

Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in
ehemaligen, neutralen Uranerzbergwerken in Sachsen und
Untersuchungen zur mikrobiellen Immobilisierung von Uran
und Arsen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der
Technischen Universität Dresden

von

M.Sc., Corinna Gagell

geboren am 09.08.1983 in Hoyerswerda

Eingereicht am 07.08.2015

Die Dissertation wurde in der Zeit von 03/2011 bis 08/2014 am
Institut für Ressourcenökologie (HZDR) angefertigt.

Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. habil. Isolde Röske (TU Dresden) Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Peter Stahmann (BTU Cottbus-Senftenberg)
Tag der Verteidigung:	03.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Uranerzbergbau und seine Folgen	1
1.2 Uran - Vorkommen und Verhalten in der Umwelt	3
1.3 Arsen - Vorkommen und Verhalten in der Umwelt	5
1.4 Einfluss von Mikroorganismen auf das Verhalten von Metallen und Halbmetallen in der Umwelt	6
1.5 Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Uran	6
1.6 Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Arsen	10
1.7 Zielstellung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Untersuchungsgebiete	15
2.2 Probenahme	19
2.3 Chemikalien und Gase	21
2.4 Präparative Methoden	21
2.4.1 Herstellung von Ferrihydrit	21
2.4.2 Herstellung von Manganoxid	22
2.4.3 Extraktion immobilisierter Metalle und Metalloide von Aktivkohle (BACTRAPs)	22

Inhaltsverzeichnis

2.5	Chemische Analysemethoden	22
2.5.1	Kationenbestimmung mittels ICP-MS	22
2.5.2	As(III)-Bestimmung mittels HG-AAS	23
2.5.3	Anionenbestimmung mittels Ionenchromatographie	23
2.5.4	Kohlenstoff- und Stickstoffbestimmung	23
2.5.5	Acetatbestimmung mittels HPLC	23
2.5.6	Kolorimetrische Fe(II)-Bestimmung mittels Ferrozin-Assay	24
2.5.7	Methanbestimmung mittels Gaschromatographie	24
2.6	Molekularbiologische Methoden	25
2.6.1	Extraktion der Gesamt-DNA aus Flutungswasser	25
2.6.2	Extraktion der Gesamt-DNA von BACTRAPs	25
2.6.3	Arbeitsweise beim Umgang mit RNA	26
2.6.4	Extraktion der Gesamt-RNA aus Flutungswasser	26
2.6.5	Extraktion der Gesamt-RNA von BACTRAPs	27
2.6.6	Entfernen der DNA und Reinheitsüberprüfung der RNA	27
2.6.7	cDNA Synthese	27
2.6.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
2.6.9	Amplifikation der 16S rRNA und 16S rRNA-Gene mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	28
2.6.10	Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung	30
2.6.11	Pyrosequenzierung	30
2.6.12	Sequenzauswertung und taxonomische Einordnung	30
2.6.13	Erstellung der Alpha-Diversitätscharakteristik	31
2.6.14	Clusteranalysen und nichtmetrische multidimensionale Skalierung . .	31
2.6.15	Quantifizierung von Mikroorganismen mittels CARD-FISH	32
2.7	Mikrobiologische Methoden	36
2.7.1	Gesamtzellzahlbestimmung	36
2.7.2	Lebendkeimzahlbestimmung aerober Mikroorganismen mittels Co- lony Forming Unit Assay	37
2.7.3	Lebendkeimzahlbestimmung anaerober Mikroorganismen mittels Most Probable Number Technik	37
2.7.4	Aerober MPN für Sulfatreduzierer	42

Inhaltsverzeichnis

2.8	Proteinbiochemische Methoden	43
2.8.1	Proteinextraktion	43
2.8.2	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	44
2.8.3	Trypsin-In-Gelverdau	44
2.8.4	Peptidreinigung	45
2.8.5	MS-Analyse und Auswertung	45
2.9	Labormikrokosmen	46
2.10	Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Hydrochemische Charakterisierung der untersuchten Urangruben	49
3.2	Testung geeigneter Aufwuchsträgersysteme für die Gewinnung von <i>in situ</i> Biofilmen	52
3.3	Molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften . .	53
3.3.1	Bakterielle Diversität mikrobieller Gemeinschaften	54
3.3.2	Taxonomische Klassifizierung der Bacteria in planktonischen Ge- meinschaften	56
3.3.3	Taxonomische Klassifizierung der Bacteria in Biofilmgemeinschaften	60
3.3.4	Archaeelle Diversität mikrobieller Gemeinschaften	63
3.3.5	Taxonomische Klassifizierung der Archaea in planktonischen Gemein- schaften	65
3.3.6	Taxonomische Klassifizierung der Archaea in Biofilmgemeinschaften	68
3.3.7	Zusammensetzung planktonischer Gemeinschaften	70
3.3.8	Zusammenhang zwischen hydrochemischen Faktoren und mikrobiel- len Gemeinschaftsstrukturen	73
3.4	Molekularbiologische Charakterisierung stoffwechselaktiver Gemeinschaften	76
3.4.1	Bakterielle Diversität stoffwechselaktiver Gemeinschaften	76
3.4.2	Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Bacteria in plank- tonischen Gemeinschaften	78
3.4.3	Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Bacteria in Bio- filmgemeinschaften	81
3.4.4	Archaeelle Diversität stoffwechselaktiver Gemeinschaften	83

Inhaltsverzeichnis

3.4.5	Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Archaea in planktonischen Gemeinschaften	85
3.4.6	Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Archaea in Biofilmgemeinschaften	86
3.5	Lebendkeimzahlen der planktonischen Gemeinschaften	89
3.6	Proteomanalysen der planktonischen Gemeinschaften	93
3.7	Stimulation mikrobieller Stoffwechselprozesse zur Immobilisierung von Uran und Arsen	100
3.7.1	Labormikrokosmen	100
3.7.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zum Valenzstatus von Uran	106
4	Diskussion	108
4.1	Lebensbedingungen für Mikroorganismen in den gefluteten Urangruben . . .	108
4.2	BACTRAPs zur Gewinnung von <i>in situ</i> Biofilmen	111
4.3	Mikrobielle Gemeinschaften in den gefluteten Urangruben	113
4.3.1	Einschätzung der bakteriellen Diversität	113
4.3.2	Bakterielle Zusammensetzung der Gemeinschaften	113
4.3.3	Einschätzung der archaeellen Diversität	121
4.3.4	Archaeelle Zusammensetzung der Gemeinschaften	122
4.3.5	Einschätzung zu stoffwechselaktiven Gemeinschaften	124
4.4	Einschätzung der Lebendkeimzahlen und des mikrobiellen Stoffwechselpotentials	126
4.5	Beurteilung der Proteomanalyse für planktonische Gemeinschaften	127
4.6	Einfluss mikrobieller Gemeinschaften auf die Mobilität von Uran und Arsen	129
5	Ausblick	134
	Literatur	136
	Anhang	163
	Danksagung	165
	Erklärung	168

Zusammenfassung

Ehemalige Urangruben tragen durch das anfallende Flutungswasser maßgeblich zur Ausbreitung von Schadstoffen wie Uran und Arsen in teils dicht besiedelte Gebiete bei. Um die Prozesse in den unterirdischen Gruben besser zu verstehen und alternative Strategien zur konventionellen, kostenintensiven Wasserbehandlung entwickeln zu können, war das Ziel der Arbeit, mikrobielle Gemeinschaften aus drei gefluteten Uranerzbergwerken in Sachsen, namens Pöhla, Schlema und Zobes, die unterschiedliche Flutungsstadien repräsentierten, zu charakterisieren und den mikrobiellen Einfluss auf die Mobilität von Uran und Arsen zu untersuchen.

Um herauszufinden, welche Mikroorganismen die hydrochemischen Vorgänge im Untergrund der Uranerzbergwerke beeinflussen könnten, wurde die Diversität und Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften mittels Pyrosequenzierung eines Fragments des 16S rRNA Gens (16S rDNA) und CARD-FISH ermittelt. Wenngleich Clusteranalysen zeigten, dass sich die planktonischen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer bakteriellen Zusammensetzung zwischen den drei Uranerzbergwerken unterschieden, wurden alle von chemolithotrophen Schwefeloxidierern der Beta- und Epsilonproteobacteria dominiert, die mit den Gattungen *Thiobacillus* und *Sulfuritalea* bzw. *Sulfuricurvum* und *Sulfurimonas* vertreten waren. Im Unterschied zu den planktonischen Gemeinschaften bestanden *in situ* Biofilme, die auf BACTRAPs während einer 3-monatigen Exposition im Flutungswasser anwuchsen, laut Pyrosequenzierung zu einem wesentlichen, mitunter dominanten Anteil aus metall- bzw. sulfatreduzierenden Deltaproteobacteria. In Biofilmgemeinschaften aus Zobes wurden hauptsächlich *Geobacter* sp. detektiert, die als Fe(III)- und U(VI)-Reduzierer bekannt sind. Obwohl Archaea basierend auf den Ergebnissen der CARD-FISH-Analyse nur einen sehr geringen Anteil der planktonischen Gemeinschaften ausmachten, wurden mittels Pyrosequenzierung planktonische Euryarchaeota der Thermoprotei in allen Gruben detektiert. In planktonischen Gemeinschaften und 3-monatigen Biofilmen aus Pöhla und Zobes wurden zudem methanogene Crenarchaeota, vor allem Methanobacteria und teilwei-

Zusammenfassung

se Methanomicrobia, ermittelt. Die 16S rRNA-Analyse, die ergänzend zum DNA-basierten Ansatz durchgeführt wurde, lieferte Hinweise darauf, dass die detektierten, dominanten Mikroorganismen, Bacteria sowie Archaea, in der planktonischen Gemeinschaft aus Schlema und den Biofilmgemeinschaften stoffwechselaktiv waren. In der planktonischen Gemeinschaft aus Zobes wurden im Vergleich zur DNA-basierten Analyse höhere Abundanzen für Verrucomicrobia, Acidobacteria und Alphaproteobacteria ermittelt, deren Bedeutung offen bleibt.

Untersuchungen zum mikrobiellen Stoffwechselfpotential planktonischer Gemeinschaften mittels CFU- und MPN-Analysen ergaben, dass Mikroorganismen aus allen Urangruben ein breites Spektrum anaerober Reaktionen (Nitrat-, Eisen-, Mangan-, Arsenat- und Sulfatreduktion und Acetogenese) unter Laborbedingungen abdeckten. In guter Übereinstimmung mit den Sequenzierungsergebnissen konnten methanogene Mikroorganismen nur im Flutungswasser aus Pöhla und Zobes detektiert werden.

Die Metaproteomanalyse ergab, dass 61,6% der Peptide in der planktonischen Gemeinschaft aus Schlema von den dominanten Epsilonproteobacteria stammten. Dagegen wurden für Zobes detektierte Peptide mehrheitlich methylo trophen und eisenoxidierenden Betaproteobacteria der Familien Methylophilaceae bzw. Gallionellaceae sowie methylo trophen Gammaproteobacteria der Methylococcaceae zugewiesen. Obwohl die Mehrheit der Proteine an der Translation beteiligt war, konnten insgesamt 49 Proteingruppen ermittelt werden, deren Vertreter für den mikrobiellen Energiestoffwechsel relevant waren. Insbesondere planktonische Gammaproteobacteria aus Zobes konnten so mit dem Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf in Zusammenhang gebracht werden.

Mithilfe von Labormikrokosmen wurde der potentielle Einfluss mikrobieller Gemeinschaften aus Schlema auf die Mobilität von Arsen und Uran im Flutungswasser mit Acetat als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen über einen Zeitraum von 98 Tagen untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen konnten sowohl die stimulierte, planktonische Gemeinschaft als auch Biofilme natürliches Arsen aus der wässrigen Phase fast vollständig entfernen. Allerdings wies der spätere Anstieg des gelösten Arsens daraufhin, dass der immobilisierte Zustand langfristig nicht stabil blieb. In stimulierten Biofilm-Ansätzen wurde Uran mit bis zu $39 \pm 9\%$ (in Anwesenheit von $7 \mu\text{M}$ natürlichem Uran) bzw. $34 \pm 8\%$ (bei Zugabe von $50 \mu\text{M}$ U(VI)) aus der wässrigen Phase langfristig (98 Tage) immobilisiert. Laserfluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zeigten, dass Uran im Biofilm reduziert wurde.

Summary

Abandoned uranium mines contribute significantly to the emission of contaminants such as uranium and arsenic into partly densely populated regions due to emerging flood water. To get a deeper understanding of ongoing processes in underground environments and for the development of alternative strategies to conventional, cost-intensive water treatment, the objective of this thesis was to characterize microbial communities from three former uranium mines in Saxony, namely Pöhla, Schlema, and Zobes representing different flooding stages and to investigate the microbial influence on the mobility of uranium and arsenic.

To find out which microorganisms could affect hydrochemical processes in underground environments, the diversity and composition of microbial communities was investigated by pyrosequencing of a 16S rRNA gene (16S rDNA) fragment together with CARD-FISH. Though cluster analyses showed that planktonic communities differed with regard to bacterial composition between the three uranium mines, all were dominated by chemolithotrophic sulfur oxidizers of Betaproteobacteria with members of genus *Thiobacillus* and *Sulfuritalea* and Epsilonproteobacteria belonging to *Sulfuricurvum* and *Sulfurimonas*. Unlike planktonic communities, *in situ* biofilms grown on BACTRAPs during three months of exposition in flood water consisted of metal and sulfate reducing Deltaproteobacteria to a substantial or even dominant proportion based on pyrosequencing results. In biofilm communities from Zobes mainly *Geobacter* sp. were detected which are known Fe(III)- and U(VI)-reducing bacteria. Although CARD-FISH analysis revealed that Archaea represented only a very small part of the planktonic communities, planktonic Euryarchaeota of the Thermoprotei class were detected in all mines by pyrosequencing. In planktonic communities and 3-month biofilms of Pöhla and Zobes methanogenic Crenarchaeota, especially Methanobacteria and partially Methanomicrobia, were determined, too. 16S rRNA analysis applied in addition to the DNA based approach indicated that detected and dominant microorganisms (Bacteria as well as Archaea) in planktonic communities from Schlema and in biofilms were metabolically active. In the planktonic community from Zobes greater

Summary

abundances were determined for Verrucomicrobia, Acidobacteria, and Alphaproteobacteria compared to data from the DNA based analysis. However, the meaning of these results remains open.

Investigations on the microbial metabolic potential of planktonic communities by CFU and MPN analyses revealed that microorganisms of all uranium mines covered a broad range of anaerobic reactions (reduction of nitrate, iron, manganese, arsenate and sulfate as well as acetogenesis) under laboratory conditions. In good agreement with sequencing results methanogenic Archaea were only detected in flood water from Pöhla and Zobes.

The metaproteomic analysis revealed that 61,6% of analyzed peptides in the planktonic community of Schlema originated from dominant Epsilonproteobacteria. Whereas for Zobes the majority of detected peptides were assigned to methylotrophic and iron oxidizing Betaproteobacteria of the families Methylophilaceae and Gallionellaceae, respectively, as well as methylotrophic Gammaproteobacteria of Methylococcaceae. Although the majority of proteins was related to translation, a total of 49 protein groups was determined with relevance for energy metabolism. Especially Gammaproteobacteria from Zobes have been associated with carbon and sulfur cycle.

The potential influence of microbial communities from Schlema on the mobility of arsenic and uranium in flood water was analyzed by means of laboratory microcosms and acetate as electron donor under anaerobic conditions over a period of 98 days. In comparison to controls the stimulated planktonic community as well as biofilms were capable to remove almost all of the natural arsenic from the aqueous phase. However, the subsequent increase of dissolved arsenic indicated that the immobilized status did not remain stable for the long term. In stimulated biofilm microcosms uranium was immobilized from the aqueous phase long-term (98 days) with up to $39 \pm 9\%$ (in the presence with $7 \mu\text{M}$ natural uranium) and $34 \pm 8\%$ (after addition of $50 \mu\text{M}$ U(VI)), respectively. Investigations applying laser fluorescence spectroscopy showed that uranium in biofilm was reduced.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Berechnete Uranspeziation für Flutungswasser aus Schlema-Alberoda [30]	4
1.2	Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der mikrobiellen Zelle mit Uran (modifiziert nach Lloyd and Macaskie [62])	7
1.3	Mikrobielle Transformationen von Arsen im Grundwasser [146]	11
2.1	Untersuchungsgebiete - drei ehemalige Uranerzbergwerke in Sachsen	15
2.2	Aufwuchsträgersysteme für Biofilme	20
3.1	Rarefaction-Kurven für 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria aus (A) 8 Flutungswasser- und (B) 5 Biofilmproben	56
3.2	Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Flutungswasserproben	60
3.3	Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Biofilmproben	62
3.4	Rarefaction-Kurven für 16S rDNA-Bibliotheken der Archaea aus (A) 8 Flutungswasser- und (B) 5 Biofilmproben	65
3.5	Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Flutungswasserproben	67
3.6	Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Biofilmproben	69
3.7	Bakterielle Zusammensetzung der planktonischen Gemeinschaften aus Flutungswasserproben	72
3.8	Hierarchische Clusterdendrogramme der Flutungswasserproben basierend auf (A) normierten OTU-Abundanzen aus 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria und Bray-Curtis Dissimilarities oder (B) standardisierten hydrochemischen Daten und Euclidean Distances	73

Abbildungsverzeichnis

3.9	NMDS-Plots der Flutungswasserproben basierend auf normierten OTU-Abundanzen aus 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria	75
3.10	Rarefaction-Kurven für 16S rRNA-Bibliotheken der Bacteria aus (A) 3 Flutungswasser- und (B) 4 Biofilmproben	77
3.11	Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Flutungswasserproben	79
3.12	Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Biofilmproben	82
3.13	Rarefaction-Kurven für 16S rRNA-Bibliotheken der Archaea aus (A) 3 Flutungswasser- und (B) 4 Biofilmproben	85
3.14	Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Flutungswasserproben	86
3.15	Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Biofilmproben	87
3.16	Hierarchische Clusterdendrogramme aller Flutungs- und Biofilmproben für (A) Bacteria und (B) Archaea aus 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliotheken basierend auf normierten OTU-Abundanzen und Anwendung der Bray-Curtis Dissimilarities.	88
3.17	MPN-Kulturen für (A) Sulfatreduzierer, (B) Eisenreduzierer und (C) Manganreduzierer	91
3.18	Taxonomische Verteilung der identifizierten Proteine für Bacteria aus Flutungswasserproben	94
3.19	Zeitliche Abfolge anaerober, mikrobieller Prozesse nach Stimulation mit Acetat in Labormikrokosmen mit (A, B) planktonischen Gemeinschaften und (C, D) Biofilm aus Schleima	102
3.20	Maximale Abnahmen von gelöstem Arsen und Uran nach Zugabe von Acetat in Labormikrokosmen mit (A, B) planktonischen Gemeinschaften und (C, D) Biofilmen aus Schleima im Vergleich zu Kontrollen	104
3.21	Zeitlicher Verlauf der Fe(II)-Konzentration in Labormikrokosmen mit Mikroorganismen der (A) planktonischen Gemeinschaft und (B) Biofilmen aus Schleima	105
3.22	LIFS-Spektrum von U(VI) nach Extraktion aus Biofilm (Labormikrokosmen)	107

Abbildungsverzeichnis

A.1	Zeitlicher Verlauf von Arsen, Uran, Fe(II), Sulfat und Acetat in Labormikrokosmen für planktonische Gemeinschaften aus Schleima der (A, B) Totkontrollen und (C, D) Substratkontrollen	163
A.2	Zeitlicher Verlauf von Arsen, Uran, Fe(II), Sulfat und Acetat in Labormikrokosmen für Biofilme aus Schleima der (A, B) Totkontrollen, (C, D) Substratkontrollen und (E, F) Matrixkontrollen	164

Tabellenverzeichnis

2.1	Wichtigste Grubencharakteristika der Untersuchungsgebiete	18
2.2	PCR-Pipettieransatz	29
2.3	Verwendete Primer	29
2.4	PCR-Programme	29
2.5	CARD-FISH-Sonden	34
2.6	Lösungen für CARD-FISH	35
2.7	Hybridisierungspuffer für CARD-FISH	35
2.8	Waschpuffer für CARD-FISH	36
2.9	Mikroskopische Filtereinstellungen für CARD-FISH	36
2.10	Mikroskopische Filtereinstellungen für DAPI	37
2.11	Zusammensetzung des R2A-Agars	37
2.12	Zusammensetzung der MPN-Fertigmedien	39
2.13	Zusammensetzung der MPN-Basalmedien	40
2.14	Zusammensetzung der MPN-Spuren- und Vitaminlösungen	40
2.15	Zusammensetzung der MPN-Stammlösungen	41
2.16	MPN-Analysetechniken	41
2.17	Zusammensetzung des halbfesten Postgate B Mediums	42
2.18	Zusammensetzung von SDS-Laufpuffer	43
2.19	Coomassiefärbelösung für Proteingele	44
2.20	Labormikrokosmen-Versuchsschema	47
3.1	Zusammenfassung physikalisch-chemischer Daten für die untersuchten Flutungswässer	51
3.2	Quantitative Bestimmung immobilisierter Metalle/Metalloide von Aktivkohle nach 3-monatiger Exposition von BACTRAPs im Flutungswasser (Feldversuch)	53

Tabellenverzeichnis

3.3	Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria .	55
3.4	Dominante Bacteria-OTUs in 16S rDNA-Bibliotheken aus Flutungswasser- proben	59
3.5	Dominante Bacteria-OTUs in 16S rDNA-Bibliotheken aus Biofilmproben . .	63
3.6	Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rDNA-Bibliotheken der Archaea .	64
3.7	Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rRNA-Bibliotheken der Bacteria .	77
3.8	Dominante Bacteria-OTUs in 16S rRNA-Bibliotheken aus Flutungswasser- proben	80
3.9	Dominante Bacteria-OTUs in 16S rRNA-Bibliotheken aus Biofilmproben . .	83
3.10	Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rRNA-Bibliotheken der Archaea .	84
3.11	Gesamtzellzahl und Anzahl kultivierbarer aerober und anaerober Mikroor- ganismen aus Flutungswasserproben	92
3.12	Zugeordnete Hauptfunktion der Proteingruppen für Bacteria aus Flutungs- wasserproben basierend auf COG-Datenbank	93
3.13	Proteingruppen für Bacteria aus Flutungswasserproben mit Bedeutung für den mikrobiellen Energiestoffwechsel basierend auf COG- und TIGRFAM- Datenbank mittels PROPHANE	97
3.14	Vergleich der mittels LIFS ermittelten Emissionsmaxima für lösliche Ura- nylsulfatspezies mit publizierten Daten	107

Abkürzungsverzeichnis

AA	autotrophe Acetogene
AM	autotrophe Methanogene
AsRB	arsenatreduzierende Bacteria
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	absorbance unit, Absorptionseinheit
BfUL	Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BP	band pass, Band-Pass
CARD-FISH	catalysed reporter deposition fluorescence <i>in situ</i> hybridisation
CFU	colony forming unit, Kolonie bildene Einheit
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMA	dimethylarsinic acid, Dimethylarsinsäure
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DOC	dissolved organic carbon, gelöster organischer Kohlenstoff
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extracellular polymeric substances, extrazelluläre polymere Substanzen
FeRB	eisereduzierende Bacteria
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GC	Gaschromatographie
HA	heterotrophe Acetogene
HG-AAS	hydride generation atom absorption spectroscopy, Hydridtechnik-Atomabsorptionsspektrometrie
HM	heterotrophe Methanogene
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HZDR	Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf
dd H ₂ O	bidestilliertes entionisiertes Wasser
IC	Ionenchromatographie
ICCD	intensified charged coupled device
ICP-MS	inductively coupled plasmon mass spectrometry, induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasenpaare
Lf	Leitfähigkeit
LIFS	Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie
LP	long pass, Lang-Pass
MID	Multiplex-Identifizier
MMA	monomethylarsonic acid, Methanarsonsäure
MnRB	manganreduzierende Bacteria
MPN	most probable number
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center of Biotechnology Information
n.d.	nicht detektiert
NDIR	nichtdispersiver Infrarot
Nd-YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NMDS	nichtmetrische multidimensionale Skalierung
NRB	nitratreduzierende Bacteria
NSAF	normalized spectral abundance factor
OD	Optische Dichte
OTU	operational taxonomic unit, operative taxonomische Einheit
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PROPHANE	Proteomics Result Pruning Homology Group Annotation Engine
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SAG	Sowjetische Aktiengesellschaft
SDAG	Sowjetisch-Deutsche Aktiengesellschaft
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOB	schwefeloxidierende Bacteria
SRB	sulfatreduzierende Bacteria
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC/TN	total carbon/total nitrogen, gesamter Kohlenstoff/gesamter Stickstoff
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Temp.	Temperatur
TMA	trimethylarsenic, Trimethylarsin
TNb	total nitrogen bound, gesamter gebundener Stickstoff
TOC	total organic carbon, gesamter organischer Kohlenstoff
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit, Einheit
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
u. Gel.	unter Gelände
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
VEB	volkseigener Betrieb

Abkürzungsverzeichnis

WBA	Wasserbehandlungsanlage
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Abkürzung von Mikroorganismen:

<i>A. faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. metallireducens</i>	<i>Geobacter metallireducens</i>
<i>M. acetivorans</i>	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>S. autotrophica</i>	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>
<i>S. denitrificans</i>	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>
<i>S. hydrogenivorans</i>	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i>
<i>S. kujiense</i>	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>
<i>S. paralvinellae</i>	<i>Sulfurimonas paralvinellae</i>
<i>S. gotlandica</i>	<i>Sulfurimonas gotlandica</i>
<i>T. aquaesulis</i>	<i>Thiobacillus aquaesulis</i>
<i>T. denitrificans</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
<i>T. thioparus</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>
<i>T. thiophilus</i>	<i>Thiobacillus thiophilus</i>

Probenbezeichnungen sind im Text erklärt.

1 Einleitung

1.1 Uranerzbergbau und seine Folgen

Bereits im Jahr 1789 entdeckte der deutsche Pharmazeut Martin Heinrich Klaproth das Element Uran in Pechblende aus Johanngeorgenstadt (Erzgebirge). Erst 149 Jahre später (1938) wuchs das weltweite Interesse an Uran mit der Entdeckung der Kernspaltung durch Hahn, Strassmann und Meitner [1, 2]. Zunächst wurde Uranerz vor allem für militärische Zwecke und später zur nuklearen Energieerzeugung abgebaut. Derzeit sind lediglich zehn Länder für fast die gesamte, weltweite Uranproduktion verantwortlich. Zu den Hauptproduzenten gehören Kasachstan (36%), gefolgt von Kanada (15%) und Australien (12%). Der Unfall des japanischen Atomkraftwerks in Fukushima im März 2011 hatte zur Folge, dass die Regierungen in Belgien, Frankreich, Deutschland, Italien und Schweiz ihre Energiepolitik überdacht haben und nukleare Energieprojekte abgeändert wurden. So beschloss z.B. die deutsche Regierung, alle inländischen Atomkraftwerke bis spätestens 2022 stillzulegen. Nichtsdestotrotz wird prognostiziert, dass der globale Bedarf an Uran aufgrund des steigenden Energiekonsums der wachsenden Weltbevölkerung in vorhersehbarer Zukunft (bis 2035) weiter steigen wird, was sich bereits durch die weltweite Zunahme der Urangewinnung durch Bergbauaktivitäten andeutet [3].

Der kommerzielle Abbau von Uranerzen wurde bis 1990 auch in einigen Regionen Deutschlands betrieben. Bereits in den 30er Jahren wurden in Buntlagerstätten im Vogtland und Erzgebirge Uranvorräte festgestellt und als Nebenprodukt abgebaut. Ab 1945 veranlasste die ehemalige Sowjetunion in der damaligen DDR großflächige (50.000 km²), geologische Erkundungen, um Rohstoffe für den Bau der sowjetischen Atombombe zu gewinnen. Dabei wurden insgesamt 27 Uranlagerstätten identifiziert. Zur Förderung von Uranerzen wurden Bergwerke zunächst im Westerzgebirge, später im Vogtland und in Thüringen sowie im Elbsandsteingebirge von der SAD/SDAG Wismut betrieben. Zu den größten als auch bedeutendsten Uranlagerstätten zählten die Ronneburger Lagerstätte in Thüringen und die

1 Einleitung

Lagerstätte Niederschlema-Alberoda in Sachsen. Bis 1990 wurden insgesamt ca. 231.000 t Uran gewonnen. Damit war die DDR der viertgrößte Uranproduzent der Welt hinter der UdSSR, USA und Kanada. Nach dem Erreichen der höchsten Jahresuranproduktion 1967 wurde die gewinnbringende Uranförderung in den Folgejahren durch das Erschöpfen der Lagerstätten und sinkende Marktpreise immer schwieriger. Mit der deutschen Wiedervereinigung wurde der Uranerzbergbau schließlich endgültig beendet. Durch das sogenannte “Wismut-Gesetz” vom 12. Dezember 1991 wurde die Umwandlung der SDAG Wismut in die bundeseigene Wismut GmbH beschlossen [3, 4].

Die jahrzehntelangen, intensiven Bergbauaktivitäten führten zu erheblichen Umweltschäden durch radioaktiv kontaminierte Halden, Absetzanlagen und Betriebsflächen in dicht besiedelten Regionen in Sachsen und Thüringen. Die in Böden als auch in Atmos- und Hydrosphäre freigesetzten radioaktiven und toxischen Schadstoffe stellen eine potentielle Gefahr für Umwelt und Mensch dar. Um Gefahrenquellen zu beseitigen und das Restrisiko von Kontaminationen zu minimieren, wurde die Wismut GmbH mit der Stilllegung und Sanierung der Hinterlassenschaften beauftragt. Die Arbeiten werden durch ein umfangreiches Umweltmonitoringprogramm begleitet, welches dazu dient den Fortschritt der Sanierungen zu kontrollieren, die Einhaltung gesetzlich festgelegter Grenzwerte zu gewährleisten und ggf. ein frühzeitiges Eingreifen zu ermöglichen [4].

Die Sanierung der Gruben und damit verbundene Behandlung der kontaminierten Grubenwässer, die als Flutungswässer bezeichnet werden, gehört zu den größten technischen und ökonomischen Herausforderungen der Wismut GmbH. Die initiierte Flutung unterirdischer Bergwerke durch Abschalten der Pumpen führt zunächst zu einem Konzentrationsanstieg von Uran und anderen Schadstoffen im Flutungswasser, der durch Verwitterungsprozesse (z.B. Pyritoxidation) in den anfangs noch belüfteten Gruben hervorgerufen wird. Das Wasser wird an die Oberfläche gepumpt und in Wasserbehandlungsanlagen (WBA) mittels Kalkfällung, Ionenaustauschersysteme und/oder chemisch-physikalischen Abtrennverfahren gereinigt (“Pump and Treat”-Verfahren) bevor es in die Vorflut (im Erzgebirge: Zwickauer Mulde) geleitet wird. In einer späteren Phase der Flutung macht sich die Verdünnung des Flutungswassers durch zulaufendes Grundwasser bemerkbar. Zusätzlich können einsetzende reduktive Prozesse eine *in situ* Immobilisierung von Schadstoffen begünstigen, die zu einer weiteren Abnahme der Konzentration dieser Stoffe im Flutungswasser führen können. Die Monitoring-Ergebnisse aus den letzten 20 Jahren haben gezeigt, dass Vorhersagen zur Entwicklung der Wasserqualität mittels thermodynamischer Modellierungen

1 Einleitung

bislang selten zutreffend sind und viele Flutungswässer nach wie vor behandelt werden müssen. Die Flutungswässer enthalten nicht nur die Radionuklide Uran und Radium sondern mitunter auch hohe Konzentrationen an Eisen, Mangan, Arsen sowie andere Metalle [5]. Für die Einleitung von bergbaubeeinflussten Wässern in Oberflächengewässer werden Richtwerte für die Schadstoffe behördlich festgelegt. Der derzeitige Behandlungszielwert in der WBA Schlema beträgt 0,5 mg/l Uran und kleiner 0,1 - 0,3 mg/l Arsen für das in die Zwickauer Mulde abzuführende Wasser (mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH). Die Wismut GmbH geht davon aus, dass die Reinigung des Flutungswassers für die fünf Standorte Schlema-Alberoda, Pöhla, Königstein, Dresden-Gittersee und Ronneburg noch für die nächsten Jahrzehnte nötig sein wird. Ein besseres Verständnis der ablaufenden Prozesse bei der Grundwassererneuerung nach der Flutung der Bergwerke sowie alternative, effizientere Sanierungsstrategien zur Behandlung der Flutungswässer könnten langfristig helfen, Kosten zu reduzieren.

1.2 Uran - Vorkommen und Verhalten in der Umwelt

Das Schwermetall Uran mit der Ordnungszahl 92 gehört zu der Gruppe der Actinoide. Natürliches Uran besitzt eine Atommasse von 238,03 g/mol, setzt sich aus den radioaktiven Isotopen ^{234}U (0,0055%), ^{235}U (0,7200%) und ^{238}U (99,2745%) zusammen und kommt mit einer durchschnittlichen Konzentration von 2,7 g/t relativ häufig in der Erdkruste vor [6–8]. In Uranerzlagerstätten kann Uran je nach Art der Lagerstätte zwischen wenigen hundert g/t bis mehr als 20% angereichert sein [2]. Von den mehr als 200 bekannten Uranmineralen gehören Pechblende, Autunit, Coffinit und Kasolit zu den wenigen wirtschaftlich bedeutsamen [7, 9, 10]. Uran wird heutzutage zur Brennstoffherstellung sowie in der Rüstungsproduktion und Kernforschung genutzt. Zudem ist es u.a. in Braun- und Steinkohle, Beton und Phosphatdünger enthalten. Der Eintrag von Uran in aquatische Systeme ist neben natürlichen Verwitterungsprozessen uranhaltiger Minerale auch anthropogen z.B. durch die Uranerzgewinnung und -verarbeitung verursacht. Der Wasserpfad spielt für die Verteilung von Uran in der Umwelt eine große Rolle. Im Meerwasser beträgt die Urankonzentration ca. 3,3 µg/l [11]. Für deutsche Flüsse werden Konzentrationen von 1 - 3 µg/l Uran angegeben [7, 12]. Mitunter können auch höhere Uranfrachten in Flüssen ehemaliger Bergbauregionen ermittelt werden, z.B. 10 µg/l Uran im Fall der Zwickauer Mulde [13]. Da die Einnahme von Trinkwasser mit erhöhten Urangehalten zu schweren gesundheitlichen

1 Einleitung

Schädigungen wie Nierenkrebs führen kann [14–17] empfiehlt die WHO einen Grenzwert von 30 µg/l für Uran in Trinkwasser [18]. Das Bundesministerium für Gesundheit legte 2011 sogar eine maximale Konzentration von 10 µg/l Uran in der deutschen Trinkwasserverordnung fest [19].

Uran kann in den Oxidationsstufen II - VI auftreten [20, 21], ist in der Natur allerdings nur in seiner vier- und sechswertigen Form stabil [22, 23]. Da der Oxidationszustand die Löslichkeit und somit die Mobilität von Uran bestimmt, ist er von besonderer ökologischer Relevanz [24]. Das Auftreten vier- oder sechswertiger Uranverbindungen wird durch viele Faktoren wie z.B. Redoxpotential, pH-Wert, Temperatur, CO₂-Partialdruck und Anwesenheit von Liganden beeinflusst [7, 25, 26]. Unter oxidierenden Bedingungen kommt Uran vorwiegend sechswertig (U(VI)) vor und bildet häufig Komplexe mit anorganischen Liganden wie Carbonat, Sulfat und Phosphat [25, 27, 28]. Die Salze des Urans sind allgemein sehr gut wasserlöslich (oft mehrere hundert Gramm pro Liter) [29], also mobil. In karbonatreichen Systemen kommen hauptsächlich Uranylcarbonat-Komplexe vor, wie Bernhard *et al.* 1998 mittels Laserspektroskopie und thermodynamischen Modellierungen für das oxische Flutungswasser aus der Urangrube Schlema-Alberoda zeigten (Abb. 1.1) [30]. Unter anoxischen, reduzierenden Bedingungen liegt Uran vierwertig (U(IV)), typischerweise als schwerlösliches und daher weniger mobiles UO₂, vor [26].

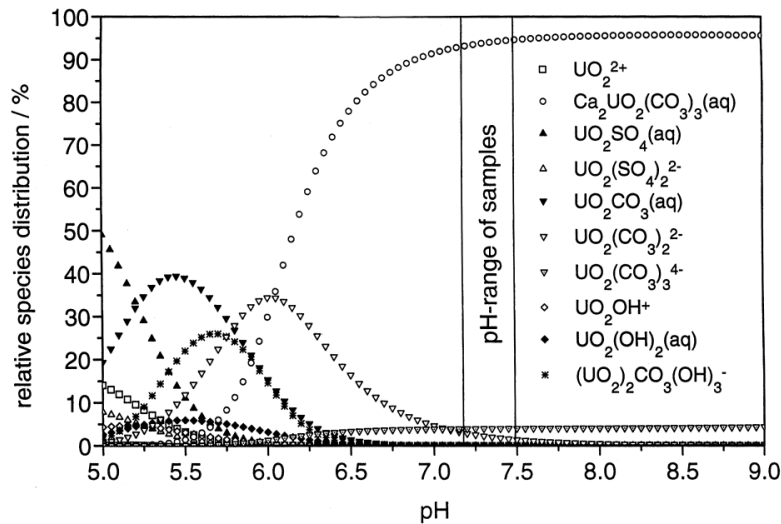


Abbildung 1.1: Berechnete Uranspeziation für Flutungswasser aus Schlema-Alberoda [30]

1.3 Arsen - Vorkommen und Verhalten in der Umwelt

Arsen ist ein toxisches Metalloid mit der Ordnungszahl 33 und einer Atommasse von 74,92 g/mol. Natürliches Arsen kommt in der Erdkruste mit durchschnittlich 1,7 g/t vor [31]. Es kann in elementarer Form oder in zahlreichen Mineralen vorliegen. Arsen-Sulfide wie Arsenopyrit (FeAsS), Realgar (As_4S_4) und Auripigment (As_2S_3), aber auch Löllingit (FeAs_2) sind relativ häufig zu finden [32–34]. Aufgrund der natürlichen Auswaschung und Verwitterung arsenhaltiger Sedimentgesteine und Böden als auch anthropogener Aktivitäten ist Arsen in signifikanten Mengen in der gesamten Umwelt verteilt [35]. Es wird in der Land- und Forstwirtschaft in verschiedenen Pestiziden, Herbiziden und Dünger sowie in Holzschutzmitteln, in der Halbleitertechnik, Erzverhüttung, in der Glas- und Keramikindustrie als Färbemittel sowie in einigen Medikamenten verwendet. Arsenhaltige Abfälle fallen zudem bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe (Kohle, Erdöl) und durch Bergbauaktivitäten an [36]. Die Konzentration von Arsen in Böden liegt im Bereich von 0,1 bis zu mehr als 1000 ppm, in atmosphärischen Staub bis zu max. 400 ppm, in Meerwasser durchschnittlich bei 2,6 ppb und in Süßwasser bei ungefähr 0,4 ppb [35]. Im Zusammenhang mit der Inhalation von gasförmigen Arsenwasserstoff und der permanenten Aufnahme arsenbelasteter Nahrungsmittel und Trinkwasser wurden vermehrt schwerwiegende Krankheitsbilder beobachtet. Eine chronische Arsenvergiftung kann aufgrund der karzinogenen Eigenschaften von Arsen zu verschiedenen Krebserkrankungen (Haut, Prostata, innere Organe) führen [37–42]. Die häufig in Regionen von Taiwan, Westbengalen und Bangladesch auftretende Erkrankung peripherer Gefäße (Black Foot Disease), die bis hin zu Gewebenekrosen führen kann, wird ebenfalls mit der Aufnahme arsenreicher Brunnen- und Trinkwässer in Verbindung gebracht [43–46]. Der von der WHO empfohlene Trinkwassergrenzwert liegt für Arsen bei 10 $\mu\text{g/l}$ und entspricht der festgelegten Konzentration in der deutschen Trinkwasserverordnung [19, 47]. In natürlichen Wässern kommt Arsen sowohl in organischen als auch anorganischen Verbindungen vor. Allerdings sind organische Arsenverbindungen aufgrund ihrer geringeren Toxizität ökologisch unbedenklicher. Anorganisches Arsen kann in den vier verschiedenen Oxidationsstufen $\text{As}(-\text{III})$, $\text{As}(0)$, $\text{As}(\text{III})$ und $\text{As}(\text{V})$ vorliegen, wobei es mit der Wertigkeit -3 und 0 nur sehr selten vorkommt. Ob Arsen als fünfwertiges Arsenat ($\text{As}(\text{V})$) oder dreiwertiges Arsenit ($\text{As}(\text{III})$) vorliegt, hängt hauptsächlich vom Redoxpotential und dem pH-Wert ab. In oxischen Gewässern und bei neutralem pH-Wert kommt hauptsächlich Arsenat als H_2AsO_4^- und HAsO_4^{2-} vor, wohingegen unter anoxischen Be-

dingungen das mobilere Arsenit als H_3AsO_3^0 und H_2AsO_3^- vorliegt [48–50]. Die oxidierte Variante des Arsens, Arsenat, adsorbiert meist sehr stark an die Oberfläche verschiedener, verbreiteter Minerale wie z.B. Ferrihydrit und ist dementsprechend weniger mobil als Arsenit [51–53].

1.4 Einfluss von Mikroorganismen auf das Verhalten von Metallen und Halbmetallen in der Umwelt

Im Gegensatz zu vielen organischen Kohlenstoffverbindungen können Metalle einschließlich Radionuklide wie Uran sowie Metalloide nicht abgebaut, aber in verschiedene Erscheinungsformen (Spezies) umgewandelt werden, die sich durch ihr Migrationsverhalten in der Umwelt unterscheiden können. Neben geochemischen Parametern können biotische Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Mobilität von Metallen und Metalloiden in der Natur haben. Mikroorganismen, die in entsprechend kontaminierten Umgebungen vorkommen, können mithilfe vielfältiger Zelloberflächenstrukturen und Stoffwechselreaktionen mit Metallen und Metalloiden interagieren. Auf diese Weise können sie sich zum einen vor der toxischen Wirkung schützen und zum anderen die anorganischen Stoffe mitunter für ihren Metabolismus nutzen. Beide Eigenschaften können Mikroorganismen besonders effektiv in Biofilmen, also Konsortien mehrerer Mikroorganismen, die auf Oberflächen existieren und von einer EPS-Matrix bestehend aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und anderen Biopolymeren wie Huminsäuren umgeben sind, realisieren. Daher kommen Mikroorganismen in der Natur bevorzugt in diesen Gemeinschaften vor [54, 55]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass planktonische Mikroorganismen nur 0,01 - 10% der gesamten Bacteria-Gemeinschaft in unberührten oder kontaminierten Grundwassersystemen abbilden [56–61].

1.5 Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Uran

Bei der Interaktion von Mikroorganismen mit Uran können im Wesentlichen fünf Prozesse unterschieden werden: Biosorption, Bioakkumulation, Biomineralisierung (auch als Biopräzipitation bzw. -kristallisation bekannt), Chelatisierung und Biotransformation (Abb. 1.2). Die Übergänge zwischen den verschiedenen Prozessen sind häufig fließend.

Der Begriff Biosorption beschreibt die passive Ablagerung von Metallen wie Uran an der

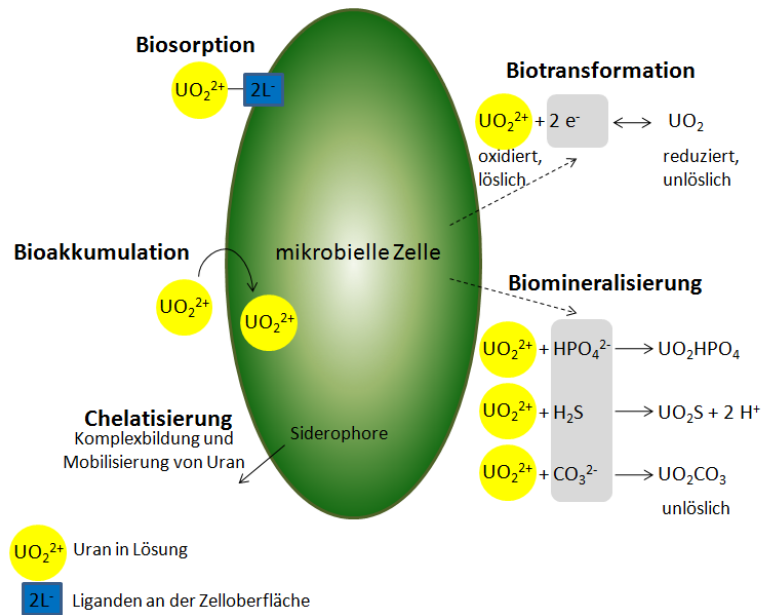


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der mikrobiellen Zelle mit Uran (modifiziert nach Lloyd and Macaskie [62])

Biomasse basierend auf der physikalischen Adsorption, dem Austausch von Ionen oder der chemischen Sorption positiv geladener Metallionen an negativ geladenen Liganden an der Zelloberfläche. Als Liganden fungieren funktionelle Gruppen wie deprotonierte Phosphat-, Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen der Zellwandpolymere (Peptidoglykan, Lipopolysaccharide etc.). Entscheidend für die Biosorption ist daher die Anzahl metallkomplexierender Liganden, die zwischen verschiedenen bakteriellen Arten variieren kann [24]. Zu den weiteren Einflussfaktoren gehört z.B. der pH-Wert. Da die mikrobielle Stoffwechselaktivität für die Biosorption keine Rolle spielt, sorbiert Uran auch an isolierten Zellwänden sowie an toter Biomasse. Eine Permeabilisierung der Mikroorganismen kann aufgrund der Zunahme verfügbarer Liganden sogar dazu führen, dass Uran in einem höheren Ausmaß an toten Zellen als an lebenden Zellen sorbiert. Die Biosorption verläuft unter Laborbedingungen sehr schnell (Minuten bis Stunden) [63, 64].

Die aktive Aufnahme von Metallen über Transporter in das Zellinnere führt zur Anreicherung der Metalle in der Zelle und wird als Bioakkumulation bezeichnet. Da Uran im Gegensatz zu essentiellen Metallen wie Eisen keine biologische Funktion erfüllt, wird angenommen, dass es in einem komplexen Gemisch verschiedener Metallionen oder als gebundener Bestandteil von Nährstoffen wie Phosphaten von Mikroorganismen zufällig aufgenommen werden kann [62, 65]. Grundsätzlich ist die Aufnahme von Uran in die bakterielle Zelle aber nach wie vor ungeklärt und ein möglicher Urantransporter konnte bislang

1 Einleitung

nicht identifiziert werden. In der Zelle bindet Uran an intrazelluläre Strukturen und bildet häufig Komplexe mit anorganischen Polyphosphaten. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Mechanismus zur Detoxifikation von Schwermetallen [66, 67].

Die Entstehung von Uranmineralen durch die Wechselwirkung von Uran mit biologischen Verbindungen bezeichnet man als Biomineralisierung. Meistens wird sie erst durch vorangegangene Sorptions- oder Reduktionsprozesse induziert und kann sowohl extrazellulär als auch intrazellulär (nach Aufnahme von Uran in die Zelle) stattfinden. Die hohe Konzentration uranbindender Liganden z.B. in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche begünstigt die schnelle Präzipitation gebildeter, unlöslicher Urankomplexe in einem räumlich eingegrenzten Bereich. Metabolisch aktive Mikroorganismen liefern zusätzlich Liganden wie z.B. Sulfide, Carbonate und Phosphate [62, 66, 68]. Die Präzipitation von U(VI) mit anorganischen Phosphaten zählt zu den am besten untersuchten Biomineralisierungen. Dieser Prozess wurde für bakterielle Isolate mit unterschiedlichem geographischen Ursprung und unabhängig von ihrer Zellwandstruktur (Gram+, Gram-) unter sauren und neutralen Bedingungen beobachtet [66, 69–72]. Die Aktivität von Phosphatasen führt hierbei zur Freisetzung von Orthophosphat (PO_4^{3-}) aus organischen Phosphatverbindungen [73–77].

Zur Chelatisierung, d.h. Komplexbildung von Metallionen, können die von Mikroorganismen gebildeten Siderophore beitragen. Diese organischen, niedrigmolekularen Verbindungen werden insbesondere bei Eisenmangel produziert, um durch die Bindung mittels funktioneller Gruppen (Catecholat, Hydroxamat) die Löslichkeit von Eisen und folglich dessen Mobilität und biologische Verfügbarkeit zu erhöhen [78]. Da Siderophore üblicherweise keine hohe Spezifität aufweisen, bilden sie mitunter auch Komplexe mit Uran und können wie für Pyoverdin und Desferrioxamin-B gezeigt, zu einer erhöhten Mobilität von Uran beitragen [79–81].

Unter Biotransformation versteht man üblicherweise alle chemischen Umwandlungen bzw. Modifikationen einer Verbindung, die durch die Aktivität von Mikroorganismen verursacht werden. In Bezug auf Uran und andere Metalle werden hauptsächlich mikrobielle Redoxprozesse unter diesem Begriff zusammengefasst. Unter aeroben Bedingungen sind vor allem acidophile Fe(II)- und S^0 -oxidierende Mikroorganismen in der Lage, die Oxidation von U(IV) zu U(VI) zu vermitteln [82]. Zu den bekanntesten Vertretern gehört *Thiobacillus ferrooxidans*, der bei geringen pH-Werten die aerobe Fe(II)-Oxidation zum Wachstum nutzt. Durch Bildung von Fe(III), einem effektiven Oxidationsmittel für U(IV), trägt das Bacterium indirekt zur U(IV)-Oxidation und Mobilisierung von Uran bei [83]. Unter anae-

1 Einleitung

roben und pH-neutralen Bedingungen können einige Bacteria anstelle von Sauerstoff Nitrat als Elektronenakzeptor für die Oxidation von U(IV) nutzen [84, 85]. Für *Geothrix fermentans* konnte im Gegensatz zu den anderen untersuchten Bacteria die direkte Oxidation von U(IV) mit Nitrat in Abwesenheit von Fe(II) nachgewiesen werden [86]. Andere Mikroorganismen sind wiederum in der Lage, die Reduktion von mobilerem U(VI) zu weniger mobilem U(IV) in Verbindung mit der Oxidation organischer Kohlenstoffverbindungen oder molekularen Wasserstoff zu katalysieren. Lovley *et al.* konnten 1991 erstmals anhand von kinetischen Wachstumsuntersuchungen mit Reinkulturen zeigen, dass die Fe(III)-reduzierenden Bacteria *Geobacter metallireducens* Stamm GS-15 und *Shewanella putrefaciens* durch den Transport von Elektronen auf U(VI) genügend Energie zum Wachstum gewinnen können [87]. Verschiedene anaerobe Mikroorganismen, die ebenfalls U(VI) reduzieren können, sind Vertreter mesophiler Sulfatreduzierer (*Desulfovibrio* spp.) [88, 89], Myxobacteria [90], fermentierender (*Clostridium* spp.), säuretoleranter und thermophiler Bacteria [91–93] sowie hyperthermophiler Archaea [94]. Die wenigsten sind allerdings in der Lage, allein mit U(VI) als (terminalen) Elektronenakzeptor zu wachsen. Bei der mikrobiellen Uranreduktion wird höchstwahrscheinlich nur ein Elektron auf U(VI) transferiert. Der resultierende U(V)-Komplex ist instabil und wird durch Disproportionierung in U(VI) und U(IV) umgewandelt [95]. Das reduzierte Uran (U(IV)) präzipitiert häufig als U(IV)-Oxid in Form von Uraninit (UO_2). Aber es wurden auch U(IV)-Phosphatminerale wie Ningyot [CaU(PO₄)₂ × H₂O] in Uranreduktionsexperimenten mit *Thermoterrabacterium ferrireducens* festgestellt [96]. In transmissionselektronenmikroskopischen (TEM)-Analysen wurden die gebildeten Präzipitate sowohl im Periplasma als auch außerhalb der Zellen an der Oberfläche detektiert [88, 97–101]. Aufgrund der Unlöslichkeit der U(IV)-Minerale wurden mögliche Uranreduktasen in ihrer unmittelbaren Nähe vermutet [102]. Biochemische Enzymaktivitätstests und genetische Mutationsanalysen lieferten wichtige Hinweise auf eine Beteiligung von c-Typ Cytochromen für den Transport von Elektronen auf U(VI) [103–108]. Außerdem besitzen einige Metallreduzierer wie *Geobacter sulfurreducens* elektrisch leitende Pili, die vermutlich eine Rolle bei der Uranreduktion spielen und durch die Präzipitation im extrazellulären Raum die Zellen vor toxischen Effekten schützen [109–111].

Während mikrobielle Prozesse, die die Mobilisierung von Uran begünstigen bzw. beschleunigen (z.B. Biooxidation), für die industrielle Gewinnung von Uran interessant sind (Bioleaching) [112–119], stehen Reaktionen zur Immobilisierung von Uran mit Hilfe von Mikroorganismen im Fokus biologischer Sanierungen bzw. Dekontaminationen uranbelas-

1 Einleitung

teter Böden und Wässer [120–122]. Als kostengünstig und umweltfreundlich gilt bislang die *in situ* Immobilisierung, da es sich um eine nicht-invasive Methode handelt. Insbesondere die mikrobielle Reduktion gekoppelt mit der Präzipitation von Uran ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und scheint ein vielversprechender Sanierungsansatz. Die Aktivität indigener Mikroorganismen und gewünschte anaerobe Prozesse werden bei diesem Ansatz durch Zugabe geeigneter Elektronendonoren stimuliert (Enhanced Natural Attenuation), um Uran aus der löslichen Phase zu entfernen [87]. Molekularbiologische Analysen konnten zeigen, dass Mitglieder der Geobacteraceae-Familie in einer Vielzahl anaerober Grundwassersedimente vorkommen und dominante Vertreter der Fe(III)-reduzierenden Gemeinschaft in unterirdischen Umgebungen sind [123]. Viele Studien zu Simulationsexperimenten im Labormaßstab und Felduntersuchungen bestätigen zudem, dass Geobacteraceae und sulfatreduzierende Mikroorganismen stimuliert werden können, um Uran effektiv zu immobilisieren [124–133].

1.6 Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Arsen

Zu den bekannten Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit Arsen gehören die Aufnahme von Arsen in die Zelle sowie die Biotransformation und Biomethylierung.

Für den Transport von Arsen in die Zelle wird zwischen As(V) und As(III) unterschieden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des fünfwertigen Oxyanions (As(V)) mit Phosphat kann es über Phosphattransportsysteme in Mikroorganismen aufgenommen werden. In der Zelle kann As(V) phosphatbasierte Prozesse zur Energiegewinnung beeinträchtigen, z.B. die oxidative Phosphorylierung inhibieren [134, 135]. As(III) wird bei neutralem pH-Wert als ungeladenes As(OH)₃ über bakterielle Aquaglyceroporine ins Zellinnere transportiert [136, 137]. Dort kann es eine Vielzahl von Prozessen negativ beeinflussen, indem es an die Thiolgruppen wichtiger Proteine wie der Pyruvatdehydrogenase oder α -Ketoglutarat-Dehydrogenase bindet [138]. Um ihr Überleben in arsenkontaminierten Habitaten zu sichern, haben Mikroorganismen verschiedene Systeme zur Resistenz sowie teilweise zur Energiegewinnung mit Arsen entwickelt.

Die Biomethylierung ist bei Mikroorganismen ein weit verbreiteter Mechanismus zur Detoxifikation von Metallen (z.B. Quecksilber) bzw. Halbmetallen (z.B. Selen). Eine oder mehrere Methylgruppen können auf anorganisches As(III) oder As(V) übertragen werden [139, 140]. Vertreter von Bacteria und Archaea (z.B. Methanogene) bilden flüchtige, me-

1 Einleitung

thylierte Arsine oder oxidieren As(III) zunächst zu As(V) [141, 142]. Während die methylierten As(V)-Verbindungen *in vivo* weniger toxisch als anorganisches As(III) und As(V) sind, trifft das Gegenteil auf methylierte As(III)-Verbindungen zu [143]. Der Transfer von Methylgruppen auf As(III) wird durch die As(III) S-Adenosyltransferase (ArsM) katalysiert. Über die Bildung der Zwischenprodukte (MMA(III) und DMA(III)), die nicht in den Zellen akkumulieren, entsteht als Endprodukt leicht flüchtiges Trimethylarsin (TMA(III)). Folglich nimmt die Konzentration von Arsen im Zytosol als auch im Medium ab [144]. In natürlichen Aquiferen wurden deutlich geringere Konzentrationen für methylierte Arsenverbindungen im Vergleich zu anorganischem As(III) und As(V) ermittelt [145]. Die Biomethylierung von Arsen ist in diesem aquatischen System bislang kaum untersucht.

Für die Biotransformation von Arsen, also As(III)-Oxidation und As(V)-Reduktion, sind drei Hauptenzymssysteme bei Mikroorganismen beschrieben (Abb. 1.3).

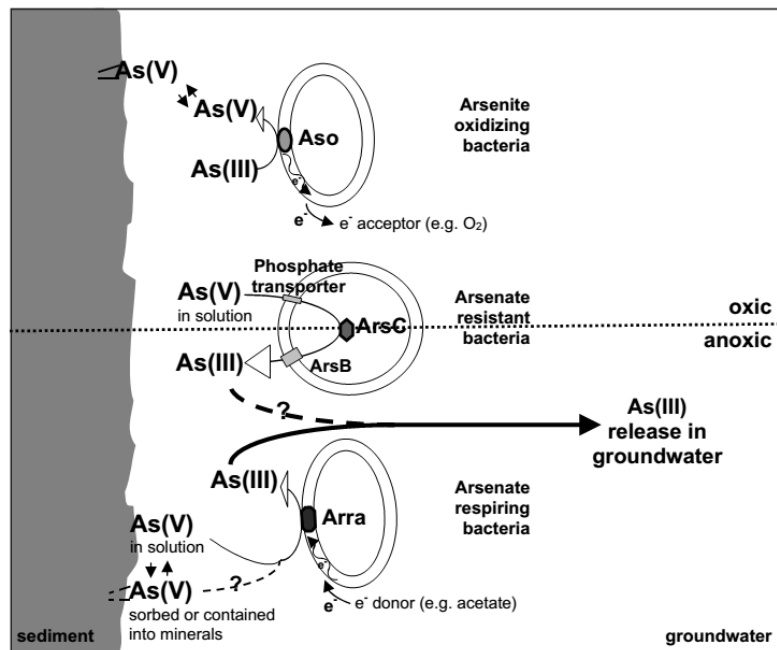


Abbildung 1.3: Mikrobielle Transformationen von Arsen im Grundwasser [146]

Die Oxidation von As(III) wurde bei mehr als 30 Stämmen von mind. neun Gattungen festgestellt, darunter befinden sich Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria, Deinocci sowie Crenarchaeota [138]. Heterotrophe Mikroorganismen wie *A. faecalis* oxidieren As(III) im Periplasma mit Hilfe der Arsenitoxidase mit Azurin und/oder Cytochrom c als Elektronenakzeptor zur Detoxifikation [147]. Dagegen können chemolithoautotrophe Arsenitoxidierer durch die katalysierte Oxidation von As(III) Energie für ihr Wachstum gewinnen [138]. Das ArsC-System ist der am besten untersuchte Resistenz- bzw. Detoxifikations-

1 Einleitung

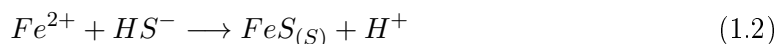
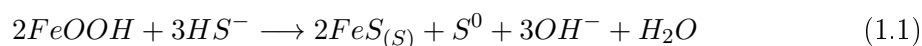
mechanismus und bei Mikroorganismen sehr weit verbreitet [35, 136]. Es wurde bei *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, strikten Anaerobiern (z.B. *Clostridium*, *Desulfovibrio*) sowie bei verschiedenen aeroben Isolaten aus arsenkontaminierten Böden und Bergbauhalden festgestellt [148–150]. Die für das ArsC-System kodierende Gene sind häufig auf Plasmiden kodiert. ArsC ist ein monomeres Protein im Zytoplasma und katalysiert die Reduktion von As(V) mit Glutaredoxin und Glutathion oder Thioredoxin als Elektronendonator [151–153]. Das gebildete As(III) wird über den As(III)-spezifischen Transporter ArsB wieder ausgeschleust [154]. Im Gegensatz zu den arsenatresistenten können dissimilatorische As(V)-reduzierende Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen As(V) als Elektronenakzeptor zum Wachstum nutzen. Die meisten können eine Vielzahl organischer Kohlenstoffverbindungen (Laktat, Acetat, Format, Aromaten) und/oder anorganische Stoffe (z.B. H₂, Sulfid) als Elektronendonator verwenden [146, 155, 156]. Die Fähigkeit der As(V)-Atmung wurde bei mind. 16 Reinkulturen festgestellt, darunter sind phylogenetisch diverse Vertreter der Gamma-, Delta-, Epsilonproteobacteria (*Sulfurospirillum arsenophilum*, *S. barnesii*), niedrig-GC Gram+ Bacteria, thermophile Eubacteria und Crenarchaeota [138]. Die respiratorische Arsenatreduktase Arr besteht aus zwei Untereinheiten (ArrA und ArrB) und ist im Periplasma lokalisiert [157–159]. Einige Mikroorganismen wie z.B. *Shewanella* sp. Stamm ANA-3 besitzen sowohl ArsC als auch Arr [160].

Da dissimilatorische As(V)-Reduzierer im Gegensatz zu As(V)-resistenten Mikroorganismen neben gelösten As(V) auch gebundenes As(V) zu giftigeren As(III) reduzieren können, spielen sie möglicherweise bei der Freisetzung von Arsen aus Mineralen in anoxischen Grundwassersystemen eine Rolle. Die meisten dissimilatorischen As(V)-Reduzierer nutzen As(V) aber nur fakultativ und besitzen eine hohe metabolische Vielfalt [138, 161–163]. Als dissimilatorische Metallreduzierer werden Mikroorganismen bezeichnet, die weitere Metalle wie z.B. Fe(III) als Elektronenakzeptor nutzen. Sie setzen bei Kontakt mit häufig vorkommenden As-Fe-Mineralen sowohl As(III) als auch Fe(II) frei. In Studien, bei denen das Fe(III)reduzierende Bacterium *Shewanella alga* mit Skorodit bzw. Sedimentproben inkubiert wurde, konnte die Freisetzung von Fe(II) und As(V) festgestellt werden. Die Autoren vermuten, dass das reduktive Lösen von Eisen als Mechanismus dominiert und die Freisetzung von Arsen in Form von As(V) verstärkt [164]. Bei Felduntersuchungen zum mikrobiellen Einfluss auf die Freisetzung von Arsen aus Grundwassersedimenten der Bengalischen Deltaebene wurde durch die Zugabe von Acetat die Mobilisierung von As(III) und Fe(II) stimuliert. Die Analyse des 16S rRNA-Gens wies auf die Dominanz von Delta-

1 Einleitung

proteobacteria der Geobacteraceae in der acetatstimulierten Gemeinschaft hin. Daher wird vermutet, dass Vertreter der Geobacteraceae durch ihre Aktivität direkt oder indirekt zur Mobilisierung von Arsen in anaeroben Sedimenten beitragen [165, 166].

Während die mikrobielle Reduktion von Fe(III) und/oder As(V) im anaeroben Milieu häufig mit einer erhöhten Mobilität von Arsen einhergeht, können sulfatreduzierende Bedingungen zur Immobilisierung beitragen. Das bei der Sulfatreduktion gebildete Hydrogensulfid kann durch die Auflösung von Fe(III)-Mineralen (Gl. 1.1) und Sulfidisierung mit Fe(II) (Gl. 1.2) in Form von Eisenmonosulfid präzipitieren [167].



Gelöstes Arsen kann mit Eisensulfiden (z.B. Pyrit und Mackinawit) gefällt werden oder adsorbiert an diese. In Grundwassersedimenten wurde Arsen unter reduzierenden Bedingungen als Substituent von feinkörnigen, biogenen Pyrit oder als Arsenopyrit FeAsS gefunden [168–170]. Es kann aber auch freies Sulfid (S^{2-}) binden und schwerlösliche Arsensulfide wie $AsS_{(S)}$ und Orpiment ($As_2S_3_{(S)}$) als auch Thioarsenverbindungen bilden [171–175]. Verschiedene Labor- und Feldstudien konnten zeigen, dass Arsen aus der wässrigen Phase unter sulfatreduzierenden Bedingungen entfernt werden kann, indem die Aktivität von sulfatreduzierenden Mikroorganismen durch geeignete Elektronendonoren und/oder -akzeptoren stimuliert wird [176–180]. Die mikrobielle Sulfatreduktion wird daher als potentieller Ansatz zur biologischen Sanierung arsenkontaminierter Grundwässer in Erwägung gezogen.

1.7 Zielstellung

Mikroorganismen besitzen ein enormes Spektrum an Stoffwechselleistungen und spielen daher eine große Rolle in zahlreichen Umweltprozessen. Da sie auf verschiedene Weise auch mit toxischen Stoffen wie Uran und Arsen direkt oder indirekt wechselwirken, können sie den Transport und die Ausbreitung dieser Elemente in der Natur beeinflussen. Die Fähigkeit von Mikroorganismen, toxische Elemente zurückzuhalten und aus der wässrigen Phase zu entfernen, ist hinsichtlich der Reinigung kontaminierter Gewässer interessant. Die Nutzung mikrobieller *in situ* Prozesse ist ein alternativer Ansatz für die Sanierung von

1 Einleitung

Flutungswässern im Vergleich zur kostenintensiven, konventionellen Wasserbehandlung. Ein umfangreiches Wissen über die vor Ort lebenden Mikroorganismen und mikrobiellen Prozesse ist nötig, um erstens das Migrationsverhalten toxischer Metalle und Halbmetalle im unterirdischen Grubensystem besser zu verstehen, welches für die Erstellung präziser Prognosen zur Wasserqualität wichtig ist, und um zweitens das mikrobiologische Potential für alternative Sanierungsstrategien abzuschätzen.

Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel der Arbeit darin, die mikrobiellen Gemeinschaften aus drei ehemaligen Uranerzbergwerken in Sachsen, die unterschiedliche Sanierungsstadien repräsentieren, erstmals hinsichtlich ihrer Diversität, Identität und Zusammensetzung zu charakterisieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass neben dominanten Mikroorganismen in planktonischen Gemeinschaften sessile Mikroorganismen in den Urangruben existieren, die metabolisch aktiv sind. Da zu Beginn der Arbeit über die als Biofilme bekannten Lebensgemeinschaften noch nichts in gefluteten, neutralen Urangruben bekannt war, war ein wesentliches Ziel, diese Gemeinschaften und deren mögliche Bedeutung hinsichtlich der Grubensanierung zu untersuchen. Dazu sollte zunächst ein Aufwuchsträgersystem etabliert werden, welches die Gewinnung von *in situ* Biofilmen aus den gefluteten, unterirdischen Uranerzbergwerken ermöglicht. Das Vorkommen und die Identität stoffwechselaktiver Mikroorganismen sollte mittels 16S rRNA-Analyse im Vergleich zu den entsprechenden DNA-basierten Daten verifiziert werden. Um das mikrobielle Stoffwechselpotential der planktonischen Gemeinschaften in den Urangruben einzuschätzen, sollte eine Anreicherung von Mikroorganismen für ausgewählte Stoffwechselgruppen mit Bestimmung der Lebendkeimzahl durchgeführt werden. Da mikrobielle Energiestoffwechselprozesse eine wichtige Rolle für biogeochemische Stoffkreisläufe spielen, sollten diese auf Ebene der Proteine ermittelt und den entsprechenden Mikroorganismen möglichst zugeordnet werden. Schließlich sollten erste Untersuchungen zum mikrobiellen Einfluss auf die Mobilität von Uran und Arsen in umweltrelevanten Konzentrationen mittels Labormikrokosmen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiete

Im Rahmen der Arbeit wurden Wasser- und Biofilmp Proben aus drei verschiedenen Bergbaugebieten in Sachsen (Abb. 2.1), in denen Uranerz vormals unterirdisch abgebaut wurde, untersucht. Die Charakteristik der Urangruben ist in Tab. 2.1 zusammengefasst.

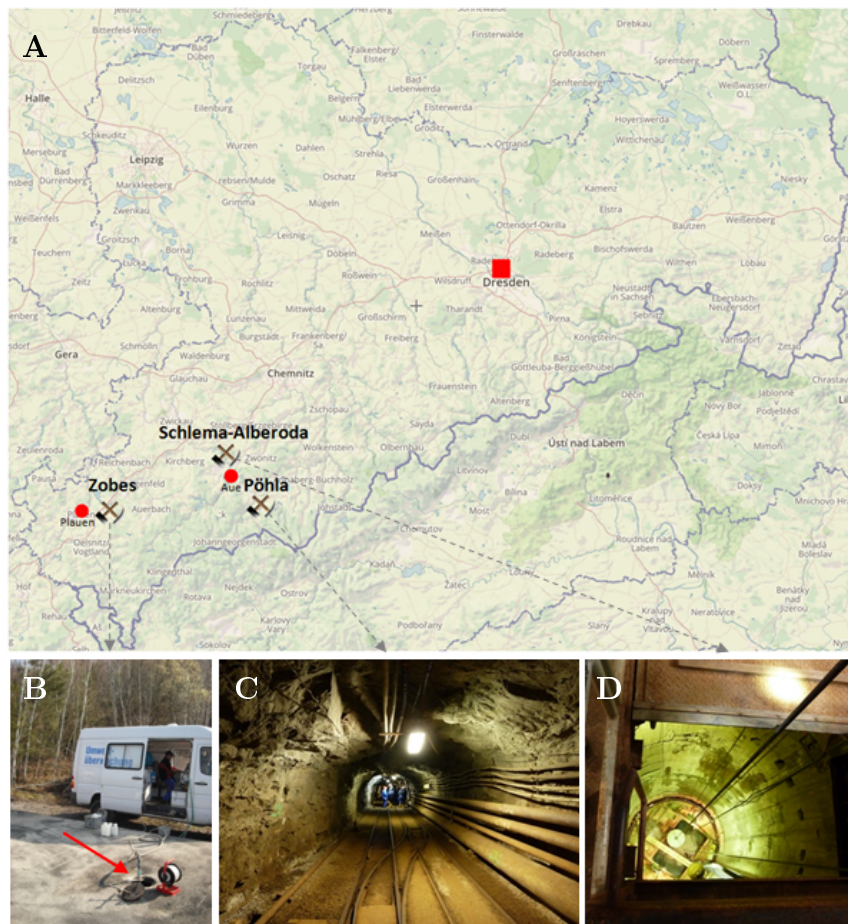


Abbildung 2.1: Untersuchungsgebiete - drei ehemalige Uranerzbergwerke in Sachsen

- A) geographische Lage in Sachsen (www.scribblemaps.com),
- B) Zobes (Schacht 277) - Altstandort,
- C) Pöhl (Hauptstollen) - intermediäres Sanierungsstadium,
- D) Schlema (Schacht 371) - frühes Sanierungsstadium

2 Material und Methoden

Das Untersuchungsgebiet Zobes und die gleichnamige Teillagerstätte liegt im Südwesten des Freistaates Sachsen, ca. 10 km östlich von Plauen und gehört zur Gemeinde Neuensalz des Vogtlandkreises. Das Zobeser Grubenfeld erstreckt sich über 6,0 km² mit sechs ehemaligen Förderschächten. Insgesamt wurden 5.031 t Uran durch die SAG/SDAG Wismut abgebaut. Das während der Bergbauarbeiten abgepumpte Flutungswasser wurde über den Rabenbach in die Trieb und ab 1960 zum Teil auch über den Forellenbach (Haarbach) in die Trieb geleitet. Um Kontaminationen der Talsperre Pöhl zu vermeiden, wurde ab 1963 die Ableitung des Wassers über eine Rohrleitung in den Friesenbach direkt in die Weiße Elster realisiert. Mit der Einstellung der Bergbauaktivitäten Anfang der 60er Jahre gingen die Hinterlassenschaften an den privaten Eigentümer (VEB Wirkmaschinenbau Karl-Marx-Stadt) zurück. Daher fällt die Sanierung nicht in den Verantwortungsbereich der Wismut GmbH. Diese Hinterlassenschaften werden als Altstandorte bezeichnet.

Schlema-Alberoda (kurz: Schlema) und Pöhla sind Grubenfelder im Westerzgebirge und befinden sich ca. 10 - 20 km nordwestlich bzw. südöstlich der Stadt Aue. Sie zählten neben Dresden-Gittersee und Königstein zu den wichtigsten Förderrevieren in Sachsen. Das Grubenfeld Pöhla, welches zum Schwarzenberger Bergbaurevier gehört, umfasst die drei Teillagerstätten Pöhla-Globenstein, Hämmerlein und Tellerhäuser und befindet sich in unmittelbarer Nähe der tschechischen Grenze. Die Bergbauaktivitäten gehen bis in das Ende des 15. Jh. zurück. Dabei wurde die Komplexlagerstätte vor allem zur Gewinnung von Eisenerzen sowie teilweise von Zinn, Silber, Blei, Kupfer und Zink genutzt. 1967 wurde ein Stollen ("Stolln Pöhla") in südöstlicher Richtung vom Niveau 575,4 m NN parallel zur tschechischen Grenze bis unter die Gemeinde Tellerhäuser am Fuße des Fichtelberges aufgeföhren. Der Stollen erreichte 1970 eine Gesamtlänge von 7845,8 m und stellt nach ca. 3 km Entfernung vom Stollenmundloch eine Verbindung zum Bereich Hämmerlein her. Von dem 30 km² großen Grubenfeld wurden nur 6 km² für den Uranerzbergbau genutzt. Insgesamt wurden ca. 1200 t Uran durch die SDAG Wismut gewonnen. Von 1992 bis 1995 wurde die Grube Pöhla bis zum Stollenniveau (ca. 600 m NN) geflutet. Das anfallende Flutungswasser erreicht im Bereich Hämmerlein im Hauptstollen das Überlaufniveau und gelangt über eine Rohrleitung zur konventionellen Wasserbehandlungsanlage (WBA) Pöhla. Nach der Reinigung wird es in den Vorfluter Schildbach/Luchsbach geleitet. Nachdem die Urankonzentration im Flutungswasser durch Selbstreinigungsprozesse in der Grube auf einen tolerierbaren Wert zurückging, wurde 2004 eine passiv-biologische Pilotanlage (Constructed Wetland) vor die konventionelle WBA geschaltet und getestet. Durch die selbst-

2 Material und Methoden

ständige Belüftung der Anlage sollte die Abtrennung von Arsen über durch die Fällung von Eisenhydroxid und die Entfernung von Radium mit Hilfe von Armleuchteralgen realisiert werden. Die anschließende Filterstrecke sollte eine adsorptive Trennung des verbliebenen Radiums und Arsens gewährleisten [13, 181]. Da die erwartete Abtrennleistung allerdings ausblieb, erfolgt die Reinigung der Flutungswässer nach wie vor über die konventionelle Anlage. Pöhla ist von allen aktuellen Wismut-Standorten bislang am weitesten saniert. Schlema ist Teil der Lagerstätte Schneeberg-Schlema-Alberoda, eine der weltweit größten hydrothermalen Uranerzlagerstätten. Bereits seit Mitte des 15. Jh. wurden in diesem Erzfeld schon Zinn, Eisen, Silber, Wismut, Kupfer, Kobalt und Nickel gewonnen. Im Zuge der gezielten Uranerzförderung wurde das Grubenfeld Schlema auf eine Fläche von ca. 32 km² ausgedehnt. Mit Schachttiefen von bis zu ca. 1800 m war Schlema das tiefste Bergwerk Deutschlands. Ab den 70er Jahren war Schacht 371 der Hauptförderschacht in dem Grubenfeld. Bis 1990 wurden insgesamt ca. 80.000 t Uran produziert. Nach Beendigung der Bergbauaktivitäten 1991 wurde durch Abschalten der Pumpen mit der Flutung der Grube begonnen. Das überlaufende, kontaminierte Flutungswasser gelangt über ein Gesenk unterhalb des Niveaus des Vorfluters in die WBA Schlema-Alberoda und anschließend in den Vorfluter Zwickauer Mulde. Die Flutung der Grube kann mit Hilfe von Tauchpumpen und Pufferspeichern gesteuert werden. Sie gilt als endgültig, wenn das Pegelniveau der Markus-Semmler-Sohle erreicht wird und das Wasser somit über den Schlemabach in die Zwickauer Mulde gelangt. Aufgrund der bislang nötigen Behandlung des Flutungswassers wird der Pegel ca. 20 - 30 m darunter gehalten [4, 182].

Tabelle 2.1: Wichtigste Grubencharakteristika der Untersuchungsgebiete (modifiziert nach Jenk *et al.* [183]), mit Unterstützung von Herrn Dr. Meyer

Grube	Zobes	Pöhla	Schlema-Alberoda
Betriebsdauer	1949 - 1963	1967 - 1990	1946 - 1990
Lagerstättentyp	Ganglagerstätte, Kristallines Gestein	Ganglagerstätte, Kristallines Gestein	Ganglagerstätte, Kristallines Gestein
Abbauverfahren	Firstenstoßbau mit Versatz, ca. $1 \cdot 10^6$ m^3 Versatz	Firstenstoßbau mit Versatz, Kammer- und Pfeilerbau, ca. $0,1 \cdot 10^6$ m^3 Versatz	Firstenstoßbau mit Versatz, ca. $1 \cdot 10^7$ m^3 Versatz
Grubenhohlräume	ca. $4 \cdot 10^6$ m^3	ca. $1,5 \cdot 10^6$ m^3	ca. $36,5 \cdot 10^6$ m^3
Max. Tiefe	ca. 900 m u. Gel. ¹ , ca. 850 m unter Wasserüberlauf	ca. 800 m u. Gel. ¹ , ca. 500 m unter Wasserüberlauf	ca. 2000 m u. Gel. ¹ , ca. 1800 m unter Wasserüberlauf
Grubengeometrie	6 Tagesschächte ca. 750 km Grubenauf- fahrungen, teils bebautes geomechanisch stabiles Deckgebirge	Hauptstollen, 2 Blindschächte, unbebautes geomechanisch stabiles Deckgebirge	80 Tages- und Blindschächte, 62 Sohlen, 4200 km horizontale Grubenbaue, bebautes geomechanisch zu sicherndes Deckgebirge
Nicht flutbare Hohlräume	ca. $0,1 \cdot 10^6$ m^3	ca. $0,5 \cdot 10^6$ m^3	ca. $2 \cdot 10^6$ m^3
Flutungsstatus 2007	ca. $3,9 \cdot 10^6$ m^3	ca. $1,5 \cdot 10^6$ m^3	ca. $35 \cdot 10^6$ m^3
Sanierungs- maßnahme	Verfüllung, teils Verplombung Tagesschächte	Hermetisierung Grubenteil Tellerhäuser; Sicherung Grubenteil Hämmerlein und Hauptstollen (Nachnutzung Besucherbergwerk)	Umfassende Bergmännische Verwahrungen
Flutung	1965/1966, unkontrolliert	1992 - 1995, kontrolliert	1991 - 2004, kontrolliert
Strategie	Keine; Wasserüberlauf über Schacht 277	Unkontrollierter Anstieg bis zur Hauptstollensohle; Wasserabfluss über Hauptstollen	Unkontrollierter Anstieg bis zur -30-m-Sohle
WBA	Keine	Konventionell, ab 2004 passiv-biologisch; ab 2014 wieder konventionell	Konventionell, Langzeitbehandlung
Schadstoffe	Ra-226; (As)	Ra-226; As; Fe	U; Ra-226; As; Fe; Mn (nicht mehr)

¹ u. Gel. = unter Gelände

2.2 Probenahme

Im Zeitraum von August 2012 bis Juli 2013 wurden in den drei Untersuchungsgebieten Flutungswasser- und Biofilmproben entnommen. Zur Anreicherung und Gewinnung von *in situ* Biofilmen wurden zwei Aufwuchsträgersysteme (Abb. 2.2) verwendet und vor Ort installiert. Die Durchflusszelle besteht aus Plexiglas und enthielt max. 24 Objektträger. Zwei Schnellverschlüsse ermöglichen die einfache Installation und Deinstallation ohne den Verlust des Flutungswassers. Vor der Exposition im Feld wurde die Durchflusszelle mit 70%igem Isopropanol für mind. 2 h desinfiziert und anschließend mit sterilem MilliQ Wasser gespült. Das BACTRAP-System basiert auf dem Prinzip der *in situ* Mikrokosmen-Technologie von Peacock *et al.* [184] und wurde von Frau Dr. Petra Bombach (UFZ Leipzig, Abteilung für Isotopenbiogeochemie) vorbereitet und zur Verfügung gestellt. Ein BACTRAP besteht aus einem perforierten Teflonschlauch (Länge: 5 cm, Durchmesser: 1 cm, Perforation: 2 mm), welcher 1 g Bio-Sep[®] Beads [185] enthält. Die Bio-Sep[®] Beads bestehen aus pulverisierter Aktivkohle in einer aufgeschäumten Aramidpolymermatrix und werden im weiteren Verlauf auch als Aktivkohlepellets bezeichnet. Zur Entfernung organischer Rückstände wurden die Aktivkohlepellets für mind. 4 h bei 300°C ausgeheizt. Zur Sterilisation und Rehydrierung der Aktivkohlepellets wurden die BACTRAPs anschließend bei 121°C autoklaviert und in sterilen, anoxischen Wasser bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Beide Systeme wurden, wenn nicht anders beschrieben, für drei Monate im Feld ggf. lichtgeschützt exponiert. Die Durchflusszelle wurde bei 4°C transportiert, das Flutungswasser steril entfernt, die an den Objektträgern adhärennten Zellen bzw. Partikel mit einem sterilem Zellschaber ablöst und die DNA mit dem PowerSoil[™] DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben extrahiert. BACTRAPs wurden nach Entnahme sofort auf Trockeneis gelagert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung der auf BACTRAPs adhärennten Biofilme für Labormikrokosmenversuche (Kap. 2.9) wurden die BACTRAPs in sterile Gefäße, die zuvor vollständig mit Flutungswasser befüllt wurden, transferiert, ins Labor transportiert und dort sofort für die Versuche präpariert.

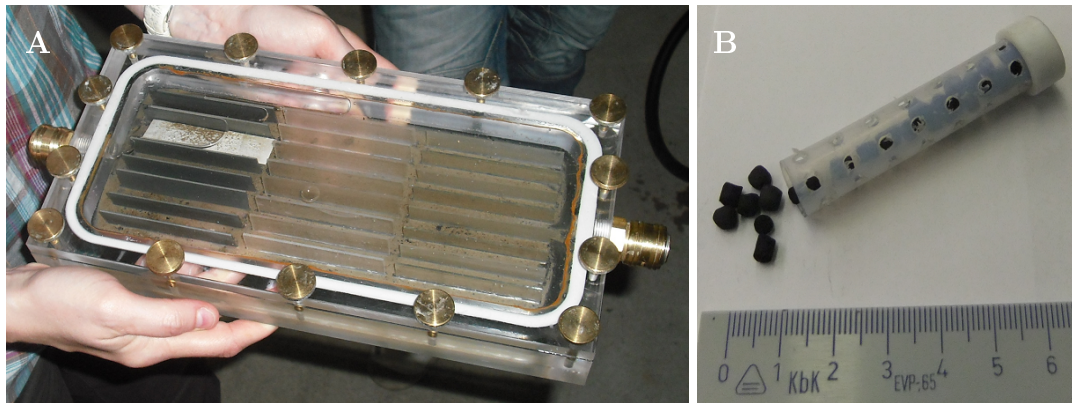


Abbildung 2.2: Aufwuchsträgersysteme für Biofilme

- A) Durchflusszelle mit Objektträgern nach 3-monatiger Exposition im Feld,
- B) Aktivkohle-basiertes BACTRAP-System

Die Probenahme für Zobes fand am Schacht 277 (Teufe: 367,5 m unterhalb der Messoberkante) statt. In Kooperation mit Mitarbeitern der Wismut GmbH bzw. der BfUL wurde das Wasser mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe aus einer Tiefe von ca. 20 m an die Oberfläche gepumpt. Die Wasserproben wurden erst bei konstant bleibenden pH- und Eh-Werten (mind. 3-faches Volumen des Rohrs verworfen) in sterilen Gefäßen gesammelt. Für die Ansiedlung von Biofilmen wurden die BACTRAPs für drei Monate bei einer Tiefe von ca. 20 m installiert. Das entsprach einem Wasserüberstand von ca. 17 m. Die Durchflusszelle konnte an diesem Messpunkt nicht installiert werden.

Mit Unterstützung der Wismut GmbH und des Vereins "Besucherbergwerk Pöhla" e.V. wurden Proben im Hauptstollen der Grube Pöhla, ca. 3 km vom Mundloch auf Höhe des natürlichen Überlaufs entnommen. Das Flutungswasser wurde am Messpunkt m-F413 nach 1-minütigem Ablauf gesammelt. Die Durchflusszelle wurde in unmittelbarer Nähe von m-F413 an der Rohrleitung, die das Flutungswasser zur WBA leitet, installiert. Die BACTRAPs wurden in dieser Rohrleitung über einen Überlaufstutzen eingehängt.

Für die Untersuchungen der Grube Schlema wurden die Wasserproben an der WBA Schlema-Alberoda am Messpunkt m-F510, dem Wasserzulauf, nach 1-minütigem Ablauf entnommen. Im Verteilerwerk der WBA wurde die Durchflusszelle so positioniert, dass nur das kontaminierte Flutungswasser die Zelle passiert. Die BACTRAPs wurden im Schacht 371 (m-F334, Teufe: 1090 m unterhalb der Messoberkante) mit Hilfe einer Stahlwinde der Wismut GmbH in einer Tiefe von 75 m (entspricht ca. 20 m in der Wassersäule) eingebracht.

Die Menge, Behandlung und Art der Lagerung der Flutungswasserproben war abhängig von den geplanten Analysen. Für nukleinsäure- und proteinbasierte Analysen wurden je-

weils 10 l Flutungswasser entnommen. Für die Extraktion von Gesamt-DNA wurden die Proben in sterilen 5l-Gefäßen bei 4°C ins Labor transportiert und die Biomasse innerhalb von 4 h durch vorsichtige Vakuumfiltration auf Celluloseacetat-Filtermembranen (Porengröße: 0,2 µm, Durchmesser: 47 mm, Sartorius, Göttingen) konzentriert. Grundsätzlich wurde für 1 l der Probe ein Filter verwendet. Für die zeitgleiche Gewinnung von Proben für die DNA- und RNA-Analyse wurde das Flutungswasser noch vor Ort auf gleiche Weise filtriert, sofort auf Trockeneis gelagert und ins Labor transportiert. Für die Proteinanalyse wurde genauso verfahren, allerdings wurden hierbei PES-Filter (Durchmesser 47 mm, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) verwendet. Da der Eintrag von Luftsauerstoff in die Proben, die für Kultivierungen (CFU, MPN) oder Labormikrokosmenversuche genutzt wurden, so gering wie möglich gehalten werden sollte, wurden diese vor Ort zügig in sterile Injektionsflaschen bis zum Rand gefüllt und mit einem Butylstopfen und einer Aluminiumkappe gasdicht verschlossen, bei Raumtemperatur ins Labor transportiert und sofort mit den Arbeiten begonnen. Für die chemischen Analysen wurden 100 ml der Wasserprobe in eine saubere Glasflasche abgefüllt, dunkel bei Raumtemperatur transportiert und im Labor für die Analysen vorbereitet.

2.3 Chemikalien und Gase

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bzw. Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Gase stammen von der Firma Air Liquide (Krefeld, Deutschland).

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 Herstellung von Ferrihydrit

Zur selektiven Anreicherung von eisenreduzierenden Mikroorganismen mittels MPN-Assay (Kap. 2.7.3) wurde als Elektronenakzeptor Fe(III) in der Form von Ferrihydrit verwendet. Zur Herstellung dieses Eisenhydroxids nach [186] wurde eine 0,4 M FeCl₃-Lösung unter ständigem Rühren langsam mit 10 M NaOH-Lösung neutralisiert. Nach Erreichen des pH-Wertes von 7,0 wurde dieser nach 30 min nochmals überprüft und ggf. nachjustiert. Das gelöste Chlorid wurde durch sechsmaliges Waschen in dest. Wasser und Zentrifugation für

15 min bei 4500 x g entfernt. Das Ferrihydrit wurde in dest. Wasser resuspendiert und die Eisenkonzentration in einem angesäuerten Aliquot mittels ICP-MS (Kap. 2.5.1) bestimmt. Eine Endkonzentration des Eisens von 0,4 M wurde eingestellt und die Lösung autoklaviert.

2.4.2 Herstellung von Manganoxid

Als Elektronenakzeptor für manganreduzierende Mikroorganismen diene Mn(IV) in Form von MnO₂. Die Synthese von Manganoxid erfolgte nach einem Protokoll von Lovley und Phillips [187]. Zu 1 l basischer Kaliumpermanganatlösung (80 mM NaOH, 20 mM KMnO₄) wurde unter ständigem Rühren langsam 1 l 30 mM MnCl₂-Lösung zugegeben. Das gefällte MnO₂ wurde - wie für Ferrihydrit beschrieben (Kap. 2.4.1) - gewaschen, um das verbliebene Chlorid zu entfernen. Eine Mangankonzentration von 0,15 M wurde in einem angesäuerten Aliquot der Lösung mittels ICP-MS (Kap. 2.5.1) ermittelt.

2.4.3 Extraktion immobilisierter Metalle und Metalloide von Aktivkohle (BACTRAPs)

Um die Menge von gebundenen Fe, Mn, As und U an Aktivkohlepellets zu bestimmen, wurden die Pellets nach dreimaligen Waschen in 0,9%iger NaCl-Lösung mit je 1 ml destillierter, konzentrierter HNO₃ versetzt und für 24 h unter Schütteln inkubiert. Die im Überstand enthaltenen, extrahierten Elemente wurde mit ICP-MS (Kap. 2.5.1) bestimmt. Die Trockenmasse der Aktivkohlepellets wurde nach Inkubation für 16 h bei 105°C ermittelt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde jeweils der ermittelte Gesamtgehalt auf die Trockenmasse des Aktivkohlepellets bezogen und die mittlere Konzentration von zwei bis vier Aktivkohlepellets angegeben.

2.5 Chemische Analysemethoden

2.5.1 Kationenbestimmung mittels ICP-MS

Zur Bestimmung der Kationen wurde 10 ml der wässrigen Probe mit 100 µl destillierter, konzentrierter HNO₃ angesäuert und mittels induktiv-gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) analysiert. Die Messungen wurden von Frau Aline Ritter (HZDR, Institut für Ressourcenökologie, Abteilung Grenzflächenprozesse) an einem ELAN 9000 ICP-MS Spektrometer (PerkinElmer, Überlingen) und an einem AXIOM ICP-MS Spektrometer (VG ThermoElemental, Winsford, UK) durchgeführt und ausgewertet. Die Nach-

weisgrenze lag für die meisten Kationen bei 1 µg/l, im Fall von Eisen und Arsen bei 10 µg/l sowie für Calciumionen bei 100 µg/l. Der Standardfehler betrug 1 - 2%.

2.5.2 As(III)-Bestimmung mittels HG-AAS

Der As(III)-Gehalt einer Probe wurde mittels Hydridtechnik-Atomabsorptionsspektrometrie (HG-AAS) an einem kontinuierlichen Fluss-Hydrid-Generator FIAS 200 gekoppelt mit einem Atomabsorptionsspektrometer 4100 (PerkinElmer, Überlingen) nach Driehaus & Jekel [188] von Frau Aline Ritter und Frau Ina Kappler (HZDR, Institut für Ressourcenökologie, Abteilung Grenzflächenprozesse) bestimmt. Durch die Reduktion von As(III) mit NaBH₄ wird AsH₃ gebildet, welches schließlich detektiert wird. Die Nachweisgrenze lag bei 1 µg/l As(III) und der Standardfehler betrug 1 - 5%.

2.5.3 Anionenbestimmung mittels Ionenchromatographie

Die Konzentration von Anionen in der wässrigen Probe wurde durch Ionenchromatographie (IC) unter Verwendung eines 732/733 IC Systems (Metrohm, Filderstadt) von Frau Carola Eckardt (HZDR, Institut für Ressourcenökologie, Abteilung Grenzflächenprozesse) ermittelt. Die Nachweisgrenze lag für Chlorid und Nitrat bei 0,2 mg/l sowie für Phosphat und Sulfat bei 0,5 mg/l. Der Standardfehler betrug max. 2%.

2.5.4 Kohlenstoff- und Stickstoffbestimmung

Die Bestimmung des gesamten organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC), gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) sowie Carbonats als auch des gesamten gebundenen Stickstoffs (TNb) in der wässrigen Probe wurde mit einem TC/TN-Analysator multi N/C 2300 bzw. 2100 S (Analytik Jena, Jena) von Frau Carola Eckardt durchgeführt. Dabei wurden nach Oxidation der Probe im Sauerstoffstrom bei 800°C unter Anwesenheit eines Platinkatalysators entstandenes CO₂ mittels nichtdispersiver Infrarot (NDIR)-Messung und entstandene NO_x-Gase mit einem Chemolumineszenzdetektor bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,2 mg/l und der Standardfehler betrug max. 5%.

2.5.5 Acetatbestimmung mittels HPLC

Zur Bestimmung der Acetatkonzentration mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die Proben für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand bis zur Messung bei -20°C gelagert. Es wurden 300 µl des Überstandes

in ein HPLC-Vial (Thermo Scientific) transferiert und Acetat am HPLC-System Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) unter Verwendung der Säule Nucleogel® Ion300 OA (Marchery-Nagel, Düren), bei 70°C Säulentemperatur, einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min und mit 5 mM H₂SO₄ als Eluent bei einer Absorption von 210 nm detektiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 mM Acetat. Es wurde ein Standardfehler von 2 - 4% ermittelt. Die Messungen wurden mit Unterstützung von Herrn Falk Lehmann (HZDR, Helmholtz-Institut Freiberg für Ressourcentechnologie, Abteilung Aufbereitung) durchgeführt.

2.5.6 Kolorimetrische Fe(II)-Bestimmung mittels Ferrozin-Assay

Um die Konzentration von Fe(II) in den Ansätzen der Mikrokosmenversuche zu bestimmen, wurde der Ferrozin-Assay nach Viollier *et al.* [189] angewandt. Die Reaktion von Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat) mit Fe(II)-Ionen führt zur Entstehung eines stabilen magentafarbenen Komplexes. Die Fe(II)-Konzentration lässt sich über die Absorption des Komplexes bei 562 nm ermitteln. Die Probe wurde unter anoxischen Bedingungen mit einer Spritze entnommen und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl des Überstandes (ggf. mit anoxischen Wasser verdünnt) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit 20 µl Ferrozin-Lösung (0,01 M Ferrozin, 0,1 M Ammoniumacetat, in dest. Wasser) versetzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm an einem µQuant™ Mikroplattenreader (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). Die Kalibrierung wurde im Bereich von 0 - 60 µM unter Verwendung eines Fe(II)-Standards (1 mM sterilfiltriertes FeSO₄ x 7 H₂O in anoxischen, dest. Wasser) durchgeführt. Der Standardfehler betrug max. 10%.

2.5.7 Methanbestimmung mittels Gaschromatographie

Für den Nachweis des Wachstums methanogener Mikroorganismen wurde Methan mittels Gaschromatographie (GC) bestimmt. Das GC Agilent 6890N System mit FID (flame ionization detector) (Agilent Technologies) wurde mit einer Trennsäule (80 m Länge, 0,53 mm Innendurchmesser, 45 µm Filmdicke) verwendet. Es wurden 2 ml aus der Gasphase der Probe mit einer Spritze entnommen und manuell in die Gasschleife transferiert. Die Messung erfolgte bei einem Säulenvordruck von 17 psi, mit Helium als Trägergas, mit einer Detektortemperatur von 250°C und nach einer Zweipunktkalibrierung. Die Analysen wurden von

Heiko Herrling (wissenschaftlich-technischer Mitarbeiter an der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig) am Institut für Siedlungs- und Industriewasserwirtschaft der TU Dresden durchgeführt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Extraktion der Gesamt-DNA aus Flutungswasser

Zur Extraktion der Gesamt-DNA aus Flutungswasser wurde das PowerWater™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode werden die Mikroorganismen auf Filtermembranen chemisch und mechanisch mittels Bead Beating lysiert. Nach Entfernen von Verunreinigungen wie Proteinen und Huminsäuren bindet die DNA an eine Silica-Membran-Säule bei hohen Salzkonzentrationen. Die gereinigte DNA wird in einem sterilen, salzfreien Puffer von der Säule eluiert. Die extrahierte DNA von zehn Filtermembranen (entspricht 10 l) einer Probe wurde vereint und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.6.2 Extraktion der Gesamt-DNA von BACTRAPs

Die Gesamt-DNA von BACTRAPs wurde nach einem Protokoll von Winderl *et al.* [190] extrahiert. Die Aktivkohlepellets eines BACTRAPs wurden auf vier 2ml-Schraubverschlussröhrchen, in die zuvor jeweils 0,2 ml einer 1:1-Mischung von 0,1 mm und 1,0 mm Zirconia/Silica Beads (Biospec, Bartlesville, USA) gegeben wurden, aufgeteilt. Die Zelllyse erfolgte unter Zugabe von 650 µl PTN-Puffer (120 mM Natriumphosphatpuffer, 125 Tris, 0,25 mM NaCl, pH 8) für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit auf einem Vortexer, Zugabe von 40 µl Lysozym-Lösung (50 mg/ml in TE-Puffer) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml in TE-Puffer) für 30 min bei 37°C und Zugabe von 200 µl 20% SDS für weitere 30 min bei 65°C und 700 rpm auf einem Thermomixer. Zur Extraktion der DNA wurden 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1, pH 8) pro Röhrchen zugegeben und für 45 s bei 6,5 m/s horizontal geschüttelt. Das Röhrchen wurde anschließend sofort bei 4°C gelagert, für 5 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und 600 µl des Überstandes in ein 2ml-Eppendorfgefäß transferiert. Zum Aktivkohlematerial wurden 300 µl PTN-Puffer gegeben, für 5 min bei 65°C und 700 rpm auf einem Thermomixer inkubiert, für 5 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert, und die Überstände vereint. Zu dem Überstand wurde 1 Volumeneinheit PCI gegeben, kurz gemischt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und

4°C zentrifugiert. ca. 800 µl des Überstandes wurden in ein 2 ml Phase Lock Gel Heavy Tube (Eppendorf, Hamburg) transferiert, mit 1 Volumeneinheit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. 650 µl des Überstandes wurden in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 2 Volumeneinheiten PEG (30% (wt/vol) Polyethylenglycol 6000 in 1,6 M NaCl) und 2 µl Glycogen (20 µg/µl, Roche, Basel, Schweiz) für 2 h bei 4°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C präzipitiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet zweimal mit 800 µl eiskaltem 70%igem Ethanol vorsichtig gewaschen und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit (16000 x g) und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet, in 40 µl HPLC-Wasser gelöst, mit den restlichen Pellets desselben BACTRAPs vereint und bei -20°C gelagert.

2.6.3 Arbeitsweise beim Umgang mit RNA

Da RNA im Vergleich zu DNA wesentlich instabiler ist und zudem durch sehr stabile, ubiquitär vorkommende RNasen leicht abgebaut wird, reicht die sterile Arbeitsweise zum Schutz der RNA nicht aus. Für Arbeiten mit RNA wurde daher ein separater Pipettensatz sowie gestopfte RNase-freie Pipettenspitzen benutzt. Alle Lösungen wurden vor dem Autoklavieren mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC, Carl Roth, Karlsruhe) enthaltenen Wasser in gebackenen (300°C für 4 h) Glasgefäßen hergestellt. Alle Flächen wurden vor der Arbeit mit RNase AWAY® (Carl Roth, Karlsruhe) gereinigt. Es wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Alle präparativen Schritte wurden, wenn möglich, bei 4°C durchgeführt.

2.6.4 Extraktion der Gesamt-RNA aus Flutungswasser

Die Gesamt-RNA aus Flutungswasser wurde unter Verwendung des PowerWater™ RNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Carlsbad, Kanada) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Methode basiert auf demselben Prinzip wie in Kap. 2.6.1 beschrieben wurde. Zusätzlich enthält der Lysepuffer ein Detergenz, welches die RNA stabilisiert und vor dem Abbau schützt. Nach der Bindung von RNA an die Säule wird genomische DNA enzymatisch mit DNase I verdaut. Das Enzym wird schließlich inaktiviert und durch Waschschrte zusammen mit den DNA-Rückständen von der Säule entfernt. Die Elution der RNA erfolgt mit sterilen, salzfreien Puffer. Die extrahierte RNA von zehn Filtermembranen (entspricht 10 l) einer Probe wurde vereint und sofort bei -80°C gelagert.

2.6.5 Extraktion der Gesamt-RNA von BACTRAPs

Zur Extraktion der Gesamt-RNA von BACTRAPs wurde ein optimiertes Protokoll nach Bombach *et al.* [191] verwendet. Die Aktivkohlepellets eines BACTRAPs wurden auf vier 2ml-Schraubverschlussröhrchen, welche jeweils 0,2 ml einer 1:1-Mischung von 0,1 mm und 0,7 mm Zirconia/Silica Beads (Biospec, Bartlesville, USA) enthielten, aufgeteilt. Die Extraktion erfolgte mit 300 µl AE-Puffer (50 mM Natriumacetat pH 5,3, 10 mM Na-EDTA), 200 µl Natriumphosphatpuffer (200 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 5,6), 50 µl SDS-Lösung und 450 µl Phenol für 10 min bei 65°C auf einen Thermomixer und unter horizontalem Schütteln für 30 s bei 6,5 m/s. Die Lösung wurde anschließend bei -80°C für 5 min eingefroren bis sich Phenolkristalle bildeten. Die Lösung wurde kurz aufgetaut, gemischt, für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein Phase Lock Gel Heavy Tube (Eppendorf, Hamburg) transferiert. Die Extraktion wurde erneut durch Zugabe von 1 Volumeneinheit AE-Puffer durchgeführt. Nach kurzem Mischen der Lösung und Zentrifugieren für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde der Überstand mit dem anderen Überstand vereint und mit 1 Volumeneinheit Phenol/Chloroform extrahiert und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 2 µl Glycogen (20 µg/µl, Roche, Basel, Schweiz) und 2 Volumeneinheiten PEG (30% (wt/vol) Polyethylenglycol 6000 in 1,6 M NaCl) für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, der Überstand nach Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C verworfen, die RNA in 30 µl RNase-freien Wasser gelöst und mit den anderen Pellets desselben BACTRAPs vereint. Die extrahierte RNA wurde sofort bei -80°C gelagert.

2.6.6 Entfernen der DNA und Reinheitsüberprüfung der RNA

Die Entfernung von DNA-Verunreinigungen in der extrahierten RNA wurde unter Verwendung des innuPREP DNase I Digest Kit (Analytik Jena, Jena) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die vollständige Eliminierung der DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese und durch eine Kontroll-PCR (Kap. 2.6.9) überprüft.

2.6.7 cDNA Synthese

Mit Hilfe der innuScript Reverse Transcriptase (Analytik Jena, Jena) wurde nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von Random-Hexamerprimern (Thermo Scien-

tific, Waltham, MA, USA) cDNA synthetisiert. Es wurden 11,5 µl extrahierter RNA aus Flutungswasser- bzw. Biofilmprouben eingesetzt.

2.6.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Absorption von 260 nm nach Maniatis *et al.* [192] an einem Nanodrop2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, UA).

2.6.9 Amplifikation der 16S rRNA und 16S rRNA-Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Beschreibung der taxonomischen Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften wurde die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens bzw. der 16S rRNA für Bacteria mit dem Primerpaar U341F-R4 (Tab. 2.3) und die V4-V5-Region des 16S rRNA Gens bzw. der 16S rRNA für Archaea mit dem Primerpaar U519F-958R (Tab. 2.3) mittels PCR amplifiziert. Da die erhaltenen Amplifikate mit der Pyrosequenzierungsmethode analysiert wurden, handelte es sich bei den Primern um Fusionsprimer, die am 5'-Ende eine Adaptersequenz, gefolgt von einer 4-Basenbibliotheksschlüsselsequenz und die Template-spezifische Sequenz am 3'-Ende enthalten. Um mehrere Proben in einer Sequenzierungsreaktion untersuchen zu können, enthielten die Vorwärtsprimer zusätzlich eine sogenannte Multiplex-Identifizier(MID)-Sequenz am 5'-Ende der Template-spezifischen Sequenz. Es wurde jeweils eine separate PCR für Bacteria und für Archaea (Tab. 2.4) angesetzt. Die PCR-Produkte besitzen eine theoretische Länge von 462 bp (Bacteria, Referenz: *E. coli*) und 289 bp (Archaea, Referenz: *M. acetivorans*). Nach Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.6.10) wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena) nach Angaben des Herstellers gereinigt und schließlich aus vier gleichen Ansätzen vereint.

Tabelle 2.2: PCR-Pipettieransatz

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
PCR Puffer (Green/Colorless GoTaq Flexi Buffer)	5	1x
MgCl ₂	1	1 mM
dNTPs	0,5	200 μ M
Vorwärts-Primer	0,5 - 1,5	0,2 - 4 μ M
Rückwärts-Primer	0,5 - 1,5	0,2 - 4 μ M
DNA Template	1	20 - 30 ng/Ansatz
Taq-Polymerase	0,125	2,5 Units/Ansatz
Wasser (PCR-Qualität) ¹	ad 25	

¹ Wasser von Carl Roth, alle anderen Komponenten von Promega

Tabelle 2.3: Verwendete Primer

Zielgruppe	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Referenz
Bacteria (16S rRNA Gen)	U341F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-(MID)- CCTACGGGRSGCAGCAG	[193]
	R4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG- TACNVGGGTATCTAATC	[194]
Archaea (16S rRNA Gen)	U519F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-(MID)- CAGYMGCCRCGGKAAHACC	[195]
	958R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG- GGACTACVSGGGTATCTAAT	[196]

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.
Nukleotidbindungssequenz, Multiplex-Identifer (MID)-Sequenz ist 10 Nukleotide lang

Tabelle 2.4: PCR-Programme

	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Primerhybridisierung	Elongation	finale Elongation	Zyklusanzahl
Bacteria (16S rRNA Gen)	5 min bei 94°C	50 s bei 94°C	50 s bei 56°C	50 s bei 72°C	6 min bei 72°C	25
Archaea (16S rRNA Gen)	5 min bei 95°C	30 s bei 95°C	40 s bei 55°C	1 min bei 72°C	10 min bei 72°C	30

2.6.10 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Zur Überprüfung bzw. Abschätzung der Größe, Reinheit und Quantität von Nukleinsäuren wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Probe wurde nach Extraktion bzw. PCR ggf. 1:5 mit 6x Loading Dye (Life Technologies, Carlsbad, USA) versetzt und 3 - 5 µl auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragmentlänge wurde ein 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™, Life Technologies, Carlsbad, USA) mitgeführt. Die Elektrophorese fand für ca. 1 h bei 100 V in 1x TAE-Puffer (2 mM EDTA, pH 8,0, 40 mM Tris-HCl) statt. Das Gel wurde anschließend für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg/l in bidest. Wasser, Carl Roth, Karlsruhe) gefärbt, in bidest. Wasser gespült und unter Anregung mit UV-Licht in einem Transilluminator (Biostep) visualisiert.

2.6.11 Pyrosequenzierung

Im Gegensatz zur klassischen Kettenabbruchmethode nach Sanger ist die Pyrosequenzierung eine nicht elektrophoretische Methode, bei der die Synthese des komplementären DNA-Strangs in Echtzeit verfolgt wird. Beim Einbau des korrekten dNTPs durch DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) entsteht anorganisches Pyrophosphat (PPi), welches mit ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wird. ATP wird als Coenzym der Luciferase zur Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin und Licht benötigt. Die Intensität des emittierten Lichts ist direkt proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide und wird mit einer CCD-Kamera detektiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut bevor ein neues dNTP zur Reaktion gegeben wird [197, 198].

Die PCR-Produkte wurden nach der Konzentrationsbestimmung in äquimolaren Mengen zu einer Probe vereint und direkt von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) sequenziert. Es wurden insgesamt drei Pyrosequenzierungen beauftragt.

2.6.12 Sequenzauswertung und taxonomische Einordnung

Nach einem ersten Qualitätscheck der Sequenzen durch die Firma Eurofins MWG GmbH selbst, wurden diese mit Hilfe des Programmpakets MOTHUR 1.15.0 [199] von Frau Dr. Kerstin Röske (Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig) automatisiert nachbearbeitet. Nachdem die Tag-Sequenzen der Primer entfernt wurden, wurden alle Sequenzen für die weitere Analyse selektiert, welche maximal 8 bp lange Homopolymere, keine unidentifizierten Nukleotide, die zugelassene Primersequenz beinhielten und eine Länge von mindestens 150 bp (Archaea) bzw. 200 bp (Bacteria) bis maximal 550 bp aufwiesen. Da

die verwendeten Primer Wobble-Basen enthalten, wurden maximal drei (zwei Wobble-Basen in U341F und eins zusätzlich) und sieben (fünf Wobble-Basen in U519F + zwei zusätzlich) Unterschiede in der Primersequenz der Bacteria- bzw. Archaea-Sequenzen zugelassen. Zusätzlich wurde ein Unterschied in der MID-Sequenz erlaubt [199]. Schließlich wurden alle chimären Sequenzen entfernt. Mit den verbliebenen Sequenzen wurden mittels des Pyro-Aligner des RPD (Ribosomal Database Project)-Programmpakets ein Alignment durchgeführt [200, 201]. Dieses Alignment wurde zur Berechnung einer spaltenformatierten Distanzmatrix auf Basis des Jukes-Cantor-Distanzmodells verwendet und die erhaltene Matrixdatei zur Gruppierung der Sequenzen in Operational Taxonomical Units (OTUs) mit MOTHUR genutzt. Sequenzen mit einer Homologie $\geq 97\%$ wurden einem OTU zugeordnet. Für die taxonomische Zuordnung der OTUs wurde der Naïve Bayesian Classifier des RDP verwendet, der eine Klassifizierung bis zur Ebene der Gattung ermöglicht [202].

2.6.13 Erstellung der Alpha-Diversitätscharakteristik

Zur Darstellung der Abdeckung der Diversität und der Beurteilung des Artenreichtums der untersuchten, mikrobiellen Gemeinschaft in einer Probe wurde eine OTU-basierte Alpha-Diversitätscharakteristik jeder Probe erstellt. Dabei wurde wie für Diversitätsstudien üblich eine Rarefaction-Analyse durchgeführt, die Anzahl der ermittelten OTUs, der Coverage-Index sowie die Richness-Indizes, Chao1 [203, 204] und ACE [205], als auch Diversity-Indizes, nichtparametrischer Shannon [206] und Simpson [207], berechnet. Die Analysen und Berechnungen erfolgten mittels des Programmpakets MOTHUR durch Frau Dr. Kerstin Röske.

2.6.14 Clusteranalysen und nichtmetrische multidimensionale Skalierung

Die Clusteranalyse sowie die Diagrammerstellung mit nichtmetrischer multidimensionaler Skalierung (NMDS) erfolgte mittels des Vegan-Pakets des Statistikprogramms R [208] durch Frau Dr. Kerstin Röske.

Zum Vergleich der Ähnlichkeiten der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur untereinander wurde eine Clusteranalyse basierend auf der Bray-Curtis Verschiedenheit [209] der OTU-Zusammensetzung aller Proben durchgeführt und die Ergebnisse als Dendrogramm dargestellt. Dazu wurde die Abundanz der OTUs normalisiert und logarithmisch transformiert. Die Distanz der physikalisch-chemischen Faktoren wurden anhand einer Euklidischen Distanzmatrix basierend auf den standardisierten Umweltparametern aller Untersuchungs-

standorte errechnet und im Dendrogramm dargestellt. Um für (Un-)Ähnlichkeiten mögliche, erklärende Variablen zu identifizieren, wurden mit Hilfe der Vektoranpassung nach Oksanen [208] die normalisierten OTU- und Umweltdaten in ein Koordinatensystem mit NMDS [210, 211] projiziert.

2.6.15 Quantifizierung von Mikroorganismen mittels CARD-FISH

Die Catalysed Reporter Deposition Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (CARD-FISH) ermöglicht die direkte Detektion und Quantifizierung von Mikroorganismen in Umweltproben ohne die Notwendigkeit der Kultivierung. Die spezifischen Sonden gelangen nach Permeabilisierung der Zellen zum Zielmolekül (in diesem Fall: rRNA). Bei der weiterentwickelten Variante der klassischen FISH wird die Tyramidsignalamplifikation bei Verwendung HRP-markierter Oligonukleotid-Sonden genutzt. Durch die Peroxidaseaktivität der HRP in Anwesenheit von H_2O_2 werden die zugegebenen Fluorochrom-markierten Tyramide in unmittelbarer Nähe des Enzyms angereichert und das Sondensignal auf diese Weise verstärkt.

Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach der Methode von Pernthaler *et al.* [212] genutzt.

Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Flutungswasserproben wurden direkt bei der Probenahme 1:1 mit 4%igem PBS-gepufferten Paraformaldehyd für 10 - 20 h bei 4°C fixiert. Verschiedene Volumina (10 ml, 50 ml, 100 ml) der fixierten Probe wurden jeweils auf einen weißen Membranfilter (0,2 µm Porengröße, Isopore™, GTBP, Millipore, Darmstadt) filtriert. Die Filter wurden bis zur weiteren Behandlung bei - 20°C gelagert.

Einbetten

Die Oberseite des Filters wurde in 0,2%ige low melting Metaphor-Agarose (Lonza, Basel, Schweiz) getaucht, für 10 min bei 35°C in einer Petrischale getrocknet, in 96%igem Ethanol für 1 min bei Raumtemperatur dehydriert und anschließend getrocknet.

Lysozym – Achromopeptidase

Zur Permeabilisierung der Zellen wurde der Filter für maximal 1 h bei 37°C in Lysozym-Lösung (Tab. 2.6) in einer mit Parafilm verschlossenen Petrischale inkubiert, viermal mit

2 Material und Methoden

MilliQ Wasser für je 1 min bei Raumtemperatur gewaschen, in 10 ml Achromopeptidase-Lösung (Tab. 2.6) für 30 min bei 37°C inkubiert und nochmals viermal in MilliQ Wasser gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Filters in reinem Methanol mit 0,15% H₂O₂. Der Filter wurde, wie zuvor beschrieben, viermal in MilliQ Wasser gewaschen, mit 96%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Der Filter wurde in 16 Stücke zerschnitten und beschriftet.

Hybridisierung

Die Hybridisierung der HRP-markierten Oligonukleotidsonde mit der komplementären RNA erfolgte in 0,5ml-Eppendorfgefäßen für 2 h 15 min bei 46°C. Maximal vier Filterstückchen wurden zu 400 µl Hybridisierungspuffer (Tab. 2.6, Tab. 2.7) mit 50 ng der entsprechenden Sonde gegeben.

Waschen

Der Anteil an nicht an die RNA gebundener Sonde wurde durch eine 5-minütige Inkubation der Filterstückchen bei 48°C in vorgewärmten Waschpuffer (Tab. 2.8) entfernt. Es folgte ein zweiter Waschschrift in 1x PBS für 15 min bei Raumtemperatur.

Tyramid-Signalamplifikation

Die Filterstückchen wurden zur Verstärkung des Sondensignals für 45 min bei 46°C in Substratmix (Tab. 2.6) inkubiert. Alle Schritte fanden von nun an bei Dunkelheit statt. Die Filterstückchen wurden bei Raumtemperatur in 1x PBS für 10 min und zweimal für je 1 min in MilliQ Wasser gewaschen, mit 96%igem Ethanol dehydriert und getrocknet.

Gegenfärbung

Die Filterstückchen wurden in einem Eppendorfgefäß mit 10 µg/ml Propidiumiodid-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) für 15 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert, dreimal in MilliQ Wasser gewaschen und auf einen Glasobjektträger mit Citifluor™ AF1 (Citifluor Ltd., Leicester, UK) eingebettet und einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger konnten bis zur mikroskopischen Analyse für einige Wochen ohne merklichen Signalverlust bei -20°C gelagert werden.

Mikroskopische Analyse

Es wurden 400 - 800 Propidiumiodid-gefärbte Objekte pro Filterstückchen über mehrere Zählfelder mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv und Zählkular (Gitternetz: 50 µm x 50 µm) eines Epifluoreszenzmikroskops (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Die Anzahl der jeweiligen Sonden-hybridisierten Objekte wurde parallel ermittelt und in Relation zur Anzahl der Propidiumiodid-gefärbten Objekte gesetzt. Für die verschiedenen Bacteria-Klassen wurde schließlich der prozentuale Anteil der entsprechenden Sonden-hybridisierten Zellen in Bezug auf die mit der EUB-Sonde ermittelte Gesamtbakterienanzahl berechnet.

Tabelle 2.5: CARD-FISH-Sonden

Zielgruppe	Sonde	Sequenz (5'→3')	Formamid- konzentra- tion[%]	Refe- renz
Bacteria (16S rRNA)	EUB338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0	[213]
Planctomycetales (16S rRNA)	EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	0	[214]
Verrucomicrobiales (16S rRNA)	EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	0	[214]
Negativkontrolle	NONEUB	ACT CCT ACG	0	[215]
Kompetitor für EUB338		GGA GGC AGC		
Alphaproteobacteria, außer Rickettsiales (16S rRNA)	ALF968	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	20	[216]
Betaproteobacteria (23S rRNA)	BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	[217]
	Kompetitor	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	
Gammaproteobacteria (23S rRNA)	GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	[217]
	Kompetitor	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	
Epsilonproteobacteria (16S rRNA)	EPSY549	CAG TGA TTC CGA GTA ACG	0	[218]
Archaea (16S rRNA)	ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	35	[219]

2 Material und Methoden

Tabelle 2.6: Lösungen für CARD-FISH

Lösung	Zusammensetzung
Lysozymlösung	100 mg Lysozym (Carl Roth, Karlsruhe); 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5; 8 ml Aqua bidest.
Achromopeptidaselösung	20 µl 600 U Achromopeptidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 4,99 ml 10 mM NaCl; 4,99 ml 10 mM Tris-HCl
Blockierungspuffer (10%)	1 g Blocking Reagent (Roche, Basel, Schweiz); 10 ml Maleinsäurepuffer
Maleinsäurepuffer	0,58 g Maleinsäure; 150 mM NaCl; 50 ml Aqua bidest., pH 7,5
Hybridisierungspuffer	1,8 ml 5 M NaCl; 0,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5; x ml (Tab. 2.8) Formamid; x ml (Tab. 2.7) Aqua bidest.; 1 ml 10% Blockierungspuffer; 10 µl 10% SDS; 1 g Dextransulfat
Amplifikationspuffer	2 ml 10 x PBS; 200 µl 10% Blockierungspuffer; 8 ml 5 M NaCl; ad 20 ml Aqua bidest.
10x PBS	80 g NaCl; 2 g KCl; 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 2 g KH ₂ PO ₄
PBS-H ₂ O ₂ -Lösung	1 µl 30% H ₂ O ₂ in 200 µl 1x PBS
Substratmix	5 µl PBS-H ₂ O ₂ in 500 µl Amplifikationspuffer und 1 µl Tyramid-FITC

Lysozymlösung aliquotiert und bei -20°C gelagert; Achromopeptidaselösung aliquotiert und bei -20°C gelagert, Blockierungspuffer (10%) lösen bei 60°C im Wasserbad und vortexen, autoklaviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert, Hybridisierungspuffer lösen bei 60°C im Wasserbad und vortexen, aliquotiert und bei -20°C gelagert; Amplifikationspuffer lösen bei 60°C im Wasserbad und vortexen, bei 4°C gelagert; 10x PBS Salze in 1 l Aqua bidest. lösen und pH-Wert auf 7,3 einstellen

Tabelle 2.7: Hybridisierungspuffer für CARD-FISH

% Formamid im Puffer	Formamid [ml]	Aqua bidest. [ml]
0	0	7
20	2	5
35	3,5	3,5

Tabelle 2.8: Waschpuffer für CARD-FISH

% Formamid im Hybridisie- rungspuffer	5 M NaCl [μl]	1 M Tris-HCl, pH 7,5 [μl]	0,5 M EDTA, pH 8,0 [μl]	10% SDS [μl]	Aqua bidest.
0	9000	1000	-	50	ad 50 ml
20	2150	1000	-	50	ad 50 ml
35	700	1000	500	50	ad 50 ml

Tabelle 2.9: Mikroskopische Filtereinstellungen für CARD-FISH

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

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Gesamtzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde das Flutungswasser 1:1 mit 4% PBS-gepufferter PFA-Lösung versetzt und 10 ml der Lösung auf einen schwarzen Membranfilter (0,2 μm GTBP, Millipore) nach Vorlage von 1x PBS filtriert. Der Filter wurde zweimal mit bidest. Wasser gewaschen, für 15 min im Dunkeln in 10 μg/ml DAPI-Lösung (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert, nochmals zweimal mit bidest. Wasser gewaschen, auf einem Glasobjektträger transferiert, mit Citifluor™ AF1 (Citifluor Ltd., Leicester, UK) eingebettet und einem Deckgläschen abgedeckt. Für jede Probe wurden insgesamt mind. 1000 DAPI-gefärbte Objekte über 15 Zählfelder mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv und Zählkular (Gitternetz: 50 μm x 50 μm) eines Epifluoreszenzmikroskops (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{(y \cdot A)}{(a \cdot V)} \quad (2.1)$$

y ... mittlere Zellzahl pro Zählquadrat

A ... effektive Filtrationsfläche (μm²)

a ... Zählquadratfläche (μm²)

V ... Filtrationsvolumen (ml)

Tabelle 2.10: Mikroskopische Filtereinstellungen für DAPI

Filter	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
DAPI	405/20	425DCLP	GG435LP

2.7.2 Lebendkeimzahlbestimmung aerober Mikroorganismen mittels Colony Forming Unit Assay

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl heterotropher, aerober Mikroorganismen im Flutungswasser mittels Colony Forming Unit (CFU) Assay wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe der Probe in 9 ml 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Es wurden 0,1 ml jeder Verdünnung als Triplikat auf jeweils eine R2A-Agar-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert, die inokulierten Agarplatten bei Raumtemperatur für 10, 16, 44 und 80 Tage dunkel inkubiert und Agarplatten mit 30 - 100 Kolonien zur Ermittlung der Lebendkeimzahl ausgezählt.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des R2A-Agars [220]

Komponente	g l ⁻¹
Hefeextrakt	0,5
Bactopepton	0,5
Bactocasiton	0,5
Glucose	0,5
Lösliche Stärke	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05
Natriumpyruvat	0,3
Agar	15

pH-Wert wurde vor Zugabe von Agar auf 7,2 eingestellt

2.7.3 Lebendkeimzahlbestimmung anaerober Mikroorganismen mittels Most Probable Number Technik

Die Anzahl lebender, anaerober Mikroorganismen im Flutungswasser wurde unter Verwendung der Most Probable Number (MPN) Technik ermittelt. Alle Arbeitsschritte wurden bei N₂-Atmosphäre in einer Glovebox durchgeführt. Die zu untersuchende Flutungswasserprobe wurde mit N₂-Pressluft durchgast und zur Herstellung einer 1:10-Verdünnungsreihe mit anoxischer 0,9%iger NaCl-Lösung verwendet. In einem Dreifachansatz wurde 1 ml jeder

2 Material und Methoden

Verdünnung zu jeweils einem 20ml-Injektionsgefäß (Th. Geyer, Renningen) mit 9 ml des anoxischen (N_2/CO_2 , 80%/20%), vorgelegten Mediums (Tab. 2.12) gegeben. Die FeRB- und MnRB-Gefäße enthielten zusätzlich 1 ml Ferrihydrit (Kap. 2.4.1) bzw. 2 ml Manganoxid (Kap. 2.4.2). Die Gasphase der AA- und AM-Kulturen wurde nach Inokulation mit H_2 zu einem Überdruck von 2 bar befüllt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 14 Wochen. Das mikrobielle Wachstum wurde über die Analyse von Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in jedem Gefäß bewertet. Tab. 2.16 liefert eine Zusammenfassung aller analysierten Parameter und verwendeten Techniken für die entsprechende Mikroorganismengruppe. Als positiv in Bezug auf das Wachstum galten all jene MPN-Gefäße, bei denen eine Produktzunahme mindestens um den Faktor 2 bzw. eine Substratabnahme um mind. 35% gegenüber der entsprechenden Kontrolle ermittelt wurde. Aus den Analysen ergibt sich für jede Verdünnung eine Anzahl positiv getesteter Gefäße. Mit Hilfe des Programms Most Probable Number (MPN) Calculator der U.S. Environmental Protection Agency Version 3.0 wurden die Ergebnisse ausgewertet und die höchstmögliche Lebendkeimzahl pro ml errechnet. Das Programm basiert auf den statistischen Berechnungen von Klee [221].

2 Material und Methoden

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der MPN-Fertigmedien

Komponente (ml l ⁻¹)	Stoffwechselgruppe									
	NRB	SOB	FeRB	MnRB	AsRB	SRB	AA	HA	AM	HM
Basalmedium	925	925	940	940	940	880	880	880	880	880
Spurenelementlösung C	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Spurenelementlösung D	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Vitaminlösung E	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Vitaminlösung F	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Thiaminlösung	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eisenlösung	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5
Resazurin	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2
Cystein-HCl	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
NaHCO ₃	30	30	30	30	30	60	60	60	60	60
Hefeextrakt	1	1	1	1	1	10	10	10	10	10
Na-Acetat (100 g l ⁻¹)	25	-	25	25	25	-	-	-	-	-
Na-Laktat	5	-	-	-	-	5	-	-	-	-
KNO ₃	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Sulfid (0,2 M)	-	-	-	-	-	7,5	10	10	10	10
Na-Formiat	-	-	-	-	-	-	-	20	-	20
Trimethylamin (40% in H ₂ O)	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
Na-Acetat (20 g l ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Arsenatlösung	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-
Natriumthiosulfat	-	14,5	-	-	-	-	-	-	-	-

NRB = nitratreduzierende Bacteria, SOB = schwefeloxidierende Bacteria, FeRB = eisenreduzierende Bacteria, MnRB = manganreduzierende Bacteria, AsRB = arsenreduzierende Bacteria, SRB = sulfatreduzierende Bacteria, AA = autotrophe Acetogene, HA = heterotrophe Acetogene, AM = autotrophe Methanogene, HM = heterotrophe Methanogene
Der finale pH-Wert wurde mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 7 - 7,5 eingestellt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der MPN-Basalmedien

Komponente (ml l ⁻¹)	Stoffwechselgruppe		
	NRB, SOB, FeRB, MnRB und AsRB	SRB	AA, HA, AM und HM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,42	0,42	0,42
KCl	0,006	0,006	0,006
NH ₄ Cl	0,25	0,25	0,25
KH ₂ PO ₄	0,01	0,01	0,01
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,56	0,56	0,56
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	3,0	-
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,005	-	-
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,001	-	-

NRB = nitratreduzierende Bacteria, SOB = schwefeloxidierende Bacteria, FeRB = eisenreduzierende Bacteria, MnRB = manganreduzierende Bacteria, AsRB = arsenreduzierende Bacteria, SRB = sulfatreduzierende Bacteria, AA = autotrophe Acetogene, HA = heterotrophe Acetogene, AM = autotrophe Methanogene, HM = heterotrophe Methanogene

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der MPN-Spuren- und Vitaminlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Spurenelementlösung C	150 mg Nitriloessigsäure; 20 mg Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O; 20 mg Na ₂ SeO ₃ ; 6,3 mg CoCl ₂ x H ₂ O; 10 mg MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 10 mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O; 10 mg Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O; 10 mg ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 7,2 mg AlCl ₃ x 6 H ₂ O; 2,5 mg NiCl ₂ x 6 H ₂ O; 1 mg H ₃ BO ₃ ; 1 mg CuCl ₂ x 2 H ₂ O; ad 100 ml Aqua bidest.
Spurenelementlösung D	12,5 ml HCl (7,7 M); 2,1 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 30 mg H ₃ BO ₃ ; 100 mg MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 120 mg CoCl ₂ x H ₂ O; 24 mg NiCl ₂ x 6 H ₂ O; 2 mg CuCl ₂ x 2 H ₂ O; 144 mg ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 36 mg Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O; ad 1 l Aqua bidest.
Vitaminlösung E	100 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,1; 4 mg p-Aminobenzoesäure; 1 mg D(+)-Biotin; 10 mg Nikotinsäure; 15 mg Pyridoxindihydrochlorid; 5 mg Calcium-D(+)-pantothenat
Vitaminlösung F	1 l 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,1; 10 mg p-Aminobenzoesäure; 5 mg Nikotinsäure; 10 mg Pyridoxindihydrochlorid; 10 mg Calcium-D(+)-pantothenat; 10 mg Riboflavin; 5 mg Folsäure; 5 mg DL- α -Liponsäure

Tabelle 2.15: Zusammensetzung der MPN-Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration
NaHCO ₃	84 g l ⁻¹
Thiaminchlorid-hydrochlorid in 25 mM Natriumphosphatpuffer; pH 3,4	100 mg l ⁻¹
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	50 mg l ⁻¹
KNO ₃	100 g l ⁻¹
Na-Acetat	100 g l ⁻¹
Na-Acetat	20 g l ⁻¹
Hefeextrakt	50 g l ⁻¹
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2 g l ⁻¹
Resazurin	500 mg l ⁻¹
L-Cystein-Hydrochlorid	50 g l ⁻¹
Na-Laktat	60%
Na-Formiat	100 g l ⁻¹
Na ₂ HAsO ₄ x 7 H ₂ O	312 g l ⁻¹
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	85 g l ⁻¹

Tabelle 2.16: MPN-Analysetechniken

Stoffwechselgruppe	Analyseparameter	Analysemethode
NRB	Nitrat	Ionenchromatographie
SOB	Nitrat	Ionenchromatographie
FeRB	Gelöstes Fe	ICP-MS
MnRB	Gelöstes Mn	ICP-MS
AsRB	Gelöstes As(III)	HG-AAS
SRB	Sulfat	Ionenchromatographie
HA	Acetat	HPLC
AA	Acetat	HPLC
HM	Methan	Gaschromatographie
AM	Methan	Gaschromatographie

NRB = nitratreduzierende Bacteria, SOB = schwefeloxidierende Bacteria, FeRB = eisenreduzierende Bacteria, MnRB = manganreduzierende Bacteria, AsRB = arsenreduzierende Bacteria, SRB = sulfatreduzierende Bacteria, AA = autotrophe Acetogene, HA = heterotrophe Acetogene, AM = autotrophe Methanogene, HM = heterotrophe Methanogene

2.7.4 Aerober MPN für Sulfatreduzierer

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Sulfatreduzierer im Flutungswasser wurde alternativ zum in Kap. 2.7.3 beschriebenen anoxischen Medium ein oxisches, halbfestes Medium nach Jain *et al.* [222] verwendet. Die Entfernung des Sauerstoffs wird durch Inokulation mit einem aeroben Mikroorganismus, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, erreicht. Die Detektion des Wachstums sulfatreduzierender Mikroorganismen ist optisch durch Entstehung des schwerlöslichen, schwarzen Eisensulfats möglich. Zu 9 ml des Mediums (Tab. 2.17) wurden 0,1 ml einer *P. fluorescens* (CCUG 32456, Äspo HRL, Schweden) Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ von 0,6 pipettiert und für 24 h bei 30°C inkubiert. Eine 1:10-Verdünnungsreihe der zur untersuchenden Probe in 0,9% NaCl-Lösung wurde hergestellt, 9 ml Medium mit *P. fluorescens* mit je 1 ml der verdünnten Probe in einer Dreifachbestimmung inokuliert und für vier Wochen bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm Most Probable Number (MPN) Calculator der U.S. Environmental Protection Agency Version 3.0 durchgeführt und die höchstmögliche Lebendkeimzahl pro ml errechnet.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des halbfesten Postgate B Mediums

Komponente	g l ⁻¹
Natriumlactat	3,5 g
Hefeextrakt	1,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
CaSO ₄ x 2 H ₂ O	1,26 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
Ascorbinsäure Natriumsalz	0,1 g
Natriumthioglycolat	0,1 g
Agar	3 g
pH-Wert von 7,5 eingestellt, dann Zugabe von 1 ml Resazurin und Agar	

2.8 Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Untersuchungen wurden am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig, Department of Proteomics in der Gruppe von Dr. Nico Jehmlich mit Unterstützung von Kathleen Eismann durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse und Auswertung der Daten wurde von Dr. Nico Jehmlich und Kathleen Eismann übernommen.

2.8.1 Proteinextraktion

Mit einem sterilen Skalpell wurde der PES-Filter mit der konzentrierten Biomasse in kleine Stücke geschnitten und diese auf insgesamt drei Eppendorfgefäße, gefüllt mit je einer Spatelspitze 0,1 mm Zirconia/Silica Beads (Carl Roth, Karlsruhe) und zwei Glaskugeln (Durchmesser: 2,85 – 3,45 mm, Carl Roth), transferiert. Die Extraktion der Proteine erfolgte in zweimal 800 µl Aufschlusspuffer (20 mM Tris, 1 mM PMSF-Proteaseinhibitor in Isopropanol) unter horizontalem Vortexen bei 5 min und maximaler Geschwindigkeit, anschließender Zugabe von zweimal 160 µl 10%igem SDS und Inkubation für 10 min bei 60°C, gefolgt von einem Ultraschallaufschluss (US-Sonde, cycle 0,7, Amplitude 70%, Ultraschall Integrator UP50H, Dr. Hielscher GmbH) für zweimal 1 min auf Eis. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und mit 5 Volumeneinheiten Aceton für 2 - 16 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde das Pellet luftgetrocknet und ggf. mehrere Pellets der gleichen Probe unter Zugabe von SDS-Laufpuffer (Tab. 2.18) und 5-minütigem Erhitzen bei 60°C vereint.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung von SDS-Laufpuffer

Komponente	Menge [ml]
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	12,5
Glycerol	10
10% SDS	20
Mercaptoethanol	5
0,5%ige Bromphenolblau-Lösung	1
Aqua bidest.	50

2.8.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Nach 5-minütigem Erhitzen der Probe in SDS-Ladepuffer bei 90°C wurden die Proteine in einem 4%igem Sammelgel bei 10 mA und 12%igem Trenngel bei 20 mA in einer SDS-PAGE nach Laemmli ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassiefärbelösung (Tab. 2.19) über Nacht gefärbt und nach Entfärbung mit bidest. Wasser für 1 h sichtbar.

Tabelle 2.19: Coomassiefärbelösung für Proteingele

Komponente	Menge
Aqua bidest.	765,2 ml
85%ige Ortho-Phosphorsäure	18,8 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	80 g
5%ige Coomassielösung	16 ml
Methanol	200 ml

2.8.3 Trypsin-In-Gelverdau

Die Coomassie-gefärbten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nochmals in mehrere Fraktionen geteilt. Zur Entfärbung wurde die Gelfraktion zweimal in je 200 µl Waschlösung (40% Acetonitril, 10 mM NH₄HCO₃ in bidest. Wasser) für 10 min unter horizontalem Schütteln bei maximaler Geschwindigkeit inkubiert. Nach einem 5-minütigen Dehydrierungsschritt mit 200 µl Acetonitril wurde das Gelstück für 5 min in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Anschließend wurden potentiell vorhandene Cysteine mit 60 µl DTT-Lösung (10 mM Dithiothreitol in 10 mM NH₄HCO₃) für 30 min bei Raumtemperatur unter horizontalem Schütteln bei 1400 rpm reduziert und mit 60 µl Iodacetamid-Lösung (100 mM 2-Iodacetamid in 10 mM NH₄HCO₃) unter den gleichen Bedingungen im Dunkeln alkyliert. Das Gelstück wurde mit 200 µl Acetonitril für 5 min bei Raumtemperatur, mit 200 µl 10 mM NH₄HCO₃-Lösung für 10 min, nochmals mit 200 µl Acetonitril gewaschen und in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Die im Gel enthaltenen Proteine wurden mit 100 ng Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Fitchburg, USA) für 16 h bei 37°C enzymatisch gespalten. Die Reaktion wurde mit Ameisensäure (Endkonzentration: 1%) gestoppt. Der Überstand wurde nach Zugabe von 50 µl 5 mM NH₄HCO₃-Lösung und 10-minütigem horizontalem Schütteln bei Raum-

temperatur in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die im Gelstück verbliebenen Peptide wurden zweimal mit 50 µl Extraktionspuffer (40% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) bei horizontalem Schütteln für 10 min extrahiert und zum restlichen Überstand gegeben. Die Lösung wurde vollständig in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 µl 0,1% Ameisensäure gelöst.

2.8.4 Peptidreinigung

Mit Hilfe von ZipTip[®] Pipette Tips (ZipTip mit 0,6 µl C18 resin, Millipore) wurden die Peptide entsprechend der Herstellerinformation gereinigt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Peptide in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und bei -20°C eingefroren.

2.8.5 MS-Analyse und Auswertung

Die zu untersuchenden, getrockneten Proben wurden zunächst in 25 µl 0,1%iger Ameisensäure gelöst, für 10 min bei 750 rpm und Raumtemperatur auf einem Thermomixer geschüttelt, für 1 min im Ultraschallbad behandelt, erneut für 5 min geschüttelt, in LC-Vials (Waters Corporation, Milford, USA) transferiert und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Die massenspektrometrische (MS) Messung erfolgte an der Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, San Jose, USA). Hierbei wurden 7 µl der Probe injiziert und die tryptischen Peptide in einem 90 min-linearen Gradienten mittels nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie getrennt und online am Massenspektrometer vermessen. Die MS-Analyse wurde mit einer Top Speed Akquisition mit einer Cycle time von 3 s durchgeführt. Die MS-Daten wurden anschließend zur Proteinidentifizierung mit dem Proteome Discoverer (Thermo Scientific, Version 1.4) und der Suchmaschine MASCOT (Matrixscience, London) gegen die NCBI-Datenbank (Taxonomie Bacteria) analysiert. Nur Peptide mit einem PeptideScore > 42 wurden als sicher identifiziert angesehen und für die weitere Auswertung verwendet. Mit Hilfe von PROPHANE (PROteomics result Pruning & Homology Group ANnotation Engine, [223, 224]) erfolgte eine automatisierte Zuordnung der Peptide in Proteingruppen und eine taxonomische und funktionelle Klassifizierung unter Verwendung verschiedener Datenbanken.

2.9 Labormikrokosmen

Die Fähigkeit von im Flutungswasser vorkommenden planktonischen Mikroorganismen und Biofilmgemeinschaften, Uran und Arsen zu immobilisieren, wurde im Labormaßstab durch ein Set verschiedener Mikrokosmenversuche untersucht. Als Ausgangsmaterial diente Flutungswasser aus Schlema-Alberoda, da die Urankonzentration von allen untersuchten Standorten am höchsten und sanierungsrelevant ist. Die verwendeten Biofilmgemeinschaften wurden für drei Monate *in situ* auf Aktivkohlepellets der BACTRAPs (Kap. 2.2) kultiviert. Die Vorbereitung der Mikrokosmenansätze erfolgte unter N₂-Atmosphäre in einer Glovebox. Die frischen Flutungswasserproben wurden im Labor mit N₂ durchgast, zu je 100 ml in 120ml-Injektionsflaschen aliquotiert und ggf. wurden acht (entspricht ca. 0,5 g) Biofilm-bewachsene (Bio) bzw. unbewachsene (nicht *in situ* exponierte) Aktivkohlepellets (AK) steril in je eine Flasche transferiert. Die Serumflaschen wurden mit einem Butylstopfen und einer Aluminiumkappe gasdicht verschlossen. Die Ansätze der Totkontrollen wurden durch Autoklavieren (121°C, 1 bar, 30 min) an drei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt, für alle anderen Ansätze der Biofilmmikrokosmen wurde nur das Flutungswasser zur Abtötung planktonischer Mikroorganismen autoklaviert. Alle Ansätze wurden durch Zugabe von N₂/CO₂ durchgaster NaHCO₃-Lösung mit einer Endkonzentration von 30 mM gepuffert und mit einem N₂/CO₂-Gemisch durchgast. Zur Stimulation des mikrobiellen Wachstums wurde als Elektronendonator Acetat mit einer Endkonzentration von 10 mM (Stammlösung: steriles, anoxisches 1 M Natriumacetat) zugesetzt. Zudem wurde die natürliche Urankonzentration im Flutungswasser in einigen Ansätzen durch die Zugabe von U(VI) mit einer Endkonzentration von 50 µM (Stammlösung: 0,1 M Uranylperchloratlösung von Dr. Robin Steudtner erhalten, steril, anoxisch) erhöht. Das Versuchsschema einschließlich aller Kontrollen ist in Tab. 2.20 dargestellt. Die Mikrokosmen wurden bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Über einen Zeitraum von 98 Tagen wurden 3 ml Probe entnommen und der Überstand analysiert. Das mikrobielle Wachstum wurde indirekt über die Bestimmung der Acetatkonzentration mittels HPLC (Kap. 2.5.5) verfolgt. Die Uran- und Arsenkonzentration wurde mittels ICP-MS (Kap. 2.5.1) bestimmt. Zusätzlich wurde die Fe(II)-Konzentration (Kap. 2.5.6) und die Sulfatkonzentration per Ionenchromatographie (Kap. 2.5.3) als Indikator für die Eisen- bzw. Sulfatreduktion ermittelt.

2 Material und Methoden

Die Berechnung von Abbauraten wurde für den exponentiellen Bereich wie folgt berechnet:

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.2)$$

c_0 ... Ausgangskonzentration

k ... Abbaurrate

t ... Inkubationszeit

Die prozentuale Ab-/Zunahme von gelösten Uran und Arsen wurde für jeden Ansatz berechnet, die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ermittelt und die maximale Abnahme für den Stimulationsansatz im Vergleich zu den Kontrollen graphisch dargestellt.

Tabelle 2.20: Labormikrokosmen-Versuchsschema

	Stimulation (n=3)	Totkontrolle (n=2)	Substrat- kontrolle (n=2)	Matrix- kontrolle (n=2)
Set 1	FW + Ac	FW (tot) + Ac	FW	-
Set 2	Bio + Ac	Bio (tot) + Ac	Bio	AK + Ac
Set 3	FW + Ac + U	FW (tot) + Ac + U	FW + U	-
Set 4	Bio + Ac + U	Bio (tot) + Ac + U	Bio + U	AK + Ac + U

FW = Flutungswasser (Schleima), Ac = Acetat (10 mM), (tot) = Totkontrolle, Bio = Biofilm (ca. 0,5 g Aktivkohlepellets mit *in situ* gewachsenem Biofilm), U = U(VI) (50 μ M), AK = Aktivkohlepellets (ca. 0,5 g, steril, ohne Biofilm)

2.10 Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie

Die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) ist eine schnelle, sensitive Methode zur direkten Bestimmung der Uran-Speziation in umweltrelevanten Konzentrationen. Dabei wird Uran mit einem Laser bei geeigneter Wellenlänge zur Emission von Photonen (Lumineszenz) angeregt und das Lumineszenzsignal über einen Spektrographen rechtwinklig zum einfallenden Laserstrahl detektiert. Die Lage der Emissionsmaxima und ggf. die Lumineszenzlebensdauer (bei der zeitaufgelösten LIFS) können aus dem aufgenommenen Spektrum entnommen bzw. berechnet werden. Diese charakteristischen Parameter dienen zur Identifizierung von Uranspezies [1].

In dieser Arbeit wurde die LIFS zur qualitativen Bestimmung von U(VI) in Biofilmen eingesetzt. Dabei wurden die U(VI)-Emissionsspektren derselben Probe unter anoxischen Bedingungen und nach Exposition unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen

2 Material und Methoden

für 1 d und 5 d aufgenommen. Die Zunahme des U(VI)-Lumineszenzsignals in der oxischen Probe ist nur durch die Oxidation reduzierter Uranverbindungen möglich und dient daher als indirekter Nachweis für das Vorhandensein reduzierten Urans (sehr wahrscheinlich U(IV)) im Biofilm.

Nach Beendigung des Mikrokosmenversuches (Kap. 2.9) wurde ein Ansatz mit acetatstimuliertem Biofilm und zusätzlichem Uran (Bio + Ac + U) unter N₂-Atmosphäre in einer Glovebox geöffnet und für die Messung präpariert. Zwei Biofilmpellets wurden entnommen, mit 3 ml anoxischer 1 M H₂SO₄ angesäuert und für 6 h bei gelegentlichem Schütteln inkubiert, um Uran von den Pellets zu lösen. Der Überstand wurde in eine Quarzküvette überführt und gasdicht mit einem Teflonstopfen verschlossen. Die spektroskopische Messung erfolgte an einem Nd-YAG-Laser-System (Minilite, Continuum, USA) mit einer für U(VI) idealen Anregungswellenlänge von 266 nm und einer Laserenergie von 0,3 mJ. Die Lumineszenzsignale wurden mit Hilfe eines Spektrographen (iHR 550, HORIBA Jobin Yvon, Deutschland) und eines ICCD (intensified charged coupled device) Kamerasystems (HORIBA Jobin Yvon) detektiert. Die Detektion fand mit einer Verzögerung von 100 ns und in einem eingestellten Zeitfenster von 2 μ s statt. Die Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 371,4 nm bis 674,3 nm mit jeweils 100 akkumulierten Laserpulsen aufgenommen. Alle Einstellungen sowie die Aufnahme der Spektren wurde über die Computersoftware Labspec 5 (HORIBA Jobin Yvon) geregelt. Die erhaltenen Daten wurden mit Origin 8.6 (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA) zur Korrektur der Basislinie, Glätten der Spektren durch Vektoranpassung sowie Ermittlung der Peaklage ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Hydrochemische Charakterisierung der untersuchten Urangruben

Die drei stillgelegten Urangruben Pöhla, Schlema-Alberoda (kurz: Schlema) und Zobes, die sich in ihrem Flutungsstadium unterschieden (Kap. 2.1), wurden zunächst hinsichtlich ihrer hydrochemischen Eigenschaften analysiert. Für den Sommer 2011 wurden die Daten aus dem standardisierten Monitoring der Wismut GmbH mit den intern ermittelten Daten (HZDR) verglichen (Tab. 3.1). Am Altstandort Zobes fand zu diesem Zeitpunkt noch keine interne Beprobung des Flutungswassers statt.

Für die Flutungswässer der drei Untersuchungsstandorte wurden bei Feld- und Labor-messungen pH-Werte zwischen 6,5 bis 7,2 ermittelt. Die Redoxpotentiale waren in jedem Fall positiv, jedoch für Schlema mit 160 mV höher als für Pöhla und Zobes. Es wurde eine Wassertemperatur von ca. 18°C für Pöhla und Zobes sowie 24,8°C für Schlema ermittelt, die durch geothermische Vorgänge in den tiefen Gruben erklärbar ist (mündliche Mitteilung von Herrn. Dr. Meyer, Wismut GmbH). Während für die Flutungswässer aus Pöhla und Zobes eine elektrische Leitfähigkeit von ca. 0,5 mS/cm ermittelt wurde, war diese in Schlema aufgrund der insgesamt höheren Ionenkonzentrationen um einen Faktor von 4 erhöht.

Die Daten der Wismut GmbH zeigten hinsichtlich der analysierten Kationen die höchste Konzentration für Calcium-, gefolgt von Natrium- und Magnesiumionen im jeweiligen Flutungswasser. Für alle drei untersuchten Flutungswässer wurde eine annähernd gleiche Eisenkonzentration von ca. 4 - 5 mg/l ermittelt. Im Flutungswasser aus Schlema war die Konzentration der meisten Kationen höher als in den anderen beiden Flutungswässern. In Bezug auf die Urankonzentration war der Unterschied mit einem Faktor von ca. 100 besonders hoch. Die höchste Arsen- und Bariumkonzentration wurde hingegen für Flutungswasser aus Pöhla bestimmt. Intern durchgeführte AAS-Analysen ergaben, dass Arsen mit

3 Ergebnisse

94% (Pöhla) bzw. 93% (Schlema) vorwiegend als As(III) vorlag. Bei den Anionen wurde die höchste Konzentration für Sulfat von ca. 630 mg/l im Flutungswasser aus Schlema ermittelt. Die Sulfatkonzentration der anderen beiden Flutungswässer war deutlich niedriger. Die Carbonatkonzentration war mit 575 mg/l bzw. 542,2 mg/l in Schlema etwa doppelt so hoch als in Pöhla und Zobes. Das Flutungswasser aus Pöhla wies mit ca. 4 mg/l die geringste Chloridkonzentration auf, gefolgt von Zobes und Schlema. Die Konzentration von Nitrat, Nitrit und Ammonium lag bei den Analysen der Wismut GmbH fast immer unter der entsprechenden Detektionsgrenze. Die intern ermittelten Nitratkonzentrationen für Pöhla und Schlema von 2,6 mg/l bzw. 1,1 mg/l überstiegen die Konzentration des gebundenen Gesamtstickstoffs (TNb). Ähnlich war die Situation für die ermittelten Werte des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) und gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC). Die widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich auf eine methodisch-bedingte Messungenauigkeit bei geringen Konzentrationen zurückzuführen. Die DOC-Konzentration betrug je nach Flutungswasser zwischen 1,3 - 6,8 mg/l. Die intern ermittelten Phosphatkonzentrationen lagen in jedem Flutungswasser unterhalb der Detektionsgrenze von 0,5 mg/l. Die extern gemessene Aktivitätskonzentration von Ra-226, einem natürlichen Zerfallsprodukt von U-238, ergab mit 4,2 Bq/l die höchste Konzentration für Pöhla, gefolgt von Zobes und Schlema.

Neben den in Tab. 3.1 aufgeführten Analyseparametern wurden auch die Schwermetalle Cadmium, Nickel, Chrom, Blei, Kupfer und Zink analysiert. Die Konzentration pro Metall betrug bei allen untersuchten Flutungswässern unter 10 µg/l. Bei der Probenahme der Flutungswässer wurde eine Gasbildung bemerkt und der für H₂S charakteristische Geruch wahrgenommen. Eine exemplarische Analyse der Gaszusammensetzung aus dem Jahr 2006 ergab für Pöhla: 44,6 Vol% N₂; 0 Vol% O₂; 40,1 Vol% CH₄; 4,3 Vol% CO₂; 0,5 Vol% H₂S; 10,5 Vol% H₂ und andere Gase (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH). Bei einer Isotopenanalyse des im Flutungswasser aus Pöhla vorkommenden Methans im Jahr 2013 wurden sehr leichte Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignaturen ermittelt, die auf einen biogenen Ursprung hinweisen (persönliche Mitteilung von Frau Dr. Bombach, UFZ Leipzig).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.1: Zusammenfassung physikalisch-chemischer Daten für die untersuchten Flutungswässer

	Pöhla		Schlema-Alberoda		Zobes	
	Wismut	HZDR ¹	Wismut	HZDR ¹	Wismut	HZDR ¹
	07/2011	08/2011	07/2011	08/2011	04/2011	04/2013
Physikalisch-chemische Parameter						
pH_Feld	6,8	-	7,2	-	6,5	-
pH_Labor	7,2	6,7	7,2	6,6	6,9	7,1
Eh_Feld [mV]	44	-	160	-	52	-
Lf_Feld [mS/cm]	0,52	-	2,01	-	0,58	-
Lf_Labor [mS/cm]	-	0,47	-	1,88	-	0,52
O2_Feld [mg/l]	1,4	-	2,1	-	0,1	-
Temp_Feld [°C]	18,6	-	24,8	-	18,4	-
Kationen						
Na ⁺ [mg/l]	36,5	62,1	129,0	134,3	24,4	27,8
Mg ²⁺ [mg/l]	17,8	16,5	116,0	118,0	23,7	22,9
K ⁺ [mg/l]	6,4	4,2	12,9	8,6	3,4	3,3
Ca ²⁺ [mg/l]	48,1	49,6	177,0	180,0	54,5	50,6
Fe [mg/l]	4,99	5,63	3,93	5,05	4,26	5,24
Mn [mg/l]	0,21	0,23	2,37	2,61	1,59	1,63
As [mg/l]	1,98	1,95	0,95	1,15	0,21	0,26
U [mg/l]	0,02	0,02	1,70	1,74	0,02	0,01
Ba ²⁺ [mg/l]	1,47	1,73	0,03	0,04	0,71	0,72
Anionen und andere Parameter						
Chorid [mg/l]	3,5	3,8	51,9	55,0	38,3	37,2
Nitrat [mg/l]	< 0,5	2,6	< 0,5	1,1	< 0,5	< 0,2
Nitrit [mg/l]	< 0,01	-	< 0,01	-	< 0,01	-
Ammonium [mg/l]	0,18	-	< 0,1	-	< 0,1	-
TNb [mg/l]	-	0,6	-	0,3	-	0,2
Phosphat [mg/l]	-	< 0,5	-	< 0,5	-	< 0,5
Sulfat [mg/l]	< 5	< 0,5	629	638,0	9	1,0
Carbonat ² [mg/l]	330	292,5	575	542,5	294	345,7
DOC [mg/l]	-	6,8	-	4,2	-	1,3
TOC [mg/l]	3,6	6,0	2,1	3,3	1,9	2,0
Ra-226 [Bq/l]	4,2	-	1,7	-	2,8	-

¹ Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, ² HCO₃⁻, Feld... Feldmessung, Labor... Labormessung

Die internen Daten der hydrochemischen Analyse der Gruben bestätigten weitestgehend die Daten der externen Analyse. Eine deutliche Abweichung wurde nur für die Natriumkonzentration des Pöhla-Flutungswassers festgestellt. Der Grund hierfür bleibt unklar.

Die Flutungswässer, die unterschiedliche Sanierungsstadien der Urangruben repräsentierten, waren sich hinsichtlich der hydrochemischen Eigenschaften relativ ähnlich. Für Schlema wurden allerdings deutlich höhere Sulfat- und Urankonzentrationen als in den anderen Flutungswässern ermittelt. In dem Untersuchungszeitraum 2011 - 2014 wurden keine wesentlichen Veränderungen der analysierten Parameter für alle drei Urangruben festgestellt (Monitoring Wismut).

3.2 Testung geeigneter Aufwuchsträgersysteme für die Gewinnung von *in situ* Biofilmen

Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit gefluteter, untertägiger Urangruben wurden zur Untersuchung der im Flutungswasser existierenden Biofilmgemeinschaft zwei Aufwuchsträgersysteme im Feld installiert. Es handelte sich zum einen um eine Durchflusszelle und zum anderen um ein auf Aktivkohle-basierendes *in situ* Mikrokosmensystem (BACTRAPs). Nach 3-monatiger Exposition im Feld wurden die Systeme zur Ernte der Biofilme und anschließender Extraktion der Nukleinsäuren entnommen. Obwohl Mikroorganismen mit zum Teil unterschiedlichen Morphologien auf den Objektträgern der Durchflusszelle mikroskopisch detektiert wurden, konnte keine Gesamt-DNA extrahiert werden. Die Verwendung verschiedener Objektträgermaterialien (Glas, Plexiglas, PVC und Polysterol), das zusätzliche Anrauen der Oberfläche zur besseren Adhärenz der Mikroorganismen sowie das Zusammenführen der Biomasse mehrerer Objektträger, um die Menge an Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion zu erhöhen, führte ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis. Im Gegensatz dazu konnte aus 1 g Aktivkohle eines BACTRAPs bis zu ca. 15 mg reine DNA extrahiert werden. Das entspricht in etwa der Menge an DNA, die aus 10 l Flutungswasser gewonnen wurde. Demzufolge wurden alle weiteren Untersuchungen von Biofilmen mit dem BACTRAP-System durchgeführt. Da die Adsorption von chemischen Verbindungen und Mineralen an Aktivkohle während der Exposition von BACTRAPs im Flutungswasser erwartet wurde, wurde nach Entnahme der BACTRAPs eine Extraktion mit konzentrierter HNO_3 mit Aktivkohlepellets durchgeführt und ausgewählte Metalle bzw. Metalloide in den Extrakten analysiert. Die Analyseergebnisse sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Von allen unter-

3 Ergebnisse

suchten Elementen wurde die größte Menge für Eisen mit 1 - 2 mg/g Aktivkohle ermittelt, gefolgt von Arsen und Mangan bzw. Uran. Für BACTRAPs aus Pöhla wurde mit 973 µg Arsen/g Aktivkohle ungefähr die 10-fache Menge im Vergleich zu Schlema und Zobes ermittelt. Die extrahierte Manganmenge war zwischen den BACTRAPs der drei Standorte ähnlich hoch. Im Vergleich zu Pöhla und Zobes wiesen BACTRAPs aus Schlema mit 38 µg/g Aktivkohle die größte Uranmenge auf.

Von den zwei getesteten Aufwuchsträgersystemen für die Ernte von *in situ* Biofilmen und anschließende Extraktion von Nukleinsäuren hat sich nur das BACTRAP-System bewährt. Die Adsorption von Metallen, insbesondere Eisen, an Aktivkohle während der Exposition der BACTRAPs in den untersuchten Flutungswässern wurde festgestellt.

Tabelle 3.2: Quantitative Bestimmung immobilisierter Metalle/Metalloide von Aktivkohle nach 3-monatiger Exposition von BACTRAPs im Flutungswasser (Feldversuch)

Standort	Fe [$\mu\text{g g}^{-1}$ Aktivkohle]	Mn [$\mu\text{g g}^{-1}$ Aktivkohle]	As [$\mu\text{g g}^{-1}$ Aktivkohle]	U [$\mu\text{g g}^{-1}$ Aktivkohle]
Pöhla	2200	26	973	6
Schlema	1026	30	93	38
Zobes	1377	61	64	2

3.3 Molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften

Um die in gefluteten Urangruben vorkommenden, mikrobiellen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer Diversität und Zusammensetzung zu charakterisieren, wurden die Mikroorganismen nach Amplifikation eines Fragments des 16S rRNA-Gens ausgehend von extrahierter Gesamt-DNA mittels Pyrosequenzierung erfasst (Kap. 2.6.11). Planktonische Gemeinschaften wurden anhand von Flutungswasserproben untersucht, die folgendermaßen bezeichnet wurden: PW_D1/2/3, SW_D1/2/3 und ZW_D1/2, wobei P, S und Z für die entsprechende Grube, also Pöhla, Schlema und Zobes, W für Flutungswasser, D für DNA und 1, 2 bzw. 3 für eine Einzelprobe entsprechend der Reihenfolge des Beprobungsdatums steht. Die mittels *in situ* exponierter BACTRAPs erhaltenen Biofilmproben wurden nach dem gleichen Schema entsprechend PB_D1/2, SB_D und ZB_D1/2 genannt, wobei B für Bio-

film steht. Alle Biofilmpuben wurden nach 3-monatiger Exposition der BACTRAPs aus dem Flutungswasser entnommen und analysiert, mit Ausnahme von ZB_D2, welche für fünf Monate exponiert wurde. Die Bezeichnungen der Proben werden synonym für die entsprechende Gemeinschaft und generierte 16S rDNA-Bibliothek verwendet.

3.3.1 Bakterielle Diversität mikrobieller Gemeinschaften

Für die drei Untersuchungsstandorte Pöhla, Schlema und Zobes wurden nach zwei- bzw. dreimaliger Probenahme des Flutungswassers und ein- bzw. zweimaliger Biofilmpubenahme insgesamt 32018 qualitätsgefilterte Sequenzen für Bacteria generiert, die in 2177 OTUs (mit $\geq 97\%$ Sequenzhomologie) gruppiert wurden. Zur Einschätzung der Diversität wurden basierend auf den berechneten OTUs die Alpha-Diversitätscharakteristiken (Tab. 3.3) sowie Rarefaction-Kurven (Abb. 3.1) erstellt. Die Anzahl der erhaltenen Sequenzen in einer 16S rDNA-Bibliothek schwankte zwischen den Proben mit 54 bis 8826 sehr stark. Unter den Flutungswasserproben, also planktonischen Gemeinschaften, war die Sequenzanzahl für die jeweils erste Probe eines Standortes (PW_D1, SW_D1, ZW_D1) besonders gering, was auf methodische Ursachen zurückzuführen war. Bei geringerer Sequenzanzahl wurden erwartungsgemäß weniger OTUs berechnet. Dennoch reichten selbst die geringeren Sequenzanzahlen in einer 16S rDNA-Bibliothek aus, um die Mehrheit aller in einer Probe vorkommenden, bakteriellen OTUs zu erfassen (Tab. 3.3 Coverage). Die Rarefaction-Analyse zeigt für alle 16S rDNA-Bibliotheken mit Ausnahme von ZB_D1 Kurvenverläufe mit abnehmenden Anstieg (Abb. 3.1) und bestätigt daher die hohe Abdeckung der bakteriellen Diversität. Die tatsächliche OTU-Anzahl wurde basierend auf den berechneten Richness-Indizes je nach Probe zwischen 108 und 2715 (ACE) bzw. 57 und 1834 (Chao1) geschätzt. Unter Berücksichtigung vergleichbarer Sequenzanzahlen (z.B. PW_D1 und PB_D2) war die tatsächliche Anzahl der OTUs für Biofilmgemeinschaften tendenziell kleiner als für planktonische Gemeinschaften. Die höchsten ACE-, Chao1- und Shannon-Indizes sowie der größte Anstieg der Rarefaction-Kurve wurden für die 16S rRNA-Bibliothek der Probe ZW_D2 ermittelt. Obwohl der invertierte Simpson-Index für ZW_D2 kleiner als für ZW_D1 und SB_D war, deuten die Ergebnisse zusammen daraufhin, dass ZW_D2 repräsentativ für die planktonische Gemeinschaft aus Zobes den größten bakteriellen Artenreichtum aufwies. Die Probe mit dem geringsten Artenreichtum für Bacteria war basierend auf den ermittelten Richness-Indizes ZB_D1, wogegen die Diversity-Indizes auf PB_D1 hindeuten. Schließlich ermöglichte auch die Rarefaction-Analyse keine eindeutige Aussage

3 Ergebnisse

darüber, ob die Biofilmgemeinschaft aus Zobes oder Pöhla repräsentiert durch ZB_D1 bzw. PB_D1 weniger divers war, da die zugehörigen Graphen sehr dicht beieinander liegen.

Tabelle 3.3: Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria

Probe ¹	Be- probungs- datum	Anzahl der Se- quenzen	Anzahl der OTUs ²	Cover- age [%] ³	Richness ⁴		Diversity	
					ACE	Chao1	Shannon ⁵	inv- Simpson ⁶
PW_D1	08/2012	267	66	83%	405	176	2,85	6,62
PW_D2	02/2013	5599	398	97%	877	654	3,40	11,54
PW_D3	03/2013	4093	337	96%	903	647	3,18	7,53
SW_D1	09/2012	145	51	76%	220	170	3,12	12,21
SW_D2	02/2013	5853	500	95%	1401	1023	3,13	5,89
SW_D3	03/2013	5639	625	94%	1712	1192	3,95	13,47
ZW_D1	08/2012	292	113	75%	504	277	4,13	39,12
ZW_D2	04/2013	8826	989	94%	2715	1834	4,34	17,71
PB_D1	02/2013	516	62	93%	209	102	1,69	2,13
PB_D2	07/2013	270	54	86%	138	115	2,21	3,34
SB_D	02/2013	302	93	83%	278	195	3,92	34,02
ZB_D1	11/2012	54	18	76%	108	57	2,06	4,35
ZB_D2	04/2013	162	51	81%	153	99	3,23	16,14

¹ Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, W... Flutungswasser, B... Biofilm, D... DNA

² Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie

³ Berechnung unter Verwendung des Good's Coverage Estimator

⁴ nichtparametrische Richness-Schätzer

⁵ nichtparametrischer Shannon-Index

⁶ invertierter Simpson-Index

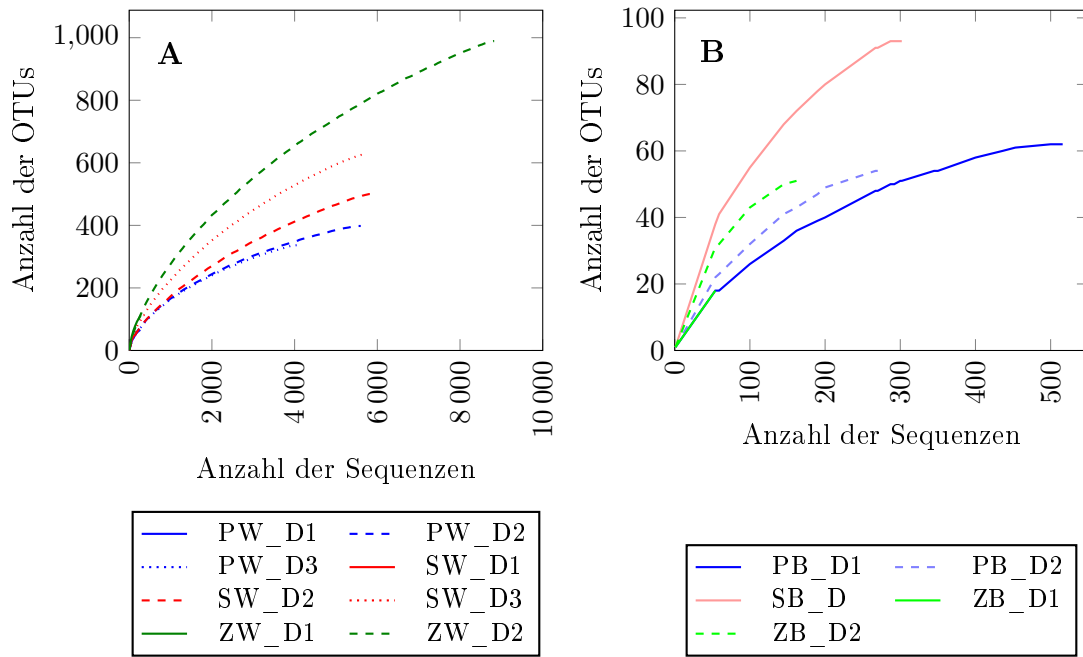


Abbildung 3.1: Rarefaction-Kurven für 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria aus (A) 8 Flutungswasser- und (B) 5 Biofilmproben
 16S rDNA-Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie wurden in dasselbe OTU gruppiert.
 Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, D...DNA

3.3.2 Taxonomische Klassifizierung der Bacteria in planktonischen Gemeinschaften

Auf Basis der OTU-basierten, taxonomischen Klassifizierung mithilfe der RDP-Datenbank konnten die erhaltenen 30714 16S rDNA-Sequenzen für die planktonischen Gemeinschaften insgesamt 18 bakteriellen Phyla (ohne unklassifizierte Bacteria) zugeordnet werden. Je nach Standort und entsprechender Probe variierte die Anzahl der identifizierten Phyla. Die wenigsten Phyla wurden für die jeweils erste Probe eines Standortes ermittelt, was auf die im Vergleich zu den anderen Proben geringeren Sequenzanzahlen der entsprechenden 16S rDNA-Bibliotheken zurückzuführen ist (Tab. 3.3). Die 16S rDNA-Sequenzen der Probe SW_D1, PW_D1 und ZW_D1 konnten nur ein, acht bzw. zehn bekannten Phyla zugeordnet werden. Hingegen wurden für die späteren Proben aus dem Jahr 2013 12 bzw. 13 (Schlema), 12 bzw. 15 (Pöhla) und 17 (Zobes) Phyla ermittelt.

Alle Flutungswasserproben enthielten Sequenzen für Proteobacteria, die mit 31,1 - 65,2% (PW), 51,7 - 78,3% (SW) und 59,9 - 60,1% (ZW) das am häufigsten detektierte Phylum darstellten. Die übrigen Sequenzen wurden den Phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, BRC1, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Elusimicro-

3 Ergebnisse

bia, Firmicutes, Gemmatimonadetes, OD1, Spirochaetes, SR1, TM7, Verrucomicrobia und WS3 zugewiesen. Die meisten dieser Phyla waren mit weniger als 1% der Flutungswasser-Sequenzen nur sehr schwach vertreten. Einen nicht zu vernachlässigen Anteil (PW: 30,2 - 63,3%; SW: 19,7 - 48,3%; ZW: 31,8, 34,5%) machten Sequenzen aus, die bereits auf Phylum-Ebene nicht klassifizierbar waren. Mit zunehmender Klassifikation (von Domäne bis Gattung) nahm der Anteil nicht einzuordnender Sequenzen zu. Zur besseren Beschreibung der planktonischen, bakteriellen Gemeinschaften im Flutungswasser wurden die relativen Häufigkeiten der zugewiesenen Klassen ermittelt und in Abb. 3.2 dargestellt. Die den vorherrschenden Proteobacteria zugeordneten Sequenzen wurden taxonomisch den Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria zugeordnet. Einen relativ geringeren Anteil der bakteriellen Gemeinschaft im Flutungswasser nahmen Sequenzen für Alpha- (PW: 0,6 - 1,9%; SW: 0 - 0,4%; ZW: 1,2%, 7,5%), Gamma- (PW: 0 - 4,2%; SW: 0 - 1,5%; ZW: 0,4%, 4,1%) und Deltaproteobacteria (PW: 0,4 - 0,6%; SW: 0 - 0,9%; ZW: 0,3%, 1,4%) ein. Im Gegensatz dazu waren Betaproteobacteria repräsentierende Sequenzen jeweils zu 6,1 - 43,6%, 0,7 - 30,8% und 34,3 - 42,1% im Pöhla-, Schlema- bzw. Zobes-Flutungswasser vertreten. Bei PW_D1 und SW_D1 kamen sie im Vergleich zu den späteren Proben (PW_D2 und PW_D3 bzw. SW_D2 und SW_D3) zu einem deutlich geringeren Anteil vor. Zusammen mit Epsilonproteobacteria, die 14,2 - 22,4% (PW), 33,7 - 53,5% (SW) und 5,8 - 22,7% (ZW) der Sequenzen abdeckten, dominierten Betaproteobacteria die planktonische, bakterielle Gemeinschaft der drei untersuchten Standorte.

Für Betaproteobacteria wurden insgesamt 133 (23%) OTUs ermittelt, wohingegen nur 15 (3%) OTUs den Epsilonproteobacteria zugeordnet wurden. Die detektierten Betaproteobacteria-OTUs wurden den Familien Rhodocyclaceae, Comamonadaceae, Methylophilaceae, Hydrogenophilaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Alcaligenaceae, Burkholderiaceae oder Oxalobacteraceae zugewiesen. Die vier häufigsten Betaproteobacteria-OTUs in den Flutungswasserproben waren OTU0008 (19%), OTU0009 (16%), OTU0010 (14%) und OTU0013 (14%). OTU0008 und OTU0010 wurden der Gattung *Thiobacillus* bzw. *Sulfuritalea* zugeordnet, bei den anderen beiden handelte es sich um unklassifizierte Rhodocyclaceae (Tab. 3.4). Unter den Epsilonproteobacteria wurden Vertreter der Helicobacteraceae, Campylobacteraceae und Nautiliaceae detektiert. Die in Flutungswässern dominierenden OTUs dieser Klasse, OTU0002 (53%), OTU0007 (28%) und OTU0022 (12%) wurden in die Gattung *Sulfuricurvum* bzw. *Sulfurimonas* eingeordnet. Die hier beschriebenen Beta- und Epsilonproteobacteria-OTUs zählten auch unter der Gesamtheit der in Flutungswässern

3 Ergebnisse

detektierten OTUs zu den dominierenden (Tab. 3.4).

Um die (Un-)Ähnlichkeit der analysierten Flutungswasserproben bzw. 16S rDNA-Bibliotheken eines Standortes einzuschätzen, wurde die relative Abundanz der gemeinsamen und einmaligen OTUs sowie deren Sequenzanteil bestimmt. Für Pöhla wurden beim Vergleich der Proben untereinander 34 (6%) gemeinsame von insgesamt 577 OTUs ermittelt, die zusammen 68% der Sequenzen repräsentierten. Die relative Häufigkeit einmaliger OTUs betrug 3% (PW_D1), 37% (PW_D2) und 27% (PW_D3) mit weniger als 1%, 4% bzw. 2% der Sequenzen. Nur 3% gemeinsame OTUs und damit 58% der Sequenzen wurden für das Flutungswasser aus Schlema ermittelt. Bei den Einzelproben wurden 2% (SW_D1), 29% (SW_D2) und 43% (SW_D3) einmalige OTUs, die jeweils weniger als 1%, 5% bzw. 9% der Gesamtsequenzen des Schlema-Flutungswassers repräsentieren, bestimmt. Bei den zwei Proben des Zobes-Flutungswassers stimmten 7% aller OTUs überein, die 65% der Sequenzen wiedergaben. Die Proben ZW_D1 und ZW_D2 enthielten 4% bzw. 89% einmalige OTUs, die 1% bzw. 35% der Sequenzen ausmachten. Die Ergebnisse zeigen, dass die bakterielle Diversität in den planktonischen Gemeinschaften bei allen Urangruben sehr ungleich verteilt war und die relativ wenigen, aber dominanten OTUs wiederholt in den einzelnen Flutungswasserproben detektiert wurden. Das deutet daraufhin, dass die für jede Urangrube dominanten Bacteria-OTUs ein wichtiger Bestandteil der planktonischen Gemeinschaften im Untersuchungszeitraum 2012 - 2013 waren.

Für die acht analysierten Flutungswasserproben der drei Urangruben untereinander wurden keine gemeinsamen Bacteria-OTUs ermittelt. In allen Flutungswasserproben aus Pöhla (PW) und Zobes (ZW) wurden sieben übereinstimmende OTUs detektiert, von denen die meisten, wie z.B. OTU0006 (Tab. 3.4), taxonomisch nicht einzuordnen waren. Für Schlema (SW) und Pöhla (PW) bzw. Zobes (ZW) wurden jeweils zwei gemeinsame sowie dominante Flutungswasser-OTUs, OTU0002 (*Sulfuricurvum*) und OTU0033 (Campylobacterales, unklassifiziert) bzw. OTU0007 (*Sulfurimonas*) und OTU0008 (Rhodocyclaceae, unklassifiziert) (Tab. 3.4), ermittelt. Die planktonischen Gemeinschaften in den drei Urangruben unterschieden sich demzufolge hinsichtlich des Vorkommens bakterieller OTUs deutlich voneinander, dennoch wurden für jeweils zwei der drei Urangruben wenige als charakteristisch anzunehmende Bacteria-OTUs festgestellt.

Tabelle 3.4: Dominante Bacteria-OTUs in 16S rDNA-Bibliotheken aus Flutungswasserproben

OTU	Klassifikation	PW_D1	PW_D2	PW_D3	SW_D1	SW_D2	SW_D3	ZW_D1	ZW_D2
0002	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacterales, Helicobacteraceae, <i>Sulfuricurvum</i>	7,5%	11,7%	9,0%	17,9%	37,4%	21,9%	n.d.	0,3%
0007	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacterales, Helicobacteraceae, <i>Sulfurimonas</i>	n.d.	0,1%	n.d.	11,0%	14,5%	10,5%	4,1%	10,2%
0006	unklassifiziert	34,8%	15,2%	31,4%	n.d.	0,1%	0,1%	0,3%	0,8%
0008	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, unklassifiziert	n.d.	n.d.	0,1%	0,7%	5,6%	4,9%	2,7%	13,8%
0009	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Hydrogenophilales, Hydrogenophilaceae, <i>Thiobacillus</i>	0,7%	11,9%	6,9%	n.d.	4,8%	5,6%	n.d.	n.d.
0010	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, <i>Sulfuritalea</i>	3,7%	14,0%	12,0%	n.d.	0,2%	0,5%	0,7%	0,6%
0013	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, unklassifiziert	n.d.	11,6%	5,2%	n.d.	2,7%	6,0%	n.d.	n.d.
0022	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacterales, Helicobacteraceae, <i>Sulfurimonas</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,1%	n.d.	1,7%	11,8%
0027	Proteobacteria, Betaproteobacteria, unklassifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4%	0,4%	0,7%	7,4%
0028	unklassifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,1%	9,6%	7,4%
0033	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacterales, unklassifiziert	14,6%	2,9%	5,1%	18,6%	0,9%	0,8%	n.d.	n.d.
0005	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, unklassifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,1%	5,7%	n.d.	n.d.
0044	unklassifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	1,4%	1,9%	2,2%	n.d.	0,7%

nur OTUs mit > 1% aller Gesamtsequenzen gezeigt

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA; n.d...nicht detektiert

3 Ergebnisse

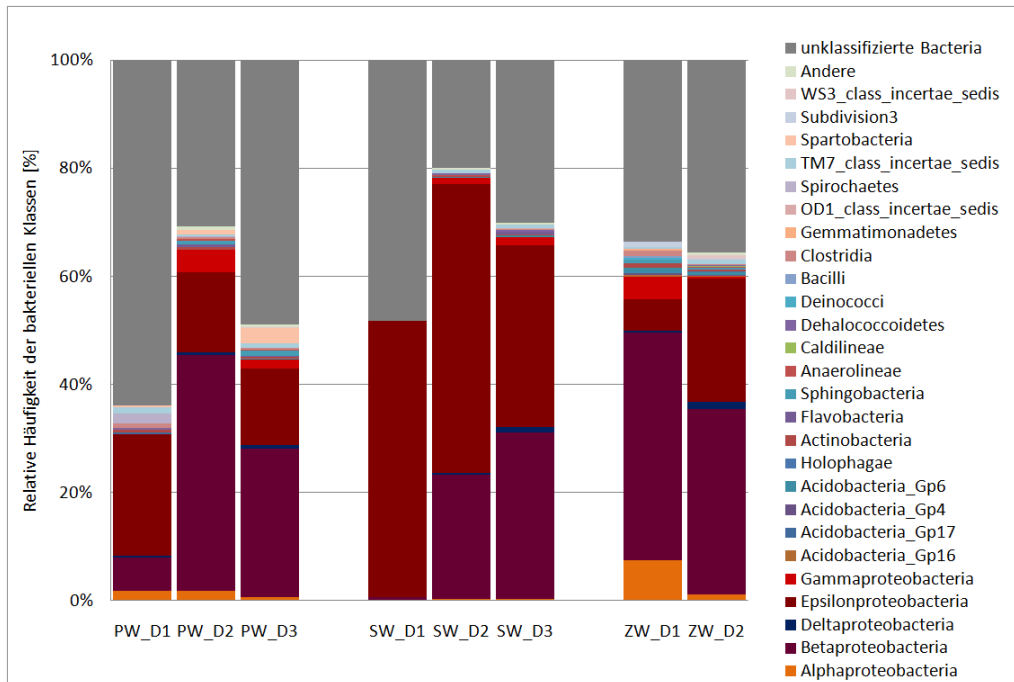


Abbildung 3.2: Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Flutungswasserproben

Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA

3.3.3 Taxonomische Klassifizierung der Bacteria in Biofilmgemeinschaften

Die erhaltenen 1304 16S rDNA-Sequenzen für fünf Biofilmproben konnten in insgesamt 236 OTUs unterteilt und mit Hilfe der RDP-Datenbank 15 verschiedenen bakteriellen Phyla (ohne unklassifizierte Bacteria) zugeordnet werden. Zu den identifizierten Phyla zählten Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Elusimicrobia, Firmicutes, Fusobacteria, Nitrospira, OD1, Planctomycetes, Proteobacteria, TM7, Verrucomicrobia und WS3. Nicht jedes Phylum war in jeder Biofilmprobe vertreten. Von den 15 genannten wurden für Biofilmproben aus Pöhla zehn (PB_D1) bzw. acht (PB_D2), aus Schlema elf sowie aus Zobes sechs (ZB_D1) bzw. elf (ZB_D2) bakterielle Phyla ermittelt. Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen Flutungswasserproben wurde ein großer Anteil an bakteriellen Sequenzen detektiert, die keinem Phylum zugeordnet werden konnten. Besonders groß war der Anteil unklassifizierter Bacteria in den Proben SB_D mit 46,0% und ZB_D2 mit 64,4% auf Phylum-Ebene. Unter den klassifizierbaren Sequenzen dominierten in den Biofilmproben proteobakterielle Sequenzen mit 29,5 - 75,6% je nach Probe, mit

3 Ergebnisse

Ausnahme der Probe ZB_D2 (8,8%). Die ermittelten, relativen Häufigkeiten aller zugeordneten Klassen wurden für die untersuchten Biofilme in Abb. 3.3 graphisch dargestellt. Die der Klasse der Alpha- (PB: 0,2%, 0,4%; SB: nicht detektiert; ZB: 0,6%, 7,4%) Beta- (PB: 1,1%, 3,3%; SB: 2,3%; ZB: nicht detektiert, 5,6%), Gamma- (PB: 1,4%, 1,9%; SB: 2,0%; ZB: nicht detektiert) und Epsilonproteobacteria (PB: 0,4%, 0,8%; SB: 1,3%, ZB: nicht detektiert) zugewiesenen Sequenzen stellten nur einen geringen Anteil der Gesamtsequenzanzahl je Biofilmprobe dar. Die dominierenden Proteobacteria-Sequenzen in den untersuchten Biofilmen wurden hauptsächlich zu den Deltaproteobacteria gezählt. Deltaproteobacteria-Sequenzen kamen in allen untersuchten Biofilmproben vor und repräsentierten jeweils 70,0% (PB_D1), 54,9% (PB_D2), 19,0% (SB_D), 55,6% (ZB_D1) und 8,1% (ZB_D2) der Gesamtsequenzen der entsprechende Probe. Ebenso wurden in allen Biofilmproben Sequenzen mit Zugehörigkeit der Klasse WS3_class_incertae_sedis detektiert. Sie waren jeweils zu 0,6% (PB_D1), 7,1% (PB_D2), 7,6% (SB_D), 1,9% (ZB_D1) und 13,8% (ZB_D2) vertreten. Bei der Probe ZB_D2, die einen 5-monatigen Biofilm darstellte, wurden die meisten der klassifizierbaren Sequenzen der Klasse WS3_class_incertae_sedis zugewiesen. Diese Klasse wurde durch insgesamt fünf OTUs repräsentiert, wobei OTU0031 am häufigsten detektiert wurde. Eine genauere taxonomische Beschreibung dieser Klasse ist derzeit nicht möglich. Für die Klasse der Deltaproteobacteria konnten entsprechende Sequenzen den Familien Geobacteraceae, Desulfobulbaceae, Syntrophaceae und Desulfobacteraceae sowie den auf der Familien-Ebene nicht klassifizierbaren Ordnungen Desulfobacterales und Myxococcales zugeordnet werden. Insgesamt wurden 20 Deltaproteobacteria-OTUs in den untersuchten Biofilmen ermittelt. Bei dem am häufigsten vorkommenden OTU (87% der Deltaproteobacteria-Sequenzen), OTU0001, war eine taxonomische Einordnung über die Klasse hinaus nicht möglich (Tab. 3.5). Auf Gattungs-Ebene konnte unter den dominanten OTUs nur OTU0011, der am häufigsten in ZB_D1 detektiert wurde, als *Geobacter* klassifiziert werden. Innerhalb der Chloroflexi ist die Klasse der Anaerolineae mit 6,0% am stärksten in der Probe SB_D vertreten. Die fünf Anaerolineae-OTUs konnten keiner Gattung zugeordnet werden.

Da für die Untersuchung der Biofilmgemeinschaft aus Schleima nur eine Probe zur Verfügung stand, war der Vergleich verschiedener 16S rDNA-Bibliotheken bzw. Proben hinsichtlich des Vorkommens gemeinsamer und einmaliger OTUs nur für Pöhla und Zobes möglich. Für die beiden Biofilme aus Pöhla (PB) wurden zehn (9%) gemeinsame von insgesamt 106 detektierten OTUs ermittelt, die 80% der Sequenzen abdeckten. Der relative Anteil ein-

3 Ergebnisse

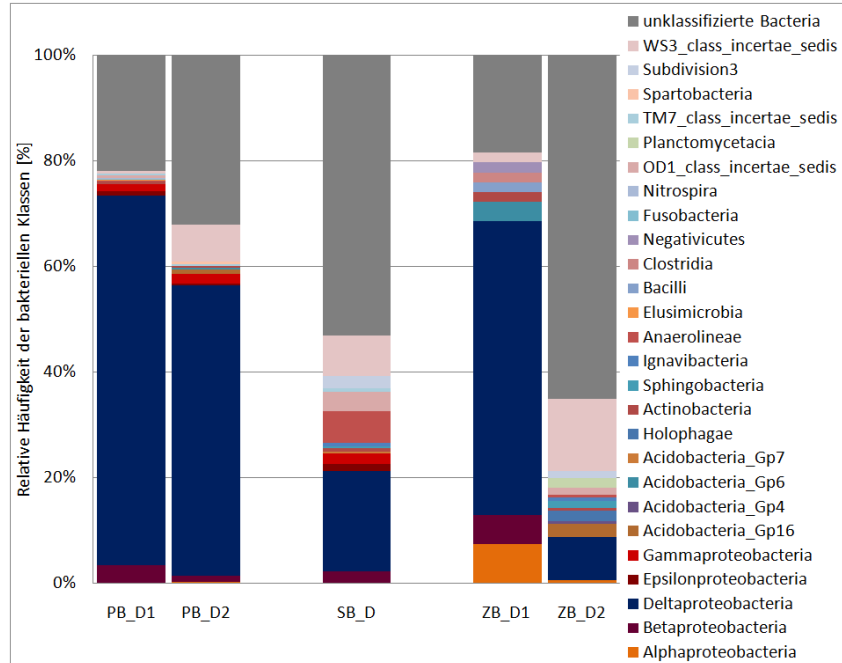


Abbildung 3.3: Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Biofilmproben

Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, B... Biofilm, D... DNA

maliger OTUs war für die Biofilmproben PB_D1 und PB_D2 mit 49% bzw. 42% ähnlich hoch, entsprach aber nur 12% bzw. 8% aller Biofilmsequenzen aus Pöhla. Der Vergleich der beiden Biofilme aus Zobes (ZB) ergab zwar ähnlich wie für Pöhla 8% (5 von 64) gemeinsame OTUs, jedoch repräsentierten diese nur 37% der gesamten Biofilmsequenzen aus Zobes. Der Anteil einmaliger OTUs betrug für ZB_D1 20% mit 9% Sequenzabdeckung und für ZB_D2 72%, die 54% der Biofilmsequenzen aus Zobes repräsentierten. Die drei Monate alten Biofilmgemeinschaften aus Pöhla waren sich folglich hinsichtlich der dominanten Bacteria-OTUs sehr ähnlich. Die bakterielle Diversität war in den untersuchten Biofilmen ungleich verteilt. Der Vergleich unterschiedlich alter Biofilme aus Zobes zeigt, dass sich die Biofilmgemeinschaft bezüglich vorherrschender Bacteria-OTUs veränderte, wenngleich einige Bacteria-OTUs auch nach zwei Monate längerer Inkubation Bestandteil dieser Gemeinschaft blieben.

In den fünf untersuchten Biofilmproben wurde ein gemeinsamer sowie dominanter Biofilm-OTU, OTU0031, detektiert (Tab. 3.5). Zusätzlich wurden für die Biofilmproben aus Pöhla und Schlema vier, darunter drei dominante OTUs (OTU0001, OTU0035 und OTU0006), sowie zwei (OTU0011, OTU0046) für alle Biofilmproben aus Schlema und Zobes ermittelt. Die Ergebnisse weisen auf eine relative Ähnlichkeit der bakteriellen Gemeinschaften in den

3 Ergebnisse

analysierten Biofilmen aus den verschiedenen Urangruben hin. An der Stelle sei nochmals erwähnt, dass die gemeinsamen und als dominant bezeichneten OTUs jedoch nicht in jeder Probe auch dominant vertreten waren.

Tabelle 3.5: Dominante Bacteria-OTUs in 16S rDNA-Bibliotheken aus Biofilmpuben

OTU	Klassifikation	PB_D1	PB_D2	SB_D	ZB_D1	ZB_D2
0001	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, unklassifiziert	67,8%	53,3%	8,9%	n.d.	4,3%
0035	unklassifiziert	9,3%	8,9%	5,3%	n.d.	11,7%
0031	WS3, WS3_class_incertae_sedis, WS3_order_incertae_sedis, WS3_family_incertae_sedis, WS3_genus_incertae_sedis	0,4%	5,2%	5,6%	1,9%	13,0%
0011	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Desulfuromonadales, Geobacteraceae, <i>Geobacter</i>	n.d.	0,4%	0,7%	46,3%	2,5%
0068	unklassifiziert	0,4%	n.d.	2,3%	n.d.	12,3%
0046	unklassifiziert	n.d.	n.d.	1,0%	11,1%	11,1%
0006	unklassifiziert	0,8%	7,0%	0,7%	n.d.	n.d.
0045	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, unklassifiziert	n.d.	n.d.	6,3%	n.d.	n.d.
0044	unklassifiziert	n.d.	n.d.	5,3%	n.d.	0,6%
0136	unklassifiziert	n.d.	n.d.	5,0%	n.d.	n.d.
0081	Proteobacteria, unklassifiziert	n.d.	n.d.	4,3%	n.d.	n.d.

nur OTUs mit > 1% aller Gesamtsequenzen gezeigt

Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, B... Biofilm, D... DNA; n.d.... nicht detektiert

3.3.4 Archaeelle Diversität mikrobieller Gemeinschaften

Die Analyse der archaeellen Diversität wurde, wie für Bacteria, an zwei bzw. drei Flutungswasser- und eine bzw. zwei Biofilmpuben der Standorte Pöhla, Schlema und Zobes durchgeführt.

Die Pyrosequenzierung des 16S rRNA Gen-Abschnitts ergab insgesamt 78266 qualitätsge-

3 Ergebnisse

filterte Sequenzen für Archaea, die mit Hilfe des Programms Mothur 672 OTUs (mit $\geq 97\%$ Sequenzhomologie) zugeordnet werden konnten. Zur Einschätzung der archaeellen Diversität wurden die Alpha-Diversitätscharakteristiken (Tab. 3.6) und Rarefaction-Kurven (Abb. 3.4) der untersuchten Proben auf Basis der OTU-Berechnung erstellt.

Tabelle 3.6: Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rDNA-Bibliotheken der Archaea

Probe ¹	Be- probungs- datum	Anzahl der Se- quenzen	Anzahl der OTUs ²	Cover- age [%] ³	Richness ⁴		Diversity	
					ACE	Chao1	Shannon ⁵	inv- Simpson ⁶
PW_D1	08/2012	12434	138	100%	209	175	2,87	9,33
PW_D2	02/2013	3955	104	99%	169	141	2,82	8,34
PW_D3	03/2013	2996	93	99%	152	138	2,76	7,54
SW_D1	09/2012	8136	168	99%	211	228	2,76	5,09
SW_D2	02/2013	4457	190	98%	455	354	3,04	7,32
SW_D3	03/2013	10748	207	99%	268	256	2,99	6,78
ZW_D1	08/2012	8565	220	99%	287	298	3,36	10,94
ZW_D2	04/2013	3707	173	98%	256	259	2,96	5,61
PB_D1	02/2013	1991	15	100%	24	18	0,52	1,31
PB_D2	07/2013	7687	84	99%	262	170	1,27	2,12
SB_D	02/2013	1257	66	98%	96	102	2,26	3,43
ZB_D1	11/2012	2786	108	99%	146	169	2,76	6,24
ZB_D2	04/2013	9547	35	100%	51	51	0,67	1,59

¹ Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, W... Flutungswasser, B... Biofilm, D... DNA

² Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie

³ Berechnung unter Verwendung des Good's Coverage Estimator

⁴ nichtparametrische Richness-Schätzer

⁵ nichtparametrischer Shannon-Index

⁶ invertierter Simpson-Index

Die Anzahl der Sequenzen pro Probe schwankte zwar mit 1257 bis 12434 sehr stark (Tab. 3.6), wurde aber grundsätzlich für alle Proben als sehr hoch beurteilt. Die resultierende, sehr hohe Coverage von 98 - 100% und die deutlich abnehmenden Anstiege der Rarefaction-Kurven (Abb. 3.4) geben Hinweise darauf, dass die gesamte archaeelle Gemeinschaft in den Flutungswasser- und Biofilmproben erfasst wurde. Das spiegelte sich auch in der geschätzten, tatsächlichen OTU-Anzahl je Probe wider, die mit 24 bis 455 (ACE) und 18 bis 354 (Chao1) um einen Faktor von nur 1,3 bis 3,1 bzw. 1,2 bis 2,0 höher als die jeweilige, ermittelte OTU-Anzahl lag. Basierend auf den Richness-Indizes war SW_D2 die Probe mit dem größten Artenreichtum für Archaea, wogegen die Diversity-Indizes auf ZW_D1 hinweisen. Die Rarefaction-Analyse ermöglichte diesbezüglich auch keine eindeutige Aus-

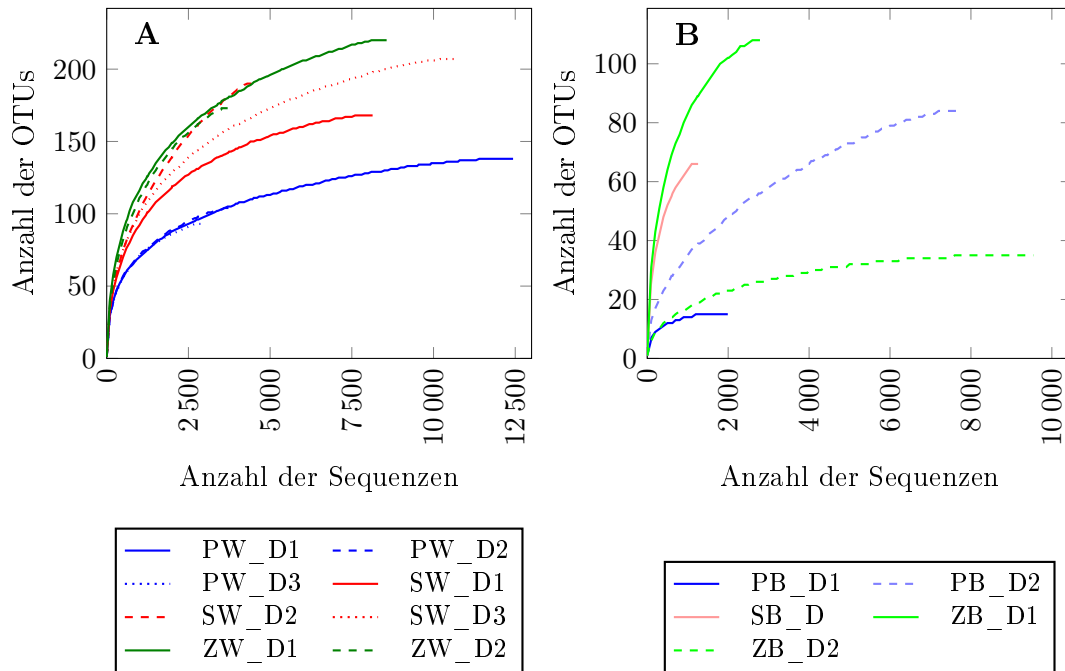


Abbildung 3.4: Rarefaction-Kurven für 16S rDNA-Bibliotheken der Archaea aus (A) 8 Flutungswasser- und (B) 5 Biofilmproben
 16S rDNA-Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie wurden in dasselbe OTU gruppiert.
 Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, D...DNA

sage, da die Graphen für beide Proben einen ähnlichen Verlauf zeigten (Abb. 3.4). Der geringste archaeelle Artenreichtum wurde basierend auf Richness- und Diversity-Indizes als auch Rarefaction-Analyse in der Biofilmprobe PB_D1 festgestellt. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die archaeelle Diversität der untersuchten Biofilmgemeinschaften tendenziell etwas geringer als für planktonische Gemeinschaften aus den Flutungswässern war.

3.3.5 Taxonomische Klassifizierung der Archaea in planktonischen Gemeinschaften

Die acht Flutungswasserproben lieferten insgesamt 54998 Sequenzen für Archaea, die 586 OTUs zugeordnet wurden. Mit Hilfe der RDP-Datenbank erfolgte die taxonomische Einordnung der OTUs in die zwei Phyla Crenarchaeota und Euryarchaeota. In allen Proben wurden 16S rDNA-Sequenzen für beide Phyla detektiert. Die relative Häufigkeit der Crenarchaeota repräsentierenden Sequenzen schwankte für Flutungswasserproben aus Pöhla und Schlema zwischen 4,0 - 10,1% bzw. 11,4 - 17,3%. In den Flutungswasserproben aus Zobes kamen sie mit 32,6% (ZW_D1) und 49,4% (ZW_D2) deutlich häufiger vor. Der Anteil

3 Ergebnisse

der Sequenzen für Euryarchaeota betrug je nach Probe zwischen 3,7 - 63,2% und variierte besonders stark zwischen den einzelnen Proben aus Pöhla. Tendenziell kamen Sequenzen für Euryarchaeota im Vergleich zu Crenarchaeota im Pöhla-Flutungswasser häufiger vor, das Gegenteil traf auf die Flutungswasserproben aus Schlema und Zobes zu. Unklassifizierte Phyla machten sehr häufig über die Hälfte der archaeellen Gesamtsequenzen einer Probe aus und waren besonders stark (77,2 - 84,1%) in den drei Proben aus Schlema vertreten. Während die detektierten Sequenzen für Crenarchaeota alle der Klasse der Thermoprotei zugewiesen wurden, wurden Euryarchaeota-Sequenzen auf die Klassen Methanobacteria, Methanomicrobia, Thermoplasmata und Halobacteria aufgeteilt. Aus der Darstellung der relativen Häufigkeiten der Klassen (Abb. 3.5) ist ersichtlich, dass Thermoplasmata und Halobacteria repräsentierende Sequenzen nicht in allen Flutungswasserproben detektiert wurden und einen sehr geringen Anteil an der gesamten archaeellen Gemeinschaft einer Probe ausmachten. Der Großteil der Euryarchaeota-Sequenzen repräsentierte Methanomicrobia und Methanobacteria. In den Flutungswasserproben aus Pöhla und Zobes deckten Methanomicrobia-Sequenzen 5,9 - 25,2% bzw. 4,9 - 5,7% der Gesamtsequenzen ab. Der Sequenzanteil für Methanobacteria variierte zwischen 4,0 - 34,0% (PW) und 0,6 - 3,1% (ZW). Da in den Flutungswasserproben aus Schlema nur sehr wenige Sequenzen den Euryarchaeota zugeordnet wurden, war der Sequenzanteil zugeordneter Methanomicrobia und Methanobacteria demzufolge entsprechend gering.

In den untersuchten Flutungswasserproben wurden insgesamt 16 Methanobacteria-OTUs ermittelt, die taxonomisch in die Familie der Methanobacteriaceae eingeordnet wurden. Die beiden dominanten Methanobacteria-OTUs wurden der Gattung *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* zugeordnet. Für die Klasse der Methanomicrobia wurden insgesamt 27 OTUs ermittelt, welche die Familien Methanomicrobiales_incerta_sedis, Methanocellaceae, Methanosaetaceae, Methanosarcinaceae und Methanospirillaceae mit den Gattungen *Methanolinea* und *Methanoregula*, *Methanocella*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* bzw. *Methanospirillum* repräsentierten. Bei den drei am häufigsten vorkommenden Methanomicrobia-OTUs handelte es sich um einen Vertreter einer unklassifizierten Ordnung, ein Mitglied der Gattung *Methanoregula* und einem Vertreter der Ordnung Methanosarcinales. Die detektierten Crenarchaeota-Sequenzen aller Flutungswasserproben wurden insgesamt 69 Thermoprotei-OTUs zugewiesen, die fast alle taxonomisch nicht detaillierter zugeordnet werden konnten.

Der Vergleich der Archaea-OTUs zwischen den drei verschiedenen Flutungswasserproben

3 Ergebnisse

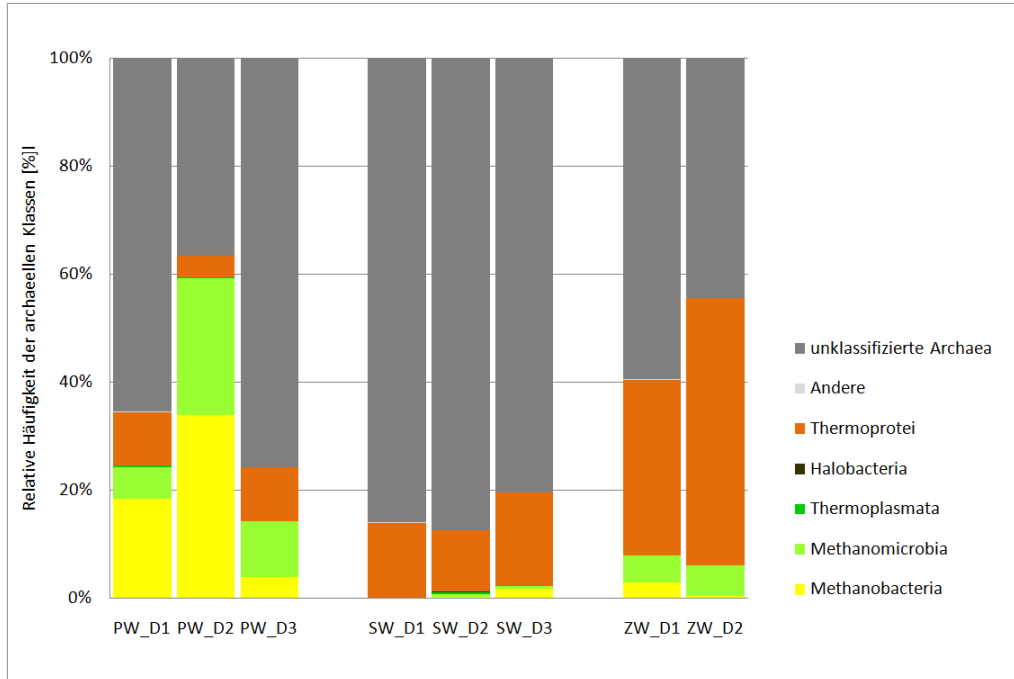


Abbildung 3.5: Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Flutungswasserproben

Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA

aus Pöhla ergab 63 (33%) gemeinsame von insgesamt 192 OTUs, die 98% der Sequenzen abdeckten. Es wurden 31% (PW_D1), 15% (PW_D2) und 12% (PW_D3) einmalig vorkommende OTUs ermittelt, deren Sequenzanteil jeweils mit max. 1% entsprechend gering ausfiel. Für die Flutungswasserproben aus Schlema wurden 86 (26%) gemeinsame von insgesamt 336 OTUs ermittelt, die wiederum 96% der gesamten Sequenzen ausmachten. Für die Proben SW_D1, SW_D2 und SW_D3, wurden 49 (15%), 74 (22%) und 71 (21%) einmalige OTUs identifiziert. Ähnlich wie für Pöhla, deckten diese OTUs jeweils weniger als 1% der Sequenzen ab. Für die beiden Flutungswasserproben aus Zobes wurden 113 (40%) gemeinsame von 280 OTUs mit 96% Sequenzanteil bestimmt. Die Differenz setzte sich aus 107 (38%) und 60 (21%) einmaligen OTUs für ZW_D1 bzw. ZW_D2 zusammen, die weitere 3% bzw. weniger als 1% der Sequenzen abdeckten. Folglich kann zusammengefasst werden, dass weniger als die Hälfte der detektierten Archaea-OTUs die archaeelle Gemeinschaft in den Flutungswasserproben der jeweiligen Urangrube nahezu vollständig dominierten. Da sie wiederholt (in mehreren Proben) detektiert wurden, konnten sie als wichtiger Bestandteil der planktonischen Gemeinschaften angenommen werden.

3 Ergebnisse

Zwischen den acht Flutungswasserproben der verschiedenen Standorte wurden 25 gemeinsame Archaea-OTUs bestimmt, von denen die meisten allerdings taxonomisch nicht einzuordnen waren. Zwölf dieser gemeinsamen OTUs waren jedoch dominant (mind. 1% der Sequenzen) und deckten zusammen 61,2% aller archaeellen Flutungswassersequenzen ab. Zusätzlich wurden für die Flutungswasserproben aus Pöhla und Schlema sieben, Pöhla und Zobes 19 sowie Schlema und Zobes 14 gemeinsame OTUs ermittelt. Mit Ausnahme von zwei gemeinsamen OTUs für Pöhla und Zobes bzw. Schlema und Zobes handelte es sich nicht um dominante OTUs. Im Fall der erstgenannten Standorte wurden die beiden dominanten OTUs als *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* identifiziert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die planktonischen Gemeinschaften in Bezug auf dominant vorkommende Archaea in den drei verschiedenen Urangruben sehr ähnelten.

3.3.6 Taxonomische Klassifizierung der Archaea in Biofilmgemeinschaften

Insgesamt ergab die Pyrosequenzierung der archaeellen 16S rDNA-Sequenzen aus Biofilmpuben der Standorte Pöhla, Schlema und Zobes 23268 Sequenzen mit 204 OTUs, die neben unklassifizierten Phyla - Euryarchaeota oder Crenarchaeota zugeordnet wurden. Nahezu alle archaeellen Sequenzen der Biofilmpuben PB_D1, PB_D2 und ZB_D2 wurden den Euryarchaeota zugewiesen. Bei den Proben ZB_D1 und SB_D deckten Euryarchaeota repräsentierende Sequenzen ca. die Hälfte der entsprechenden Gesamtsequenzen ab bzw. wurden selten detektiert. Im Vergleich zu den anderen enthielten diese beiden Biofilmpuben deutlich mehr Sequenzen, die als unklassifizierte Archaea galten. In der Biofilmprobe aus Schlema (SB_D) machten sie sogar den Großteil der Sequenzen aus. Einen Anteil von 8,5% und 5,1% der Sequenzen in den Proben SB_D bzw. ZB_D2 wurde den Crenarchaeota der Klasse Thermoprotei zugeordnet (Abb. 3.6), für die insgesamt 21 OTUs ermittelt wurden. In den Biofilmpuben wurden Euryarchaeota repräsentierende Sequenzen hauptsächlich in die Familien Methanomicrobia und Methanobacteria sowie relativ selten in die Thermoplasmata und Halobacteria eingeordnet (Abb. 3.6). Im Fall von PB_D1 und ZB_D1 wurden diese fast ausschließlich den Methanobacteria zugeordnet. Für die Biofilmprobe PB_D2 wurden 84,9% der archaeellen Sequenzen den Methanobacteria und 11,8% den Methanomicrobia zugewiesen. Die Probe ZB_D2 war die einzige, die fast nur Sequenzen für Methanomicrobia enthielt und unterschied sich demzufolge stark von ZB_D1, welche eine fünf Monate alte Biofilmgemeinschaft aus Zobes repräsentierte.

Insgesamt wurden in den Biofilmpuben 11 Methanomicrobia- und 15 Methanobacteria-

3 Ergebnisse

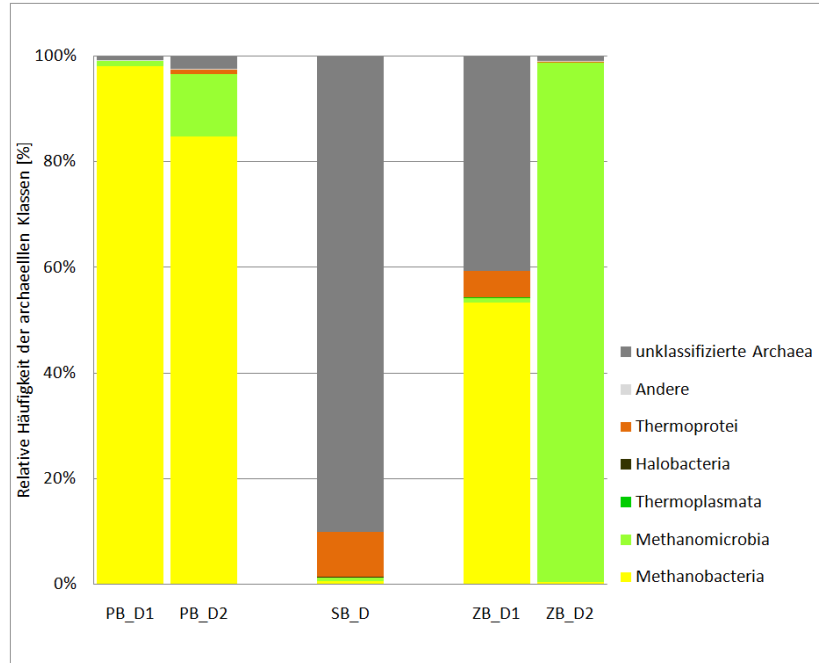


Abbildung 3.6: Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Biofilmproben

Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter “Andere” zusammengefasst.

Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, B... Biofilm, D... DNA

OTUs ermittelt. Einige Methanomicrobia-OTUs wurden als Vertreter der Ordnung Methanosarcinales und Methanomicrobiales mit der Gattung *Methanomethylovorans* und *Methanosaeta* bzw. *Methanoregula* und *Methanolinea* klassifiziert. Die zwei am häufigsten vorkommenden OTUs dieser Familie gehörten jeweils zu einer unklassifizierten Ordnung und zur Ordnung Methanosarcinales. Alle klassifizierten Methanobacteria-OTUs gehörten zur Familie der Methanobacteriaceae, wobei die beiden dominanten Methanobacteria-OTUs jeweils der Gattung *Methanobrevibacter* und *Methanobacterium* zugeordnet wurden.

Der Vergleich der detektierten Archaea-OTUs zwischen den verschiedenen Proben eines Standortes war nur für Pöhla und Zobes möglich. Es konnten neun (11%) gemeinsame von insgesamt 84 OTUs mit 96% Sequenzabdeckung für die beiden Biofilmproben aus Pöhla ermittelt werden. Die meisten (89%) OTUs wurden zwar einmalig in der Probe PB_D1 detektiert, deckten aber nur 3% der gesamten Sequenzen ab. Bei den Biofilmproben aus Zobes stimmten 22 (18%) von 121 OTUs überein, die 78% der Sequenzen ausmachten. Nur in der Probe ZB_D1 und ZB_D2 wurden 71% bzw. 11% der OTUs mit 5% bzw. 17% der Sequenzen bestimmt. Ähnlich wie für die planktonischen Gemeinschaften wurde die archaeelle Diversität in den untersuchten Biofilmen nur von einer Minderheit der

3 Ergebnisse

Archaea-OTUs dominiert. Die fünf Monate alte Biofilmgemeinschaft aus Zobes unterschied sich deutlich vom 3-monatigen Biofilm desselben Standortes hinsichtlich des Vorkommens dominanter Archaea und der archaeellen Diversität.

Der Vergleich der fünf Biofilmproben der drei Standorte ergab drei gemeinsame OTUs, von denen zwei zu den insgesamt sechs dominanten Archaea-OTUs aller Biofilme zählten und zusammen 51% der gesamten Sequenzen abdeckten. Die zwei dominanten OTUs repräsentierten die Gattung *Methanobacterium* bzw. ein unklassifiziertes Mitglied der Methanomicrobia. Für die Biofilmproben aus Pöhla und Schlema wurden zwei weitere, gemeinsame OTUs, darunter ein dominanter OTU repräsentativ für einen unklassifizierten Vertreter der Ordnung Methanosarcinales, ermittelt. Zusätzlich wurde ein dominanter, *Methanobrevibacter* repräsentierender OTU gemeinsam für Pöhla- und Zobes-Biofilme sowie 13 gemeinsame mit zwei dominanten unklassifizierten Archaea-OTUs für Biofilme aus Schlema und Zobes bestimmt. Die drei Urangruben waren sich bezüglich einiger dominant vorkommenden Archaea-OTUs in den Biofilmgemeinschaften ähnlich, wobei deutliche Unterschiede für die relativen Abundanzen dieser Archaea-OTUs insbesondere für die Biofilmgemeinschaft aus Schlema festgestellt wurden.

3.3.7 Zusammensetzung planktonischer Gemeinschaften

Um die quantitative Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft kultivierungsunabhängig und ohne Nukleinsäureextraktion mit anschließender Amplifizierung des 16S rRNA-Gens zu ermitteln, wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt. Die planktonischen Mikroorganismen wurden aus den Flutungswasserproben der drei Standorte fixiert, auf Membranen filtriert und in mehreren Schritten den Sonden zur Hybridisierung zugänglich gemacht. Nach der Sondenhybridisierung erfolgte die mikroskopische Auszählung fluoreszierender Objekte. Da bei der zunächst angewandten, klassischen FISH mit Fluorochrom-markierten 16S rRNA-Oligonukleotidsonden keine Signale für Eubacteria detektiert wurden, wurde die sensitivere Catalysed Reporter Deposition FISH (CARD-FISH) verwendet.

Zunächst wurde der Einfluss unspezifischer Hybridisierungen mit Hilfe der NONEUB-Sonde eingeschätzt. Für alle hier untersuchten Flutungswasserproben wurden nur sehr wenig unspezifische Signale detektiert. Da der Anteil der Objekte mit Hintergrundfluoreszenz deutlich weniger als 1% der Gesamtzellzahl ausmachte, wurden sie als vernachlässigbar beurteilt. Die Gesamtheit der Eubacteria wurde mit dem Sondengemisch EUB338 I/II/III

3 Ergebnisse

erfasst und deren Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. Im Flutungswasser aus Zobes, Schlema und Pöhla wurden für Eubacteria relative Abundanzen von 78%, 83% bzw. 64% bestimmt. Zur Quantifizierung von Archaea wurde die Sonde ARCH915 zur Hybridisierung eingesetzt. Für Pöhla und Schlema konnten keine fluoreszierenden Objekte detektiert werden. Bei der Flutungswasserprobe aus Zobes wurden insgesamt so wenige Signale festgestellt, dass der Anteil der ARCH915-hybridisierten Zellen an der Gesamtzellzahl weniger als 1% betrug. Durch die Verwendung einer Positivkontrolle (MPN-Kultur mit Methanogenen) konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellpräparation ungeeignet oder die Sonde defekt war.

Die Verwendung spezifischer Sonden für einzelne, taxonomische Gruppen ermöglichte eine detailliertere Untersuchung der bakteriellen Lebensgemeinschaft hinsichtlich ihrer Zusammensetzung im Flutungswasser. Dabei lag der Fokus auf der Quantifizierung der Epsilon- und Betaproteobacteria, die als dominante Klassen aus der Sequenzierung hervorgingen. Epsilonproteobacteria wurden mit der EPSY549-Sonde detektiert, da diese unter den kommerziell erhältlichen Sonden die einzige war, die 100% komplementär zur 16S rRNA-Basensequenz der Gattung *Sulfuricurvum* ist. Da mit der in der Literatur beschriebenen Formamidkonzentration von 55% [218] keine Signale detektiert werden konnten, wurde die Formamidkonzentration mit einer Reinkultur von *Sulfuricurvum kujiense* (Stamm YK-1, DSMZ, Braunschweig) zunächst optimiert. Eine optimale Formamidkonzentration von 0% wurde dabei ermittelt. Um den Einfluss unspezifischer Sondenhybridisierungen abzuschätzen bzw. auszuschließen, wurden als Negativkontrolle Flutungswasserproben aus der Urangrube Königstein (erhalten von I. Zirnstern, HZDR) verwendet, die laut Sequenzierung keine Epsilonproteobacteria enthielten. Mit der optimierten Formamidkonzentration von 0% wurden keine Sondensignale in der Negativkontrolle detektiert. Wie in Abb. 3.7 dargestellt, wurden 13,2% (Zobes), 58,7% (Schlema) und 14,5% (Pöhla) Epsilonproteobacteria repräsentierende Zellen unter den Eubacteria ermittelt. Die Abundanz der Betaproteobacteria wurde mit der BET42a-Sonde bestimmt. Da sich die 23S rRNA in dem zu hybridisierenden Abschnitt nur um eine Base zwischen Beta- und Gammaproteobacteria unterscheidet, sollten Fehlhybridisierungen dieser Sonde durch Zugabe der entsprechenden, unmarkierten Kompetitorsonde verhindert werden. Betaproteobacteria repräsentierende Zellen wurden mit 64,6%, 28,8% und 47,9% für Flutungswasser aus Zobes, Schlema bzw. Pöhla bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen stellten Epsilon- und Betaproteobacteria den größten Anteil der Eubacteria dar. Ergänzend wurden Alpha-

3 Ergebnisse

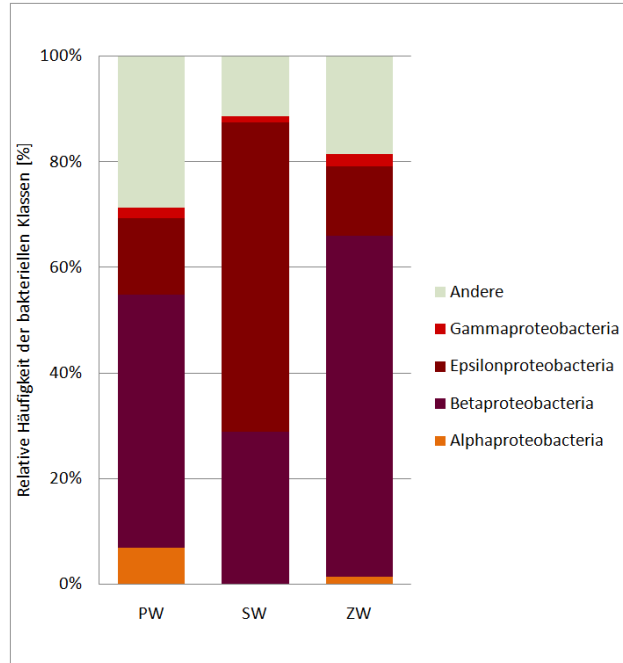


Abbildung 3.7: Bakterielle Zusammensetzung der planktonischen Gemeinschaften aus Flutungswasserproben

“Andere” bezeichnet Bacteria, die mit den verwendeten, klassenspezifischen Sonden nicht detektiert wurden. Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, W... Flutungswasser

und Gammaproteobacteria mit der ALF968-Sonde bzw. Gam42a- und der entsprechenden Kompetitorsonde untersucht. Alphaproteobacteria repräsentierende Zellen wurden im Flutungswasser aus Schlema gar nicht detektiert, wohingegen für Zobes und Pöhla Abundanzen von 1,4% bzw. 6,9% ermittelt wurden. Gammaproteobacteria deckten nur zwischen 1,2 - 2,4% der Eubacteria ab. Mit den verwendeten, spezifischen Sonden wurden die bakteriellen Lebensgemeinschaften in den Flutungswasserproben größtenteils erfasst. Die basierend auf CARD-FISH ermittelten Abundanzen stimmen insbesondere für Beta- und Epsilonproteobacteria sehr gut mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung für die zugehörigen Proben PW_D2 und SW_D2 überein. Für Flutungswasser aus Zobes wurden mittels CARD_FISH allerdings mehr Betaproteobacteria (64,6% *vs.* 34,0%) und weniger Epsilonproteobacteria (13,2% *vs.* 22,7%) als mit der Pyrosequenzierung für die zugehörige Probe ZW_D2 ermittelt.

3.3.8 Zusammenhang zwischen hydrochemischen Faktoren und mikrobiellen Gemeinschaftsstrukturen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Umweltbedingungen im Flutungswasser und der Struktur planktonischer Gemeinschaften festzustellen, wurden basierend auf den hydrochemischen Daten der drei Urangruben und ermittelten bakteriellen OTUs für jeweils zwei bis drei verschiedenen Proben eines Standortes Clusteranalysen durchgeführt und die Ergebnisse in Form von Dendrogrammen und NMDS-Plots visualisiert.

Wie aus Abb. 3.8 ersichtlich ist, ähneln sich die Strukturen der beiden Dendrogramme, welche die Proben hinsichtlich der bakteriellen Gemeinschaftsstruktur und hydrochemischen Charakteristik darstellen. Dies deutet auf eine Verbindung der gemessenen Umweltparameter und der ermittelten Struktur der bakteriellen Gemeinschaften hin. Der Vergleich der standardisierten chemischen Daten bestätigt nochmals die größere Ähnlichkeit der Flutungswässer aus Pöhla und Zobes.

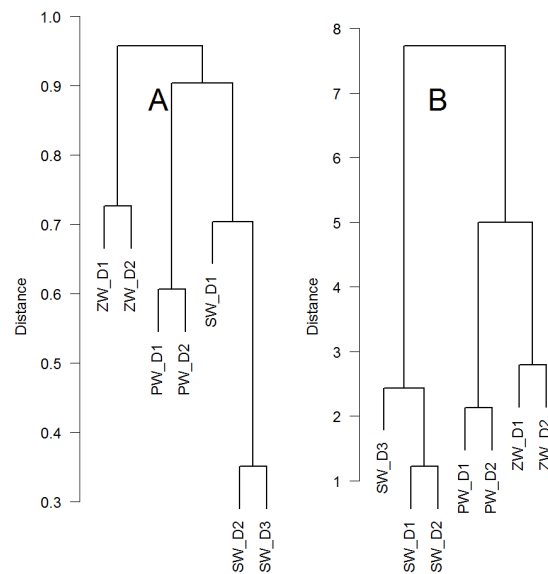


Abbildung 3.8: Hierarchische Clusterdendrogramme der Flutungswasserproben basierend auf (A) normierten OTU-Abundanzen aus 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria und Bray-Curtis Dissimilarities oder (B) standardisierten hydrochemischen Daten und Euclidean Distances
Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA

Hydrochemische Daten des entsprechenden Beprobungsdatums stammen aus dem Monitoring der Wismut GmbH (erhalten von Herrn Dr. Jenk)

Aus dem NMDS-Plot (Abb. 3.9) kann ein möglicher Zusammenhang durch die Visualisierung der normierten OTU-Abundanzen und standardisierten chemischen Daten für die

3 Ergebnisse

verschiedenen Flutungswasserproben im Koordinatensystem weiter entwirrt und der Einfluss einzelner chemischer Stressfaktoren abgeschätzt werden. Die Proben eines Standortes wurden aufgrund ihrer relativ hohen Ähnlichkeit durch nur einen Punkt im Plot dargestellt. Entlang der 1. Ordinatenachse (NMDS1) werden die Flutungswasserproben für Zobes (ZW) und Pöhla (PW) von denen für Schlema (SW) separiert. Eine weitere Trennung ist für ZW und PW entlang der 2. Ordinatenachse (NMDS2) sichtbar. Durch die Pfeillänge für einzelne Stressfaktoren lässt sich zusammen mit den ermittelten statistischen Signifikanzwerten (p) die Bedeutung dieser Parameter auf die Gemeinschaftsstruktur abschätzen. Den größten Einfluss auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften hatte demnach Radium (Ra-226, $p = 0,000999$). Für alle anderen betrachteten Parameter mit Ausnahme von gelöstem Sauerstoff (O2_Feld) und Eisen (Fe) wurde ebenso ein bedeutender Zusammenhang mit der Gemeinschaftsstruktur planktonischer Bacteria festgestellt. Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften wurde nach Radium durch folgende Stressfaktoren der Reihenfolge nach mit abnehmender Signifikanz beeinflusst: pH-Wert (pH_Feld) und elektrische Leitfähigkeit (Lf_Feld) und As > Carbonat (HCO3) und Ca > Mg und K > Sulfat (SO4) > Na > Mn und Cl > Redoxpotential (Eh_Feld) > Temperatur (Temp_Feld) > U. Im NMDS-Plot zeigen die Stressfaktoren elektrische Leitfähigkeit (Lf_Feld), Temperatur (Temp_Feld), Na, Ca, Sulfat (SO4), Carbonat (HCO3) und U einen Effekt in die gleiche Richtung und bilden die 1. Ordinatenachse. Wie anhand der Lokalisation von SW im NMDS-Plot erkennbar ist, waren im Vergleich zu PW und ZW höhere Werte dieser Faktoren typisch für Flutungswasserproben aus Schlema.

Die in Abb. 3.9 dargestellten Verteilungsellipsen für detektierte Phyla zeigen die gleiche Verteilung der Phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria und TM7 für alle Proben. Das deutet daraufhin, dass kein Phylum einzigartig für einen bestimmten Standort war. Auf Ebene der bakteriellen Klassen sind kleine Unterschiede in der Verteilung zwischen den Standorten sichtbar. Anhand der Verteilungsellipsen ist zu entnehmen, dass Gammaproteobacteria typischer für Flutungswasserproben aus Pöhla (PW) und Schlema (SW) waren. Dagegen waren OTUs der Klassen Subdivision3, Betaproteobacteria, TM7_class_incertae_sedis, Clostridia und Epsilonproteobacteria charakteristischer für Flutungswasserproben aus Zobes (ZW). Dehalococcoidetes wurden eher in Flutungswasserproben aus Schlema (SW) detektiert.

Es kann zusammengefasst werden, dass sich die Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaften zwischen den Standorten am besten durch unterschiedliche Radi-

3 Ergebnisse

umkonzentrationen erklären lassen. Hinsichtlich der Verteilung bakterieller Klassen in den Flutungswasserproben der drei Standorte wurden nur geringe Unterschiede festgestellt.

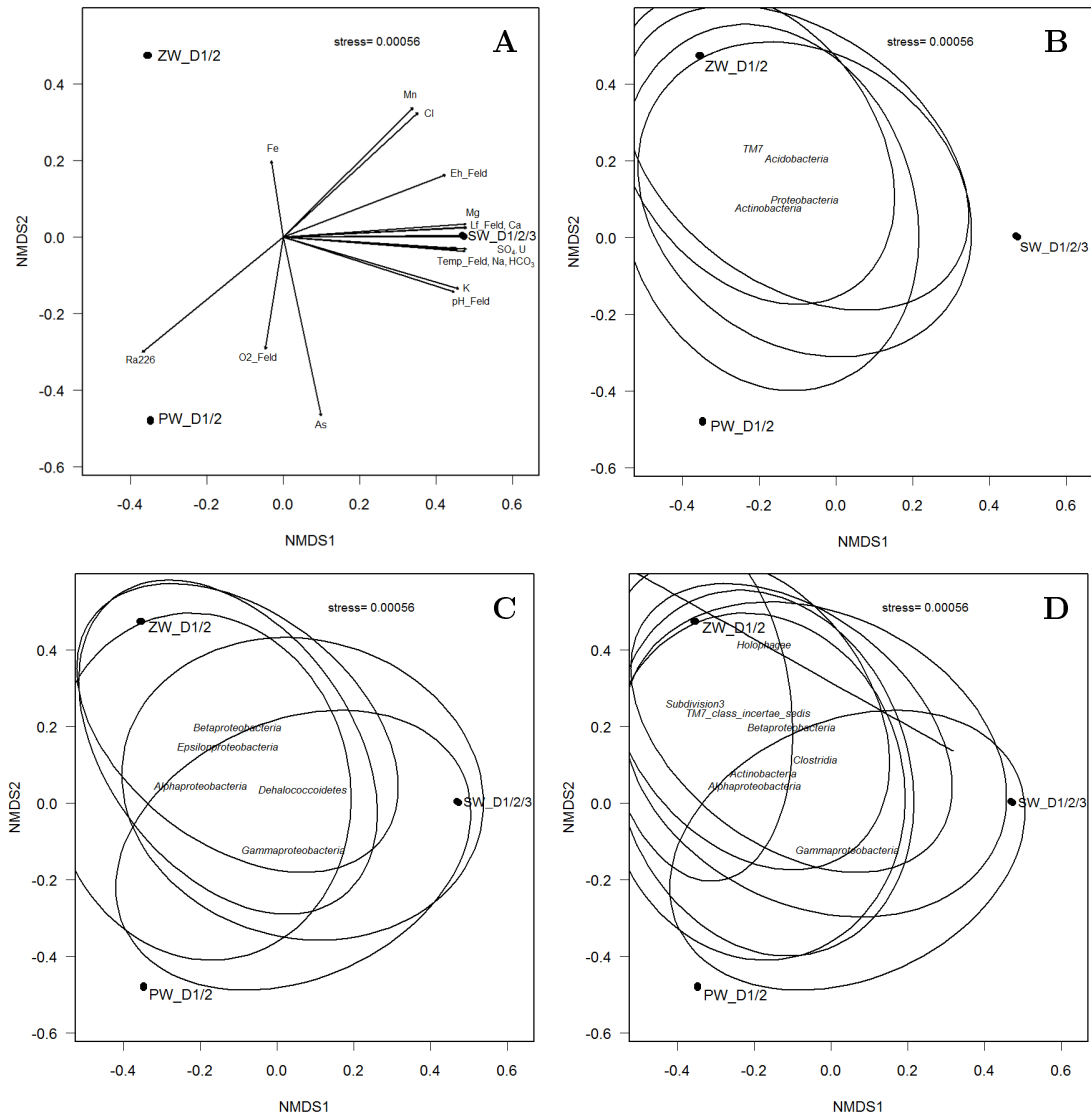


Abbildung 3.9: NMDS-Plots der Flutungwasserproben basierend auf normierten OTU-Abundanzen aus 16S rDNA-Bibliotheken der Bacteria

(A) Die Pfeile stellen Projektionen möglicher Erklärungsvariablen dar, die mittels Vektoranpassung erhalten wurden. SO₄...SO₄²⁻ (Sulfat); HCO₃...HCO₃⁻ (Carbonat); Feld...Feldmessung, (B) Ausgewählte Phyla und (C, D) Klassen werden durch Verteilungsellipsen repräsentiert. Die Bezeichnung der jeweiligen Ellipse liegt mittig. Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA

3.4 Molekularbiologische Charakterisierung stoffwechselaktiver Gemeinschaften

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ausgehend von extrahierter DNA tote oder inaktive Mikroorganismen bei der Pyrosequenzierung mit erfasst wurden, wurden die mikrobiellen Gemeinschaften zur besseren Beurteilung ihrer stoffwechselaktiven Fraktion zusätzlich zur DNA- auf RNA-Ebene untersucht. Zur Charakterisierung der stoffwechselaktiven Gemeinschaft wurde der entsprechend DNA-komplementäre Sequenzabschnitt der 16S rRNA nach Synthese der cDNA auf gleiche Weise amplifiziert und analysiert (Kap. 2.6.9, Kap. 2.6.12). Die Flutungswasserproben für die planktonischen Gemeinschaften und Biofilme wurden nach dem gleichen Prinzip wie in Kap. 3.3 erklärt entsprechend als PW_R, SW_R, ZW_R und PB_R, SB_R, ZB_R1 sowie ZB_R2 bezeichnet, wobei R für RNA steht. Die Bezeichnungen wurden auch für die repräsentierte Gemeinschaft und 16S rRNA-Bibliothek verwendet.

3.4.1 Bakterielle Diversität stoffwechselaktiver Gemeinschaften

Zur Bestimmung der Diversität stoffwechselaktiver Bacteria wurden für jeden Standort jeweils eine Flutungswasser- und eine Biofilmprobe analysiert. Nur für Zebes wurden zwei Biofilmproben, die sich hinsichtlich ihrer Inkubationszeiten unterschieden, untersucht. Die Pyrosequenzierung der cDNA-Sequenzen des 16S rRNA-Fragments lieferte insgesamt 34861 qualitätsgefilterte Sequenzen mit 1837 OTUs (mit $\geq 97\%$ Sequenzhomologie) für Bacteria (Tab. 3.7). Die Anzahl der Sequenzen pro Probe variierte zwischen 347 und 8974, wobei ZB_R2 mit deutlichem Abstand die geringste Sequenzanzahl aufwies. Die hohe Coverage von 82 - 99% und die abflachenden Rarefaction-Kurven (Abb. 3.10) deuten daraufhin, dass genügend Sequenzen je Probe analysiert wurden, um die bakterielle Gemeinschaft in den Flutungswasser- und Biofilmproben nahezu vollständig zu erfassen. Die mit Hilfe der Richness-Indizes geschätzte, tatsächliche OTU-Anzahl war für alle Biofilmproben, auch bei sehr hohen Sequenzanzahlen, deutlich kleiner als für die Flutungswasserproben. Die höchsten Richness- und Diversity-Indizes als auch den größten Kurvenanstieg bei der Rarefaction-Analyse wurden für die Flutungswasserprobe ZW_R ermittelt, die demzufolge die artenreichste der untersuchten Proben war. Auch wenn für die Biofilmprobe ZB_R2 die tatsächliche OTU-Anzahl unter allen Proben am geringsten geschätzt wurde, weisen die ermittelten Diversity-Indizes zusammen mit der Rarefaction-Analyse daraufhin, dass die

3 Ergebnisse

Biofilmprobe PB_R den geringsten, bakteriellen Artenreichtum aufwies. Für die übrigen Flutungswasser- und Biofilmproben konnte kein deutlicher Unterschied in Bezug auf die bakterielle Diversität festgestellt werden.

Tabelle 3.7: Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rRNA-Bibliotheken der Bacteria

Probe ¹	Be- probungs- datum	Anzahl der Se- quenzen	Anzahl der OTUs ²	Cover- age [%] ³	Richness ⁴ ACE	Chao1	Diversity Shannon ⁵	inv- Simpson ⁶
PW_R	07/2013	4172	374	95%	1361	905	3,31	8,68
SW_R	03/2013	7466	434	97%	1144	870	2,77	5,90
ZW_R	04/2013	5643	642	94%	1559	1116	4,43	23,50
PB_R	02/2013	8974	163	99%	522	309	0,63	1,22
SB_R	02/2013	2168	237	94%	665	445	3,82	15,53
ZB_R1	11/2012	6091	404	97%	776	634	3,57	9,70
ZB_R2	04/2013	347	104	82%	338	238	3,66	15,97

¹ Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, D...DNA

² Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie

³ Berechnung unter Verwendung des Good's Coverage Estimator

⁴ nichtparametrische Richness-Schätzer

⁵ nichtparametrischer Shannon-Index

⁶ invertierter Simpson-Index

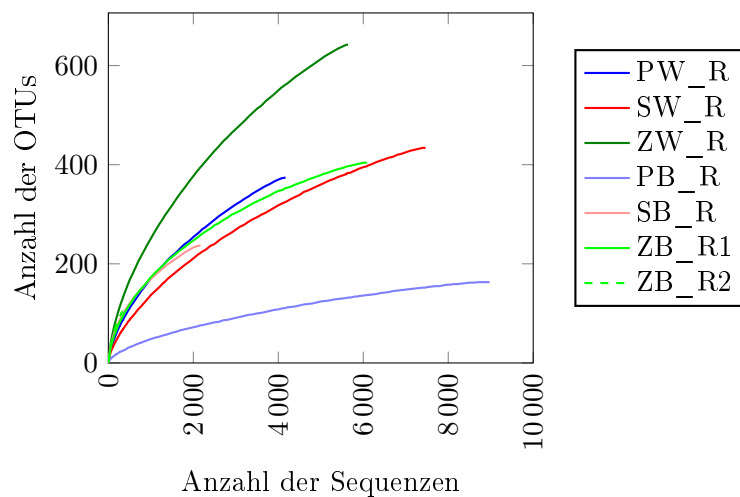


Abbildung 3.10: Rarefaction-Kurven für 16S rRNA-Bibliotheken der Bacteria aus (A) 3 Flutungswasser- und (B) 4 Biofilmproben

cDNA-Sequenzen der 16S rRNA-Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie wurden in dasselbe OTU gruppiert.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, R...RNA

3.4.2 Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Bacteria in planktonischen Gemeinschaften

Zur Beschreibung der stoffwechselaktiven, bakteriellen Gemeinschaft im Flutungswasser der drei Urangruben standen nach der Pyrosequenzierung insgesamt 17821 Sequenzen für die taxonomische Einordnung zur Verfügung. Die Sequenzen konnten 1325 OTUs und 20 (ohne unklassifizierte) verschiedenen bakteriellen Phyla zugeordnet werden. Bei den zugeordneten Phyla handelte es sich um Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, BRC1, Chlorobi, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Elusimicrobia, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, SR1, TM7, Verrucomicrobia und WS3. Da die Flutungswasserprobe aus Pöhla zur Extraktion von Gesamt-RNA aufgrund technischer Schwierigkeiten zu einem späteren Zeitpunkt als für die Extraktion von Gesamt-DNA entnommen wurde, sind die bakteriellen Gemeinschaften nicht direkt vergleichbar, daher wird diese Probe (PW_R) in der folgenden Beschreibung nicht mit berücksichtigt. Für die 16S rRNA-Bibliothek der Flutungswasserprobe aus Schlemma (SW_R) und Zobes (ZW_R) wurden die detektierten Sequenzen jeweils 11 bzw. 17 Phyla zugewiesen. Damit wurden auch nahezu alle der mit den entsprechenden 16S rDNA-Bibliotheken (SW_D3 bzw. ZW_D2) erfassten Phyla detektiert. In der 16S rRNA-Bibliothek der Probe SW_R wurden zwar keine Sequenzen für OD1, TM7 und SR1 ermittelt, aber ergänzend zu SW_D3 wurden *Deinococcus-Thermus* und *Verrucomicrobia* repräsentierende Sequenzen detektiert. Im Fall der beiden Flutungswasserproben aus Zobes, ZW_D2 und ZW_R, hat sich die Anzahl der detektierten Phyla nicht verändert. Allerdings wurden in ZW_D2 Sequenzen für OD1 und *Deinococcus-Thermus* erfasst, wohingegen in ZW_R *Nitrospira* und *Planctomycetes* repräsentierende Sequenzen detektiert wurden. Unklassifizierte Phyla machten je nach Probe 6,2% (SW_R) bzw. 27,0% (ZW_R) und damit weniger als die Hälfte der Sequenzen aus. Wie für die Probe SW_D3 beschrieben, dominierten proteobakterielle Sequenzen auch in SW_R (92,9%). Die in der Flutungswasserprobe ZW_R detektierten Sequenzen wurden mit 25,3% den *Proteobacteria*, 22,8% den *Acidobacteria* und mit 18,0% den *Verrucomicrobia* zugeordnet. Damit war die relative Abundanz von *Proteobacteria* repräsentierenden Sequenzen in der 16S rRNA-Bibliothek deutlich niedriger als in der zugehörigen 16S rDNA-Bibliothek (59,9%). Die relativen Häufigkeiten der zugewiesenen, bakteriellen Klassen für die Flutungswasserproben SW_R, SW_D3, ZW_R und ZW_D2 wurden in Abb. 3.11 gegenübergestellt. In jeder Probe wurden *Proteobacteria*-Sequenzen in fünf Klassen eingeordnet. *Deltaproteobacteria*-Sequenzen

3 Ergebnisse

machten nur einen geringen Anteil in allen Proben aus. Dagegen waren Betaproteobacteria repräsentierende Sequenzen mit 69,0% in SW_R relativ stark vertreten. In der Flutungswasserprobe ZW_R wurden nur 8,8% Betaproteobacteria-Sequenzen und damit deutlich weniger als in ZW_D2 detektiert. Ähnlich wie für SW_D3 wurde in SW_R ein hoher Anteil (18,6%) Epsilonproteobacteria repräsentierender Sequenzen ermittelt. Für ZW_R wurden im Vergleich zu ZW_D2 höhere relative Abundanzen für Alphaproteobacteria repräsentierende Sequenzen festgestellt. Die für ZW_R häufig detektierten Acidobacteria- und Verrucomicrobia-Sequenzen wurden mit 18,2% zur Klasse Acidobacteria_Gp6 bzw. mit 17,5% zur Subdivision3 zugeordnet.

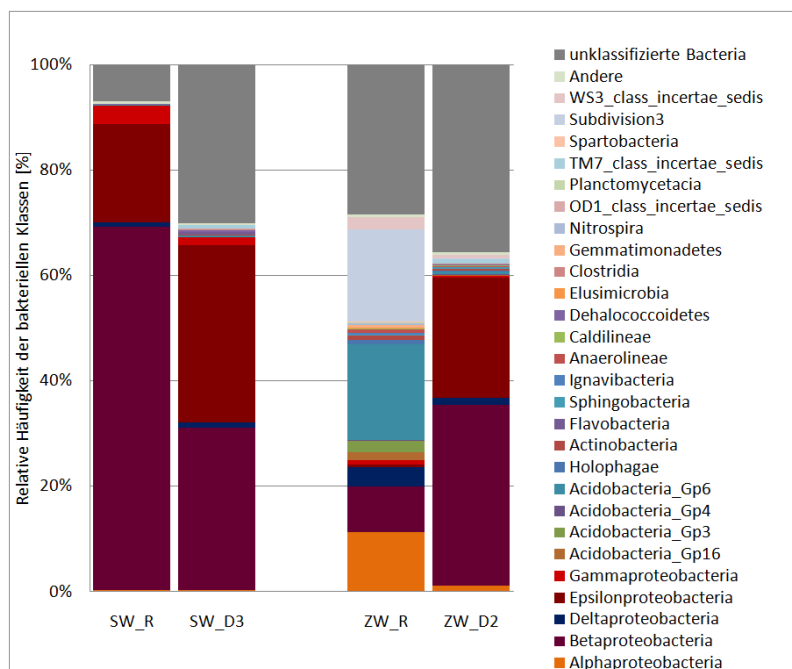


Abbildung 3.11: Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Flutungswasserproben

Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA, R...RNA

Trotz geringerer relativer Abundanzen wurden für die 16S rRNA-Bibliotheken mehr Betaproteobacteria-OTUs als in den 16S rDNA-Bibliotheken ermittelt. In der Probe SW_R ist auch die Anzahl von Epsilonproteobacteria-OTUs höher als in SW_D3; umgekehrt ist es für die Flutungswasserproben aus Zobes. Die in Probe ZW_R ermittelten, häufigeren OTUs für Acidobacteria_Gp6 und Subdivision3 sind taxonomisch nicht detaillierter beschrieben. Alphaproteobacteria-OTUs wurden insgesamt elf verschiedenen Familien zu-

3 Ergebnisse

geordnet. Bei dem am meisten vorkommenden OTU dieser Klasse (OTU0038) handelte es sich um einen unklassifzierten Vertreter der Acetobacteraceae (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Dominante Bacteria-OTUs in 16S rRNA-Bibliotheken aus Flutungswasserproben

OTU	Klassifikation	SW_R	ZW_R
0005	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, unklassifiziert	33,7%	n.d. ¹
0016	Proteobacteria, Betaproteobacteria, unklassifiziert	17,5%	n.d. ¹
0002	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacteriales, Helicobacteraceae, <i>Sulfuricurvum</i>	13,5%	n.d. ²
0017	Verrucomicrobia, Subdivision3, Subdivision3_order_incertae_sedis, Subdivision3_family_incertae_sedis, <i>3_genus_incertae_sedis</i>	n.d. ¹	14,1%
0032	Acidobacteria, Acidobacteria_Gp6, Acidobacteria_Gp6_order_incertae_sedis, Acidobacteria_Gp6_family_incertae_sedis, Gp6	n.d. ¹	10,5%
0007	Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacteriales, Helicobacteraceae, <i>Sulfurimonas</i>	4,8%	0,1%
0009	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Hydrogenophilales, Hydrogenophilaceae, <i>Thiobacillus</i>	4,2%	n.d. ¹
0038	Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Acetobacteraceae, unklassifiziert	n.d. ¹	5,5%
0030	Proteobacteria, Betaproteobacteria, unklassifiziert	4,0%	< 0,1%
0008	Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclales, Rhodocyclaceae, unklassifiziert	3,0%	0,9%
0047	unklassifiziert	n.d. ¹	4,8%
0053	unklassifiziert	n.d. ²	3,9%
0001	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, unklassifiziert	0,3%	2,6%
0087	unklassifiziert	n.d. ¹	2,6%
0092	Acidobacteria, Acidobacteria_Gp6, Acidobacteria_Gp6_order_incertae_sedis, Acidobacteria_Gp6_family_incertae_sedis, Gp6	n.d. ¹	2,4%

¹ OTUs wurden auch nicht in entsprechender 16S rDNA-Bibliothek detektiert

² OTU mit < 1% in entsprechender 16S rDNA-Bibliothek detektiert
nur OTUs mit > 1% aller Gesamtsequenzen gezeigt; grau hinterlegt sind dominante OTUs, die ebenso in der 16S rDNA-Bibliothek dominant detektiert wurden
Probenbezeichnung: S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, R...RNA; n.d.... nicht detektiert

Für die jeweilige 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliothek wurden 18% (Schlema) bzw. 12%

(Zobes) gemeinsame OTUs ermittelt, die 83% (SW_D3) bzw. 66% (ZW_D2) der in der 16S rDNA-Bibliothek enthaltenen Sequenzen abdeckten. Folglich konnten dominante Bacteria-OTUs der 16S rDNA-Bibliothek auch in der 16S rRNA-Bibliothek detektiert werden. Die in SW_D3 häufig detektierten OTUs wurden mit abweichenden Abundanzen auch vorrangig in SW_R gefunden (Tab. 3.8). Für die planktonische Gemeinschaft aus Zobes dagegen wurden in ZW_R dominante Bacteria-OTUs ermittelt, die in ZW_D2 nur selten detektiert wurden.

3.4.3 Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Bacteria in Biofilmgemeinschaften

Die Pyrosequenzierung der cDNA-Sequenzen eines 16S rRNA-Abschnitts für insgesamt vier Biofilmproben aus den drei Urangruben lieferte 17580 Sequenzen, die in 798 OTUs eingeteilt wurden. Die OTUs wurden den folgenden 20 bakteriellen Phyla zugeordnet: Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, BRC1, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Elusimicrobia, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, OD1, Proteobacteria, Spirochaetes, SR1, TM7, Verrucomicrobia und WS3. Für Biofilmproben aus Pöhla (PB_R) und Schlema (SB_R) wurden jeweils elf im Vergleich zu neun bzw. zehn Phyla in der entsprechenden 16S rDNA-Bibliothek ermittelt. Größere Abweichungen bezüglich der Anzahl detektierter Phyla wurden für Biofilmproben aus Zobes mit 15 (ZB_R1) und sieben (ZB_R2) im Vergleich zu fünf (ZB_D1) und zehn (ZB_D2) Phyla festgestellt. Dies war insbesondere für ZB_R1 und ZB_D1 auf den großen Sequenzunterschied (6091 *vs.* 54) zwischen den Bibliotheken zurückzuführen. In allen Biofilmproben wurde die Mehrheit der klassifizierbaren Sequenzen den Proteobacteria zugewiesen. Während sie in PB_R nahezu die Gesamtheit sowie in SB_R und ZB_R1 jeweils fast die Hälfte der bakteriellen Sequenzen darstellten, deckten Proteobacteria in ZB_R2 nur 14,5% der Sequenzen auf Phylum-Ebene ab. Der Sequenzanteil unklassifizierter Phyla beträgt je nach Probe zwischen 6,1 - 64,5% und ist für ZB_R2 am größten. Zur genaueren Beschreibung wurden die relativen Häufigkeiten der zugeordneten, bakteriellen Klassen für die 16S rRNA-Bibliotheken errechnet und mit denen der 16S rDNA-Bibliotheken verglichen (Abb. 3.12). Es ist ersichtlich, dass die bakteriellen Klassen zwischen den jeweiligen Bibliotheken zu ähnlichen Anteilen vertreten waren. Für Biofilme, die drei Monate im Flutungswasser gewachsen sind, wurden mit 92,0% (PB_R), 33,6% (SB_R) und 38,1% (ZB_R1) hauptsächlich Deltaproteobacteria repräsentierenden Sequenzen im Vergleich zu 70,0% (PB_D1), 19,0%

3 Ergebnisse

(SB_D) und 55,6% (ZB_D1) detektiert. Für die Biofilmprobe ZB_R1 wurde mit 13,3% eine hohe Abundanz für Subdivision3 ermittelt, Sequenzen für diese Klasse wurden in der 16S rDNA-Bibliothek ZB_D1 gar nicht detektiert. Die in ZB_D2 häufiger detektierten Sequenzen für Subdivision3 und WS3_class_incertainae_sedis, wurden mit ähnlichen relativen Abundanzen in ZB_R2 bestimmt. Die für alle 16S rRNA-Bibliotheken ermittelten, domi-

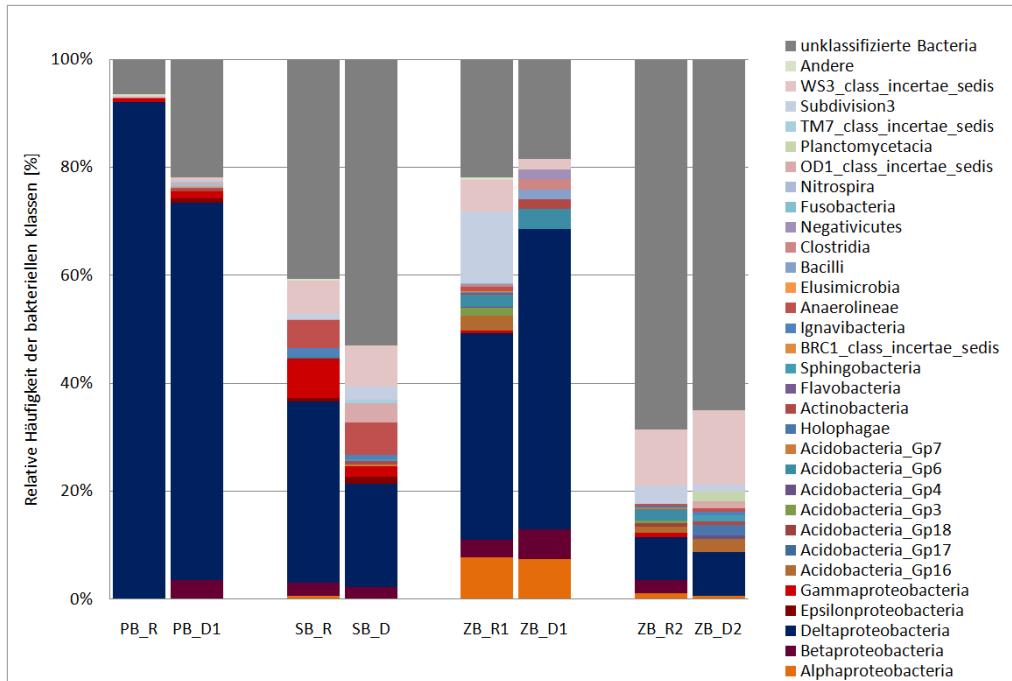


Abbildung 3.12: Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Bacteria aus Biofilmproben. Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, B...Biofilm, D...DNA, R...RNA

nanten bakteriellen OTUs sind mit ihrer taxonomischen Zuordnung in Tab. 3.9 aufgelistet. Zwischen den verglichenen 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliotheken wurden 10% (PB), 20% (SB), 4% (ZB1) bzw. 18% (ZB2) gemeinsame OTUs ermittelt, die 84%, 81%, 93% bzw. 79% der DNA-Sequenzen ausmachten. Demzufolge wurden die dominanten Bacteria-OTUs der Biofilmpuben in den 16S rDNA-Bibliotheken auch in den 16S rRNA-Bibliotheken detektiert und zählten dort ebenso zur vorherrschenden Fraktion. Nur in ZB_D1 wurden vermutlich aufgrund der geringen Sequenzanzahl in dieser Bibliothek drei der in ZB_R1 dominanten OTUs (OTU0001, OTU0017, OTU0051) gar nicht detektiert. Insgesamt weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die Zusammensetzung der jeweiligen, bakteriellen Biofilmgemeinschaft ausgehend von extrahierter DNA und RNA ähnlich war.

Tabelle 3.9: Dominante Bacteria-OTUs in 16S rRNA-Bibliotheken aus Biofilmpuben

OTU	Klassifikation	PB_R	SB_R	ZB_R1	ZB_R2
0001	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, unklassifiziert	90,6%	21,3%	4,1%	2,0%
0011	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Desulfuromonadales, Geobacteraceae, <i>Geobacter</i>	<0,1%	n.d. ²	28,7%	1,4%
0017	Verrucomicrobia, Subdivision3, Subdivision3_order_incertae_sedis, Subdivisi- on3_family_incertae_sedis, <i>3_genus_incertae_sedis</i>	n.d. ¹	n.d. ¹	9,1%	0,9%
0031	WS3, WS3_class_incertae_sedis, WS3_order_incertae_sedis, WS3_family_incertae_sedis, <i>WS3_genus_incertae_sedis</i>	0,4%	4,5%	5,8%	6,1%
0035	unklassifiziert	2,7%	4,2%	n.d. ¹	17,6%
0048	unklassifiziert	< 0,1%	n.d. ¹	4,4%	0,9%
0051	unklassifiziert	0,9%	n.d. ²	3,0%	0,9%
0046	unklassifiziert	n.d. ¹	1,2%	3,1%	3,2%
0069	Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Desulfuromonadales, Geobacteraceae, <i>Geobacter</i>	n.d. ¹	n.d. ¹	3,3%	n.d. ¹

¹ OTUs wurden auch nicht in entsprechender 16S rDNA-Bibliothek detektiert

² OTU mit < 1% in entsprechender 16S rDNA-Bibliothek detektiert
 nur OTUs mit > 1% aller Gesamtsequenzen gezeigt; grau hinterlegt sind dominante OTUs, die
 ebenso in der 16S rDNA-Bibliothek dominant detektiert wurden
 Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, B... Biofilm, R... RNA; n.d... nicht
 detektiert

3.4.4 Archaeelle Diversität stoffwechselaktiver Gemeinschaften

Die Pyrosequenzierung eines 16S rRNA Genabschnitts für Archaea aus drei Flutungswasser- und vier Biofilmpuben der Untersuchungsstandorte Pöhla, Schlema und Zobes ergab insgesamt 97050 Sequenzen, die in 578 OTUs (mit $\geq 97\%$ Sequenzhomologie) unterteilt wurden. Je Probe wurden 4669 bis 35633 Sequenzen und 21 bis 281 OTUs ermittelt (Tab. 3.10). Aufgrund der sehr hohen Sequenzanzahlen wurden wiederum sehr hohen Coverage-Werte von 98 - 100% erreicht und Rarefaction-Kurven (Abb. 3.13) mit abnehmenden Anstiegen

3 Ergebnisse

festgestellt, die zusammen auf eine nahezu vollständige Erfassung der archaeellen Gemeinschaft in den Proben hinweisen. Da die ermittelte Anzahl der OTUs, die mittels Richness-Indizes geschätzte, tatsächliche OTU-Anzahl sowie die Diversity-Indizes höher und die Rarefaction-Kurven für alle Flutungswasserproben steiler als für die Biofilmproben waren, deuten die Ergebnisse auf ein größeres Artenreichtum der Archaea in den planktonischen Gemeinschaften als in den Biofilmgemeinschaften hin. Trotz widersprüchlicher Werte des ACE- und invertierten Simpson-Index wurde die Flutungswasserprobe SW_R basierend auf den errechneten Chao1- und Shannon-Indizes sowie der Rarefaction-Analyse unter allen Proben als diejenige mit dem größten archaeellen Artenreichtum ermittelt. Der geringste Artenreichtum für Archaea wurde anhand der Alpha-Diversitätscharakteristik und Rarefaction-Analyse in der Biofilmprobe ZB_R2 festgestellt, wenngleich der invertierte Simpson-Index für PB_R kleiner war.

Tabelle 3.10: Alpha-Diversitätscharakteristiken für 16S rRNA-Bibliotheken der Archaea

Probe ¹	Be- probungs- datum	Anzahl der Se- quenzen	Anzahl der OTUs ²	Cover- age [%] ³	Richness ⁴		Diversity	
					ACE	Chao1	Shannon ⁵	inv- Simpson ⁶
PW_R	07/2013	4172	374	95%	1361	905	3,31	8,68
SW_R	03/2013	7466	434	97%	1144	870	2,77	5,90
ZW_R	04/2013	5643	642	94%	1559	1116	4,43	23,50
PB_R	02/2013	8974	163	99%	522	309	0,63	1,22
SB_R	02/2013	2168	237	94%	665	445	3,82	15,53
ZB_R1	11/2012	6091	404	97%	776	634	3,57	9,70
ZB_R2	04/2013	347	104	82%	338	238	3,66	15,97

¹ Probenbezeichnung: P... Pöhla, S... Schlema, Z... Zobes, W... Flutungswasser, B... Biofilm, D... DNA

² Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie

³ Berechnung unter Verwendung des Good's Coverage Estimator

⁴ nichtparametrische Richness-Schätzer

⁵ nichtparametrischer Shannon-Index

⁶ invertierter Simpson-Index

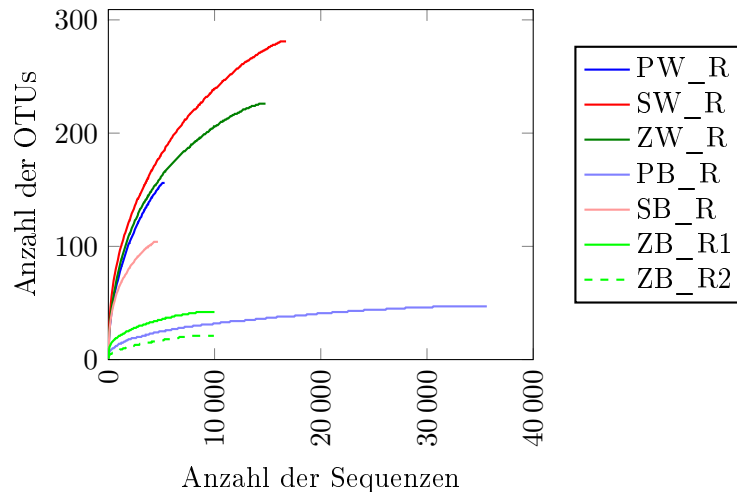


Abbildung 3.13: Rarefaction-Kurven für 16S rRNA-Bibliotheken der Archaea aus (A) 3 Flutungswasser- und (B) 4 Biofilmprouben
cDNA-Sequenzen der 16S rRNA-Sequenzen mit $\geq 97\%$ Homologie wurden in dasselbe OTU gruppiert.
Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, R...RNA

3.4.5 Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Archaea in planktonischen Gemeinschaften

Insgesamt lieferte die Pyrosequenzierung für die drei Flutungswasserproben ausgehend von extrahierter Gesamt-RNA 36823 qualitätsgefilterte, archaeelle Sequenzen und 496 OTUs. Die Probe PW_R wird aus bereits genanntem Grund in der folgenden Beschreibung nicht mitbetrachtet. Wie für die entsprechenden 16S rDNA-Bibliotheken wurden die in SW_R und ZW_R detektierten, archaeellen Sequenzen den Euryarchaeota und Crenarchaeota zugeordnet. Erneut stellten unklassifizierte Archaea mit mehr als der Hälfte aller Sequenzen den größten Anteil in den Proben dar. Die meisten der klassifizierbaren Sequenzen wurden für Crenarchaeota mit 19,2% (SW_R) und 32,7% (ZW_R) ermittelt. Die relativen Abundanz der archaeellen Klassen (Abb. 3.14) in den 16S rRNA-Bibliotheken entsprachen im Wesentlichen denen in den 16S rDNA-Bibliotheken. Die detektierten Crenarchaeota-Sequenzen wurden in den Flutungswasserproben durch die Klasse der Thermoprotei repräsentiert. Für ZW_R wurden 2,9% und 5,9% der Sequenzen für Methanomicrobia bzw. Methanobacteria im Vergleich zu 5,7% und 0,6% in ZW_D2 ermittelt.

Für die entsprechenden 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliotheken wurden 37% (SW) und 33% (ZW) gemeinsame Archaea-OTUs bestimmt, die 98% bzw. 96% der zugehörigen DNA-Sequenzen abdeckten. Alle der in der 16S rDNA-Bibliothek dominanten OTUs wurden auch

3 Ergebnisse

in der entsprechenden 16S rRNA-Bibliothek mit hohen Abundanzen detektiert. Die relativen Abundanzen einiger dominanter, vor allem unklassifizierter Archaea-OTUs in ZW_R wichen von denen in ZW_D2 ermittelten etwas ab. Allgemein war die Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft in den planktonischen Proben ausgehend von extrahierter DNA und RNA sehr ähnlich.

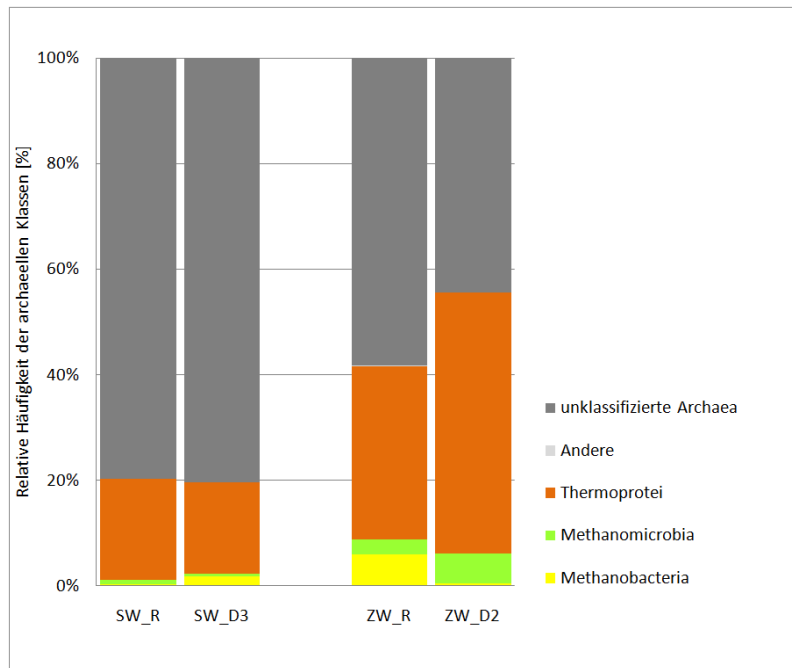


Abbildung 3.14: Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Flutungswasserproben

Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, D...DNA, R...RNA

3.4.6 Taxonomische Klassifizierung der stoffwechselaktiven Archaea in Biofilmgemeinschaften

Die Pyrosequenzierung der cDNA-Sequenzen eines 16S rRNA-Abschnitts lieferte für vier Biofilmproben, jeweils eine aus Pöhla und Schlema sowie zwei aus Zobes, 60227 archaeelle Sequenzen, die in 174 OTUs unterteilt wurden. Im Vergleich zu den entsprechenden 16S rDNA-Bibliotheken wurden Sequenzen für Euryarchaeota abermals in allen 16S rRNA-Bibliotheken detektiert. In den Proben PB_R, ZB_R1 und ZB_R2 bildeten sie mit 99,8%, 72,3% bzw. 99,6% nahezu die gesamte archaeelle Gemeinschaft ab. Die große Abundanz unklassifizierter Archaea für die Biofilmprobe aus Schlema (SB_D) wurde ebenso in der

3 Ergebnisse

16S rRNA-Bibliothek festgestellt. Unter den klassifizierten Phyla waren Crenarchaeota der Familie Thermoprotei mit 6,1% erneut am stärksten in der Biofilmprobe aus Schlema (SB_R) vertreten (Abb. 3.15). Im Vergleich zu ZB_D1 wurden Thermoprotei-Sequenzen in ZB_R1 nicht detektiert. Die Sequenzen für Euryarchaeota-OTUs wurden den Klassen Methanomicrobia, Methanobacteria, Halobacteria und Thermoplasmata zugeordnet. Wie für die entsprechenden 16S rDNA-Bibliotheken wurden Sequenzen für die letzten beiden Klassen aber nur in den Proben SB_R und ZB_R1 mit jeweils weniger als 1% detektiert. Die relativ hohe Abundanz für Methanobacteria repräsentierende Sequenzen in PB_D1 und ZB_D1 wurde auch in den zugehörigen Proben PB_R (95,3%) und ZB_R1 (70,4%) festgestellt. Ebenso wird aus (Abb. 3.15) ersichtlich, dass wie für ZB_D2 nahezu alle archaeellen Sequenzen in ZB_R2 den Methanomicrobia innerhalb der Euryarchaeota zugeordnet wurden.

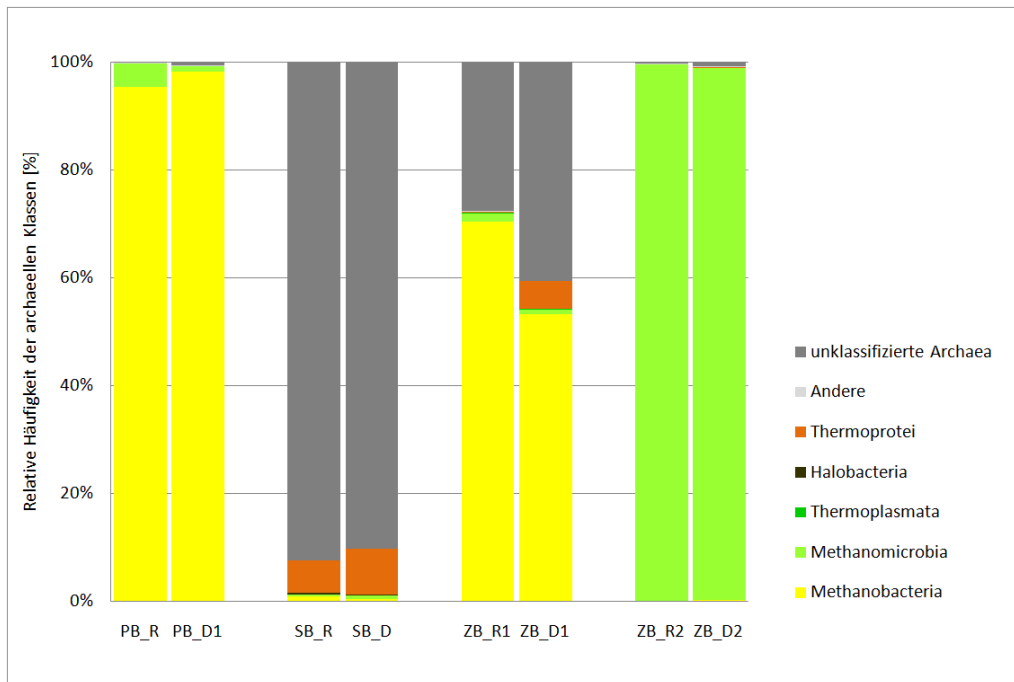


Abbildung 3.15: Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA- und 16S rDNA-Bibliotheken für zugeordnete Klassen der Archaea aus Biofilmpuben
Taxonomische Klassen mit Abundanzen $< 0,1\%$ wurden unter "Andere" zusammengefasst.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, B...Biofilm, D...DNA, R...RNA

Der Vergleich der Archaea-OTUs zwischen den 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliotheken ergab 26% (PB), 37% (SB), 7% (ZB1) und 19% (ZB2) gemeinsame OTUs, die 99%, 98%, 62% bzw. 99% der Sequenzen in der entsprechenden 16S rDNA-Bibliothek abdeckten. Wäh-

3 Ergebnisse

rend SB_R und ZB_R2 eine sehr gute Übereinstimmung hinsichtlich der Präsenz und Abundanz dominanter Archaea-OTUs im Vergleich zur zugehörigen 16S rDNA-Bibliothek aufwiesen, wurden einige Abweichungen für PB_R und ZB_D1 festgestellt. Für die Biofilmprobe aus Pöhla wurde in PB_R ein in PB_D1 dominant vorkommender OTU nicht detektiert. Zudem gab es große Unterschiede für die Abundanz zweier OTUs (PB_D1 *vs.* PB_R: 17,2% *vs.* 76,8% bzw. 66,0% *vs.* 18,0%), die der Gattung *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* zugeordnet wurden. In der Biofilmprobe aus Zobes, ZB_R1, wurden fünf von zwölf dominanten OTUs in ZB_D1 gar nicht detektiert und wesentlich höhere Abundanzen für zwei dominante OTUs (ZB_D1 *vs.* ZB_R1: 35,8% *vs.* 56,1% bzw. 7,3% *vs.* 22,0%) ermittelt.

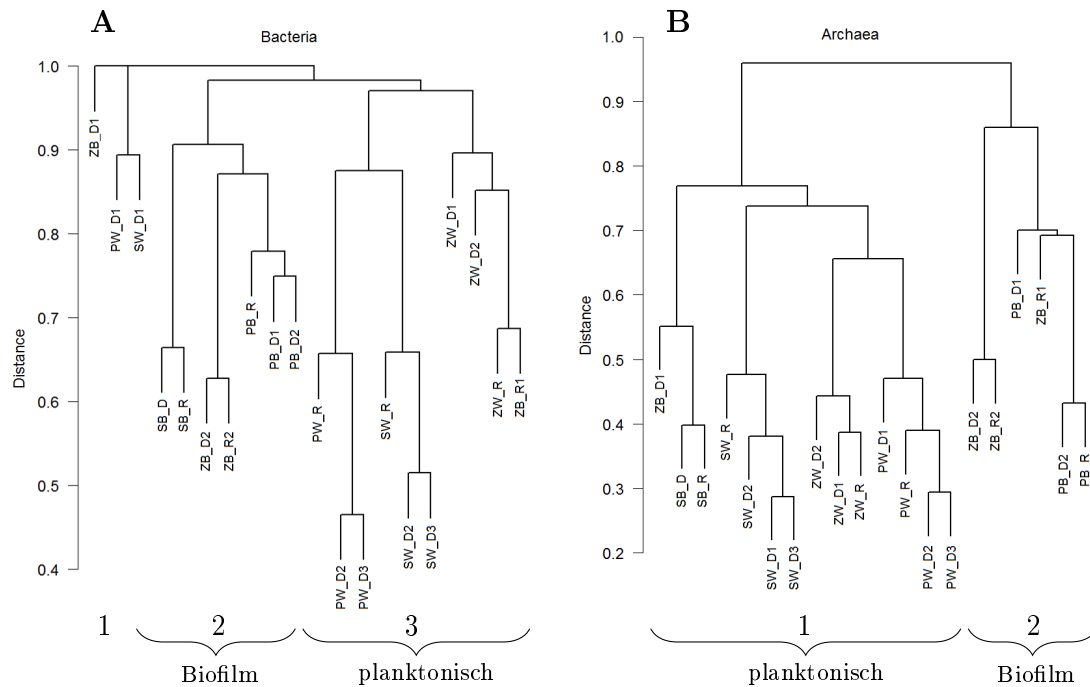


Abbildung 3.16: Hierarchische Clusterdendrogramme aller Flutungs- und Biofilmproben für (A) Bacteria und (B) Archaea aus 16S rDNA- und 16S rRNA-Bibliotheken basierend auf normierten OTU-Abundanzen und Anwendung der Bray-Curtis Dissimilarities.

Probenbezeichnung: P...Pöhla, S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser, B...Biofilm, D...DNA, R...RNA

Zusammenfassend wurden alle Proben hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften miteinander verglichen. In Abb. 3.16 sind die Ergebnisse der Clusteranalyse für Bacteria und Archaea dargestellt. Im Fall von Bacteria wurden die Proben in drei größere Cluster aufgeteilt. Die Proben ZB_D1, PW_D1 und SW_D1, für die jeweils eine sehr geringe Anzahl an Sequenzen nach der Pyrosequenzierung erhalten wurde

(Tab. 3.3), unterschieden sich demnach deutlich von den restlichen Proben. Das 2. Cluster bildeten mit Ausnahme von ZB_R1 alle Biofilmproben und das 3. Cluster repräsentierte die Flutungswasserproben. Im 3. Cluster ist eine weitere Verzweigung für die Flutungswasserproben aus Zebes erkennbar. Die verschiedenen Proben eines Standortes inklusive der jeweiligen RNA-Probe clusterten zusammen. Die Proben für die archaeellen Gemeinschaften wurden in zwei große Cluster unterteilt. Die Flutungswasserproben bildeten das 1. Cluster. Mit Ausnahme von ZB_D1 wurden die Biofilmproben aus Pöhla und Zebes von den Flutungswasserproben separiert und bildeten zusammen das 2. Cluster. Hingegen wurden die Biofilmproben aus Schlema dem 1. Cluster zugeordnet. Ähnlich wie für Bacteria beschrieben, aber mit geringerer Distanz, clusterten die Proben eines Standortes zusammen. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die mikrobielle Gemeinschaft sowohl für Bacteria als auch Archaea im Flutungswasser und Biofilm verschieden war. Die Standorte unterschieden sich zwar hinsichtlich der mikrobiellen Gemeinschaften, aber der Unterschied zwischen den Flutungswässern und Biofilmen war größer. Da die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften ausgehend von extrahierter Gesamt-DNA und Gesamt-RNA zu ähnlichen Ergebnissen führte, waren die Gemeinschaften auch metabolisch aktiv.

3.5 Lebendkeimzahlen der planktonischen Gemeinschaften

Um die metabolische Diversität planktonischer Gemeinschaften bzw. das Potential mikrobieller Stoffwechselprozesse in den Urangruben abzuschätzen, wurde die Keimzahl lebensfähiger Mikroorganismen aus Flutungswasserproben mit Hilfe der kultivierungsabhängigen CFU- und MPN-Technik ermittelt. Aufgrund der geringen Sauerstoffkonzentrationen in den Flutungswässern (Kap. 3.1) lag der Fokus auf der Bestimmung anaerober Mikroorganismen. Durch die Verwendung verschiedener MPN-Medien konnte zwischen zehn metabolischen Gruppen unterschieden werden. Das mikrobielle Wachstum wurde schließlich in jedem MPN-Röhrchen über die Bestimmung entsprechender Produkt- bzw. Substratkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle bewertet und die höchstmögliche Zellzahl mit Hilfe des Programms Most Probable Number (MPN) Calculator der U.S. Environmental Protection Agency ermittelt. Zunächst wurde die Gesamtzellzahl der planktonischen Mikroorganismen bestimmt, um den kultivierten Anteil der Mikroorganismen einzuschätzen. Die Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie CFU- und MPN-Analysen sind für die drei Gruben zusammenfassend in Tab. 3.11 dargestellt. Die Gesamtzellzahl

3 Ergebnisse

im Flutungswasser aus Zobes und Schlema war mit $1,38 \cdot 10^6$ bzw. $1,37 \cdot 10^6$ Zellen/ml ähnlich hoch und lag für Flutungswasser aus Pöhla etwas höher. Die Anzahl aerober Mikroorganismen wurde zunächst nach 10, 16, 44 und 80 Tagen ermittelt. Die in Tab. 3.11 aufgelisteten Zellzahlen für aerobe Mikroorganismen beziehen sich auf eine Inkubationszeit von 80 Tagen, da die Zellzahl auch noch zwischen dem 44. und 80. Inkubationstag um ca. 4 - 5% anstieg. Die meisten aeroben Mikroorganismen wurden für Flutungswasser aus Zobes bestimmt, dagegen wurden weniger als 300 aus Schlema-Flutungswasser kultiviert. Der Anteil kultivierbarer aerober Mikroorganismen an der Gesamtzellzahl betrug 0,5%, 0,04% und weniger als 0,02% für das Flutungswasser aus Zobes, Pöhla bzw. Schlema. Das Wachstum anaerober Mikroorganismen in flüssigen MPN-Medien wurde für alle verschiedenen, metabolischen Gruppen mit Ausnahme von Sulfatreduzierern für die Proben aus Zobes und Pöhla festgestellt. Die höchstmögliche Lebendkeimzahl von Anaerobiern im Zobes-Flutungswasser war mit 462 Zellen/ml für Eisenreduzierer am größten. Einige, aber nicht alle, als positiv bewerteten Eisenreduziererkulturen zeigten eine Farbveränderung von ocker-braun zu grün, die auf die Bildung von Fe(II) hinwies (Abb. 3.17). Nach einer verlängerten Inkubation für weitere drei Monate wurde die Grünfärbung bei weiteren, wenngleich immer noch nicht allen positiven, Kulturen sichtbar. Insgesamt war die optische Beurteilung des Wachstums von Eisenreduzierern damit weniger sensitiv als die Analyse des gelösten Eisens. Für Flutungswasser aus Pöhla wurden unter den Anaerobiern am meisten Manganreduzierer detektiert. Die Manganreduziererkulturen zeigten zum Zeitpunkt der Analyse noch keine optische Veränderung. Nach einer anschließenden 3-monatigen Inkubation konnte bei einigen positiv beurteilten Kulturen eine Entfärbung des ursprünglich braun-schwarz gefärbten Mediums und eine weiße Ausfällung beobachtet werden, die auf die Reduktion von Mn(IV) zu Mn(II) schließen ließ (Abb. 3.17). Die höchstmögliche Lebendkeimzahl von Acetogenen und autotrophe Methanogenen war sowohl für Zobes als auch für Pöhla im Vergleich zu den jeweils anderen metabolischen Gruppen sehr gering. Für Flutungswasser aus Schlema war die Anzahl schwefeloxidierender Nitratreduzierer mit 1099 Zellen/ml am höchsten. Nitratreduzierer waren unter den anaeroben Mikroorganismen die einzigen deren Wachstum neben der analytischen Bestimmung des Nitratgehaltes auch optisch durch die Trübung der Kulturen beobachtet werden konnte. Die Trübung war bei diesen Kulturen als Indikator fast genauso gut geeignet wie die Nitratkonzentration. Im Vergleich zu den schwefeloxidierenden Nitratreduzierern wurden deutlich geringere Zellzahlen für heterotrophe Nitratreduzierer, Eisen-, Arsenat- und

3 Ergebnisse

Mangan- und Sulfatreduzierer als auch autotrophe Acetogene im Flutungswasser aus Schlema ermittelt. Das Wachstum von Methanogenen und heterotrophen Acetogenen wurde für Schlema-Flutungswasser nicht detektiert. Die Summe aller hier untersuchten anaeroben Mikroorganismen je Flutungswasserprobe betrug nur 0,02 bis 0,08% der gesamten Zellen. Somit wurden insgesamt weniger als 1% der im Flutungswasser vorkommenden Mikroorganismen unter den gewählten Bedingungen auch kultiviert.

Da Sulfatreduzierer in den flüssigen MPN-Medien kaum bzw. gar nicht detektiert wurden, wurde die höchstmögliche Lebendkeimzahl zusätzlich in einem halbfesten Medium (Kap. 2.7.4) bestimmt. Der Nachweis sulfatreduzierender Mikroorganismen war optisch durch Bildung eines schwarzen FeS-Niederschlags möglich (Abb. 3.17). Nach bereits vier Wochen Inkubation wurden für das Flutungswasser aus Zobes und Schlema jeweils 2 Zellen/ml (95%-Vertrauensintervall: 0 - 10) und aus Pöhla 43 Zellen/ml (95%-Vertrauensintervall: 10 - 138) ermittelt.

Die Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Methoden zeigen, dass planktonische Mikroorganismen aus Flutungswässern auch unter aeroben Bedingungen relativ langsam wuchsen. Obwohl nur ein sehr geringer Anteil der Mikroorganismen kultiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass die planktonischen Gemeinschaften unter den Wachstumsbedingungen in der Lage waren, eine Vielzahl anaerober Prozesse zu katalysieren. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung und CARD-FISH wurden mittels MPN-Analyse im Flutungswasser aus Schlema keine methanogenen Mikroorganismen detektiert.

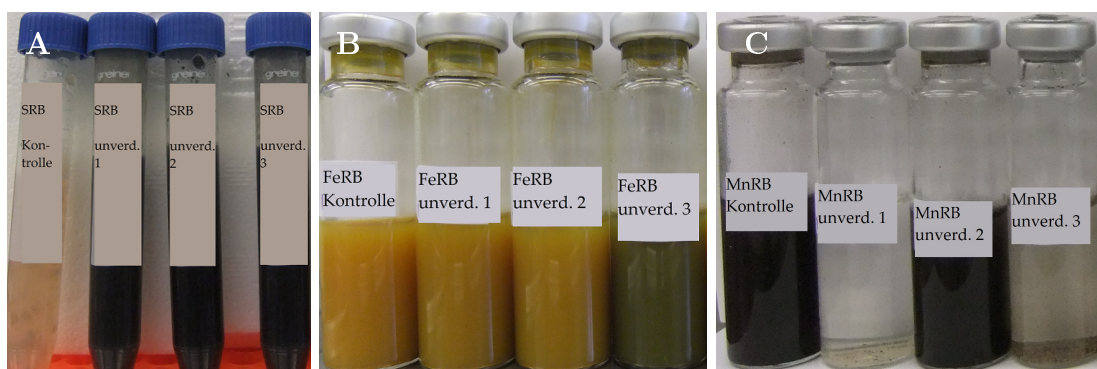


Abbildung 3.17: MPN-Kulturen für (A) Sulfatreduzierer, (B) Eisenreduzierer und (C) Manganreduzierer

Im Vergleich zur Kontrolle war in den unverdünnten (unverd.) Flutungswasserproben aus Pöhla (A) nach vier Wochen ein schwarzer FeS-Niederschlag in allen drei Röhrchen, (B) nach sechs Monaten Inkubation eine Grünfärbung in einem Röhrchen und (C) nach sechs Monaten Inkubation eine Entfärbung des Mediums in zwei Röhrchen sichtbar.

Tabelle 3.11: Gesamtzellzahl und Anzahl kultivierbarer aerober und anaerober Mikroorganismen aus Flutungswasserproben

	Zobes		Pöhla		Schlema	
	Menge	Standardabweichung	Menge	Standardabweichung	Menge	Standardabweichung
Gesamtzellzahl [Zellen ml ⁻¹]	1,38·10 ⁶	2,8·10 ⁵	1,77·10 ⁶	2,4·10 ⁵	1,37·10 ⁶	1,6·10 ⁶
Anzahl aerober Mikroorganismen [KbE ml ⁻¹]	6800	839	670	91	< 300	-
MPN-Analysen	MPN	unteres - oberes 95% Vertrauensintervall	MPN	unteres - oberes 95% Vertrauensintervall	MPN	unteres - oberes 95% Vertrauensintervall
S-oxidierende NO ₃ ⁻ -reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	93	21 - 271	24	5 - 97	1099	225 - 3075
heterotrophe NO ₃ ⁻ -reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	240	48 - 965	15	3 - 63	9	2 - 27
Fe-reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	462	111 - 1498	28	4 - 102	4	1 - 13
Mn-reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	5	1 - 16	240	48 - 965	1	0 - 3
As-reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	24	5 - 97	9	2 - 27	4	1 - 14
SO ₄ ²⁻ -reduzierende Bacteria [Zellen ml ⁻¹]	n.d.	-	n.d.	-	0,4	0 - 1
heterotrophe Acetogene [Zellen ml ⁻¹]	1	0 - 3	2	0 - 10	n.d.	-
autotrophe Acetogene [Zellen ml ⁻¹]	2	0 - 10	1	0 - 3	0,4	0 - 1
heterotrophe Methanogene [Zellen ml ⁻¹]	21	3 - 85	1	0 - 6	n.d.	-
autotrophe Methanogene [Zellen ml ⁻¹]	1	0 - 6	2	0 - 10	n.d.	-
MPN-Summe [Zellen ml ⁻¹]	849		322		1117,4	

3.6 Proteomanalysen der planktonischen Gemeinschaften

Um die in den Urangruben lebenden Bacteria auch funktionell zu erfassen und schließlich deren mögliche Bedeutung für ökologische Stoffkreisläufe in diesen Ökosystemen einzuschätzen, wurden die mikrobiellen Gemeinschaften aus Flutungswasserproben hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung mittels Massenspektrometrie analysiert.

Die erhaltenen MS-Spektren der analysierten Peptide für die planktonischen Gemeinschaften wurden mithilfe des Programms Proteome Discoverer identifiziert und anschließend mittels des Programms PROPHANE insgesamt 955 verschiedenen, d.h. einzigartigen, Proteingruppen zugeordnet. Die Proteingruppen wurden taxonomischen und funktionellen Gruppen zugewiesen und deren Häufigkeit anhand des "Normalized Spectral Abundance Factor" (NSAF) quantifiziert. Bedingt durch die unterschiedliche Anzahl analysierter Peptide (2914 für Zobes, 419 für Schlema, 41 für Pöhla) variierte die Gesamtanzahl der Proteingruppen zwischen den drei Proben entsprechend stark (Tab. 3.12). Aufgrund der sehr geringen Anzahl der Proteingruppen für Pöhla wurden diese Daten für weitere Analysen nicht betrachtet.

Tabelle 3.12: Zugeordnete Hauptfunktion der Proteingruppen für Bacteria aus Flutungswasserproben basierend auf COG-Datenbank

Beprobungsstandort	Anzahl bzw. relative Häufigkeit der funktionellen Proteingruppen					
	Gesamtanzahl	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Metabolismus	zelluläre Prozesse und Signaling	heterogene Funktion	unbekannte Funktion
Pöhla	23	12; 55,7%	1; 0,9%	4; 11,0%	5; 29,0%	1; 3,5%
Schlema	173	85; 70,9%	33; 12,0%	25; 6,9%	24; 8,6%	6; 1,6%
Zobes	818	327; 60,2%	224; 15,4%	102; 8,3%	125; 12,7%	40; 2,7%

Gruppierung von Peptiden in Proteingruppen und funktionelle Zuordnung mittels PROPHANE

Der größte Anteil der Peptidspektren (Zobes: 65,4%; Schlema: 84,1%) wurde taxonomisch den Proteobacteria zugeordnet. Sehr geringe Abundanzen wurden hingegen für die Phyla Cyanobacteria, Actinobacteria, Tenericutes, Firmicutes, Chloroflexi, Spirochaetes, Deinococcus-Thermus, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Fusobacteria und Bacteroidetes bestimmt. Für 30,2% (Zobes) und 12,1% (Schlema) der analysierten Spektren war keine Zuordnung auf Phylum-Ebene möglich. Die den Proteingruppen taxonomisch zugewiesenen bakteriellen Klassen und ermittelten Abundanzen sind zusammenfassend in Abb. 3.18

3 Ergebnisse

dargestellt. Basierend auf den ermittelten NSAFs dominierten in der Flutungswasserprobe aus Zobes unter den zugeordneten Klassen Beta- und Gammaproteobacteria in etwa zu gleichem Anteil. Sehr geringe Abundanzen wurden für Proteingruppen der Alpha- (4,3%), Delta- (0,1%) und Epsilonproteobacteria (0,5%) in dieser Probe ermittelt. Im Gegensatz dazu dominierten in der Flutungswasserprobe aus Schlema Proteingruppen für Epsilonproteobacteria mit 61,6%, gefolgt von Betaproteobacteria mit 12,5%. Für Alpha- sowie Gammaproteobacteria zugeordnete Proteingruppen wurden in der Probe aus Schlema geringe Abundanzen von 0,4% bzw. 4,3% ermittelt; Proteingruppen für Deltaproteobacteria wurden nicht festgestellt.

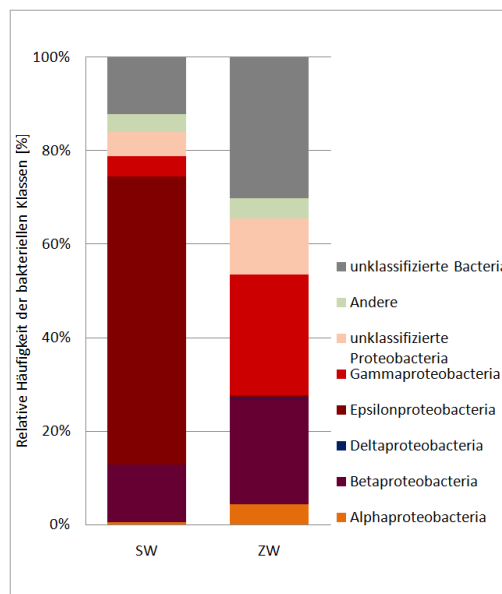


Abbildung 3.18: Taxonomische Verteilung der identifizierten Proteine für Bacteria aus Flutungswasserproben

Taxonomische Zuordnung mittels PROPHANE; Unter “Andere” sind nicht eindeutig zuordenbare Proteine zusammengefasst. Probenbezeichnung: S...Schlema, Z...Zobes, W...Flutungswasser

Die in der Probe aus Zobes den Gammaproteobacteria zugeordneten Proteingruppen wurden mit insgesamt 12,8% der Peptidspektren der Familie Methylococcaceae zugewiesen. Die weitere Klassifizierung auf Spezies-Ebene ergab eine Abundanz von 10,5% für *Methylobacter tundripaludum*. In Zobes detektierte Proteingruppen der Betaproteobacteria wurden der Familie Gallionellaceae (7,8%) und Methylophilaceae (3,2%) zugeordnet. Innerhalb der beiden Familien wurde die Arten *Gallionella capsiferriformans* (7,2%) bzw. *Methylotenera versatilis* (1,6%) am häufigsten ermittelt. Im Flutungswasser aus Schlema wurden 5,5% der Peptidspektren den Gallionellaceae mit *Gallionella capsiferriformans* (2,7%) und *Sideroxydans lithotrophicus* (2,4%) als Vertreter zugeordnet. Die für Schlema

3 Ergebnisse

dominierenden Proteingruppen der Epsilonproteobacteria wurden mit 30,3% der Gattung *Sulfuricurvum* zugewiesen, darunter der unkultivierte *Sulfuricurvum* sp. RIFRC-1 (6,2%) und *Sulfuricurvum kujiense* DSM 16994 (2,4%).

In Tab. 3.12 ist die Anzahl und relative Häufigkeit der Proteingruppen entsprechend ihrer zugewiesenen Hauptfunktion für die untersuchten Flutungswasserproben aufgelistet. Die Proteingruppen wurden mit Hilfe der COG-Datenbank in fünf funktionelle Hauptgruppen unterteilt. Sowohl die Anzahl als auch der Anteil der Proteingruppen, die der Funktion "Informationsspeicherung und -verarbeitung" zugeordnet wurden, dominierte in allen Proben. Die Gruppe dieser Funktion schließt Proteine ein, die an der Proteinbiosynthese oder Replikation und Reparatur von DNA beteiligt sind. Bei den analysierten Proben wurden vor allem Proteingruppen, die für die Translation wichtig sind, ermittelt. Dem Metabolismus zugewiesene Proteingruppen repräsentierten insgesamt 15,4% und 12,0% der Peptidspektren in Zobes bzw. Schlema. Zu dieser Funktion gehören Proteingruppen, die entscheidend für den Transport und Stoffwechsel von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Coenzymen, Lipiden, Nukleotiden, anorganischen Ionen oder Sekundärmetaboliten bzw. für die Energiegewinnung und -umwandlung sind. Ähnliche Abundanzen wie für die Metabolismus-Gruppe wurden für Proteingruppen mit Zugehörigkeit zur Gruppe "zelluläre Prozesse und Signaling" und "heterogene Funktion" für Zobes und Schlema ermittelt. Die erstgenannte Gruppe umfasst alle Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Zellteilung; Zellmotilität; Biogenese der Zellwand/-membran/-hülle; Abwehrmechanismen; intrazellulären Transport, Sekretion und Vesikeltransport; Signalweiterleitung; posttranslationalen Modifikation oder Proteinumsatz spielen bzw. als Chaperone fungieren. Für Zobes wurden die höchsten Abundanzen (3,5%) innerhalb dieser Gruppe für Proteingruppen ermittelt, die an der Biogenese der Zellwand/-membran/-hülle beteiligt sind, wie z.B. Phospholipase C. Proteingruppen, die der Funktion "posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz und Chaperone" zugewiesen wurden, konnten für Schlema innerhalb der entsprechenden Hauptgruppe am häufigsten (2,5%) identifiziert werden. Proteingruppen mit "heterogener Funktion" konnten keiner eindeutigen Funktion zugeschrieben werden. Die geringsten Abundanzen wurden für unbekannte Proteingruppen in den Flutungswasserproben aus Schlema und Zobes ermittelt.

Aus der Gesamtheit der Proteingruppen waren insbesondere diejenigen von Interesse, die Reaktionen des mikrobiellen Energiestoffwechsels katalysieren, da diese Prozesse i.d.R. einen direkten Einfluss auf ökologische Stoffkreisläufe haben und somit die Bedeutung der Mikroorganismen in einem Habitat sehr gut wiedergeben. Alle Proteingruppen, die

3 Ergebnisse

mit Hilfe der COG-Datenbank der Teilgruppe “Energiegewinnung und -umwandlung” in der Metabolismus-Gruppe zugewiesen wurden, wurden zur besseren funktionellen Beschreibung mit der TIGRFAM-Datenbank verglichen. Es wurden nur Proteingruppen betrachtet, deren Zuordnung hinsichtlich der Proteingruppenbeschreibung bei Vergleich beider Datenbanken übereinstimmt. Zusätzlich wurden Proteingruppen berücksichtigt, die basierend auf der COG-Klassifizierung wichtig für den Transport und Stoffwechsel von Kohlenhydraten oder anorganischen Ionen sind, wenn diese mit der TIGRFAM-Datenbank dem Energie- oder dem zentralen Intermediärstoffwechsel zugewiesen wurden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 3.13 dargestellt. Für die Flutungswasserproben aus Zobes und Schlema wurden zusammen 49 Proteingruppen mit 23 verschiedenen Funktionen ermittelt, die sechs verschiedenen, mikrobiellen Stoffwechselprozessen zugeordnet wurden. Die selektierten Proteingruppen deckten nur ca. 3% der Peptidspektren einer Probe ab. Für die Probe aus Zobes wurden die meisten Proteingruppen und größten Gesamtabundanzen für die Glykolyse/Gluconeogenese und den Pentosephosphat-Weg ermittelt. Dagegen wurden diese Funktionen in der planktonischen Gemeinschaft aus Schlema selten oder gar nicht festgestellt. Die größte Abundanz wurde in dieser Probe für Proteingruppen bestimmt, die am Elektronentransport beteiligt sind. Taxonomisch wurden alle vier Proteingruppen den Epsilonproteobacteria zugeordnet. Zudem wurden für die Flutungswasserproben aus Zobes und Schlema Proteingruppen ermittelt, die wichtig für den Zitronensäurezyklus, die Protonengradient getriebenen ATP-Umwandlung und den Schwefelstoffwechsel sind. Fast die Hälfte aller hier betrachteten Proteingruppen konnte keiner eindeutigen bakteriellen Klasse zugeordnet werden. Von den insgesamt 49 Proteingruppen gehörten 13, darunter auch jene des Schwefelstoffwechsels, zu den Gammaproteobacteria. Ergänzend zu den hier gezeigten Ergebnissen lieferte der Vergleich der Peptidspektren mit der Pfam-Datenbank zusätzliche Proteingruppen. Für die Probe aus Zobes wurden vier Proteingruppen mit der Funktion “Methan-Monooxygenase/Ammonium-Monooxygenase” der Familie Methylococcales bestimmt, die mit den anderen beiden Datenbanken (COG und TIGRFAM) der “unbekannten Funktion” zugeordnet wurden. Das gleiche gilt für eine Proteingruppe aus Zobes, die mittels Pfam der Funktion “Sulphur Oxidation Protein SoxZ” und *Sulfuricella denitrificans* zugeordnet wurde. Für Schlema wurden zwei Proteingruppen der Gattung *Sulfuricurvum* mit der Funktion “Sulphur Oxidation Protein SoxY bzw. SoxZ” ermittelt, die mit den anderen Datenbanken als zu wenig charakterisiert bzw. unbekannt eingestuft wurden.

Tabelle 3.13: Proteingruppen für Bacteria aus Flutungswasserproben mit Bedeutung für den mikrobiellen Energiestoffwechsel basierend auf COG- und TIGRFAM-Datenbank mittels PROPHANE

Protein- gruppe Nr.	Funktion der Proteingruppe [COG]	Mikroorganismus (bester Hit)	SW ²	ZW ³	Zellstoffwechsel(-schritt) [TIGRFAM]
547	Pentose5phosphate3epimerase	<i>Alteromonas macleodii</i>		0,09%	Pentose phosphate pathway
555	Pentose5phosphate3epimerase	Gammaproteobacteria; heterogen		0,21%	Pentose phosphate pathway
788	Pentose5phosphate3epimerase	Proteobacteria; heterogen		0,27%	Pentose phosphate pathway
390	Ribose 5phosphate isomerase	Gammaproteobacteria; heterogen		0,14%	Pentose phosphate pathway
110	Transaldolase	Gammaproteobacteria; heterogen		0,04%	Pentose phosphate pathway
385	Transketolase	Proteobacteria; heterogen		0,02%	Pentose phosphate pathway
610	6phosphofructokinase	<i>Methylobacterium alcaliphilum</i>		0,02%	Glycolysis/ gluconeogenesis
473	6phosphofructokinase	Methylococcaceae; heterogen		0,05%	Glycolysis/ gluconeogenesis
169	GAPDH/E4PDH ¹	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502		0,02%	Glycolysis/ gluconeogenesis
21	GAPDH/E4PDH ¹	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3		0,02%	Glycolysis/ gluconeogenesis
77	GAPDH/E4PDH ¹	<i>Thalassobium</i> sp. R2A62		0,02%	Glycolysis/ gluconeogenesis
278	GAPDH/E4PDH ¹	Bacteria; heterogen		0,04%	Glycolysis/ gluconeogenesis
1	GAPDH/E4PDH ¹	Bacteria; heterogen	0,09%	0,07%	Glycolysis/ gluconeogenesis
63	GAPDH/E4PDH ¹	Bacteria; heterogen		0,07%	Glycolysis/ gluconeogenesis
64	GAPDH/E4PDH ¹	Bacteria; heterogen		0,13%	Glycolysis/ gluconeogenesis
559	Triosephosphate isomerase	<i>Sulfuricella denitrificans</i>		0,03%	Glycolysis/ gluconeogenesis
702	Triosephosphate isomerase	<i>Gallionella capsiferriformans</i>		0,03%	Glycolysis/ gluconeogenesis
726	Triosephosphate isomerase	<i>Methylobacter tundripaludum</i>		0,14%	Glycolysis/ gluconeogenesis
774	Triosephosphate isomerase	Bacteria; heterogen		0,17%	Glycolysis/ gluconeogenesis
627	Pyruvate kinase	Bacteria; heterogen		0,03%	Glycolysis/ gluconeogenesis
449	SuccinylCoA synthetase, α subunit	Bacteria; heterogen		0,02%	TCA cycle
954	SuccinylCoA synthetase, α subunit	Sulfurovum sp. AR	0,06%		TCA cycle
934	SuccinylCoA synthetase, α subunit	Helicobacteraceae; heterogen	0,22%		TCA cycle
856	SuccinylCoA synthetase, α subunit	Bacteria; heterogen	0,23%		TCA cycle

¹ Glyceraldehyde3phosphate dehydrogenase/erythrose4phosphate dehydrogenase² Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Schleima³ Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Zobes

Tabelle 3.13: Proteingruppen für Bacteria aus Flutungswasserproben mit Bedeutung für den mikrobiellen Energiestoffwechsel basierend auf COG- und TIGRFAM-Datenbank mittels PROPHANE (continued)

Protein- gruppe Nr.	Funktion der Proteingruppe [COG]	Mikroorganismus (bester Hit)	SW ¹	ZW ²	Zellstoffwechsel(-schritt) [TIGRFAM]
595	Rieske FeS protein	<i>Neisseria elongata</i>		0,03%	Electron transport
429	Rieske FeS protein	Methylococcaceae; heterogen		0,11%	Electron transport
692	Rieske FeS protein	<i>Methylomonas methanica</i>		0,21%	Electron transport
951	Rieske FeS protein	<i>Sulfuricurvum</i> ; heterogen	0,20%		Electron transport
259	NADH:ubiquinone oxidoreductase 20 kD subunit and related FeS oxidoreductases	Bacteria; heterogen		0,02%	Electron transport
276	NADH:ubiquinone oxidoreductase 20 kD subunit and related FeS oxidoreductases	Bacteria; heterogen		0,03%	Electron transport
912	NADH:ubiquinone oxidoreductase 20 kD subunit and related FeS oxidoreductases	Epsilonproteobacteria; heterogen	0,38%		Electron transport
949	NADH dehydrogenase/NADH:ubiquinone oxidoreductase 75 kD subunit (chain G)	uncultured <i>Sulfuricurvum</i> sp. RIFRC1	0,04%		Electron transport
874	Desulfoferrodoxin	<i>Sulfuricurvum</i> ; heterogen	0,49%		Electron transport
953	Cbb3type cytochrome oxidase, cytochrome c subunit	uncultured <i>Sulfuricurvum</i> sp. RIFRC1	0,30%		Electron transport
258	Cytochrome c, mono and diheme variants	<i>Burkholderia phytofirmans</i>		0,02%	Electron transport

¹ Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Schlema

² Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Zobes

Tabelle 3.13: Proteingruppen für Bacteria aus Flutungswasserproben mit Bedeutung für den mikrobiellen Energiestoffwechsel basierend auf COG- und TIGRFAM-Datenbank mittels PROPHANE (continued)

Protein- gruppe Nr.	Funktion der Proteingruppe [COG]	Mikroorganismus (bester Hit)	SW ¹	ZW ²	Zellstoffwechsel(-schritt) [TIGRFAM]
267	F0F1type ATP synthase, α subunit	Spiribacter salinus		0,01%	ATPproton motive force interconversion
61	F0F1type ATP synthase, β subunit	Bacteria; heterogen		0,01%	ATPproton motive force interconversion
62	F0F1type ATP synthase, β subunit	Bacteria; heterogen		0,03%	ATPproton motive force interconversion
837	F0F1type ATP synthase, β subunit	Bacteria; heterogen	0,06%		ATPproton motive force interconversion
686	F0F1type ATP synthase, δ subunit (mitochondrial oligomycin sensitivity protein)	<i>Polaromonas</i> ; heterogen		0,08%	ATPproton motive force interconversion
434	F0F1type ATP synthase, gamma subunit	<i>Gallionella capsiferriiformans</i>		0,02%	ATPproton motive force interconversion
544	ATP sulfurylase (sulfate adenylyltransferase)	Bacteria; heterogen		0,03%	Sulfur metabolism
632	Dissimilatory sulfite reductase (desulfovirdin), α and β subunits	Bacteria; heterogen		0,02%	Sulfur metabolism
933	Dissimilatory sulfite reductase (desulfovirdin), α and β subunits	<i>Thiothrix</i> nivea	0,10%		Sulfur metabolism
434	Ferredoxin	<i>Beggiatoa</i> sp. PS		0,05%	Sulfur metabolism
584	Ferredoxin	Proteobacteria; heterogen		0,10%	Sulfur metabolism
585	Ferredoxin	Proteobacteria; heterogen		0,15%	Sulfur metabolism
425	Ferredoxin	Bacteria; heterogen	0,24%		Sulfur metabolism
857	Ferredoxin	<i>Thiothrix</i> ; heterogen	0,25%		Sulfur metabolism

¹ Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Schlema² Relative Abundanz der Proteingruppen für Flutungswasser aus Zobes

3.7 Stimulation mikrobieller Stoffwechselprozesse zur Immobilisierung von Uran und Arsen

3.7.1 Labormikrokosmen

Um zu untersuchen, ob indigene Mikroorganismen aus der Urangrube Schlema in der Lage sind, die Mobilität von Uran und Arsen zu beeinflussen, wurde deren Wachstum in Labormikrokosmen unter naturnahen Bedingungen stimuliert. Durch die Verwendung von Acetat als Elektronendonator sollten anaerobe Prozesse induziert werden, die durch die Analyse von gelöstem Fe(II) und Sulfat verfolgt wurden.

In Abb. 3.19 ist der zeitliche Verlauf der analysierten Parameter für die stimulierten Labormikrokosmen zusammenfassend dargestellt. Labormikrokosmen mit der planktonischen mikrobiellen Gemeinschaft zeigten ab dem 2. Tag nach Acetatzugabe einen Anstieg der Fe(II)-Konzentration von ca. 0 μM auf bis zu 57 μM am 19. Tag. Nach 23 d nahm die Fe(II)-Konzentration bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus an Tag 57 ab und blieb bis zum Ende des Versuchszeitraums konstant. Eine Abnahme des gelösten Arsens von 18 μM auf 2 μM war von Tag 33 bis Tag 40 zu beobachten. In den folgenden 58 d stieg die Konzentration des gelösten Arsens wieder leicht auf bis zu 5 μM an. Die Konzentration des gelösten, natürlichen Urans im Flutungswasser nahm ab dem 40. Tag von 6 μM auf 5 μM ab. Ein Abfall der Acetat- als auch der Sulfatkonzentration wurde ebenfalls nach 40 d Inkubation festgestellt. Die Acetatkonzentration sank auf ca. 6 mM und blieb im weiteren Verlauf konstant, während Sulfat schon nach 63 d kaum mehr detektiert werden konnte. Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der Urankonzentration zu einer Veränderung der beobachteten Prozesse führt, wurde ein Set der Mikrokosmen mit 50 μM U(VI) supplementiert. Der Einfluss des zugegebenen U(VI) auf den Verlauf des gelösten Fe(II) geht aus den ermittelten Daten nicht eindeutig hervor. Die zunächst beobachtete Zunahme von Fe(II) war hinsichtlich des Zeitraums und der maximal erreichten Konzentration vergleichbar mit den entsprechenden Daten für Mikrokosmen ohne Zugabe von U(VI). Dagegen schien die Abnahme von Fe(II) mit zusätzlichem U(VI) zeitlich verzögert einzusetzen. Der Zeitpunkt sowie das Niveau der minimal erreichten Fe(II)-Konzentration wurden nicht beeinflusst. Die Zugabe von U(VI) führte bei der planktonischen, mikrobiellen Gemeinschaft außerdem zu einer zeitlich verzögerten und deutlich verlangsamten Abnahme von Acetat, Sulfat und gelöstem Arsen. Die Reihenfolge der beobachteten Prozesse, d.h. Zunahme des gelösten Fe(II), gefolgt von der Abnahme des gelösten Arsens und schließlich die gleichzeitige

3 Ergebnisse

Abnahme von Acetat und Sulfat, wurde durch die Zugabe von U(VI) nicht beeinflusst. Die Konzentration des gelösten Urans nahm nur geringfügig ab.

Bei Labormikrokosmen, die mit Biofilm bewachsenen Aktivkohlepellets nach 3-monatiger Inkubation im Feld beschickt wurden, wurde eine Zunahme des gelösten Fe(II) von ca. 0 μM bis zum Erreichen einer maximalen Konzentration von 119 μM an Tag 19 festgestellt. Die Fe(II)-Konzentration sank ab dem 21. Tag innerhalb von 12 d wieder auf das Ausgangsniveau. Eine deutliche Konzentrationsabnahme des gelösten Arsens wurde ab dem 9. Inkubationstag über einen Zeitraum von 24 d ermittelt. Nach sieben weiteren Tagen stieg die Arsenkonzentration im Flutungswasser bis zum Versuchsende auf 8 μM an. Vom 9. bis 63. Tag wurde zudem eine schwache Abnahme des gelösten Urans von 7 μM auf 4 μM ermittelt. Die Konzentration des gelösten Urans blieb im weiteren Untersuchungszeitraum konstant. Für Acetat wurde eine Abnahme ab dem 26. Inkubationstag bis zum Erreichen einer Konzentration von ca. 3 mM an Tag 57 festgestellt. Ungefähr zeitgleich mit Acetat nahm Sulfat ab, welches nach 57 d nicht mehr detektiert werden konnte. Bei stimulierten Mikrokosmen mit Supplementation von 50 μM U(VI) wurden in Bezug auf Fe(II), Arsen, Acetat und Sulfat ähnliche Konzentrationsverläufe wie für die entsprechenden Biofilmgemeinschaften ohne Zusatz von Uran ermittelt. Zusätzlich konnte die gleichzeitige Abnahme von gelöstem Uran und Arsen festgestellt werden, die in den Mikrokosmen ohne Zusatz von Uran nicht so deutlich erkennbar war. Gelöstes Uran sank bis zum 35. Tag auf eine Konzentration von 39 μM , die bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes in etwa konstant blieb. Die Konzentrationsabnahme von ca. 14 μM Uran war somit höher als die natürliche Urankonzentration im Flutungswasser von ca. 7 μM . Das deutet daraufhin, dass ein Teil des zugegebenen U(VI) immobilisiert wurde. Insgesamt liefen die Prozesse bei den stimulierten Biofilmgemeinschaften zeitlich wie folgt ab: 1. die Zunahme des gelösten Fe(II), 2. die gleichzeitige Abnahme des gelösten Arsens und Urans (in zeitlicher Überschneidung mit 1. Prozess) und 3. die gleichzeitige Abnahme von Acetat und Sulfat. Das entspricht grundsätzlich der gleichen Reihenfolge wie bei der planktonischen Gemeinschaft. Allerdings konnte bei den Biofilmen im Vergleich zu den planktonischen Gemeinschaften eine deutlichere Abnahme des gelösten Urans festgestellt werden, die zudem noch vor der Sulfatreduktion stattfand. Desweiteren wurde ein früheres Eintreten der Abnahme von Acetat, Sulfat und insbesondere des gelösten Arsens bei den Biofilmgemeinschaften festgestellt.

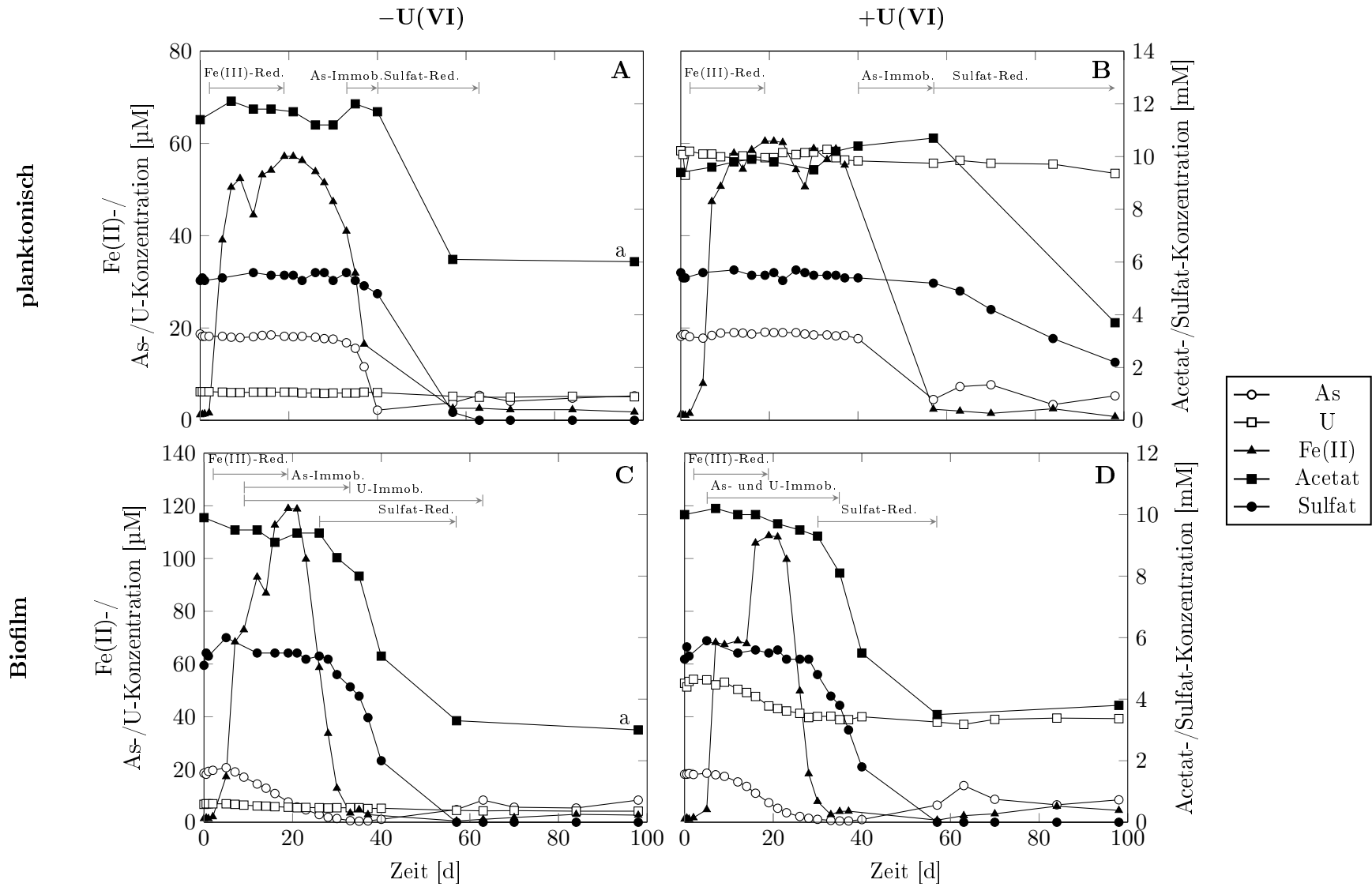


Abbildung 3.19: Zeitliche Abfolge anaerober, mikrobieller Prozesse nach Stimulation mit Acetat in Labormikrokosmen mit (A, B) planktonischen Gemeinschaften und (C, D) Biofilm aus Schleima

(B, D) enthielten zusätzlich 50 μM U(VI); Konzentrationen gelten für gelöste Fraktion; Punkte sind Mittelwerte aus 3 parallelen Ansätzen; a... errechneter Wert für Ausreißer durch Acetatbestimmung nach 190 Tagen; Red... Reduktion; Immob... Immobilisierung

3 Ergebnisse

Die positive Korrelation zwischen der Acetat- und Sulfatkonzentration, die bei allen stimulierten Mikrokosmen festgestellt wurde, weist daraufhin, dass die Sulfatreduktion mit der Oxidation von Acetat gekoppelt wurde. Unter Annahme eines chemischen Gleichgewichts wurde für beide Parameter die gleiche Abnahmerate erwartet, da das Molverhältnis zwischen Acetat und Sulfat 1:1 betragen sollte.



Sowohl für die stimulierten Biofilmgemeinschaften als auch für die planktonische Gemeinschaft ohne Zugabe von U(VI) wurde eine Acetat- und Sulfatabnahmerate von 0,04 mM/d bzw. 0,23 mM/d ermittelt. Daraus ergab sich ein ungefähres Acetat-Sulfat-Verhältnis von 1:6, d.h. Sulfat nahm schneller ab als Acetat. Für die planktonische Gemeinschaft mit zusätzlichem U(VI) wurden geringere Abnahmeraten von 0,02 mM/d und 0,03 mM/d für Acetat bzw. Sulfat ermittelt, was eher dem erwarteten Acetat-Sulfat-Verhältnis von 1:1 entsprach. Die erhaltenen Abnahmeraten dienten hier nur als Orientierung, da die Raten aufgrund der geringeren Anzahl vorhandener Daten im Bereich der exponentiellen Abnahme vermutlich nicht ausreichend genau waren.

Um den mikrobiellen Einfluss sowie die Auswirkungen der Wachstumsstimulation mit Acetat auf die Mobilität von Arsen und Uran in den untersuchten Mikrokosmen besser beurteilen zu können, wurden zeitgleich jeweils drei verschiedene Kontrollen für jeden Ansatz mitgeführt. Zu den Kontrollen zählten die Totkontrolle (autoklaviert), die Substratkontrolle (ohne Acetat) und im Fall der Biofilmversuche die Matrixkontrolle (Aktivkohlepellets ohne Biofilm). Bei allen Kontrollen wurden in Bezug auf die Konzentration des gelösten Arsens und Urans keine deutlichen Veränderungen, zumindest im Sinne einer Abnahme, im Untersuchungszeitraum festgestellt (Abb. A.1, Abb. A.2). Zur besseren Visualisierung wurde für die stimulierten Mikrokosmen der maximale, mikrobielle Einfluss auf die Mobilität von Arsen und Uran als relative Ab-/bzw. Zunahme der Konzentration für jeden einzelnen Ansatz berechnet und die gemittelten Werte eines Sets (jeweils drei Ansätze) den zugehörigen Kontrollen gegenübergestellt (Abb. 3.20). Für die stimulierte, planktonische Gemeinschaft der Mikroorganismen wurde eine maximale Abnahme des gelösten Arsens von $81 \pm 10\%$ und $80 \pm 3\%$ für Mikrokosmen ohne bzw. mit zusätzlichem U(VI) bestimmt. Die maximale Abnahme des gelösten Urans der stimulierten, planktonischen Gemeinschaft betrug hingegen nur $20 \pm 3\%$ (ohne Zusatz von U(VI)) bzw. $8 \pm 1\%$ (mit Zusatz von

3 Ergebnisse

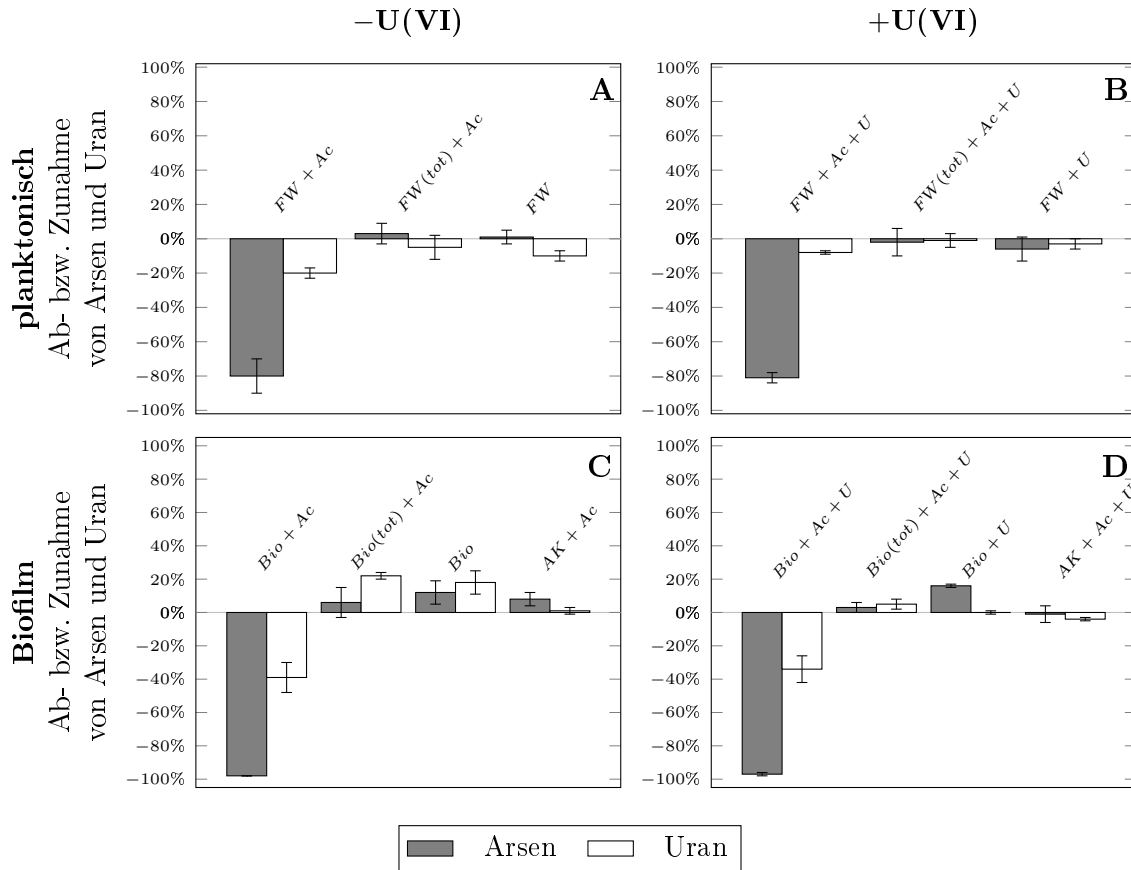


Abbildung 3.20: Maximale Abnahmen von gelöstem Arsen und Uran nach Zugabe von Acetat in Labormikrokosmen mit (A, B) planktonischen Gemeinschaften und (C, D) Biofilmen aus Schleima im Vergleich zu Kontrollen (C, D) enthielten zusätzlich 50 μM U(VI)

U(VI)). Für die untersuchten Biofilme wurde bei Stimulation mit Acetat eine maximale Abnahme des gelösten Arsens von 98% (ohne Zusatz von U(VI)) bzw. $97 \pm 1\%$ (mit Zusatz von U(VI)) ermittelt. Für die entsprechenden Kontrollen wurde meist eine Zunahme des gelösten Arsens festgestellt. Die maximale Abnahme des gelösten Urans betrug $39 \pm 9\%$ und $34 \pm 8\%$ für die stimulierten Biofilme ohne bzw. mit zusätzlichem U(VI). Eine Zunahme des Urans wurde insbesondere für die Kontrollen ohne Zugabe von U(VI) ermittelt. Die Zunahmen von Uran und Arsen in den Tot- und Substratkontrollen weisen daraufhin, dass während der *in situ* Inkubation an Biofilm bewachsenen Aktivkohlepellets immobilisiertes Arsen und Uran, möglicherweise durch die Zerstörung von Zell-bzw. Biofilmstrukturen, freigesetzt wurde.

Neben gelöstem Arsen und Uran wurden auch die anderen drei Parameter in den Kontrollen analysiert. Während die Ausgangskonzentration von Acetat und Sulfat im gesamten Untersuchungszeitraum in den Kontrollen konstant blieb, wurden bei gelöstem Fe(II)

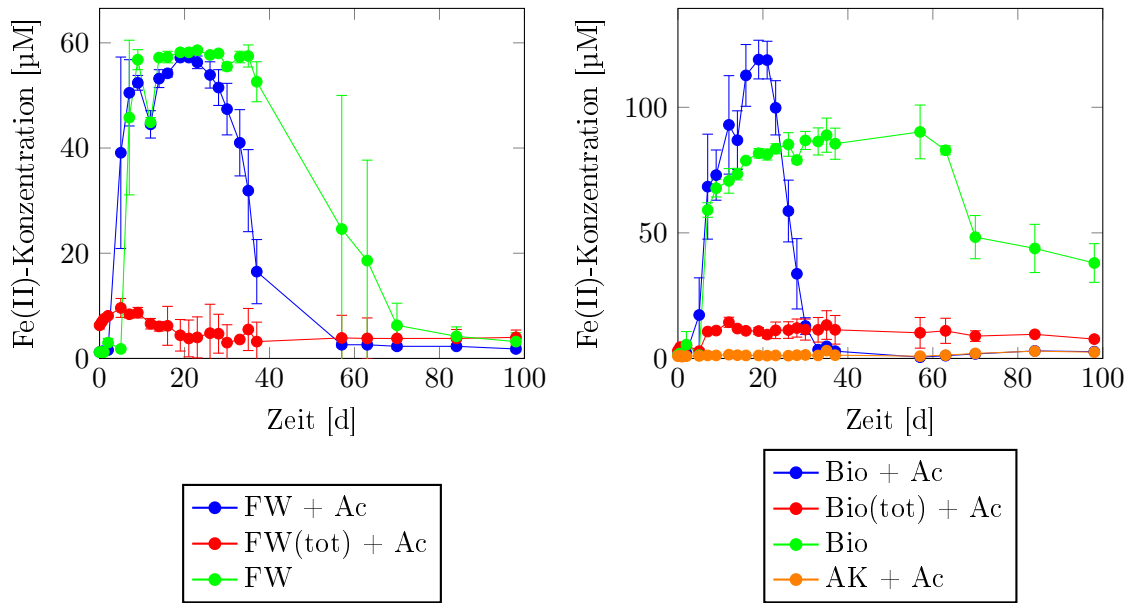


Abbildung 3.21: Zeitlicher Verlauf der Fe(II)-Konzentration in Labormikrokosmen mit Mikroorganismen der (A) planktonischen Gemeinschaft und (B) Biofilmen aus Schleima

blau... Stimulation; rot... Totkontrolle; grün... Substratkontrolle;
orange... Matrixkontrolle

unerwartet Konzentrationsänderungen festgestellt. In Abb. 3.21 sind die Verläufe der Konzentration des Fe(II) für die Labormikrokosmen ohne zusätzliches U(VI) dargestellt, die für die Mikrokosmen mit Zugabe von U(VI) grundsätzlich ähnlich aussahen. Für die Totkontrolle wurde sowohl für die planktonischen Gemeinschaften als auch bei Biofilmen im Vergleich zu den stimulierten Mikrokosmen eine etwas höhere Ausgangskonzentration des Fe(II) von ca. 7 µM bzw. 11 µM ermittelt, die im Untersuchungszeitraum nahezu konstant blieb. Bei der für Biofilm-Mikrokosmen mitgeführten Matrixkontrolle (AK + Ac) lag die Ausgangskonzentration des gelösten Fe(II) unter der Detektionsgrenze und veränderte sich im Laufe des Experiments nicht. Für die Substratkontrollen, die nicht mit Acetat supplementiert wurden, wurde ähnlich wie in den stimulierten Mikrokosmen ein Anstieg der Fe(II)-Konzentration bis auf ca. 60 µM bzw. 80 µM ermittelt, der daraufhin deutet, dass andere in dem Flutungswasser vorhandene Elektronendonoren für die Fe(III)-Reduktion mikrobiell genutzt wurden. Da in den stimulierten Mikrokosmen mit Biofilmen Fe(II) weiter bis auf ca. 120 µM anstieg, wurde möglicherweise ein Teil des Eisens mit dem zugesetzten Acetat reduziert als der natürliche Elektronendonator vollständig verbraucht war. Bei beiden Substratkontrollen nahm Fe(II) mit geringerer Geschwindigkeit als bei den stimulierten Mikrokosmen ab.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Labormikrokosmenversuche vereinfacht zusammengefasst. Erwartungsgemäß wurde in allen stimulierten Mikrokosmen, sowohl für planktonische Gemeinschaften als auch Biofilme, als erster Prozess die mikrobielle Fe(III)-Reduktion festgestellt. Die Reduktion des Eisens fand auch ohne Acetat als Elektronendonator, aber nur bei Anwesenheit nicht getöteter Mikroorganismen, statt. Fast zeitgleich mit der Fe(III)-Reduktion wurde die Immobilisierung von Arsen bei den stimulierten Biofilmgemeinschaften festgestellt. Bei den planktonischen Gemeinschaften wurde dieser Prozess erst nach der Reduktion des Eisens beobachtet. Beide Gemeinschaften konnten Arsen kurzfristig fast vollständig immobilisieren, ein Teil des Arsens wurde wieder mobil. Die partielle Immobilisierung von Uran wurde bei stimulierten Biofilmen deutlicher als bei planktonischen Gemeinschaften festgestellt und verlief gleichzeitig mit der Immobilisierung von Arsen bzw. der Fe(III)-Reduktion. In stimulierten, planktonischen Gemeinschaften wurde ein sehr geringer Teil des Urans in etwa gleichzeitig mit der späteren Sulfatreduktion immobilisiert. Sowohl die Immobilisierung von Arsen als auch Uran fand nur in stimulierten Mikrokosmen statt. Die Supplementation von 50 μM U(VI) führte bei der planktonischen Gemeinschaft zu einer Verzögerung und Verlängerung der untersuchten Prozesse mit Ausnahme der Fe(III)-Reduktion. Die Sulfatreduktion, der letzte Prozess, konnte in allen Gemeinschaften nur bei Supplementation mit Acetat festgestellt werden, welches gleichzeitig mikrobiell verbraucht wurde.

3.7.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zum Valenzstatus von Uran

Um herauszufinden, ob immobilisiertes Uran im Biofilm reduziert wurde, wurde der Valenzstatus mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie (LIFS) durch Anregung von U(VI) unter anoxischen und oxischen Bedingungen untersucht. Hierbei dient die Zunahme der U(VI)-Lumineszenz nach Exposition der Probe unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen als indirekter Nachweis für das Vorkommen reduzierter Uranverbindungen. Nach Beendigung der Mikrokosmenversuche wurde Uran aus dem Biofilm des Ansatzes Bio + Ac + U mit anoxischer H_2SO_4 extrahiert und in Lösung analysiert.

In Abb. 3.22 sind die Emissionsspektren für U(VI) des untersuchten Biofilmextrakts dargestellt. Während nach Anregung des U(VI) unter anoxischen Bedingungen keine deutlichen Lumineszenzsignale im Wellenlängenbereich von 450 - 600 nm detektiert werden konnten, wurde ein charakteristisches Emissionsspektrum mit fünf Maxima für dieselbe

3 Ergebnisse

Probe nach Exposition unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen festgestellt. Die Lumineszenzintensität für U(VI) stieg während der Exposition von Tag 1 bis Tag 5 in der Probe weiter an, die Lage der Emissionsmaxima änderte sich dagegen kaum. Für die detektierten U(VI)-Emissionsmaxima der oxidierten Probe nach fünf Expositionstagen wurden Wellenlängen von 475 nm, 493 nm, 515 nm, 539 nm und 565 nm ermittelt, die erwartungsgemäß mit denen für lösliche Uranylsulfat-Spezies übereinstimmen (Tab. 3.14). Aufgrund der Komplexität der Probenmatrix war die Kalibrierung des U(VI)-Signals zur Konzentrationsbestimmung nicht sinnvoll. Daher konnte U(VI) nur qualitativ bestimmt werden. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass der größte Teil des immobilisierten Urans in Acetat stimuliertem Biofilm aus Schleima reduziert wurde. Demzufolge fanden im Biofilm Redoxprozesse statt, die auch Auswirkungen auf den Oxidationszustand von Uran hatten.

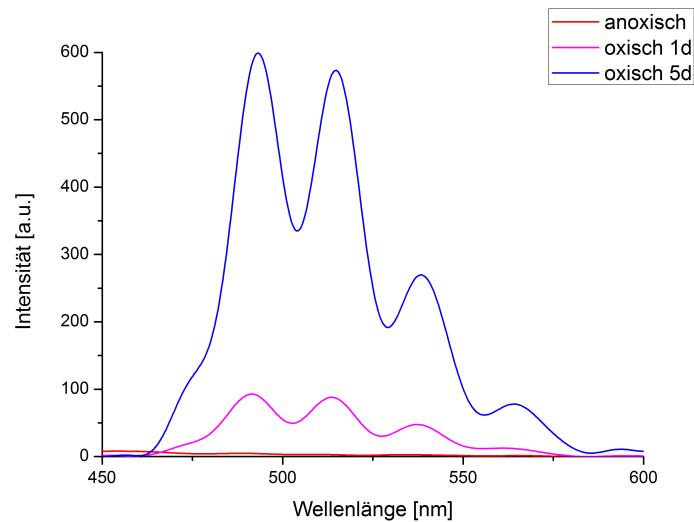


Abbildung 3.22: LIFS-Spektrum von U(VI) nach Extraktion aus Biofilm (Labormikrokosmen)

Tabelle 3.14: Vergleich der mittels LIFS ermittelten Emissionsmaxima für lösliche Uranylsulfatspezies mit publizierten Daten

Emissionsmaxima [nm] für lösliche Uranylsulfatspezies					Quelle
475	493	515	539	565	In dieser Arbeit
-	493	514	538	565	Bernhard <i>et al.</i> , 1996 [226]
477 bzw. 478	493	515	539	563	Vetešník <i>et al.</i> , 2008 [227]
478	493	514	538	563	Arnold <i>et al.</i> , 2011 [228]

4 Diskussion

4.1 Lebensbedingungen für Mikroorganismen in den gefluteten Urangruben

Mit dem Ziel, die Lebensbedingungen für Mikroorganismen besser einschätzen zu können, wurden die Untersuchungsstandorte zunächst hydrochemisch charakterisiert. Grundsätzlich können die hier untersuchten, unterirdischen Urangruben am ehesten mit abgeschlossenen, tiefen Grundwassersystemen verglichen werden. Die Beschaffenheit der Flutungswässer hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften und chemischen Zusammensetzung ist hauptsächlich durch das umgebende Grundgestein und mögliche Zuströme geprägt. Die Flutungswässer aus Pöhla, Schlema und Zobes wiesen nahezu neutrale pH-Werte und dementsprechend geringe Schwermetallkonzentrationen auf. Die untersuchten Gruben unterscheiden sich insofern von sauren Uranerzbergwerken (Acid Mine Drainage), wie z.B. Königstein in Sachsen [5, 229] oder Curilo in Bulgarien [230], für die eine hohe Schwermetallbelastung typisch ist. Bedingt durch geothermische Prozesse im Untergrund waren die ermittelten Temperaturen mit ca. 18 - 25°C für alle Flutungswässer relativ hoch. Die Redoxpotentiale deuteten auf ein intermediäres bzw. schwach oxidierendes Milieu in den untersuchten Urangruben hin. Die ermittelten Werte für die Temperatur, das Redoxpotential sowie die elektrische Leitfähigkeit, d.h. die Summe der gelösten Ionen, waren für Schlema im Vergleich zu den beiden anderen Gruben höher. Die Ursache hierfür liegt in der Grubencharakteristik begründet. In tiefen Schächten, wie sie in Schlema vorkommen, sind höhere Temperaturen und längere Verweildauern des Wassers typisch, die letztlich zu einer höheren Dissoziation von Mineralen führen. Die Grube Schlema besitzt zudem geräumigere Schächte, die bis kurz unter die Oberfläche reichen sowie größere Hohlräume. Das könnte im Vergleich zu den beiden anderen Gruben zu höheren Sauerstoffeinträgen führen und reduktive Prozesse erschweren. Im Gegensatz zu oberflächennahen Gewässern unterliegen die analysierten Flutungswässer keiner saisonalen Dynamik (Monitoring Wis-

mut). Basierend auf den Ergebnissen jährlicher *in situ* Messungen in noch zugänglichen Tagesschächten wurde für die Gruben Pöhla und Schlema ein homogener Flutungswasserkörper angenommen (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH) [183]. Gute hydraulische Verbindungen der unterirdischen Schächte sowie die durch den geothermischen Tiefengradient aufgezwungene Konvektion führen zu einer Vermischung des Wassers einschließlich möglicher Elektronendonoren und -akzeptoren und somit vermutlich zur Aufhebung der Stratifikation [183, 231]. Der für mikrobielle Prozesse in Grundwassersystemen geläufigste Elektronendonator ist organischer Kohlenstoff [231]. Anhand des Summenparameters DOC (dissolved organic carbon) wird üblicherweise die Nährstoffsituation eines Ökosystems beurteilt. Die für die Flutungswässer ermittelten DOC-Konzentrationen von 1,3 bis 6,8 mg/l entsprechen in etwa denen für Grund- bzw. Oberflächenwasser und deuteten auf ein eher oligotrophes Habitat hin [232]. Die Zusammensetzung des DOCs wurde in den Flutungswässern nicht untersucht. Eine mögliche Quelle organischer Verbindungen könnte aber das für den Ausbau der Gruben eingebrachte Holz darstellen, welches durchschnittlich mit 26 - 32 m³ pro 1000 m³ Bergmasse im Abbau verbaut wurde [4], (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH). Eine geringe Bioverfügbarkeit des DOC wird, wie durch Studien an Grundwassersystemen mittels biochemischen und spektroskopischen Analysen belegt [233–236], auch für Flutungswässer angenommen. Neben organischen Kohlenstoff können andere reduzierte Komponenten wie z.B. Mn(II), Fe(II), Ammonium oder Sulfid ebenso als Elektronendonator fungieren. Während letzteres nicht bestimmt wurde, lagen die Konzentrationen von Mangan, Eisen und Ammonium in allen Flutungswässern im mikromolaren Bereich. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei der Bestimmung von Mangan und Eisen keine Unterscheidung zwischen den entsprechenden Oxidationsformen, Mn(II) und Mn(IV) bzw. Fe(II) und Fe(III), stattgefunden hat. Insgesamt deuten die Daten daraufhin, dass der Elektronendonator zumindest für heterotrophe Mikroorganismen ein limitierender Faktor in allen Flutungswässern war. Die Limitation des Elektronendonors wurde auch in unberührten Aquiferen festgestellt und auf den mangelnden Zustrom neuer und einfach verwertbarer, reduzierter Verbindungen zurückgeführt [57]. Von der Vielzahl möglicher, mikrobiell katalysierter Elektronentransfers ist der letzte Schritt der Elektronenübertragung auf einen Akzeptor hinsichtlich ökologischer Stoffkreisläufe am bedeutendsten [237]. Als terminale Elektronenakzeptoren können entsprechend der freiwerdenden Reaktionsenergie der Reihenfolge nach O₂, NO₃⁻, Mn(IV), Fe(III), SO₄²⁻ und CO₂ genutzt werden. Sie kommen in der Atmosphäre und/oder in der

ungesättigten Zone, dem Gebiet oberhalb der Grundwasseroberfläche, vor und können bei der Grundwassererneuerung in den Wasserkörper transportiert werden, wobei Mn(IV) sowie Fe(III) bei neutralem pH-Wert hauptsächlich in festen Mineralphasen auftreten. In den Randbereichen der Urangruben wurde eine schnelle Sauerstoffzehrung angenommen (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH), die schließlich ein sub- bis anoxisches Milieu in den Flutungswässern bewirkte. Für Nitrat wurden in allen Flutungswässern mit bis zu 2,6 mg/l nur geringe Konzentrationen ermittelt. Die Verfügbarkeit von Mn(IV) und Fe(III) ließ sich mit der Art der Proben und Analysemethoden schlecht einschätzen. Für Sulfat wurde interessanterweise eine sehr hohe Konzentration im millimolaren Bereich für das Flutungswasser aus Schlema im Unterschied zu Pöhla und Zobes festgestellt. Als mögliche Quelle für Sulfat kommen Minerale wie Gips, Schwerspat und Anhydrit in den vorliegenden Carbonatgesteinen in Frage. Der Überschuss an Sulfat im Flutungswasser aus Schlema lässt vermuten, dass Sulfat aufgrund der Dominanz thermodynamisch günstigerer Reaktionen als Elektronenakzeptor entweder nicht genutzt wurde oder dass die Sulfatreduktionsraten angesichts begrenzt verfügbarer Elektronendonoren sehr gering waren. Kohlendioxid, welches in Sedimenten bei der Mineralisierung organischer Stoffe entsteht, löst sich zum Teil in Wasser und dissoziiert zu H^+ und HCO_3^- . Die Hydrogencarbonatkonzentration wird durch das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht bestimmt und war in allen Flutungswässern, bedingt durch die Geologie der Gruben, sehr hoch. Eine Besonderheit der Flutungswässer aus Pöhla und Schlema im Vergleich zu Zobes als auch zu anderen ehemaligen Urangruben in Deutschland war der hohe Arsengehalt. Das westliche Erzgebirge enthält von Natur aus arsenhaltige Minerale, gediegenes Arsen sowie insbesondere Arsenide. Arsen war unter den vorherrschenden Bedingungen mit bis zu 18 g/l gut in Wasser löslich und lag, wie für anoxische Wässer beschrieben, primär als As(III) vor [48, 183, 238, 239]. Für das Flutungswasser aus Schlema wurde zudem im Vergleich zu Pöhla und Zobes eine hohe Urankonzentration von 1,7 mg/l ermittelt, die den angestrebten Grenzwert von 0,5 mg/l Uran zur Einleitung in die Zwickauer Mulde überstieg (mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Meyer, Wismut GmbH). Obwohl Uran bei neutralem pH-Wert unter anoxischen Bedingungen in Form von U(IV) schlechter wasserlöslich ist als im oxischen Milieu in Form von U(VI), können Liganden wie Carbonat und Sulfat, die in Schlema auch in höheren Konzentrationen vorhanden waren, die Löslichkeit beeinflussen [240]. Ulrich *et al.* zeigten anhand von Löslichkeitsstudien mit Uraninit, dass die Löslichkeit von Uran bei Anwesenheit von Carbonat sowohl unter oxischen als auch anoxischen Be-

dingungen durch die Komplexbildung des Liganden mit U(VI) beschleunigt wird. Darüber hinaus vermuteten die Autoren, dass divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} einen ähnlichen Effekt auf die Löslichkeit haben, da diese häufig Bestandteil der Komplexe waren [241, 242]. In guter Übereinstimmung dazu wurde mithilfe thermodynamischer Modellrechnungen der Calcium-Carbonat-Uranyl-Komplex, $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$, als dominierende Uranspezies für das aktuell nahezu anoxische Flutungswasser aus Schlema (Daten von 2013) identifiziert (unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. Bok, HZDR). Demnach hat sich die Uranspeziation in diesem Flutungswasser seit 1998 [30], trotz der durch die Flutung initiierten Veränderungen hydrochemischer Parameter wie Sauerstoffkonzentration und Redoxpotential, nicht wesentlich geändert. Während Uran und Arsen von Mikroorganismen potentiell als Elektronendonator oder -akzeptor genutzt werden können [35, 138, 243], ist ein mikrobieller Nutzen für Radium, einem Tochternuklid des Urans, nicht bekannt. Für Ra-226 wurden in allen untersuchten Flutungswässern sehr hohe Aktivitätskonzentrationen (1,7 - 4,2 Bq/l *vs.* ca. 5 mBq/l für Trinkwässer aus Deutschland [244]) ermittelt.

Aus der hydrochemischen Charakterisierung der Urangruben wurde in erster Linie abgeleitet, dass die Lebensbedingungen für heterotrophe Mikroorganismen ungünstig waren. Ein relativ langsames Wachstum von mesophilen, neutrophilen sowie vor allem anaeroben Mikroorganismen wurde erwartet. Aufgrund der Durchmischung des Wassers in den Gruben konnte nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene, mikrobielle Prozesse in räumlicher Nähe zueinander stattgefunden haben. Die zusätzliche Analyse von Redoxindikatoren, wie z.B. N_2 , H_2S , CH_4 und H_2 könnte in Zukunft helfen, dominante Prozesse zu identifizieren [245–248].

4.2 BACTRAPs zur Gewinnung von *in situ* Biofilmen

Da Mikroorganismen in unberührten als auch kontaminierten Aquifersystemen bevorzugt in Biofilmgemeinschaften auf Sedimentoberflächen leben [57, 60, 61, 249], waren diese - neben planktonischen Mikroorganismen - für die Untersuchungen der Flutungswässer stillgelegter Uranminen von besonderem Interesse. Um zeit- und kostenintensive Sedimentbohrungen in den schwer zugänglichen Urangruben zu vermeiden, wurden artifizielle Aufwuchsträgersysteme zur *in situ* Besiedlung sessiler Mikroorganismen im Flutungswasser exponiert. Die bereits von vielen Autoren zur Gewinnung von Biofilmen erfolgreich eingesetzten Träger aus Glas oder Kunststoffen [250–256] wurden zwar von morphologisch

4 Diskussion

unterschiedlichen Mikroorganismen innerhalb der 3-monatigen Exposition in der Durchflussszelle besiedelt, eigneten sich aber dennoch nicht, um in dem definierten Zeitfenster aus den nährstoffarmen Flutungswässern genügend Biomasse für eine erfolgreiche Extraktion von Nukleinsäuren zu gewinnen. Nichtsdestotrotz kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass eine andere Extraktionsmethode als die gewählte mit dem verwendeten PowerSoil™ DNA Isolation Kit bessere DNA-Ausbeuten erzielen würde. Lear *et al.* zeigten beispielsweise, dass zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Bachbiofilmen verschiedene, in der Literatur beschriebene Extraktionsprotokolle besser geeignet waren als kommerziell erhältliche Kits [257]. Alternativ könnte auch insbesondere bei geringen Biomassen auf die Nukleinsäureextraktion komplett verzichtet werden, indem eine Intact-Biofilm-PCR zur Identifizierung von Mikroorganismen durchgeführt würde [258].

Im Gegensatz zu den Objektträgern in der Durchflussszelle ermöglichte der Einsatz von BACTRAPs, wahrscheinlich aufgrund größerer Biomasseerträge, die Extraktion hochreiner Nukleinsäuren mit ausreichenden Ausbeuten für weitere Analysen. Zum einen bietet die poröse Struktur der Aktivkohlepellets eine wesentlich größere Oberfläche (1 BACTRAP : 1 Durchflussszelle à 24 Träger entspricht $> 600 \text{ m}^2 : < 0,1 \text{ m}^2$), zum anderen führt die Adsorption und somit Anreicherung potentieller Nährstoffe an Aktivkohle möglicherweise zu einer bevorzugten, mikrobiellen Kolonisierung dieser Oberflächen.

Neben den in der Arbeit verwendeten Materialien und Oberflächen wurden von vielen Autoren zahlreiche andere, darunter Glaskügelchen [259, 260], Glasfaserfilter [250], Glaswolle [184] semipermeable Membranen [261] sowie sterile Sedimente [61, 258, 262–264] zur Besiedlung und Untersuchung natürlicher Biofilme eingesetzt. Generell ist die Bedeutung von *in situ* Mikrokosmen gewonnenen Daten schwer einzuschätzen. Die Verwendung artifizierlicher Materialien, die Wahl des Expositionsortes (z.B. Wassertiefe, Nähe zum Sediment, etc.) als auch die Expositionszeit der Mikrokosmen resultieren in einer eingeschränkten Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf physiologisch relevante Gemeinschaften und Prozesse [263]. Daher ist der Vergleich mit mikrobiellen Gemeinschaften aus Bohrkernen grundsätzlich ratsam, wenngleich auch hier Fehlinterpretationen aufgrund geologischer Heterogenitäten sowie Kontaminationen möglich sind.

4.3 Mikrobielle Gemeinschaften in den gefluteten Urangruben

4.3.1 Einschätzung der bakteriellen Diversität

Mithilfe der Pyrosequenzierung eines 16S rDNA-Anschnitts wurde mit einer Coverage von mind. 75% der größte Anteil der Bacteria in den hier untersuchten planktonischen Gemeinschaften erfasst. Die Diversität wurde ausgehend von Flutungswasserproben anhand verschiedener Indizes sowie Rarefaction-Kurven abgeschätzt. Da die Berechnung der tatsächlichen OTU-Anzahl mittels der Richness-Indizes, ACE und Chao1, im Wesentlichen auf der Anzahl seltener OTUs beruht, ist für den Vergleich verschiedener Einzelproben untereinander eine zumindest ähnliche Probertiefe nötig, die aber nicht für alle Proben erreicht wurde. Die Aussagekraft der ermittelten Richness-Indizes allein war entsprechend gering. Dagegen wurde für die Reihenfolge der Diversität der Proben untereinander zumeist ein übereinstimmendes Ergebnis anhand des Diversity-Index Shannon und der Rarefaction-Analyse erzielt. Die bakterielle Diversität war im Flutungswasser der verschiedenen Gruben mit Shannon-Indizes von 2,85 bis 3,40 (Pöhla) und 4,13 bis 4,34 (Zobes) durchaus verschieden. Die Bedeutung dieser Unterschiede bleibt jedoch offen. Da die mittels Indizes bestimmte Diversität neben der eigentlichen Diversität der Probe bzw. des Ökosystems von einer Reihe an Faktoren wie der Wahl der Primer und des Genabschnitts, der PCR-Methodik, der Fragmentlänge des PCR-Produkts, der Probertiefe sowie der OTU-Definition abhängt, lässt sie sich zwischen den in verschiedenen Studien analysierten Ökosystemen streng genommen nicht vergleichen. Es kann dennoch angenommen, dass die Diversität planktonischer Bacteria aus den drei Urangruben mit der ähnlicher Ökosysteme vergleichbar war. Beispielsweise ermittelten Edberg *et al.* für die bakterielle Diversität in einem Uranbergbausee im schwedischen Randstad Shannon-Indizes von 3,26 bis 4,07 [265].

In den Biofilmgemeinschaften, die sich auf BACTRAPs ansiedelten, wurden laut Coverage mind. 76% der Bacteria trotz eher geringer Probertiefe erfasst. Basierend auf der Alpha-Diversitätscharakteristik war die bakterielle Diversität in den Biofilmen geringer als in der planktonischen Gemeinschaften. Diese Unterschiede könnten auf eine Selektion von Mikroorganismen durch die gewählten Aufwuchsträger zurückzuführen sein.

4.3.2 Bakterielle Zusammensetzung der Gemeinschaften

Mithilfe der Clusteranalyse wurde die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften verglichen. Die zu einem Standort zugehörigen Flutungswasserproben waren sich untereinander

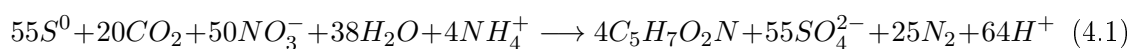
bezüglich ihrer bakteriellen Gemeinschaftsstruktur im Vergleich zu den anderen Standorten am ähnlichsten, wenngleich auch Unterschiede zwischen den Einzelproben eines Standortes hinsichtlich der relativen Abundanz von Bacteria-OTUs festgestellt wurden. Im Untersuchungszeitraum von 2012 bis 2013 dominierten wenige Bacteria die planktonische Gemeinschaft in der jeweiligen Urangrube. Die Ermittlung gemeinsamer, teils dominanter Bacteria-OTUs zwischen verschiedenen Standorten wies daraufhin, dass sich die bakterielle Zusammensetzung in den drei verschiedenen Urangruben, die unterschiedliche Flutungsstadien repräsentierten, nicht gänzlich voneinander unterschied.

Laut NMDS-Analyse hatte Ra-226 den größten Einfluss auf die Struktur der planktonischen Bacteria-Gemeinschaften. Es wurden allerdings nur geringe Unterschiede bezüglich der Verteilung der Bacteria zumindest auf Klassen-Ebene zwischen den drei Standorten festgestellt. Wenngleich radioaktive Strahlung durch oxidativen Stress zur Schädigung und schließlich zum Tod der mikrobiellen Zelle führen kann [266], ist bislang wenig über den Einfluss der umweltrelevanten Radioaktivität auf mikrobielle Gemeinschaften bekannt. Anhand von Labormikrokosmen mit Bodenproben aus Tschernobyl wurde gezeigt, dass die radioaktive Kontamination mit Cs-137 und Sr-90 die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft kaum beeinflusste und dass andere Stressfaktoren wie DOC zudem eine größere Rolle für die Funktion der Gemeinschaft spielten [267]. Auch in dieser Arbeit wurden neben Ra-226 viele andere Parameter wie Sulfat als mögliche Einflussfaktoren festgestellt. Am Beispiel des pH-Wertes als möglicher Einflussfaktor wurde offensichtlich, dass NMDS-Plots mit äußerster Vorsicht interpretiert werden müssen. So ist es eher unwahrscheinlich, dass Unterschiede der ermittelten pH-Werte zwischen 6,7 und 7,2 in den Flutungswässern einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Bacteria-Gemeinschaft hatten. Darüber hinaus konnten einige der für Mikroorganismen relevanten Faktoren (z.B. DOC) nicht mit berücksichtigt werden, weil sie nicht routinemäßig erfasst wurden.

Die OTU-basierte, taxonomische Zuordnung der mittels 16S rDNA-Analyse detektierten Mikroorganismen ergab, dass die meisten unter den klassifizierten Bacteria dem Phylum Proteobacteria angehörten. Proteobacteria sind eine der größten Gruppen der Prokaryonten und beinhalten die Mehrheit aller gramnegativen Bacteria [268–275]. Derzeit sind sechs verschiedene Klassen dieses Phylums bekannt: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und Zetaproteobacteria [276], die alle mit Ausnahme der letztgenannten in den planktonischen Gemeinschaften der verschiedenen Flutungswässer detektiert wurden. Wenngleich Unterschiede bezüglich der relativen Abundanzen der jeweiligen Klasse zwischen den Einzelpro-

ben eines Standortes als auch zwischen den verschiedenen Standorten ermittelt wurden, dominierten Beta- und/oder Epsilonproteobacteria die planktonische Bacteria-Gemeinschaft in der Urangrube Pöhla, Schlema und Zobes. Die direkte Quantifizierung der planktonischen Mikroorganismen mit klassenspezifischen Sonden bei der CARD-FISH-Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Während Betaproteobacteria gegenüber Epsilonproteobacteria in den planktonischen Gemeinschaften aus Pöhla und Zobes häufiger vorkamen, verhielt es sich für Schlema umgekehrt.

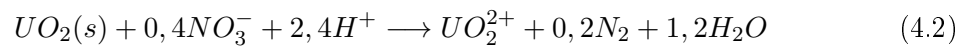
Betaproteobacteria sind hinsichtlich ihrer morphologischen sowie physiologischen Eigenschaften sehr heterogen und kommen oft dominant in Süßwasserseen und -sedimenten vor [277–282]. Im Flutungswasser aus Pöhla und Schlema wurde ein dominanter Vertreter der Gattung *Thiobacillus* innerhalb der Betaproteobacteria identifiziert. Die Gattung enthält derzeit nur noch vier Arten (*T. thioparus*, *T. denitrificans*, *T. aquaesulis*, *T. thiophilus*), die alle den Betaproteobacteria zugeordnet werden, nachdem die meisten ehemaligen Arten dieser Gattung anderen oder neuen Gattungen wie z.B. *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus* oder *Thiomonas* zugewiesen wurden [283]. Thiobazillen verbindet die Eigenschaft, aus der Oxidation einer oder mehrerer reduzierter Schwefelverbindungen einschließlich Sulfide, elementaren Schwefel, Thiosulfat, Polythionat und Thiocyanat Energie zu gewinnen [284–286]. Daher spielen sie eine wichtige Rolle für den biogeochemischen Schwefelkreislauf [287–291]. *Thiobacillus denitrificans* ist das am besten untersuchteste Bacterium unter den obligat chemolithotrophen Schwefeloxidierern und kommt in einer Vielzahl von Habitaten wie Böden, Schlämmen, Salz- und Süßwassersedimenten, häuslichen Abwässern, industriellen Abfallbehandlungsbecken sowie Faultürmen vor [292]. Im Gegensatz zu vielen anderen Schwefeloxidierern, die nur O₂ als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können, kann *T. denitrificans* auch unter anaeroben Bedingungen durch Kopplung der Oxidation von anorganischen Schwefelverbindungen (Thiosulfat, Tetrathionat, Thiocyanat, Sulfid, elementarer Schwefel) mit der Reduktion von Nitrat oder anderen oxidierten Stickstoffverbindungen (Nitrit, Distickstoffmonoxid) wachsen [292]. Für die autotrophe Denitrifikation mit elementarem Schwefel wurde folgende stöchiometrische Gleichung von Batchelor und Lawrence [293] beschrieben:



Darüber hinaus ist *T. denitrificans* in der Lage, gelöstes und mineralisch gebundenes Fe(II)

4 Diskussion

in der Form von FeS_x unter anaeroben Bedingungen zu oxidieren [294, 295]. Die Oxidation von Eisen(II)-sulfiden kann dabei aufgrund der gleichzeitigen Freisetzung möglicher eingeschlossener oder immobilisierter toxischer Verbindungen wie Arsen zu ökologischen Problemen führen [296–298]. Interessanterweise haben Beller *et al.* in Laborversuchen mit Reinkulturen von *T. denitrificans* zudem festgestellt, dass diese Bacteria in Anwesenheit von Nitrat sowohl synthetisches als auch biogenes U(IV)-Oxid unter anoxischen und pH-neutralen Bedingungen oxidieren können. Für die mikrobielle Uranoxidation gekoppelt mit Denitrifikation wurde folgende Gleichung aufgestellt [85]:



Auch wenn die Reaktion als thermodynamisch günstig ($\Delta G^{0'} = -65$ oder -93 kJ/mol für kristallines bzw. nichtkristallines UO_2) gilt [85], wurde bislang nicht nachgewiesen, dass *T. denitrificans* durch Oxidation von Uran genug Energie zum Wachstum gewinnt. Nichtsdestotrotz vermuten einige Autoren, dass die mikrobielle U(IV)-Oxidation möglicherweise auch unter natürlichen Bedingungen eine Rolle spielt und die Sanierung von urankontaminierten Gebieten negativ beeinflussen könnte [85, 299]. Bei einer Analyse urankontaminierter Sedimente aus einer inaktiven Urangrube wurden zudem ca. 24% der untersuchten 16S rDNA-Klone als *T. denitrificans* identifiziert [300]. Die Detektion von *Thiobacillus* sp. im Flutungswasser aus Pöhla und Schlema scheint dennoch kein Hinweis auf eine mikrobiell katalysierte Freisetzung von Uran aus den beiden Gruben zu sein, da sich zum einen die Urankonzentration beider Flutungswässer deutlich voneinander unterscheidet (0,02 mg/l vs. 1,7 mg/l für Pöhla und Schlema) und zum anderen zumindest im Flutungswasser aus Pöhla sogar niedriger ist als mittels geochemischer Modellrechnungen erwartet wurde [5].

Wenngleich eine Klassifizierung der detektierten Mikroorganismen auf Art-Ebene in dieser Arbeit nicht möglich war und nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei der Gruppierung der Sequenzen in OTUs verschiedene Spezies, die untereinander sehr hohe Übereinstimmungen der 16S rRNA-Gensequenz (z.B. 98% für *T. denitrificans* NCIMB 9548T zu *T. thioparus* ATCC 8185T) aufweisen [292], in einem OTU (Sequenzhomologie $\geq 97\%$) erfasst wurden, könnten moderat thermophile und obligat aerobe Vertreter wie *T. aquaesulis* bzw. *T. thioparus* basierend auf ihren Wachstumsansprüchen vermutlich nicht im Flutungswasser der hier untersuchten Urangruben leben. *Thiobacillus thiophilus* hingegen ist wie *T. denitrificans* ein fakultativ anaerobes, mesophiles und neutrophiles Bacterium.

4 Diskussion

Es wurde aus Sedimentproben eines Öl-kontaminierten Grundwassers isoliert und wächst mit Thiosulfat als Elektronendonator und O₂ bzw. Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor [301]. Bislang wurde *Thiobacillus thiophilus* allerdings noch nicht in anderen Habitaten detektiert.

Die meisten der dominanten Betaproteobacteria in den planktonischen Gemeinschaften gehörten zur Familie der Rhodocyclaceae. Diese Familie enthält 18 Gattungen und insgesamt 45 Arten, die allein auf Basis ihrer 16S rRNA Phylogenie klassifiziert wurden [283, 302]. Da die Familie metabolisch diverse Vertreter wie anoxische Photoheterotrophe, Stickstofffixierer oder Methyilotrophe umfasst, kann die Bedeutung der detektierten Rhodocyclaceae ohne eine weitere Klassifizierung für die untersuchten Urangruben schlecht abgeschätzt werden. Ein Vertreter, der vor allem in Pöhla häufig vorkam, wurde der Gattung *Sulfuritalea* zugewiesen. Für die Gattung *Sulfuritalea* wurde bisher erst eine Art beschrieben. *Sulfuritalea hydrogenivorans* Stamm sk43H wurde aus einem stratifizierten Süßwassersee in Japan isoliert [277]. Unter anaeroben Bedingungen wächst das Bakterium autotroph und kann dabei Thiosulfat, elementaren Schwefel als auch H₂ mit Nitrat als Elektronenakzeptor oxidieren. *S. hydrogenivorans* ist ein fakultativ anaerober und chemolithotropher Mikroorganismus, der bei mittleren Temperaturen (Optimum: 25°C) und neutralen pH-Werten (Optimum: 6,7 - 6,9) lebt. *Sulfuritalea*-ähnliche Vertreter dominierten die bakterielle Gemeinschaft in thermischen, sulfidischen Wässern eines porösen Karstaquifers [303] und wurden ebenso in nitrifizierendem-denitrifizierendem Belebtschlamm [304], in mit Abfällen von Steinkohleleer belastetem Grundwasser [305] und Seesedimenten [306] detektiert. Basierend auf 16S rRNA-Genanalysen und Untersuchungen von Markergenen für die Schwefeloxidation vermuteten Kojima *et al.*, dass planktonische Betaproteobacteria insbesondere *S. hydrogenivorans* bei der Schwefeloxidation in stratifizierten Süßwasserökosystemen eine zentrale Rolle spielen [307].

Im Flutungswasser vorkommende, planktonische Epsilonproteobacteria repräsentierten hauptsächlich Mitglieder der Ordnung Campylobacterales in der Familie Helicobacteraceae. Darunter konnten insbesondere Vertreter der Gattung *Sulfuricurvum* und *Sulfurimonas* identifiziert werden. Beide Gattungen wurden von Campbell *et al.* anhand von publizierten 16S rRNA-Gensequenzen zur vorläufigen Klade Thiovolgaceae zugeordnet. Bisher beschriebene Thiovolgaceae leben chemolithoautotroph mit molekularem Wasserstoff und/oder reduzierten Schwefelverbindungen als Elektronendonator und unter mesophilen Bedingungen [308]. Der einzige bisher kultivierte Vertreter der Gattung *Sulfuricurvum*

ist *S. kujiense* Stamm YK-1T, der aus einer unterirdischen Rohölspeicherkammer in Japan isoliert wurde. Als Elektronenakzeptoren kann das Bacterium molekularen Sauerstoff und Nitrat unter mikroaerophilen bzw. anaeroben Bedingungen nutzen. Das optimale Wachstum wurde bei einem pH-Wert von 7,0, 25°C und geringen NaCl-Konzentrationen (< 1%) festgestellt [309]. *Sulfuricurvum*-ähnliche Sequenzen wurden zudem häufig in anoxischen als auch oxischen, meist sulfidreichen Habitaten detektiert [310–316]. Innerhalb der Gattung *Sulfurimonas* wurden als kultivierte Vertreter *S. autotrophica* [317], *S. paralvinellae* [318], *S. gotlandica* [319] und *S. denitrificans* [320] detaillierter beschrieben. Sie stammen aus diversen Habitaten wie marinen Sedimenten [320], hydrothermalen Tiefseespalten [317, 318], pelagischen Sauerstoffgrenzschichten [319] und Ölfeldern [321]. Die kultivierten *Sulfurimonas* sp. benötigen unbedingt erhöhte NaCl-Konzentrationen im Bereich von Gramm pro Liter zum Wachstum. Nur *S. denitrificans* wächst unabhängig von der NaCl-Konzentration und könnte somit auch bei niedrigen Salzgehalten, wie sie im Flutungswasser zu finden waren, leben. Dieses denitrifizierende, chemolithoautotrophe Bacterium nutzt Sulfid, Thiosulfat oder molekularen Wasserstoff als Elektronendonator und reduziert Nitrat oder Nitrit [318, 320, 322].

Basierend auf den Pyrosequenzierungsergebnissen eines 16S rRNA-Genabschnitts aus extrahierter Gesamt-DNA sowie CARD-FISH-Analysen wurde die Dominanz von Beta- und Epsilonproteobacteria in den planktonischen Gemeinschaften festgestellt, deren verwandte Vertreter als chemolithoautotrophe, schwefeloxidierende Bacteria bekannt sind. Daher wird vermutet, dass diese Mikroorganismen eine besondere Rolle für den Schwefelkreislauf in den unterirdischen Flutungswassersystemen der hier untersuchten, stillgelegten Uranminen spielen. Die lithotrophe Schwefeloxidation gilt bisher vor allem in Tiefseegebieten als Hauptprozess zur Gewinnung von Energie für die Bildung organischen Kohlenstoffs [323]. Da bei der Schwefeloxidation neben O₂ häufig auch Nitrat als Elektronenakzeptor genutzt wird, kann durch die mikrobielle Aktivität schwefeloxidierender Mikroorganismen die Verteilung von Stickstoffverbindungen im Ökosystem beeinflusst werden.

Die Koexistenz verschiedener Phylotypen schwefeloxidierender Mikroorganismen in den planktonischen Gemeinschaften der Flutungswässer deutet auf unterschiedliche Nährstoffpräferenzen der Bacteria und verschiedene Nischen hin. Es wird angenommen, dass im Flutungswasser vorkommende Thiobazillen, ähnlich wie *T. denitrificans*, nicht in der Lage wären, molekularen Wasserstoff als alleinigen Elektronendonator unter denitrifizierenden Bedingungen zu nutzen. Im Gegensatz dazu können viele der hier relevanten Epsilonpro-

teobacteria wahrscheinlich durch die Oxidation von H_2 gekoppelt mit Nitrat als Elektronenakzeptor wachsen und auf diese Art ihren Energiebedarf decken. Han *et al.* zeigten in einer Studie zum Wachstumsverhalten von *S. denitrificans*, dass die Oxidation von H_2 im Vergleich zu Thiosulfat unter den getesteten Laborbedingungen effizienter war. Trotz des geringeren Energiegewinns wird die H_2 -Oxidation unter nitratlimitierenden Bedingungen vermutlich bevorzugt und spielt für den Energiestoffwechsel bei *S. denitrificans* und verwandten *Sulfurimonas* sp. in entsprechenden Ökosystemen vermutlich eine große Rolle. *S. denitrificans* wäre basierend auf den genetischen Voraussetzungen sogar in der Lage, Sulfat mit H_2 als Elektronendonator zu reduzieren [324]. Betaproteobakterielle Thiobazillen könnten im Flutungswasser zusätzlich zu anorganischen Schwefelverbindungen Fe(II) in gelöster oder gebundener Form (z.B. FeS) oxidieren. Durch die Sekretion löslicher Redoxmediatoren wie Elektronenshuttles oder Metallchelatoren wäre die mikrobielle Eisenoxidation ohne Anhaftung der Bacteria an die Mineraloberfläche möglich und könnte indirekt zur Oxidation von Pyrit beitragen [325–327]. Andere Studien wiesen jedoch daraufhin, dass der direkte Kontakt zwischen eisenoxidierenden Bacteria und Metallsulfiden für den Transfer der Elektronen nötig ist. Die Bildung von Biofilmen auf der Mineraloberfläche wurde in diesem Zusammenhang beobachtet [328, 329]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beschriebenen Mikroorganismen der planktonischen Gemeinschaft im Flutungswasser auch in biofilmähnlichen Gemeinschaften existierten. Die Flutungswasserproben enthielten möglicherweise abgelöste Mikroorganismen aus Biofilmen, die mit dem strömenden Wasser transportiert worden sind.

Wie anhand der Clusteranalyse deutlich wird, unterschied sich die bakterielle Zusammensetzung in Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Gemeinschaften. Obwohl die biofilm-assoziierten Bacteria aus dem gleichen Habitat wie die planktonischen Bacteria stammten, gab es kaum Übereinstimmungen bei den dominanten Bacteria-OTUs zwischen den beiden Gemeinschaften. Die für Mikroorganismen angebotene, poröse Oberfläche der BACTRAPs führte offensichtlich zur Entstehung eines Mikrohabitats, in dem Bacteria nach ihren physiologischen Eigenschaften selektiert wurden.

Die Ergebnisse der 16S rDNA-basierten Analyse weisen daraufhin, dass Deltaproteobacteria ein wesentlicher, zum Teil dominanter Bestandteil der Biofilmgemeinschaften waren. Die Klasse der Deltaproteobacteria enthält strikt aerobe als auch strikt anaerobe sowie morphologisch diverse Bacteria, die allein basierend auf ihrer 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zugeordnet werden. Sechs der insgesamt acht Ordnungen, darunter auch die in den un-

tersuchten Biofilmgemeinschaften detektierten Desulfuromonadales, Desulfobacterales und Synthrophobacterales, zeichnen sich durch einen anaeroben Lebensstil aus. Die meisten Anaerobier nutzen anorganische Verbindungen wie Sulfat und Fe(III) als Elektronenakzeptoren und haben daher eine große Bedeutung für den globalen Kreislauf der Elemente. Allerdings ist die Reduktion der Elektronenakzeptoren nicht immer mit dem Wachstum der Bacteria assoziiert. Einige Deltaproteobacteria fermentieren unter anaeroben Bedingungen auch organische Substanzen oder wachsen syntroph [283]. Insbesondere in den drei Monate alten Biofilmen aus Zobes wurden Vertreter der Gattung *Geobacter* innerhalb der Ordnung Desulfuromonadales und der Familie Geobacteraceae identifiziert. Die Gattung umfasst derzeit 18 valide Arten, darunter *Geobacter metallireducens* als erst beschriebene Art [330]. Obwohl Mitglieder der Geobacteraceae aus bzw. in einer Vielzahl verschiedenster Habitate isoliert und detektiert wurden [130, 186, 331–339], sind sie vor allem in Süßwassergebieten von Bedeutung. Die Familie der Geobacteraceae enthält die meisten der bislang kultivierten dissimilatorischen Eisen- und Manganreduzierer. Auch wenn viele Geobacteraceae H_2 zur Reduktion von Fe(III) nutzen können, dient in den meisten Sedimenten wahrscheinlich Acetat als primärer Elektronendonator [340]. Neben ihrer offensichtlichen Bedeutung für den biogeochemischen Eisenkreislauf sind sie somit maßgeblich an der vollständigen Oxidation von 10% bis nahezu des gesamten organischen Materials in aquatischen Sedimenten und überschwemmten Böden beteiligt [237, 341–343]. Sie können neben Acetat viele weitere organische Säuren, aber auch teilweise langkettige Fettsäuren sowie aromatische Verbindungen oxidieren als auch diverse Metalle, darunter ebenso radioaktive Elemente wie U(VI) und Tc(VII) reduzieren [187, 344–347].

Angesichts der im Vergleich zu anderen Metallen bzw. Metalloiden höheren Konzentration von Eisen in BACTRAPs wird vermutet, dass die hier identifizierten Deltaproteobacteria in der Biofilmgemeinschaft hauptsächlich Fe(III) reduzierten. Es ist anzunehmen, dass Deltaproteobacteria auch auf natürlichen Oberflächen im Flutungswasser leben und wie bereits für eine Vielzahl anderer Habitate beschrieben, eine wichtige Rolle im Eisenkreislauf spielen. Aufgrund des großen Stoffwechselspektrums von Deltaproteobacteria könnten neben der Eisenreduktion grundsätzlich auch andere Reduktionsprozesse katalysiert werden, die z.B. im Fall von Uran durch Bildung von schwerer löslichen U(IV)-Verbindungen zur Immobilisierung und folglich zur biologischen Sanierung unter geeigneten Bedingungen beitragen könnten.

Die exemplarische Untersuchung von Biofilmen aus Zobes hinsichtlich ihrer bakteriellen

Zusammensetzung nach zwei unterschiedlichen Expositionsszeiten der BACTRAPs im Flutungswasser lieferte Hinweise darauf, dass der physiologische Zustand der Biofilmgemeinschaft einer gewissen Dynamik unterlag. Da in der vorliegenden Arbeit, der Einsatz von BACTRAPs in erster Linie die Gewinnung von ausreichend Biomasse für weiterführende Analysen gewährleisten sollte, wurde dieser Aspekt nicht weiter analysiert. Die Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien der auf Aktivkohlepellets gewachsenen Biofilme würde aber zum besseren Verständnis der dynamischen Gemeinschaftsstrukturen beitragen und möglicherweise die Bedeutung nicht dominanter Mikroorganismengruppen im Biofilm hervorheben. Zum Beispiel wäre denkbar, dass eisen- bzw. schwefeloxidierende Beta- und Epsilonproteobacteria, die nur einen geringen Anteil der drei Monate alten Biofilmgemeinschaften ausmachten, in einem früheren Biofilmstadium häufiger vertreten waren. Interessanterweise wurden nach nur 1-monatiger Exposition verschiedener Mineralträger im neutralen Grundwasser des Newark Beckens (USA) Sequenzen für autotrophe Schwefeloxidierer mit *Thiobacillus* sp. und *Sulfuricurvum kujiense* ähnlichen Vertretern sowie heterotrophe, eisenreduzierende *Geobacter* sp. in Biofilmen auf Pyrit und Arsenopyrit festgestellt [329]. Daher wird vermutet, dass auch die verschiedenen Bacteria-Gruppen in den hier untersuchten Flutungswassersystemen unter bestimmten Umständen zusammen in Biofilmen leben und dabei an einer Vielzahl von Redoxprozessen bezüglich des Schwefel- und Eisenkreislaufs beteiligt sind.

Bei allen Schlussfolgerungen muss berücksichtigt, dass die detektierten Mikroorganismen durchaus physiologische Eigenschaften haben könnten, die sich von ihren kultivierten Verwandten unterscheiden. Außerdem ist das Wissen über einige hier festgestellten taxonomischen Gruppen wie dem Kandidatenphylum WS3 nach wie vor extrem begrenzt. Um letztlich auch noch die Identität und Funktion unklassifizierter Phylotypen aufzuklären, wäre zudem die Isolation und Kultivierung der Mikroorganismen nötig.

4.3.3 Einschätzung der archaeellen Diversität

Mit einer Probentiefe von je über 1000 Sequenzen wurden bei der Pyrosequenzierung laut der berechneten Coverage und Rarefaction-Kurven nahezu alle Archaea in den planktonischen Gemeinschaften als auch in den Biofilmen aus den drei Urangruben erfasst. Obwohl nicht alle analysierten Parameter bzw. Indizes der Alpha-Diversitätscharakteristik zu dem gleichen Ergebnis bezüglich der Reihenfolge der archaeellen Diversität zwischen den Einzelproben führten, wurde zumindest für die Rarefaction-Analyse und den Shannon-Index

in der Regel ein übereinstimmendes Resultat erzielt. Bezüglich der archaeellen Diversität in den Flutungswasserproben wurden Unterschiede zwischen den Standorten festgestellt. Die planktonische Gemeinschaft aus Zobes (Shannon: 2,96 - 3,36) wies insbesondere gegenüber Pöhla (Shannon: 2,76 - 2,87) eine höhere Diversität für Archaea auf. Somit ergab sich die gleiche Reihenfolge für die archaeelle Diversität zwischen den Urangruben wie für Bacteria. Im Vergleich zu den Biofilmen war die archaeelle Diversität in den planktonischen Gemeinschaften tendenziell höher.

4.3.4 Archaeelle Zusammensetzung der Gemeinschaften

Der Vergleich der archaeellen Gemeinschaftsstrukturen mittels Clusteranalyse deutet daraufhin, dass sich die Flutungswasserproben innerhalb eines Standortes ähnlicher waren als zwischen verschiedenen Standorten. Dennoch wurden einige dominante Archaea-OTUs der planktonischen Gemeinschaften in allen drei Urangruben gefunden, was für eine große Ähnlichkeit der Gemeinschaft hinsichtlich der Archaea in den verschiedenen Flutungswässern spricht. Ähnlich wie bei Bacteria dominierten nur wenige Archaea-OTUs die jeweilige planktonische Gemeinschaft.

Bei der taxonomischen Einordnung der Archaea mittels der RDP-Datenbank konnten oft mehr als die Hälfte der archaeellen 16S rDNA-Sequenzen einer Bibliothek keiner Klasse zugeordnet werden. Hohe Anteile für unklassifizierte Archaea mit bis zu 90% der archaeellen 16S rDNA-Sequenzen wurden auch schon in anderen Diversitätsstudien z.B. bei der Untersuchung tiefer Schichten (200 und 1500 m) der Wassersäule im Roten Meer ermittelt [348]. In dieser Arbeit könnte die große Anzahl unklassifizierter Archaea-OTUs auf die im Vergleich zu den Bacteria kürzere Sequenzlänge (289 bp) zusammen mit einer schwachen Repräsentation von archaeellen Referenzsequenzen in der RDP-Datenbank zurückzuführen sein. Möglicherweise reflektiert das Maß nicht zuordenbarer Archaea auch, dass archaeelle Gemeinschaften insbesondere in unterirdischen Habitaten im Vergleich zu Bacteria weniger gut untersucht sind. Die relative Abundanz unklassifizierter Archaea auf Klassenebene war für die planktonischen Gemeinschaften aus Schlema mit über 80% besonders hoch. Die restlichen 16S rDNA-Sequenzen konnten den Eury- bzw. Crenarchaeota zugeordnet werden. Unter den detektierten Crenarchaeota wurden einige Vertreter als Thermoprotei, der derzeit einzigen charakterisierten Klasse der Crenarchaeota, identifiziert. Während die bislang kultivierten Crenarchaeota thermophil oder sogar hyperthermophil sind [349], wurden crenarchaeelle Sequenzen aber auch in Umgebungen mittlerer Temperatur wie z.B. in

Sedimenten, in Wasser aus einer tiefen Goldmine als auch in Wasser- und Biofilmen einer unterirdischen, radioaktiven Thermalquelle detektiert [350–355]. Die vor allem in den planktonischen Gemeinschaften aus Pöhla detektierten Euryarchaeota wurden hauptsächlich Methanomicrobia und Methanobacteria zugeordnet. In der letztgenannten Klasse kamen dominant zwei Vertreter der Gattung *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter* vor. Sie leben strikt anaerob und gehören zur Gruppe der hydrogenotrophen Methanogenen, d.h. sie nutzen CO₂ und H₂ oder Formiat zur Bildung von Methan [356, 357].

Wie anhand der Clusteranalyse deutlich wird, unterschieden sich die archaeellen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer Struktur zwischen der planktonischen Proben und den Biofilmen voneinander. Im Unterschied zu Bacteria hatten beide Gemeinschaftsformen aber auch einige dominante OTUs gemeinsam. Folglich war die relative Ähnlichkeit zwischen beiden Gemeinschaftsformen für Archaea größer als für Bacteria.

In den untersuchten Biofilmen wurden unter den klassifizierten Archaea vorrangig Euryarchaeota detektiert, die den Gattungen *Methanobacterium* oder *Methanobrevibacter* zugewiesen wurden. Die Anwesenheit von methanogenen Mikroorganismen insbesondere in der Urangrube Pöhla würde unter der Voraussetzung ihrer Aktivität die Bildung biogenen Methans erklären, welches mithilfe der Isotopenanalyse (externe Analyse vom UFZ) nachgewiesen wurde. Interessanterweise lieferten die Ergebnisse der Biofilmgemeinschaften insbesondere aus Pöhla und Zobes Hinweise auf die Koexistenz von methanogenen Archaea und Deltaproteobacteria wie *Geobacter* sp. Obwohl die metall- bzw. sulfatreduzierenden Deltaproteobacteria mit Methanogenen unter thermodynamischen Standardbedingungen um gemeinsame Elektronendonoren (z.B. Acetat, H₂) konkurrieren und die Methanogenese dadurch häufig unterdrückt wird [358–360], wurde eine syntrophe Verbindung dieser Mikroorganismen in anoxischen Habitaten wie überschwemmten Reisböden und Abfallanlagen festgestellt [361, 362]. Die Oxidation komplexer organischer Kohlenstoffverbindungen war in solchen Gemeinschaften direkt mit der Methanogenese verbunden [363–365]. Für die hier untersuchten Biofilmgemeinschaften ist jedoch noch offen, wie groß der Anteil der Archaea überhaupt ist und in welcher Beziehung sie zu den Deltaproteobacteria stehen. In den planktonischen Gemeinschaften stellten Archaea jedenfalls einen deutlich geringeren Anteil als Bacteria dar, wie anhand der CARD-FISH-Analyse gezeigt wurde.

4.3.5 Einschätzung zu stoffwechselaktiven Gemeinschaften

Um die metabolisch aktive Fraktion der mikrobiellen Gemeinschaften in den Urangruben besser zu erfassen, wurden die Gemeinschaften einzelner Flutungswasserproben und Biofilme hinsichtlich ihrer mikrobiellen Diversität und Zusammensetzung ausgehend von extrahierter Gesamt-RNA nach Synthese der cDNA und Amplifikation eines 16S rRNA-Genabschnitts (wie bei Verwendung von Gesamt-DNA als Template) analysiert. Die Ergebnisse wurden zwischen der RNA- und DNA-Bibliothek für die jeweils gleiche Einzelprobe miteinander verglichen. Trotz unterschiedlicher Sequenzanzahlen, d.h. Probertiefe, in den verglichenen Bibliotheken einer Probe und voneinander abweichender Indizes wurde auch anhand der RNA-Bibliotheken die größte bakterielle Diversität für die planktonische Gemeinschaft aus Zobes ermittelt, während die Biofilmprobe aus Pöhla am wenigsten divers in Bezug auf Bacteria war. Insgesamt ergab sich auf Grundlage der RNA-Bibliotheken anhand der Shannon-Indizes und Rarefaction-Kurven eine ähnliche Reihenfolge der bakteriellen bzw. archaeellen Diversität für die analysierten Proben untereinander wie bei der Analyse der DNA-Bibliotheken.

Die Clusteranalyse und der Vergleich gemeinsamer OTUs wiesen auf eine gute Übereinstimmung der Gemeinschaftsstrukturen zwischen der entsprechenden DNA- und RNA-Bibliothek einer Probe bezüglich Bacteria und Archaea sowohl für planktonische Gemeinschaften als auch Biofilme hin. Auch wenn die ermittelten relativen Abundanzen bakterieller Klassen zwischen den beiden Bibliotheken für die planktonische Gemeinschaft aus Schlema voneinander abwichen, bestätigten die RNA-basierten Daten doch das häufige Vorkommen von Beta- und Epsilonproteobacteria und deuteten auf die Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen hin. Die ausgehend von RNA ermittelte Dominanz von Deltaproteobacteria unter den klassifizierten Phylotypen in den Biofilmen aus den drei Urangruben stimmte gut mit den DNA-basierten Ergebnissen überein. Die RNA-basierten Ergebnisse bestätigten sowohl für Bacteria als auch für Archaea im Wesentlichen die Annahme, dass die biofilmassoziierten Mikroorganismen auch stoffwechselaktiv waren. In Bezug auf Archaea ergab die Analyse ausgehend von RNA wie bei DNA hohe Abundanzen von Thermoprotei in der planktonischen Gemeinschaft aus Schlema und Zobes sowie die Dominanz von Methanobacteria in drei Monate alten Biofilmen aus Pöhla und Zobes.

Größere Unterschiede zwischen den DNA- und RNA-basierten Ergebnissen wurden vor allem für die planktonische Gemeinschaft aus Zobes hinsichtlich der bakteriellen Zusammensetzung festgestellt. Acidobacteria vor allem die Subgruppe Gp_6 sowie Acetobacteria-

ceae innerhalb der Alphaproteobacteria und Vertreter der Subdivision3 (Verrucomicrobia) repräsentierten einen wesentlich größeren Anteil der Sequenzen in der RNA-Bibliothek im Vergleich zur DNA-Bibliothek. Acidobacteria kommen ubiquitär in sehr unterschiedlichen terrestrischen Gebieten einschließlich urankontaminierten Sedimenten vor. Aufgrund der geringeren Anzahl kultivierter Vertreter ist bislang noch sehr wenig über den Stoffwechsel und die ökologische Bedeutung der heterotrophen Mikroorganismen bekannt. *Geothrix fermentans*, ein strikt anaerober Vertreter der Acidobacteria innerhalb der Familie Holophagae, wurde beispielsweise aus einem metallkontaminierten Grundwasser isoliert und ist in der Lage durch Reduktion von Fe(III) zu wachsen. Ähnlich wie für Acidobacteria gilt für Verrucomicrobia, dass sie weit verbreitet in sedimentären als auch aquatischen Habitaten sind, aber das Wissen über ihre Physiologie sehr limitiert ist [366, 367]. Acetobacteraceae in der Klasse der Alphaproteobacteria sind heterotrophe, aerobe, meist acidophile Mikroorganismen. In der Umwelt vorkommende Vertreter konnten häufig aus sauren, oligotrophen Wässern isoliert werden. Andere Acetobacteraceae wie einige Vertreter der Gattung *Acidiphilium* besitzen aber auch die Fähigkeit, Fe(III) unter anaeroben Bedingungen zu reduzieren [368–370]. Welche Rolle die mittels von 16S rRNA-Analyse bestimmten, dominanten Bacteria in der Urangrube Zobes spielen könnten, bleibt unklar.

Wenngleich die 16S rRNA, die einen strukturellen Bestandteil der Ribosomen darstellt, nur auf die potentielle Translation in den hier detektierten Mikroorganismen hinweist, wird angenommen, dass die hier detektierten Bacteria auch stoffwechselaktiv waren. Fragen bezüglich des Ausmaßes und der Art der mikrobiellen Aktivität bleiben offen. Die Präsenz einiger OTUs in der DNA-Bibliothek, die nicht in der entsprechenden RNA-Bibliothek detektiert wurden, könnte theoretisch auf ruhende Mikroorganismen hinweisen. Die Detektion einiger OTUs in der RNA-Bibliothek, aber nicht in der DNA-Bibliothek, ist hingegen unlogisch, da Zellen unabhängig vom physiologischen Zustand auch das entsprechende 16S rRNA Gen enthalten müssen. Methodisch bedingte Fehler könnten diese Diskrepanz erklären. Zum einen können unterschiedliche Startkonzentrationen des Templates (16S rDNA, 16S rRNA) bei der Amplifikation zur Verzerrung der Anteile der PCR-Amplifikate führen [371]. Zum anderen enthielten die miteinander verglichenen DNA- und RNA-Bibliotheken teilweise unterschiedlich hohe Sequenz- und folglich OTU-Anzahlen. Wenn die Sequenzanzahl sehr niedrig ist, wird nur ein kleiner Teil aller in der Probe enthaltenen Sequenzen einschließlich der zugeordneten OTUs abgebildet. Dies könnte neben methodischen Unterschieden bei der Nukleinsäureextraktion sowie dem zusätzlichen Schritt der reversen

Transkription bei dem RNA-basierten Ansatz auch Unterschiede beim Vergleich der Abundanzen der Phylotypen erklären.

4.4 Einschätzung der Lebendkeimzahlen und des mikrobiellen Stoffwechselfpotentials

Der kultivierungsbasierte Ansatz mittels CFU- und MPN-Technik ermöglichte die Abschätzung der Zellzahl lebensfähiger Mikroorganismen für bestimmte Stoffwechselgruppen in den planktonischen Gemeinschaften der drei Urangruben. Neben aeroben, heterotrophen Mikroorganismen wurden anaerobe Mikroorganismen über ein breites Spektrum möglicher Stoffwechselprozesse hinweg, von der Nitratreduktion bis hin zur Methanogenese, detektiert. Für Flutungswasser aus Pöhla und Zobes wurden am meisten aerobe Mikroorganismen, gefolgt von Mangan- bzw. Eisenreduzierern ermittelt, während für Schlema die höchste Zellzahl für nitratreduzierende Schwefeloxidierer bestimmt wurde. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Pyrosequenzierung und CARD-FISH wurden methanogene Mikroorganismen in der planktonischen Gemeinschaft aus Schlema gar nicht detektiert.

Gemessen an der relativ hohen Gesamtzellzahl von $1,37 \cdot 10^6$ - $1,77 \cdot 10^6$ Zellen/ml in den Flutungswässern, die in etwa den Höchstwerten für Grundwasser entspricht [372–375], war der Anteil der kultivierten Mikroorganismen mit unter 1% sehr gering. In Bezug auf die Gesamtzellzahl ist unklar, ob alle Zellen tatsächlich lebten, da der verwendete DNA-Farbstoff DAPI keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglicht. Der geringe Anteil kultivierter Mikroorganismen ist jedoch nicht ungewöhnlich und wird in der Literatur häufig als “Great Plate Count Anomaly” beschrieben. Demnach sind die meisten Mikroorganismen zwar lebensfähig, bilden aber keine sichtbaren Kolonien auf Agarplatten [376, 377]. Schätzungen zufolge sind mehr als 99% der natürlich vorkommenden Mikroorganismen nicht einfach kultivierbar [378]. Hallbeck und Pedersen konnten mit ähnlichen MPN-Medien wie in dieser Arbeit insgesamt zwischen 0,1 - 6,46% der Mikroorganismen in Minenwasser aus tiefen Schichten kultivieren [379].

Wie viel und welche Mikroorganismen aus einer Probe kultiviert werden, hängt maßgeblich von den gewählten Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, Inkubationszeit etc.) ab. Aufgrund des teilweise sehr langsamen Wachstums einiger anaerober Mikroorganismen könnten die hier gewählten Inkubationszeiten von drei Monaten immer

noch zu kurz und Lebendkeimzahlen möglicherweise unterschätzt worden sein. Bei der Bewertung der Lebendkeimzahlen muss zudem berücksichtigt werden, dass mikrobiell katalysierte Reaktionen nicht zwangsläufig mit dem Wachstum der Mikroorganismen verbunden sein müssen. So kann z.B. Arsenat auch zur Detoxifikation reduziert worden sein [35, 136]. Bei den in dieser Arbeit gewählten Kultivierungsbedingungen konnte außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass acetogene und methanogene Mikroorganismen um das angebotene Substrat konkurrierten und Zellzahlen entsprechend beeinflusst wurden. Zudem könnte von hydrogenotrophen Acetogenen gebildetes Acetat theoretisch von acetoklastischen Methanogenen wieder verbraucht worden sein und die Acetogenese auf diese Weise verborgen haben.

Die kultivierungsabhängigen Ergebnisse lieferten Hinweise darauf, dass indigene, planktonische Mikroorganismen aus den Urangruben ein breites Stoffwechselspektrum abdeckten und somit an vielen auch anaeroben Prozessen beteiligt sein könnten.

4.5 Beurteilung der Proteomanalyse für planktonische Gemeinschaften

Mithilfe der Metaproteomanalyse konnten im Flutungswasser exprimierte Genprodukte indigener Mikroorganismen identifiziert und taxonomisch als auch funktionell beschrieben werden. In erster Linie bestätigten die Metaproteomdaten die Dominanz von Epsilonproteobacteria in der planktonischen Gemeinschaft aus der Urangrube Schlema. Wie anhand der Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung und CARD-FISH erwartet wurde, gehörten zudem viele der identifizierten Proteine in den planktonischen Gemeinschaften aus Schlema und Zobes zu den Betaproteobacteria. Interessanterweise dominierten in der planktonischen Gemeinschaft aus Zobes auf Proteinebene neben Betaproteobacteria auch Gammaproteobacteria.

In guter Übereinstimmung mit den Pyrosequenzierungsdaten wurden basierend auf der taxonomischen Einordnung der identifizierten Proteine Epsilonproteobacteria vor allem durch schwefeloxidierende *Sulfuricurvum* spp. repräsentiert. Betaproteobakterielle Proteine im Zobes- und Schlema-Flutungswasser wurden hauptsächlich den Gattungen *Gallionella* und *Methylothermobacter* bzw. *Sideroxydans* zugeordnet. *Gallionella* und *Sideroxydans* - beide Vertreter der neuen Ordnung Gallionellales - gehören zu den neutrophilen, lithotropen Fe(II)-Oxidierern und können auch unter mikroaerophilen Bedingungen leben [380, 381].

Methylothermobacter ist ein methylothermes Bacterium und als solches in der Lage, Substrate ohne C-C-Bindung wie Methanol unter aeroben Bedingungen zu oxidieren [283, 382]. Gammaproteobacteria der Klasse Methylococcaceae, wie *Methylobacter* spp., zählen zur Gruppe I Methanotrophen und katalysieren die Oxidation von Methan bzw. Methanol unter aeroben Bedingungen [383, 384]. Während die Oxidation von Fe(II) in den Urangruben prinzipiell denkbar scheint, ist die Bedeutung methylothermer bzw. methanotropher Bacteria aufgrund der geringen Sauerstoffkonzentrationen in diesen Ökosystemen unklar. Interessanterweise sind einige *Methylothermobacter* sp. sowie einige methanotrophe Mikroorganismen in der Lage, Methanol bzw. Methan durch Kopplung der Denitrifikation zu oxidieren [385, 386]. Für Methylococcaceae wurde diese Reaktion allerdings bislang nicht festgestellt. Grundsätzlich kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass genügend Sauerstoff über Sickerwasser oder an oberflächennahen Grenzschichten zur Luftatmosphäre in das Flutungswasser eingetragen wird und die entsprechenden Bacteria in diesen Zonen leben können.

Bei den meisten identifizierten Proteinen handelte es sich um ribosomale Proteine, die an der Translation beteiligt sind. Nur ein relativ kleiner Anteil wurde einer metabolischen Funktion, insbesondere dem mikrobiellen Energiestoffwechsel, zugewiesen. Obwohl viele dieser Proteine taxonomisch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, weisen die Ergebnisse auf eine mögliche Bedeutung von Gammaproteobacteria hinsichtlich im Flutungswasser stattfindender Prozesse hin. Vertreter dieser Klasse könnten basierend auf der zugeordneten Funktion ihrer Proteine in den Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf involviert sein.

Wenngleich für die planktonische Gemeinschaft aus Pöhla zu wenig Peptide zur MS-Analyse zur Verfügung standen und die taxonomische als auch funktionelle Zuordnung von Peptiden nicht trivial ist, lieferte die Metaproteomanalyse zusätzliche Hinweise bezüglich möglicher, mikrobieller Prozesse in den Gruben Schlemma und Zöbes und stellte somit eine gute Ergänzung zu den anderen Methoden dar. Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung in den Biofilmgemeinschaften waren bedingt durch Schwierigkeiten bei der Proteinextraktion von Aktivkohle (nach an einem Protokoll von Herbst *et al.*, [387]) nicht möglich. Da Mikroorganismen bevorzugt in Biofilmgemeinschaften organisiert und vermutlich aktiver als in den planktonischen Lebensgemeinschaften sind, ist die Information über deren funktionellen Einheiten nach wie vor von Interesse.

4.6 Einfluss mikrobieller Gemeinschaften auf die Mobilität von Uran und Arsen

Der potentielle Einfluss indigener Mikroorganismen auf die Mobilität von Uran und Arsen wurde mithilfe von Labormikrokosmen unter anaeroben Bedingungen untersucht. Acetat diente als Elektronendonator zur Stimulation des mikrobiellen Wachstums, da es in vielen Sedimenten als zentrales Zwischenprodukt beim Abbau organischen Materials entsteht [237]. Es kann u.a. von Eisen- und Sulfatreduzierern verwertet werden und wurde schon in diversen Feldstudien erfolgreich zur Stimulation der mikrobiellen Uranreduktion eingesetzt [124, 126, 130, 131, 388, 389].

Da die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) in allen Acetat stimulierten, aber auch in unstimulierten Mikrokosmen mit nicht abgetöteten Zellen festgestellt wurde, wird angenommen, dass die mikrobiell katalysierte Eisenreduktion mit der Oxidation eines natürlich im Flutungswasser vorkommenden Elektronendonors gekoppelt wurde. In den stimulierten Biofilmmikrokosmen wurde möglicherweise nach vollständigem Verbrauch des natürlichen Elektronendonors Acetat in nicht detektierbaren Mengen zur Reduktion des noch verbliebenen Anteils von Fe(III) genutzt. Die spätere Abnahme von Fe(II) in allen stimulierten Mikrokosmen war nicht allein auf die Bildung von schwerlöslichem FeS durch die Präzipitation von Fe(II) mit mikrobiell gebildeten Sulfid zurückzuführen, weil die Fe(II)-Abnahme auch in den unstimulierten Mikrokosmen festgestellt wurde, bei denen aufgrund der nicht stattgefundenen Sulfatreduktion kein Sulfid gebildet werden konnte. Die mikrobielle Reduktion von Sulfat wurde nur bei Acetat stimulierten Mikrokosmen (planktonisch und Biofilm) festgestellt. Wenngleich die Abnahmen von Sulfat und Acetat miteinander korrelierten, wiesen die ermittelten Substratabbauraten daraufhin, dass neben Acetat andere, während der Versuche mikrobiell neu gebildete Elektronendonoren zur Sulfatreduktion genutzt wurden; planktonische Mikrokosmen mit Zugabe von U(VI) davon ausgenommen.

Ein deutlicher Anteil des gelösten, natürlichen Urans von maximal $39 \pm 9\%$ konnte durch mikrobielle Prozesse langfristig (98 Tage) im Biofilm immobilisiert werden. Eine Uranimmobilisierung konnte in diesem Ausmaß in der planktonischen Gemeinschaft nicht festgestellt werden. Darüber hinaus wirkte sich die Erhöhung der U(VI)-Konzentration um nur 50 μM bereits negativ auf das Wachstum planktonischer Mikroorganismen aus. Die höhere Schwermetallresistenz biofilmassoziierten Mikroorganismen im Vergleich zu planktonischen Mikroorganismen wurde schon von vielen Autoren beschrieben [390, 391]. Die

4 Diskussion

Substratverläufe bei Mikrokosmen ohne Zugabe von U(VI) zeigten aber auch, dass die Biofilmgemeinschaft in einem günstigeren physiologischen Ausgangszustand war. Zudem muss berücksichtigt werden, dass basierend auf der Menge extrahierter Gesamt-DNA aus den für die Pyrosequenzierung verwendeten Flutungswasser- und Biofilmproben (ungefähr gleich für 1 BACTRAP à 1 g Aktivkohle und 10 l Flutungswasser) die Zellzahl in den Biofilmmikrokosmen zu Versuchsbeginn schätzungsweise um einen Faktor von 50 höher als in den planktonischen Mikrokosmen war. Die ermittelten Substratabbauraten für die Sulfatreduktion wiesen allerdings daraufhin, dass die untersuchten planktonischen und Biofilmgemeinschaften ohne U(VI)-Zugabe unter den Versuchsbedingungen in ihrer Gesamtheit zu einer ähnlichen Stoffwechselleistung während der exponentiellen Wachstumsphase imstande waren. Die Immobilisierung von gelöstem Uran in der stimulierten Biofilmgemeinschaft, aber nicht in Mikrokosmen mit stimulierten, planktonischen Mikroorganismen deutet daraufhin, dass für die Immobilisierung eine strukturelle Komponente und/oder eine bestimmte Aktivität des Biofilms wichtig war. Wie indirekt durch spektroskopische Untersuchungen gezeigt werden konnte, wurde das im Biofilm immobilisierte Uran reduziert. Da *Delta*-proteobacteria, die oft direkt mit der Reduktion von Uran in Zusammenhang gebracht wurden [87, 130, 300, 340, 388], basierend auf den Pyrosequenzierungsdaten häufig in den Biofilmgemeinschaften, aber selten in den planktonischen Gemeinschaften vorkamen, wird vermutet, dass U(VI) in den stimulierten Biofilmmikrokosmen direkt durch mikrobielle Reduktion zu weniger löslichem U(IV) umgewandelt und somit aus der wässrigen Phase entfernt wurde. Auf eine direkte Uranreduktion deutet auch die zeitliche Einordnung der beobachteten Uranimmobilisierung gegenüber den anderen, mikrobiellen Prozessen hin. Die Uranimmobilisierung fand, wie es für die Reduktion von U(VI) anhand der thermodynamischen Prinzipien erwartet wird, in etwa zeitgleich mit der Reduktion von Fe(III) und noch vor der Sulfatreduktion statt. In *in situ* und *ex situ* Mikrokosmenversuchen mit uran-kontaminierten Sedimenten wurde durch die Stimulation mikrobieller Prozesse mit Acetat als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen die gleiche Reihenfolge zur Verwertung terminaler Elektronenakzeptoren wie in den Biofilmmikrokosmen in dieser Arbeit festgestellt [84, 130, 392]. Da die Immobilisierung von Uran in unstimulierten Mikrokosmen trotz Zunahme von Fe(II) nicht stattfand und in stimulierten Biofilmmikrokosmen bereits vor der Sulfatreduktion einsetzte, konnte eine indirekte Reduktion von U(VI) durch mikrobiell gebildetes Fe(II) oder Sulfid [393, 394] bzw. die direkte Reduktion durch sulfatreduzierende Mikroorganismen als Ursache für die Immobilisierung von Uran aus der löslichen Phase

ausgeschlossen werden. Methodisch bedingt kann in dieser Arbeit die Immobilisierung von Uran allerdings nicht einfach mit der Reduktion von U(VI) gleichgesetzt werden. Insofern besteht auch die Möglichkeit, dass Uran in Form von U(VI) zunächst z.B. durch Sorption an funktionelle Gruppen des Biofilms immobilisiert wurde und erst zu einem späteren Zeitpunkt direkt oder indirekt mit Sulfid reduziert wurde. Die Reduktion von immobilisiertem U(VI) zu weniger löslichem U(IV) könnte schließlich zur Stabilisierung des immobilisierten Zustands beigetragen haben. Die unvollständige Immobilisierung des gelösten Urans (natürliches als auch zugefügtes U(VI)) in den stimulierten Biofilmmikrokosmen deutet daraufhin, dass nur ein Teil davon biologisch verfügbar war. Die laut thermodynamischer Modellrechnungen im Flutungswasser der Grube Schlema dominant vorliegende Uranspezies, $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$, gilt als schwächerer Elektronenakzeptor als andere U(VI)-Spezies. In kinetischen Experimenten zur Uranreduktion mit fakultativ und obligat anaeroben Mikroorganismen stellten Brooks *et al.* fest, dass eine Erhöhung der Calciumkonzentration auf 0,45 - 5 mM zu einer deutlichen Erniedrigung der Rate und des Ausmaßes der bakteriellen U(VI)-Reduktion führte [395]. Die Calciumkonzentration war im Flutungswasser von Schlema mit ca. 4,5 mM ähnlich hoch und limitierte vermutlich auch in den stimulierten Biofilmmikrokosmen die Reduktion von U(VI). Unter den gewählten Bedingungen wurde der behördlich festgelegte Behandlungsgrenzwert von 0,5 mg/l Uran für die Reinigung des Flutungswasser aus Schlema im Fall des natürlichen Urans durch die reduktive Immobilisierung in Biofilmmikrokosmen mit Acetat letztlich nicht erreicht. Untersuchungen an Porenwasser eines durch Bergbau geprägten Sumpfgebietes zeigten, dass gelöstes Uran nicht nur in Form von U(VI) sondern auch als kolloidales U(IV) in der Natur vorliegen kann [396]. Diese Fraktion ist folglich nicht mehr reduzierbar, aber mobil. Für das Flutungswasser aus Schlema lagen jedoch keinerlei Hinweise für das Vorkommen kolloidaler U(IV)-Spezies vor. Dagegen spricht auch, dass neben natürlichem Uran auch zusätzliches U(VI) in den stimulierten Biofilmmikrokosmen nicht vollständig immobilisiert wurde. Da die lösliche Phase der Mikrokosmenansätze hinsichtlich des Valenzstatus von Uran nicht analysiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das in Lösung verbliebene Uran (natürlich oder zugegebenes U(VI)) in den stimulierten Mikrokosmen möglicherweise vollständig reduziert wurde, aber mobil blieb. Die biologische Reduktion von Uran kann schließlich verschiedene U(IV)-Spezies mit unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften hervorbringen. Neben dem relativ immobilen UO_2 wurden mobilere Formen wie U(IV)-Nanopartikel in Kulturen von *G. metallireducens* [397] als auch monomere, phosphatassoziierte U(IV)-Spezies in Batch-

und Säulenexperimenten [398–400] detektiert. Barlett *et al.* konnten in Säulenversuchen außerdem zeigen, dass die Art des Elektronendonors einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Immobilisierung von Uran ($20\ \mu\text{M U(VI)}$) aus der wässrigen Phase und die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaftsstrukturen hatte. Komplexere Elektronendonoren wie Pflanzenöl waren hinsichtlich der Uranrückhaltung effektiver als Acetat [401].

Bei Stimulation des mikrobiellen Wachstums mit Acetat als Elektronendonor war sowohl die planktonische als auch die Biofilmgemeinschaft in der Lage, natürlich vorkommendes Arsen aus dem Flutungswasser fast vollständig zu immobilisieren. Unter Berücksichtigung aller Kontrollen war die Immobilisierung von Arsen in den Mikrokosmenversuchen eine Folge aktiver, biologischer Prozesse. Die Ergebnisse zeigten allerdings auch, dass der immobilisierte Zustand von Arsen nicht stabil blieb und ein Teil des Arsens in den stimulierten Mikrokosmen wieder mobil wurde. Bedingt durch die Komplexität der Mikrokosmen und die Vielzahl möglicher Einflussfaktoren auf die Arsenmobilität kann über die Ursachen des Verlaufs der Arsenkonzentration anhand der erhobenen Parameter nur spekuliert werden. Arsen, welches unter natürlichen Bedingungen primär als As(III) im Flutungswasser aus Schlemma vorlag, könnte zunächst mikrobiell zu As(V) oxidiert worden sein. Diese Reaktion kann von chemolithoautotrophen Arsenitoxidierern mit Nitrat als Elektronenakzeptor zur Energiegewinnung oder aber auch von heterotrophen Mikroorganismen zur Detoxifikation von As(III) zu weniger toxischem As(V) an der Zelloberfläche katalysiert werden [138, 147]. Die beobachtete Arsenimmobilisierung könnte entweder durch die Bindung von Arsen an der Zelloberfläche erklärbar sein oder As(V) blieb in Lösung, wurde aktiv in die Zellen transportiert, mithilfe der Arsenatreduktase ArsC im Zytoplasma reduziert und wieder ausgeschleust. Letzteres würde den Anstieg mobilen Arsens erklären. Wenngleich in dieser Arbeit weder die Expression der nötigen Gene noch die Aktivität der entsprechenden Enzyme untersucht wurde, sind insbesondere die Mechanismen zur Detoxifikation unter Mikroorganismen weit verbreitet [35, 136, 139]. Die häufig beschriebene Sorption und Präzipitation von Arsen mit Sulfid [161, 180, 402–404] wird hier als Ursache der Arsenimmobilisierung weitestgehend ausgeschlossen, da die Immobilisierung von Arsen noch vor der Sulfatreduktion stattfand. Zudem würde die Bildung schwerlöslicher Sulfidverbindungen mit Arsen den Anstieg des mobilen Arsens nicht erklären. Während in den hier untersuchten, stimulierten Biofilmmikrokosmen eine Immobilisierung von Arsen zeitgleich zur Reduktion von Fe(III) festgestellt wurde, deuteten die Ergebnisse aus einer Feldstudie

zur biologischen Sanierung urankontaminierter Grundwässer mit Acetat als auch Mikrokosmenversuche mit Sedimentproben arsenkontaminierter Grundwässer aus Asien daraufhin, dass die mikrobielle Reduktion von Fe(III)-Oxiden gleichzeitig mit einer Mobilisierung von Arsen durch die Reduktion von immobilisiertem As(V) zu löslichem As(III) verbunden war [156, 165, 405].

Mithilfe des Aktivkohle-basierten BACTRAP-Systems konnte schließlich eine Biofilmgemeinschaft aus der Urangrube Schlema gewonnen werden, die mit Acetat als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen in der Lage war, gelöstes Uran und Arsen zumindest partiell und in einem bestimmten Zeitfenster zu immobilisieren. Insofern verdeutlichen die Ergebnisse, dass diese Biofilmgemeinschaft einen potentiellen Beitrag zur Rückhaltung und Entfernung von Uran und Arsen in Schlema leisten kann. Weitere Untersuchungen zur besseren Identifikation und Optimierung induzierter Prozesse sowie Stabilität der Immobilisate wären für einen gezielten Einsatz der Biofilme zur biologischen Reinigung des kontaminierten Flutungswasser nötig.

5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals wichtige Informationen zur Diversität, Zusammensetzung und zu potentiellen Stoffwechselfähigkeiten mikrobieller Gemeinschaften im Flutungswasser der drei ehemaligen Uranerzbergwerke Pöhla, Schlema und Zobes in Sachsen. Die gewonnenen Ergebnisse stellen eine gute Voraussetzung für weiterführende Arbeiten dar.

Um die Verbindung von Mikroorganismen und hydrogeochemischen Vorgängen im Untergrund der gefluteten Urangruben in Zukunft noch besser zu verstehen, wird empfohlen geochemische Parameter, vor allem Redoxindikatoren, in Kombination mit der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur auch für unterschiedliche Tiefen und Schächte der Urangruben zu analysieren. Vor allem für die große und hinsichtlich des Flutungsstadiums jüngste Urangrube Schlema könnten dadurch neue Erkenntnisse gewonnen werden, die möglicherweise für die Sanierung vergleichbarer Bergwerke relevant wären.

Da die taxonomische Zuordnung vieler 16S rRNA Gensequenzen nach der Pyrosequenzierung nicht möglich war, liegen zu den entsprechenden Mikroorganismen keine aussagekräftigen Informationen vor. Diese Lücke könnte durch die Charakterisierung von Mikroorganismen nach deren erfolgreichen Anreicherung, Kultivierung und Isolierung geschlossen werden. Als Ausgangsmaterial stehen hierfür die in dieser Arbeit angelegten selektiven Anreicherungen des MPN-Assays zur Verfügung. Die Analyse des full length 16S rRNA Gens kann zudem zu einer genaueren taxonomischen Eingruppierung der Sequenzen beitragen.

Zukünftig könnten außerdem Metagenom- bzw. Metatranskriptomanalysen zu einem besseren Verständnis der Funktion von Mikroorganismen in den unterirdischen Urangruben beitragen. Zudem ließen sich die hier detektierten Peptide aus der Metaproteomanalyse den taxonomischen als auch funktionellen Gruppen wahrscheinlich besser zuordnen. Für die vermutlich aktiveren Mikroorganismen der Biofilmgemeinschaften wäre eine Metaproteomanalyse nach wie vor interessant. Hierzu wäre zunächst die Optimierung der Proteinextraktion notwendig.

5 Ausblick

Mehr Informationen zur mikrobiellen Aktivität könnte die Detektion bzw. Quantifizierung funktioneller Gene für bestimmte katabolische Reaktionen, z.B. *soxB* Gen für Schwefeloxidation, mittels Real-time PCR liefern. Die Rate der mikrobiellen Aktivität könnte zusätzlich über die Verwertung von radioaktiv-markierten Substraten oder die Produktbildung *in situ* oder *ex situ* in Mikrokosmenversuchen ermittelt werden.

Ob die Stimulation von indigenen, biofilmassoziierten Mikroorganismen aus Schlema tatsächlich zur langfristigen Immobilisierung des Urans in der Urangrube und somit zur Sanierung des kontaminierten Flutungswassers beiträgt, müsste letztlich mit Hilfe einer Pilotanlage im Feld untersucht werden. Weitere Untersuchungen mit Labormikrokosmen zur Optimierung der Uranimmobilisierung z.B. durch Variation der Art und Konzentration des Elektronenakzeptors wären denkbar. Nach wie vor ist außerdem unklar, wie sich die mikrobielle Gemeinschaft in Folge der Stimulation verändert. Zudem könnte die Unterscheidung von As(III) und As(V) bei der Analyse des gelösten Arsens vermutlich zu einem besseren Verständnis der ablaufenden Prozesse beitragen.

Literatur

1. Meinrath, G. Aquatic chemistry of uranium. *Geoscience* **1**, 1–101 (1998).
2. Lehmann, B. Uranium ore deposits. *Rev. Econ. Geol. AMS Online* **2008**, 16–26 (2008).
3. OECD-IAEA. Uranium 2014: Resources, Production and Demand, A Joint Report by the OECD Nuclear Energy Agency and the International Atomic Energy Agency, NEA No. 7209 (2014).
4. Wismut. Chronik der WISMUT, Wismut GmbH, Abteilung Öffentlichkeitsarbeit, Chemnitz, Germany (1999).
5. Paul, M., Meyer, J., Jenk, U., Baacke, D., Schramm, A. & Metschies, T. Mine Flooding and Water Management at Underground Uranium Mines two Decades after Decommissioning. *Proc. IMWA Conference (eds Wolkersdorfer, C., Brown, A. and Figueroa, L.)*, Golden, Colorado, USA, 1081–1087 (2013).
6. Kemski, J., Klingel, R. & Siehl, A. Die terrestrische Strahlung durch natürlich radioaktive Elemente in Gesteinen und Böden. *Umweltradioaktivität*, Ernst & Sohn Verlag, Berlin, 69–96 (1996).
7. Merkel, B. & Sperling, B. Hydrogeochemische Stoffsysteme, Teil 2. *Deutscher Verband für Wasserwirtschaft und Kulturbau eV (DVWK)*, Bonn (1998).
8. Rudnick, R. & Gao, S. Composition of the continental crust. *Treatise on geochemistry* **3**, 1–64 (2003).
9. Keith, L., Faroon, O. & Fowler, B. Uranium. *Handbook on the toxicology of metals, 3rd Ed. San Diego: Academic Press*, 881–901 (2007).
10. Rafferty, J. P. Minerals, Britannica Educational Publishing (2011).
11. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for uranium, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA (1999).
12. Mangini, A., Sonntag, C., Bertsch, G. & Müller, E. Evidence for a higher natural uranium content in world rivers. *Nature* **278**, 337–339 (1979).
13. Wismut. Umweltbericht 2008 der Wismut GmbH, Wismut GmbH, Unternehmensleitung, Chemnitz, Germany (2008).
14. Siehl, A. *Umweltradioaktivität*, Ernst W. + Sohn Verlag, Berlin (1996).
15. Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Mäkeläinen, I., Väisänen, S. B., Penttilä, I. M. & Komulainen, H. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* **110**, 337–342 (2002).
16. Kurttio, P., Harmoinen, A., Saha, H., Salonen, L., Karpas, Z., Komulainen, H. & Auvinen, A. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis* **47**, 972–982 (2006).

17. Kurttio, P., Salonen, L., Ilus, T., Pekkanen, J., Pukkala, E. & Auvinen, A. Well water radioactivity and risk of cancers of the urinary organs. *Environ Res* **102**, 333–338 (2006).
18. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, 4th ed. World Health Organization, Geneva (2011).
19. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2011 Teil Nr. 21 ausgegeben zu Bonn am 11. Mai 2011. Erste Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung. Anlage 2 (zu § 6 zu Absatz 2).
20. Seaborg, G. Uranium, In: *The Encyclopedia of the Chemical Elements* (eds Hampel, C. A.), Skokie, Illinois. Reinhold Book Corporation, 773–786 (1968).
21. MacDonald, M. R., Fieser, M. E., Bates, J. E., Ziller, J. W., Furche, F. & Evans, W. J. Identification of the +2 Oxidation State for Uranium in a Crystalline Molecular Complex, $[K(2.2.2\text{-Cryptand})][(C_5H_4SiMe_3)_3U]$. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 13310–13313 (2013).
22. Choppin, G. R. & Stout, B. E. Actinide behavior in natural waters. *Science of the total environment* **83**, 203–216 (1989).
23. Konhauser, K., Mortimer, R., Morris, K. & Dunn, V. The role of microorganisms during sediment diagenesis: implications for radionuclide mobility, In: *Interactions of Microorganisms with Radionuclides* (eds Keith-Roach, M. J. and Livens, F.), **2**, Elsevier, Oxford, UK, 61–100 (2002).
24. Lloyd, J. R. & Renshaw, J. C. Microbial transformations of radionuclides: fundamental mechanisms and biogeochemical implications. *Metal ions in biological systems* **44**, 205 (2005).
25. Grenthe, I., Fuger, J., Lemire, R. J., Muller, A. B., Nguyen-Trung, C. & Wanner, H. Chemical thermodynamics of uranium, 1st ed., Elsevier, Amsterdam (1992).
26. Langmuir, D. Aqueous Environmental Geochemistry. *Prentice Hall* (1997).
27. Brendler, V., Geipel, G., Bernhard, G. & Nitsche, H. Complexation in the System $UO_2^{2+}/PO_4^{3-}/OH^-_{(aq)}$: Potentiometric and Spectroscopic Investigations at very Low Ionic Strengths. *Radiochimica Acta* **74**, 75–80 (1996).
28. Geipel, G., Brachmann, A., Brendler, V., Bernhard, G. & Nitsche, H. Uranium (VI) sulfate complexation studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta* **75**, 199–204 (1996).
29. Karpas, Z. Analytical Chemistry of Uranium: Environmental, Forensic, Nuclear, and Toxicological Applications, Crc Press, Taylor & Francis Group (2014).
30. Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V. & Nitsche, H. Uranium speciation in waters of different uranium mining areas. *Journal of Alloys and Compounds* **271**, 201–205 (1998).
31. Wedepohl, K. H. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 1217–1232 (1995).
32. O'Neill, P. Arsenic, In: *Heavy metals in soils* (eds Alloway, Brian J), Springer, 105–121 (1995).
33. Tamaki, S. & Frankenberger Jr, W. T. Environmental biochemistry of arsenic. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* **124**, 79–110 (1992).

34. Fergusson, J. E. Heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects, Pergamon Press, (1990).
35. Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T. & Silver, S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 311–325 (2002).
36. Rde, T. R. Beiträge zur Geochemie des Arsens, Dissertation, Karlsruher Geochemische Hefte 10 (1996).
37. Bates, M. N., Smith, A. H. & Hopenhayn-Rich, C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* **135**, 462–476 (1992).
38. Pershagen, G. Lung cancer mortality among men living near an arsenic-emitting smelter. *Am J Epidemiol* **122**, 684–694 (1985).
39. Smith, A. H., Lingas, E. O. & Rahman, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull World Health Organ* **78**, 1093–1103 (2000).
40. Nriagu, J. O. Arsenic poisoning through the ages, In: *Environmental Chemistry of Arsenic* (eds Frankenberger Jr., W. T.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1–26 (2002).
41. Le, X. C. Arsenic speciation in the environment and human, In: *Environmental Chemistry of Arsenic* (eds Frankenberger Jr., W. T.), Marcel Dekker, Inc., New York, 95–116 (2002).
42. Henke, K. Introduction, In: *Arsenic: environmental chemistry, health threats and waste treatment*, John Wiley & Sons, 1–8 (2009).
43. Chen, S. L., Dzung, S. R., Yang, M. H., Chiu, K. H., Shieh, G. M. & Wai, C. M. Arsenic species in groundwaters of the blackfoot disease area, taiwan. *Environ Sci Technol* **28**, 877–881 (1994).
44. Chiou, J.-M., Wang, S.-L., Chen, C.-J., Deng, C.-R., Lin, W. & Tai, T.-Y. Arsenic ingestion and increased microvascular disease risk: observations from the southwestern arseniasis-endemic area in Taiwan. *International Journal of Epidemiology* **34**, 936–943 (2005).
45. Chakraborti, D., Sengupta, M. K., Rahman, M. M., Ahamed, S., Chowdhury, U. K., Hossain, M. A., Mukherjee, S. C., Pati, S., Saha, K. C., Dutta, R. N. & Quamruzzaman, Q. Groundwater arsenic contamination and its health effects in the Ganga-Meghna-Brahmaputra plain. *J Environ Monit* **6**, 74N–83N (2004).
46. Chowdhury, A. M. R. Arsenic crisis in Bangladesh. *Sci Am* **291**, 86–91 (2004).
47. World Health Organization. WHO guidelines for drinking-water quality. **2**, 2nd ed. World Health Organization, Geneva (1996).
48. Cullen, W. R. & Reimer, K. J. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* **89**, 713–764 (1989).
49. Merian, E. & Clarkson, T. W. Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance. *VCH Verlagsgesellschaft mbH* (1991).
50. Oremland, R. S. & Stolz, J. F. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* **13**, 45–49 (2005).
51. Foster, A. L. Spectroscopic investigations of arsenic species in solid phases, In: *Arsenic in ground water: geochemistry and occurrence* (eds Welch, A. H. and Stollenwerk, K. G.) Springer Science & Business Media, 27–66 (2002).

52. Morin, G., Juillot, F., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.-C., Elbaz-Poulichet, F., Leblanc, M., Ildefonse, P. & Calas, G. Bacterial formation of tooeleite and mixed arsenic (III) or arsenic (V)-iron (III) gels in the Carnoules acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ Sci Technol* **37**, 1705–1712 (2003).
53. O'Day, P. A., Vlassopoulos, D., Root, R. & Rivera, N. The influence of sulfur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13703–13708 (2004).
54. Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng, K. J. How bacteria stick. *Sci Am* **238**, 86–95 (1978).
55. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187–209 (2002).
56. Marxsen, J. Ein neues Verfahren zur Untersuchung der bakteriellen Besiedlung grundwasserführender sandiger Sedimente. *Archiv für Hydrobiologie* **95**, 221–233 (1982).
57. Griebler, C. & Lueders, T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology* **54**, 649–677 (2009).
58. Harvey, R. W., Smith, R. L. & George, L. Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., aquifer. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1197–1202 (1984).
59. Kölbel-Boelke, J., Anders, E.-M. & Nehrkorn, A. Microbial communities in the saturated groundwater environment II: diversity of bacterial communities in a Pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. *Microb Ecol* **16**, 31–48 (1988).
60. Hazen, T. C., Jiménez, L., López de Victoria, G. & Fliermans, C. B. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb Ecol* **22**, 293–304 (1991).
61. Alfreider, A., Krössbacher, M. & Psenner, R. Groundwater samples do not reflect bacterial densities and activity in subsurface systems. *Water Res* **31**, 832–840 (1997).
62. Lloyd, J. R. & Macaskie, L. E. Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions, In: *Interactions of microorganisms with radionuclides* (eds Keith-Roach, Miranda J and Livens, Francis R), Elsevier, Amsterdam, 313–342 (2002).
63. Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Flemming, C. A. & Bailey, G. W. Bacterial sorption of heavy metals. *Appl Environ Microbiol* **55**, 3143–3149 (1989).
64. Volesky, B. Biosorption of heavy metals. *CRC press* (1990).
65. Markich, S. J. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal* **2**, 707–729 (2002).
66. Merroun, M. L. & Selenska-Pobell, S. Bacterial interactions with uranium: an environmental perspective. *J Contam Hydrol* **102**, 285–295 (2008).
67. Keasling, J. D. & Hupf, G. A. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 743–746 (1996).
68. Macaskie, L. E., Empson, R. M., Cheetham, A. K., Grey, C. P. & Skarnulis, A. J. Uranium bioaccumulation by a *Citrobacter* sp. as a result of enzymically mediated growth of polycrystalline HUO_2PO_4 . *Science* **257**, 782–784 (1992).

69. Merroun, M., Nedelkova, M., Rossberg, A., Hennig, C & Selenska-Pobell, S. Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium. *Radiochimica Acta* **94**, 723–729 (2006).
70. Nedelkova, M., Merroun, M. L., Rossberg, A., Hennig, C. & Selenska-Pobell, S. *Microbacterium* isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 694–705 (2007).
71. Jroundi, F., Merroun, M. L., Arias, J. M., Rossberg, A., Selenska-Pobell, S. & González-Muñoz, M. T. Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiology Journal* **24**, 441–449 (2007).
72. Merroun, M. L., Nedelkova, M., Ojeda, J. J., Reitz, T., Fernández, M. L., Arias, J. M., Romero-González, M. & Selenska-Pobell, S. Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses. *J Hazard Mater* **197**, 1–10 (2011).
73. Renninger, N., Knopp, R., Nitsche, H., Clark, D. S. & Keasling, J. D. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7404–7412 (2004).
74. Beazley, M. J., Martinez, R. J., Sobecky, P. A., Webb, S. M. & Taillefert, M. Uranium biomineralization as a result of bacterial phosphatase activity: insights from bacterial isolates from a contaminated subsurface. *Environ Sci Technol* **41**, 5701–5707 (2007).
75. Macaskie, L. E., Bonthron, K. M., Yong, P. & Goddard, D. T. Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp. : a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology* **146**, 1855–1867 (2000).
76. Jerden, J., Sinha, A. & Zelazny, L. Natural immobilization of uranium by phosphate mineralization in an oxidizing saprolite–soil profile: chemical weathering of the Coles Hill uranium deposit, Virginia. *Chemical Geology* **199**, 129–157 (2003).
77. Geissler, A., Merroun, M., Geipel, G., Reuther, H. & Selenska-Pobell, S. Biogeochemical changes induced in uranium mining waste pile samples by uranyl nitrate treatments under anaerobic conditions. *Geobiology* **7**, 282–294 (2009).
78. Neilands, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**, 26723–26726 (1995).
79. Premuzic, E. T., Francis, A. J., Lin, M. & Schubert, J. Induced formation of chelating agents by *Pseudomonas aeruginosa* grown in presence of thorium and uranium. *Arch Environ Contam Toxicol* **14**, 759–768 (1985).
80. Frazier, S. W., Kretzschmar, R. & Kraemer, S. M. Bacterial siderophores promote dissolution of UO₂ under reducing conditions. *Environ Sci Technol* **39**, 5709–5715 (2005).
81. Kalinowski, B. E., Oskarsson, A., Albinsson, Y., Arlinger, J., Ödegaard-Jensen, A., Andlid, T. & Pedersen, K. Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma* **122**, 177–194 (2004).
82. Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. & Sand, W. Bioleaching review part A. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 239–248 (2003).

83. DiSpirito, A. A. & Tuovinen, O. H. Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol* **133**, 28–32 (1982).
84. Finneran, K. T., Housewright, M. E. & Lovley, D. R. Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Environ Microbiol* **4**, 510–516 (2002).
85. Beller, H. R. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2170–2174 (2005).
86. Weber, K. A., Thrash, J. C., Van Trump, J. I., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. Environmental and taxonomic bacterial diversity of anaerobic uranium(IV) bio-oxidation. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4693–4696 (2011).
87. Lovley, D. R., Phillips, E. J., Gorby, Y. A. & Landa, E. R. Microbial reduction of uranium. *Nature* **350**, 413–416 (1991).
88. Lovley, D. R. & Phillips, E. J. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 850–856 (1992).
89. Suzuki, Y., Kelly, S. D., Kemner, K. M. & Banfield, J. F. Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1790–1797 (2005).
90. Wu, Q., Sanford, R. A. & Löffler, F. E. Uranium(VI) reduction by *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3608–3614 (2006).
91. Francis, A. J., Dodge, C. J., Lu, F., Halada, G. P. & Clayton, C. R. XPS and XANES Studies of Uranium Reduction by *Clostridium* sp. *Environ Sci Technol* **28**, 636–639 (1994).
92. Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2959–2965 (2004).
93. Kieft, T. L., Fredrickson, J. K., Onstott, T. C., Gorby, Y. A., Kostandarithes, H. M., Bailey, T. J., Kennedy, D. W., Li, S. W., Plymale, A. E., Spadoni, C. M. & Gray, M. S. Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1214–1221 (1999).
94. Kashefi, K. & Lovley, D. R. Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100 degrees C by *Pyrobaculum islandicum*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1050–1056 (2000).
95. Renshaw, J. C., Butchins, L. J. C., Livens, F. R., May, I., Charnock, J. M. & Lloyd, J. R. Bioreduction of uranium: environmental implications of a pentavalent intermediate. *Environ Sci Technol* **39**, 5657–5660 (2005).
96. Khijniak, T. V., Slobodkin, A. I., Coker, V., Renshaw, J. C., Livens, F. R., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Birkeland, N.-K., Medvedeva-Lyalikova, N. N. & Lloyd, J. R. Reduction of uranium(VI) phosphate during growth of the thermophilic bacterium *Thermoterrabacterium ferrireducens*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6423–6426 (2005).
97. Marsili, E., Beyenal, H., Palma, L., Merli, C., Dohnalkova, A., Amonette, J. & Lewandowski, Z. Uranium removal by sulfate reducing biofilms in the presence of carbonates. *Water Science & Technology* **52**, 49–55 (2005).

98. Suzuki, Y., Kelly, S. D., Kemner, K. M. & Banfield, J. F. Nanometre-size products of uranium bioreduction. *Nature* **419**, 134 (2002).
99. Suzuki, Y., Kelly, S. D., Kemner, K. M. & Banfield, J. F. Enzymatic U(VI) reduction by *Desulfosporosinus* species. *Radiochimica Acta* **92**, 11–16 (2004).
100. Xu, H., Barton, L. L., Zhang, P. & Wang, Y. TEM investigation of U⁶⁺ and Re⁷⁺ reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*, a sulfate-reducing bacterium. *Sci Basis Nuclear Waste Manage* **23**, 299–304 (1999).
101. Liu, H. & Fang, H. H. P. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol Bioeng* **80**, 806–811 (2002).
102. Wall, J. D. & Krumholz, L. R. Uranium reduction. *Annu Rev Microbiol* **60**, 149–166 (2006).
103. Lovley, D. R., Widman, P. K., Woodward, J. C. & Phillips, E. J. Reduction of uranium by cytochrome c₃ of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3572–3576 (1993).
104. Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L. & Hunnicutt, D. MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular microbiology* **39**, 722–730 (2001).
105. Bencheikh-Latmani, R., Williams, S. M., Haucke, L., Criddle, C. S., Wu, L., Zhou, J. & Tebo, B. M. Global transcriptional profiling of *Shewanella oneidensis* MR-1 during Cr(VI) and U(VI) reduction. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7453–7460 (2005).
106. Payne, R. B., Gentry, D. M., Rapp-Giles, B. J., Casalot, L. & Wall, J. D. Uranium reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 and a cytochrome c₃ mutant. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3129–3132 (2002).
107. Shelobolina, E. S., Coppi, M. V., Korenevsky, A. A., DiDonato, L. N., Sullivan, S. A., Konishi, H., Xu, H., Leang, C., Butler, J. E., Kim, B.-C. *et al.* Importance of c-type cytochromes for U (VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol* **7**, 16 (2007).
108. Wade, R. & DiChristina, T. J. Isolation of U(VI) reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 143–148 (2000).
109. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T. & Lovley, D. R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**, 1098–1101 (2005).
110. Cologgi, D. L., Lampa-Pastirk, S., Speers, A. M., Kelly, S. D. & Reguera, G. Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15248–15252 (2011).
111. Reguera, G. Electron transfer at the cell-uranium interface in *Geobacter* spp. *Biochem Soc Trans* **40**, 1227–1232 (2012).
112. Rawlings, D. E. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**, 65–91 (2002).
113. Tuovinen, O. H. & Kelly, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. *Arch Microbiol* **95**, 153–164 (1974).
114. Brierley, C. L. Bacterial leaching. *CRC Crit Rev Microbiol* **6**, 207–261 (1978).

115. Lundgren, D. G. & Silver, M. Ore leaching by bacteria. *Annu Rev Microbiol* **34**, 263–283 (1980).
116. Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A. & Brierley, C. L. Microorganisms in reclamation of metals. *Annu Rev Microbiol* **40**, 311–336 (1986).
117. Rawlings, D. E. & Silver, S. Mining with microbes. *Nature Biotechnology* **13**, 773–778 (1995).
118. Munoz, J., Gonzalez, F., Blazquez, M. & Ballester, A. A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I: A review of the bacterial leaching in the treatment of uranium ores. *Hydrometallurgy* **38**, 39–57 (1995).
119. Bosecker, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **20**, 591–604 (1997).
120. Gadd, G. M. Microbial interactions with metals/radionuclides: the basis of bioremediation, In: *Interactions of microorganisms with radionuclides* (eds Keith-Roach, Miranda J and Livens, Francis R), Elsevier Ltd, Oxford, UK, 179–203 (2002).
121. Gadd, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* **122**, 109–119 (2004).
122. Lloyd, J. R. & Renshaw, J. C. Bioremediation of radioactive waste: radionuclide-microbe interactions in laboratory and field-scale studies. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 254–260 (2005).
123. Mondani, L., Benzerara, K., Carrière, M., Christen, R., Mamindy-Pajany, Y., Février, L., Marmier, N., Achouak, W., Nardoux, P., Berthomieu, C. & Chapon, V. Influence of uranium on bacterial communities: a comparison of natural uranium-rich soils with controls. *PLoS One* **6** (10), e25771 (2011).
124. Anderson, R. T., Vrionis, H. A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C. T., Long, P. E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D. R., Peacock, A., White, D. C., Lowe, M. & Lovley, D. R. Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5884–5891 (2003).
125. Akob, D. M., Mills, H. J., Gihring, T. M., Kerkhof, L., Stucki, J. W., Anastácio, A. S., Chin, K.-J., Küsel, K., Palumbo, A. V., Watson, D. B. & Kostka, J. E. Functional diversity and electron donor dependence of microbial populations capable of U(VI) reduction in radionuclide-contaminated subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3159–3170 (2008).
126. Vrionis, H. A., Anderson, R. T., Ortiz-Bernad, I., O'Neill, K. R., Resch, C. T., Peacock, A. D., Dayvault, R., White, D. C., Long, P. E. & Lovley, D. R. Microbiological and geochemical heterogeneity in an in situ uranium bioremediation field site. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6308–6318 (2005).
127. Luo, J., Weber, F.-A., Cirpka, O. A., Wu, W.-M., Nyman, J. L., Carley, J., Jardine, P. M., Criddle, C. S. & Kitanidis, P. K. Modeling in-situ uranium(VI) bioreduction by sulfate-reducing bacteria. *J Contam Hydrol* **92**, 129–148 (2007).
128. Chang, Y.-J., Long, P. E., Geyer, R., Peacock, A. D., Resch, C. T., Sublette, K., Pfiffner, S., Smithgall, A., Anderson, R. T., Vrionis, H. A., Stephen, J. R., Dayvault, R., Ortiz-Bernad, I., Lovley, D. R. & White, D. C. Microbial incorporation of ¹³C-labeled acetate at the field scale: detection of microbes responsible for reduction of U(VI). *Environ Sci Technol* **39**, 9039–9048 (2005).

129. Gihring, T. M., Zhang, G., Brandt, C. C., Brooks, S. C., Campbell, J. H., Carroll, S., Criddle, C. S., Green, S. J., Jardine, P., Kostka, J. E., Lowe, K., Mehlhorn, T. L., Overholt, W., Watson, D. B., Yang, Z., Wu, W.-M. & Schadt, C. W. A limited microbial consortium is responsible for extended bioreduction of uranium in a contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5955–5965 (2011).
130. Holmes, D. E., Finneran, K. T., O'Neil, R. A. & Lovley, D. R. Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2300–2306 (2002).
131. Williams, K. H., Long, P. E., Davis, J. A., Wilkins, M. J., N'Guessan, A. L., Steefel, C. I., Yang, L., Newcomer, D., Spane, F. A., Kerkhof, L. J., McGuinness, L., Dayvault, R. & Lovley, D. R. Acetate availability and its influence on sustainable bioremediation of uranium-contaminated groundwater. *Geomicrobiology Journal* **28**, 519–539 (2011).
132. Madden, A. S., Palumbo, A. V., Ravel, B., Vishnivetskaya, T. A., Phelps, T. J., Schadt, C. W. & Brandt, C. C. Donor-dependent extent of uranium reduction for bioremediation of contaminated sediment microcosms. *J Environ Qual* **38**, 53–60 (2009).
133. Abdelouas, A., Lu, Y., Lutze, W. & Nuttall, H. E. Reduction of U(VI) to U(IV) by indigenous bacteria in contaminated ground water. *Journal of Contaminant Hydrology* **35**, 217–233 (1998).
134. Silver, S., Budd, K., Leahy, K. M., Shaw, W. V., Hammond, D., Novick, R. P., Willsky, G. R., Malamy, M. H. & Rosenberg, H. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **146**, 983–996 (1981).
135. Jackson, C. R., Jackson, E. F., Dugas, S. L., Gamble, K. & Williams, S. Microbial transformations of arsenite and arsenate in natural environments. *Recent Research Developments in Microbiology* **7**, 103–118 (2003).
136. Rosen, B. P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 689–693 (2002).
137. Meng, Y.-L., Liu, Z. & Rosen, B. P. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 18334–18341 (2004).
138. Oremland, R. S. & Stolz, J. F. The ecology of arsenic. *Science* **300**, 939–944 (2003).
139. Frankenberger Jr, W. T. Environmental chemistry of arsenic, CRC Press, (2001).
140. Bentley, R. & Chasteen, T. G. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 250–271 (2002).
141. McBride, B. C. & Wolfe, R. S. Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry* **10**, 4312–4317 (1971).
142. Honschopp, S., Brunken, N., Nehrhorn, A. & Breunig, H. J. Isolation and characterization of a new arsenic methylating bacterium from soil. *Microbiol Res* **151**, 37–41 (1996).
143. Styblo, M., Del Razo, L. M., Vega, L., Germolec, D. R., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W. R. & Thomas, D. J. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* **74**, 289–299 (2000).

144. Qin, J., Rosen, B. P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S. & Rensing, C. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2075–2080 (2006).
145. Smedley, P. & Kinniburgh, D. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* **17**, 517–568 (2002).
146. Héry, M., Gault, A. G., Rowland, H. A., Lear, G., Polya, D. A. & Lloyd, J. R. Molecular and cultivation-dependent analysis of metal-reducing bacteria implicated in arsenic mobilisation in south-east asian aquifers. *Applied Geochemistry* **23**, 3215–3223 (2008).
147. Anderson, G., Williams, J. & Hille, R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 23674–23682 (1992).
148. Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V., O'Neill, A. H. & Sly, L. I. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiol* **173**, 49–57 (2000).
149. Jones, C., Langner, H., Anderson, K., McDermott, T. & Inskeep, W. Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization. *Soil Science Society of America Journal* **64**, 600–608 (2000).
150. Macur, R. E., Wheeler, J. T., McDermott, T. R. & Inskeep, W. P. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ Sci Technol* **35**, 3676–3682 (2001).
151. Rosen, B. P. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* **7**, 207–212 (1999).
152. Shi, J., Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Holmgren, A. & Rosen, B. P. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J Biol Chem* **274**, 36039–36042 (1999).
153. Ji, G. & Silver, S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9474–9478 (1992).
154. Silver, S., Ji, G., Bröer, S., Dey, S., Dou, D. & Rosen, B. P. Orphan enzyme or patriarch of a new tribe: the arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. *Mol Microbiol* **8**, 637–642 (1993).
155. Niggemyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E. & Rosenzweig, R. F. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5568–5580 (2001).
156. Rowland, H., Pederick, R., Polya, D., Pancost, R., Van Dongen, B., Gault, A., Vaughan, D., Bryant, C., Anderson, B. & Lloyd, J. The control of organic matter on microbially mediated iron reduction and arsenic release in shallow alluvial aquifers, Cambodia. *Geobiology* **5**, 281–292 (2007).
157. Krafft, T. & Macy, J. M. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur J Biochem* **255**, 647–653 (1998).
158. Afkar, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R. S. & Stolz, J. F. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 107–112 (2003).

159. Saltikov, C. W. & Newman, D. K. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10983–10988 (2003).
160. Saltikov, C. W., Wildman, R. A. Jr & Newman, D. K. Expression dynamics of arsenic respiration and detoxification in *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J Bacteriol* **187**, 7390–7396 (2005).
161. Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R. & Morel, F. M. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch Microbiol* **168**, 380–388 (1997).
162. Laverman, A. M., Blum, J. S., Schaefer, J. K., Phillips, E., Lovley, D. R. & Oremland, R. S. Growth of Strain SES-3 with Arsenate and Other Diverse Electron Acceptors. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3556–3561 (1995).
163. Oremland, R. S., Dowdle, P. R., Hoeft, S., Sharp, J. O., Schaefer, J. K., Miller, L. G., Blum, J. S., Smith, R. L., Bloom, N. S. & Wallschlaeger, D. Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3073–3084 (2000).
164. Cummings, D. E., Caccavo, F., Fendorf, S. & Rosenzweig, R. F. Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Environ Sci Technol* **33**, 723–729 (1999).
165. Islam, F. S., Gault, A. G., Boothman, C., Polya, D. A., Charnock, J. M., Chatterjee, D. & Lloyd, J. R. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature* **430**, 68–71 (2004).
166. Ohtsuka, T., Yamaguchi, N., Makino, T., Sakurai, K., Kimura, K., Kudo, K., Homma, E., Dong, D. T. & Amachi, S. Arsenic dissolution from Japanese paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *Geobacter* sp. OR-1. *Environ Sci Technol* **47**, 6263–6271 (2013).
167. Fortin, D. & Beveridge, T. J. Microbial sulfate reduction within sulfidic mine tailings: formation of diagenetic Fe sulfides. *Geomicrobiology Journal* **14**, 1–21 (1997).
168. Rittle, K. A., Drever, J. I. & Colberg, P. J. Precipitation of arsenic during bacterial sulfate reduction. *Geomicrobiology Journal* **13**, 1–11 (1995).
169. Saunders, J. A., Pritchett, M. A. & Cook, R. B. Geochemistry of biogenic pyrite and ferromanganese coatings from a small watershed: a bacterial connection? *Geomicrobiology Journal* **14**, 203–217 (1997).
170. Kim, M.-J., Nriagu, J. & Haack, S. Arsenic species and chemistry in groundwater of southeast Michigan. *Environ Pollut* **120**, 379–390 (2002).
171. Saunders, J., Lee, M.-K., Shamsudduha, M., Dhakal, P., Uddin, A., Chowdury, M. & Ahmed, K. Geochemistry and mineralogy of arsenic in (natural) anaerobic groundwaters. *Applied Geochemistry* **23**, 3205–3214 (2008).
172. Suess, E., Scheinost, A. C., Bostick, B. C., Merkel, B. J., Wallschlaeger, D. & Planer-Friedrich, B. Discrimination of thioarsenites and thioarsenates by X-ray absorption spectroscopy. *Anal Chem* **81**, 8318–8326 (2009).
173. Moore, J. N., Ficklin, W. H. & Johns, C. Partitioning of arsenic and metals in reducing sulfidic sediments. *Environ Sci Technol* **22**, 432–437 (1988).
174. Aggett, J. & O'Brien, G. A. Detailed model for the mobility of arsenic in lacustrine sediments based on measurements in Lake Ohakuri. *Environ Sci Technol* **19**, 231–238 (1985).

175. Wilkin, R. T. & Ford, R. G. Use of hydrochloric acid for determining solid-phase arsenic partitioning in sulfidic sediments. *Environ Sci Technol* **36**, 4921–4927 (2002).
176. Keimowitz, A. R., Mailloux, B. J., Cole, P., Stute, M., Simpson, H. J. & Chillrud, S. N. Laboratory investigations of enhanced sulfate reduction as a groundwater arsenic remediation strategy. *Environ Sci Technol* **41**, 6718–6724 (2007).
177. Couture, R.-M., Wallschläger, D., Rose, J. & Van Cappellen, P. Arsenic binding to organic and inorganic sulfur species during microbial sulfate reduction: a sediment flow-through reactor experiment. *Environmental Chemistry* **10**, 285–294 (2013).
178. Omoregie, E. O., Couture, R.-M., Van Cappellen, P., Corkhill, C. L., Charnock, J. M., Polya, D. A., Vaughan, D., Vanbroekhoven, K. & Lloyd, J. R. Arsenic bioremediation by biogenic iron oxides and sulfides. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4325–4335 (2013).
179. Luo, Q., Tsukamoto, T., Zamzow, K. & Miller, G. Arsenic, selenium, and sulfate removal using an ethanol-enhanced sulfate-reducing bioreactor. *Mine Water and the Environment* **27**, 100–108 (2008).
180. Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M. & Wallis, M. Bioremoval of arsenic species from contaminated waters by sulphate-reducing bacteria. *Water Res* **42**, 4885–4893 (2008).
181. Kalin, M., Wheeler, W. N. & Meinrath, G. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *J Environ Radioact* **78**, 151–177 (2005).
182. Wismut. Umweltbericht der Wismut GmbH 2013, Wismut GmbH, Unternehmensleitung, Chemnitz, Germany (2013).
183. Jenk, U., Meyer, J. & Paul, M. Flooding of WISMUT’s uranium mines after closure—key findings and unexpected effects. *Securing the future and 8th ICARD, Skelleftea, Schweden* (2009).
184. Peacock, A. D., Chang, Y. J., Istok, J. D., Krumholz, L., Geyer, R., Kinsall, B., Watson, D., Sublette, K. L. & White, D. C. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microb Ecol* **47**, 284–292 (2004).
185. Geyer, R., Peacock, A. D., Miltner, A., Richnow, H.-H., White, D. C., Sublette, K. L. & Kästner, M. In situ assessment of biodegradation potential using biotrap amended with ¹³C-labeled benzene or toluene. *Environ Sci Technol* **39**, 4983–4989 (2005).
186. Lovley, D. R. & Phillips, E. J. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol* **51**, 683–689 (1986).
187. Lovley, D. R. & Phillips, E. J. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1472–1480 (1988).
188. Driehaus, W. & Jekel, M. Determination of As (III) and total inorganic arsenic by on-line pretreatment in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry* **343**, 352–356 (1992).
189. Viollier, E., Inglett, P. W., Hunter, K., Roychoudhury, A. N. & Van Cappellen, P. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry* **15**, 785–790 (2000).

190. Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R. U. & Lueders, T. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Appl Environ Microbiol* **74**, 792–801 (2008).
191. Bombach, P., Chatzinotas, A., Neu, T. R., Kästner, M., Lueders, T. & Vogt, C. Enrichment and characterization of a sulfate-reducing toluene-degrading microbial consortium by combining in situ microcosms and stable isotope probing techniques. *FEMS Microbiol Ecol* **71**, 237–246 (2010).
192. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory Manual. **3**, Cold spring harbor laboratory press, New York (1989).
193. Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. & Molin, S. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol* **26**, 141–149 (1998).
194. Zhang, T., Shao, M.-F. & Ye, L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J* **6**, 1137–1147 (2012).
195. Porat, I., Vishnivetskaya, T. A., Mosher, J. J., Brandt, C. C., Yang, Z. K., Brooks, S. C., Liang, L., Drake, M. M., Podar, M., Brown, S. D. & Palumbo, A. V. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microb Ecol* **60**, 784–795 (2010).
196. La Duc, M. T., Vaishampayan, P., Nilsson, H. R., Torok, T. & Venkateswaran, K. Pyrosequencing-derived bacterial, archaeal, and fungal diversity of spacecraft hardware destined for Mars. *Appl Environ Microbiol*, AEM-01435 (2012).
197. Hyman, E. D. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* **174**, 423–436 (1988).
198. Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T. & Eshleman, J. R. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* **137**, 1296–1303 (2013).
199. Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537–7541 (2009).
200. Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research* **37**, D141–D145 (2009).
201. Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R. & Tiedje, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, gkt1244 (2013).
202. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5261–5267 (2007).
203. Chao, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265–270 (1984).

204. Colwell, R. K. & Coddington, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**, 101–118 (1994).
205. Chao, A. & Lee, S.-M. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* **87**, 210–217 (1992).
206. Chao, A. & Shen, T.-J. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and ecological statistics* **10**, 429–443 (2003).
207. Simpson, E. H. Measurement of diversity. *Nature* (1949).
208. Oksanen, J. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial, University of Oulu (2010).
209. Bray, J. R. & Curtis, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs* **27**, 325–349 (1957).
210. Cox, T. & Cox, M. Multidimensional Scaling. *Chapman & Hall, London, UK* (1994).
211. Kruskal, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* **29**, 1–27 (1964).
212. Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3094–3101 (2002).
213. Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919–1925 (1990).
214. Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**, 434–444 (1999).
215. Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**, 136–143 (1993).
216. Neef, A. Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen, Dissertation, Technische Universität München (1997).
217. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**, 593–600 (1992).
218. Lin, X., Wakeham, S. G., Putnam, I. F., Astor, Y. M., Scranton, M. I., Chistoserdov, A. Y. & Taylor, G. T. Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2679–2690 (2006).
219. Stahl, D. & Amann, R. Development and application of nucleic acid probes, In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.), John Wiley and Sons, New York, 205–247 (1991).
220. Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1–7 (1985).

221. Klee, A. J. A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits. *Journal of Microbiological Methods* **18**, 91–98 (1993).
222. Jain, D. K. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **22**, 27–38 (1995).
223. Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J. V., Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G. & Riedel, K. Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. *Proteomics* **11**, 2752–2756 (2011).
224. Koskinen, V. R., Emery, P. A., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Hierarchical clustering of shotgun proteomics data. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**, M110–003822 (2011).
225. Muyzer, G. & Stams, A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 441–454 (2008).
226. Bernhard, G., Geipel, G., Brendler, V. & Nitsche, H. Speciation of uranium in seepage waters of a mine tailing pile studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Radiochimica Acta* **74**, 87–92 (1996).
227. Vetešník, A., Semelová, M., Štamberg, K. & Vopálka, D. Uranium (VI) sulfate complexation as a function of temperature and ionic strength studied by TRLFS, In: *Uranium, Mining and Hydrogeology* (eds. Merkel, B. J. and Hasche-Berger, A.), Technische Universität Bergakademie Freiberg: Freiberg, Germany, Springer Berlin Heidelberg, 623–630 (2008).
228. Arnold, T., Baumann, N., Krawczyk-Bärsch, E., Brockmann, S., Zimmermann, U., Jenk, U. & Weiß, S. Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **75**, 2200–2212 (2011).
229. Jenk, U., Nindel, K. & Zimmermann, U. Underground in-situ mine water treatment in a flooded uranium mine at the WISMUT Königstein site-motivation, activities and outlook, In: *Uranium, Mining and Hydrogeology*, Springer, 431–436 (2008).
230. Groudev, S., Georgiev, P., Spasova, I. & Nicolova, M. Bioremediation of acid mine drainage in a uranium deposit. *Hydrometallurgy* **94**, 93–99 (2008).
231. McMahon, P., Chapelle, F. & Bradley, P. Evolution of redox processes in groundwater, In: *Aquatic Redox Processes* (eds PG Tratnyek, TJ Grundl, and SB Haderlein), **1071**, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 581–597 (2011).
232. Thurman, E. M. Organic Carbon in Natural Water: Amount, Origin and Classification. *Organic geochemistry of natural waters*, **2**, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 5–112 (1985).
233. Chapelle, F. H., Bradley, P. M., Goode, D. J., Tiedeman, C., Lacombe, P. J., Kaiser, K. & Benner, R. Biochemical indicators for the bioavailability of organic carbon in ground water. *Groundwater* **47**, 108–121 (2009).
234. Birdwell, J. E. & Engel, A. S. Variability in terrestrial and microbial contributions to dissolved organic matter fluorescence in the Edwards Aquifer, Central Texas. *Journal of Cave and Karst Studies* **71**, 144–156 (2009).
235. Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K. & Benner, R. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science* **292**, 917–920 (2001).

236. Kaiser, K. & Benner, R. Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnology and Oceanography* **53**, 99–112 (2008).
237. Lovley, D. R. & Chapelle, F. H. Deep subsurface microbial processes. *Reviews of Geophysics* **33**, 365–381 (1995).
238. Peterson, M. & Carpenter, R. Biogeochemical processes affecting total arsenic and arsenic species distributions in an intermittently anoxic fjord. *Marine Chemistry* **12**, 295–321 (1983).
239. Seyler, P. & Martin, J. M. Biogeochemical processes affecting arsenic species distribution in a permanently stratified lake. *Environ Sci Technol* **23**, 1258–1263 (1989).
240. Drever, J. I. Heavy metals and metalloids, In: *The geochemistry of natural waters: surface and groundwater environments*, Prentice Hall, New Jersey, 175–196 (1997).
241. Ulrich, K.-U., Ilton, E. S., Veeramani, H., Sharp, J. O., Bernier-Latmani, R., Schofield, E. J., Bargar, J. R. & Giammar, D. E. Comparative dissolution kinetics of biogenic and chemogenic uraninite under oxidizing conditions in the presence of carbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **73**, 6065–6083 (2009).
242. Dong, W. & Brooks, S. C. Determination of the formation constants of ternary complexes of uranyl and carbonate with alkaline earth metals (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , and Ba^{2+}) using anion exchange method. *Environ Sci Technol* **40**, 4689–4695 (2006).
243. Anderson, R. T. & Lovley, D. R. Microbial redox interactions with uranium: an environmental perspective, In: *Interactions of microorganisms with radionuclides (eds Keith-Roach, Miranda J and Livens, Francis R)*, Elsevier Science Limited, Amsterdam, The Netherlands, 205–223 (2002).
244. Höll, K. & Grohmann, A. Wasser: Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung, Walter de Gruyter, (2002).
245. Lovley, D. R., Chapelle, F. H. & Woodward, J. C. Use of dissolved H_2 concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environ Sci Technol* **28**, 1205–1210 (1994).
246. Chapelle, F. H. & McMahon, P. B. Geochemistry of dissolved inorganic carbon in a Coastal Plain aquifer. 1. Sulfate from confining beds as an oxidant in microbial CO_2 production. *Journal of Hydrology* **127**, 85–108 (1991).
247. McMahon, P. B. & Chapelle, F. H. Geochemistry of dissolved inorganic carbon in a Coastal Plain aquifer. 2. Modeling carbon sources, sinks, and $\delta^{13}\text{C}$ evolution. *Journal of Hydrology* **127**, 109–135 (1991).
248. McMahon, P. & Chapelle, F. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Groundwater* **46**, 259–271 (2008).
249. Balkwill, D. L. & Ghiorse, W. C. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl Environ Microbiol* **50**, 580–588 (1985).
250. Claret, C. A method based on artificial substrates to monitor hyporheic biofilm development. *International Review of Hydrobiology* **83**, 135–143 (1998).
251. Bott, T. L. & Brock, T. D. Growth and metabolism of periphytic bacteria: methodology. *Limnology and Oceanography* **15**, 333–342 (1970).
252. McMahon, R. F., Hunter, R. D. & Russell-Hunter, W. Variation in Aufwuchs at six freshwater habitats in terms of carbon biomass and of carbon: nitrogen ratio. *Hydrobiologia* **45**, 391–404 (1974).

253. Lowe, R. L. & Gale, W. F. Monitoring river periphyton with artificial benthic substrates. *Hydrobiologia* **69**, 235–244 (1980).
254. Biggs, B. J. The use of periphyton in the monitoring of water quality, In: *Biological monitoring in freshwaters: proceeding of a seminar (eds Pridmore, R. D. and Cooper, A. B.)*, **82**, Hamilton, Water and Soil Miscellaneous Publication, 117–142 (1985).
255. Kevern, N. R., Wilhm, J. L. & Van Dyne, G. M. Use of artificial substrata to estimate the productivity of periphyton. *Limnology and Oceanography* **11**, 499–502 (1966).
256. Morikawa, K. Differences in plating efficiency of bacteria from river epilithon sampled from upper and lower surfaces of artificial substrata. *Microb Ecol* **15**, 217–228 (1988).
257. Lear, G., Dong, Y. & Lewis, G. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**, 567–571 (2010).
258. Reardon, C. L., Cummings, D. E., Petzke, L. M., Kinsall, B. L., Watson, D. B., Peyton, B. M. & Geesey, G. G. Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6037–6046 (2004).
259. Barlocher, F. & Murdoch, J. H. Hyporheic biofilms — a potential food source for interstitial animals. *Hydrobiologia* **184**, 61–67 (1989).
260. Jones, S. E. & Lock, M. A. Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting streams. *Freshwater Biology* **22**, 289–296 (1989).
261. Mandelbaum, R. T., Shati, M. R. & Ronen, D. In situ microcosms in aquifer bioremediation studies. *FEMS Microbiol Rev* **20**, 489–502 (1997).
262. Hirsch, P. & Rades-Rohkohl, E. Microbial colonization of aquifer sediment exposed in a groundwater well in northern Germany. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2963–2966 (1990).
263. Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D. & Geiger-Kaiser, M. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology* **28**, 117–129 (2002).
264. Hendrickx, B., Dejonghe, W., Boënné, W., Brennerova, M., Cernik, M., Lederer, T., Bucheli-Witschel, M., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., Diels, L. & Springael, D. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3815–3825 (2005).
265. Edberg, F., Andersson, A. F. & Holmström, S. J. Bacterial community composition in the water column of a lake formed by a former uranium open pit mine. *Microb Ecol* **64**, 870–880 (2012).
266. Thornley, M. J. Radiation resistance among bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **26**, 334–345 (1963).
267. Niedrée, B., Vereecken, H. & Burauel, P. Effects of low-level radioactive soil contamination and sterilization on the degradation of radiolabeled wheat straw. *Journal of Environmental Radioactivity* **109**, 29–35 (2012).
268. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. & Trüper, H. G. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 321–325 (1988).

269. Stackebrandt, E. Unifying phylogeny and phenotypic diversity, In: *The Prokaryotes* (eds Balows, A. and Trüper, H. G. and Dworkin, M. and Harder, W. and Schleifer, K.-H.), 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 19–47 (1992).
270. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221 (1987).
271. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T. & Williams, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1994).
272. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. H. The Prokaryotes, Vol. I, Springer-Verlag New York (1992).
273. Holdeman, L., Kelley, R., Moore, W., Krieg, N. & Holt, J. Bergey's manual of systematic bacteriology (1984).
274. Balows, A. & Duerden, B. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections, vol. 2. *Systematic bacteriology*. Arnold, London, United Kingdom (1998).
275. Zinder, S. Bacterial diversity, In: *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (eds Balows, A. and Duerden, B. I.), **2**, London: Arnold, 125–147 (1998).
276. Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D. & Bertilsson, S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**, 14–49 (2011).
277. Kojima, H. & Fukui, M. *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1651–1655 (2011).
278. Buck, U., Grossart, H.-P., Amann, R. & Pernthaler, J. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environ Microbiol* **11**, 1854–1865 (2009).
279. Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A. & Amann, R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5053–5065 (2000).
280. Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. & Zehr, J. P. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2957–2960 (1997).
281. Zwisler, W., Selje, N. & Simon, M. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* **31**, 211–225 (2003).
282. Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N. F.-Y. & Zhou, H.-W. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8264–8271 (2012).
283. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. The Proteobacteria Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2005).
284. Kelly, D. P. Physiology and biochemistry of unicellularsulfur bacteria, In: *Biology of autotrophic bacteria* (eds Schlegel, H. G. and Bowien, B.), Science Tech Publishers, Madison, 193–217 (1989).

285. Kelly, D. P. & Harrison, A. P. Genus *Thiobacillus* Beijerinck, In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (eds Staley, J. T.) **3**, Williams & Wilkins, Baltimore, 1842–1858 (1989).
286. Kuenen, J. G., Robertson, L. A. & Tuovinen, O. H. The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*, In: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* (eds Balows, A. and Trueper, H. G. and Dworkin, M. and Harder, W. and Schleifer, K.-H.), 2nd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2638–2657 (1992).
287. Woese, C., Weisburg, W., Paster, B., Hahn, C., Tanner, R., Krieg, N., Koops, H.-P., Harms, H & Stackebrandt, E. The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, 327–336 (1984).
288. Lane, D. J., Stahl, D. A., Olsen, G. J., Heller, D. J. & Pace, N. R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J Bacteriol* **163**, 75–81 (1985).
289. Lane, D., Harrison, A., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S., Olsen, G. & Pace, N. Evolutionary relationships among sulfur-and iron-oxidizing eubacteria. *Journal of Bacteriology* **174**, 269–278 (1992).
290. McDonald, I. R., Kelly, D. P., Murrell, J. C. & Wood, A. P. Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. *Arch Microbiol* **166**, 394–398 (1996).
291. Goebel, B. M., Norris, P. R. & Burton, N. P. Acidophiles in biomining, In: *Applied Microbial Systematics* (eds Priest, F. G. and Goodfellow, M.), Springer Netherlands, 293–314 (2000).
292. Kelly, D. P. & Wood, A. P. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 547–550 (2000).
293. Batchelor, B. & Lawrence, A. W. Stoichiometry of autotrophic denitrification using elemental sulfur, In: *Chemistry of Wastewater Technology* (eds Rubin, A. J.), Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan, 421–440 (1978).
294. Buchholz-Cleven, B. E., Rattunde, B. & Straub, K. L. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Syst Appl Microbiol* **20**, 301–309 (1997).
295. Straub, K. L., Benz, M., Schink, B. & Widdel, F. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1458–1460 (1996).
296. Kelly, W. R., Holm, T. R., Wilson, S. D. & Roadcap, G. S. Arsenic in glacial aquifers: sources and geochemical controls. *Ground Water* **43**, 500–510 (2005).
297. Rhine, E. D., Onesios, K. M., Serfes, M. E., Reinfelder, J. R. & Young, L. Y. Arsenic transformation and mobilization from minerals by the arsenite oxidizing strain WAO. *Environ Sci Technol* **42**, 1423–1429 (2008).
298. Zhu, W., Young, L. Y., Yee, N., Serfes, M., Rhine, E. D. & Reinfelder, J. R. Sulfide-driven arsenic mobilization from arsenopyrite and black shale pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 5243–5250 (2008).
299. Senko, J. M., Istok, J. D., Suffita, J. M. & Krumholz, L. R. In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization. *Environ Sci Technol* **36**, 1491–1496 (2002).

300. Suzuki, Y., Kelly, S. D., Kemner, K. M. & Banfield, J. F. Microbial populations stimulated for hexavalent uranium reduction in uranium mine sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1337–1346 (2003).
301. Kellermann, C. & Griebler, C. *Thiobacillus thiophilus* sp. nov., a chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from contaminated aquifer sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 583–588 (2009).
302. Aharon, O. The Family Rhodocyclaceae, In: *The Prokaryotes* (eds Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F.) Springer, Berlin, Heidelberg, 975–998 (2014).
303. Miseta, R., Palatinszky, M., Makk, J., Márialigeti, K. & Borsodi, A. K. Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with sulfurous karstic well waters of a hungarian spa. *Geomicrobiology Journal* **29**, 101–113 (2012).
304. Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. & Wagner, M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol* **25**, 84–99 (2002).
305. Yagi, J. M., Neuhauser, E. F., Ripp, J. A., Mauro, D. M. & Madsen, E. L. Subsurface ecosystem resilience: long-term attenuation of subsurface contaminants supports a dynamic microbial community. *ISME J* **4**, 131–143 (2010).
306. Kojima, H., Tsutsumi, M., Ishikawa, K., Iwata, T., Mußmann, M. & Fukui, M. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Syst Appl Microbiol* **35**, 233–238 (2012).
307. Kojima, H., Watanabe, T., Iwata, T. & Fukui, M. Identification of major planktonic sulfur oxidizers in stratified freshwater lake. *PLoS One* **9**, e93877 (2014).
308. Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L. & Takai, K. The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* **4**, 458–468 (2006).
309. Kodama, Y. & Watanabe, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2297–2300 (2004).
310. Watanabe, K., Watanabe, K., Kodama, Y., Syutsubo, K. & Harayama, S. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4803–4809 (2000).
311. Kodama, Y. & Watanabe, K. Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **69**, 107–112 (2003).
312. Wagner, C., Mau, M., Schlömann, M., Heinicke, J. & Koch, U. Characterization of the bacterial flora in mineral waters in upstreaming fluids of deep igneous rock aquifers. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012) **112** (2007).
313. Haaijer, S. C., Harhangi, H. R., Meijerink, B. B., Strous, M., Pol, A., Smolders, A. J., Verwegen, K., Jetten, M. S. & Op den Camp, H. J. Bacteria associated with iron seeps in a sulfur-rich, neutral pH, freshwater ecosystem. *ISME J* **2**, 1231–1242 (2008).

314. Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciú, M., Lu, Y. & Colin Murrell, J. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J* **3**, 1093–1104 (2009).
315. Gaidos, E., Marteinson, V., Thorsteinsson, T., Jóhannesson, T., Rúnarsson, A. R., Stefansson, A., Glazer, B., Lanoil, B., Skidmore, M., Han, S., Miller, M., Rusch, A. & Foo, W. An oligarchic microbial assemblage in the anoxic bottom waters of a volcanic subglacial lake. *ISME J* **3**, 486–497 (2009).
316. Wright, K. E., Williamson, C., Grasby, S. E., Spear, J. R. & Templeton, A. S. Metagenomic evidence for sulfur lithotrophy by Epsilonproteobacteria as the major energy source for primary productivity in a sub-aerial arctic glacial deposit, Borup Fiord Pass. *Frontiers in microbiology* **4** (2013).
317. Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1801–1805 (2003).
318. Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F. & Horikoshi, K. *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1725–1733 (2006).
319. Labrenz, M., Grote, J., Mammitzsch, K., Boschker, H. T., Laue, M., Jost, G., Glau-bitz, S. & Jürgens, K. *Sulfurimonas gotlandica* sp. nov., a chemoautotrophic and psychrotolerant epsilonproteobacterium isolated from a pelagic redoxcline, and an emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 4141–4148 (2013).
320. Timmer-Ten Hoor, A. A new type of thiosulphate oxidizing, nitrate reducing micro-organism: *Thiomicrospira denitrificans* sp. nov. *Netherlands Journal of Sea Research* **9**, 344–350 (1975).
321. Gevertz, D., Telang, A. J., Voordouw, G. & Jenneman, G. E. Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2491–2501 (2000).
322. Sievert, S. M., Scott, K. M., Klotz, M. G., Chain, P. S., Hauser, L. J., Hemp, J., Hügler, M., Land, M., Lapidus, A., Larimer, F. W., S., L., Malfatti, S. A., F., M., Paulsen, I. T., Ren, Q., Simon, J. & Class, U. G. Genome of the epsilonproteobac-terial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1145–1156 (2008).
323. Grote, J., Jost, G., Labrenz, M., Herndl, G. J. & Jürgens, K. Epsilonproteobacteria represent the major portion of chemoautotrophic bacteria in sulfidic waters of pelagic redoxclines of the Baltic and Black Seas. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7546–7551 (2008).
324. Han, Y. & Perner, M. The role of hydrogen for *Sulfurimonas denitrificans*’ metabo-lism. *PLoS One* **9**, e106218 (2014).

325. Rodriguez, Y., Ballester, A., Blazquez, M. L., González, F. & Munoz, J. A. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* **71**, 37–46 (2003).
326. Schippers, A. & Sand, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol* **65**, 319–321 (1999).
327. Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* **4**, 752–764 (2006).
328. Edwards, K. J., Rogers, D. R., Wirsén, C. O. & McCollom, T. M. Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic alpha- and gamma-proteobacteria from the deep sea. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2906–2913 (2003).
329. Zhu, W. & Reinfelder, J. R. The Microbial Community of a Black Shale Pyrite Biofilm and its Implications for Pyrite Weathering. *Geomicrobiology Journal* **29**, 186–193 (2012).
330. Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J., Gorby, Y. A. & Goodwin, S. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol* **159**, 336–344 (1993).
331. Gibbs-Eggar, Z., Jude, B., Dominik, J., Loizeau, J.-L. & Oldfield, F. Possible evidence for dissimilatory bacterial magnetite dominating the magnetic properties of recent lake sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **168**, 1–6 (1999).
332. Taillefert, M., Bono, A. B. & Luther, G. W. Reactivity of freshly formed Fe(III) in synthetic solutions and (pore) waters: voltammetric evidence of an aging process. *Environ Sci Technol* **34**, 2169–2177 (2000).
333. Caccavo, F., Blakemore, R. P. & Lovley, D. R. A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3211–3216 (1992).
334. Coates, J., Lonergan, D. & Lovley, D. *Desulfuromonas palmitatis* sp. nov., a long-chain fatty acid oxidizing Fe(III) reducer from marine sediments. *Arch Microbiol* **164**, 406–413 (1995).
335. Lowe, K. L., Dichristina, T. J., Roychoudhury, A. N. & Van Cappellen, P. Microbiological and geochemical characterization of microbial Fe(III) reduction in salt marsh sediments. *Geomicrobiology Journal* **17**, 163–178 (2000).
336. Boone, D. R., Liu, Y., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O. & Aldrich, H. C. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 441–448 (1995).
337. Chapelle, F. H. & Lovley, D. R. Competitive exclusion of sulfate reduction by Fe(III)-reducing bacteria: a mechanism for producing discrete zones of high-iron ground water. *Groundwater* **30**, 29–36 (1992).
338. Snoeyenbos-West, O. L., Nevin, K. P., Anderson, R. T. & Lovley, D. R. Enrichment of *Geobacter* Species in Response to Stimulation of Fe(III) Reduction in Sandy Aquifer Sediments. *Microb Ecol* **39**, 153–167 (2000).

339. Zhou, J., Liu, S., Xia, B., Zhang, C., Palumbo, A. V. & Phelps, T. J. Molecular characterization and diversity of thermophilic iron-reducing enrichment cultures from deep subsurface environments. *J Appl Microbiol* **90**, 96–105 (2001).
340. Lovley, D. R. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes, In: *The Prokaryotes* (eds Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F.), Springer Berlin Heidelberg, 287–308 (2013).
341. Lovley, D. R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev* **55**, 259–287 (1991).
342. Canfield, D. E., Jorgensen, B. B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N. B., Thamdrup, B., Hansen, J. W., Nielsen, L. P. & Hall, P. O. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar Geol* **113**, 27–40 (1993).
343. Lovley, D. R., Coates, S. D. A. John D & Lonergan, D. J. 6. Dissimilatory iron reduction. *Transition metals in microbial metabolism*, 187 (1997).
344. Lovley, D. R., Roden, E. E., Phillips, E. & Woodward, J. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Mar Geol* **113**, 41–53 (1993).
345. Caccavo, F. Jr, Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F. & McInerney, M. J. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3752–3759 (1994).
346. Coates, J. D., Phillips, E., Lonergan, D. J., Jenter, H. & Lovley, D. R. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1531–1536 (1996).
347. Coates, J. D., Ellis, D. J., Blunt-Harris, E. L., Gaw, C. V., Roden, E. E. & Lovley, D. R. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1504–1509 (1998).
348. Qian, P.-Y., Wang, Y., Lee, O. O., Lau, S. C., Yang, J., Lafi, F. F., Al-Suwailem, A. & Wong, T. Y. Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. *ISME J* **5**, 507–518 (2011).
349. Itoh, T. & Iino, T. Phylogeny and Biological Features of Thermophiles, In: *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: Biotechnology of thermophiles* (eds Satyanarayana, T. and Littlechild, J. and Kawarabayasi, Y.), Springer Netherlands, 249–270 (2013).
350. Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P. & Goodman, R. M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 277–282 (1997).
351. DeLong, E. F. Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 649–654 (1998).
352. Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L. & Schleper, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol* **5**, 787–797 (2003).
353. Schleper, C., Jurgens, G. & Jonscheit, M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* **3**, 479–488 (2005).
354. Takai, K., Moser, D. P., DeFlaun, M., Onstott, T. C. & Fredrickson, J. K. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5750–5760 (2001).

355. Weidler, G. W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F. W., Heinen, W. & Stan-Lotter, H. Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol* **73**, 259–270 (2007).
356. Deppenmeier, U. & Müller, V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy, In: *Bioenergetics*, Springer, 123–152 (2008).
357. Deppenmeier, U. Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**, 1513–1533 (2002).
358. Achtnich, C., Bak, F. & Conrad, R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils* **19**, 65–72 (1995).
359. Chidthaisong, A. & Conrad, R. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* **31**, 73–86 (2000).
360. Teh, Y. A., Dubinsky, E. A., Silver, W. L. & Carlson, C. M. Suppression of methanogenesis by dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria in tropical rain forest soils: Implications for ecosystem methane flux. *Global Change Biology* **14**, 413–422 (2008).
361. Lueders, T., Pommerenke, B. & Friedrich, M. W. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5778–5786 (2004).
362. Morita, M., Malvankar, N. S., Franks, A. E., Summers, Z. M., Giloteaux, L., Rotaru, A. E., Rotaru, C. & Lovley, D. R. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. *MBio* **2**, e00159–e00111 (2011).
363. Schink, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 262–280 (1997).
364. Stams, A. J. & Plugge, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 568–577 (2009).
365. Yao, H. & Conrad, R. Thermodynamics of propionate degradation in anoxic paddy soil from different rice-growing regions. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 359–364 (2001).
366. Hedlund, B. P., Gosink, J. J. & Staley, J. T. Verrucomicrobia div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of *Prostheobacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**, 29–38 (1997).
367. Janssen, P. H., Schuhmann, A., Mörschel, E. & Rainey, F. A. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1382–1388 (1997).
368. Johnson, D. B. & McGinness, S. Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **57**, 207–211 (1991).
369. Johnson, D. B., Ghauri, M. & McGinness, S. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiol Rev* **11**, 63–70 (1993).
370. Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G. & Stackebrandt, E. Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3633–3640 (1999).

371. Suzuki, M. T. & Giovannoni, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**, 625–630 (1996).
372. Ghiorse, W. C. & Wilson, J. T. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Adv Appl Microbiol* **33**, 107–172 (1988).
373. Madsen, E. & Ghiorse, W. Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes. *Aquatic Microbiology: An Ecological Approach*. Blackwell, Cambridge, MA, 167–213 (1993).
374. Pedersen, K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol Lett* **185**, 9–16 (2000).
375. Griebler, C., Danielopol, D. L., Gibert, J., Nachtnebel, H. P. & Notenboom, J. Groundwater ecology: a tool for management of water resources (2001).
376. Roszak, D. B. & Colwell, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* **51**, 365–379 (1987).
377. Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321–346 (1985).
378. Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143–169 (1995).
379. Hallbeck, L. & Pedersen, K. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Applied Geochemistry* **23**, 1796–1819 (2008).
380. Weiss, J. V., Rentz, J. A., Plaia, T., Neubauer, S. C., Merrill-Floyd, M., Lilburn, T., Bradburne, C., Magonigal, J. P. & Emerson, D. Characterization of Neutrophilic Fe(II)-Oxidizing Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Wetland Plants and Description of *Ferritrophicum radicola* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiology Journal* **24**, 559–570 (2007).
381. Emerson, D., Field, E. K., Chertkov, O., Davenport, K. W., Goodwin, L., Munk, C., Nolan, M. & Woyke, T. Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics. *Frontiers in microbiology* **4**, 254 (2013).
382. Kalyuzhnaya, M. G., Bowerman, S., Lara, J. C., Lidstrom, M. E. & Chistoserdova, L. *Methylothermobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2819–2823 (2006).
383. Whittenbury, R. & Krieg, N. R. Family IV. Methylococcaceae fam. nov, In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (eds Krieg, N. R. and Holt, J. G.), **1**, Williams & Wilkins, Baltimore, 256–261 (1984).
384. Hanson, R. S. & Hanson, T. E. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* **60**, 439–471 (1996).
385. Kalyuzhnaya, M. G., Martens-Habben, W., Wang, T., Hackett, M., Stolyar, S. M., Stahl, D. A., Lidstrom, M. E. & Chistoserdova, L. Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. *Environ Microbiol Rep* **1**, 385–392 (2009).

386. Wu, M. L., Ettwig, K. F., Jetten, M. S. M., Strous, M., Keltjens, J. T. & van Niftrik, L. A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus '*Methyloirabilis oxyfera*'. *Biochem Soc Trans* **39**, 243–248 (2011).
387. Herbst, F.-A., Bahr, A., Duarte, M., Pieper, D. H., Richnow, H.-H., Bergen, M., Seifert, J. & Bombach, P. Elucidation of in situ polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by functional metaproteomics (protein-SIP). *Proteomics* **13**, 2910–2920 (2013).
388. Istok, J., Senko, J., Krumholz, L. R., Watson, D., Bogle, M. A., Peacock, A., Chang, Y.-J. & White, D. C. In situ bioreduction of technetium and uranium in a nitrate-contaminated aquifer. *Environ Sci Technol* **38**, 468–475 (2004).
389. Nevin, K. P., Finneran, K. T. & Lovley, D. R. Microorganisms associated with uranium bioremediation in a high-salinity subsurface sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3672–3675 (2003).
390. Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2313–2320 (2003).
391. Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**, 928–938 (2007).
392. Finneran, K. T., Anderson, R. T., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. Potential for bioremediation of uranium-contaminated aquifers with microbial U(VI) reduction. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* **11**, 339–357 (2002).
393. Liger, E., Charlet, L. & Van Cappellen, P. Surface catalysis of uranium(VI) reduction by iron(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 2939–2955 (1999).
394. Kauffman, J. W., Laughlin, W. C. & Baldwin, R. A. Microbiological treatment of uranium mine waters. *Environ Sci Technol* **20**, 243–248 (1986).
395. Brooks, S. C., Fredrickson, J. K., Carroll, S. L., Kennedy, D. W., Zachara, J. M., Plymale, A. E., Kelly, S. D., Kemner, K. M. & Fendorf, S. Inhibition of bacterial U(VI) reduction by calcium. *Environ Sci Technol* **37**, 1850–1858 (2003).
396. Wang, Y., Frutschi, M., Suvorova, E., Phommavanh, V., Descostes, M., Osman, A. A., Geipel, G. & Bernier-Latmani, R. Mobile uranium(IV)-bearing colloids in a mining-impacted wetland. *Nature communications* **4**, 2942 (2013).
397. Gorby, Y. A. & Lovley, D. R. Enzymatic uranium precipitation. *Environ Sci Technol* **26**, 205–207 (1992).
398. Bernier-Latmani, R., Veeramani, H., Vecchia, E. D., Junier, P., Lezama-Pacheco, J. S., Suvorova, E. I., Sharp, J. O., Wigginton, N. S. & Bargar, J. R. Non-uraninite products of microbial U(VI) reduction. *Environ Sci Technol* **44**, 9456–9462 (2010).
399. Fletcher, K. E., Boyanov, M. I., Thomas, S. H., Wu, Q., Kemner, K. M. & Löffler, F. E. U(VI) reduction to mononuclear U(IV) by *Desulfitobacterium* species. *Environ Sci Technol* **44**, 4705–4709 (2010).
400. Sharp, J. O., Lezama-Pacheco, J. S., Schofield, E. J., Junier, P., Ulrich, K.-U., Chinni, S., Veeramani, H., Margot-Roquier, C., Webb, S. M., Tebo, B. M., Giammar, D. E., Bargar, J. R. & Bernier-Latmani, R. Uranium speciation and stability after reductive immobilization in aquifer sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **75**, 6497–6510 (2011).

Literatur

- 401. Barlett, M., Zhuang, K., Mahadevan, R. & Lovley, D. Integrative analysis of *Geobacter* spp. and sulfate-reducing bacteria during uranium bioremediation. *Biogeosciences* **9**, 1033–1040 (2012).
- 402. Lizama, A. K., Fletcher, T. D. & Sun, G. Removal processes for arsenic in constructed wetlands. *Chemosphere* **84**, 1032–1043 (2011).
- 403. Wolthers, M., Charlet, L., van Der Weijden, C. H., Van der Linde, P. R. & Rickard, D. Arsenic mobility in the ambient sulfidic environment: Sorption of arsenic(V) and arsenic(III) onto disordered mackinawite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**, 3483–3492 (2005).
- 404. Bostick, B. C. & Fendorf, S. Arsenite sorption on troilite (FeS) and pyrite (FeS₂). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 909–921 (2003).
- 405. Giloteaux, L., Holmes, D. E., Williams, K. H., Wrighton, K. C., Wilkins, M. J., Montgomery, A. P., Smith, J. A., Orellana, R., Thompson, C. A., Roper, T. J., Long, P. E. & Lovley, D. R. Characterization and transcription of arsenic respiration and resistance genes during in situ uranium bioremediation. *ISME J* **7**, 370–383 (2013).

Anhang

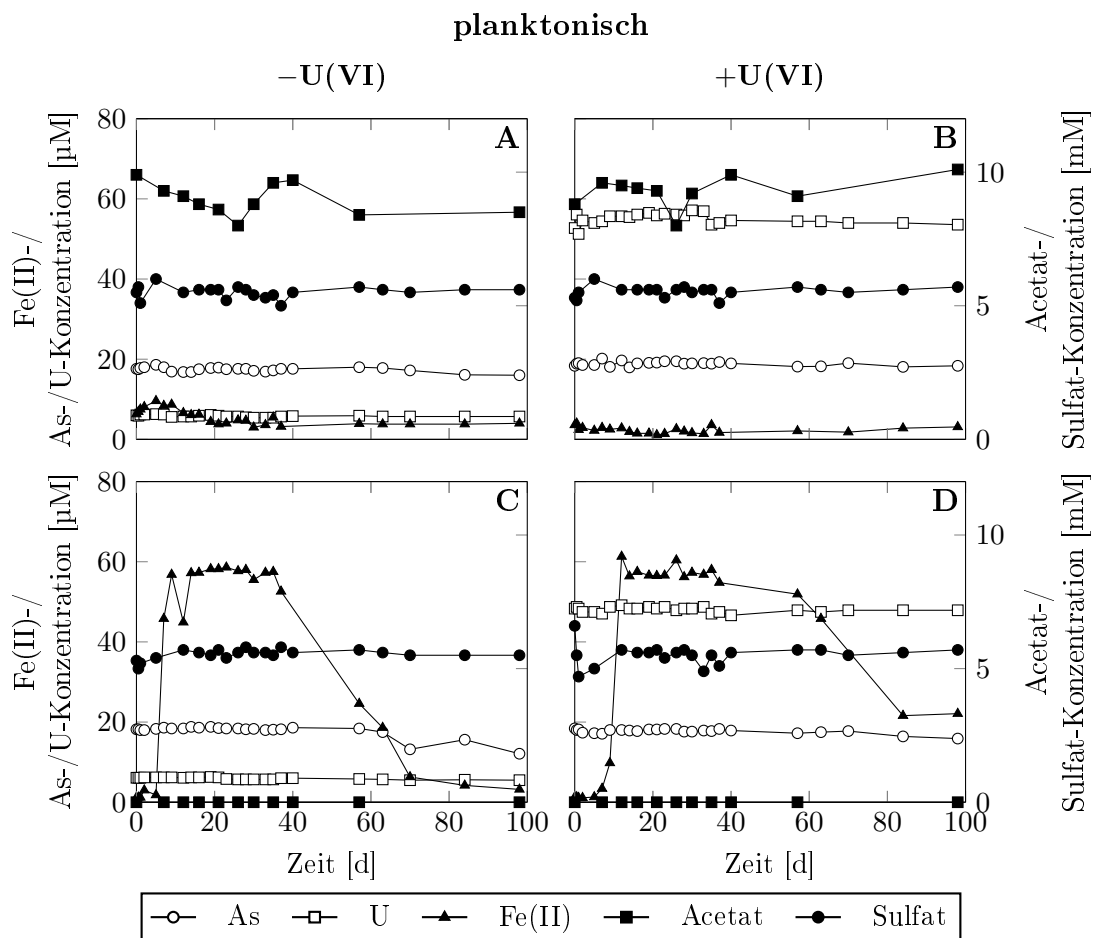


Abbildung A.1: Zeitlicher Verlauf von Arsen, Uran, Fe(II), Sulfat und Acetat in Labor-mikrokosmen für planktonische Gemeinschaften aus Schleima der (A, B) Totkontrollen und (C, D) Substratkontrollen
(B, D) enthielten zusätzlich 50 µM U(VI)

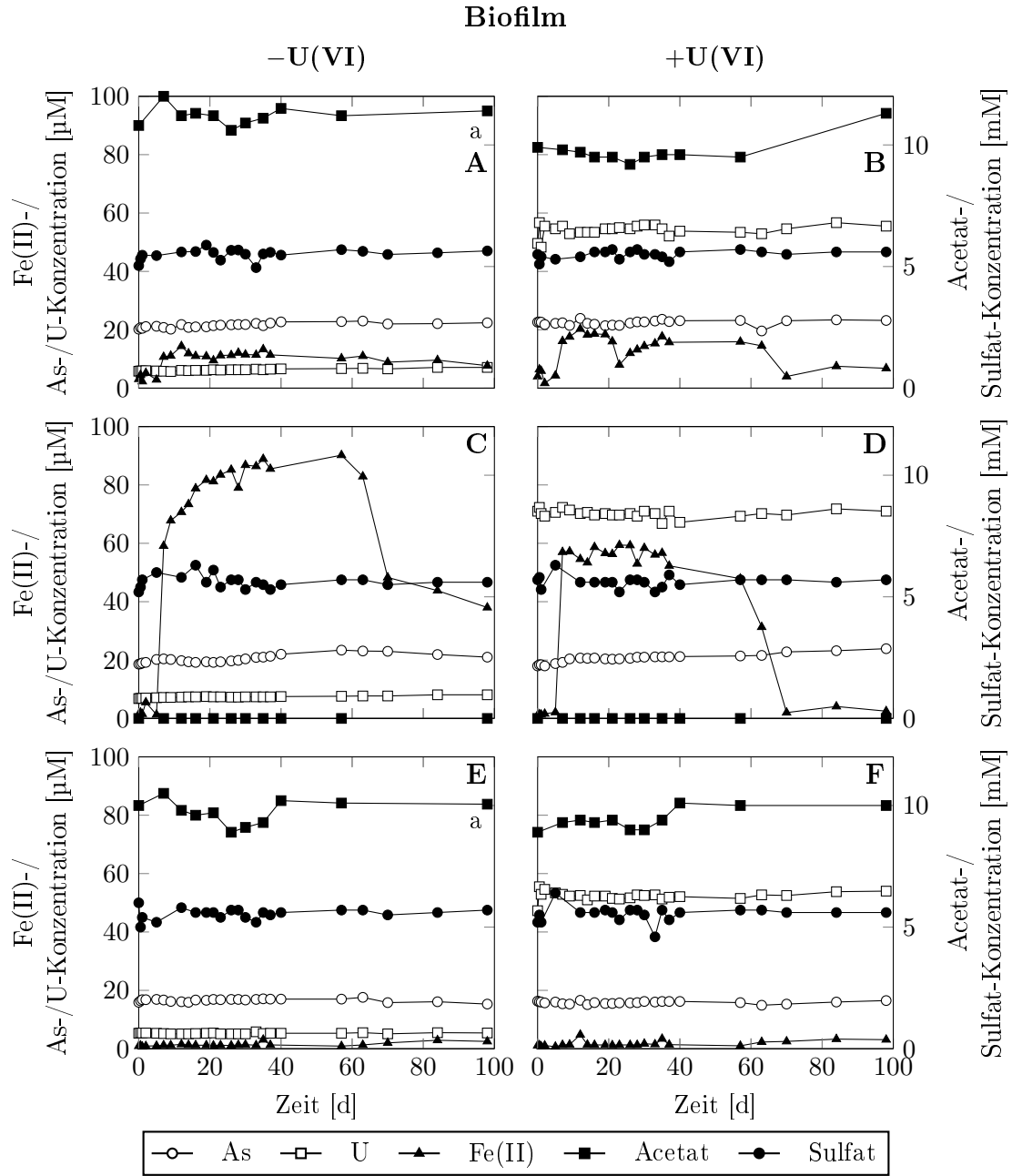


Abbildung A.2: Zeitlicher Verlauf von Arsen, Uran, Fe(II), Sulfat und Acetat in Labor-mikrokosmen für Biofilme aus Schleima der (A, B) Totkontrollen, (C, D) Substratkontrollen und (E, F) Matrixkontrollen
(B, D, F) enthielten zusätzlich 50 μM U(VI)

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Gert Bernhard, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Ressourcenökologie am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, und bei Herrn Prof. Thorsten Stumpf, welcher derzeit das Institut leitet, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an diesem Institut anfertigen zu können.

Frau Prof. Isolde Röske von der TU Dresden danke ich für die Übernahme der Gesamtbetreuung einschließlich der Begutachtung meiner Arbeit sowie für die vielen anregenden Diskussionen, ihre stetige Unterstützung und die motivierenden Worte. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Stahmann von der BTU Cottbus-Senftenberg für sein Interesse an meiner Arbeit, die hilfreichen Hinweise bzw. Anmerkungen und die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Dr. Thuro Arnold möchte ich besonders für die Idee zu dieser Arbeit, die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit am Institut einschließlich der Hilfestellungen und für den Gestaltungsfreiraum bei der Bearbeitung des interessanten Themas in einem interdisziplinären Forschungsumfeld danken.

Bei den beteiligten Mitarbeitern der Wismut GmbH, Herrn Dr. Jenk, Herrn Dr. Meyer, Herrn Herrmann, Herrn Hiller, Herrn Morell, Herrn Höpner und Herrn Rico Wolff, möchte mich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei den Probenahmen, das wissenschaftliche Interesse sowie für viele interessante Hintergrundinformationen bedanken. Außerdem danke ich Herrn Dr. Heinrich, Herrn Weber, Herrn Ladisch und Herrn Hampel von der BfUL und den Mitarbeitern des “Besucherbergwerk Pöhla” e.V. sowie Herrn Dr. Nils Baumann, die mich ebenso bei den Arbeiten im Feld sehr unterstützt haben.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Rother von der TU Dresden für die Möglichkeit, die CARD-FISH-Analysen in den Laboren der TU Dresden durchführen zu können. Zudem konnte ich durch die Teilnahme an seinem Praktikum auf anschauliche Weise die Physiologie und das technische Handling anaerober Mikroorganismen kennenlernen.

Ich danke vielmals Frau Dr. Kerstin Röske für die Auswertung der Pyrosequenzierungs-

Danksagung

daten, die statistische Analyse, die vielen hilfreichen Hinweise und fachlichen Diskussionen. Frau Dr. Petra Bombach und Herrn Dr. Nico Jehmlich vom UFZ Leipzig danke ich sehr für die unkomplizierte, angenehme Zusammenarbeit. Herrn Dr. Nico Jehmlich danke ich insbesondere für die Auswertung der Massenspektren. Desweiteren bedanke ich mich dafür, dass ich in der Gruppe von Herrn Dr. Nico Jehmlich durch intensive Unterstützung von Kathleen Eismann die vorbereitenden Arbeitsschritte zur metaproteomischen Analyse erlernen und durchführen durfte.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Axel Wobus von der TU Dresden, welcher stets ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen und auch sonstigen Belange hatte. Seine fachliche Meinung war eine große Unterstützung für meine Arbeit. Auch Frau Dr. Evelyn Krawczyk-Bärsch vom Institut für Ressourcenökologie sei an dieser Stelle für den fachlichen Austausch und hilfreiche Tipps gedankt.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Robin Steudtner für die Zusammenarbeit bezüglich der Untersuchungen zum Valenzstatus von Uran einschließlich der LIFS-Messungen und bei Herrn Dr. Frank Bok für die thermodynamischen Berechnungen zur Uranspeziation. Beiden danke ich außerdem für wertvolle Diskussionen.

Für die Durchführung der GC-Analysen am Institut für Siedlungs- und Industrieresourtwirtschaft der TU Dresden bedanke ich mich bei Heiko Herrling. Falk Lehmann vom Helmholtz-Institut Freiberg für Ressourcentechnologie danke ich für die intensive Unterstützung bei der HPLC-Analytik im Haus. Für zahlreiche chemische Analysen meiner Proben im Haus danke ich Aline Ritter, Carola Eckardt, Christa Müller und Ina Kappler. Ebenso bedanke ich mich bei den Kollegen Dirk Falkenberg und Bernd Hiller von der Werkstatt, die z.B. den Bau von Durchflusszellen durchführten oder mich beim technischen Handling der Gloveboxen unterstützten.

Bei meiner Praktikantin Dorina Köpke möchte ich mich besonders für ihr Engagement vor allem an den langen Tagen der Probenahme bedanken. Sie hat mit der Durchführung bzw. Assistenz von einigen Experimenten einen wertvollen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet.

Ich danke ganz besonders meinen Kolleginnen Dr. Isabel Zirnstern, Juliane Schott, Katja Schulz, Ulrike Gerber, Claudia Wilke, Dr. Laura Lütke, Dr. Siriwan Dulnee, Dr. Claudia Joseph, Dr. Sina Brockmann und Dr. Anne Heller, die mich durch ihr fachliches Know-how zu neuen Ideen inspirierten und darüber hinaus zu einer freundschaftlichen Atmosphäre mit netten Gesprächsrunden beitrugen. Bei Dr. Isabel Zirnstern möchte ich mich außerdem

Danksagung

herzlich für die gemeinsame Labororganisation, wissenschaftliche Hilfestellungen sowie für die unterstützenden Gespräche bedanken.

Gedankt sei auch allen nicht namentlich erwähnten Kollegen des Instituts für Ressourcenökologie, die ebenso auf die ein oder andere Weise zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Und nicht zuletzt danke ich auf diesem Weg meiner Familie und ganz besonders meinem Freund Andreas Miersch, der mich während der Promotionsphase stets unterstützt und mir den Rücken freigehalten hat.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Corinna Gagell, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit wurde am Institut für Ressourcenökologie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf in der Zeit vom März 2011 bis August 2014 unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Dr. Thuro Arnold und Frau Professor Dr. Isolde Röske (Lehrstuhl Angewandte Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden) angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Corinna Gagell

Dresden, den