarithmischen Verhältnis der Intensitäten I_0 und I_1 lässt sich der energieabhängige Absorptionskoeffizient μ berechnen:

$$\mu(E) = \ln(I_0 / I_1). \quad (2.11)$$

Die Transmission kann nur bei hoch konzentrierten Proben gemessen werden. Für Proben, die niedrig konzentriert sind, erfolgt die Messung im Fluoreszenzmodus mit Hilfe des Fluoreszenzdetektors I_F . Der Absorptionskoeffizient berechnet sich in diesem Fall nach folgender Gleichung:

$$\mu(E) \propto I_F / I_0. \quad (2.12)$$

Zwischen den Ionisationskammern I_1 und I_2 befindet sich außerdem eine Referenzprobe, deren Absorptionsspektrum zur Kalibrierung der Monochromatorenergie genutzt wird.

2.5.3 Datenauswertung der EXAFS-Messung

Die in dieser Arbeit experimentell ermittelten Daten der EXAFS-Messungen wurden entsprechend den Standardprozeduren mit dem Programm EXAFSPAK (George & Pickering, 1995) ausgewertet. Die theoretischen Rückstreuphasen und -amplituden wurden mit Hilfe des Programms FEFF8 (Ankudinov et al., 1998) „ab initio“ berechnet.

Bei der Bearbeitung der Spektren werden die gemessenen Daten auf die EXAFS-Funktion reduziert und andere Effekte wie der atomare Untergrund entfernt. Außerdem wird das Spektrum normiert und in die Dimension eines energieabhängigen Wellenvektors überführt. Die Datenauswertung beginnt mit der Festlegung der Absorptionskante des gemessenen Spektrums, welche durch den Energiewert des Maximums der ersten Ableitung des Spektrums bestimmt wird. Es folgt die Korrektur des Untergrunds der Vorkantenenergie. Dazu wird ein Polynom (meist erster Ordnung) unter Nutzung des Victoreen-Koeffizienten an die Daten des Vorkantenbereichs angepasst und für den weiteren Energiebereich des Spektrums extrapoliert. Der atomare Untergrund des Spektrums wird mit Hilfe einer Spline-Funktion entfernt (Teo, 1986). Bei der Spline-Funktion handelt es sich um eine Polynomfunktion, welche durch den EXAFS-Bereich gelegt wird und durch Parameter, wie die Anzahl der individuellen Polynome und deren Ordnungen, gekennzeichnet ist. In den meisten Fällen liegt ca. 20 eV über der ermittelten Absorptionskante des Spektrums der energetische Ursprung (Ionisationsenergie, E_0) der Spline-Funktion. Parallel dazu erfolgt die Überführung des Spektrums von der Energiedimension in die Dimension des Wellenvektors k mit der Einheit \AA^{-1} (siehe auch Gleichung 2.9). Die Daten werden daraufhin mit einem Victoreen-Polynom normalisiert und mit k^n ($n = 1 - 3$) gewichtet. Diese Wichtung ist

notwendig, da die EXAFS-Oszillationen mit zunehmender Energie abnehmen. Als erstes Ergebnis der Datenverarbeitung ergibt sich eine Darstellung der EXAFS-Oszillation in Form der Funktion $\chi(k)$ berechnet durch:

$$\chi(k) = \frac{\mu_{\text{exp.}} - \mu_{\text{spline}}}{\mu_{\text{victoreen}}}. \quad (2.13)$$

Wie bereits in Kapitel 2.5.1 erwähnt sind die EXAFS-Spektren alleine nicht interpretierbar, weswegen durch weitere Datenbearbeitung die Schwingungsfunktionen mittels Fourier-Transformation in Ortsfunktionen umgewandelt werden. Die Peakintensität der Fourier-transformierten Spektren ist dabei ein Maß für die Koordinationszahl und die Lage der Peaks ermöglicht die Bestimmung der Atomabstände R , die in der Fourier-Transformation aufgrund der Phasenverschiebung in der Phasenfunktion der EXAFS-Gleichung (Gl. 2.10) um 0,2 – 0,5 Å kleiner sind als die realen Abstände (Teo, 1986). Die erzeugten EXAFS- und Fourier-transformierten Spektren werden im weiteren über die Anpassung von Funktionen (N , R , ΔE) an die experimentellen Daten analysiert. Die Qualität der Anpassung spiegelt der F^2 -Wert wieder, welcher als Summe der Quadrate der Differenz zwischen der Datenpunkten der experimentellen und der angepassten Funktion definiert ist. Um eine optimale Anpassung zu gewährleisten, werden die theoretischen Rückstreuphasen und –amplituden für alle möglichen Rückstreupfade mit FEFF8 berechnet und die relevanten Streupfade für die Berechnung von den Koordinationszahlen und den entsprechenden Atomabständen in die Parametermatrix von EXAFSPAK eingesetzt. Durch Variation der Parameter (N , R , σ^2 , ΔE) erfolgt eine schrittweise Verbesserung der Anpassung an das EXAFS-Spektrum und dessen entsprechende Fourier-Transformation.

2.5.4 EXAFS-Spektroskopie von Uran(VI)

Bei der EXAFS-Spektroskopie von Uran werden Röntgenstrahlen absorbiert, deren Energie nahe der elementspezifischen Anregungsenergie der 2p_{3/2}-Elektronen liegen. Die Absorptionskante, die sogenannte Uran L_{III}-Kante, befindet sich bei 17,167 keV (Teo, 1986). Wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben bildet die Abhängigkeit des Absorptionskoeffizienten von der Energie an und über dieser Absorptionskante das Röntgenabsorptionsspektrum mit dem XANES- und dem EXAFS-Bereich (siehe auch Abb. 2.11). Das Aussehen eines EXAFS-Spektrums von Uran (Abb. 2.13a) mit dazugehöriger Fourier-Transformation (Abb. 2.13b) ist exemplarisch von $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ bei pH 0 dargestellt.

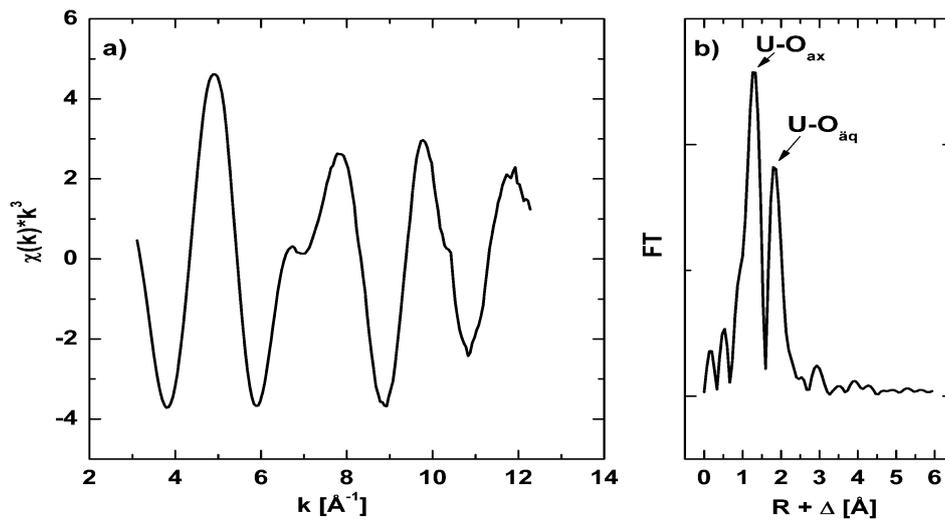


Abb. 2.13: Darstellung der EXAFS-Funktion $\chi(k)$ (gewichtet mit k^3) (a) und der dazugehörigen Fourier-Transformation (b) von $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ bei pH 0.

Die Feinstruktur gibt die Bindungs- und Koordinationsverhältnisse des absorbierenden Atoms, in diesem Fall Uran, wieder. Die Fourier-Transformation (FT) liefert Informationen über die Nachbaratome (Rückstreuatome) vom Uran. Uran(VI) liegt in der Regel als lineares Uranylion (UO_2^{2+}) vor (Evans, 1963). Die Rückstreubeiträge der zwei axialen Sauerstoffe zu den EXAFS-Spektren vom Uranyl sind in der Fourier-Transformation am ersten großen Maximum bei $R+\Delta \sim 1,3 \text{ \AA}$ sichtbar. Das zweite Maximum bei $R+\Delta \sim 1,8 \text{ \AA}$ in der FT repräsentiert die Rückstreubeiträge von äquatorialen Sauerstoffatomen (O^{2-} , OH^- , H_2O), welche das Uranylion koordinieren. Die Rückstreubeiträge weiterer Nachbaratome des Urans (C, N, P) würden sich durch entsprechende Maxima in der FT bei $R+\Delta > 1,8 \text{ \AA}$ abzeichnen. Aus der Position der Peakmaxima in der FT lassen sich unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung die Bindungsabstände der Nachbaratome des Urans mit $1,8 \text{ \AA}$ für die axialen Sauerstoffe und $2,26 \text{ \AA} - 2,46 \text{ \AA}$ für die äquatorialen Sauerstoffe festlegen (Burns et al., 1996).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kultivierung von *Chlorella vulgaris* in Glucose-Glycin-Medium

Für die Biosorptionsexperimente und die sich anschließenden spektroskopischen Untersuchungen war es notwendig, eine große Menge an *C. vulgaris*-Biomasse zu kultivieren. Diese Kultivierung erfolgte in 1,8 l Bioreaktoren unter ständiger Luftzufuhr und Bestrahlung mit Licht (Licht-Dunkel-Rhythmus 12 h). Als Wachstumsmedium wurde ein Glucose-Glycin-Medium eingesetzt (vgl. Kap. 5.2.2), dessen organische Bestandteile den Algen als Grundlage für ein mixotrophes Wachstum dienen. Zur Ermittlung des optimalen Erntezeitpunkts mit möglichst viel stoffwechselaktiver Biomasse wurden Wachstumskurven der Algenzellen aufgenommen. Dazu erfolgte die Messung der optischen Dichte an den zwei Absorptionsmaxima im UV-Vis-Spektrum der Algenzellen bei 500 und 690 nm. Eine dieser Wachstumskurven ist in Abb. 3.1 dargestellt.

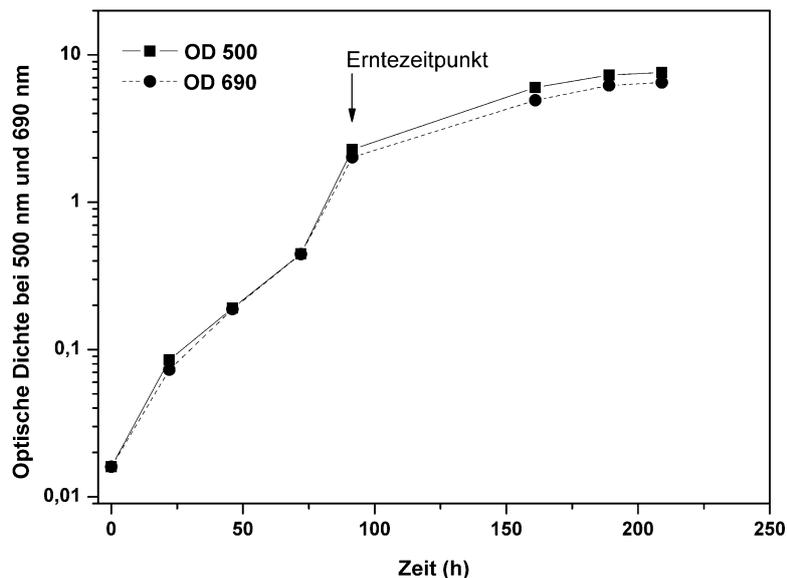


Abb. 3.1: Wachstumskurve von *Chlorella vulgaris*. Die Anzucht erfolgte bei Begasung mit Luft und Bestrahlung mit Licht. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 500 und 690 nm verfolgt.

Die *Chlorella*-Kultur besitzt unter den gewählten Wachstumsbedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase eine Verdopplungszeit von $t_d = 14,85$ h und eine Wachstumsrate von $0,047$ h⁻¹. Die Algenkultur wurde am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Vor der weiteren Verwendung der Zellen wurde die Reinheit der

Kultur lichtmikroskopisch überprüft. Das typische Erscheinungsbild von metabolisch aktiven *Chlorella*-Zellen wird in Abb. 3.2 gezeigt.

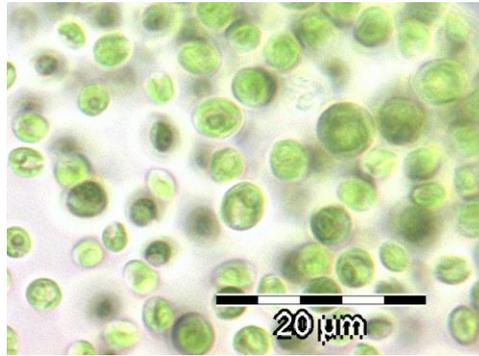


Abb. 3.2: Lichtmikroskopisches Bild von *Chlorella vulgaris*-Zellen. Hellfeld-Aufnahme, 1000-fache Vergrößerung.

Die *C. vulgaris*-Zellen erreichen bei diesen Wachstumsbedingungen einen Zelldurchmesser von ca. 2 – 5 μm .

3.2 Speziation von Uran in Medien und Wässern

Für die Vorhersage und Interpretation des Sorptionsverhaltens und der Wechselwirkungen von Uran mit den Algen ist die Speziation des Urans im Medium und damit einhergehend seine Bioverfügbarkeit ein entscheidender Faktor. Das Mineralmedium wurde für die Sorptionsexperimente eingesetzt, weil es alle Nährstoffe zur Verfügung stellt, die für das Überleben beziehungsweise Wachstum der Algen mit Hilfe der Photosynthese notwendig sind. Auf den Zusatz von organischen Stoffen wurde verzichtet, da deren Einfluss auf die Uranspeziation nicht abgeschätzt werden kann. Das Mineralmedium ähnelt bezüglich der Zusammensetzung, dem untersuchten pH-Wertbereich und der eingesetzten Urankonzentration in der Natur vorkommenden Bergbauwässern, wie z.B. den von Bernhard et al. (1998) beschriebenen Wässern. Oberflächenwasser von der Gessenwiese bei Ronneburg (ehemalige Gessenhalde) wurde als erster Vertreter für mit dem Bergbau in Verbindung stehenden Wässern untersucht. Als weiterer Vergleich wurden außerdem Experimente mit Leitungswasser aus Rossendorf hinzugezogen. Die Uranspeziation ist von der Zusammensetzung, der Urankonzentration, dem pH-Wert und der Ionenstärke der Flüssigkeiten abhängig. Die für die Berechnung der Speziation von Uran in dem Medium und den Wässern wichtigen Bestandteil und Parameter sind in Tab. 3.1 gegenübergestellt. Die genauen Zusammensetzungen sind Kapitel 5.2.3–5.2.5 zu entnehmen.

Die Berechnung der Speziation erfolgte mit dem Computerprogramm EQ3/6 (Wolery, 1992) unter Nutzung der NEA Datenbank (Guillaumont et al., 2003). Im Anschluss an die theoretisch ermittelte Speziation von Uran in den Medien und Wässern, wurde diese mittels TRLFS-Messungen experimentell überprüft.

Tab. 3.1: Überblick über Inhaltsstoffe und Parameter mit Relevanz für die Uranspeziation im Mineralmedium, in Leitungswasser und in Oberflächenwasser.

Parameter	Konzentration (mmol / l)		
	Mineralmedium	Leitungswasser Rossendorf	Oberflächenwasser Gessenwiese
Na	5,5	12,00	0,43
K	10,0	0,13	0,08
Ca	0,01	1,10	8,06
Mg	1,0	0,34	26,42
Cl	0,2	0,78	2,41
Fe	0,025	n.b.	0,01
U	0,005-1,0	0,10	$1,60 \times 10^{-3}$
NO_3^-	10 – 12	0,28 – 0,38	0,07
$\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^-$	<0,01	1,43	0,07
SO_4^{2-}	1,0	0,86	45,39
PO_4^{2-}	$5,00 \times 10^{-3}$	$< 5,00 \times 10^{-3}$	$< 5,00 \times 10^{-3}$
TOC (mg / L)	0,97	2,30	0,07
pH	4,4 – 7,0	7,10	4,2

n.b. nicht bestimmt

3.2.1 Berechnung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium

Die pH-Werte des Mineralmediums wurden beim Einsatz der umweltrelevanten Urankonzentration von 5 μM zwischen 4,4 und 7,0 variiert, um einen relativ großen Bereich der natürlich vorkommenden pH-Werte abzudecken. Der Ausgangspunkt der Untersuchungen war der pH-Wert 4,4. Die dominierenden beziehungsweise häufigsten Spezies (Anteil > 4 %) unter diesen Versuchsbedingungen und die Veränderungen in der Speziation, die durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 auftreten, sind im Speziationsdiagramm (Abb. 3.3) zu sehen. Beim niedrigen pH-Wert von 4,4 wird die Speziation von UO_2^{2+} und $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ dominiert. Dahingegen bilden bei höheren pH-Werten die Uranylhydroxide und Uranylcarbonate die Haupturanspezies im Mineralmedium.

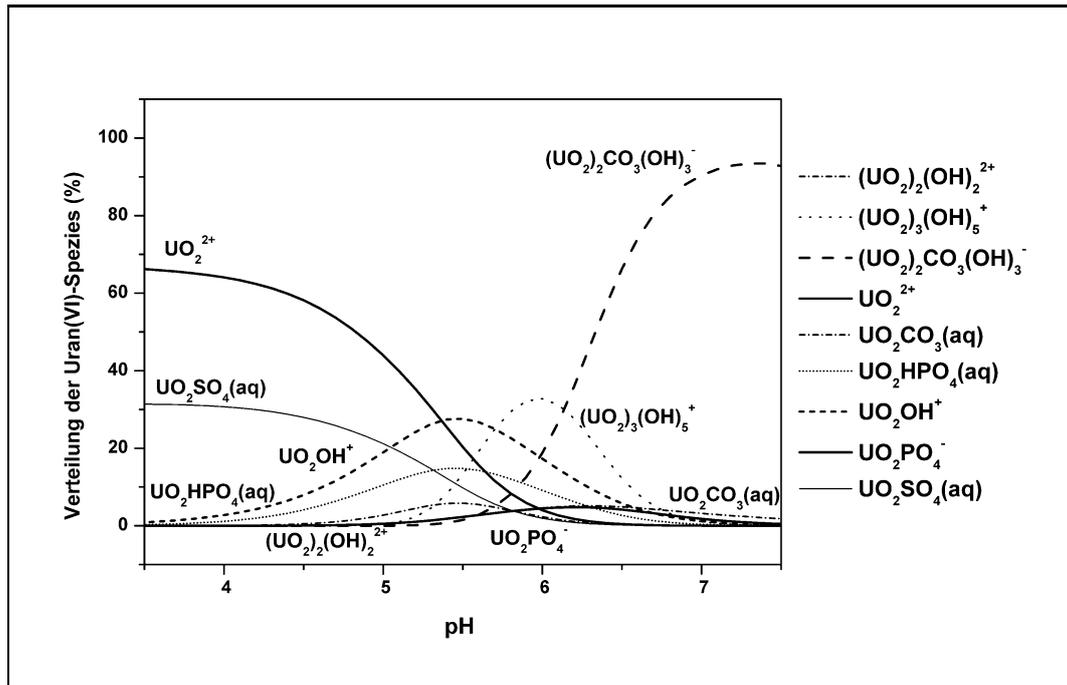


Abb. 3.3: Verteilung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium bei pH-Werten von 4,4 – 7,0 und einer Urankonzentration von 5 μ M.

Die Erhöhung der Urankonzentration im Medium bei pH 4,4 von 5 μ M auf 0,1 mM, 0,5 mM oder 1,0 mM führt zu einer leichten Veränderung der Speziation. Das freie Uranylion und $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ bestimmen weiterhin die Speziation, allerdings werden zusätzlich die Uranylhydroxide $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$, $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ und UO_2OH^+ in signifikanten Mengen gebildet. Eine Zusammenfassung über die gebildeten Uranspezies im Mineralmedium bei pH 4,4 bei verschiedenen Urankonzentrationen gibt Tab. 3.2.

Tab. 3.2: Verteilung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium bei pH 4,4 und unterschiedlichen Urankonzentrationen.

	Mineralmedium pH 4,4			
Urankonzentration [mM]	0,005	0,1	0,5	1,0
Uranspezies [%]				
UO_2^{2+}	59,9	57,2	46,2	37,8
$\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$	28,8	26,8	20,1	15,4
UO_2OH^+	6,5	6,2	5,0	4,1
$\text{UO}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$	3,3	1,9	<1,0	<1,0
$(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$	-	5,9	19,2	25,5
$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$	-	-	5,0	10,8

3.2.2 Berechnung der gebildeten Uranspezies in umweltrelevanten Wässern

Als Vertreter für umweltrelevante Wässer wurden Leitungswasser aus Rossendorf und Oberflächenwasser von der Gessenwiese ausgewählt. Das Verhalten von *Chlorella* in diesen natürlichen Wässern soll mit dem künstlich zusammengestellten Mineralmedium verglichen

werden. Dazu wurde, wie bereits für das Mineralmedium beschrieben, zunächst die theoretisch vorliegende Speziation von Uran in diesen Wässern mittels EQ3/6 berechnet.

Die Uranspeziation im Rossendorfer Leitungswasser mit einer Zugabe von Uran zu einer Endkonzentration von 0,1 mM wird mit 85,1 % von $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ dominiert. Daneben werden noch $(\text{UO}_2)\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ mit 9,9 % und $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ mit 2,8 % in nennenswerten Mengen gebildet.

Das Oberflächenwasser weist eine dem Mineralmedium recht ähnliche Zusammensetzung der wichtigsten Inhaltsstoffe auf. Dementsprechend sind auch die berechneten Uranspezies für das Oberflächenwasser nahezu gleich den im Mineralmedium bei pH 4,4 mit 5 μM Uran gebildeten Spezies. Es bestimmen ganz klar die Uranylsulfate $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ mit 66,2 % und $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$ mit 18 % die Speziation. Als dritte Spezies liegt UO_2^{2+} in signifikanter Menge von 14,3 % vor. Eine Erhöhung der natürlichen Urankonzentration von 1,6 μM auf 5 μM durch Zusatz von Uranylнитrat führte zu keiner Änderung in der Uranspeziation im Oberflächenwasser.

Allerdings ist zu beachten, dass für die in diesem Kapitel beschriebenen Speziationsrechnungen nur die in Kap. 5.2 aufgeführten „anorganischen“ Parameter in die Berechnung eingeflossen sind. Angaben über organische Bestandteile (z.B. Carbonsäuren), die nur als organischer Gesamtkohlenstoffgehalt bestimmt wurden, konnten für die Uranspeziationrechnung nicht berücksichtigt werden. Die Uranspeziation in den natürlichen Wässern ist somit nicht als vollständig zu betrachten.

3.2.3 Nachweis der gebildeten Uranspezies in den Medien durch zeitaufgelöste Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Die TRLFS-Messungen wurden durchgeführt, um die thermodynamische Kalkulation der Uranspeziation in den Medien und Wässern spektroskopisch zu überprüfen. Dazu wurden sowohl Einzelspektren als auch zeitaufgelöste Messungen verwendet. Neben den Peakmaxima konnten auch Lumineszenzlebensdauern zur Bestätigung der Uranspeziation herangezogen werden. In Abb. 3.4 sind die Lumineszenzspektren von U(VI) in Mineralmedium von pH 4,4 – 7,0 und vergleichend dazu ein Spektrum vom freien Uranyl bei pH 4,0 dargestellt. Es zeigt sich, dass alle Spektren von U(VI) im Mineralmedium (MM) gegenüber dem von UO_2^{2+} bathochrom verschoben sind. Dies bedeutet, dass Uran nicht nur als freies Uranyl vorliegt sondern als andere Spezies. Zusätzlich wird auch deutlich, dass sich die Spektrenform insbesondere mit steigendem pH-Wert verändert.

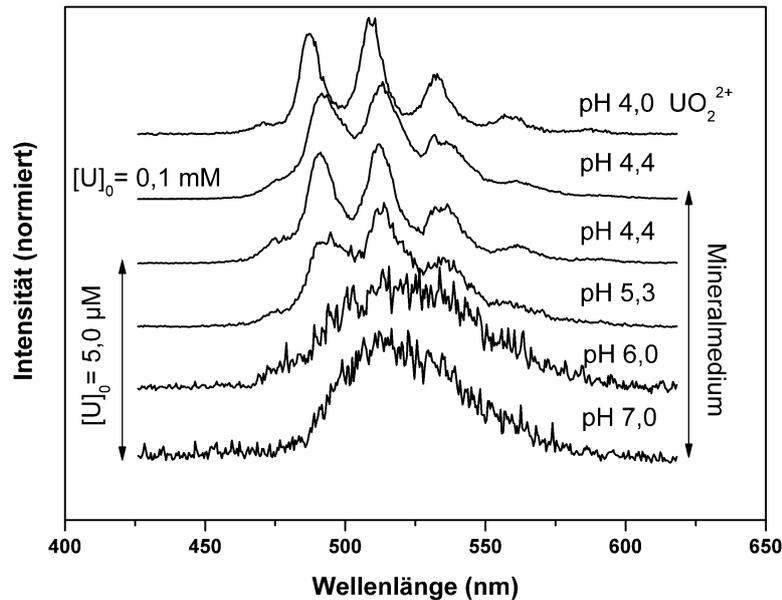


Abb. 3.4: Lumineszenzspektren von U(VI) im Mineralmedium bei unterschiedlichen Urankonzentrationen und pH-Werten. Vergleichsspektrum freies Uranyl bei pH 4.

In Tab. 3.3 sind die Peakmaxima der in Abb. 3.4 gezeigten Spektren zusammengefasst. Die Peakmaxima von MM pH 4,4 und MM pH 5,3 sind unabhängig von der eingesetzten Urankonzentration von 0,1 mM beziehungsweise 5 μ M nahezu gleich. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die vorab erstellte Speziationsrechnung bereits angedeutet hat, dass unter den gewählten Bedingungen nur minimale Unterschiede in der Uranspeziation auftreten.

Tab. 3.3: Lumineszenzemissionsbanden von U(VI) im Mineralmedium (MM) in Abhängigkeit von pH-Wert und Urankonzentration.

Probe	[U] ₀	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
UO ₂ ²⁺ pH 4,4	0,1 mM	471,1	487,9	509,1	532,3	557,8	587,5
MM pH 4,4		475,4	492,9	513,1	534,7	559,7	590,4
MM pH 4,4	5,0 μ M	475,3	491,7	512,3	534,8	560,6	590,2
MM pH 5,3		475,6	492,9	513,2	535,0	558,1	590,0
MM pH 6,0		481,0	496,5	514,5	537,5	559,8	580,0
MM pH 7,0		481,2	497,9	514,2	535,2	557,6	584,4

Für die Interpretation der ermittelten Emissionsbandenlagen wurden diese mit bekannten Bandenlagen von anorganischen Uranyl-Modellverbindungen (Tab. 3.4) verglichen. Die Lumineszenzbandenlage lässt sich somit durch eine Mischung aus freiem Uranyl und Uranylsulfatverbindungen erklären, die die Speziation dominiert. Dadurch sind die Peakmaxima im Vergleich zu UO₂²⁺ hin zu höheren Wellenlängen beziehungsweise im Vergleich zu den Uransulfaten (Geipel et al., 1996) hin zu niedrigeren Wellenlängen

verschoben. Bei pH 6,0 und 7,0 weist die veränderte Spektrenform daraufhin, dass Uranhydroxide für die Speziation von Bedeutung sind, da kaum noch diskrete Peaks erkennbar sind. Außerdem wurde eine Intensitätsabnahme der Lumineszenz bei ansteigendem pH-Wert beobachtet, welche aber durch die Normierung der Spektren nicht graphisch wiedergegeben wird. Diese Intensitätsabnahme kann zum Teil mit dem Entstehen des gemischten Uranylhydroxocarbonatkomplexes $(\text{UO}_2)\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ bei pH 6,0 und 7,0 erklärt werden, welcher bei Raumtemperatur nicht fluoresziert (Geipel et al., 1998).

Tab. 3.4: Lumineszenzemissionsbanden von verschiedenen anorganischen Uranyl-Modellkomplexen.

Probe	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						Referenz	
$\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO})_3(\text{aq})$	465	484	504	524			Bernhard et al. (2001)	
$\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$		477	493	515	538	563	590	Geipel et al. (1996)
$(\text{UO}_2)(\text{OH})_2^{2+}$		480	497	519	542	570	598	Moulin et al. (1998)
$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$		479	496	514	535	556	584	

Zur Ermittlung der Lumineszenzlebensdauer wurden von den Medien zeitaufgelöste Spektren aufgenommen. Als Beispiel für ein solches TRLFS-Spektrum ist das zeitaufgelöste Spektrum von U(VI) in Mineralmedium bei pH 4,4 und einer Urankonzentration von 0,1 mM in Abb. 3.5 dargestellt.

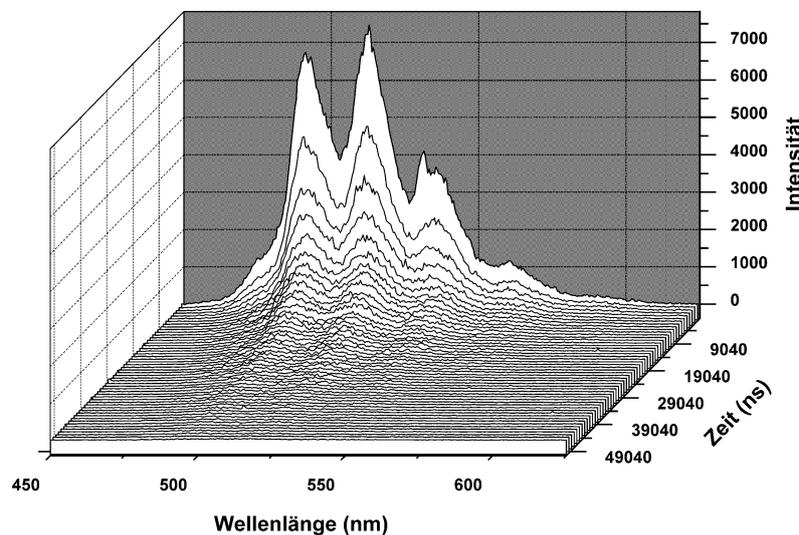


Abb. 3.5: Zeitaufgelöstes laserinduziertes Lumineszenzspektrum von U(VI) im Mineralmedium. $[\text{U}]_0$: 0,1 mM; pH 4,4; Zeitintervall: 40 – 50040 ns.

Aus dem TRLFS-Spektrum und auch aus den Lumineszenzbandenlagen nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten (Tab. 3.5) geht hervor, dass es entlang der Zeitachse zu einer bathochromen Verschiebung der Peakmaxima kommt. Es liegen demnach mehrere Uranspezies und unterschiedliche Lumineszenzlebensdauern im Mineralmedium vor. Das

erste Spektrum nach 40 ns gibt somit die Summe der Lumineszenzemissionen aller Spezies wieder. Die nachfolgend exemplarisch ausgewählten Spektren/Bandenlagen bei 3040 ns und 12040 ns geben dahingegen nur noch die Summe der Lumineszenz von Uranspezies wieder, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeklungen ist.

Tab. 3.5: Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern von Uranspezies im Mineralmedium bei pH 4,4 und $[U]_0 = 0,1 \text{ mM}$

Verzögerungszeit (ns)	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
40	475,4	492,9	513,1	534,7	559,6	590,4
3040	477,4	494,2	514,9	538,5	563,6	590,0
12040	479,4	497,0	518,1	540,5	566,2	594,0
Lumineszenzlebensdauer (ns)	$\tau_1 = 1114 \pm 79$	$\tau_2 = 3679 \pm 176$	$\tau_3 = 12649 \pm 147$			

Die drei ermittelten Lumineszenzlebenszeiten (Tab. 3.5) bestätigen die Annahme, dass mehrere Uranspezies im Mineralmedium vorkommen. Sowohl die Lebensdauern als auch die Peakmaxima lassen sich anhand von Werten aus der Literatur (Geipel et al., 1996; Günther et al., 2007; Moulin et al., 1998) gut den dominierenden Uranspezies UO_2^{2+} ($\tau_1 = 1114 \pm 79 \text{ ns}$) und $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ ($\tau_2 = 3679 \pm 176 \text{ ns}$) und $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ ($\tau_3 = 12649 \pm 147 \text{ ns}$) zuordnen.

Die Uranspeziation im Rossendorfer Leitungswasser versetzt mit 0,1 mM Uran ist weniger komplex als die soeben beschriebene im Mineralmedium, da die klar dominierende Spezies $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ ist, was auch durch das aufgenommene Lumineszenzspektrum nach 40 ns bestätigt wurde (Abb. 3.6).

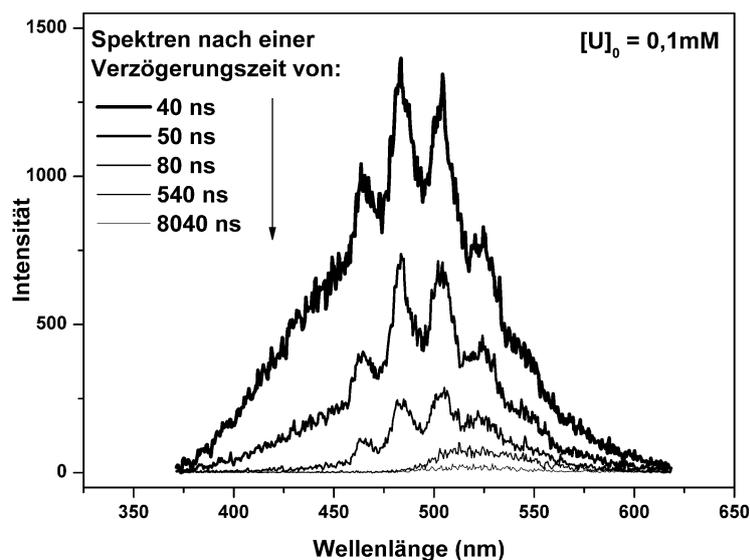


Abb. 3.6: Lumineszenzspektren von Leitungswasser nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten; $[U]_0 = 0,1 \text{ mM}$.

Die erhöhte Lumineszenzintensität im Wellenlängenbereich von ca. 375 – 455 nm ist auf organische Verbindungen im Leitungswasser zurückzuführen. Die Lumineszenz der organischen Verbindungen, aber auch die des aquatischen Calciumuranylcarbonats, ist bei Raumtemperatur nur sehr kurzlebig, sodass im Spektrum nach 80 ns die Intensität von beiden bereits deutlich abgenommen hat. Die Lumineszenzbandenlagen und –lebenszeiten, die für die Urankomplexe im Leitungswasser ermittelt werden konnten, sind in Tab. 3.6 aufgeführt.

Tab. 3.6: Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern der Uranspezies im Leitungswasser.

Verzögerungszeit (ns)	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
40	464,4	483,5	503,2	523,9	546,7	574,7
50	465,2	483,8	503,4	523,4	544,7	575,4
80	465,1	484,3	503,2	522,4	547,7	576,6
540	kein Fit möglich					
8040	kein Fit möglich					
Lumineszenzlebensdauer (ns)	$\tau_1 = 43 \pm 3$	$\tau_2 = 1344 \pm 220$	$\tau_3 = 6315 \pm 303$			

Sowohl die Bandenlagen als auch die bestimmte Lumineszenzlebensdauer für den Calciumuranylcarbonatkomplex stimmen gut mit den von Bernhard et al. (2001) beschriebenen Werten überein (vgl. auch Tab. 3.4). Den zwei weiteren Lebenszeiten und der Lumineszenz, welche z.B. nach 540 ns detektiert wurde, konnten keine weiteren Uranspezies zugeordnet werden, welche durch die Speziationsrechnung vorgegeben wurden. Wie bereits erwähnt, ist für den ebenfalls entstehenden Komplex $(\text{UO}_2)\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ keine Lumineszenz bei Raumtemperatur beschrieben (Geipel et al., 1998) und gleiches gilt für $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ (Bernhard & Geipel, 2010).

Die Speziation von Uran im Oberflächenwasser der Gessenwiese wurde ebenfalls mittels TRLFMS-Messungen überprüft. In Abb. 3.7 ist eine Auswahl an Uranlumineszenzspektren nach verschiedenen Verzögerungszeiten beginnend nach 140 ns dargestellt. Im ersten Spektrum nach 40 ns (nicht dargestellt) waren die Uranlumineszenzbanden nur schwer zu erkennen, da die Lumineszenz von organischen Verbindungen die Emissionsbanden des Urans überlagerte. Die Bandenlagen (Tab. 3.7) der einzelnen Spektren bleiben über die Zeit nahezu gleich und passen gut zu den erwarteten Emissionsbanden der Uranylsulfate gemischt mit dem Einfluss des freien Uranyls. Allerdings wurden nicht drei Lumineszenzlebensdauern entsprechend der drei dominierenden Uranspezies ermittelt, sondern nur zwei. Außerdem sind die Lebensdauern nicht eindeutig den Spezies zuzuordnen. Da das freie Uranyl eine kürzere Lumineszenzlebensdauer besitzt (Günther et al., 2007) als die Uranylsulfate (Geipel et al., 1996) ist die kürzere Lebenszeit von $\tau_1 = 879,5 \pm 81,4$ ns eher dem freien Uranyl zuzuordnen. Die längere Lebenszeit $\tau_2 = 2300,2 \pm 114$ ns würde dann zum Uranylsulfat gehören.

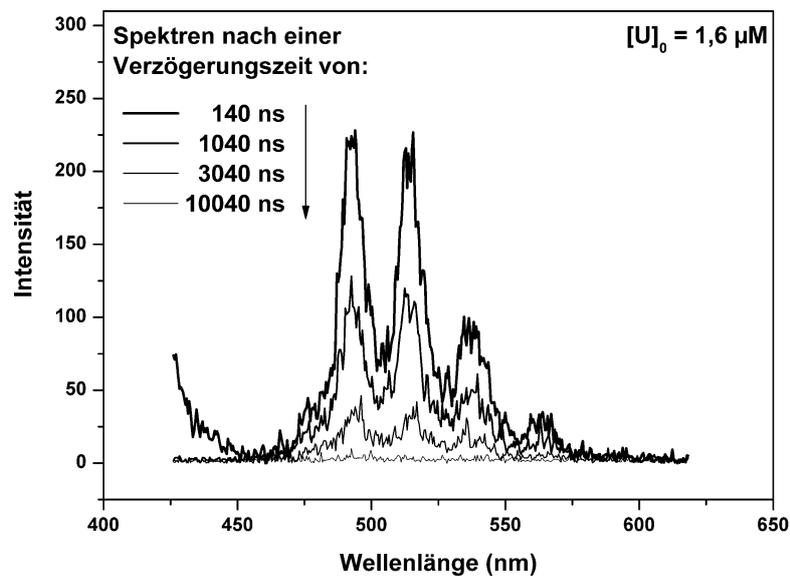


Abb. 3.7: Lumineszenzspektren vom Oberflächenwasser der Gessenwiese nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten.

Tab. 3.7: Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern von Uranspezies im Oberflächenwasser der Gessenwiese.

Verzögerungszeit (ns)	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
140	477,2	493,1	514,2	537,2	562,8	
1040	477,5	493,2	513,8	536,8	564,1	592,3
3040	479,4	494,2	514,8	536,7	564,4	
10040	keine Lumineszenz					
Lumineszenzlebensdauer (ns)	$\tau_1 = 880 \pm 149$		$\tau_2 = 2303 \pm 93$			

Die Verkürzung der Lumineszenzlebensdauern lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass es während der Messung der U(VI)-Lumineszenz im Oberflächenwasser womöglich zu Lumineszenzquenchprozessen kommt. Das Quenchen der Lumineszenz kann durch organische Substanzen im Oberflächenwasser ausgelöst werden, die jedoch nicht näher charakterisiert wurden.

3.3 Bestimmung der funktionellen Gruppen auf der Algenzelloberfläche

Zur weitergehenden Charakterisierung der Algenbiomasse hinsichtlich verfügbarer und damit bindungsrelevanter funktioneller Gruppen sowie als zusätzliche Information zur Interpretation erhaltener Ergebnisse (z.B. Sorptionsversuche mit Uran, Kap. 3.4) wurde die Art und die Konzentration an funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche der Algen mittels potentiometrischer Titration bestimmt. Die Titrationskurve für die Algenzellen beginnend bei pH 4 ist in Abb. 3.8 dargestellt.

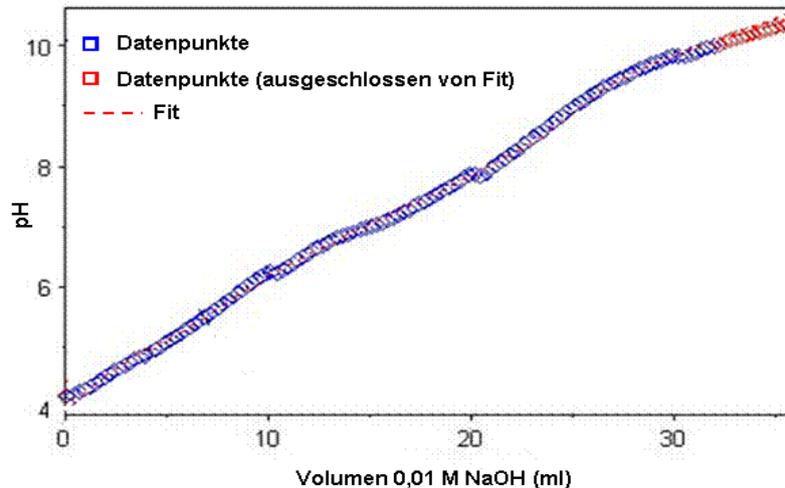


Abb. 3.8: Titrationskurve von *C. vulgaris* (6,6 g Biomasse-TG/I). Die Darstellung der Kurve umfasst die Datenpunkte (blaue Quadrate) und den Fit (gestrichelte rote Linie) mit HYPERQUAD.

Die experimentell ermittelten Daten konnten für die *Chlorella*-Zellen mit Hilfe der Auswertungssoftware HYPERQUAD unter Berücksichtigung eines Modells mit vier Säuregruppen (A-D), welche funktionelle Gruppen repräsentieren, gefittet werden. Es wurden vier pK_S -Werte und die dazugehörige Konzentration der Säuregruppen bestimmt. Eine Übersicht der Ergebnisse und Zuordnung zu funktionellen Gruppen gibt Tab. 3.8 wieder.

Tab. 3.8: Säurekonstanten (pK_S) und Konzentrationen von funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche von *Chlorella*.

Säuregruppe	pK_S	Konzentration der Säuregruppen (10^{-4} mol/g Algen)	mögliche funktionelle Gruppe ^a
A	$4,98 \pm 0,01$	$4,33 \pm 0,1$	Carboxyl
B	$6,68 \pm 0,01$	$4,16 \pm 0,1$	Carboxyl / Phosphat
C	$7,92 \pm 0,01$	$4,05 \pm 0,1$	Phosphat / Amino
D	$10,01 \pm 0,01$	$6,33 \pm 0,1$	Amino / Hydroxyl

a Cox et al. (1999); Phoenix et al. (2002); Yee et al. (2004); Yun & Volesky (2003)

Der pK_S -Wert $4,98 \pm 0,01$ der Säuregruppe A wird Carboxylgruppen der Zelloberfläche zugeordnet. Diese können jedoch auch höhere pK_S -Werte aufweisen und somit neben den Phosphatgruppen auch für den pK_S -Wert der Säuregruppe B von $6,68 \pm 0,01$ verantwortlich sein. Im Bereich des pK_S -Werts von $7,92 \pm 0,01$ (Säuregruppe C) können sowohl Phosphat- als auch Aminogruppen dissoziieren. Bei der oberhalb von pH 8 titrierten Gruppe D könnte es sich ebenfalls um Amino- beziehungsweise um Hydroxylgruppen handeln. Diese wurden jedoch aufgrund des begrenzten Titrationsbereichs (pH 4 – 10) nicht vollständig erfasst, was bei der Berücksichtigung des Ergebnisses zu beachten ist. Die Konzentration der gefundenen funktionellen Gruppen A - C auf der Zelloberfläche ist mit Werten von $4,05 \times 10^{-4}$ – $4,33 \times 10^{-4}$ mol/g Biomasse-Trockengewicht nahezu gleich. Für *Chlorella miniata* sind in

der Literatur vergleichbare Angaben für die drei pK_S -Werte und die Konzentrationen der jeweiligen funktionellen Gruppe auf der Zelloberfläche beschrieben (Han et al., 2006). In den nachfolgend vorgestellten Sorptionsversuchen mit Uran können somit je nach gewähltem pH-Wert Carboxyl, Phosphat- und Aminogruppen an der Wechselwirkung mit Uran beteiligt sein. Allerdings ist bisher in der Literatur für die Wechselwirkung von Mikroorganismen mit Uran in der Regel nur die Beteiligung von Phosphat- und Carboxylgruppen beschrieben.

3.4 Biosorption von Uran durch *C. vulgaris* im Mineralmedium

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Sorptionsversuche von Uran(VI) mit variierender Stoffwechselaktivität der Zellen beziehungsweise unterschiedlichen Urankonzentrationen und/oder pH-Werten in Mineralmedium beschrieben.

3.4.1 Sorption von Uran durch metabolisch aktive *Chlorella*-Zellen

Die Sorption von Uran durch metabolisch aktive *Chlorella*-Zellen im Mineralmedium wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Zunächst wurde die Sorptionsfähigkeit der Algen bei der niedrigen Urankonzentration von $5 \mu\text{M}$ im pH-Wertbereich von 4,4 – 7,0 untersucht. Wie aus Abb. 3.9 (links) hervorgeht, sind lebende *Chlorella*-Zellen bei einer Biomassekonzentration von $0,76 \text{ g Biomasse-TG/l}$ in der Lage, innerhalb kürzester Zeit (5 min) fast das gesamte Uran (ca. 80 %) aus der Lösung zu entfernen.

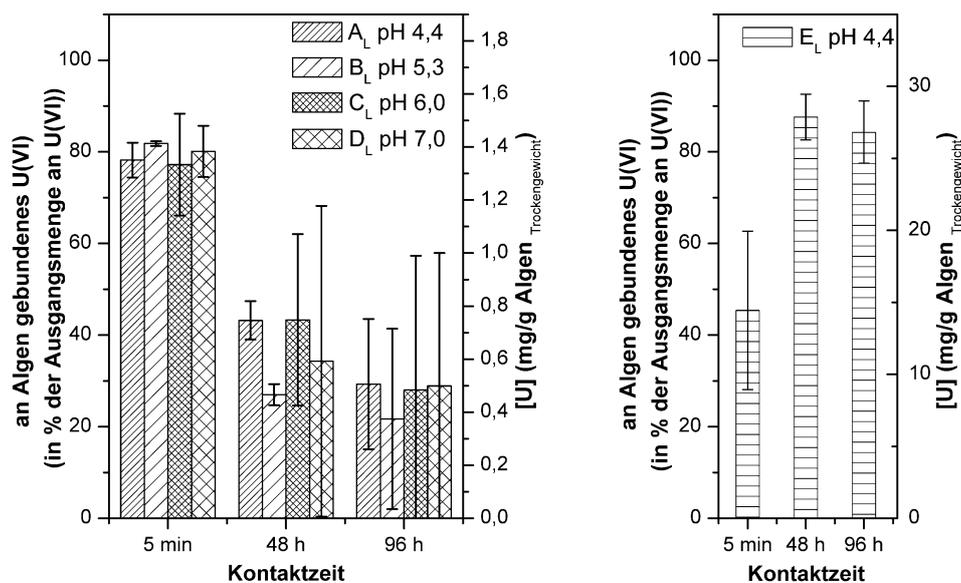


Abb. 3.9: Sorption von U(VI) an lebende *Chlorella*-Zellen im Mineralmedium bei $[U]_0 = 5 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von pH-Wert (links) und bei pH 4,4 mit $[U]_0 = 0,1 \text{ mM}$ (rechts). X_L: lebende Zellen.

Die durch die lebenden Algen ($A_L/pH\ 4,4$; $B_L/pH\ 5,3$; $C_L/pH\ 6,0$; $D_L/pH\ 7,0$) gebundene Uranmenge schwankt je nach pH-Wert zwischen $1,3 \pm 0,2$ und $1,4 \pm 0,1$ mg U/g Algenbiomasse-TG. Nach weiterer Kultivierung der metabolisch aktiven Algen über 48 h und 96 h sind nur noch 27 % bis 43 % bzw. 22 % bis 30 % des ursprünglich eingesetzten Urans an die Algen gebunden. Das heißt, es wurden während der Kultivierung innerhalb von 96 h 63 % bis 74 % des zuvor von den Algen gebundenen Urans freigesetzt (Abb. 3.9, links). Die Lebendzellzahlen, die durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten auf Agarplatten bestimmt wurden, blieben bei allen Ansätzen konstant. Die pH-Werte stiegen während der Kultivierung auf Werte zwischen 7,4 und 8,5 an. Dieser pH-Wertanstieg kann auf die Photosyntheseaktivität der Algen im ungepufferten Medium zurückgeführt werden (Shiraiwa et al., 1993; Talling, 1976). Der Verbrauch von Kohlendioxid führt zu einer Verschiebung des CO_2 - HCO_3^- - CO_3^{2-} -Gleichgewichts, wodurch der pH-Wert des Mediums in den mild-alkalischen Bereich driftet (Goldman & Toerien, 1972; Hofslagare et al., 1985; Hofslagare et al., 1983; Shiraiwa et al., 1993; Talling, 1976). Außerdem kann auch der Verbrauch von Nitrat aus dem Medium durch die Algen einen Anstieg der Alkalinität bewirken (Brewer & Goldman, 1976; Hofslagare et al., 1985). Der pH-Wertanstieg wird als Ursache für die Freisetzung von Uran während der Kultivierung über 96 h ausgeschlossen, da die Sorption von Uran durch die Algen auch bei pH 7,0 erfolgte. Außerdem sollte ein pH-Wertanstieg durch Deprotonierung von Carboxyl- und Phosphatgruppen zu einer negativ geladeneren Algenzelloberfläche führen, welche eine Sorption von kationischen Uranylspezies begünstigt. Die mittels potentiometrischer Titration ermittelten pK_S -Werte von 4,98 und 6,68 für Carboxyl- und Phosphatgruppen (vgl. Kap. 3.3) bestätigen die Annahme einer vermehrten Deprotonierung dieser funktionellen Gruppen im untersuchten pH-Bereich. Da viele positiv geladene Aminogruppen bei pH-Werten zwischen 6 und 9 protoniert bleiben (vgl. potentiometrische Titration Kap. 3.3, Aminogruppen mit pK_S 7,92 bzw. 10,01), wird eine Komplexierung von anionischen Uranspezies, welche im neutralen pH-Wertbereich dominieren (vgl. Abb. 3.3), wahrscheinlich durch die Aminogruppen gewährleistet. Was letztlich zur Mobilisierung des zuvor gebundenen Urans durch die stoffwechselaktiven Algen geführt haben könnte, wird in Kap. 3.7 näher betrachtet.

In einem weiteren Versuch mit metabolisch aktiven *Chlorella*-Zellen wurde die Urankonzentration im Mineralmedium bei pH 4,4 auf 0,1 mM erhöht. In diesem Fall wurden innerhalb der ersten Minuten $14,3 \pm 5,5$ mg U/g Algen-TG von den lebenden Algen gebunden. Dies entspricht 45 % des ursprünglich zugesetzten Urans (Abb. 3.9, rechts). Mit zunehmender Kontaktzeit von 48 h beziehungsweise 96 h stieg der Anteil an gebundenem

Uran bis auf $27,6 \pm 1,6$ bzw. $26,6 \pm 2,1$ mg U/g Algen-TG an. Insgesamt wurden somit ca. 85 % des ursprünglich eingesetzten Urans an die Algenzellen gebunden. Anhand der mittels potentiometrischer Titration ermittelten Anzahl an funktionellen Gruppen (vgl. Kap. 3.3, Tab. 3.8) läßt sich das Ergebnis für die sorbierte Uranmenge recht gut einordnen. Bei einem pH von 5 würden unter Berücksichtigung des ersten pK_S -Wertes von 4,98 die Hälfte der vorhandenen Carboxylgruppen, also ca. 0,2 mmol/g Algen-TG, deprotoniert vorliegen. Theoretisch könnten somit maximal 0,2 mmol U/g Algen-TG also ca. 50 mg U/g Algen-TG gebunden werden. Der pH-Wert im Mineralmedium blieb bei diesen Versuchsbedingungen konstant bei $pH 4,4 \pm 0,1$. Demnach ist die bei pH 4,4 maximal sorbierte Uranmenge von 27,6 mg U/g Algen-TG ein realistisches Ergebnis, da die Anzahl der deprotonierten und damit für die Uranbindung relevanten Carboxylgruppen in diesem Fall unterhalb der für pH 5 ermittelten 0,2 mmol/g Algen-TG liegt. Somit können auch nur weniger als 0,2 mmol U/g Algen-TG bzw. 50 mg U/g Algen-TG gebunden sein. Allerdings ist es für die Einordnung der erhaltenen Ergebnisse wichtig, die Lebendzellzahlen der Algen zu betrachten. Bei dieser erhöhten Urankonzentration von 0,1 mM sind unter den gewählten Versuchsbedingungen innerhalb von 48 h alle ursprünglich lebenden Zellen abgestorben. Damit läßt sich auch erklären, dass die Sorptionsexperimente mit 0,1 mM Uran nach 48-stündiger Inkubation vergleichbare Ergebnisse lieferten wie die Sorptionsexperimente mit toter Biomasse (vgl. Kap. 3.4.2). Außerdem wurde beim Einsatz von hohen Urankonzentrationen während der Algenkultivierung ein Verblässen der Grünalgen beobachtet. Dieser Einfluss von Uran auf Pflanzenzellen wurde auch bei der Wasserpflanze *Lemna gibba* L. beobachtet (Mkandawire & Dudel, 2002) und wird als Chlorose bezeichnet. In der Literatur werden Defizite in der Mineralstoffversorgung oder Einwirkung von Toxinen (Schwermetalle) auf die Pflanzen als Auslöser für die Chlorose beschrieben. Der durch Schwermetalle ausgelöste Stress kann direkten Einfluss auf die Photosynthese (Rai et al., 1991) haben oder oxidativen Stress bedingen (Pinto et al., 2003), der letztlich zum Zelltod führt. Da unter den gegebenen Bedingungen die *Chlorella vulgaris*-Zellen eine Urankonzentration von 5 μ M überleben und ab einer Konzentration von 0,1 mM absterben, kann die toxisch wirkende Urankonzentration auf einen Wert zwischen diesen beiden untersuchten Konzentrationen eingegrenzt werden.

3.4.2 Sorption von Uran durch tote *Chlorella*-Zellen

Vergleichend mit den Sorptionsversuchen im Mineralmedium an lebenden *Chlorella*-Zellen wurden die Versuche auch mit abgetöteten (autoklavierten) Zellen durchgeführt. Aus Mineralmedium mit 5 μM Uran bei pH 4,4 (Probe A_T) wurden innerhalb von 5 min $1,6 \pm 0,1$ mg U/g Algen-TG an die Zellen gebunden (Abb. 3.10, links).

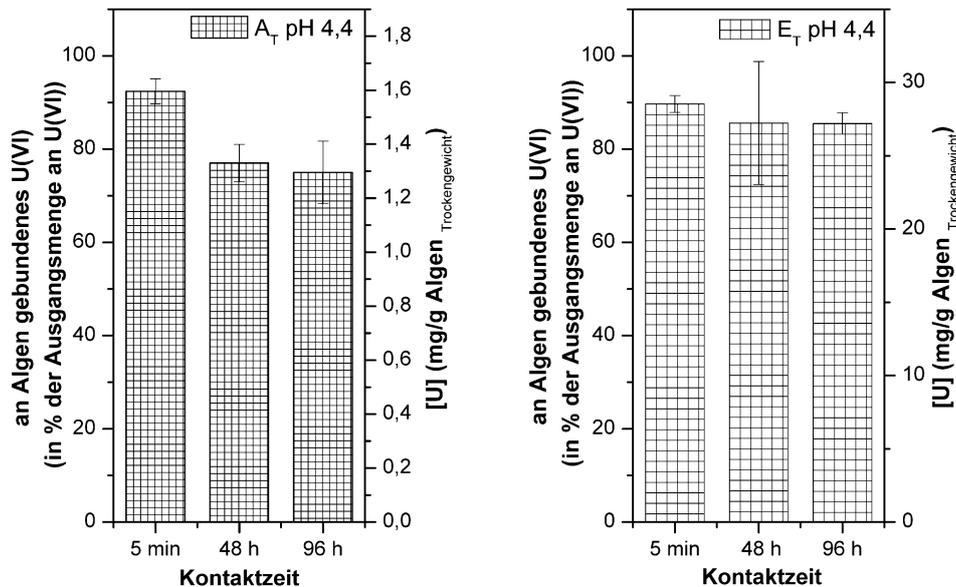


Abb. 3.10: Sorption von U(VI) durch tote *Chlorella*-Zellen im Mineralmedium bei pH 4,4 und $[U]_0 = 5 \mu\text{M}$ (links) und bei $[U]_0 = 0,1 \text{ mM}$ (rechts). X_T : tote Zellen

Im Gegensatz zu dem in Kap. 3.4.1 beschriebenen Versuch mit metabolisch aktiven Algen wurde während der fortgeführten Inkubation innerhalb von 96 h maximal 23 % des gebundenen Urans erneut freigesetzt. Demnach unterscheidet sich das Sorptionsverhalten von lebenden und toten Algenzellen. Der pH-Wert blieb bei diesem Versuch mit toten Zellen konstant bei $\text{pH } 4,4 \pm 0,1$. Wie aus Abb. 3.10 (rechts) hervorgeht, verhielten sich die toten *Chlorella*-Zellen bei der hohen Urankonzentration von 0,1 mM bei pH 4,4 (Probe E_T) in den ersten fünf Minuten des Sorptionsexperiments anders als die lebenden Zellen (vgl. Probe E_L , Kap. 3.4.1). Durch die tote Biomasse wurden von Beginn an ca. 90 % des zugesetzten Urans sorbiert, was $28,3 \pm 0,6$ mg U/g Algen-TG entspricht. Nach 96 h Inkubationszeit sind immer noch $27,0 \pm 0,7$ mg U/g Algen-TG an die tote Biomasse gebunden, was 86 % des eingesetzten Urans entspricht. Wie bereits in Kap. 3.4.1 ausgeführt, bedingt die zu Beginn des Experiments noch vorhandene metabolische Aktivität der lebenden Algenzellen eine verminderte Uransorption in den ersten 5 min im Vergleich zu der toten Biomasse. Da während der 48 h Inkubation jedoch auch ursprünglich lebende Zellen absterben, lassen sich die ähnlichen Mengen an sorbiertem Uran durch ursprünglich aktive und inaktive Biomasse nach 48 h und

96 h Inkubation erklären. Auch in diesem Fall gilt, dass die durch potentiometrische Titration ermittelten Anzahl deprotonierter funktioneller Gruppen von 0,2 mmol/g Algen-TG (vgl. Ausführung Kap. 3.4.1 und Kap.3.3) bei pH 5 maximal eine Bindung von 0,2 mmol Uran also 50 mg U/g Algen-TG ermöglichen würde. Unter Berücksichtigung des im Sorptionsexperiment mit toter Biomasse verwendeten pH-Wertes von 4,4, kann der erhaltene Wert von 28,3 mg U/g Algen-TG, welcher unter dem für pH 5 ermittelten Wert liegt, als realistisch angesehen werden.

3.5 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen *Chlorella* und Uran in natürlichen Wässern

Zur Überprüfung, inwiefern die gewonnenen Erkenntnisse aus den Experimenten im Modellsystem Mineralmedium bezüglich der Wechselwirkung zwischen *Chlorella* und Uran auf umweltrelevante Systeme übertragbar sind, wurden erste Versuche in natürlichen Wässern durchgeführt.

3.5.1 Sorption von Uran aus Leitungswasser

Das Rossendorfer Leitungswasser wurde als Beispielsystem ausgewählt, weil bekannt ist, dass Trinkwasser zumindest geringe Mengen an Uran enthalten kann. Kontaminiertes Trinkwasser könnte somit direkten Einfluss auf die Gesundheit von Menschen haben.

Um einen Effekt auf die Vitalität der Algen zu provozieren, wurde in diesem Fall mit der vergleichsweise hohen Urankonzentration von 0,1 mM gearbeitet, die im natürlichen Trinkwasserkreislauf so allerdings nicht vorkommen sollte. In Abb. 3.11 ist dargestellt, wie viel Uran die lebenden Algenzellen innerhalb von 96 h aus dem Wasser entfernen konnten. Innerhalb der ersten 48 h blieb die sorbierte Uranmenge unter 7 % der ursprünglich eingesetzten. Insgesamt konnten die stoffwechselaktiven *Chlorella*-Zellen innerhalb von 96 h maximal 30,4 % der eingesetzten Uranmenge aus dem Leitungswasser entfernen. Dies entspricht $9,8 \pm 1,7$ mg U/g Biomasse-TG. Aus Leitungswasser konnten die Zellen somit nur etwa ein Drittel der Uranmenge, verglichen mit den Werten, die die Zellen im Mineralmedium erreicht hatten (vgl. Kap. 3.4.1), entfernen.

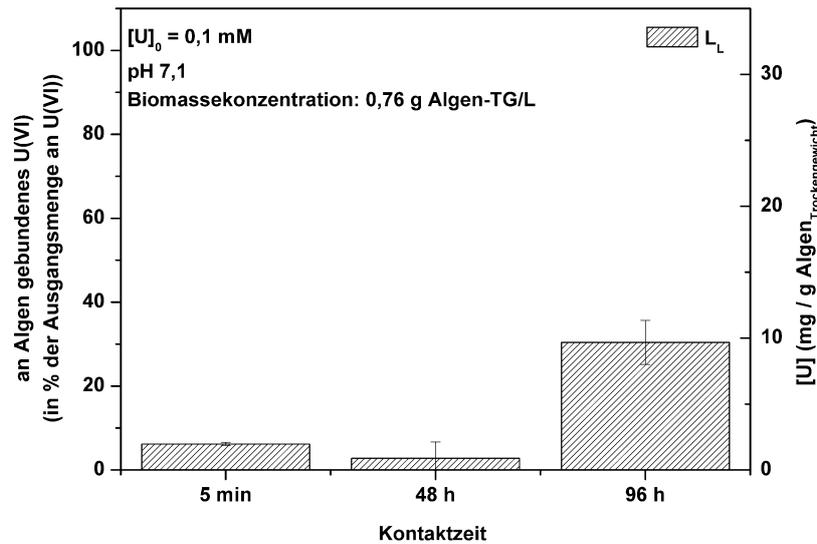


Abb. 3.11: An lebende *Chlorella*-Zellen gebundenes Uran aus Leitungswasser; $[U]_0 = 0,1 \text{ mM}$.

Der Unterschied in der sorbierten Uranmenge aus Leitungswasser und Mineralmedium kann dadurch erklärt werden, dass im Leitungswasser die Lebendzellzahl erst nach 48 h auf ca. 24 % absinkt, wohingegen zu diesem Zeitpunkt im Mineralmedium schon alle Zellen abgestorben waren. Die Unterschiede in der Überlebensrate scheinen dabei durch den chemotoxischen Einfluss der unterschiedlichen Uranspezies zustande zu kommen. In Leitungswasser ist die dominierend gebildete Spezies Calciumuranylcarbonat (vgl. Kap. 3.2.2 & 3.2.3), welches zum Teil auch als weißer Niederschlag direkt nach der Uranzugabe ausgefallen ist. Urancarbonspezies sind sowohl gelöst als auch als Präzipitat für chemische Wechselwirkungen mit den Algenzellen nicht verfügbar (Nakajima et al., 1979). Die Algenzellen im Leitungswasser waren demnach weniger Stress durch Uran ausgesetzt als die Zellen im Mineralmedium, da eine direkte Wechselwirkung (Sorption) wohl zunächst nur in geringem Maße stattfand. Die verminderte Uranbindung innerhalb von 48 h kann somit auch durch aktive Einflussnahme der vitalen Algen begründet werden. Ähnliches konnte für die lebenden Algen im Mineralmedium für die Probe nach 5 min Einwirkzeit des Urans beobachtet werden. Über die Dauer der Kultivierung verändern sich die Bedingungen scheinbar. Dies führt letztlich zu einem Absterben eines Teils der Algen und offensichtlich als Folge dessen auch zu einer erhöhten Uranbindung.

3.5.2 Sorption von Uran aus Oberflächenwasser der Gessenwiese

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit von *Chlorella*-Zellen überprüft, Uran aus einem natürlichen mit dem Bergbau in Verbindung stehenden Wasser zu entfernen. Das Oberflächenwasser hatte zum Zeitpunkt der Probennahme eine natürliche Urankonzentration von ca. $1,6 \mu\text{M}$ und einem pH-Wert von $4,0 \pm 0,2$. In dem oberirdischen verlaufenden Wasser war natürliches Algenwachstum u.a. aufgrund der Lichtexposition möglich. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Wasserproben haben gezeigt, dass verschiedene Algen beziehungsweise Mikroorganismen in diesem Wasser leben.

Der eigentliche Sorptionsversuch fand in filtriertem Oberflächenwasser statt, um nur den Einfluss von *Chlorella* auf den Urangehalt zu untersuchen. Die natürlich vorliegende Urankonzentration von $1,6 \mu\text{M}$ wurde durch die Filtration nicht verringert. Analog den Experimenten in Mineralmedium wurde auch in diesem Fall lebende und tote Biomasse eingesetzt. In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse der Uransorption aus originalem und modifiziertem ($5 \mu\text{M}$ Uran) Gessenwiesenwasser dargestellt.

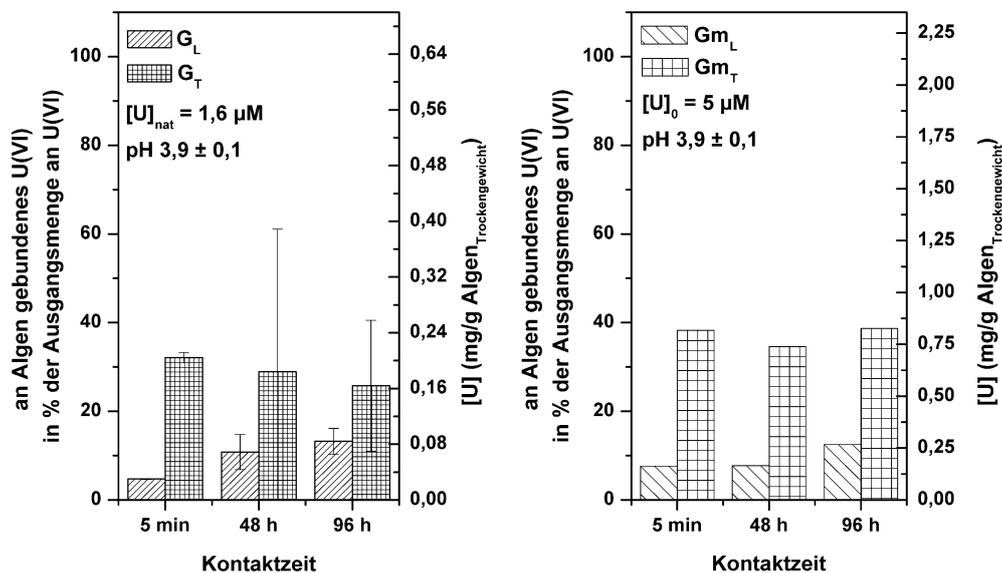


Abb. 3.12: An lebende und tote *Chlorella*-Zellen sorbiertes Uran aus natürlichem (links) und modifiziertem (rechts) Oberflächenwasser der Gessenwiese. G_L / G_{M_L} = lebende Algen; G_T / G_{M_T} = tote Algen; Biomassekonzentration: 0,5 g Algen-TG/l.

Aus den Grafiken der beiden Versuche geht hervor, dass sowohl lebende als auch tote *Chlorella*-Zellen nur einen Bruchteil des Urans aus dem Oberflächenwasser entfernen konnten. Lebende *Chlorella*-Zellen konnten maximal 13 % Uran aus natürlichem und aus dem modifizierten Oberflächenwasser sorbieren. Dies entspricht bei einer

Biomassekonzentration von 0,5 g Biomasse-TG/l 84,8 µg U/g Algen-TG bzw. 283 µg U/g Algen-TG. Tote *Chlorella*-Zellen haben mit 31 % Uran aus natürlichem und 39 % aus modifiziertem Oberflächenwasser etwas mehr Uran gebunden als lebende Zellen. Pro Gramm Algen-TG entsprechen diese Werte 205,6 µg Uran bzw. 827,4 µg Uran. Tendenziell scheinen tote *Chlorella*-Zellen somit auch in diesem Fall mehr Uran zu binden als lebende. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass lebende Zellen die Möglichkeit besitzen passiv oder aktiv die Uranbindung zu beeinflussen. Die Vitalität der lebenden Zellen in diesem Versuch wurde anhand der koloniebildenden Einheiten auf Agarplatten zum Zeitpunkt der Probennahme verifiziert. Die Zahl der lebenden *Chlorella*-Zellen blieb dabei über den gesamten Versuchverlauf hin weitgehend konstant. Kultivierungsversuche mit *Chlorella*-Zellen im Oberflächenwasser waren nicht erfolgreich. Die Zellen wachsen also im Oberflächenwasser nicht, können aber im Versuchszeitraum von 96 h überleben. Unter Berücksichtigung der berechneten Uranspeziation im Oberflächenwasser (Kap. 3.2.2) ist davon auszugehen, dass in erster Linie Uran in Form von UO_2^{2+} gebunden wurde (Nakajima et al., 1979). Inwiefern die Uranylulfatspezies $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ und $\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$ mit den Algenzellen in Wechselwirkung treten, kann nicht abgeschätzt werden. Außerdem konnte der Anteil an organischen Uranylverbindungen von vornherein nicht in die Berechnung einbezogen werden, da die organischen Substanzen im Wasser nicht definiert, sondern nur als organischer Gesamtkohlenstoffgehalt bestimmt wurden. Es ist jedoch offensichtlich, dass insbesondere die toten Zellen noch weitere Uranspezies neben dem freien Uranyl gebunden haben müssen. Dennoch bleibt der größere Teil des Urans sowohl im natürlichen als auch im modifizierten Oberflächenwasser ungebunden. Natürlich hat auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Sorptionseigenschaften. Die Konkurrenz der Uranspezies mit Protonen um die Bindungsstellen auf der Algenoberfläche ist bei pH $3,9 \pm 0,1$ größer als bei den höheren pH-Werten von 4,4 – 7,0, die im Mineralmedium vorlagen. So beschrieben Horikoshi et al. (1979a) den pH-Bereich zwischen 5 – 7 für die Uransorption durch *Chlorella regularis* als optimal. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten potentiometrischen Titration (Kap. 3.3) bestätigen diese Erkenntnis, da die ermittelten $\text{p}K_S$ -Werte für die funktionellen Gruppen zwischen 4,98 und 10,01 liegen und somit erst ab pH 5 die Anzahl deprotonierter funktioneller Gruppen deutlich zunimmt.

3.6 Einfluss der Stoffwechselaktivität auf die Uran(VI)-Sorption

Aus den Sorptionsexperimenten in Mineralmedium mit einer Biomassekonzentration von 0,76 g Algen-TG/l bei pH 4,4 und unterschiedlichen Urankonzentrationen geht deutlich hervor, dass die Stoffwechselaktivität der Algen einen Einfluss auf das Sorptionsverhalten von Uran hat. Bei niedriger Urankonzentration (5 μM) kommt es nach einer raschen Bindung des Urans durch die Algen bei andauernder Stoffwechselaktivität zu einer Mobilisierung des Urans. Im Falle der hohen Urankonzentration (0,1 mM) erfolgt die Anbindung des Urans bei lebenden Algen zunächst in geringerem Ausmaß (45 %) als bei den toten Zellen (90 %). Allerdings führt das Absterben der zunächst lebenden Algen, vermutlich ausgelöst durch die hohe Urankonzentration, letztlich zu einem gleichartigen Sorptionsverhalten von ursprünglich lebenden und von Beginn an toten Algen. Es wurden in beiden Fällen nach 96 h ca. 85 % der eingesetzten Uranmenge durch die Algenbiomasse entfernt. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen von Günther et al. (2008) für eine Biomassekonzentration von 0,75 g Algen-TG/l und einer Urankonzentration von 0,1 mM in 0,1 M Natriumperchlorat beschriebenen Werten von 96 % bei pH 5 und 95,5 % bei pH 6 überein.

Die Bindung von Uran an die Algenbiomasse erfolgt demnach zumindest zu Beginn passiv. Für eine anhaltende Sorption scheint dabei die Stoffwechselaktivität der Algen hinderlich zu sein, da Uran durch die lebenden Algen mobilisiert (bei geringer Urankonzentration) beziehungsweise anfänglich in geringerem Ausmaß gebunden (bei hoher Urankonzentration) wurde. Obwohl aus den natürlichen Wässern tendenziell weniger Uran durch die Algenzellen entfernt wurde als aus dem Modellsystem Mineralmedium und andere Faktoren (z.B. die Uranspeziation, der pH-Wert, die Zusammensetzung des Wassers) die Sorption mitbestimmen, bestätigen die Sorptionsergebnisse der Algen in den natürlichen Wässern einen Einfluss der Stoffwechselaktivität auf die Sorption von Uran. Die lebenden Zellen im Leitungswasser haben erst nach dem Absinken der Lebendzellzahl auf 24 % vermehrt Uran gebunden. Im Oberflächenwasser der Gessenwiese haben lebende Zellen ebenfalls tendenziell weniger Uran gebunden als tote Zellen.

3.7 Desorption von algengebundenem Uran durch stoffwechselrelevante Substanzen

Die Sorptionsexperimente mit lebenden *Chlorella*-Zellen zeigten, dass bei einer umweltrelevanten Urankonzentration von 5 μM von den Algen zunächst gebundenes Uran während der Kultivierung freigesetzt wird. Eine mögliche Erklärung für diese Mobilisierung des Urans ist die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, wie z. B. organischen Säuren, während des Zellwachstums. Deshalb wurden vier Substanzen, die mit dem Stoffwechsel der Algen in Verbindung gebracht werden können, auf ihre Fähigkeit getestet, Uran zu mobilisieren, welches an abgetötete Algen gebunden war.

Die organischen Säuren Oxal- und Citronensäure wurden ausgewählt, weil sie als Zwischenprodukte des Algenstoffwechsels in das Kulturmedium freigesetzt werden könnten. Als gut untersuchte Modellverbindung und Vertreter für organische Phosphatverbindungen wurde ATP eingesetzt, welches in jeder Zelle vorkommt. Die vierte Testsubstanz war Glutathion, welches als Vorstufe von in Pflanzenzellen gebildeten Phytochelatinen gilt (Grill et al., 1986; Grill et al., 1987). Diese Phytochelatine sind Polypeptide, bestehend aus den Aminosäuren Cystein, Glycin und Glutaminsäure, welche eine wichtige Rolle beim Umgang der Pflanzenzelle mit Schwermetallen spielen (Gekeler et al., 1988).

Für den Desorptionsversuch wurden tote Algenzellen in Mineralmedium bei pH 4,4 und pH 7,4 mit einer Urankonzentration von 5 μM suspendiert. Nach 30 Minuten hatten die Zellen ca. 89 % der zugesetzten Uranmenge sorbiert. Daraufhin wurden zu den jeweiligen Ansätzen entweder Oxalsäure, Citronensäure, ATP oder Glutathion im zwanzigfachen Überschuss gegenüber Uran zugesetzt. In Abb. 3.13 sind die prozentualen Mengen an Uran dargestellt, die innerhalb von 24 h ohne bzw. mit Zusatz der organischen Substanzen von dem an die Algen gebundenen Uran freigesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass in den Kontrollproben bei pH 4,4 und pH 7,4 innerhalb von 24 h nur ca. 5 % des gebundenen Urans freigesetzt wurden. Dahingegen wurden bei pH 4,4 beziehungsweise pH 7,4 durch Zugabe von Citronensäure 82 % beziehungsweise 79 % und von Oxalsäure 71 % und 55 % des an den Algen sorbierten Urans mobilisiert. In Gegenwart von ATP wurden bei pH 4,4 85 % und bei pH 7,4 81 % des Urans innerhalb von 24 h von den Algen desorbiert. Die geringste Menge an freigesetztem Uran, mit 14 % bei pH 4,4 und 45 % bei pH 7,4 zeigte der Ansatz mit Zusatz von Glutathion. Demnach sind im neutralen bis mild alkalischen pH-Bereich von den getesteten Substanzen insbesondere Citronensäure, Oxalsäure und ATP in der Lage Uran von *C. vulgaris*-Zellen zu desorbieren.

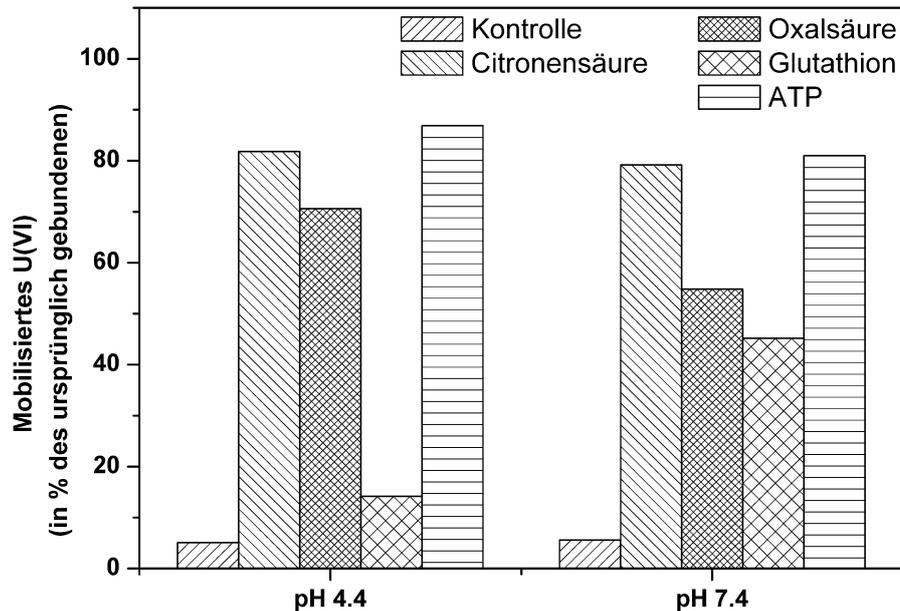


Abb. 3.13: Mobilisierung von an tote Algen gebundenem U(VI) innerhalb von 24 h ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von Citronensäure, Oxalsäure, Glutathion oder ATP in 20-fachem Überschuss im Vergleich zur Ausgangskonzentration an Uran (5 μ M).

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die gebildeten Uran-Algen-Komplexe instabiler sein müssen als die Komplexe, welche sich zwischen Uran und den getesteten Stoffwechselprodukten ausbilden. Für die getesteten Substanzen lässt sich anhand der Desorptionsergebnisse folgende Reihenfolge für die Fähigkeit algengebundenen Uran zu mobilisieren festlegen: Glutathion < Oxalsäure < Citronensäure < ATP.

3.8 Stabilität der gebildeten Uran(VI)-Algen-Komplexe

Die in Kap. 3.7 beschriebenen Ergebnisse ermöglichen nähere Betrachtungen zur Stabilität der in Mineralmedium bei pH 4,4 bzw. pH 7,4 gebildeten Uran-Algen-Komplexe. In der nachfolgend aufgeführten Tabelle (Tab. 3.9) sind die Urankomplexe mit dazugehöriger Komplexbildungskonstante aufgelistet, die sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen wahrscheinlich mit den auf Desorptionsfähigkeit getesteten stoffwechselrelevanten Substanzen gebildet haben. Zur Berechnung der dominierenden Spezies wurde das Speziationsprogramm EQ 3/6 eingesetzt.

Tab. 3.9: Übersicht der U(VI)-Komplexe mit deren Komplexbindungskonstante, die in Mineralmedium mit Citronensäure, Oxalsäure, ATP und Glutathion bevorzugt gebildet werden.

pH-Wert	Komplexe	Komplexbildungskonstante	Referenz
pH 4,4	$\text{UO}_2(\text{Oxalat})_2^{2-}$	$\log\beta = 11,65 \pm 0,15$	Hummel et al. (2005)
	$\text{UO}_2\text{Oxalat}(\text{aq})$	$\log\beta = 7,13 \pm 0,16$	
	$\text{UO}_2(\text{Citrat})^-$	$\log\beta = 8,96 \pm 0,17$	Hummel et al. (2005)
	$(\text{UO}_2)(\text{ATP})\text{H}^-$	$\log\beta = 14,7 \pm 0,02$	De Stefano et al. (2005)
	$(\text{UO}_2)(\text{ATP})_2^{6-}$	$\log\beta = 9,14 \pm 0,02$	
	$\text{UO}_2\text{H}_2\text{GS}^+$	$\log\beta = 20,39$	Martell et al. (1998)
pH 7,4	$\text{UO}_2(\text{Oxalat})_2^{2-}$	$\log\beta = 11,65 \pm 0,15$	Hummel et al. (2005)
	$\text{UO}_2\text{Oxalat}(\text{aq})$	$\log\beta = 7,13 \pm 0,16$	
	$\text{UO}_2(\text{Citrat})^-$	$\log\beta = 8,96 \pm 0,17$	Hummel et al. (2005)
	$(\text{UO}_2)(\text{ATP})_2^{6-}$	$\log\beta = 12,836 \pm 0,008$	De Stefano et al. (2005)
	$\text{UO}_2\text{H}_2\text{GS}^+$	$\log\beta = 20,39$	Martell et al. (1998)

In der Tabelle sind die Spezies aufgeführt, welche den Hauptanteil der zwischen Uran und den Stoffwechselprodukten der Alge gebildeten Komplexe ausmachen. Je nach pH-Wert unterscheiden sich die gebildeten Komplexe im Mineralmedium. Im Falle der organischen Säuren ändern sich nur die Anteile der Komplexe an der Gesamtspeziation, bei ATP bestimmen unterschiedliche Spezies die jeweilige Speziation bei pH 4,4 und 7,4.

Die Fähigkeit der getesteten Substanzen Uran zu mobilisieren, lässt sich anhand der aufgelisteten Komplexbindungskonstanten auf die theoretischen Reihenfolge Oxalsäure < Citronensäure < ATP < Glutathion festlegen. Bei Betrachtung der Komplexbindungskonstanten wird deutlich, dass der schwächste Komplex mit Oxalsäure ($\text{UO}_2\text{Oxalat}(\text{aq})$): $\log\beta = 7,13 \pm 0,16$ gebildet wird. Da Oxalsäure dennoch in der Lage ist, signifikante Mengen an algengebundenen Uran zu desorbieren (vgl. Kap. 3.7), muss die Komplexstabilitätskonstante der gebildeten Uran-Algen-Komplexe folglich noch kleiner sein. Allerdings wird auch deutlich, dass die experimentell ermittelte Reihenfolge bezüglich der Fähigkeit der Substanzen, Uran zu mobilisieren, nicht vollständig mit der hier beschriebenen theoretischen übereinstimmt. Der Uran-Glutathionkomplex $\text{UO}_2\text{H}_2\text{GS}^+$ mit $\log\beta = 20,39$ sollte am stabilsten sein und auch zur Desorption des größten Anteils an algengebundenem Uran führen. Aus den Experimenten ging jedoch hervor, dass Glutathion am wenigsten zur Freisetzung von algengebundenem Uran führte. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem theoretisch und experimentell bestimmten Verhalten von Glutathion konnte bisher nicht gefunden werden.

3.9 Laserspektroskopische Untersuchung von U(VI)-Modellkomplexen zur Interpretation von U(VI)-Algen-Komplexen

Die Ergebnisse der Biosorptionsversuche mit *Chlorella* im Mineralmedium lassen den Schluss zu, dass Uran erfolgreich an die Algenzellen und damit an bestimmte funktionelle Gruppen gebunden hatte. Nachdem die Ergebnisse der potentiometrischen Titration (Kap. 3.3) ergaben, dass insbesondere deprotonierte Carboxyl- und Phosphatgruppen im untersuchten pH-Wertbereich von 4,4 bis 7,0 als Bindungsstelle für Uran in Frage kommen, wurden diese funktionellen Gruppen als potentielle Liganden für Uran in den Modellverbindungen ausgewählt. Die bereits existierenden Untersuchungen zu U(VI)-Modellverbindungen wurden für die Interpretation der zu erwartenden Spektren von U(VI)-Algen-Komplexen als nicht ausreichend angesehen, da jeweils nur die Wechselwirkung zwischen Uran und einer Art funktioneller Gruppe betrachtet wurde. Im untersuchten Biosystem Alge ist allerdings davon auszugehen, dass ein Gemisch aus verschiedenen funktionellen Gruppen als Bindungspartner für Uran vorliegt. Diese Mischung aus unterschiedlichen urankoordinierenden Liganden würde auch zu einem Summenspektrum als Ergebnis der TRLFS-Messung führen. Um für die nachfolgende laserfluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der gebildeten U(VI)-Algen-Komplexe (Kap. 3.10.1.1 & 3.10.2.1) entsprechende Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden deshalb U(VI)-Modellkomplexe mit Carboxylgruppen, organischen Phosphatgruppen oder einem Gemisch dieser beiden Funktionalitäten als Liganden für Uran mit TRLFS vermessen. Relevant für die Interpretation der gebildeten Uran-Algen-Komplexe sind dabei in erster Linie die Emissionsbandenlagen der verschiedenen Uranmodellspezies. Da die Lumineszenzlebensdauern der U(VI)-Modellkomplexe für die gelösten Spezies bestimmt wurden, ist ein Vergleich mit den Lebensdauern der algengebunden Uranspezies (Feststoffe) nicht möglich. Die Lumineszenzlebensdauer der U(VI)-Modellkomplexe wurde somit nur für den Vergleich mit bereits bekannten Literaturdaten mit gemessen.

3.9.1 U(VI)-Acetat

Acetat wurde ausgewählt, da dieser Ligand das Uran über die Carboxylgruppe bindet (Jiang et al., 2002). In einer 0,1 M Natriumperchloratlösung bei pH 4,4 mit einer Urankonzentration von 50 μM wurde die Acetatkonzentration schrittweise erhöht. Die Veränderungen in den TRLFS-Spektren ausgehend von freiem Uranyl und mit zunehmender Konzentration an $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ -Komplexen sind in Abb. 3.14 dargestellt.

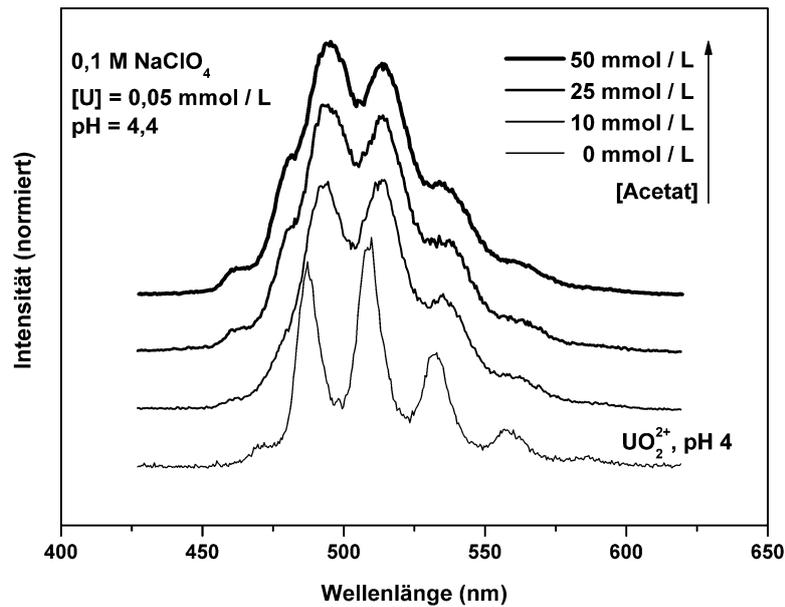


Abb. 3.14: Lumineszenzspektren von $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .

Es ist deutlich die bathochrome Verschiebung der Spektren von $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ im Vergleich zum Spektrum vom freien Uranylion zu erkennen. Außerdem tritt mit zunehmender Konzentration an Acetat die Bande bei ca. 463 nm klarer hervor. In Tab. 3.10 sind die Emissionsbanden der $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ -Komplexe in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration zusammengefasst. Als Lumineszenzlebensdauer für den $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ -Komplex wurden 399 ± 8 ns bestimmt.

Tab. 3.10: Lumineszenzemissionsbanden von $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ bei pH 4,4 in Abhängigkeit der Acetatkonzentration.

Acetat	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						
10 mM	463,0	477,3	492,7	513,0	535,5	561,0	587,1
25 mM	463,2	478,6	493,9	514,0	536,5	561,1	590,0
50 mM	462,9	478,8	494,6	514,3	535,9	562,0	585,0

3.9.2 U(VI)-Fructose-6-phosphat

Fructose-6-phosphat (F6P) wurde als Ligand ausgewählt, der Uran über die Phosphatgruppe koordiniert (Koban et al., 2004). In einer 0,1 M Natriumperchloratlösung bei pH 4,4 mit einer Urankonzentration von 50 μM wurde die F6P-Konzentration schrittweise erhöht. Die Veränderungen in den TRLFS-Spektren beginnend mit freiem Uranyl und mit zunehmender Konzentration an $\text{UO}_2(\text{Fructose-6-phosphat})$ -Komplexen sind in Abb. 3.15 dargestellt.

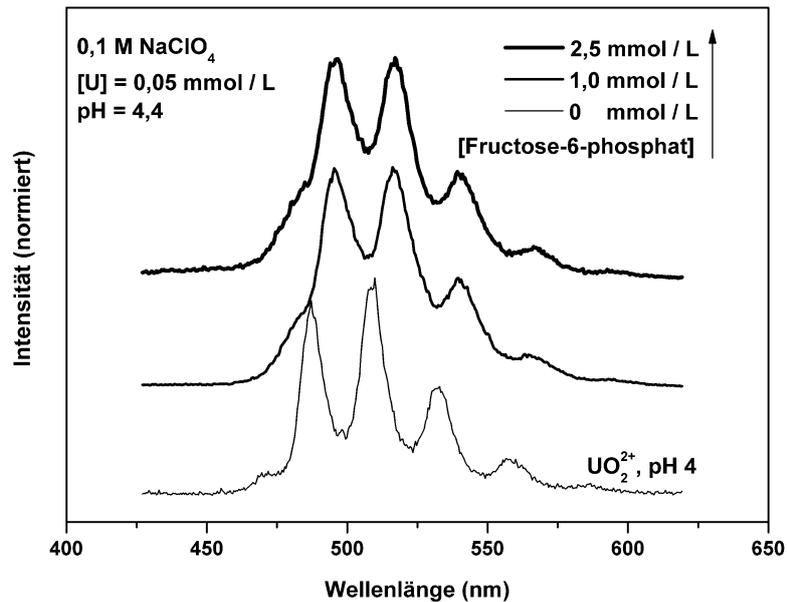


Abb. 3.15: Lumineszenzspektren von $\text{UO}_2(\text{Fructose-6-phosphat})$ bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .

Bereits bei geringer F6P-Konzentration ist eindeutig die Verschiebung der Uranlumineszenzbanden im Vergleich zum freien Uranyl sichtbar. Die in dieser Arbeit bestimmten Emissionsbanden (Tab. 3.11) stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten (Koban et al., 2004) überein. Minimale Unterschiede lassen sich z.B. auf die verwendeten Lasersysteme und die nicht exakt gleichen Versuchsbedingungen (pH-Wert) zurückführen. Die Versuchsbedingungen beeinflussen die gebildeten Uranspezies und damit die Position der Banden in den Spektren und die Lumineszenzlebensdauern. So konnten in diesem Fall drei Lumineszenzlebenszeiten ermittelt werden. Die kürzeste Lebenszeit mit $\tau_1 = 147 \pm 40$ ns wird dem $\text{UO}_2(\text{F6P})$ -Komplex zugeordnet, die mittlere mit $\tau_2 = 1488 \pm 537$ ns dem freien Uranyl und die längste mit $\tau_3 = 9359 \pm 894$ ns dem Uranylhydroxid $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$.

Tab. 3.11: Lumineszenzemissionsbanden von $\text{UO}_2(\text{Fructose-6-phosphat})$ in Abhängigkeit der F6P-Konzentration.

F6P	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
1,0 mM	479,5	496,3	517,0	539,7	564,5	594,7
2,5 mM	480,7	496,4	517,0	540,0	565,7	593,6

3.9.3 U(VI)-Phosphothreonin

Als Vertreter für phosphorylierte Proteine, die an einer Uranbindung beteiligt sein können, wurde die Aminosäure o-Phospho-L-threonin (pThr) als weiterer Ligand ausgewählt, der Uran über die Phosphatgruppe koordiniert (Günther et al., 2006). Zu einer 0,1 M Natriumperchloratlösung bei pH 4,4 mit einer Urankonzentration von 50 μM wurden unterschiedliche Mengen an Phosphothreonin zugegeben, um Endkonzentrationen von 0,25 mM und 1,0 mM zu erreichen. Die Veränderungen in den TRLFS-Spektren von freiem Uranyl und mit zunehmender Konzentration an $\text{UO}_2(\text{o-Phospho-L-threonin})$ -Komplexen sind in Abb. 3.16 dargestellt und die entsprechenden Lumineszenzemissionsbanden sind in Tab. 3.12 zusammengefasst.

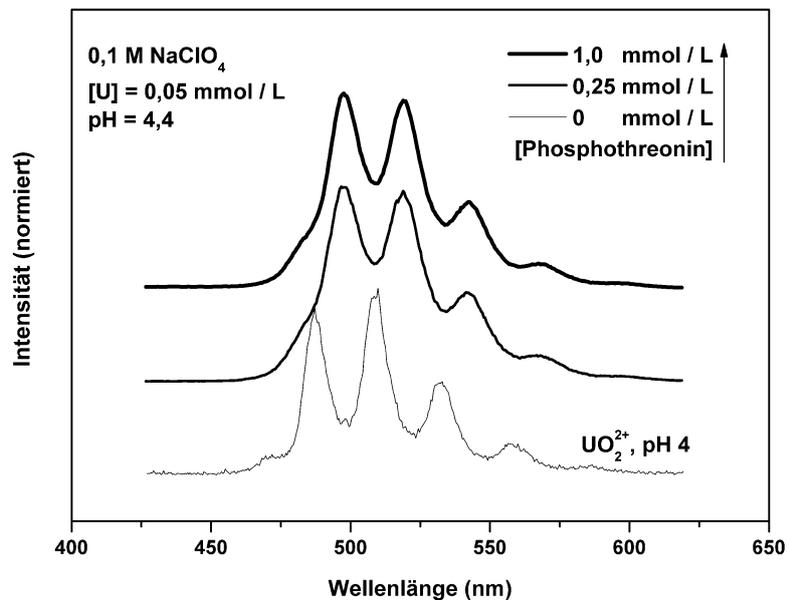


Abb. 3.16: Lumineszenzspektren von $\text{UO}_2(\text{o-Phospho-L-threonin})$ bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .

Die gemessenen TRLFS-Spektren geben die Summe an Beiträgen der in der Lösung enthaltenen Uranspezies wieder und stimmen gut mit den Literaturwerten überein (Günther et al., 2006). Anhand der leicht bathochromen Verschiebung der TRLFS-Spektren von $\text{UO}_2(\text{o-Phospho-L-threonin})$ im Vergleich zu $\text{UO}_2(\text{Fructose-6-phosphat})$ (vgl. 3.9.2) wird deutlich, dass bereits unterschiedliche organische Phosphate als Ligand für Uran einen maßgeblichen Einfluss auf die Lage der Uranemissionsbanden haben.

Tab. 3.12: Lumineszenzemissionsbanden von $\text{UO}_2(\text{o-Phospho-L-threonin})$ in Abhängigkeit der pThr-Konzentration.

pThr	Lumineszenzemissionsbanden (nm)					
0,25 mM	480,6	497,8	519,0	541,6	566,5	598,2
1,0 mM	481,2	498,0	519,1	541,8	567,1	597,2

Für das Phosphothreonin-Modellsystem konnten in dieser Arbeit drei Lumineszenzlebenszeiten ermittelt werden. Die kürzeste Lebenszeit mit $\tau_1 = 543 \pm 202$ ns wird dem UO_2HpThr -Komplex zugeordnet, die mittlere mit $\tau_2 = 1249 \pm 151$ ns dem freien Uranyl und die längste mit $\tau_3 = 4623 \pm 482$ ns dem $\text{UO}_2\text{H}_2\text{pThr}^+$ -Komplex.

3.9.4 U(VI)-Komplexgemische

In diesem Versuch wurden U(VI)-Komplexgemische mittels TRLFS untersucht, um so Summenspektren von Uranspezies zu erhalten, die sowohl Carboxyl- als auch Phosphatgruppen zur Koordination von Uran bereitstellen. Da auf den Algenzellen mehrere Arten an funktionellen Gruppen vorhanden sind (vgl. Kap. 3.3), ist davon auszugehen, dass auch ein Gemisch aus diesen an der Koordination von Uran beteiligt ist wie z. B. auch für Zellen von *Lysinibacillus sphaericus* (Merroun et al., 2005) oder das Protein Phosvitin (Li et al., 2010) beschrieben. Zur Herstellung der Komplexgemische wurden Acetat und Fructose-6-phosphat im Verhältnis 25 zu 1 bzw. Acetat und Phosphothreonin im Verhältnis 200 zu 1 mit 50 μM Uran in 0,1 M NaClO_4 gemischt. Die Verhältnisse der beteiligten Substanzen in den Mischungen wurden so gewählt, dass die höhere Lumineszenzausbeute der U(VI)-Phosphatverbindungen die Lumineszenz von $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ nicht vollständig überdeckt, sondern die Summenspektren wichtige Charakteristika der Einzelspektren beibehalten. Die Spektren der U(VI)-Komplexgemische sowie der jeweiligen beteiligten Einzelkomponenten sind in Abb. 3.17 dargestellt. Aus Abb. 3.17 ist zu entnehmen, dass die Spektren der Komplexgemische jeweils bathochrom im Vergleich zum $\text{UO}_2(\text{Acetat})$ -Spektrum und hypsochrom im Vergleich zu den Spektren der organischen Uranylphosphate verschoben sind. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Lumineszenzemissionsbanden der U(VI)-Komplexgemische (Tab. 3.13) verglichen mit denen der beteiligten Einzelkomponenten (Kap. 3.9.1 – 3.9.3) wider.

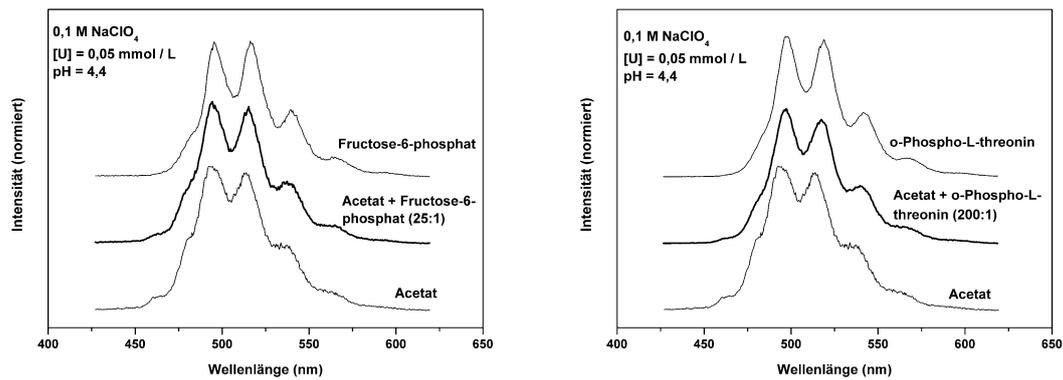


Abb. 3.17: Lumineszenzspektren der Komplexe $\text{UO}_2(\text{Acetat}/\text{Fructose-6-phosphat})$ (links) und $\text{UO}_2(\text{Acetat}/\text{Phosphothreonin})$ (rechts) bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .

Tab. 3.13: Lumineszenzemissionsbanden der Uranylkomplexe mit Acetat und Fructose-6-Phosphat bzw. Phosphothreonin.

Gemisch	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						
$\text{UO}_2\text{AcF6P}$	463,2	479,3	494,8	515,1	537,9	562,9	590,0
UO_2AcPThr	462,8	481,7	496,7	517,1	539,9	563,5	594,4

3.10 Charakterisierung der gebildeten Uran(VI)-Algen-Komplexe in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität der Algen

Aus den Biosorptionsversuchen mit Algenzellen in Mineralmedium ging hervor, dass signifikante Mengen an Uran unabhängig von der Stoffwechselaktivität der Zellen durch diese gebunden wurden. Mit Hilfe der spektroskopischen Methoden TRLF-, EXAFS- und ATR-FTIR-Spektroskopie sollten die gebildeten U(VI)-Algen-Komplexe charakterisiert und damit an der Uran-Bindung beteiligte funktionelle Gruppen identifiziert werden. Außerdem sollte der Einfluss der Stoffwechselaktivität auf die Struktur der gebildeten Komplexe geklärt werden.

3.10.1 Charakterisierung von U(VI)-Komplexen mit metabolisch aktiven Algen-Zellen

3.10.1.1 TRLFS

Neben dem in Kap. 3.2.3 beschriebenen Mineralmedium für die Sorptionsexperimente wurde auch feuchte Algenbiomasse nach erfolgter Uransorption im Hinblick auf eine Veränderung der Uranspeziation untersucht. Für die untersuchten Algenproben konnten Lumineszenzspektren unabhängig vom gewählten pH-Wert aufgenommen werden (Abb. 3.18). Das Uran

verblieb somit nach der Immobilisierung an/in den Algenzellen im Oxidationszustand (VI). Ein Vergleich der in Mineralmedium unter den jeweils gewählten Bedingungen erhaltenen Lumineszenzspektren und der in Abb. 3.18 dargestellten Spektren der Algenzellen zeigt deutlich, dass die U(VI)-Algen-Komplexe andere Spezies als das unbeimpfte Medium enthalten.

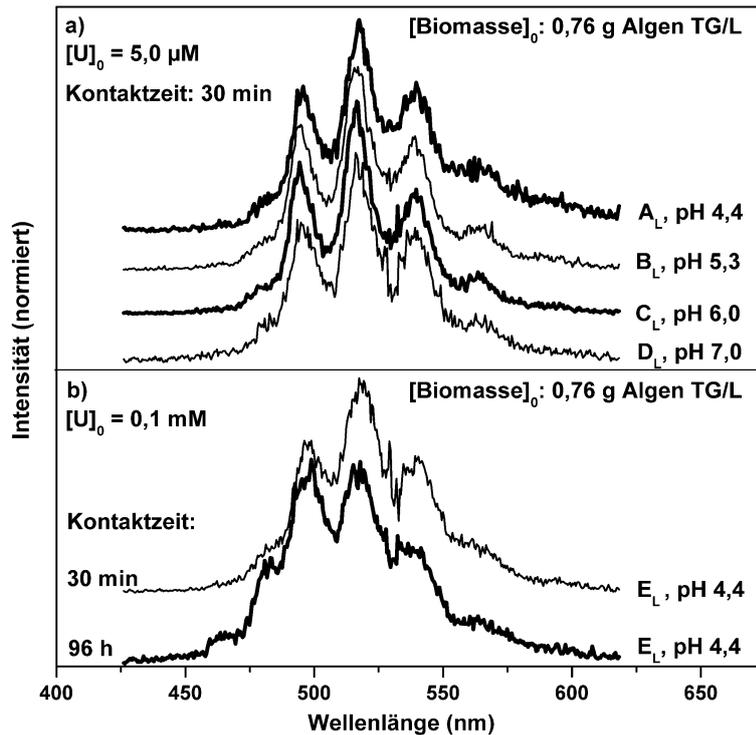


Abb. 3.18: Lumineszenzspektren von Uran(VI)-Algen-Komplexen, welche von ursprünglich lebenden Zellen bei Urankonzentrationen von a) 5,0 μM in Abhängigkeit vom pH-Wert und b) 0,1 mM bei pH 4,4 in Mineralmedium gebildet wurden.

Die Spektren unterscheiden sich sowohl in der Form als auch in der Lage der Peakmaxima (Tab. 3.14, vgl. Kap. 3.2.3). Die nach 30 min Kontaktzeit bei niedriger Urankonzentration (5 μM) aufgenommenen Lumineszenzspektren der gebildeten U(VI)-Algen-Komplexe bei pH 4,4 (A_L), pH 5,3 (B_L), pH 6,0 (C_L) und pH 7,0 (D_L) unterscheiden sich leicht in der Lage der Peaks voneinander (Abb. 3.18a). Das Spektrum E_L (Abb. 3.18b) der lebenden Algenzellen, welche für 30 min bei pH 4,4 mit 0,1 mM Uran inkubiert wurden, zeigt ebenfalls nur leichte Unterschiede von der Lage der Peaks her zu denen bei niedriger Urankonzentration ermittelten Emissionsbanden. Allerdings sind die Abweichungen in diesen Fällen nicht deutlich genug, um Rückschlüsse auf unterschiedliche U(VI)-Algen-Komplexe zuzulassen. Das TRLFS-Spektrum der Algenprobe (E_L), die der hohen Urankonzentration bei pH 4,4 für 96 h ausgesetzt und ursprünglich am Leben war, weist bei der vierten, fünften und

sechsten Bande deutliche Verschiebungen der Peakmaxima im Vergleich zu dem Spektrum nach 30 min auf (Abb. 3.18b, Tab. 3.14). Die Bezeichnung ursprünglich am Leben (ursprünglich lebend) wird für die Algenzellen, welche bei einer Urankonzentration von 0,1 mM, pH 4,4 und einer Inkubationszeit von 96 h wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben abstarben, im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet.

Tab. 3.14: Lumineszenzemissionsbanden der Uran(VI)-Spezies auf/in *C. vulgaris*-Zellen im Mineralmedium bei unterschiedlichen Bedingungen (pH-Wert, $[U]_0$, Kontaktzeit). X_L = ursprünglich lebende Zellen

Probe	$[U]_0$	Kontaktzeit (h)	pH	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						
Alge A _L	5 μ M	0,5	4,4	480,5	496,8	517,6	539,9	565,4		
Alge B _L	5 μ M	0,5	5,3	464,0	480,1	496,4	517,4	539,0	564,5	590,0
Alge C _L	5 μ M	0,5	6,0	478,9	496,3	517,5	539,4	564,3	593,7	
Alge D _L	5 μ M	0,5	7,0	466,0	481,3	497,2	518,5	540,4	563,9	590,0
Alge E _L	0,1 mM	0,5	4,4	465,7	481,4	497,8	518,1	540,4	563,8	590,8
Alge E _L	0,1 mM	96	4,4	463,2	481,7	497,7	516,8	538,3	564,8	590,0

Nach dem Vergleich der Daten zahlreicher U(VI)-Modellkomplexe (Tab. 3.15 & Kap. 3.9) mit den Ergebnissen der U(VI)-Algenkomplexe (Tab. 3.14) werden zwei Möglichkeiten der Wechselwirkung von Uran mit der Algenbiomasse in Betracht gezogen. Zum einen könnte Uran nur mit Carboxylgruppen komplexiert sein. Dafür spricht die Ähnlichkeit zwischen den Emissionsbanden von lebenden Zellen und den Banden von Uranyl-Modellkomplexen mit Carboxylgruppen, wie z.B. $UO_2(\text{Acetat})$ (Kap. 3.9.1) und $UO_2(\text{Glycin})$ (vgl. Kap. 3.10.1.1, Tab. 3.15). Besonders das Auftreten der Uranemissionsbande bei ca. 463 nm sowohl in den Algenproben als auch im Spektrum von Uranylacetat bestätigt die Annahme einer Koordination von Uran über Carboxylgruppen.

Zum anderen könnten zusätzlich zu den Carboxylgruppen auch organische Phosphatgruppen an der Koordination von Uran an stoffwechselaktiven *Chlorella*-Zellen beteiligt sein. Diesen Rückschluss lassen die Ergebnisse der Modellkomplexierung von Uran mit Substanzmischungen, die Carboxyl- und organische Phosphatgruppen als Liganden besitzen (Kap. 3.9.4), zu. Die Bandenlagen der Modelle bestehend aus $UO_2(\text{Acetat})$ und $UO_2(\text{Fructose-6-phosphat})$ bzw. $UO_2(\text{o-Phospho-L-threonin})$ stimmen sehr gut mit den Peakmaxima der U(VI)-Komplexe mit metabolisch aktiven Algenzellen überein.

Die Lage der vierten, fünften und sechsten Bande des TRLFS-Spektrums der ursprünglich lebenden Algen (E_L), welche für 96 h der hohen Urankonzentration ausgesetzt waren (Abb. 3.18b, Tab. 3.14), wird wahrscheinlich durch einem erhöhten Beitrag von uran-koordinierenden Carboxylgruppen zum TRLFS-Spektrum anstelle von oder zusätzlich zu

Wechselwirkungen mit Phosphatgruppen hervorgerufen. Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen zur Wechselwirkung von Uran mit Phosvitin (Li et al., 2010). Mit ansteigender Urankonzentration konnte in diesem System eine vermehrte Bindung von Uran an Carboxylgruppen im Vergleich zu Phosphatgruppen festgestellt werden. Das läßt den Schluss zu, dass die Affinität von Uran zu Phosphatgruppen höher ist als zu Carboxylgruppen und die Bindungsplätze an den Phosphatgruppen zuerst durch Uran belegt werden.

Tab. 3.15: Lumineszenzemissionsbanden von verschiedenen Uranyl-Modellkomplexen und U(VI) in Biosystemen.

Probe	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						Referenz
UO ₂ (Glycin)	478,7	495,3	516,7	540,6	565,0	594,4	Günther et al. (2007)
UO ₂ (Phosphoserin)	480,9	496,9	517,6	540,5	565,0		Koban et al. (2007)
UO ₂ (Fructose-6-phosphat)	478,9	497,1	519,0	543,3	568,9	598,0	Koban et al. (2004)
UO ₂ (Phosphothreonin)	483,7	501,8	523,4	546,8	572,6	601,0	Günther et al. (2006)
U(VI)/ <i>C. vulgaris</i> pH 3	481,6	497,9	518,5	539,3	565,3	595,7	Günther et al. (2008)
U(VI)/ <i>C. vulgaris</i> pH 6	488,1	504,0	524,9	547,5	571,7	597,4	Günther et al. (2008)
U(VI)/ <i>B. sphaericus</i>		501,9	523,9	545,8	571,1		Panak et al. (2000)
Ca(UO ₂) ₂ (PO ₄) ₂ ·10 H ₂ O	488,6	504,0	524,2	548,0	573,9	602,4	Geipel et al. (2000)

Die TRLFS-Ergebnisse der U(VI)-Algen-Komplexe an ursprünglich lebenden Zellen sind außerdem gut mit den TRLFS-Emissionsmaxima von *Chlorella*-Zellen bei pH 3 vergleichbar, welche von Günther et al. (2008) als dominante Komplexierung von Uran an Carboxylgruppen interpretiert wurden. Im Gegensatz zu den bisher für *Chlorella* Zellen bei pH 5 und 6 (Günther et al., 2008), höheren Pflanzen (Günther et al., 2003) und verschiedenen Bakterienstämmen (Panak et al., 2000) gemachten Beobachtungen, zeigt metabolisch aktive Algenbiomasse unter den gewählten Sorptionsbedingungen somit keine dominante Wechselwirkung von Phosphatgruppen mit Uran. Vielmehr spielen unter den gewählten Bedingungen neben den organischen Phosphatgruppen die Carboxylgruppen eine entscheidende Rolle für die Uranbindung. Beide Funktionalitäten sind somit an der Urankoordination beteiligt.

3.10.1.2 EXAFS-Spektroskopie

Ergänzend zu der laserspektroskopischen Charakterisierung der mit *C. vulgaris*-Zellen gebildeten Uran-Algen-Komplexe erfolgte eine röntgenabsorptionsspektroskopische Analyse der Komplexe. Die Verwendung dieser Methode ermöglicht es, aus den gewonnenen Daten Aussagen über Nachbaratome des Urans und die mittleren Bindungsabstände zwischen diesen Atomen zu treffen. Im Zuge dessen ist es möglich, an der Uranbindung beteiligte funktionelle Gruppen und deren Bindungsform abzuleiten.

Die Wechselwirkungen zwischen Uran und den lebenden *Chlorella*-Zellen wurden zum einen in Abhängigkeit vom pH-Wert (zwischen pH 4,4 und 7,0) bei einer Urankonzentration von 5 μM und zum anderen in Abhängigkeit von der Urankonzentration zwischen 0,1 mM und 1,0 mM bei pH 4,4 untersucht. Die jeweiligen EXAFS-Spektren an der Uran-L_{III}-Kante und die entsprechenden Fourier-Transformationen (FT) sind zusammen mit den besten Fits in Abb. 3.19 und Abb. 3.20 abgebildet. Die dazugehörigen Strukturparameter sind in Tab. 3.16 und Tab. 3.17 zusammengefasst. Der Datenbereich aller EXAFS-Spektren wurde durch das Signal-Rausch-Verhältnis auf $3,1 \text{ \AA}^{-1} \leq k \leq 12,3 \text{ \AA}^{-1}$ begrenzt.

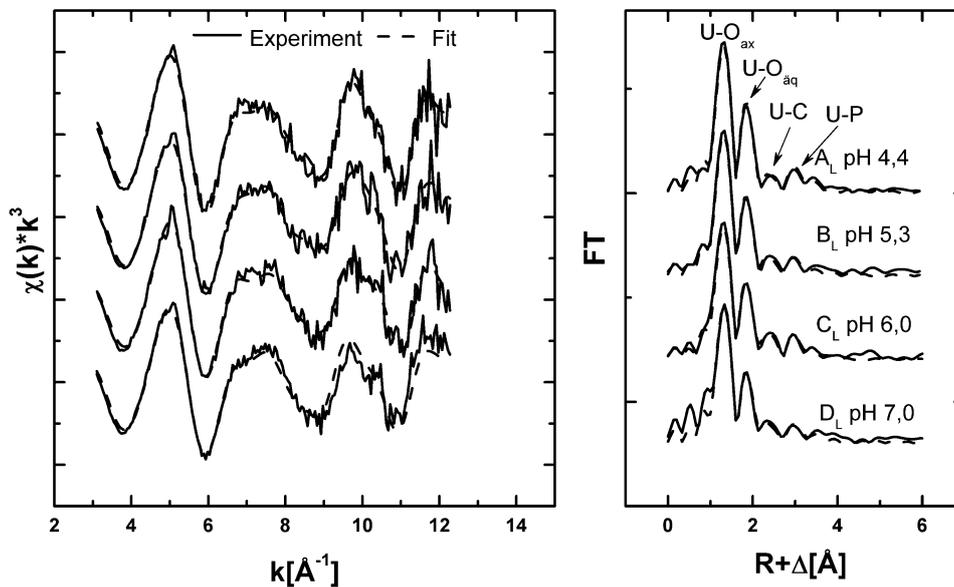


Abb. 3.19: EXAFS-Spektren an der U-L_{III}-Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von Uran-Algen-Komplexen, welche in Abhängigkeit vom pH-Wert durch metabolisch aktive Algen gebildet wurden. X_L = lebende Algen, inkubiert mit 5 μM Uran.

In allen Proben ist Uran über zwei axiale Sauerstoffatome (U-O_{ax}) mit einer Bindungslänge von 1,76 \AA – 1,78 \AA (FT Peak bei $R + \Delta \sim 1,3 \text{ \AA}$) und äquatoriale Sauerstoffe U-O_{aq} mit Bindungslängen von 2,34 \AA – 2,50 \AA (FT Peak bei $R + \Delta \sim 1,8 \text{ \AA}$) koordiniert. Für die Proben mit niedriger Urankonzentration (A_L/pH 4,4; B_L/pH 5,3; C_L/pH 6,0; D_L/pH 7,0), welche im

Fluoreszenzmodus gemessen wurden, konnte der äquatoriale Sauerstoff ($O_{\text{äq}}$) in Abständen zwischen $2,34 \text{ \AA} - 2,36 \text{ \AA}$ ermittelt werden (Tab. 3.16). Der relativ hohe Debye-Waller-Faktor $\sigma^2 \geq 0,01$ von $U-O_{\text{äq}}$ deutet die Existenz von mehr als einer Sauerstoffschale an. Aufgrund der durch den begrenzten k -Bereich limitierten spektralen Auflösung von $0,17 \text{ \AA}$, können die Sauerstoffschalen jedoch in diesem Fall nicht voneinander getrennt werden.

Tab. 3.16: Strukturparameter der Urankomplexe mit *Chlorella vulgaris* Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten; X_L = lebende Algen.

Probe	Schale	N^a	$R [\text{\AA}]^b$	$\sigma^2 [\text{\AA}^2]^c$	$\Delta E_0 \text{ (eV)}^d$
A_L ; pH 4,4 [U] $_0$ = 5 μM	U=O	2 ^f	1,77	0,0011	2,1
	U- $O_{\text{äq}}$	5,5	2,35	0,0091	
	U-C	1,3	2,91	0,0034	
	U-P	3,0	3,61	0,0025 ^f	
	U- $O_{\text{äq}}$ -P	5,9 ^e	3,74	0,0025 ^e	
B_L ; pH 5,3 [U] $_0$ =5 μM	U=O	2 ^f	1,77	0,0013	1,5
	U- $O_{\text{äq}}$	5,3	2,34	0,0099	
	U-C	1,6	2,94	0,0034 ^f	
	U-P	2,3	3,61	0,0037	
	U- $O_{\text{äq}}$ -P	4,7 ^e	3,73	0,0037 ^e	
C_L ; pH 6,0 [U] $_0$ =5 μM	U=O	2 ^f	1,76	0,0018	0,9
	U- $O_{\text{äq}}$	5,7	2,34	0,0110	
	U-C	2,4	2,91	0,0025 ^f	
	U-P	2,4	3,59	0,0025 ^f	
	U- $O_{\text{äq}}$ -P	4,8 ^e	3,70	0,0025 ^e	
D_L ; pH 7,0 [U] $_0$ =5 μM	U=O	2 ^f	1,78	0,0015	2,4
	U- $O_{\text{äq}}$	5,8	2,36	0,0130	
	U-C	1,8	2,92	0,0036	
	U-P	3,4	3,64	0,0051	
	U- $O_{\text{äq}}$ -P	6,8 ^e	3,77	0,0051 ^e	

a Fehler in der Koordinationszahl N beträgt $\pm 25\%$

b Fehler im Atomabstand R beträgt $\pm 0,02 \text{ \AA}$

c Debye-Waller Faktor (σ^2)

d Verschiebung der Schwellenenergie (ΔE_0)

e Parameter während des Fits mit der P-Schale verknüpft.

f Parameter während des Fits fixiert.

Der radiale $U-O_{\text{äq}}$ Abstand ist charakteristisch für den entsprechenden Liganden und die Anzahl an Sauerstoffatomen, die an der Koordination von Uran beteiligt sind. In der äquatorialen Ebene von UO_2^{2+} können sechs, fünf oder vier Sauerstoffatome von Uran koordiniert werden. Daraus ergeben sich hexagonale, pentagonale und quadratisch bipyramidale Koordinationspolyeder. Burns et al. (1996) beschrieben den mittleren Bindungsabstand von $U-O_{\text{äq}}$ in anorganischen U(VI)-Verbindungen mit $2,46 \text{ \AA} \pm 0,12 \text{ \AA}$ für $O_{\text{äq(hexagonal)}}$, mit $2,34 \text{ \AA} \pm 0,10 \text{ \AA}$ für $O_{\text{äq(pentagonal)}}$ und mit $2,26 \text{ \AA} \pm 0,08 \text{ \AA}$ für $O_{\text{äq(quadratisch)}}$. Die fünffache Koordinationssphäre wird als am meisten verbreitete Geometrie für organische U(VI)-Verbindungen angesehen (Evans, 1963; Leciejewicz et al., 1995). Unter der Berücksichtigung der soeben beschriebenen Klassifikation und der für die U(VI)-Algen-Komplexe erhaltenen Ergebnisse (Tab. 3.16 & Tab. 3.17) wird eine Vierfach-Koordination

des Uranylions nahezu ausgeschlossen. Im Fall der Proben A_L , B_L , C_L , und D_L liegt die Koordinationszahl der äquatorialen Sauerstoffatome zwischen fünf und sechs (Tab. 3.16).

Aus den EXAFS-Spektren der Proben E_{L1-3} (Abb. 3.20) lässt sich eine sechsfache Koordination des Urans mit äquatorialen Sauerstoffen ableiten. Diese Proben wurden im Transmissionsmodus gemessen. In diesem Fall wurde die Sauerstoffschale trotz der begrenzten Auflösung von $0,17 \text{ \AA}$ in zwei Schalen geteilt, was letztlich ein besseres Ergebnis beim Fit zur Folge hatte (Abb. 3.20 & Tab. 3.17). Die zwei Sauerstoffschalen werden in der FT nicht als separate Peaks sichtbar, da ihre Abstände einen R-Bereich umfassen, der nicht groß genug ist, um beide Peaks im EXAFS-Spektrum einzeln wahrzunehmen. Dort gilt $\Delta k = 9,1 \text{ \AA}^{-1}$ ist in Übereinstimmung mit $\Delta R \geq \pi/(2\Delta k)$. Die Bindungsabstände von $U-O_{\text{äq1}}$ und $U-O_{\text{äq2}}$ wurden mit $2,34 \text{ \AA} - 2,35 \text{ \AA}$ bzw. $2,49 \text{ \AA} - 2,50 \text{ \AA}$ (Tab. 3.17) berechnet.

Neben den Sauerstoffatomen wurden Beiträge von Kohlenstoffatomen zu den EXAFS-Spektren mit einem Peak bei $R+\Delta \sim 2,3 \text{ \AA}$ in der FT sichtbar. Die daraus resultierenden Bindungsabstände des Kohlenstoffs liegen bei $2,89 \text{ \AA} - 2,94 \text{ \AA}$. Ein weiterer Peak bei $R+\Delta \sim 3 \text{ \AA}$ in der FT wird Phosphoratomen zugeordnet, die Bindungsabstände von $3,59 \text{ \AA} - 3,64 \text{ \AA}$ zum Uranatom aufweisen.

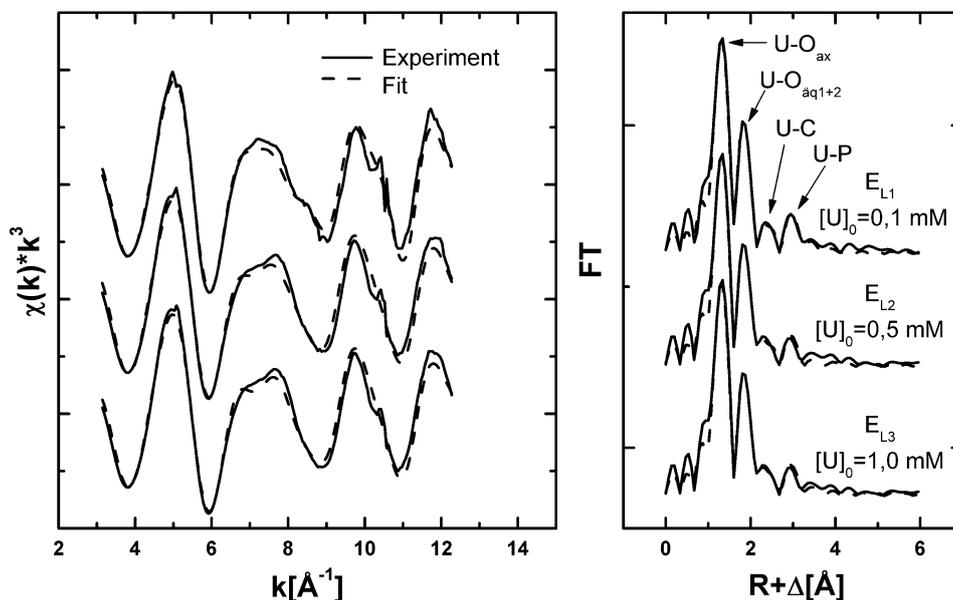


Abb. 3.20: EXAFS-Spektren an der $U-L_{III}$ -Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von Uran-Algen-Komplexen, welche in Abhängigkeit von der Urankonzentration durch metabolisch aktive Algen gebildet wurden. X_L = lebende Algen, inkubiert mit Uran bei pH 4,4.

Tab. 3.17: Strukturparameter der Urankomplexe mit *Chlorella vulgaris* Zellen bei varrierenden Urankonzentrationen. X_L = lebende Algen

Probe	Schale	N ^a	R [Å] ^b	σ^2 [Å ²] ^c	ΔE_0 (eV) ^d
E _{L,1} ; pH 4,4 [U] ₀ = 0,1 mM	U=O	2 ^f	1,77	0,0018	4,0
	U-O _{äq1}	3,7	2,34	0,0035	
	U-O _{äq2}	1,7	2,49	0,0035	
	U-C	1,0	2,89	0,0038 ^f	
	U-P	3,2	3,60	0,0039	
	U-O _{äq1} -P	6,3 ^e	3,72 ^e	0,0039 ^e	
E _{L,2} ; pH 4,4 [U] ₀ = 0,5 mM	U=O	2 ^f	1,78	0,0017	3,9
	U-O _{äq1}	3,9	2,35	0,0063	
	U-O _{äq2}	2,1	2,50	0,0063	
	U-C	1,4	2,90	0,0036	
	U-P	2,1	3,61	0,0050	
	U-O _{äq1} -P	4,2 ^e	3,72 ^e	0,0050 ^e	
E _{L,3} ; pH 4,4 [U] ₀ = 1,0 mM	U=O	2 ^f	1,78	0,0015	3,9
	U-O _{äq1}	3,7	2,35	0,0060	
	U-O _{äq2}	2,1	2,49	0,0060	
	U-C	1,7	2,91	0,0057	
	U-P	2,2	3,61	0,0045	
	U-O _{äq1} -P	4,3 ^e	3,74 ^e	0,0045 ^e	

a Fehler in der Koordinationszahl (N) beträgt ± 25 %

b Fehler in den Atomabständen (R) beträgt ± 0.02 Å

c Debye-Waller-Faktor (σ^2)

d Verschiebung in der Schwellenenergie (ΔE_0)

e Parameter während des Fits verknüpft.

f Parameter während des Fits fixiert.

Entsprechend der unterschiedlichen Bindungsabstände der äquatorialen Sauerstoffatome und der detektierten Beiträge von Kohlenstoff- und Phosphoratomen zu den EXAFS-Spektren E_{L,1-3} ergeben sich Schlussfolgerungen zur Bindungsform des Urans an die funktionellen Gruppen. Der kürzere Sauerstoffbindungsabstand U-O_{äq1} lässt sich durch eine monodentate Anbindung von organischem Phosphat mit Bindungsabständen von 3,60 Å – 3,61 Å zum Uran interpretieren (Agostini et al., 1982; Hennig et al., 2001; Koban et al., 2004). Außerdem konnte eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den EXAFS-Spektren der U(VI)-Algen-Komplexe und denen von UO₂-Fructose-6-phosphat, aufgenommen von Koban et al. (2004), festgestellt werden (Abb. 3.21). Dies weist auf eine vergleichbare Molekülstruktur der gebildeten U(VI)-Algen-Komplexe hin. Der längere Bindungsabstand U-O_{äq2} spricht, gestützt durch die Existenz eines U-C Beitrages bei 2,89 Å – 2,91 Å, für eine bidentate Bindungsform von Uran an Carboxylgruppen (Allen et al., 1996; Denecke et al., 1998; Jiang et al., 2002; Moll et al., 2003). Neben einer Anbindung von Uran an organisches Phosphat wäre auch die Bindung an anorganisches Phosphat denkbar. Die Modellverbindung Meta-Autunit dient als Referenz für die Koordination von Uran über anorganische Phosphate. Der Vergleich eines Spektrums von Meta-Autunit (Hennig et al., 2001) (Abb. 3.21) mit denen der Algenproben, zeigt insbesondere im k-Bereich zwischen 8 Å⁻¹ bis 11 Å⁻¹ in den EXAFS-Spektren deutliche

Unterschiede. Außerdem unterscheiden sich auch die ermittelten Strukturparameter der Algenproben von denen des Meta-Autunits (Tab. 3.18). Dies führt übereinstimmend mit den Ergebnissen der TRIFS-Untersuchungen (Kap. 3.10.1.1) zu dem Schluss, dass anorganische Phosphate unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht an der Koordination von U(VI) durch metabolisch aktive *Chlorella*-Zellen beteiligt sind.

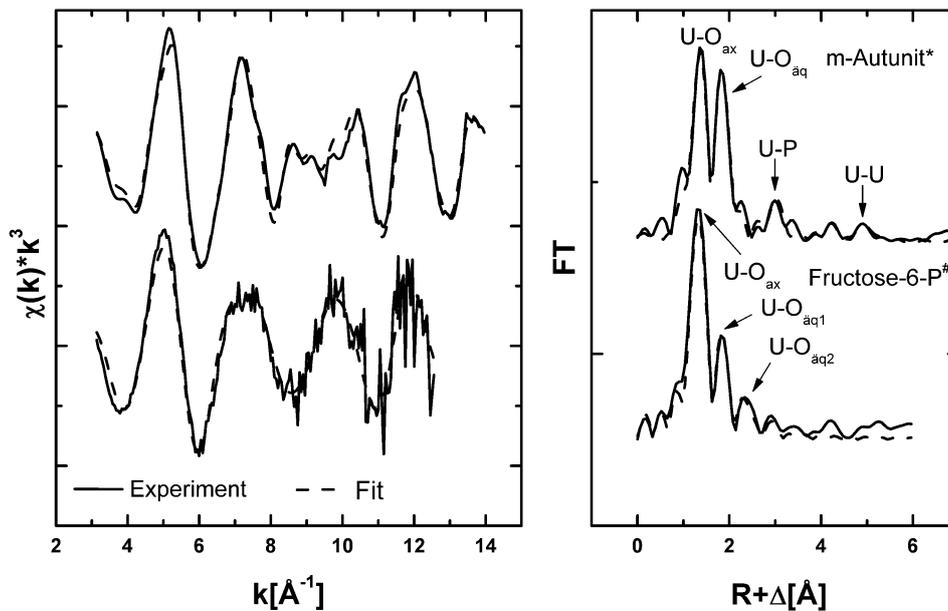


Abb. 3.21: EXAFS-Spektren an der U-L_{III}-Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von den Uranmodellkomplexen Meta-Autunit (Hennig et al., 2001) und Fructose-6-phosphat (Koban et al., 2004).

Tab. 3.18: Strukturparameter von Uranmodellkomplexen.

Probe	Schale	N ^a	R [Å] ^b	σ ² [Å ²] ^c	ΔE ₀ (eV) ^d
U(VI)-Fructose-6-phosphat ^g	U=O	2 ^f	1,77	0,0014	1,0
	U-O _{aq1}	5,2	2,32	0,0120	
	U-O _{aq2}	1,6	2,88	0,0040 ^f	
Meta-Autunit ^h	U=O	2,2	1,76	0,0045	-11,0
	U-O _{aq}	3,9	2,29	0,0026	
	U-P	2,3	3,60	0,008 ^f	
	U-U	2,7	5,2	0,008 ^f	

a Fehler in der Koordinationszahl (N) beträgt ± 25 %

b Fehler in den Atomabständen (R) beträgt ± 0.02 Å

c Debye-Waller-Faktor (σ²)

d Verschiebung in der Schwellenenergie (ΔE₀)

e Parameter während des Fits verknüpft.

f Parameter während des Fits fixiert.

g Koban et al. (2004).

h Hennig et al. (2001).

Die Auswertung der EXAFS-Messungen ergab, dass sowohl der pH-Wert als auch die Urankonzentration Einfluss auf den Beitrag der verschiedenen funktionellen Gruppen zur Uran(VI)-Koordination durch metabolisch aktive *Chlorella*-Zellen haben. Aus den Strukturparametern der Uran(VI)-Algen-Komplexe (Tab. 3.16 & Tab. 3.17) geht hervor, dass mit ansteigendem pH-Wert von 4,4 bis 7,0 und Erhöhung der Urankonzentration bei pH 4,4 von 0,1 mM auf 1,0 mM tendenziell die Koordinationszahl der Kohlenstoffatome ansteigt, während die der Phosphoratome sinkt. Diese Beobachtung deckt sich mit dem bereits bei den TRLFS-Untersuchungen (Kap. 3.10.1.1) beschriebenen Phänomen der erhöhten Affinität von Uran zu Phosphatgruppen im Vergleich zu Carboxylgruppen. Die Anbindung von U(VI) an Carboxylgruppen erlangt somit erst im neutralen pH-Wertbereich und bei hohen Urankonzentrationen im Vergleich zur Bindung an Phosphatgruppen größere Bedeutung.

3.10.1.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

Neben intakten Zellen wurden auch Zellhomogenate verwendet, um eventuell auftretende Komplexe innerhalb der Zellen zu identifizieren, welche aufgrund der limitierten Eindringtiefe des ATR-Infrarotsignals von ca. 1 – 2,5 μm (Kap. 2.4.1) bei einem Zelldurchmesser der Algen von 3 – 4 μm andernfalls nicht detektiert werden würden.

Die ATR FT-IR Spektren von unbehandelten und mit Uran inkubierten metabolisch aktiven *Chlorella*-Zellen beziehungsweise deren Zellhomogenaten, sowie die entsprechenden Differenzspektren zwischen diesen beiden sind in Abb. 3.22 im Spektralbereich von 1800 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} dargestellt. Die Absorptionsmaxima in allen Absorptionsspektren lassen sich entsprechend der in Tab. 2.3 aufgeführten Frequenzen verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen. Die Absorptionsmaxima im Bereich von 1800 cm^{-1} – 1400 cm^{-1} stammen von der Carbonyl-Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ (1735 cm^{-1} / 1738 cm^{-1}), von der Streck-schwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ (1651 cm^{-1} , Amid I), von der Deformationsschwingung $\delta(\text{N}-\text{H})$ (1546 cm^{-1} /1548 cm^{-1} , Amid II), sowie von den asymmetrischen Deformationsschwingungen $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ (1454 cm^{-1}) und der symmetrischen Streckschwingung $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ (1410 cm^{-1} /1404 cm^{-1}). Sowohl Phosphate als auch Kohlenhydrate zeigen Schwingungsbanden im Bereich von 1250 cm^{-1} bis 950 cm^{-1} . Die Banden bei 1245 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 1048 cm^{-1} werden den Streckschwingungen $\nu_{\text{as}}(\text{P}=\text{O})$, $\nu_{\text{s}}(\text{P}=\text{O})$ und $\nu_{\text{as}}(\text{P}-\text{O})$ der Phosphat-estergruppen von Nukleinsäuren und anderen Phosphorylgruppen zugeordnet. Da die Streckschwingungen $\nu(\text{C}-\text{OH})$ und $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ von Zellwand- und Speicherpolysacchariden der Algenzellen ebenfalls zu den Banden im Spektralbereich zwischen 1150 cm^{-1} und 1020 cm^{-1}

beitragen (Benning et al., 2004; Kansiz et al., 1999), ist eine eindeutige Zuordnung der Banden in diesem Bereich der Absorptionsspektren nicht möglich.

In den Absorptionsspektren der Proben, die mit Uran inkubiert wurden, sind zusätzlich Banden um $\sim 920\text{ cm}^{-1}$ sichtbar, welche auf die $\nu_3(\text{UO}_2)$ Schwingung des Uranylions zurückzuführen sind. Das vollkommen hydrolysierte Uranylion erzeugt Banden bei 961 cm^{-1} (Müller et al., 2009). Da ungebundene Hydroxylspezies in der die Zellen umgebenden Flüssigkeit durch Waschen der Algen entfernt wurden, repräsentieren die Banden um 920 cm^{-1} die $\nu_3(\text{UO}_2)$ Schwingung von komplexiertem U(VI).

Alle spektralen Merkmale, die von den verschiedenen funktionellen Gruppen herrühren, erzeugen einen charakteristischen "Fingerabdruck" der Algenzellen. Änderungen dieser Merkmale nach der Uranzugabe deuten auf eine Komplexierung des Urans durch diese funktionellen Gruppen hin. Um diese Veränderungen deutlich sichtbar zu machen, wurden Differenzspektren zwischen den mit Uran behandelten Algenzellen und den Kontrollproben ohne Uran berechnet. In dem Differenzspektrum der intakten Zellen (Abb. 3.22a) tritt die positive Bande bei 1744 cm^{-1} deutlich hervor, welche der Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ von Lipiden zugeordnet wird. Da in den Absorptionsspektren zusätzlich kleine Verschiebungen der Bande von 1735 cm^{-1} zu 1744 cm^{-1} bzw. 1737 cm^{-1} zu 1744 cm^{-1} nach der Zugabe von Uran auftreten, lässt sich eine Beteiligung von Lipiden an der Urankomplexierung bei Algen (Binder & Zschornig, 2002) vermuten. Außerdem sind in den Differenzspektren von intakten und aufgeschlossenen Zellen eine negative Bande bei 1401 cm^{-1} und eine positive Bande bei 1464 cm^{-1} zu erkennen, die eine Verschiebung der $\nu_s(\text{COO}^-)$ Schwingung von Carboxylgruppen hin zu höheren Wellenzahlen repräsentieren (Kakihana et al., 1987). Die negativen Banden bei 1250 cm^{-1} und 1066 cm^{-1} sowie die positiven Banden bei 1080 cm^{-1} und 1022 cm^{-1} belegen einen Symmetriewechsel der Phosphatgruppen, ausgelöst durch die Uranbindung (Li et al., 2010). Eine Beteiligung der Polysaccharide an diesen Veränderungen im Spektrum wird ausgeschlossen, da die Hauptzuckergruppen im sauren pH-Bereich nicht mit U(VI) wechselwirken (Stedtner et al., 2010) und deshalb wahrscheinlich keinen Beitrag zu diesen Spektren leisten. Die $\nu_3(\text{UO}_2)$ Banden in den Differenzspektren der ursprünglich lebenden Zellen haben im Fall von intakten Zellen ein Maximum bei 928 cm^{-1} mit einer kleinen Schulter bei 922 cm^{-1} (Abb. 3.22a).

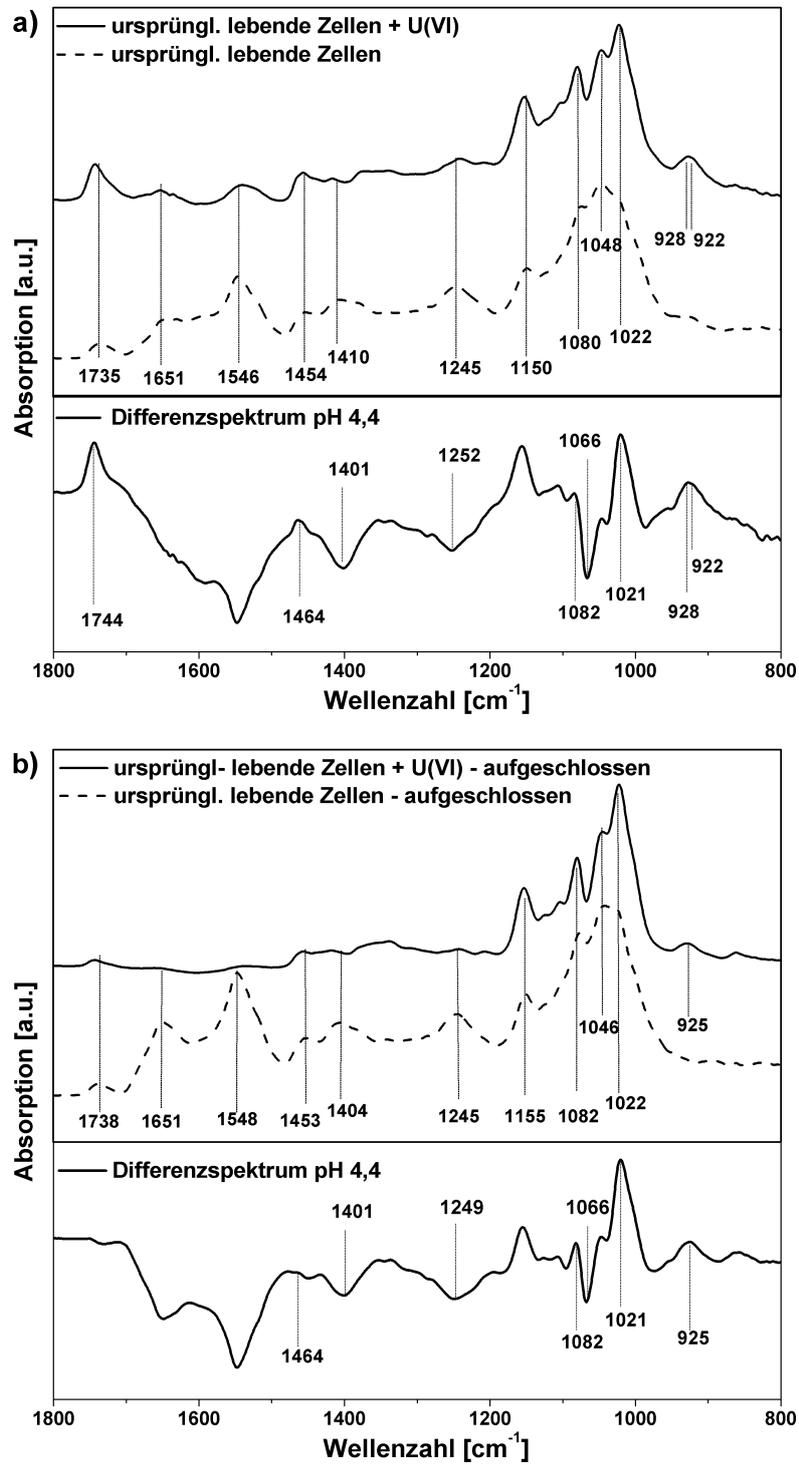


Abb. 3.22: IR- und Differenzspektren von Algenzellen mit U(VI) und entsprechende Kontrollproben ohne Uran bei pH 4,4. a) lebende Zellen b) lebende Zellen – aufgeschlossen

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob das Uran auch in die Algenzellen aufgenommen wird und um die dann dort gebildeten Urankomplexe zu charakterisieren, wurden zusätzlich zu intakten Zellen auch Zellhomogenate von mechanisch zerstörten Algenzellen untersucht. Das Peakmaximum der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Schwingung im Spektrum des Zellhomogenats ist gegenüber dem intakter Zellen leicht hin zu 925 cm^{-1} verschoben (Abb. 3.22b).

Die eindeutige Zuordnung der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Banden zu funktionellen Gruppen, die an der Uranbindung beteiligt sein können, ist jedoch schwierig, da viele Parameter wie z.B. der pH-Wert, desorbierte und gelöste Uranylspezies und die Beschaffenheit der Algenzelle einen Einfluss auf die Position dieser Bande haben. In der Literatur werden Uranspezies bei 923 cm^{-1} einer bidentaten Bindung von U(VI) an Carboxylgruppen zugeordnet (Kakihana et al., 1987). Je nach untersuchtem System sind Bindungen für Uran an organische Phosphate mit Peakmaxima bei 917 cm^{-1} (Li et al., 2010) oder 928 cm^{-1} (Merroun et al., 2005) beschrieben. In früheren Studien von Nakajima et al. (1981) mit trockener *Chlorella*-Biomasse wurde die $\nu_3(\text{UO}_2)$ Bande bei 914 cm^{-1} zugeordnet. Daraus lässt sich ableiten, dass die Probenbeschaffenheit (Wassergehalt, Frische, Intaktheit der Zelle, etc.) die Komplexierung von U(VI) in Batch-Experimenten beeinflusst. Mit Hilfe der IR-Analyse wurden also unterschiedliche U(VI)-Algen-Komplexe auf/in den Proben gefunden, unter anderem Komplexe, in denen Uran bidentat über Carboxylgruppen gebunden ist.

Zusammenfassend weisen die ATR-FTIR Ergebnisse im Fall von stoffwechselaktiven *Chlorella*-Zellen durch die Präsenz von Carboxylgruppenschwingungen und die Position der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Bande auf eine primäre U(VI)-Koordination durch Carboxylgruppen hin. Obwohl eine eindeutige Zuordnung der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Bande zu Phosphatgruppen schwierig ist, werden die Wechselwirkungen zwischen U(VI) und organischem Phosphat durch die Schwingungen der Phosphatgruppen und die Ergebnisse der TRLFS- (Kap. 3.10.1) und EXAFS-Messungen (Kap. 3.10.1.2) gestützt.

3.10.2 Charakterisierung von U(VI)-Komplexen mit metabolisch inaktiven Algen-Zellen

3.10.2.1 TRLFS

Autoklavierte Algenbiomasse wurde parallel zu den Versuchen mit lebender Biomasse in Mineralmedium bei pH 4,4 und Urankonzentrationen von $5\text{ }\mu\text{M}$ beziehungsweise $0,1\text{ mM}$ inkubiert. Die mit der toten Biomasse erhaltenen TRLFS-Ergebnisse (Abb. 3.23 & Tab. 3.19) zeigen deutlich, dass die U(VI)-Algen-Komplexe andere sind als die auf/in (ursprünglich) lebender Biomasse (Kap. 3.10.1.1).

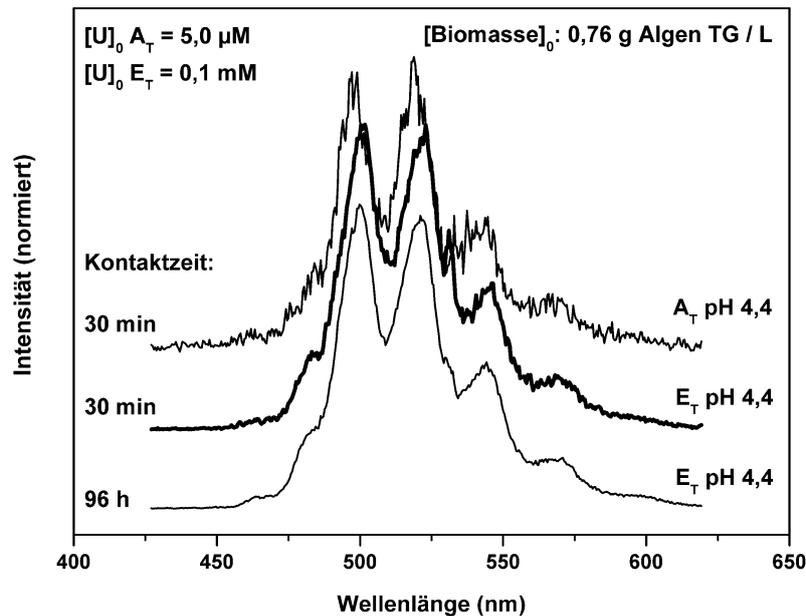


Abb. 3.23: Lumineszenzspektren von Uran(VI)-Algen-Komplexen, welche mit toten Zellen bei $[U]_0$ von $5,0 \mu\text{M}$ und $0,1 \text{ mM}$ in Mineralmedium bei pH 4,4 gebildet wurden.

Diese Beobachtung wird der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität der untersuchten Proben zugeschrieben. Die Peakmaxima in den Spektren der metabolisch inaktiven Algenzellen (A_T , E_T) sind verglichen mit denen von metabolisch aktiven Zellen, die unter denselben Bedingungen untersucht wurden, hin zu höheren Wellenlängen verschoben. Demzufolge sind die Emissionsbanden der toten Algenbiomasse eher mit Uranyl-Modellverbindungen vergleichbar, die (anorganische) Phosphate als Liganden für Uran aufweisen (Vgl. Kap. 3.10.1.1, Tab. 3.15). TRLFS-Spektren zeigen eine größere bathochrome Verschiebung im Vergleich zum Spektrum des freien Uranyls, je höher der Beitrag an anorganischen Phosphaten zum Spektrum wird. Die in dieser Studie beobachtete bathochrome Verschiebung der Spektren von autoklavierten *Chlorella*-Zellen ist nicht so groß wie die für Spektren von Lupinen (Günther et al., 2003), *Lysinibacillus sphaericus* (früher *Bacillus sphaericus*) (Panak et al., 2000) und *Chlorella*-Zellen in Natriumperchloratlösung bei pH 5 und 6 (Günther et al., 2008) beschriebene. Die geringere Verschiebung begründet sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen demnach in erster Linie durch Wechselwirkungen von Uran mit Carboxyl- und organischen Phosphatgruppen. Nur in geringem Ausmaß haben Uran-komplexe mit anorganischen Phosphaten ebenfalls einen Anteil an der Spektrenverschiebung.

Tab. 3.19: Lumineszenzemissionsbanden der Uran(VI)-Spezies auf/in *C. vulgaris*-Zellen im Mineralmedium bei unterschiedlichen Urankonzentrationen und Kontaktzeiten. X_T = tote Zellen; pH 4,4.

Probe	[U] ₀	Kontaktzeit (h)	Lumineszenzemissionsbanden (nm)							
Alge A _T	5,0 µM	0,5	463,0	481,6	497,9	518,9	541,6	566,0	591,7	
Alge E _T	0,1 mM	0,5	463,5	483,5	500,1	521,1	543,7	568,2	596,0	
Alge E _T	0,1 mM	96	465,2	482,5	499,0	520,2	542,9	567,3	598,8	

Möglicherweise verursacht das Abtöten der Algenzellen die Freisetzung des anorganischen Phosphats aus organischen Verbindungen. Die Art und Weise der Zellaktivierung scheint dabei einen Einfluss auf die Ergebnisse der TRLFS-Messung zu haben. Bei *Chlorella*-Zellen, die durch Einfrieren und Resuspension in 0,1 M Natriumperchloratlösung behandelt wurden (Günther et al., 2008), und bei *Lysinibacillus sphaericus*-Zellen, die langsam über vier Wochen bei Raumtemperatur zersetzt wurden (Knopp et al., 2003), konnten ähnliche spektrale Verschiebungen wie in dieser Arbeit festgestellt werden, die auf eine erhöhte Komplexierung von Uran mit anorganischen Phosphat hindeuten. Interessanterweise haben Knopp et al. (2003) festgestellt, dass eine Abtötung von *Lysinibacillus* bei 60°C über 24 h nicht zu Unterschieden bei den Uranemissionsbanden im Vergleich zu frisch präparierter Biomasse führt. Diese Beobachtung wurde so gedeutet, dass anorganisches Phosphat erst bei der Zersetzung der Zellen freigesetzt wird und durch Hitze abgetötete Zellen intakt bleiben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von autoklavierten *Chlorella*-Zellen zeigten scheinbar unversehrte Zellen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellwände und Membranen dennoch durchlässiger waren als die von metabolisch aktiven Zellen.

3.10.2.2 ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Urankomplexe mit abgetöteten *Chlorella*-Zellen wurden ebenfalls ergänzend zur TRLFS-Messung mittels ATR-FTIR charakterisiert. Die ATR FT-IR Spektren von unbehandelten und mit Uran inkubierten toten Algenzellen bzw. deren Zellhomogenat, sowie die entsprechenden Differenzspektren aus beiden, sind in Abb. 3.24 im Spektralbereich von 1800 cm⁻¹ bis 800 cm⁻¹ dargestellt.

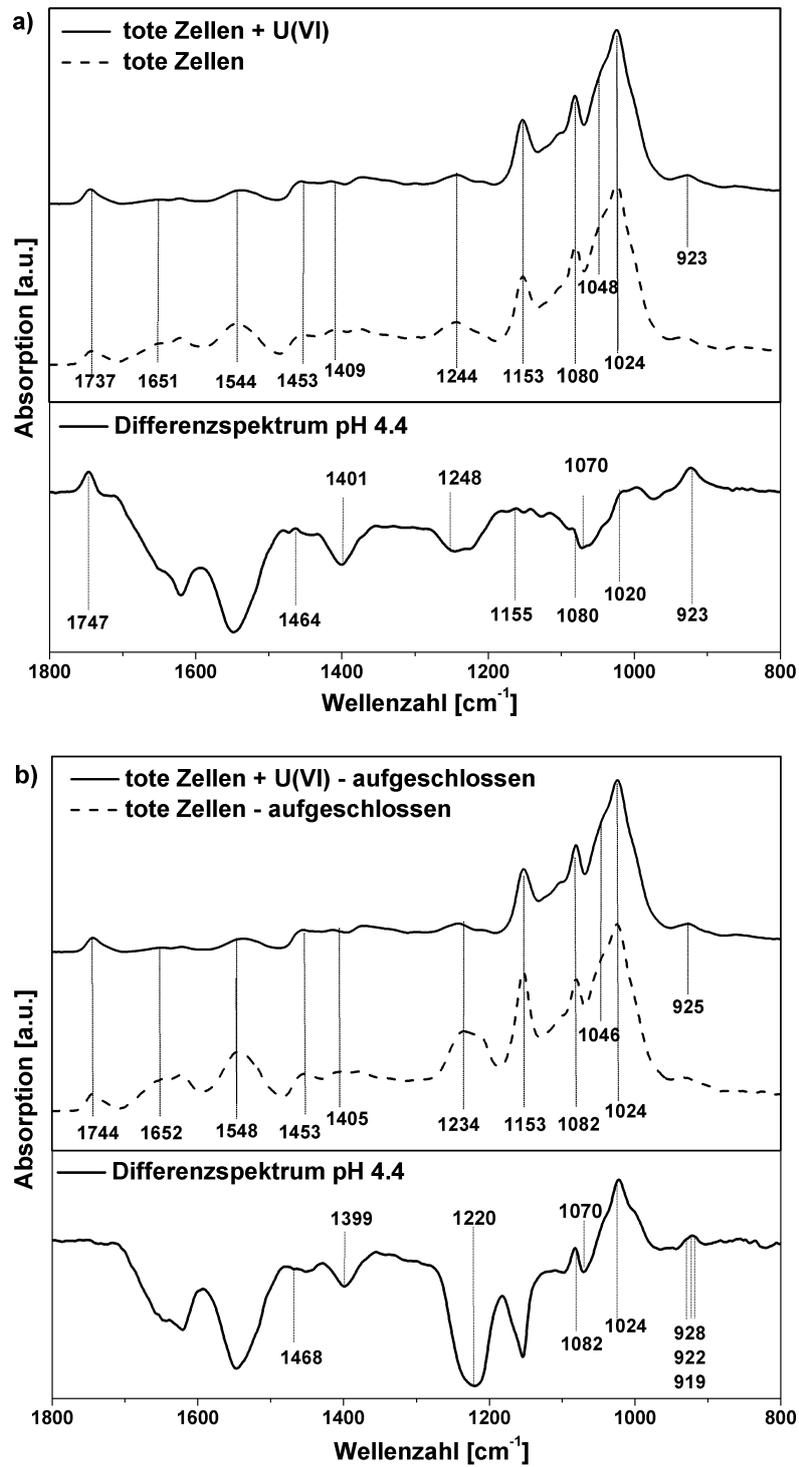


Abb. 3.24: IR- und Differenzspektren von aufgeschlossenen Algenzellen mit U(VI) und entsprechende Kontrollproben ohne Uran bei pH 4,4. a) tote Zellen b) tote Zellen – aufgeschlossen.

Für die toten Zellen konnten ähnliche Absorptionsmaxima in den Absorptionsspektren identifiziert werden wie für die metabolisch aktiven Zellen (Kap. 3.10.1.3). Die Spektren zeigen die Banden der Carbonyl-Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ (1737 cm^{-1} / 1744 cm^{-1}), von Amid I (1652 cm^{-1}), von Amid II ($1544\text{ cm}^{-1}/1548\text{ cm}^{-1}$), sowie von den asymmetrischen Deformationsschwingungen $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ (1453 cm^{-1}) und der symmetrischen Streck-schwingung $\nu_s(\text{COO}^-)$ ($1409\text{ cm}^{-1}/1405\text{ cm}^{-1}$). Am deutlichsten sind auch in diesen Absorptionsspektren die sich überlagernden Beiträge von Phosphatgruppen und Kohlenhydraten im Bereich von 1250 cm^{-1} bis 950 cm^{-1} erkennbar. Die mit Uran inkubierten Proben weisen zusätzlich die $\nu_3(\text{UO}_2)$ Banden bei 923 cm^{-1} beziehungsweise 925 cm^{-1} auf. Ebenso wie bei den metabolisch aktiven Zellen wurden auch in diesem Versuch Differenzspektren aus den Absorptionsspektren mit und ohne Uran berechnet, um die durch die Uranwechselwirkung hervorgerufenen Unterschiede in den Spektren hervorzuheben. Das Differenzspektrum der intakten toten Zellen (Abb. 3.24a) zeigt, ebenso wie das für die lebenden Zellen beschriebene (Kap. 3.10.1.3), eine positive Bande bei 1744 cm^{-1} , welche durch die Streckschwingung $\nu(\text{C}=\text{O})$ von Lipiden erzeugt wird. Die Verschiebung der $\nu_s(\text{COO}^-)$ Schwingung der Carboxylgruppen hin zu höheren Wellenzahlen ist bei den Differenzspektren erneut durch eine negative Bande bei 1401 cm^{-1} bzw. 1399 cm^{-1} und eine positive Bande bei 1464 cm^{-1} bzw. 1468 cm^{-1} zu erkennen. Das Muster der Phosphatgruppen in den Differenzspektren der intakten und aufgeschlossenen Zellen, welches durch die negativen Banden bei 1250 cm^{-1} und 1066 cm^{-1} , sowie die positiven Banden bei 1080 cm^{-1} und 1022 cm^{-1} gebildet wird, ist ebenfalls in den Spektren sichtbar. Es unterscheidet sich allerdings in seinem Aussehen von dem Muster in den Differenzspektren der metabolisch aktiven intakten Zellen, sowie von deren Zellhomogenat. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass die Bindung von U(VI) an *Chlorella* in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der Zellen variiert. Das Peakmaximum der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Schwingung im Differenzspektrum von intakten Zellen liegt bei 923 cm^{-1} (Abb. 3.24a). Im Spektrum des Zellhomogenats ist das Maximum dieser Bande bei 922 cm^{-1} , wobei noch zwei Schultern bei 928 cm^{-1} bzw. 919 cm^{-1} zuerkennen sind (Abb. 3.24b).

Wie bereits in Kapitel 3.10.1.3 beschrieben, ist die Zuordnung der $\nu_3(\text{UO}_2)$ Bande zu den beteiligten funktionellen Gruppen sehr schwierig. Trotzdem ist durch die Aufspaltung der Bande im Differenzspektrum der Probe der toten aufgeschlossenen Zellen die Schlussfolgerung möglich, dass mehrere funktionelle Gruppen an der U(VI)-Koordination mitwirken. Des Weiteren zeigen die positive Bande bei 1401 cm^{-1} und die negative Bande bei 1464 cm^{-1} erneut die Verschiebung der $\nu_s(\text{COO}^-)$ Schwingung hin zu höheren Wellenzahlen,

ausgelöst durch die bidentate Bindung von U(VI) an Carboxylgruppen (Kakihana et al., 1987).

Die ATR-FTIR-Ergebnisse der auf/in stoffwechselinaktiven *Chlorella*-Zellen gebildeten U(VI)-Algen-Komplexe deuten ebenso wie bei stoffwechselaktiven Zellen auf eine U(VI)-Koordination über Carboxyl- und Phosphatgruppen hin. Der Unterschied zwischen beiden Stoffwechselzuständen besteht darin, dass im Fall von inaktiven Zellen zusätzlich anorganische Phosphate, welche in toter Biomasse durch Zersetzung (Hydrolyse) von organischen Phosphaten freigesetzt werden, als Ligand von U(VI) fungieren können.

3.11 Strukturmodelle für die Uranbindung an *Chlorella* in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität

Die in dieser Arbeit eingesetzten spektroskopischen Techniken erwiesen sich als wertvolle, sich gegenseitig ergänzende Methoden, um die mit Algenbiomasse gebildeten Uran(VI)-Komplexe zu untersuchen und die für die Bindung von Uran verantwortlichen funktionellen Gruppen zu identifizieren. Anhand der Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen konnte unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine Mischung aus verschiedenen funktionellen Gruppen für die Koordination von Uran durch *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit vom Stoffwechselstatus der Zellen ermittelt werden. In Abb. 3.25 sind Modelle von Uran-Algen-Komplexen dargestellt, die während unterschiedlichen Stoffwechselzuständen der Algen gebildet wurden.

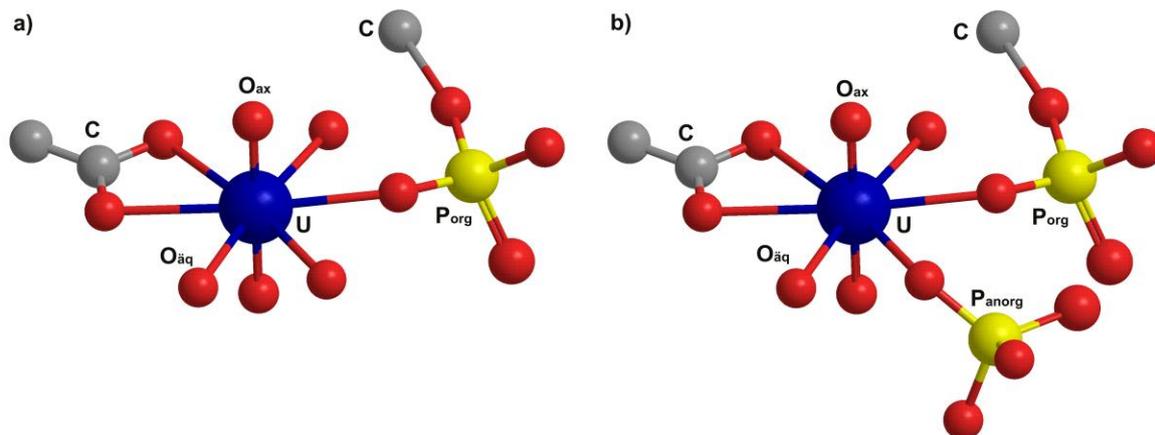


Abb. 3.25: Modelle der Uran-Algen-Komplexe, welche von a) stoffwechselaktiven und b) stoffwechselinaktiven *Chlorella*-Zellen gebildet wurden. In diesen Modellen wird U(VI) über zwei axiale Sauerstoffatome O_{ax} , sechs äquatoriale Sauerstoffatome $O_{äq}$ und die entsprechend daran gebundenen funktionellen Gruppen (Carboxylgruppe, organische Phosphatgruppe P_{org} , anorganische Phosphatgruppe P_{anorg}) koordiniert.

Im Fall von lebenden *Chlorella*-Zellen sind vor allem Carboxyl- und organische Phosphatgruppen für die Uranbindung verantwortlich. Die Carboxylgruppe bindet in bidentater und die Phosphatgruppe in monodentater Form an das Uran. Die Bindungsformen von Uran an tote Algenbiomasse unterscheiden sich zu denen mit lebender Biomasse in einer zusätzlichen Koordination von Uran über anorganische Phosphate, welche nach dem Zelltod durch Zersetzungsprozesse von organischen Phosphatverbindungen, wie z.B. phosphorylierten Proteinen, freigesetzt werden.

3.12 Lokalisierung von Uran an/in Algenzellen

Um den Bindungsort von Uran an/in den *Chlorella*-Zellen zu bestimmen, wurden mehrere Strategien verfolgt. Zum einen sollte der Bindungsort mikroskopisch über die Analyse von Algenzelldünnschnitten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gekoppelt mit einer EDX-Analyse durchgeführt werden. Zum anderen sollte der Urangehalt in verschiedenen Zellfraktionen Aufschluss über den Bindungsort geben. Alternativ zu den bereits genannten Herangehensweisen wurden isolierte Algenzellwände mit Uran kontaminiert und die gebildeten Uran-Zellwand-Komplexe laserfluoreszenzspektroskopisch charakterisiert.

3.12.1 Transmissionselektronenmikroskopie von Algenzelldünnschnitten

Eine mikroskopische Lokalisierung von gebundenem Uran an/in der Algenzelle wurde anhand von Dünnschnitten der Zellen mittels TEM versucht. Zum Vergleich, welche Änderungen im Erscheinungsbild der Algen durch Uraneinwirkung auftreten können, wurden neben den kontaminierten auch unbehandelte Zellen mikroskopiert (Abb. 3.26).

Wie in Abb. 3.26 zu erkennen, haben die Zellen einen Durchmesser von 2 – 4 μm und sind von einer dicken Zellwand umgeben. In der Detailansicht der Algenzelle (Abb. 3.26b) wird deutlich, dass das Zellinnere durch den einzelnen Chloroplast zum größten Teil ausgefüllt wird. In die Thylakoide des Chloroplasten sind mehrere Stärkekörner und ein Thylakoid-durchzogener Pyrenoid mit Stärkescheide eingelagert. Zentral in der Zelle gelegen ist schemenhaft der Nukleus zu erkennen. Im oberen Teil der Zelle hat sich die Plasmamembran von der Zellwand abgelöst und wird damit sichtbar. Insgesamt wird deutlich, dass während der Probenpräparation die Algenzellen weitestgehend intakt geblieben sind und sich nur gelegentlich Zellwände abgelöst haben.

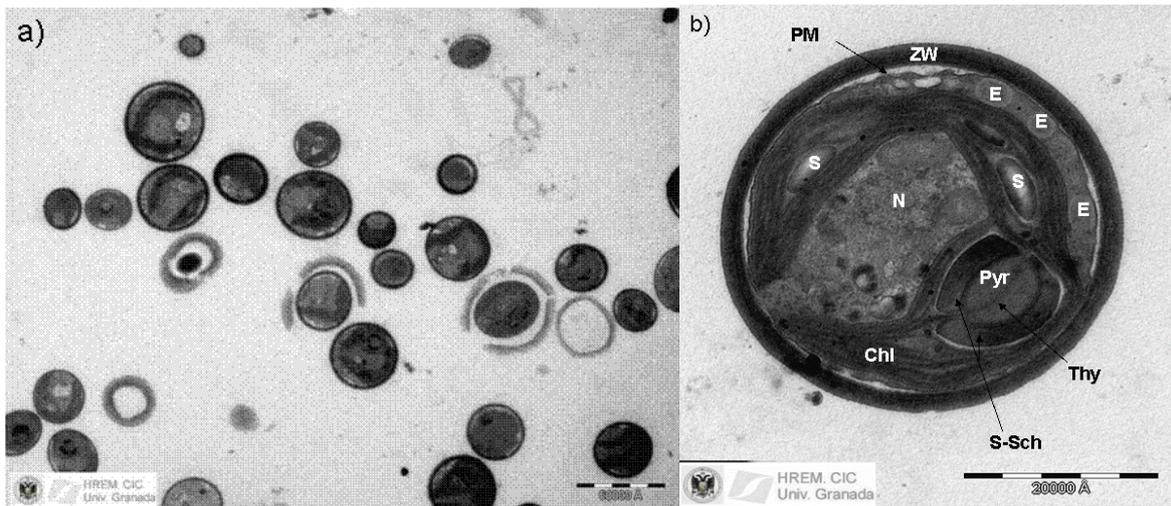


Abb. 3.26: TEM Bilder von unbehandelten *Chlorella vulgaris* Zellen. a) Übersichtsaufnahme; b) Detailaufnahme einer Algenzelle; Chl: Chloroplast, E: Speicherstoffe, N: Nukleus, Pyr: Pyrenoid, PM: Plasmamembran, S: Stärkekörner, S-Sch: Stärkescheide, Thy: Thylakoid, ZW: Zellwand.

Die Lokalisierung des Urans erfolgte an Zellen, die zum Zeitpunkt des Urankontakts metabolisch aktiv waren. Allerdings enthielten diese Zellsuspensionen zu einem gewissen Prozentsatz natürlich auch inaktive, absterbende Zellen. Im Fokus der Untersuchung standen Partikel, die potentielle Uranpräzipitate darstellen könnten, bzw. besonders exponierte Zellkomponenten, z.B. die Zellwand. In Abb. 3.27 und Abb. 3.28 sind mit Pfeilen und Großbuchstaben beispielhaft Stellen markiert, an denen eine EDX-Analyse vorgenommen wurde.

In Abb. 3.27a sind *Chlorella*-Zellen, welche für 48 h in Mineralmedium mit einer Urankonzentration von 1 mM inkubiert wurden. Die drei Zellen grenzen mit ihren Zellwänden aneinander. In der abgebildeten Region, insbesondere in der vergrößerten Darstellung in Abb. 3.27b, sind nadelförmige, 30–70 nm große Ablagerungen in der Zellwand zu erkennen. Durch eine EDX-Analyse konnte Uran (U) in diesen Ablagerungen nachgewiesen werden. Das entsprechende EDX-Spektrum ist in Abb. 3.27c dargestellt. Die anderen Peaks im Spektrum für C, Cu, Os, Pb, und Si resultieren aus der Art der Probenpräparation und den für die Lagerung der Dünnschnitte verwendeten Kupfernetzchen. Das von den Algen gebundene Uran ist demnach relativ gleichmäßig über die Oberfläche der Zellen verteilt. Eine regelmäßige Verteilung des Urans auf der Zelloberfläche zeigen auch die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen von Günther et al. (2008).

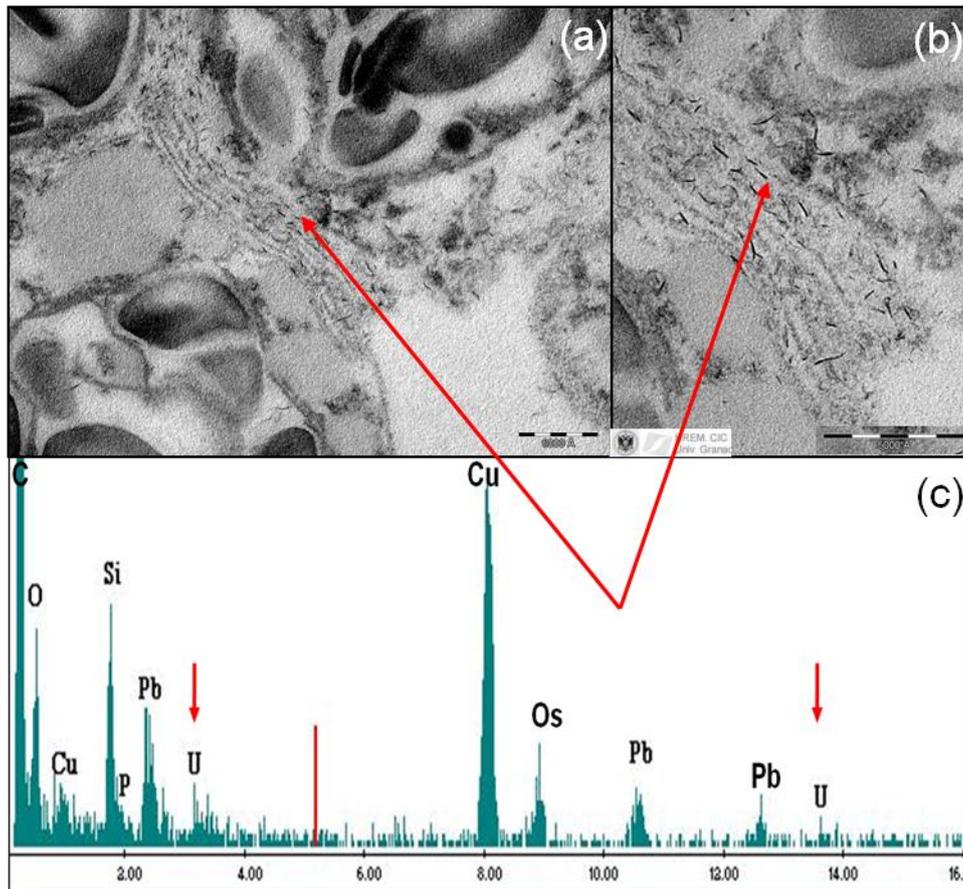


Abb. 3.27: TEM Bild von *Chlorella vulgaris* Zellen, die zum Zeitpunkt des Urankontakts (1 mM) lebten (a), Vergrößerung der aneinander grenzenden Zellwände (b). EDX-Spektrum nadelförmiger Ablagerungen in den Zellwänden (c).

Neben den Akkumulaten auf der Zelloberfläche sind in einigen Zellen außerdem stark kontrastierte Bereiche innerhalb der Zelle sichtbar (Abb. 3.28a). Die von diesen Bereichen durchgeführten EDX-Analysen weisen eindeutig darauf hin, dass auch diese Akkumulate Uran enthalten (Abb. 3.28c,d). Vergrößerungen dieser Regionen zeigen, dass es in diesen Zellbereichen zu einer Anhäufung von nadelförmigen Ablagerungen, ähnlich denen auf der Zelloberfläche gekommen ist (Abb. 3.28b). Von einer aktiven Aufnahme des Urans in die Zelle wird jedoch nicht ausgegangen, da unter anderem, wie auch in Abb. 3.28a zu sehen, nicht alle Zellen diese inneren Ablagerungen aufweisen. Vielmehr kann die Akkumulation von Uran im Inneren der Zellen durch eine Schädigung von Zellwand bzw. Zellmembran während der 48-stündigen Inkubation mit Uran erklärt werden. Außerdem befanden sich im Inkubationsansatz neben den lebenden auch eine gewisse Anzahl toter Zellen mit bereits kaputter Zellwand. In diese geschädigten Zellen konnte Uran eindringen und an Zellorganellen binden oder mit bestimmten Stoffen, wie zum Beispiel Phosphat, innerhalb der Zelle präzipitieren. In toter Biomasse werden Phosphate im Laufe der Zeit vermehrt durch Hydrolyse von organischen Verbindungen freigesetzt und stehen dann für eine Präzipitation

mit Uran zur Verfügung. Ein Indiz für die Existenz von Phosphat in den Akkumulaten im Zellinneren liefert das EDX-Spektrum der beprobten Region B (Abb. 3.28d). Der erhöhte Phosphorgehalt an der Stelle ist durch den vergrößerten Peak bei 2 keV deutlich zu erkennen.

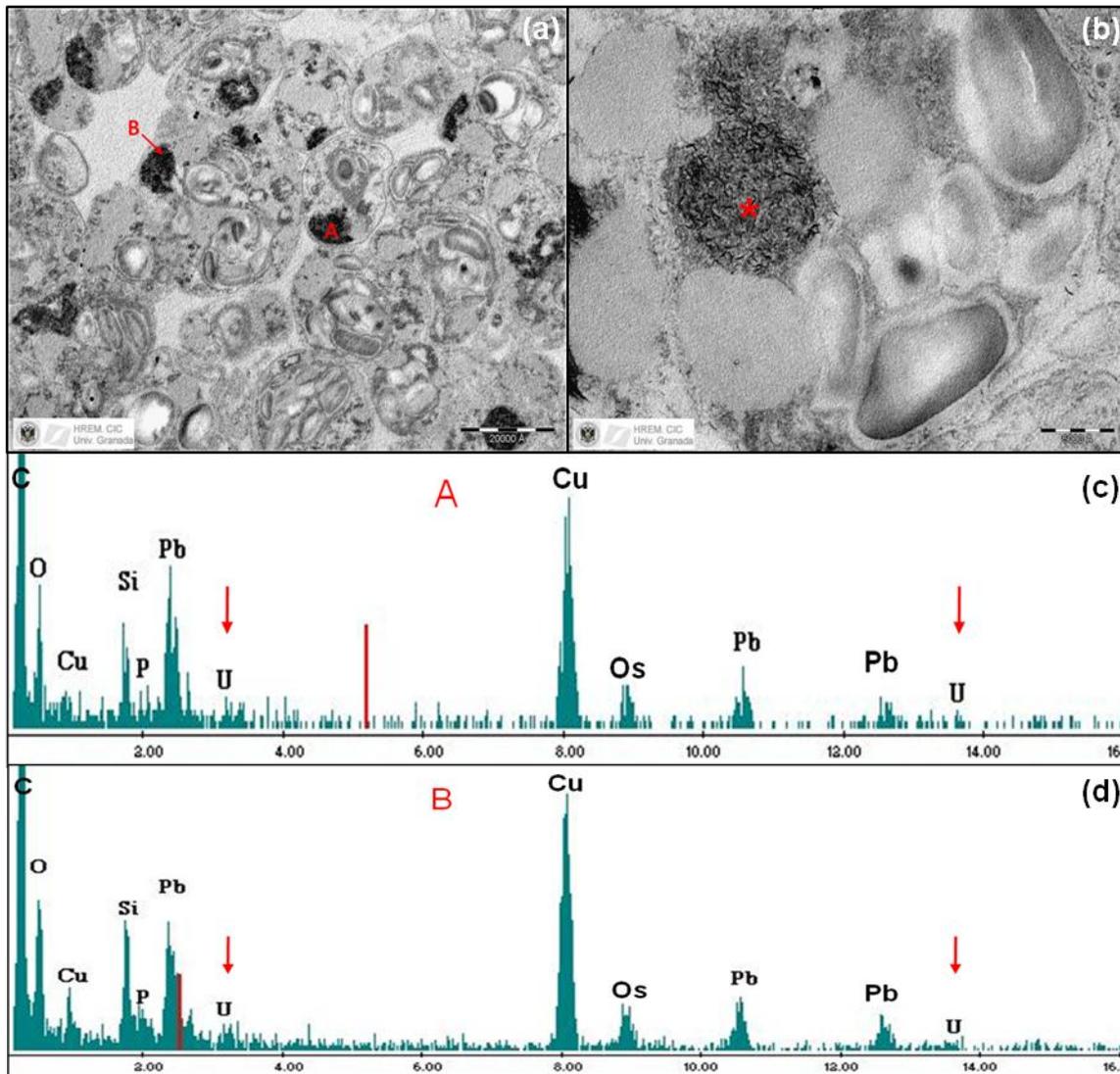


Abb. 3.28: TEM-Bild (a) von *Chlorella vulgaris* Zellen, die Akkumulate im Zellinneren zeigen. (b) TEM-Bild Nahaufnahme eines stark kontrastieren Bereichs (*) im Zellinneren. EDX-Spektren (c-d) der beprobten Regionen A und B im TEM-Bild.

3.12.2 Urangehalt in Algenzellfraktionen

Zur Ermittlung des Urangehalts in Algenzellfraktionen wurde lebende und tote *C. vulgaris*-Biomasse in Mineralmedium mit einer Urankonzentration von 0,5 mM bei pH 4,4 für 48 h inkubiert und die Zellen nach Abtrennung des Mediums mit Hilfe einer Schwingmühle aufgeschlossen. Der Urangehalt wurde von ganzen Zellen und in den festen und flüssigen Zellfraktionen, die nach einer Zentrifugation bei 25,000×g für 10 min entstanden, bestimmt. Es wurden drei Versuche durchgeführt. Deren Ergebnisse sowie die daraus berechneten Mittelwerte für lebende und tote Biomasse sind in Tab. 3.20 zusammengefasst.

Tab. 3.20: Verteilung von gebundenem Uran in unterschiedlichen Zellfraktionen von *C. vulgaris*.

	U-Gehalt in ganzen Zellen (mg U/ g Zell-TG)	U-Gehalt in fester Zellfraktion (mg U/ g Zell-TG)	Mittelwert Anteil U in Feststofffraktion in % des U- Gehalts von ganzen Zellen	U-Gehalt in flüssiger Zellfraktion (µg U/ g Zell- TG)	Mittelwert Anteil U in flüssiger Zellfraktion in % des U-Gehalts in ganzen Zellen
Lebende Zellen	89,1 54,9 69,6	66,9 (75,1) ^a 45,6 (83,0) ^a 54,0 (77,6) ^a	78,6 ± 4,0	235 (0,3) ^b 6 (0,01) ^b 236 (0,3) ^b	0,2 ± 0,2
Tote Zellen	87,0 50,2 69,2	72,1 (82,9) ^a 44,4 (88,4) ^a 55,8 (80,6) ^a	84,0 ± 4,0	321 (0,4) ^b 116 (0,2) ^b 234 (0,3) ^b	0,3 ± 0,1

a Die Werte in Klammern geben den Urangehalt der festen Zellfraktion als Prozent des Urangesamtgehalts von ganzen Zellen an.

b Die Werte in Klammern geben den Urangehalt der flüssigen Zellfraktion als Prozent des Urangesamtgehalts von ganzen Zellen an.

Da in den drei durchgeführten Versuchen nicht mit derselben Biomassekonzentration gearbeitet wurde, unterscheiden sich die Uranmengen an der Biomasse voneinander. Die Werte für lebende und tote Biomasse einer Versuchsreihe sind sich jedoch sehr ähnlich. Es ist ja bereits aus den Sorptionsversuchen bekannt, dass die lebenden Algenzellen bei höheren Urankonzentrationen absterben und sich somit bezüglich der Uranbindung analog zu toter Biomasse verhalten (Kap. 3.4.1 & 3.4.2). In der festen Zellfraktion sind 78,6 % des gebundenen Urans im Falle von lebenden Zellen und 84 % des gebundenen Urans im Falle von toten Zellen enthalten. Aus der Literatur sind Werte von 75 % Urangehalt in der Zellfraktion, die bei 26000×g sedimentiert, sowohl für lebende als auch erhitzte Zellen bekannt (Horikoshi et al., 1979a). In der flüssigen Zellfraktion von lebenden und toten Zellen konnten nur 0,2 % bzw. 0,5 % des Urangehalts der gesamten Zelle detektiert werden. Die Aufnahme von Uran in die Zelle, welches auch zum Zelltod der ursprünglich lebenden Zellen geführt haben könnte, wurde somit nicht abschließend bestätigt. Der Unterschied im Urangehalt der festen Zellfraktion bei den untersuchten unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ist nicht signifikant. Außerdem konnte der quantitative Nachweis des Urans in der entsprechend dazugehörigen löslichen (flüssigen) Zellfraktion nicht erbracht werden. Allerdings bedeutet ein hoher Urangehalt in der festen Zellfraktion nicht zwangsläufig, dass das Uran nur oberflächlich gebunden ist. Sowohl mineralisiertes Uran als auch Uran, welches an Zellorganellen, Speicherstoffe innerhalb von *Chlorella*-Zellen gebunden oder unlösliche Komplexe gebildet hat, würde durch die Zentrifugation sedimentieren. Für eine genauere Unterscheidung des Bindungsorts ist eine differenziertere Fraktionierung, zum Beispiel über Dichtegradientenzentrifugation, notwendig.

3.12.3 Laserfluoreszenzspektroskopie von U(VI)-Zellwand-Komplexen

Zur Gewinnung von Zellwänden wurden größere Mengen *C. vulgaris*-Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Aus dem entstandenen Homogenat wurden durch differenzielle Zentrifugation die rein weißen Zellwände isoliert. Diese Algenzellwände wurden in Mineralmedium mit 0,1 mM Uran bei pH 4,4 für 96 h inkubiert. Die gebundene Uranmenge an der Zellwandbiomasse betrug 2,13 mg U/g Biomasse-TG. Von den gebildeten U(VI)-Zellwandkomplexen wurde ein Lumineszenzspektrum aufgenommen. Dieses ist gemeinsam mit den Spektren von U(VI) an toter (E_T) und ursprünglich lebender (E_L) Algenbiomasse in Abb. 3.29 abgebildet. Die Spektren von U(VI) an ganzen Zellen und der Zellwand ähneln sich im Hinblick auf Form und Lage der Peakmaxima. Das Auftreten und die Lage einzelner Emissionsbanden ist jedoch leicht unterschiedlich (Tab. 3.21). Insbesondere die drei mittleren Hauptpeaks des Zellwandspektrums liegen mit ihren Maxima genau zwischen denen der Spektren von lebenden und toten Zellen. Da es sich in allen drei Fällen um Summenspektren verschiedener U(VI)-Komplexe handelt, ist davon auszugehen, dass die Anteile der funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche oder aber auch auf der Innenseite der Zellwand, die an der Uranbindung beteiligt sind, variieren.

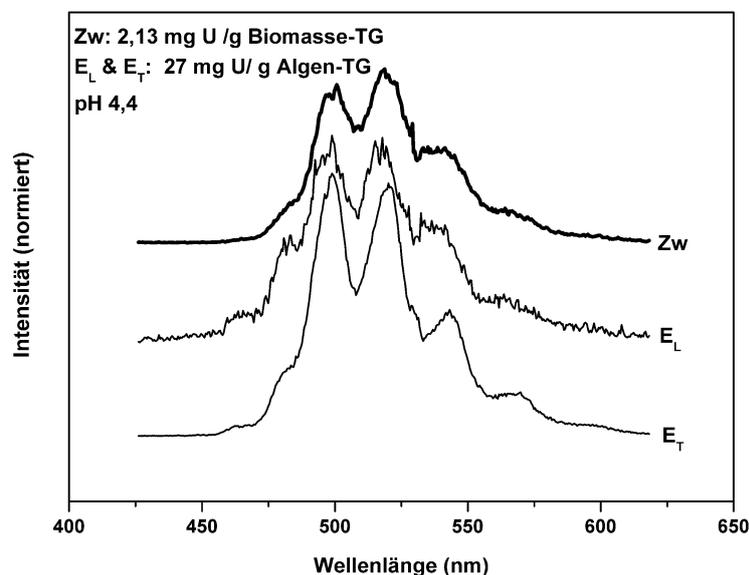


Abb. 3.29: Lumineszenzspektrum von einem U(VI)-Zellwand-Komplex (Zw) verglichen mit Spektren von U(VI) gebunden an ursprünglich lebende (E_L) und tote (E_T) *Chlorella*-Zellen in Mineralmedium bei pH 4,4.

Tab. 3.21: Lumineszenzemissionsbanden von U(VI)-Zellwand- und U(VI)-Algen-Komplexen.

Probe	Lumineszenzemissionsbanden (nm)						
Z _w	465,1	481,5	598,8	518,8	540,8	566,1	590,0
E _L	463,2	481,7	497,7	516,8	538,3	564,8	590,0
E _T	465,2	482,5	499,0	520,2	542,9	567,3	598,8

So ist die Bande bei ca. 463 nm nur bei den Spektren ganzer Zellen deutlich erkennbar. Für die Lage der Peaks im Zellwandspektrum im Vergleich zu denen von ganzen Zellen lassen sich drei mögliche Erklärungen finden. Erstens ist vor allem aufgrund der geringeren Biomassekonzentration von 0,76 g Zell-TG/L im Gegensatz zu 2 g Zellwand-TG/L bei der Sorption an den ganzen Zellen mehr Uran gebunden (ca. 27 mg U/g Algen-TG im Vergleich zu 2,13 mg U/g Zellwand-TG). Dies hat zur Folge, dass pro Zelle mehr funktionelle Gruppen an der Uranbindung beteiligt sind. Die TRLFS-Ergebnisse des Modelkomplexes U(VI)-Acetat, die von lebenden Algenzellen mit U(VI) und die EXAFS-Ergebnisse mit lebenden Zellen haben gezeigt, dass bei erhöhter Urankonzentration mehr Komplexe mit der Biomasse gebildet werden, bei denen Uran über Carboxylgruppen koordiniert wird. Ist die Urankonzentration auf der Biomasse niedriger, scheinen organische Phosphatgruppen bevorzugt an der Bindung von Uran beteiligt zu sein. Zu einer ähnlichen Erkenntnis gelangten wie bereits in vorangegangenen Kapitel (Kap. 3.10.1.1 & 3.10.1.2) erwähnt Li et al. (2010) für die Komplexierung von U(VI) mit Phosvitin.

Zweitens ist es denkbar, dass insbesondere bei erhöhter Urankonzentration im Falle von Wechselwirkungen mit toter Biomasse Komplexe mit anorganischen Phosphatverbindungen entstehen. Diese begünstigen aufgrund ihrer höheren Lumineszenzausbeute trotz der ebenso vermehrt gebildeten Komplexe über Carboxylgruppen eine spektrale Verschiebung hin zu höheren Wellenlängen. Das Lumineszenzspektrum von toten Zellen ist somit durch den nachgewiesenen Einfluss der anorganischen Phosphate (vgl. 3.10.2.13.10.2.2) am weitesten hin zu höheren Wellenlängen verschoben.

Drittens deutet die tendenzielle Peakverschiebung des Lumineszenzspektrums der U(VI)-Zellwandkomplexe hin zu den Peakmaxima der U(VI)-Komplexe mit toten Zellen an, dass in beiden Fällen neben den funktionellen Gruppen auf der Algenzelloberfläche auch Liganden auf der Zellinnenseite für die Bindung von Uran verantwortlich sein können.

Letztlich sind die unterschiedliche Urankonzentration im Verhältnis zur eingesetzten Biomasse und die Beteiligung von anorganischen Phosphaten an der Uranbindung bei toter Biomasse am wahrscheinlichsten für die Lage des U(VI)-Zellwandspektrums im Vergleich zu denen von urankontaminierten lebenden und toten Zellen verantwortlich.

4 Schlussfolgerungen & Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Sorptionsexperimente zeigen deutlich den maßgeblichen Einfluss des Stoffwechselstatus von *Chlorella* auf die Wechselwirkung mit Uran. Sowohl metabolisch aktive als auch inaktive Algen binden Uran in signifikanten Mengen von 14 mg U/g Algen-TG und 28 mg U/g Algen-TG. Offensichtlich ist, dass vitale Algen weniger Uran als tote Biomasse binden. In Gegenwart von umweltrelevanten Urankonzentrationen kann eine Remobilisierung von zuvor passiv gebundenem Uran durch die stoffwechselaktiven Algen erfolgen. Dies kann sowohl ein aktiver Detoxifizierungsmechanismus als auch ein Nebeneffekt des normalen Algenwachstums sein. Die Desorption des Urans wird offensichtlich durch Stoffwechselprodukte der Algen wie z.B. organische Säuren und/oder phosphorylierte Verbindungen bewirkt. Experimente mit getrockneter, inaktiver oder toter Biomasse sind demnach nur bedingt für die Vorhersage der Wechselwirkungen zwischen Uran und Organismen in der Natur geeignet. Je nach Stoffwechselstatus der Algen erfolgt eine Mobilisierung oder Immobilisierung des Urans. Allerdings wurde durch die Experimente mit Leitungswasser und dem natürlichen Bergbauwasser bestätigt, dass neben der Stoffwechselaktivität die natürlichen Gegebenheiten des Mediums und die damit verbundene Speziation des Urans von entscheidender Bedeutung für die Wechselwirkung mit Biomasse sind. Außerdem bestätigte sich, dass insbesondere das freie Uranylion aber auch andere geladene Uranspezies an die Biomasse im pH-Wertbereich zwischen 4,4 und 7,0 binden. Dagegen sorbieren zum Beispiel der Calciumuranylcarbonatkomplex aus dem Leitungswasser oder der neutrale Uranylsulfatkomplex $\text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$ aus dem Mineralmedium und dem Oberflächenwasser der ehemaligen Gessenhalde schlecht an den Algenzellen.

Die in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität, der Urankonzentration und dem pH-Wert mit den Algenzellen gebildeten Uran(VI)-Komplexe wurden strukturell mit Hilfe der spektroskopischen Methoden TRLF-, EXAFS- und ATR-FTIR-Spektroskopie charakterisiert. Die zentrale Erkenntnis dieser Untersuchungen ist, dass verschiedene funktionelle Gruppen an der Bindung von Uran an die Algenzelle beteiligt sind. Lebende *Chlorella*-Zellen koordinieren Uran über Carboxyl- und organische Phosphatgruppen. Dahingegen gibt es bei toten Algenzellen zusätzlich eine Beteiligung von anorganischen Phosphatgruppen an der Uranbindung, hervorgerufen durch die Lyse der Zelle und den damit einhergehenden Abbau von verschiedenen phosphorylierten Verbindungen (z.B. Proteine). Des Weiteren verändert sich mit erhöhter Urankonzentration der jeweilige Anteil der beteiligten funktionellen

Gruppen an der Urankoordination. Je höher die Urankonzentration ist, umso größer ist die Beteiligung von Carboxyl- und anorganischen Phosphaten bei der Wechselwirkung von Uran mit der jeweiligen Biomasse. Gemäß den unterschiedlichen pKa-Werten vorhandener funktioneller Gruppen hat der pH-Wert ebenfalls einen Einfluss auf die Verfügbarkeit funktioneller Gruppen bei der Uranbindung. Im untersuchten pH-Wertbereich von 4,4 bis 7,0 liegen Carboxyl- und Phosphatgruppen deprotoniert vor und stellen potentielle Bindungsorte für kationische Uranylspezies dar. Dagegen verbleiben die meisten Amino- und Hydroxylgruppen bei neutralen pH-Werten noch protoniert. Die Aminogruppen könnten somit an der Bindung von anionischen Uranylspezies beteiligt sein.

Die organischen Säuren Oxalsäure und Citronensäure sowie die Phosphatverbindung ATP sind in der Lage, den größten Teil des algengebundenen Urans zu mobilisieren. Die Uran(VI)-Algen-Komplexe sind im Vergleich zu den Urankomplexen mit den genannten stoffwechselrelevanten Substanzen relativ instabil. Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich für die Komplexstabilität mit Uran(VI)-Komplexen folgende Reihenfolge ableiten: Algen < Oxalat < Citrat < ATP.

Die Sorptionsversuche mit Uran an Algenzellen deuten an, dass die Zelloberfläche eine zentrale Rolle bei der Wechselwirkung zwischen *Chlorella* und Uran spielt. So erfolgt die nahezu vollständige Bindung des eingesetzten Urans innerhalb kürzester Zeit, unabhängig von der Stoffwechselaktivität der Zellen, basierend auf physikochemischer Adsorption zunächst an die Zelloberfläche. Eine zeitabhängige langsame Akkumulation von Uran konnte nicht beobachtet werden. Die Fraktionierungsversuche mit urankontaminierten Algenzellen führten zum Nachweis von mindestens 79 % des gebundenen Urans in der Fraktion der festen Zellbestandteile. Hinweise auf gelöste Urankomplexe im Zytosol gab es bei den durchgeführten Experimenten jedoch nicht. Allerdings kann eine Komplexierung mit anderen Zellkomponenten oder eine Präzipitation von Uran in der Zelle nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt deuten die beschriebenen Ergebnisse auf eine gleichmäßige Verteilung des Urans auf der Zelloberfläche lebender Algenzellen hin. Die durchgeführten TRLFS-Messungen waren sensitiv genug um dieses Uran auch bei geringen Konzentrationen (1,3 mg U/g Algen-TG) zu detektieren. Dahingegen konnte mit der EDX-Analyse von Algenzelldünnschnitten nur Uran an den Zellen nachgewiesen werden, wenn sehr hohe Uranmengen (80 mg U/g Algen-TG) gebunden waren und diese somit im untersuchten Zellwandabschnitt trotz der feinen Verteilung oberhalb der Nachweisgrenze der Methode lagen. Die TEM-Bilder zeigen Uran an den zum Zeitpunkt des Urankontakts lebenden Algenzellen in Form von 30-70 nm großen nadelförmigen Ablagerungen in der Zellwand. Akkumulate ähnlich geformter Uran-

ablagerungen fanden sich vereinzelt auch im Inneren einiger Zellen. Dieses Erscheinungsbild ist jedoch wahrscheinlich auf tote Zellen mit beschädigter Zellwand beschränkt. Mit der in dieser Arbeit verwendeten schlichten Trennung in flüssige und feste Zellbestandteile war es nicht möglich, die beschriebenen Uranablagerungen von den Zellbestandteilen zu trennen. Für die Überprüfung der These, dass diese Uranablagerungen im Inneren nur bei toten Zellen auftreten, wäre eine stärkere Fraktionierung der Algenzellen beispielsweise mittels Dichtegradientenzentrifugation hilfreich.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag zur Vorhersage des Migrationsverhaltens von Uran unter umweltrelevanten Bedingungen und der radiologischen Risikobewertung von geogen und anthropogen auftretendem Uran. Zum weitergehenden Verständnis der Wechselwirkung von Uran mit Primärproduzenten und somit einer verlässlichen Abschätzung des Transfers oder des Verhaltens von Uran in der Nahrungskette sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Es gilt den Uranbindungsort noch genauer zu lokalisieren und eine mögliche Aufnahme in die Zelle und somit einen möglichen Eingriff des Urans in die Stoffwechselprozesse der Alge nachzuweisen. Auch der potentielle Detoxifizierungsmechanismus und die Stoffe, die tatsächlich für die Mobilisierung des Urans verantwortlich sind, müssen identifiziert und näher untersucht werden. Das bessere Verständnis der Interaktion zwischen Uran und dem einzelligen Organismus *Chlorella* kann eine fundierte Grundlage dafür bilden, die bei Einwirkung von Uran in komplexeren mehrzelligen Organismen ablaufenden Prozesse aufklären zu können.

5 Experimentelle Einzelheiten

5.1 Algenstamm

Für diese Arbeit wurde der Algenstamm *Chlorella vulgaris* Beijerinck aus der Stammsammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG) verwendet.

5.2 Kulturmedien und Lösungen

5.2.1 Vollmedium (fest)

Für die Herstellung des Algenvollmediums nach Esser (2000) wurden zunächst eine Mineralien-, eine Spurenelemente- und eine Phosphatpufferstammlösung hergestellt und mittels Sterilfiltration sterilisiert. Deren Zusammensetzungen sind im Folgenden aufgelistet.

Mineralienstammlösung (MST)

NH_4NO_3	0,5 g	0,0062 M
K_2HPO_4	0,2 g	0,0011 M
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g	0,0008 M
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g	0,0007 M
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad. 1000 ml	

Spurenelementestammlösung (SST)

EDTA	1,0 g	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2,5 g	0,0870 M
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g	0,0126 M
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g	0,0048 M
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,075 g	0,0032 M
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,075 g	0,0030 M
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,075 g	0,0006 M
H_3BO_3 (Anhydrid)	0,05 g	0,0081 M
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	ad. 100 ml	

Phosphatpuffer (PP) pH 7

KH ₂ PO ₄	3,63 g	0,0208 M
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	7,17 g	0,0535 M
H ₂ O _{bidest.}	ad. 1000 ml	

Zur Herstellung des festen Vollmediums wurden Hefe (4 g/l), Natriumacetat (2,0 g/l) und Agar (15 g/l) in VE-Wasser resuspendiert und für 25 min bei 121°C autoklaviert. Nachdem das Medium leicht abgekühlt war, wurden die bereits steril vorliegenden Stammlösungen SST (2 ml/l), MST (100 ml/l) und PP (100 ml/l) hinzugefügt. Das auf ca. 55 °C temperierte Medium wurde zum Gießen von Schrägagarröhrchen beziehungsweise Platten verwendet.

5.2.2 Glucose-Glycin-Medium

Das Glucose-Glycin-Medium ist eine Abwandlung des in Kap. 5.2.1 beschriebenen festen Vollmediums. Für dieses Flüssigmedium wurde kein Agar verwendet. Der Hefeextrakt und das Natriumacetat wurden durch Glucose und Glycin (jeweils 5 g/l) als organische Energiequelle ersetzt, um das Flüssigmedium definiert zu gestalten. Dazu wurde zunächst die Glycinlösung mit HCl bzw. NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und autoklaviert. Die Glucosestammlösung (100 g/L) wurde steril filtriert und erst nach dem Abkühlen der Glycinlösung zu dieser hinzugefügt.

Zusammensetzung von 1 Liter Glucose-Glycin-Medium:

Glycin	5 g	5 g/L
Glucose	50 ml	5 g/L
MST	100 ml	
PP	100 ml	
SST	2 ml	

5.2.3 Mineralmedium

Für die Sorptionsexperimente mit Uran war es notwendig ein Medium zu wählen, welches keine organischen Komponenten enthält. Deren Einfluss auf die Uranspeziation ist noch nicht vollständig geklärt und damit verbunden wären Aussagen über die Verfügbarkeit des Urans für die Algenzellen erschwert worden. Für das in dieser Arbeit verwendete Mineralmedium wurde das von Kuhl und Lorenzen (1964) beschriebene Medium zur Anzucht von *Chlorella* als Grundlage gewählt.

Um unerwünschte Wechselwirkungen einiger Komponenten des Originalmediums mit Uran auszuschließen, wurde das Medium modifiziert. Auf EDTA wurde vollkommen verzichtet und die Phosphatkonzentration auf 5×10^{-6} M begrenzt. Die genaue Zusammensetzung von einem Liter Mineralmedium ist im Folgenden aufgeführt.

KNO ₃	1011,10 mg	1×10^{-2} M
NaH ₂ PO ₄ × 1 H ₂ O	6,210 mg	$4,5 \times 10^{-6}$ M
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	0,89 mg	$0,5 \times 10^{-6}$ M
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	246,50 mg	1×10^{-3} M
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	14,70 mg	1×10^{-4} M
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	6,95 mg	$2,5 \times 10^{-5}$ M
H ₃ BO ₃	0,061 mg	1×10^{-6} M
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	0,169 mg	1×10^{-6} M
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,287 mg	1×10^{-6} M
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,00249 mg	1×10^{-8} M
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,01235 mg	1×10^{-8} M
H ₂ O _{bidest.}	1000 ml	

5.2.4 Leitungswasser (Rossendorf)

Die Zusammensetzung von Leitungswasser aus Rossendorf, welches vor den Versuchen frisch aus der Leitung entnommen und autoklaviert wurde, ist in Tab. 5.1 aufgelistet. Die Zusammensetzung des Leitungswassers wurde mittels Elementaranalyse (Kap. 5.11) bestimmt.

Tab. 5.1: Zusammensetzung Leitungswasser Rossendorf.

Parameter	Konzentration (mmol / l)
Na	12,00
K	0,13
Ca	1,10
Mg	0,34
Cl	0,78
Fe	-
U	$1,20 \times 10^{-4}$
NO ₃ ⁻	0,28
CO ₃ ²⁻ / HCO ₃ ⁻	1,43
SO ₄ ²⁻	0,86
PO ₄ ²⁻	$< 5,00 \times 10^{-3}$
TOC (mg / L)	2,30
pH	7,10

5.2.5 Oberflächenwasser der Gessenwiese

Das Oberflächenwasser der Gessenwiese stammt vom „Testfeld Gessenwiese“ auf dem Gebiet der alten Gessenhalde im ehemaligen Ostthüringer Uranbergbaugebiet Ronneburg (Abb. 5.1).

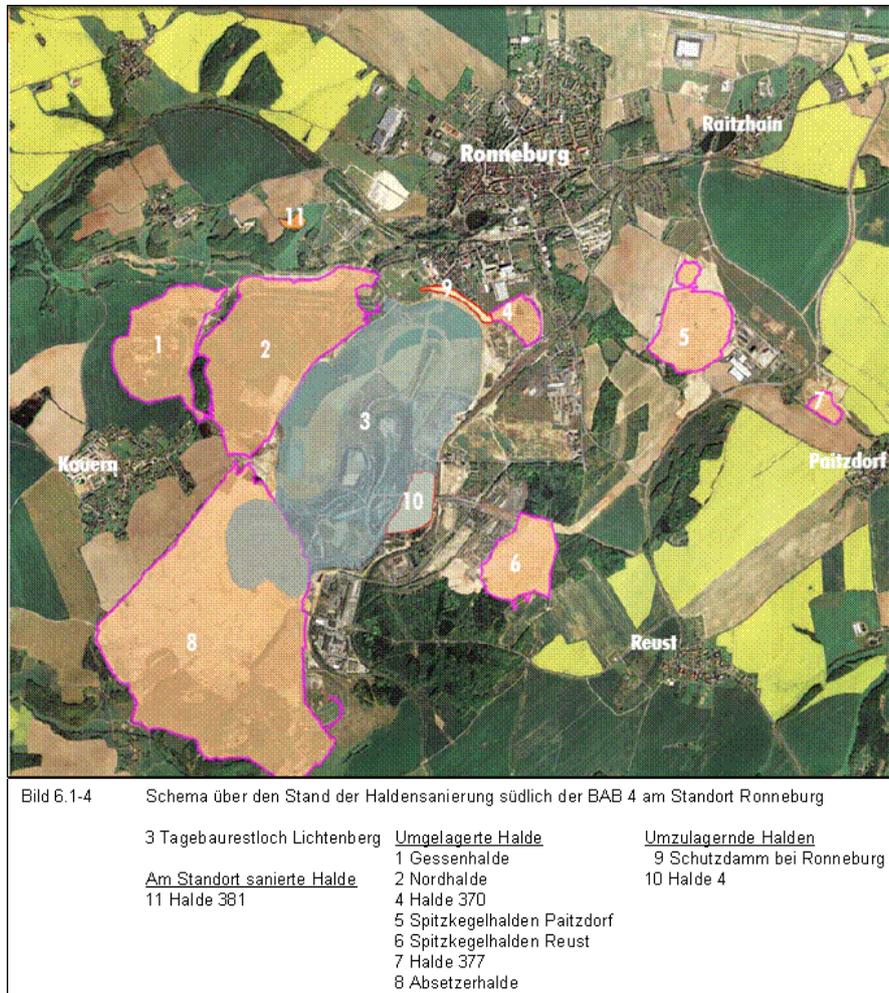


Abb. 5.1: Übersichtskarte (Wismut GmbH, 2006) des ehemaligen Uranbergbaugebiets bei Ronneburg (Thüringen).

Es wurden Wasserproben aus einem oberflächlich gelegenen Wasserlauf auf der Gessenwiese (Gebiet 1 auf der Übersichtskarte in Abb. 5.1) entnommen. Die natürlich in dem Wasser vorkommenden Kleinstlebewesen wurden mikroskopisch untersucht.

Die Wasserproben wurden im unbehandelten und im sterilfiltrierten Zustand hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert. Die wichtigsten Parameter sind in Tab. 5.2 zusammengefasst.

Tab. 5.2: Zusammensetzung von natürlichem und sterilfiltriertem Oberflächenwasser der Gessenwiese.

Parameter	Konzentration (mmol / l)	
	Oberflächenwasser der Gessenwiese (natürlich)	Oberflächenwasser der Gessenwiese (sterilfiltriert)
Na	0,42	0,43
K	0,09	0,08
Mg	26,91	26,42
Ca	7,93	8,06
Al	1,55	1,53
Si	0,72	0,72
Ni	0,20	0,19
Cu	0,01	0,01
Fe	0,01	0,01
Zn	0,04	0,04
Mn	1,36	1,35
Co	0,04	0,04
As	$< 1,30 \times 10^{-5}$	$< 1,30 \times 10^{-5}$
Cd	$4,00 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-4}$
Pb	$1,30 \times 10^{-5}$	$1,10 \times 10^{-5}$
U	$1,50 \times 10^{-3}$	$1,60 \times 10^{-3}$
Cl	2,41	2,41
NO ₃ ⁻	0,06	0,07
PO ₄ ²⁻	$< 5,00 \times 10^{-3}$	$< 5,00 \times 10^{-3}$
SO ₄ ²⁻	44,97	45,39
CO ₃ ²⁻ / HCO ₃ ⁻	0,33	0,07
pH	4,40	4,20

5.3 Kultivierung von *Chlorella vulgaris*

Die Kultivierung von *C. vulgaris* erfolgte als Batch-Kultur in einem Glasbioreaktor (Abb. 5.2) in 1800 ml Glucose-Glycin-Medium (siehe Kap. 5.2.2). Für das Medium wurden 1440 ml Glycinlösung (5 g/L) pH 7.0 autoklaviert. Danach wurden steril 180 ml Mineralienstammlösung, 180 ml Phosphatpuffer und 3,6 ml Spurenelementestammlösung hinzugefügt. Für die Beimpfung des Bioreaktors wurden zunächst Vorkulturen angelegt. Dazu wurden Algenzellen aus einem Schrägagarröhrchen mit einer sterilen Impföse entnommen, in

30 ml Medium resuspendiert und unter leichtem Schütteln kultiviert. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurde der Bioreaktor mit 10 ml der Vorkultur angeimpft.



Abb. 5.2: Kultivierung von *C. vulgaris* in Glasbioreaktoren in einer Lichtbank.

Die Kultivierung im Bioreaktor erfolgte unter Rührung (Magnetrührer), mit Luftzufuhr durch eine Pumpe und bei einer Belichtungszeit (Tageslichtlampen) von 12 h. Das Wachstum der Algenkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 500 nm und 690 nm verfolgt. Die Ernte der Algenzellen wurde am Ende der exponentiellen Wachstumsphase eingeleitet. Die Reinheit der *Chlorella*-Kultur wurde vor dem Einsatz der Zellen für weitere Experimente mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus BX 61, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) überprüft.

5.3.1 Ernte der Zellkultur

Für die Ernte der Algenbiomasse wurde die Zellkultur auf sterile Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 10000 g für 20 min bei 8 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall Evolution RC, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Das Medium wurde vom Zellsediment abgetrennt und verworfen. Die Algenzellen wurden zweimal in ca. 80 ml Mineralmedium oder VE-Wasser gewaschen und durch erneute Zentrifugation von der Lösung abgetrennt.

5.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte

Die Zellzahl von *C. vulgaris* Zellkulturen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Auszählung von mindestens acht Großquadraten und Mittelung der erhaltenen Zahlenwerte ließ sich die Zellzahl nach Gleichung 2.14 berechnen.

$$\text{Zellzahl} \times \text{ml}^{-1} = y \times 10 \times 10^3 \quad (2.14)$$

y: Mittlere Zellzahl pro Großquadrat

Die mittlere Zellzahl pro Großquadrat wird mit dem Faktor 10 multipliziert, welcher der Kehrwert des Produktes aus Quadratfläche (1 mm²) und Kammerhöhe (0,1 mm) ist. Dadurch ergibt sich zunächst die Anzahl an Zellen pro Mikroliter und durch Multiplikation mit dem Umrechnungsfaktor 10³ die Zellzahl pro Milliliter.

Um einen Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der Messung der optischen Dichte verschieden konzentrierter Suspensionen herstellen zu können, wurde die Zellzahl von verschieden konzentrierten Zellsuspensionen nach obiger Gleichung ermittelt und gegen die optische Dichte der entsprechenden Suspension bei 500 nm aufgetragen. Als Referenz wurde zellfreies Algenmedium verwendet. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem Photometer des Typs Ultraspec®1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zellzahl wird durch die Gleichung 2.15 beschrieben.

$$\text{Zellzahl} \times \text{ml}^{-1} = 2 \times 10^7 \times \text{OD}_{500 \text{ nm}} + 91182 \quad (2.15)$$

5.3.3 Bestimmung von Trockengewichten

Die Bestimmung von Trockengewichten der Algenbiomasse oder von Zellbestandteilen erfolgte nach Einwaage definierter Mengen des jeweiligen Feuchtgewichts in Reaktionsgefäße und deren Trocknung im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau). Dazu wurden die Proben bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet und nach dem Abkühlen im Exikator bis auf RT mit Hilfe einer Analysenwaage (Sartorius MC1 Research RC 210 D, Sartorius AG, Göttingen) das Probengewicht bestimmt. Die Leergewichte der Reaktionsgefäße und die Trockengewichtsanteile der jeweils verwendeten Puffer oder von Wasser wurden zuvor in gleicher Weise bestimmt. Um einen Mittelwert bilden zu können, erfolgte die Gewichtsbestimmung jeweils als Dreifachmessung. Die Gewichts Differenz zwischen den Reaktionsgefäßen im leeren und befüllten Zustand jeweils nach dem Trocknen entspricht dem Trockengewicht der Biomasse.

5.4 Biosorptionsversuche

Die Sorptions- und Desorptionsversuche mit lebenden und toten Algenzellen wurden zunächst in Mineralmedium (Kap. 5.2.3) durchgeführt. Dieses Medium gewährleistet eine Versorgung mit allen Nährstoffen, die für das Überleben und Wachstum der Algen notwendig sind. Als Vergleich zu diesem Modellsystem wurden einzelne Sorptionsversuche mit Leitungswasser

(Kap. 5.2.4) und Oberflächenwasser der Gessenwiese (Kap. 5.2.5) als Vertreter von natürlichen Wässern durchgeführt.

Die Algen wurden für alle Sorptions-/Desorptionsexperimente zunächst in Glucose-Glycin-Medium (Kap. 5.2.2) angezogen und direkt nach dem Abernten mit Mineralmedium, Leitungswasser oder Oberflächenwasser gewaschen und resuspendiert.

5.4.1 Sorptionsexperimente in Mineralmedium

Der pH-Wert des Mineralmediums wurde je nach Experiment zuvor auf pH 4,4, pH 5,3, pH 6,0 und pH 7,0 eingestellt. Da die Algen im Mineralmedium keine organischen Komponenten für ihren Stoffwechsel zur Verfügung hatten, war es für die Zellen unumgänglich mit Hilfe der Photosynthese alle für den Metabolismus notwendigen Stoffe zu synthetisieren. Deshalb erfolgten die Sorptionsexperimente mit Uran in Bioreaktoren mit Luftzufuhr in einer Lichtbank. Für die Sorptionsexperimente mit toten Zellen wurden die frisch geernteten Algen durch Autoklavieren vor Beginn des Experiments abgetötet. Die Urankonzentrationen im Medium wurden je nach den sich anschließenden Untersuchungen variiert. Die niedrige Urankonzentration von 5 μM wurde ausgewählt, um die Experimente im umweltrelevanten Konzentrationsbereich und insbesondere auch bei verschiedenen naturrelevanten pH-Werten (pH 4,4 bis 7,0) durchzuführen. Mit der höheren Urankonzentration von 0,1 mM wurde die Sorptionskapazität der Algenzellen ausgetestet. Des Weiteren waren hohe Konzentrationen von Uran (0,1 - 1 mM) nötig, um die Qualität der Ergebnisse aus den sich anschließenden spektroskopischen Untersuchungen (Kap. 5.7) zu verbessern. Die Experimente mit hohen Urankonzentrationen wurden nur bei pH 4,4 durchgeführt, um Ausfällungen des Urans zu vermeiden. Die Biomassekonzentration während der Experimente betrug 0,76 g Algen TG/l. Die Biomasse wurde unmittelbar nach Zugabe des Urans, nach 48 h und nach 96 h durch Zentrifugation vom Medium separiert und anschließend mit 0,9 % Natriumperchloratlösung gewaschen. Die Urankonzentration wurde in den Ausgangslösungen und in den Überständen zum Zeitpunkt der Probennahme mittels ICP-MS Analyse (ELAN 9000, Perkin Elmer) bestimmt, um die Menge an gelöstem und an die Algen gebundenem Uran zu quantifizieren. Die Menge an gebundenem Uran wurde auf das Trockengewicht der Algenbiomasse bezogen. Es wurden Verdünnungsreihen der Algenkultur erstellt und auf Agarplatten mit festem Vollmedium (Kap. 5.2.1) ausgestrichen, um die Anzahl an koloniebildenden Einheiten als Maß für die metabolische Aktivität am Tag der Probennahmen zu bestimmen.

5.4.2 Desorptionsexperimente in Mineralmedium

Bei den Desorptionsexperimenten wurde die Fähigkeit der stoffwechselrelevanten Substanzen Citrat, Oxalat, ATP und Glutathion getestet, das an die Algen gebundene Uran zu mobilisieren. Dafür wurde frisch autoklavierte Algenbiomasse (0.76 g Algen TG/L) in Mineralmedium mit 5 μ M Uran bei pH 4,4 und 7,4 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde eine der benannten organischen Substanzen in zwanzigfachem Überschuss im Vergleich zu Uran zum Medium hinzugefügt. Bei der Probennahme wurde die Biomasse durch Zentrifugation (10000 g, 5 min) vom Medium abgetrennt. Die Urankonzentration im Überstand wurde vor und 24 h nach der Zugabe des jeweiligen Desorptionsmittels durch ICP-MS Analyse bestimmt. Es wurden Kontrollen mitgeführt, denen kein Desorptionsmittel zugesetzt wurde.

5.4.3 Sorptionsexperimente in natürlichen Wässern

Die Sorptionsexperimente in Leitungswasser und Oberflächenwasser der Gessenwiese erfolgten in Bioreaktoren unter Luftzufuhr in einer Lichtbank. Die Probennahme, die Bestimmung der Urankonzentration und die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgten analog zu der Vorgehensweise wie bereits für das Mineralmedium beschrieben (siehe Kap. 5.4.1).

Dem Leitungswasser wurde Uran mit einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt. Für die Sorption von Uran aus Leitungswasser wurde nur lebende Biomasse (0.76 g Algen TG/L) eingesetzt.

Das Oberflächenwasser wurde sowohl mit der natürlich vorkommenden Urankonzentration von 1,6 μ M als auch modifiziert mit einer künstlich durch Zusatz von Uran erzeugten Konzentration von 5 μ M für die Experimente verwendet. Die Biomassekonzentration betrug in den Versuchen mit lebenden und toten Algenzellen jeweils 0,5 g Algen TG/L.

5.5 Mechanischer Zellaufschluss

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden die Algenzellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und auf Eis gestellt. Im Fall von Uran kontaminierten Proben wurden von dem feuchten Zellpellet 400 – 500 mg in eine Probenkammer gegeben und zwei Stahlkugeln mit einem Durchmesser von 12 mm hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Schwingmühle (MM 2000, Retsch GmbH & Co. KG, Haan) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff für 10 min bei maximaler Schwingungszahl. Der Großteil des Zellhomogenats wurde mit einem Spatel von der Probenkammer in ein Reaktionsgefäß überführt. Lediglich kleine

Volumina an destilliertem Wasser wurden eingesetzt, um aus der Kammer möglichst alle Probenrückstände zu entfernen und mit dem restlichen Zellhomogenat zu vereinigen.

Für die Zellwandisolierung wurden nicht mit Uran kontaminierte Algenzellen eingesetzt. Diese wurden nach Resuspension in VE-Wasser in einem Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer M-110L von Microfluidics Corporation, Newton, USA) aufgeschlossen. Die Zellsuspension beziehungsweise das Zellhomogenat wurden dabei ständig mit Eis gekühlt. Für den vollständigen Zellaufschluss waren bis zu 10 Durchgänge mit einem angelegten Vordruck von 5,5 bar und dem daraus resultierenden Prozessdruck von 1285 bar notwendig.

5.6 Fraktionierung des Zellhomogenats

Das Homogenat der Algenzellen wurde durch Zentrifugation bei 26000 g für 10 min bei 4 °C in eine feste und eine flüssige Fraktion aufgetrennt. Die flüssige Fraktion sollte danach möglichst alle löslichen Bestandteile der Algenzellen enthalten und das Pellet(1) alle festen Zellbestandteile. Der Urangehalt von ganzen Zellen, von der flüssigen und von der festen Zellfraktion wurde mittels ICP-MS bestimmt und jeweils auf das Trockengewicht von ganzen Zellen normiert. Für diese Normierung wurde zuvor mit nicht kontaminierter Biomasse der Gewichtsanteil der jeweiligen Zellfraktion am Gesamtzelltrockengewicht bestimmt. Die feste Zellfraktion umfasst 70 % und die flüssigen Zellfraktion 30 % des Gesamtzelltrockengewichts.

Die Zellwandisolierung erfolgte in modifizierter Form entsprechend der Anleitung zur Isolierung von *Chlorella*-Zellwänden nach Northcote et al. (1958). Für die Isolierung von Zellwänden, die sich als weißer Niederschlag in der Fraktion mit allen festen Zellbestandteilen abzeichnen, wurde das Pellet(1) in destilliertem Wasser resuspendiert. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 190 g für 20 min bei 4 °C an. Der schillernde Überstand(2) mit einem Großteil der Zellwände wurde vorsichtig abgenommen ohne das Pellet(2) zu beschädigen. Ein Teil der weißen Zellwände war dennoch in Pellet(2) sichtbar. Das Pellet(2) wurde daraufhin langsam in destilliertem Wasser gelöst, wobei die sich zuerst ablösenden Zellwände zusammen mit den sich ablösenden anderen Zellpartikeln in ein separates Gefäß überführt wurden. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 190 g um weitere Zellwände abzutrennen. Die Überstände 2 und 3 wurden anschließend vereinigt und bei 10000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die weißen Zellwände ergaben nun das Pellet(4), welches jedoch noch grüne Verunreinigungen beinhalten konnte. Diese wurden durch selektives resuspendieren von dem Zellwandpellet abgelöst bis ein rein weißes Zellpellet vorlag.

5.7 Spektroskopische Methoden und entsprechende Probenpräparation

5.7.1 TRLFS

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden eingesetzt, um die Uran(VI)spezies in den Modelllösungen, in/an den Algen, sowie in den Ausgangs- und Endlösungen der Sorptionsexperimente zu bestimmen. Für die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie wurde die Algenbiomasse, wie zuvor bereits für die Sorptionsexperimente beschrieben (Kap.5.4.1), in Mineralmedium mit unterschiedlichen Uranylнитratkonzentrationen und pH-Werten inkubiert. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation vom Medium getrennt (10000 g, 5 min) und danach in 0,9 % Natriumperchloratlösung gewaschen, um ungebundenes Uran von der Zelloberfläche zu entfernen. Proben für diese Experimente wurden 30 min, 48 h und 96 h nach der Zugabe von Uran genommen.

Neben der Algenbiomasse und dem eingesetzten Medium vor und nach Algenkontakt wurden auch extra präparierte Modelllösungen, die der besseren Interpretation der erhaltenen Spektren für die Algenbiomasse dienen sollten, laserspektroskopisch untersucht. Zur Herstellung dieser Modelllösungen wurden zunächst Stammlösungen der Einzelkomponenten hergestellt. Für die Modelllösungen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Acetat (10–50 mM), Fructose-6-Phosphat (1–2,5 mM) und Phosphothreonin (0,25–1 mM) in 0,1 M Natriumperchloratlösung bei pH 4,4 ausgewählt. Die Uranylperchloratkonzentration in den Modelllösungen betrug 0,05 mM. Außerdem wurden Mischungen aus Acetat und Fructose-6-Phosphat (Verhältnis 25:1) bzw. Acetat und Phosphothreonin (Verhältnis 200:1) auf gleiche Weise hergestellt. Die Verhältnisse zwischen Acetat und der jeweiligen phosphathaltigen Komponente in den gemischten Modelllösungen wurden so gewählt, dass die Charakteristika der Einzelkomponentenspektren auch in den Summenspektren deutlich erkennbar sind.

Alle Proben wurden mit einem Nd-YAG Laser (Minilite, Continuum) bei einer Wellenlänge von 266 nm und einer durchschnittlichen Laserenergie von 250 µJ angeregt. Das emittierte Lumineszenzlicht von Lösungen und Algenbiomasse wurde mit einem Spektrograph (iHR 550, HORIBA Jobin Yvon) und einer ICCD Kamera (HORIBA Jobin Yvon) detektiert. Die TRLF-Spektren wurden von 371,4 nm bis 664,3 nm durch Akkumulation von 50 bis 200 Laserpulsen bei einer Gate-Zeit von 2 µs aufgenommen. Das gesamte System wurde mittels der Software Labspec 5 (HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) computergesteuert. Die erhaltenen Lumineszenzdaten wurden mit dem Programm Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) einschließlich des PeakFit Moduls 4.0 weiterverarbeitet.

5.7.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)

Für die EXAFS Messung wurde in einem Versuch die Urankonzentration von 5 μM im pH-Wertbereich von 4,4 bis 7,0 im Mineralmedium eingesetzt, um umweltrelevante Bedingungen zu untersuchen. In einem zweiten Versuch wurde die Urankonzentration im Medium zwischen 0,1 mM und 1 mM bei pH 4,4 variiert. Dies geschah zum einen, um den Einfluss der Urankonzentration auf die Komplexbildung mit den Algen zu untersuchen und zum anderen, um die Qualität der erhaltenen Spektren zu verbessern. Die mit Uran kontaminierten Algenzellen wurden jeweils durch Zentrifugation (10000 g, 5 min) vom Medium separiert. Die feuchte Biomasse wurde dann in einen Probenhalter für EXAFS Messungen aus Polyethylen transferiert. Die Probe wurde mit Kapton-Band (Polyimid, 3M, St. Paul, Minnesota, USA) versiegelt und danach der Probenhalter zugeschweißt. Die Algenprobe wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur Messung gelagert. Die EXAFS Messung erfolgte an der Rossendorf-Beamline an der ESRF in Grenoble (Frankreich) (siehe Kap. 2.5.2). Zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Uran(VI) und der Algenbiomasse erfolgte die Messung an der Uran-L_{III}-Kante. In Abhängigkeit von der Urankonzentration wurden die Spektren der Algenproben bei 15 K im Fluoreszenz- oder Transmissionsmodus aufgenommen. Je nach Messmodus wurden acht (Fluoreszenzmodus) oder drei (Transmissionsmodus) Spektren von jeder Probe gemessen und dann gemittelt. Die Energiekalibrierung der Probenspektren wurde für die L_{III}-Kante des Urans mit Hilfe eines parallel gemessenen Spektrums einer Yttriumfolie an der K-Kante bei 17038 eV vorgenommen. Die Ionisationsenergie der Uran-L_{III}-Kante wurde auf E_0 gleich 17185 eV festgelegt. Die experimentell ermittelten EXAFS-Daten wurden entsprechend dem Standardverfahren mit dem Programm EXAFSPAK (George & Pickering, 1995) ausgewertet. Im Fall der Fluoreszenzmessungen wurde eine Totzeitkorrektur des Fluoreszenzsignals durchgeführt. Die theoretischen Rückstreuphasen- und Amplitudenfunktionen wurden aus den Röntgenabsorptionsdaten der Modellverbindungen Autunit (Locock & Burns, 2003), Uranyl-Acetat (Ramos Silva et al., 1999) und Uranyl-AMP (Szabo et al., 2005) mit dem Programm FEFF8.2 (Ankudinov et al., 1998) berechnet. Während des Fits wurde die Koordinationszahl (N) des Einzelstreupfades U-O_{ax} konstant bei zwei gehalten. Der vierbeinige Mehrfachstreupfad der Uranylgruppe, U-O_{ax}-U-O_{ax} wurde in alle Fits einbezogen und dessen Koordinationszahl wurde einfach, sowie der atomare Abstand (R) und der Debye-Waller Faktor (σ^2) zweifach an die Werte für N, R und σ^2 des Einzelstreupfades U-O_{ax} gebunden (Hudson et al., 1996). Der Skalierungsfaktor S_0^2 wurde für alle Fits konstant auf 0.9 eingestellt. Die Verschiebung der Schwellenenergie ΔE_0 , wurde während der Fits als globaler Parameter variabel belassen.

5.7.3 ATR-FT-IR Spektroskopie

Für die IR Messungen wurde 0,1 M NaCl-Lösung als Hintergrundelektrolyt genutzt. Lebende und tote Algenzellen wurden in Mineralmedium bei pH 4,4 mit und ohne Zusatz von Uran (0,5 mM) kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen vom Medium separiert (10000 g, 10 min) und mit 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen. Die feuchte Algenbiomasse wurde daraufhin auf dem ATR-Kristall ausgestrichen. Ein Spektrum der 0,1 M NaCl-Lösung diente als Hintergrundspektrum, welches automatisch von jedem Probenspektrum subtrahiert wurde. Für einige Messungen wurden die Algenzellen mit Hilfe einer Hochfrequenzschwingmühle (Perkin Elmer, USA) aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in einem kleinen Volumen 0,1 M NaCl-Lösung (50–150 μ l) resuspendiert und danach auf den ATR-Kristall überführt. Alle Spektren wurden mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} in einem Frequenzbereich von 3000 cm^{-1} bis 600 cm^{-1} mit einem Vertex 80v Vakuum FT-IR Spektrometer (Bruker Optics, Deutschland) aufgenommen. Für jede Probe wurden 256 Scans gemittelt. Zur Aufnahme der Spektren und zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Software Opus 6.0 (Bruker Optics, Deutschland) genutzt.

5.8 Potentiometrische Titration

Die potentiometrische Titration wurde in einem geschlossenen System mit dem automatischen Titrator 736 GP Titrino (Metrohm, Herisau, Schweiz) unter Inertgasatmosphäre (N_2) durchgeführt. Feuchte Algenbiomasse mit einem Trockengewicht von 200 mg wurde in 30 ml 0,1 M NaCl suspendiert, mit 1,1 ml 0,1 M HCl auf etwa pH 4 eingestellt und in das Titrationsgefäß überführt. Vor Beginn der Titration wurde das System durch kontinuierlichen N_2 -Durchfluss von CO_2 befreit. Die Titration fand unter Rührung bei 12 ± 1 °C und einer Ionenstärke von 0,1 M statt. Nachdem sich im System ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde die Titration mit 0,01 M NaOH von pH 4 bis pH 10,5 durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit der pH-Elektrode BlueLine11 (Schott) gemessen. Der Titrationsverlauf konnte mit der zum Titrator gehörigen Software TiNet 2.50 (Metrohm) direkt am Computer verfolgt werden. Die gemessenen Daten wurden mittels der Software HYPERQUAD 2006 (Gans et al., 1996) zur Ermittlung der pK_S -Werte und der Häufigkeit von funktionellen Gruppen ausgewertet.

5.9 Mikroskopische Methoden und entsprechende Probenpräparation

5.9.1 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde in erster Linie zur Reinheitskontrolle der Algenkulturen eingesetzt. Außerdem wurde die Morphologie der Zellen oder Zellwände begutachtet. In der Regel wurden das 40er oder 100er (mit Immersionsöl) Objektiv des Lichtmikroskops Olympus BX 61 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) für die Untersuchungen genutzt.

5.9.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die lebenden Algenzellen für die Elektronenmikroskopie wurden in Mineralmedium bei pH 4,4 mit 0,5 mM und 1 mM Uran für 48 h inkubiert. Nach dem Abtrennen des Mediums durch Zentrifugation (10000 g, 10 min) wurden die mit Uran kontaminierten Algenzellen zunächst zweimal mit 0,9 % Natriumchloridlösung (pH 4,4) und einmal mit 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 2,5 % (w/v) Glutardialdehyd in 0,1 M Natriumcacodylate-Puffer (pH 7,2) bei 4°C. Nach erfolgter Fixierung wurden die Zellen dreimal mit dem Cacodylate-Puffer gewaschen und daraufhin für 60 min im Dunkeln mit 1 % OsO₄ kontrastiert. Die Dehydratisierung der Proben erfolgte mit Hilfe einer Entwässerungsreihe mit ansteigender Ethanolkonzentration. Nach der Entwässerung wurden die Zellen in Harz (EMbed 812) eingebettet. Die Polymerisation des Harzes erfolgte bei 60 °C. Von den in die Harzblöckchen eingebetteten Proben wurden mit einem Diamantmesser am Ultracut-R Microtome (Leica, Deutschland) Dünnschnitte von 0,3–0,7 µm angefertigt. Die Dünnschnitte wurden auf Kupfergitternetzchen fixiert, mit Bleicitrat nach der Methode von Reynolds (1963) kontrastiert und mit Kohlenstoff beschichtet. Das Hochleistungs-Transmissions-Elektronenmikroskop CM 200 (Philips, Eindhoven, Niederlande) am “Centro de Instrumentación Científica” der Universität von Granada (Spanien) wurde für die Untersuchung der Proben bei einer Beschleunigerspannung von 200 kV genutzt.

5.10 Thermodynamische Berechnung der Speziation

Die thermodynamische Berechnung der Speziation von Uran in Medien und Lösungen erfolgte mit Hilfe des Speziationsprogramms EQ3/6 (Wolery, 1992) unter Nutzung der NEA-Datenbank (Guillaumont et al., 2003).

5.11 Elementaranalyse

Die Elementzusammensetzung von Medien, Lösungen und Biomasse wurde mittels Massenspektrometrie durch Ionisation der Probe in einem induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS) bestimmt. Für die Bestimmung wurde das ICP-Massenspektrometer Elan 6000 der Firma Perkin Elmer durch Frau U. Schäfer eingesetzt. Der totale organische Kohlenstoffgehalt wurde mit einem TOC-Analysator (multi N/C der Firma Analytik Jena) und die Anionenzusammensetzung wurde mittels Ionenaustauschchromatographie durch Frau C. Eckardt bestimmt.

5.12 Chemikalien

Bis auf nachfolgend genannte Ausnahmen wurden alle Chemikalien für die beschriebenen Experimente von den Firmen Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) in den Reinheitsgraden reinst oder zur Analyse bezogen:

Difco Laboratories, Detroit	Bacto TM Agar, Bacto TM Hefeextrakt
Chemapol, Prag/Lachema, Brünn	UO ₂ (NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Schematische Darstellung des Urankreislaufs in der Natur (nach Moore & DiChristina, 2002).	5
Abb. 2.2:	Möglicher Weg des Urans entlang der Nahrungskette.	6
Abb. 2.3:	Schematischer Aufbau einer <i>Chlorella</i> -Zelle.	9
Abb. 2.4:	Wechselwirkungsmechanismen von Algenzellen mit Schwermetallen.	10
Abb. 2.5:	Jablonski-Termschema für Fluoreszenz und Phosphoreszenz (nach Lakowicz (2006)).	14
Abb. 2.6:	Schematischer Aufbau des Lasersystems für die TRLFS-Messung.	17
Abb. 2.7:	Termschema der Absorptions- und Emissionsübergänge des Uranylions (nach Bell und Biggers (1968)).	18
Abb. 2.8:	Fluoreszenzemissionsspektrum (a) und monoexponentieller Fluoreszenzzerfall (b) von UO_2^{2+} bei pH3 (aus Günther et al. (2007)).	19
Abb. 2.9:	Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers.	20
Abb. 2.10:	Anordnung der Probe auf dem ATR-Kristall und möglicher Strahlengang.	21
Abb. 2.11:	Röntgenabsorptionsspektrum von einem Uran(VI)-Komplex an der Uran-L _{III} -Kante mit Unterteilung in den XANES- und den EXAFS-Bereich und der schematischen Darstellung des jeweils dafür verantwortlichen physikalischen Prozesses; a: Mehrfachstreuung, b: Einfach-streuung, c und d die sich auslöschende und die sich verstärkende Elektronenwelle.	25
Abb. 2.12:	Vereinfachter experimenteller Aufbau zur Messung von EXAFS-Spektren. Die Strahlung verläuft von links nach rechts.	27
Abb. 2.13:	Darstellung der EXAFS-Funktion $\chi(k)$ (gewichtet mit k^3) (a) und der dazugehörigen Fourier-Transformation (b) von $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ bei pH 0.	30
Abb. 3.1:	Wachstumskurve von <i>Chlorella vulgaris</i> . Die Anzucht erfolgte bei Begasung mit Luft und Bestrahlung mit Licht. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 500 und 690 nm verfolgt.	31

Abb. 3.2:	Lichtmikroskopisches Bild von <i>Chlorella vulgaris</i> -Zellen. Hellfeld-Aufnahme, 1000-fache Vergrößerung.....	32
Abb. 3.3:	Verteilung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium bei pH-Werten von 4,4 – 7,0 und einer Urankonzentration von 5 µM.	34
Abb. 3.4:	Lumineszenzspektren von U(VI) im Mineralmedium bei unterschiedlichen Urankonzentrationen und pH-Werten. Vergleichsspektrum freies Uranyl bei pH 4.	36
Abb. 3.5:	Zeitaufgelöstes laserinduziertes Lumineszenzspektrum von U(VI) im Mineralmedium. [U] ₀ : 0,1 mM; pH 4,4; Zeitintervall: 40 – 50040 ns.....	37
Abb. 3.6:	Lumineszenzspektren von Leitungswasser nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten; [U] ₀ = 0,1 mM.	38
Abb. 3.7:	Lumineszenzspektren vom Oberflächenwasser der Gessenwiese nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten.	40
Abb. 3.8:	Titrationkurve von <i>C. vulgaris</i> (6,6 g Biomasse-TG/l). Die Darstellung der Kurve umfasst die Datenpunkte (blaue Quadrate) und den Fit (gestrichelte rote Linie) mit HYPERQUAD.	41
Abb. 3.9:	Sorption von U(VI) an lebende <i>Chlorella</i> -Zellen im Mineralmedium bei [U] ₀ = 5 µM in Abhängigkeit von pH-Wert (links) und bei pH 4,4 mit [U] ₀ = 0,1 mM (rechts). X _L : lebende Zellen.....	42
Abb. 3.10:	Sorption von U(VI) durch tote <i>Chlorella</i> -Zellen im Mineralmedium bei pH 4,4 und [U] ₀ = 5 µM (links) und bei [U] ₀ = 0,1 mM (rechts). X _T : tote Zellen.....	45
Abb. 3.11:	An lebende <i>Chlorella</i> -Zellen gebundenes Uran aus Leitungswasser; [U] ₀ = 0,1 mM.	47
Abb. 3.12:	An lebende und tote <i>Chlorella</i> -Zellen sorbiertes Uran aus natürlichem (links) und modifiziertem (rechts) Oberflächenwasser der Gessenwiese. G _L / G _{mL} = lebende Algen; G _T / G _{mT} = tote Algen; Biomassekonzentration: 0,5 g Algen-TG/l.....	48
Abb. 3.13:	Mobilisierung von an tote Algen gebundenem U(VI) innerhalb von 24 h ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von Citronensäure, Oxalsäure, Glutathion oder ATP in 20-fachem Überschuss im Vergleich zur Ausgangskonzentration an Uran (5 µM).....	52
Abb. 3.14:	Lumineszenzspektren von UO ₂ (Acetat) bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO ₄	55

Abb. 3.15: Lumineszenzspektren von UO_2 (Fructose-6-phosphat) bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .	56
Abb. 3.16: Lumineszenzspektren von UO_2 (o-Phospho-L-threonin) bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4 .	57
Abb. 3.17: Lumineszenzspektren der Komplexmische UO_2 (Acetat/Fructose-6-phosphat) (links) und UO_2 (Acetat/Phosphothreonin) (rechts) bei pH 4,4 in 0,1 M NaClO_4	59
Abb. 3.18: Lumineszenzspektren von Uran(VI)-Algen-Komplexen, welche von ursprünglich lebenden Zellen bei Urankonzentrationen von a) 5,0 μM in Abhängigkeit vom pH-Wert und b) 0,1 mM bei pH 4,4 in Mineralmedium gebildet wurden.	60
Abb. 3.19: EXAFS-Spektren an der U-L _{III} -Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von Uran-Algen-Komplexen, welche in Abhängigkeit vom pH-Wert durch metabolisch aktive Algen gebildet wurden. X_L = lebende Algen, inkubiert mit 5 μM Uran.	63
Abb. 3.20: EXAFS-Spektren an der U-L _{III} -Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von Uran-Algen-Komplexen, welche in Abhängigkeit von der Urankonzentration durch metabolisch aktive Algen gebildet wurden. X_L = lebende Algen, inkubiert mit Uran bei pH 4,4.	65
Abb. 3.21: EXAFS-Spektren an der U-L _{III} -Kante (links) und die entsprechende Fourier-Transformation (rechts) von den Uranmodellkomplexen Meta-Autunit (Hennig et al., 2001) und Fructose-6-phosphat (Koban et al., 2004).	67
Abb. 3.22: IR- und Differenzspektren von Algenzellen mit U(VI) und entsprechende Kontrollproben ohne Uran bei pH 4,4. a) lebende Zellen b) lebende Zellen – aufgeschlossen	70
Abb. 3.23: Lumineszenzspektren von Uran(VI)-Algen-Komplexen, welche mit toten Zellen bei $[\text{U}]_0$ von 5,0 μM und 0,1 mM in Mineralmedium bei pH 4,4 gebildet wurden.	72
Abb. 3.24: IR- und Differenzspektren von aufgeschlossen Algenzellen mit U(VI) und entsprechende Kontrollproben ohne Uran bei pH 4,4. a) tote Zellen b) tote Zellen – aufgeschlossen.	74

- Abb. 3.25: Modelle der Uran-Algen-Komplexe, welche von a) stoffwechselaktiven und b) stoffwechsel-inaktiven *Chlorella*-Zellen gebildet wurden. In diesen Modellen wird U(VI) über zwei axiale Sauerstoffatome O_{ax} , sechs äquatoriale Sauerstoffatome $O_{äq}$ und die entsprechend daran gebundenen funktionellen Gruppen (Carboxylgruppe, organische Phosphatgruppe P_{org} , anorganische Phosphatgruppe P_{anorg}) koordiniert. 76
- Abb. 3.26: TEM Bilder von unbehandelten *Chlorella vulgaris* Zellen. a) Übersichtsaufnahme; b) Detailaufnahme einer Algenzelle; Chl: Chloroplast, E: Speicherstoffe, N: Nukleus, Pyr: Pyrenoid, PM: Plasmamembran, S: Stärkekörner, S-Sch: Stärkescheide, Thy: Thylakoid, ZW: Zellwand. 78
- Abb. 3.27: TEM Bild von *Chlorella vulgaris* Zellen, die zum Zeitpunkt des Urankontakts (1 mM) lebten (a), Vergößerung der aneinander grenzenden Zellwände (b). EDX-Spektrum nadelförmiger Ablagerungen in den Zellwänden (c). 79
- Abb. 3.28: TEM-Bild (a) von *Chlorella vulgaris* Zellen, die Akkumulate im Zellinneren zeigen. (b) TEM-Bild Nahaufnahme eines stark kontrastieren Bereichs (*) im Zellinneren. EDX-Spektren (c-d) der beprobten Regionen A und B im TEM-Bild. 80
- Abb. 3.29: Lumineszenzspektrum von einem U(VI)-Zellwand-Komplex (Zw) verglichen mit Spektren von U(VI) gebunden an ursprünglich lebende (E_L) und tote (E_T) *Chlorella*-Zellen in Mineral-medium bei pH 4,4. 82
- Abb. 5.1: Übersichtskarte (Wismut GmbH, 2006) des ehemaligen Uranbergbaugebiets bei Ronneburg (Thüringen). 90
- Abb. 5.2: Kultivierung von *C. vulgaris* in Glasbioreaktoren in einer Lichtbank. 92

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Algengliederung mit Übersicht der wichtigsten Merkmale der jeweiligen Gruppe (nach Hoek et al. (1993)).	7
Tab. 2.2:	In der Literatur beschriebene Anregungswellenlängen für Uran in der Oxidationsstufe (VI).	17
Tab. 2.3:	Frequenzen und IR-Banden der wichtigsten Molekülgruppen in Spektren von Zellen und deren makromolekulare Zuordnung nach (Benning et al., 2004; Heraud et al., 2007; Kansiz et al., 1999).	22
Tab. 2.4:	Antisymmetrische Streckschwingung von Uran(VI)-Komplexen.	23
Tab. 3.1:	Überblick über Inhaltsstoffe und Parameter mit Relevanz für die Uranspeziation im Mineralmedium, in Leitungswasser und in Oberflächenwasser.	33
Tab. 3.2:	Verteilung der gebildeten Uranspezies im Mineralmedium bei pH 4,4 und unterschiedlichen Urankonzentrationen.	34
Tab. 3.3:	Lumineszenzemissionsbanden von U(VI) im Mineralmedium (MM) in Abhängigkeit von pH-Wert und Urankonzentration.	36
Tab. 3.4:	Lumineszenzemissionsbanden von verschiedenen anorganischen Uranyl-Modellkomplexen.	37
Tab. 3.5:	Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern von Uranspezies im Mineralmedium bei pH 4,4 und $[U]_0 = 0,1$ mM.	38
Tab. 3.6:	Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern der Uranspezies im Leitungswasser.	39
Tab. 3.7:	Lumineszenzemissionsbanden und –lebensdauern von Uranspezies im Oberflächenwasser der Gessenwiese.	40
Tab. 3.8:	Säurekonstanten (pK_S) und Konzentrationen von funktionellen Gruppen auf der Zelloberfläche von <i>Chlorella</i> .	41
Tab. 3.9:	Übersicht der U(VI)-Komplexe mit deren Komplexbindungskonstante, die in Mineralmedium mit Citronensäure, Oxalsäure, ATP und Glutathion bevorzugt gebildet werden.	53
Tab. 3.10:	Lumineszenzemissionsbanden von $UO_2(\text{Acetat})$ bei pH 4,4 in Abhängigkeit der Acetatkonzentration.	55

Tab. 3.11: Lumineszenzemissionsbanden von UO_2 (Fructose-6-phosphat) in Abhängigkeit der F6P-Konzentration.	56
Tab. 3.12: Lumineszenzemissionsbanden von UO_2 (o-Phospho-L-threonin) in Abhängigkeit der pThr-Konzentration.	58
Tab. 3.13: Lumineszenzemissionsbanden der Uranylkomplexe mit Acetat und Fructose-6-Phosphat bzw. Phosphothreonin.	59
Tab. 3.14: Lumineszenzemissionsbanden der Uran(VI)-Spezies auf/in <i>C. vulgaris</i> -Zellen im Mineralmedium bei unterschiedlichen Bedingungen (pH-Wert, $[\text{U}]_0$, Kontaktzeit). X_L = ursprünglich lebende Zellen	61
Tab. 3.15: Lumineszenzemissionsbanden von verschiedenen Uranyl-Modellkomplexen und U(VI) in Biosystemen.	62
Tab. 3.16: Strukturparameter der Urankomplexe mit <i>Chlorella vulgaris</i> Zellen bei unterschiedlichen pH-Werten; X_L = lebende Algen.	64
Tab. 3.17: Strukturparameter der Urankomplexe mit <i>Chlorella vulgaris</i> Zellen bei varrierenden Urankonzentrationen. X_L = lebende Algen	66
Tab. 3.18: Strukturparameter von Uranmodellkomplexen.	67
Tab. 3.19: Lumineszenzemissionsbanden der Uran(VI)-Spezies auf/in <i>C. vulgaris</i> -Zellen im Mineral-medium bei unterschiedlichen Urankonzentrationen und Kontaktzeiten. X_T = tote Zellen; pH 4,4.	73
Tab. 3.20: Verteilung von gebundenem Uran in unterschiedlichen Zellfraktionen von <i>C. vulgaris</i>	81
Tab. 3.21: Lumineszenzemissionsbanden von U(VI)-Zellwand- und U(VI)-Algen-Komplexen.	83
Tab. 5.1: Zusammensetzung Leitungswasser Rossendorf.	89
Tab. 5.2: Zusammensetzung von natürlichem und sterilfiltriertem Oberflächenwasser der Gessenwiese.	91

7 Literaturverzeichnis

- Agostini, G., Giacometti, G., Clemente, D. A. & Vicentini, M. (1982). Crystal and molecular structure of uranyl-nitrate trimethylphosphate. *Inorg. Chim. A-Articles* **62**, 237-240.
- Al-Rub, F. A. A., El-Naas, M. H., Ashour, I. & Al-Marzouqi, M. (2006). Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochem.* **41**, 457-464.
- Allen, P. G., Shuh, D. K., Bucher, J. J., Edelstein, N. M., Reich, T., Denecke, M. A. & Nitsche, H. (1996). EXAFS determinations of uranium structures: The uranyl ion complexed with tartaric, citric, and malic acids. *Inorg. Chem.* **35**, 784-787.
- Ankudinov, A. L., Ravel, B., Rehr, J. J. & Conradson, S. D. (1998). Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure. *Phys. Rev. B* **58**, 7565-7576.
- Beitz, J. V. (1994). F-state luminescence of trivalent lanthanide and actinide ions in solution. *J. Alloy. Compd.* **207**, 41-50.
- Beitz, J. V. & Hessler, J. P. (1980). Oxidation-state specific detection of transuranic ions in solution. *Nucl. Technol.* **51**, 169-177.
- Bell, J. T. & Biggers, R. E. (1968). Absorption spectrum of uranyl ion in perchlorate media. 3. Resolution of ultraviolet band structure - some conclusions concerning excited state of UO_2^{2+} . *J. Mol. Spectrosc.* **25**, 312-329.
- Benning, L. G., Phoenix, V. R., Yee, N. & Tobin, M. J. (2004). Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 729-741.
- Bernhard, G. & Geipel, G. (2010). Determination of uranium speciation in aqueous samples by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). In *Advances in trace analysis* (Hrsg. S. Lahiri), S. 127-147, Narosa Publishing House, Neu Delhi.
- Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V. & Nitsche, H. (1998). Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *J. Alloy. Compd.* **271-273**, 201-205.
- Bernhard, G., Geipel, G., Reich, T., Brendler, V., Amayri, S. & Nitsche, H. (2001). Uranyl(VI) carbonate complex formation: Validation of the $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq.})$ species. *Radiochim. Acta.* **89**, 511-518.

- Billard, I. (2003). Aqueous solutions of uranium(VI) as studied by time-resolved emission spectroscopy: A round-robin test. *Appl. Spectrosc.* **57**, 1027-1038.
- Binder, H. & Zschornig, O. (2002). The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **115**, 39-61.
- 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. *Radiochim. Acta.* **74**, 75-80.
- Brewer, P. G. & Goldman, J. C. (1976). Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnol. Oceanogr.* **21**, 108-117.
- Brina, R. & Miller, A. G. (1992). Direct detection of trace levels of uranium by laser-induced kinetic phosphorimetry. *Anal. Chem.* **64**, 1413-1418.
- Burns, P. C., Miller, M. L. & Ewing, R. C. (1996). U6+ minerals and inorganic phases: A comparison and hierarchy of crystal structures. *Can. Mineral.* **34**, 845-880.
- Chang, H. S., Korshin, G. V., Wang, Z. M. & Zachara, J. M. (2006). Adsorption of uranyl on gibbsite: A time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy study. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 1244-1249.
- Chisholm-Brause, C. J., Berg, J. M., Matzner, R. A. & Morris, D. E. (2001). Uranium(VI) sorption complexes on montmorillonite as a function of solution chemistry. *J. Colloid Interface Sci.* **233**, 38-49.
- Cho, D. Y., Lee, S. T., Park, S. W. & Chung, A. S. (1994). Studies on the biosorption of heavy-metals onto *Chlorella vulgaris*. *J. Environ. Sci. Health Part A-Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control* **29**, 389-409.
- Cox, J. S., Smith, D. S., Warren, L. A. & Ferris, F. G. (1999). Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4514-4521.
- Craft, E. S., Abu-Quare, A. W., Flaherty, M. M., Garofolo, M. C., Rincavage, H. L. & Abou-Donia, M. B. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health* **7**, 297-317.
- Crist, R. H., Oberholser, K., Schwartz, D., Marzoff, J., Ryder, D. & Crist, D. R. (1988). Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* **22**, 755-760.

- Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, N. & Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 1212-1217.
- De Stefano, C., Gianguzza, A., Pettignano, A. & Sammartano, S. (2005). Interaction of UO_2^{2+} with ATP in aqueous ionic media. *Biophys. Chem.* **117**, 147-153.
- Denecke, M. A., Reich, T., Bubner, M., Pompe, S., Heise, K. H., Nitsche, H., Allen, P. G., Bucher, J. J., Edelstein, N. M. & Shuh, D. K. (1998). Determination of structural parameters of uranyl ions complexed with organic acids using EXAFS. *J. Alloy. Compd.* **271-273**, 123-127.
- Elzinga, E. J., Tait, C. D., Reeder, R. J., Rector, K. D., Donohoe, R. J. & Morris, D. E. (2004). Spectroscopic investigation of U(VI) sorption at the calcite-water interface. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 2437-2448.
- Enghang, P. (2004). Encyclopedia of the elements. Wiley-VCH, Weinheim.
- Esser, K. (2000). Kryptogamen. Springer, Berlin, Germany.
- Evans, H. T. (1963). Uranyl ion coordination. *Science* **141**, 154-158.
- Fortin, C., Denison, F. H. & Garnier-Laplace, J. (2007). Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* **26**, 242-248.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, R. P. & Petocz, P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 2412-2422.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J. & Lim, R. P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquat. Toxicol.* **48**, 275-289.
- Gadd, G. M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. In *Biotechnology* (Hrsg. H. J. Rehm), S. 401-433, VCH, Weinheim.
- Gadd, G. M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 13-28.

- Gans, P., Sabatini, A. & Vacca, A. (1996). Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **43**, 1739-1753.
- Geipel, G., Bernhard, G., Brendler, V. & Nitsche, H. (1998). Uranyl hydroxo carbonate complexes studied by laser-induced spectroscopy. In *Annual Report 1997: Institute of Radiochemistry* (Hrsg. H. Nitsche, H.-J. Engelmann und G. Bernhard), S. 23-25. FZR, Rossendorf.
- Geipel, G., Bernhard, G., Rutsch, M., Brendler, V. & Nitsche, H. (2000). Spectroscopic properties of uranium(VI) minerals studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochim. Acta.* **88**, 757-762.
- Geipel, G., Brachmann, A., Brendler, V., Bernhard, G. & Nitsche, H. (1996). Uranium(VI) sulfate complexation studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Radiochim. Acta.* **75**, 199-204.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1988). Algae sequester heavy-metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* **150**, 197-202.
- George, G. N. & Pickering, I. J. (1995). EXAFSPAK - A suite of computer programs for analysis of X-ray absorption., Synchrotron Radiation Laboratory, Stanford, CA. USA
- Goldman, J. C. & Toerien, D. F. (1972). Effect of carbon on algal growth - its relationship to eutrophication. *Water Res.* **6**, 637-679.
- Gosh, R., Mondal, J. A., Gosh, H. N. & Palit, D. K. (2010). Ultrafast dynamics of the excited states of the uranyl ion in solutions. *J. Phys. Chem. A* **114**, 5263-5270.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E. L. & Zenk, H. H. (1986). Homo-phytochelatins are heavy metal binding peptides of homo-glutathione containing fabales. *FEBS Lett.* **205**, 47-50.
- Grill, E., Winnacker, E. L. & Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 439-443.
- Guillaumont, R., Fanghänel, T., Fuger, J., Grenthe, I., Neck, V., Palmer, N. A. & Rand, M. H. (2003). Update on the chemical thermodynamics of uranium, neptunium, plutonium,

- americum and technetium. *Chemical Thermodynamics 5* (Hrsg. OECD Nuclear Energy Agency). Elsevier, Amsterdam.
- Günther, A., Bernhard, G., Geipel, G., Reich, T., Roßberg, A. & Nitsche, H. (2003). Uranium speciation in plants. *Radiochim. Acta.* **91**, 319-328.
- Günther, A., Geipel, G. & Bernhard, G. (2006). Complex formation of U(VI) with the amino acid L-threonine and the corresponding phosphate ester O-phospho-L-threonine. *Radiochim. Acta.* **94**, 845-851.
- Günther, A., Geipel, G. & Bernhard, G. (2007). Complex formation of uranium(VI) with the amino acids L-glycine and L-cysteine: A fluorescence emission and UV-Vis absorption study. *Polyhedron* **26**, 59-63.
- Günther, A., Raff, J., Geipel, G. & Bernhard, G. (2008). Spectroscopic investigations of U(VI) species sorbed by the green algae *Chlorella vulgaris*. *Biometals* **21**, 333-341.
- Günzler, H. & Gremlich, H.-U. (2002). IR Spectroscopy. Wiley-VCH, Weinheim.
- Han, X., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2006). Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *J. Colloid Interface Sci.* **303**, 365-371.
- Harris, P. O. & Ramelow, G. J. (1990). Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environ. Sci. Technol.* **24**, 220-228.
- Hennig, C., Panak, P. J., Reich, T., Rossberg, A., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Matz, W., Bucher, J. J., Bernhard, G. & Nitsche, H. (2001). EXAFS investigation of uranium(VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces. *Radiochim. Acta.* **89**, 625-631.
- Heraud, P., Wood, B., Beardall, J. & Mcnaughton. (2007). Probing the influence of the environment on microalgae using infrared and raman spectroscopy. In *New Approaches in Biomedical Spectroscopy*, S. 85-106, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Hoek, C. V. D., Jahns, H. M. & Mann, D. G. (1993). Algen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hofslagare, O., Samuelsson, G. & Sjöberg, S. (1985). Cadmium effects on Photosynthesis and nitrate assimilation in *Scenedesmus obliquus* - a potentiometric study in an open CO₂-system. *Environ. Exp. Bot.* **25**, 75-82.

- Hofslagare, O., Samuelsson, G., Sjöberg, S. & Ingri, N. (1983). A precise potentiometric method for determination of algal activity in an open CO₂ system. *Plant Cell Environ.* **6**, 195-201.
- Holleman, A. F. & Wiberg, E. (2007). Lehrbuch der anorganischen Chemie, 102. Auflage. de Gruyter, Berlin.
- Horikoshi, T., Nakajima, A. & Sakaguchi, T. (1979a). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. 4. Uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agr. Biol. Chem.* **43**, 617-623.
- Horikoshi, T., Nakajima, A. & Sakaguchi, T. (1979b). Uptake of uranium by various cell fractions of *Chlorella regularis*. *Radioisotopes* **28**, 485-488.
- Horikoshi, T., Nakajima, A. & Sakaguchi, T. (1981). Accumulation of uranium by *Chlorella* cells grown under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture conditions. *Agr. Biol. Chem.* **45**, 781-783.
- Huang, Z., Li, L., Huang, G., Yan, Q., Shi, B. & Xu, X. (2009). Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquat. Toxicol.* **91**, 54-61.
- Hudson, E. A., Allen, P. G., Terminello, L. J., Denecke, M. A. & Reich, T. (1996). Polarized X-ray-absorption spectroscopy of uranyl ion: Comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. B* **54**, 156-165.
- Hummel, W., Anderegg, G., Puigdoménech, I., Rao, L. & Tochiyama, O. (2005). Chemical Thermodynamics Series Volume 9: Chemical thermodynamics of compounds and complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr with selected organic ligands. OECD-NEA, Elsevier, Amsterdam.
- Jiang, J., Rao, L. F., Di Bernardo, P., Zanonato, P. & Bismondo, A. (2002). Complexation of uranium(VI) with acetate at variable temperatures. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, 1832-1838.
- Kakihana, M., Nagumo, T., Okamoto, M. & Kakihana, H. (1987). Coordination structures of uranyl carboxylate complexes in aqueous solutions studied by IR and C-13 NMR-spectra. *J. Phys. Chem.* **91**, 6128-6136.
- Kalin, M., Wheeler, W. N. & Meinrath, G. (2005). The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *J. Environ. Radioact.* **78**, 151-177.

- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J. & Mcnaughton, D. (1999). Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* **52**, 407-417.
- Kato, Y., Meinrath, G., Kimura, T. & Yoshida, Z. (1994). A study of U(VI) hydrolysis and carbonate complexation by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochim. Acta.* **64**, 107-111.
- Knopp, R., Panak, P. I., Wray, L. A., Renninger, N. S., Keasling, J. D. & Nitsche, H. (2003). Laser spectroscopic studies of interactions of U-VI with bacterial phosphate species. *Chem.-Eur. J.* **9**, 2812-2818.
- Koban, A. & Bernhard, G. (2007). Uranium(VI) complexes with phospholipid model compounds - A laser spectroscopic study. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 750-757.
- Koban, A., Geipel, G., Rossberg, A. & Bernhard, G. (2004). Uranium(VI) complexes with sugar phosphates in aqueous solution. *Radiochim. Acta.* **92**, 903-908.
- Kowal-Fouchard, A., Drot, R., Simoni, E. & Ehrhardt, J. J. (2004). Use of spectroscopic techniques for uranium (VI)/montmorillonite interaction modeling. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 1399-1407.
- Kuhl, A. & Lorenzen, H. (1964). Handling and culturing of *Chlorella*. In *Methods of cell physiology* (Hrsg. D. M. Prescott), S. 159-187, Academic Press, New York.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy, 3. Auflage. Springer, New York.
- Langmuir, D. (1978). Uranium solution-mineral equilibria at low-temperatures with applications to sedimentary ore-deposits. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 547-569.
- Leciejewicz, J., Alcock, N. W. & Kemp, T. J. (1995). Carboxylato complexes of the uranyl ion: effects of ligands size and coordination geometry upon molecular and crystal structure. In *Structure and Bonding* (Hrsg. M. J. Clark Et Al.), S. 43-84, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Li, B., Raff, J., Barkleit, A., Bernhard, G. & Foerstendorf, H. (2010). Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitin. A vibrational spectroscopic approach. *J. Inorg. Biochem.* **104**, 718-725.
- Liger, E., Charlet, L. & Van Cappellen, P. (1999). Surface catalysis of uranium(VI) reduction by iron(II). *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 2939-2955.

- Locock, A. J. & Burns, P. C. (2003). The crystal structure of synthetic autunite, $\text{Ca}[(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)]_2(\text{H}_2\text{O})_{11}$. *Am. Miner.* **88**, 240-244.
- Mangini, A., Sonntag, C., Bertsch, G. & Müller, E. (1979). Evidence for a higher natural uranium content in world rivers. *Nature* **278**, 337-339.
- Martell, A. E., Smith, R. M. & Motekaitis, R. J. (1998). NIST: Standard reference database 46: critically selected stability constants of metal complexes database, version 5.0. Texas A & M University, USA.
- Matz, W., Schell, N., Bernhard, G., Prokert, F., Reich, T., Claussner, J., Oehme, W., Schlenk, R., Dienel, S., Funke, H., Eichhorn, F., Betzl, M., Prohl, D., Strauch, U., Huttig, G., Krug, H., Neumann, W., Brendler, V., Reichel, P., Denecke, M. A. & Nitsche, H. (1999). ROBL - a CRG beamline for radiochemistry and materials research at the ESRF. *J. Synchrotron Radiat.* **6**, 1076-1085.
- Mehta, S. K. & Gaur, J. P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **25**, 113-152.
- Mehta, S. K., Singh, A. & Gaur, J. P. (2002). Kinetics of adsorption and uptake of Cu^{2+} by *Chlorella vulgaris*: Influence of pH, temperature, culture age, and cations. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **37**, 399-414.
- Merroun, M. L., Geipel, G., Nicolai, R., Heise, K. H. & Selenska-Pobell, S. (2003). Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* studied using time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *Biometals* **16**, 331-339.
- Merroun, M. L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T. & Selenska-Pobell, S. (2005). Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5532-5543.
- Mkandawire, M. & Dudel, E. G. (2002). Uranium attenuation from tailing waters by floating macrophyte *Lemna gibba* L. In *Uranium, Mining and Hydrogeology* (Hrsg. J. B. Merkel, B. Planer-Friedrich und C. Wolkersdorfer), S. 627-634, Springer, Berlin.
- Moll, H., Geipel, G., Reich, T., Bernhard, G., Fanghanel, T. & Grenthe, I. (2003). Uranyl(VI) complexes with alpha-substituted carboxylic acids in aqueous solution. *Radiochim. Acta.* **91**, 11-20.

- Moore, C. M. & Dichristina, T. J. (2002). Metal (U,Fe,Mn,Hg) cycling. In *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. (Hrsg. G. Bitton), S. 1902-1912, John Wiley & Sons, New York.
- Moore, W. S. (1967). Amazon and Mississippi river concentrations of uranium, thorium, and radium isotopes. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2**, 231-234.
- Moulin, C., Laszak, I., Moulin, V. & Tondre, C. (1998). Time-resolved laser-induced fluorescence as a unique tool for low-level uranium speciation. *Appl. Spectrosc.* **52**, 528-535.
- Müller, K., Brendler, V. & Foerstendorf, H. (2008). Aqueous Uranium(VI) Hydrolysis Species Characterized by Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **47**, 10127-10134.
- Müller, K., Foerstendorf, H., Tsushima, S., Brendler, V. & Bernhard, G. (2009). Direct Spectroscopic Characterization of Aqueous Actinyl(VI) Species: A Comparative Study of Np and U. *J. Phys. Chem. A* **113**, 6626-6632.
- Nakajima, A., Horikoshi, T. & Sakaguchi, T. (1979). Studies on the accumulation of heavy-metal elements in biological-systems. 5. Ion effects on the uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agr. Biol. Chem.* **43**, 625-629.
- Nakajima, A., Horikoshi, T. & Sakaguchi, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 76-83.
- Newville, M. (2008). XAS Fundamentals, University of Chicago, Chicago, USA.
- Northcote, D. H., Goulding, K. J. & Horne, R. W. (1958). Chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. J.* **70**, 391-397.
- Panak, P. J., Booth, C. H., Caulder, D. L., Bucher, J. J., Shuh, D. K. & Nitsche, H. (2002). X-ray absorption fine structure spectroscopy of plutonium complexes with *Bacillus sphaericus*. *Radiochim. Acta.* **90**, 315-321.
- Panak, P. J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G. & Nitsche, H. (2000). Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile. *Radiochim. Acta.* **88**, 71-76.
- Perkampus, H. H. (1993). Lexikon Spektroskopie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

- Phoenix, V. R., Martinez, R. E., Konhauser, K. O. & Ferris, F. G. (2002). Characterization and implications of the cell surface reactivity of *Calothrix* sp strain KC97. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4827-4834.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D. & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* **39**, 1008-1018.
- Punnett, T. & Derrenbacker, E. (1966). Amino acid composition of algal cell walls. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 105-114.
- Quiles, F. & Burneau, A. (2000). Infrared and Raman spectra of uranyl(VI) oxo-hydroxo complexes in acid aqueous solutions: a chemometric study. *Vib. Spectrosc.* **23**, 231-241.
- Rai, L. C., Singh, A. K. & Mallick, N. (1991). Studies on photosynthesis, the associated electron-transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy-metal stress. *J. Plant Physiol.* **137**, 419-424.
- Ramos Silva, M., Matos Beja, A., Paixao, J. A., Alte Da Veiga, L. & Martin-Gil, J. (1999). 1-Argininium tris(acetato-*O,O'*)dioxouranium(III)-acetic acid-water (1/1/1). *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **55**, 2039-2041.
- Reich, T., Bernhard, G., Geipel, G., Funke, H., Hennig, C., Rossberg, A., Matz, W., Schell, N. & Nitsche, H. (2000). The Rossendorf Beam Line ROBL - a dedicated experimental station for XAFS measurements of actinides and other radionuclides. *Radiochim. Acta.* **88**, 633-637.
- Reynolds, E. S. (1963). Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Sachs, S., Brendler, V. & Geipel, G. (2007). Uranium(VI) complexation by humic acid under neutral pH conditions studied by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Radiochim. Acta.* **95**, 103-110.
- Saitoh, T., Nakagaki, N., Uchida, Y., Hiraide, M. & Matsubara, C. (2001). Spectrophotometric determination of some functional groups on *Chlorella* for the evaluation of their contribution to metal uptake. *Anal. Sci.* **17**, 793-795.
- Sandau, E., Sandau, P. & Pulz, O. (1996). Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol.* **16**, 227-235.

- Seaborg, G. T. (1993). Overview of the actinide and lanthanide (the f) elements. *Radiochim. Acta.* **61**, 115-122.
- Shiraiwa, Y., Goyal, A. & Tolbert, N. E. (1993). Alkalization of the medium by unicellular green-algae during uptake of dissolved inorganic carbon. *Plant Cell Physiol.* **34**, 649-657.
- Smith, B. C. (1996). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. CRC Press, Boca Raton.
- Spence, R. (1968). Uranium content of sea-water. *Talanta* **15**, 1307-&.
- Stuedtner, R., Arnold, T., Geipel, G. & Bernhard, G. (2010). Fluorescence spectroscopic study on complexation of uranium(VI) by glucose - a comparison of room and low temperature measurements. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **284**, 421-429.
- Stewart, D. C. & Bentley, W. C. (1954). Analysis of uranium in sea water. *Science* **120**, 50-51.
- Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Wiley, Chichester.
- Suzuki, Y. & Banfield, J. F. (1999). Geomicrobiology of Uranium. *Rev. Miner.* **38**, 393-432.
- Szabo, Z., Furo, I. & Csoregh, I. (2005). Combinatorial multinuclear NMR and X-ray diffraction studies of uranium(VI)-nucleotide complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15236-15247.
- Talling, J. F. (1976). Depletion of carbon-dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.* **64**, 79-121.
- Teo, B. K. (1986). EXAFS: Basic principles and data analysis. Springer, New York.
- Veglio, F. & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**, 301-316.
- Volesky, B. & Holan, Z. R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Progr.* **11**, 235-250.
- Wismut GmbH. (2006). Umweltbericht 2006 der Wismut GmbH (Hrsg. Unternehmensleitung der Wismut GmbH). Wismut GmbH, Chemnitz.
- Wolery, T. J. (1992). EQ 3/6 A software package for geochemical modeling of aqueous system. Report UCRL-MA-110662 part 1. In *Report UCRL-MA-110662 part 1*, Lawrence Livermore National Laboratory, California, USA.

- Yee, N., Benning, L. G., Phoenix, V. R. & Ferris, F. G. (2004). Characterization of metal-cyanobacteria sorption reactions: A combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 775-782.
- Yun, Y. S. & Volesky, B. (2003). Modeling of lithium interference in cadmium biosorption. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3601-3608.
- Yusov, A. B. (1993). Luminescence of transplutonium elements in solutions and its application *Radiochemistry* **35**, 1-14.

In Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandene Publikationen

Vogel, M., Günther, A., Rossberg, A., Li, B., Bernhard, G. & Raff, J. (2010). Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Sci. Total Environ.* **409**, 385-396.

Vogel, M., Günther, A., Raff, J. & Bernhard, G. (2008). Microscopic and spectroscopic investigation of U(VI) interaction with monocellular green algae. In *Uranium, Mining and Hydrogeology* (Ed. B. J. Merkel and A. Hasche-Berger), S. 693-702. Springer Berlin, Heidelberg.

Vorträge

Vogel, M.; Günther, A.; Raff, J.; Bernhard, G.: Microscopic and spectroscopic investigation of U(VI) interaction with the monocellular green alga *Chlorella vulgaris*. Workshop des Instituts für Radiochemie (IRC) und des Instituts für Nukleare Entsorgung (INE), 23.-24.10. 2008, Karlsruhe, Deutschland.

Vogel, M.; Günther, A.; Raff, J.; Bernhard, G.: Microscopic and spectroscopic investigation of the U(VI) interaction with monocellular green algae. 5th International Conference Uranium, Mining and Hydrogeology (UMH V), 14.-18.09. 2008, Freiberg, Germany.

Posterbeiträge

Vogel, M., Günther, A.; Raff, J., Bernhard, G.: Untersuchung der Wechselwirkung von Uran(VI) mit der Grünalge *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von pH-Wert und metabolischer Aktivität. GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2009, 30.08.-02.09.2009, Frankfurt am Main, Deutschland.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gert Bernhard für die Vergabe des interessanten Themas und die Gesamtbetreuung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. Alix Günther und Herrn Dr. Johannes Raff danke ich sehr für die umfassende Betreuung dieser Arbeit, die Vielzahl an wertvollen Hinweisen sowie für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und Hilfestellung.

Frau Prof. Dr. Erika Kothe danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Dr. Andre Rossberg und dem ROBL-Team in Grenoble (Frankreich) danke ich für die Unterstützung bei den EXAFS-Messungen und der Datenanalyse.

Ebenso danke ich Bo Li für ihre Hilfe bei den ATR-FTIR-Messungen.

Dr. Mohamed Merroun und dem Team des “Centro de Instrumentación Científica” der Universität von Granada (Spanien) gilt mein Dank für die Durchführung der TEM-Untersuchungen.

Mein herzlichster Dank gilt auch den Mitgliedern der Nachwuchsforschergruppe „NanoBio“, die mich insbesondere in den letzten Monaten am wissenschaftlichen und sozialen Leben der Gruppe teilhaben liessen.

Gedankt sei auch den anderen Doktoranden des Instituts für die Bereitschaft zur Hilfestellung, für gewinnbringende Diskussionen und aufmunternde Worte. Insbesondere gilt mein Dank Thomas Reitz, Bo Li, Sina Brockmann, Claudia Joseph, Robin Steudtner und Franziska Lederer.

Mein Dank gilt auch den nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Radiochemie für ihre stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Marcel Richter für sein Verständnis, seine Unterstützung und Rücksichtnahme in den zurückliegenden Monaten bedanken.

Außerdem möchte ich meinem Bruder Olaf Vogel für die Hilfe beim Korrekturlesen und die moralische Unterstützung danken.

Ein besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir meine Universitätsausbildung ermöglicht, mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite gestanden, mir den Rücken freigehalten und mich fortlaufend ermuntert haben, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Forschungszentrum Dresden-Rossendorf – Institut für Radiochemie – in der Zeit von Februar 2007 bis Juli 2010 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gert Bernhard angefertigt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 17. Juli 2008 an. Bisherige erfolgreiche Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Dresden, den 04.03.2011

Versicherung

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

Dresden, den 04.03.2011