



Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen

**Teilprojekt C, Arbeitspaket 2.4:
Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf
den Transfer von Radionukliden im Grund- und
Tiefenwasser**

Wissenschaftlicher Abschlussbericht
Georg Büchel & Erika Kothe

Jena, 15. Juni 2018

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen **02NUK030C** gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

1. Kurzdarstellung

1.1 Aufgabenstellung

Das hier vorgestellte Teilprojekt soll einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Freisetzung, des Transports und der Immobilisierung der Radionuklide im System Gestein/Wasser liefern. Die möglichst genaue Kenntnis der beteiligten hydrogeochemischen und mikrobiologischen Prozesse trägt gezielt zur Reduzierung des negativen Einflusses der Radionuklide auf das Mineralwasser und Trinkwasser bei. Als Untersuchungsbeispiele wurden drei Gesteinstypen in ihrem geologischen Umfeld untersucht, die dafür bekannt sind, Radionuklide zu enthalten. Es sind dies Gesteine des Mittleren Buntsandsteins (Werra-Gebiet), Schwarzpelite des Silurs (Alaunschieferbergwerk „Morassina“, Thüringisches Schiefergebirge) sowie rhyolithische und assoziierte Gesteine (Radonbad Bad Kreuznach).

Das Teilprojekt war unmittelbar an den Verbund-Schwerpunkten „Verständnis der hydrogeochemischen und biologischen (mikrobiellen) Prozesse bei der Freisetzung und beim Transport von Radionukliden“ sowie „Bewertung der Sensitivität von unterschiedlichen Reservoirs in den Kompartimenten Grundwasser und Trinkwasser“ beteiligt. Die gewonnenen Ergebnisse bzgl. Radionuklideinträge erlauben Abschätzungen zu den Prozessen in fluvialen Systemen und Abwassersystemen. Damit konnten die in den ersten Förderrunden des BMBF begonnenen Kooperationen zwischen der Friedrich-Schiller-Universität Jena und den Hochschulen und Einrichtungen der Helmholtz-Gemeinschaft intensiviert werden.

Die Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses anhand konkreter Forschungsprojekte und die Einbindung in die forschungsorientierte Lehre an der Universität im Rahmen der Studiengänge BSc und MSc Biogeowissenschaften und MSc Microbiology konnten einen erheblichen Beitrag zum Kompetenzerhalt in der Radioökologie leisten.

1.2 Voraussetzungen für das Vorhaben

Voraussetzung für das Vorhaben waren die Vorarbeiten aller Projektpartner und die Projektidee. Das Verbundvorhaben wurde wie geplant durchgeführt.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Alle Arbeiten konnten erfolgreich umgesetzt werden.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Im Projekt „Transaqua“ wurde eine Reihe von vielversprechenden Forschungsergebnissen erzielt, die für eine zukünftige wirtschaftliche Nutzung interessant sind. Gleichzeitig konnten eine ganze Reihe von Studierenden in die Radioökologie eingeführt werden. Das wissenschaftliche Weiterqualifizierungsprogramm des Verbunds war sehr gut geeignet, die Promovierenden im Projekt zu fördern.

Es konnten für alle drei untersuchten Gesteinstypen Ergebnisse erzielt werden, die die Freisetzung und Immobilisierung von RN/SM jeweils erklären können. Insbesondere PubMed und Web of Science wurden als Datenbasis für Literaturrecherchen genutzt.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten wurden im engen Kontakt zwischen den Verbundpartnern durchgeführt. Die regelmäßigen Gesamtprojekttreffen sowie die direkte Zusammenarbeit zwischen MitarbeiterInnen der einzelnen Gruppen führten zu einer optimierten Abstimmung. In Kooperation mit VKTA (Strahlenschutz, Analytik & Entsorgung Rossendorf e.V.) und HZDR (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf) wurden gammaspektrometrische Untersuchungen an Wasser- und teilweise auch an Gesteinsproben (VKTA, Dresden, Dr. Dietrich) durchgeführt und die Radionuklid-Zusammensetzung analysiert. Weiterhin wurden Uran-Inkubationsexperimente und anschließende Untersuchungen via Induzierte Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS), Time-resolved Laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS) (HZDR, Dr. Krawczyk-Bärsch; Thimo Philipp) sowie Elektronenmikroskopie (STEM-EDX Dr. Hübner) durchgeführt.

Mit dem Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie (HKI, Dr. Walter, Wagner) wurden Pilzisolat phylogenetisch eingeordnet. Siderophore wurden mit dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie (FSU, Dr. Wichard, Mohr) charakterisiert und Transelektronenmikroskopie sowie Rasterelektronenmikroskopie (TEM/REM) im Elektronenmikroskopiezentrum (Friedrich-Schiller-Universität (FSU), Dr. Nietzsche) durchgeführt.

2. Eingehende Darstellung

2.1 Ergebnisse im Einzelnen

Arbeitspaket (a) befasste sich mit Grundwasser-führenden Gesteinen des Mittleren Buntsandsteins, die typische Grundwasser-Aquifere mit häufig erhöhtem Urangelhalte ($> 10 \mu\text{g/L}$) darstellen. Die in Unterbreizbach/Thüringen neben der ESTA-Rückstandhalde Hattdorf im Mittleren Buntsandstein abgeteufte Bohrung diente als Forschungsgrundlage, um eine mögliche Beeinflussung des Hauptgrundwasserleiters durch Haldenwässer näher zu untersuchen. Anhand lithologischer Aufnahmen und Messungen der magnetischen Suszeptibilität konnten die häufigen faziellen Wechsel zwischen mürben tonigen-, siltigen-, feinsandigen und grobsandigen Gesteinsschichten am Bohrkern nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Totalaufschlüssen und anschließender ICP-MS Analysen konnten sowohl in den oberen Bereichen des Bohrkerns, als auch in einer Tiefe von 54,40 m erhöhte Thorium- ($31 \mu\text{g/g}$) und Uran-Konzentrationen ($7 \mu\text{g/g}$) an einzelnen feinkörnigen Lagen nachgewiesen werden. Anhand von Dünnschliff- und Mikrosondenanalysen konnten zahlreiche Apatite in den Bohrkernproben bestimmt werden, welche u.a. die Eigenschaft besitzen, Uran einzubauen (Bartsch, 2014). Begleitend hierzu wurde das gesamte Werra-Salzgewinnungsgebiet durch zahlreiche Bachelorarbeiten und einige Maserarbeiten hydrogeologisch kartiert und insbesondere die stark salzhaltigen Quellen dokumentiert. Hydrochemische Untersuchungen zeigen, dass einige stark salzbelastete Quellen erhöhte RN/SM-Konzentrationen aufweisen. Sie können direkt aus dem Mittleren Buntsandstein durch das ionenstarke Wasser herausgelöst werden.

Die mikrobiologischen Untersuchungen bezogen sich einmal auf einen Salzwasser-belasteten schwebenden Grundwasserleiter (SGWL) in der untersuchten Bohrung GWM 24 2012 HA, zum anderen auf einen unbelasteten Hauptgrundwasserleiter (HGWL) im unteren Teil der Abfolge in der Bohrung. Die Bohrkern wurden uns freundlicherweise von K+S KALI GmbH Werk Werra zur Verfügung gestellt, auch wurde die Wasserbeprobung ermöglicht. Die angebohrte Gesteinsschichten reichen von der Volpriehausen-Wechselfolge im Liegenden bis hin zum Solling-Sandstein im Hangenden. Beide Aquifere unterscheiden sich sowohl hydrochemisch als auch mikrobiologisch. Während im tieferen Grundwasserleiter vorrangig *Pseudomonas* sp. und *Flavobacterium* sp. identifiziert werden konnten, traten im SGWL hauptsächlich *Bacillus*-Arten auf. Die mikrobiologische Untersuchung an salzbeeinflussten Quellen der Umgebung konnten einen Einblick in die Prozesse dieses Gesteinstyps (Mittlerer Buntsandstein) ermöglichen. Die Sequenzierungsergebnisse der gewonnenen Isolate verweisen bei sehr hoher Salzbeeinflussung auf eine geringe mikrobielle Diversität, wobei Pseudomonaden und *Bacillus* sp. dominierten. Zudem wurden halotolerante/halophile Bakterien und Pilze wie *Virgibacillus* sp., *Salinicola* sp. oder *Cladosporium* sp., welche eine NaCl-Konzentration von 3,6 M tolerieren, in der stärker salzbelasteten Quelle nachgewiesen. Allgemein ist die geringe mikrobielle Diversität in diesen Quellen auf den erniedrigten pH-Wert, die hohe elektrische Leitfähigkeit und erhöhte SM/RN-Konzentrationen zurückzuführen.

Tiefenwasser-führende Rhyolithe wurden in Arbeitspaket (b) im Kreuznacher Rhyolith untersucht, die neben Uran auch Radium enthalten und Radon-Emanation besitzen. Grundwasser verschiedener Kreuznacher Mineralbrunnen wurde physikochemisch, hydrochemisch und mikrobiologisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Urankonzentrationen ($0,05\text{-}0,29 \mu\text{g/L}$) vergleichsweise gering sind. Neben Actiniden wurden Lanthanide (La-Lu) aus der Wasserphase angereichert. Basierend auf den in der Literatur erwähnten hohen Rn-Konzentrationen, wurde das GW in Zusammenarbeit mit dem VKTA Dresden auf dessen Rn-Gehalt ($70\text{-}120 \text{ Bq/L}$) analysiert. Es folgten weitere gammaspektroskopische Untersuchungen des Grundwassers sowie des Wirtsgesteins (^{226}Ra : 103 Bq/kg ; ^{228}Th : 104 Bq/kg). Der Vergleich der radioaktiven Isotopenverhältnisse des Grundwassers mit denen des Rhyoliths deutet daraufhin, dass die im Grundwasser erhöhte ^{222}Rn -Konzentration ursprünglich nicht dem vorherrschenden Rhyolith entstammt. Unter Verwendung von Laserablationsprofilen (LA-ICP-MS) senkrecht zu ehemals hydraulisch aktiven Brüchen des Rhyoliths konnten keine aussagekräftige Verteilung ^{238}U -haltiger Sekundärphasen nachgewiesen werden, die auf eine Emanation/Migration des Ra/Rn aus dem Wirtsgestein in das Grundwasser hinweisen könnte. Auch weitere Brunnen zeigten stabile Aktivitätskonzentrationen einzelner RN. Die gammaspektrometrische Analyse von Gesteinsproben, die unterhalb des Kreuznachs Rhyoliths auftreten und aufgrund von tektonischen Prozessen bei der Intrusion des Kreuznacher Rhyoliths heute auch lateral an der Oberfläche auftauchen, unterstützt die Theorie, dass das Rn im Grundwasser nicht nur aus dem vorherrschenden Rhyolith stammt.

Hinsichtlich der mikrobiologischen Charakterisierung konnten aus den Grundwässern der Brunnen durchschnittlich je 30-40 Stämme kultiviert werden. Phylogenetische Untersuchungen wiesen auf eine teilweise geringe mikrobielle Diversität hin. Weiterhin wurden die Isolate auf die Produktion von

Siderophoren getestet, da diese möglicherweise die Mobilität von Radionukliden beeinflussen können. In einem weiteren Brunnen wurde eine abweichende mikrobielle Diversität, aber wiederum Dominanz Siderophor-bildender Bakterien nachgewiesen.

Die in Arbeitspaket (c) adressierten, oberflächennahen Grundwasser-führenden Schwarzpelite, die für hohe Uran- und Radiumgehalte und hohe Emanationsraten bekannt sind, wurden mineralogisch und hydrochemisch in Batch- und Säulenexperimenten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Th und U an Mineralphasen wie z.B. Apatit oder Titanit und nicht an organisches Material gebunden sind. Das durch das Wirtsgestein perkolierende Wasser wies einen niedrigen pH-Wert (2,6-3,7) und geringe Elementgehalte auf. In einem tieferen Bereich der Höhle wurden jedoch U-Konzentrationen von 4-400 µg/L detektiert. Verschiedene Präzipitate wurden als Schwertmannit und Fe-Phosphate mit hoher Akkumulation von V (4,5 mg/g) und Mo (1,0 mg/g) identifiziert. Im Wirtsgestein waren U (1,6-7,3 µg/g) sowie Th (0,4-2 µg/g) angereichert. Die Verweilzeiten der Probenwässer mit dem Wirtsgestein konnten durch Batch-Tests (8-168 h) mit Konzentrationen im Eluat korreliert werden, wobei die Elemente Cu, Co, Mn und Mo ein Gleichgewicht erreichten. Die Reduzierung der Fe-Konzentration deutet auf die Präzipitation von Eisenphasen hin. Höhere Uran-Konzentrationen wurden im Grundwasser der „Tiefen Sohle“ (0,95 Bq/L) im vgl. zur „Märchengrotte“ (0,13 Bq/L) nachgewiesen. Bezogen auf die analysierten Radionuklid-Konzentrationen zeigte ²²⁶Ra leicht erhöhte Werte (0,3-0,8 Bq/L). Die Untersuchungen des Schiefers zeigten maximale Th und U Konzentrationen von 2,1 bzw. 8,2 µg/g. Die Radionuklidanalyse (VKTA Dresden) ergab Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze.

Durch kultivierungsunabhängige Untersuchungen konnten in den Präzipitaten sowohl Bakterien als auch Archaeen nachgewiesen werden. Entsprechend der hydrochemischen Standortbedingungen (pH 3-4) war eine geringe mikrobielle Diversität zu erwarten, die mit hoher Abundanz von Pilzen kombiniert war. Isolate (u.a. *Mortierella* sp., *Sporothrix* sp. und *Geomyces* sp. bzw. Hefen wie *Trichosporon* sp. oder *Yarrowia* sp.) wurden auf ihre Fähigkeit zur Produktion von Biofilmen getestet. Diese Ansammlung von Mikroorganismen an festen Grenzflächen bewirkt u.a. die Akkumulation von Radionukliden. Es konnte eine verstärkte Biofilmproduktion der Pilze (z.B. *Trichosporon* sp.) nachgewiesen werden. Eine Schieferprobe mit sehr hohen Elementkonzentrationen und C-Gehalten (106 ± 6 g/kg) wurde in Mikrokosmen mit Mikroorganismen (*Cryptococcus* sp., *Arthrobacter* sp. und *Mucor* sp.) eingesetzt und für *Mucor* sp. durch gammaspektrometrische Messungen (VKTA Dresden) der Kulturüberstände ein Einfluss von auf die Mobilisierung von ²²⁶Ra bestätigt. Sowohl *Mucor* sp. als auch *Verticillium* sp. konnte Siderophore produzieren, die daran beteiligt sein können. Die Siderophore wurden mittels ESI-MS untersucht. Die räumlich aufgelöste Analyse der inokulierten Schwarzschieferplatten mittels LA-ICP-MS zeigte u.a. eine Akkumulation von ⁵⁵Mn und ⁸⁸Sr in der Biomasse von *Arthrobacter* sp. MB 109 sowie von U bei *Mucor* sp. (87 % bzw. 91 mg U pro Gramm Trockenmasse). REM/TEM zeigten sowohl Sorption an der Zellwand, als auch intrazelluläre Akkumulation. Mit der TRLIFS-Methode konnten isolatspezifische, gebundene Uranspezies gezeigt werden. In Bezug auf die Interaktion zwischen Isolat und Schwarzschiefer wurden Messungen mittels Raman-Spektroskopie durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Bereiche der Schwarzschieferoberfläche durch die Mikroorganismen degradiert wurden.

Zusätzlich zu den bisherigen Arbeiten wurde die Geochemie des Laacher Sees der letzten 150 Jahre untersucht. Dazu wurden Seesedimente herangezogen und diese in Zusammenarbeit mit einer weiteren Gruppe aus TransAqua analysiert. In Kooperation mit Herrn Prof. Eckehard Klemt von der Hochschule Ravensberg-Weingarten wurden Sedimente des Laacher Sees mittels radiogener Isotope in ein unabhängiges Altersmodell überführt. Mit Unterstützung durch Herrn Dr. Siebert, Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig, konnte ein 90 cm langer Kern gezogen und von diesem 66 Proben entnommen werden. In Weingarten wurden ⁷Be (atmosphärischer Eintrag, kosmische Strahlung), ⁴⁰K (natürliche Gesteinsstrahlung, Glimmer, Tone), ¹³⁷Cs (Bomben-Fallout), ²¹⁰Pb (natürl. Gesteinsstrahlung, Uranzerfallsreihe) und weitere Isotope gemessen. Begleitend wurden detaillierte mikroskopische Analysen und magnetische Suszeptibilitäten aufgenommen, die bis zum Sommer mit weiterem Kernmaterial verglichen werden. Damit können Änderungen der Umwelt innerhalb der letzten 150 Jahre präzise gefasst werden. Die Proben wurden mittels Gammaspektroskopie auf künstliche (¹³⁷Cs, ²⁴¹Am, ²³⁹Pu) und natürliche Gamma-Emittenten (u.a. ⁴⁰K, ²¹⁰Pb, ²¹⁴Pb, ²¹⁴Bi, ⁷Be) untersucht. Anhand der Bestimmung von ¹³⁷Cs Peaks bei 7,5 (Marker des Tschernobyl-Unfalls) und 16,5 cm Tiefe (Marker der Kernwaffentests in den 1960er Jahren) konnten Tiefen-Altersmodelle entwickelt werden. Des Weiteren konnte aus der Pb-210/214-Verteilung die Sedimentationsrate errechnet werden. Diese beträgt bis zu einer Tiefe von 25 cm 0,13-0,49 cm/a, im Bereich von 26-29 cm steigen die Werte jedoch an (1,65 cm/a). Für ausführliche Informationen s. Anhang.

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Bericht ist abgeschlossen. Alle Ausgaben wurden wie geplant verwendet.

2.3 Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Alle geplanten Arbeiten wurden durchgeführt und waren angemessen.

2.4 Voraussichtlicher Nutzen

Die Ergebnisse bieten Voraussetzungen für die weitere Grundlagenforschung zur Wechselwirkung von Mikroben mit Gestein und Grundwasser. Darüber hinaus sind die Kenntnisse für die Minimierung der Gefährdung der Bevölkerung, beispielsweise im Fall einer Schmutzigen Bombe oder eines Unfalls eines AKW wichtig und wertvoll.

Daneben ist die Projektarbeit auch im Rahmen der universitären Lehre verbreitet worden. Abschlussarbeiten sowie Forschungspraktika, Vorlesungen, Seminare und Praktika für Studierende sind essentieller Bestandteil der wissenschaftlichen Verbreitung.

Poster und Vorträge auf internationalen Tagungen haben zur Sichtbarkeit der Forschung im Rahmen des Projekts beigetragen.

2.5 Fortschritt an anderer Stelle

Es gibt unseres Wissens keine Konkurrenzarbeiten.

2.6 Relevante eigene Veröffentlichungen im Verlauf des Teilprojekts

- Bartsch M (2014) Bindung und Freisetzung von Radionukliden an und aus Gesteinen des Mittleren Buntsandsteins. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Beyer A, Burow K, Büchel G, Kothe E (2015) Bacterial communities in marine salt evaporate rocks and pristine Zechstein aquifers. *Geomicrobiol J* 33, 774-778.
- Beyer A, Rzanny M, Weist A, Möller S, Burow K, Gutmann F, Neumann S, Lindner J, Müsse S, Brangsch H, Stoiber-Lipp J, Lonschinski M, Merten D, Büchel G, Kothe E. 2015. Aquifer community structure in dependence of lithostratigraphy in groundwater reservoirs. *Environ Sci Pollut Res* 22, 19342-19351.
- Bock S (2016) Einfluss von Mikroorganismen auf die Freisetzung von Elementen/Radionukliden aus Schwarzschiefer-Proben. Bachelorarbeit, Univ. Jena.
- Enderlein S. (2017) Hydrogeologisches Kartieren im Werra-Gebiet (TK 5126 SO – Merkers). 94 S., Bachelorarbeit Univ. Jena.
- Engelhardt J., Voigt T. (2016) Subrosion und Kupferschieferhalden im südlichen Harzvorland – eine Auswertung des Digitalen Geländemodells zwischen Questenberg und Pölsfeld. *Beitr. Geol. Thüringen*, 23, 115-124.
- Erhardt R (2014) Hydro-Geochemische Untersuchungen in dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Gatz P. (2015) Hydrogeologische Kartierung TK-10 5126-SW Vacha. 89 S., Bachelorarbeit, Univ. Jena.
- Grawunder A., Lonschinski M., Händel M., Wagner S., Merten D., Mirgorodsky D., Büchel G. (2108) Rare earth element patterns as process indicators at the water-solid interface of a post-mining area. *Applied Geochem.* (accepted)
- Grawunder A., Gube M. (2018) Element distribution in fruiting bodies of *Lactarius pubescens* with focus on rare earth elements. *Chemosphere* (accepted)
- Grawunder A., Raabe D., Lonschinski M., Merten D., Büchel G. (2017) Rare earth elements in Permian salts and brines, Thuringia, Germany. *Chemie der Erde* 77, 633-636.
- Grawunder A., Gärtner S., Merten D. (2017) Adaption of rare earth element pre-concentration method to water enriched in Al, Ca, Fe, and Mg. *Mine Water Environ.* 36, 363-370.
- Günther A, Raff J, Merroun ML, Roßberg A, Kothe E, Bernhard G. 2014. Interaction of U(VI) with Schizophyllum commune studied by microscopic and spectroscopic methods. *BioMetals* 27, 775-785.
- Harpke M (2015) Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Harpke M (2017) Spezifizierung mikrobieller (Im)mobilisierungsprozesse von Elementen und/oder Radionukliden aus Schwarzschiefer. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Hellwig S (2017) Hydrogeologische Kartierung TK 10 5025-SO Großensee und hydrogeologische und mikrobiologische Charakterisierung salzbeeinflusster Quellen, der Werra-Region. 77 S., Bachelorarbeit, Univ. Jena.
- Kothe E, Büchel G. 2014. UMBRELLA: Using MicroBes for the REgulation of heavy metal mobiLity at ecosystem and landscape scAle. *Environ Sci Pollut Res* 21, 6761-6764.
- Kothe E, Büchel G. 2015. Alteration and element mobility at microbe-mineral interfaces. *Env Sci Poll Res* 22, 19315-19316.
- Kuhlemann L.-M. (2015) Hydrogeologische Kartierung TK-10 Baltt 5126-NW Heringen (Werra). 79 S., Bachelorarbeit, Univ. Jena.
- Mayanna S, Peacock C, Schäffner F, Grawunder A, Merten D, Kothe E, Büchel G. 2015. Biogenic precipitation of manganese oxides and enrichment of heavy metals at acidic soil pH. *Chem Geol* 402, 6-17.

- Schäfer D (2015) Mikrobiomanalyse von Eisenpräzipitaten und saurer Grundwässer des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes „Morassina“. Bachelorarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schöneck C (2016) Radiometrische Datierungen und sedimentpetrographische Untersuchungen von Sedimenten im Laacher See. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schütze E, Ahmed E, Voit A, Klose M, Greyer M, Svatos A, Merten D, Roth M, Holmström SJM, Kothe E. 2015. Siderophore production by streptomycetes - stability and alteration of ferrihydroxamates in heavy metal contaminated soil. *Env Sci Poll Res* 22, 19376-19383.
- Sommerwerk E (2014) Vergleich der mikrobiellen Diversität in Grundwasser-Aquiferen. Bachelorarbeit Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Wenzel H. (2017) Hydrogeologische Kartierung TK 10 5126-NO Frauensee. 52 S., Bachelorarbeit, Univ. Jena.

Tagungsbeiträge

- Burow K, Gärtner S, Grawunder A, Kothe E, Büchel G (2014a) Microbial and hydrochemical characterization of groundwater containing radionuclides. Proceedings of the 4th International Student Conference on Microbial Communication (MiCom), 31.03.-03.04.2014, Jena, p. 64-65.
- Burow K, Gärtner S, Sommerwerk E-M, Grawunder A, Kothe E, Büchel G (2014b) Microbial and hydrochemical impact on transfer of radionuclides in Groundwater. 13. Sanierungskolloquium/ 13th Symposium on Remediation, September 25-26, 2014, Jena, p. 17.
- Burow K, Gärtner S, Grawunder A, Kothe E, Büchel G (2014c) Microbial consortia in radionuclide-rich groundwater. Freiberg, Uranium Mining Conference 2014
- Burow K, Gärtner S, Grawunder A, Merten D, Kothe E, Büchel G (2015) Radionuclides in groundwater: (Micro)biology and (hydro)geology (TransAqua). Proceedings of KONTEC 2015: „Conditioning of Radioactive Operational & Decommissioning Wastes“. Dresden, p. 866-873.
- Burow K, Grawunder A, Pietschmann S, Harpke M, Schäfer D, Bock S, Dietrich N, Merten D, Kothe E, Büchel G (2016) Impact of microorganisms on element mobilization in water-rock-interactions. Jena, 15th symposium on remediation.
- Burow K, Grawunder A, Harpke M, Schäfer D, Bock S, Dietrich N, Wagner L, Merten D, Büchel G, Kothe E (2017) Microbial (im)mobilization of radionuclides: active or passive?. Jena, 16th symposium on remediation,.
- Burow K, Grawunder A, Harpke M, Schäfer D, Bock S, Dietrich N, Merten D, Kothe E, Büchel G (2017a) Actors in rock-water-systems: microbial radionuclide mobilization. Paris, Goldschmidt-Tagung.
- Burow K, Grawunder A, Erhardt R, Harpke M, Schäfer D, Bock S, Dietrich N, Merten D, Kothe E, Büchel G (2017b) Microbially-induced release of elements/radionuclides. Jena, 6th International Conference on Microbial Communication for Young Scientists (MiCom).

3. Erfolgskontrollbericht, Berichtsblatt und *data control sheet*

Zuwendungsempfänger: Büchel, Georg & Kothe Erika	Förderkennzeichen: 02NUKO30C
Vorhabenbezeichnung:	
Laufzeit des Vorhabens: 01.06.2013 – 31.12.2017	

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B. des Förder-programms - (ggf. unter Angabe des Schwerpunkts) - soweit dies möglich ist

Das Teilprojekt C, Arbeitspaket 2.4 „Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf den Transfer von Radionukliden im Grund- und Tiefenwasser“ war unmittelbar an den Verbund-Schwerpunkten „Verständnis der hydrogeochemischen und biologischen (mikrobiellen) Prozesse bei der Freisetzung und beim Transport von Radionukliden“ sowie „Bewertung der Sensitivität von unterschiedlichen Reservoirs in den Kompartimenten Grundwasser und Trinkwasser“ beteiligt. Die gewonnenen Ergebnisse bzgl. Radionuklideinträge erlauben Abschätzungen zu den Prozessen in fluvialen Systemen und Abwassersystemen. Damit konnten die in den ersten Förderrunden des BMBF begonnenen Kooperationen zwischen der Friedrich-Schiller-Universität Jena und den Hochschulen und Einrichtungen der Helmholtz-Gemeinschaft intensiviert werden.

Die Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses anhand konkreter Forschungsprojekte und die Einbindung in die forschungsorientierte Lehre an der Universität im Rahmen der Studiengänge BSc und MSc Biogeowissenschaften und MSc Microbiology konnten einen erheblichen Beitrag zum Kompetenzerhalt in der Radioökologie leisten.

2. wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Im Projekt „Transaqua“ wurde eine Reihe von vielversprechenden Forschungsergebnissen erzielt, die für eine zukünftige wirtschaftliche Nutzung interessant sind. Gleichzeitig konnten eine ganze Reihe von Studierenden in die Radioökologie eingeführt werden. Das wissenschaftliche Weiterqualifizierungsprogramm des Verbunds war sehr gut geeignet, die Promovierenden im Projekt zu fördern.

Es konnten für alle drei untersuchten Gesteinstypen (Buntsandstein, Schwärzpelite, Rhyolith) Ergebnisse erzielt werden, die die Freisetzung und Immobilisierung von RN/SM jeweils erklären können.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans. Diese soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des Zuwendungsempfängers brauchen nicht offenbart zu werden):

3.1 *Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten*

Alle wissenschaftlichen Untersuchungsergebnisse wurden und werden publiziert, bzw. in Kooperationen mit anderen Institutionen und sich anschließenden Projekten weitergegeben.

3.2 *Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - z.B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt),*

Die Ergebnisse bieten Voraussetzungen für weitere Grundlagenforschung zur Wechselwirkung von Mikroben mit Gestein und Grundwasser. Die Ergebnisse in ihrer hydrochemischen/mikrobiologischen-Verknüpfung bieten Vorteile gegenüber bisherigen Vorgehensweisen. Mit diesem Ansatz konnte bereits ein Projekt mit K+S KALI GmbH Standort Werra erfolgreich durchgeführt werden.

Daneben ist die Projektarbeit auch im Rahmen der universitären Lehre verbreitet worden. Abschlussarbeiten sowie Forschungspraktika, Vorlesungen, Seminare und Praktika für Studierenden sind essentieller Bestandteil der wissenschaftlichen Verbreitung. Poster und Vorträge auf internationalen Tagungen haben zur Sichtbarkeit der Forschung im Rahmen des Projekts beigetragen.

- 3.3 *Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u.a. einzubeziehen,*

Die Ergebnisse tragen dazu bei, die Erfolgsaussichten zur Einwerbung von Projekten zu verbessern.

- 3.4 *Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse*

Es wird angestrebt, die erzielten Ergebnisse der mikrobiologischen/hydrogeochemischen Untersuchungen an der Gesteins/Wasser-Interaktion auf den Bereich der Tailings zu übertragen und zu vertiefen (Projektvorhaben BMBF)

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die durchgeführten wissenschaftlichen Untersuchungen führten zu den im Antrag formulierten Zielen.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt),

Die Anwendung der neuen erzielten methodischen Ergebnisse werden in den bestehenden Kooperationen weitergeleitet, bzw. in Publikationen verbreitet

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.

Ausgaben und Zeitplan wurden eingehalten.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf den Transfer von Radionukliden im Grund- und Tiefenwasser (Schlussbericht zum Verbundprojekt TransAqua: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen; Teilprojekt C, Arbeitspaket 2.4 mit Anhang)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Büchel, Georg & Kothe, Erika	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2017
	6. Veröffentlichungsdatum 15.6.2018
	7. Form der Publikation Unveröff. Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Prof. Dr. Georg Büchel, Institut für Geowissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Burgweg 11, 07749 Jena Prof. Dr. Erika Kothe, Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Neugasse 25, 07743 Jena	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen 02NUK030C
	11. Seitenzahl 75
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 119
	14. Tabellen 19
	15. Abbildungen 52
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf den Transfer von Radionukliden im Grund- und Tiefenwasser, BMBF: Dresden, 15.6.2018	

18. Kurzfassung

Gesteins-/Wasser-Interaktionen bestimmen die Verbreitung von Radionukliden in Grund- und Tiefenwasser. Um die Prozesse zu verstehen und radioökologische Auswirkungen zu betrachten, wurden mikrobiologische und hydrogeochemische Untersuchungen an drei Gesteinstypen untersucht: Mittlerer Buntsandstein (Unterbreizbach, Werra Gebiet, Thüringen; U >10 µg/L), silurischer Schwarzpelit (Alaunbergwerk „Morassina“, Thüringisches Schiefergebirge; hohe Gehalte für U, Ra, Rn) und Rhyolith (Bad Kreuznach, Rheinland-Pfalz; hohe Konzentrationen in den Mineral- und Thermalwässern für Radon und in den assoziierten Gesteinen für U und Ra R). Basierend auf den Verbundvorhaben „Verständnis der hydrogeochemischen und biologischen (mikrobiellen) Prozesse bei der Freisetzung und beim Transport von Radionukliden“ sowie „Bewertung der Sensitivität von unterschiedlichen Reservoiren in den Kompartimenten Grundwasser und Trinkwasser“ wurden Mobilisierungs- und Immobilisierungsprozesse für Radionuklide im Zusammenhang der Strahlenschutzvorsorge bearbeitet. Die Hauptergebnisse bestehen für das erste Untersuchungsgebiet in der Identifizierung salztoleranter Bacteria und Archäa, die durch die Produktion von Siderophoren auch Radionuklide mobilisieren und im Grundwasser verbreiten können. Im zweiten Testgebiet wurden im besonderen Pilze gefunden, die die organische Fraktion zusetzen und damit Radionuklide freisetzen können. Am dritten Standort wurde durch die Untersuchung der Radiumisotope eine bisher unbekante Quelle für das im Mineral- und Thermalwasser auftretende Edelgas Radon identifiziert.

19. keywords

Radionuklide, Tiefenwasser/Grundwasser, Buntsandstein, Schwarzpelite, Rhyolith, Mikrobiologie, Hydrochemie

20. Verlag

21. Preis

-

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Schlussbericht
3. title Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf den Transfer von Radionukliden im Grund- und Tiefenwasser (Schlussbericht zum Verbundprojekt TransAqua: Transfer von Radionukliden in aquatischen Ökosystemen; Teilprojekt C, Arbeitspaket 2.4 mit Anhang)	
4. author(s) (family name, first name(s)) Büchel, Georg & Kothe, Erika	5. end of project 31.12.2017
	6. publication date 15.06.2018
	7. form of publication Unveröff. Bericht
8. performing organization(s) (name, address) Prof. Dr. Georg Büchel, Institut für Geowissenschaften Friedrich-Schiller-Universität Burgweg 11, 07749 Jena Prof. Dr. Erika Kothe, Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Neugasse 25, 07743 Jena	9. originator's report no. 02NUKO30C
	10. reference no.
	11. no. of pages 77

12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 111 für 14. no. of tables 18 15. no. of figures 52
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date) Hydrogeochemischer und/oder mikrobieller Einfluss auf den Transfer von Radionukliden im Grund- und Tiefenwasser, BMBF: Dresden, 15.6.2018	
18. abstract <p>Gesteins-/Wasser-Interaktionen bestimmen die Verbreitung von Radionukliden in Grund- und Tiefenwasser. Um die Prozesse zu verstehen und radioökologische Auswirkungen zu betrachten, wurden mikrobiologische und hydrogeochemische Untersuchungen an drei Gesteinstypen untersucht: Mittlerer Buntsandstein (Untere Breitzbach, Werra Gebiet, Thüringen; U >10 µg/L), silurischer Schwarzpelit (Alaunbergwerk „Morassina“, Thüringisches Schiefergebirge; hohe Gehalte für U, Ra, Rn) und Rhyolith (Bad Kreuznach, Rheinland-Pfalz; hohe Konzentrationen in den Mineral- und Thermalwässern für Radon und in den assoziierten Gesteinen für U und Ra R). Basierend auf den Verbundvorhaben „Verständnis der hydrogeochemischen und biologischen (mikrobiellen) Prozesse bei der Freisetzung und beim Transport von Radionukliden“ sowie „Bewertung der Sensitivität von unterschiedlichen Reservoiren in den Kompartimenten Grundwasser und Trinkwasser“ wurden Mobilisierungs- und Immobilisierungsprozesse für Radionuklide im Zusammenhang der Strahlenschutzvorsorge bearbeitet. Die Hauptergebnisse bestehen für das erste Untersuchungsgebiet in der Identifizierung salztoleranter Bacteria und Archäa, die durch die Produktion von Siderophoren auch Radionuklide mobilisieren und im Grundwasser verbreiten können. Im zweiten Testgebiet wurden im besonderen Pilze gefunden, die die organische Fraktion zusetzen und damit Radionuklide freisetzen können. Am dritten Standort wurde durch die Untersuchung der Radiumisotope eine bisher unbekannte Quelle für das im Mineral- und Thermalwasser auftretende Edelgas Radon identifiziert.</p>	
19. keywords Radionuklide, Tiefenwasser/Grundwasser, Buntsandstein, Schwarzpelite, Rhyolith, Mikrobiologie, Hydrochemie	
20. publisher	21. price

Anhang

Zusammenfassung	13
1. Untersuchungsgebiet Hattorf	13
1.1 Wechselwirkungen zwischen Grundwasser und Gestein.....	16
1.1.1 Uran- und Thorium-Gehalte der Grundwasserproben an der Halde Hattorf	20
1.1.2 Seltene Erdelemente der Grundwasserproben an der Halde Hattorf	22
1.2 Untersuchung möglicher anthropogener Salzbelastung	23
1.2.1 Laugenversenkung	24
1.2.2 Hydrogeologische Kartierung	24
1.2.3 Hydrogeochemie im Gebiet um die Halde und K+S Versenkungsbrunnen	29
1.2.4 Mikrobiologische Charakterisierung Quelle 1 und 10.....	31
1.3 Vergleich der mikrobiellen Diversität in Grundwasser-Aquiferen	37
1.3.1 Lebensraum Grundwasser	37
1.3.2 Physiologische Charakterisierung	41
1.3.3 Phylogenie	42
2. Untersuchungsgebiet Morassina	43
2.1 Mikrobiomanalyse von Eisenpräzipitaten und saurer Grundwässer des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes „Morassina“	43
2.2 Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk Morassina	45
2.2.1 Höhlen als Lebensraum von Mikroorganismen	45
2.2.2 Isolate aus dem Bergwerk Morassina	46
2.2.3 Bakterien aus dem Bergwerk Morassina.....	48
2.2.4 Pilze aus dem Bergwerk Morassina	49
2.2.5 Zuordnung der Isolate.....	51
2.2.6 Spezifizierung mikrobieller (Im)mobilisierungsprozesse von Elementen und/oder Radionukliden aus Schwarzschiefer.....	54
2.2.7 Interaktionen mit Schwarzschiefer.....	57
2.3 Einfluss von Mikroorganismen auf die Freisetzung von Elementen/ Radionukliden aus Schwarzschiefer-Proben	67
3. Untersuchungsgebiet Bad Kreuznach	70
3.1 Radionuklid-reiche Gesteins-Wasser-Systeme: eine hydrochemische und mikrobiologische Studie	71
Literatur	74

Zusammenfassung

Gesteins-/Wasser-Interaktionen im Untergrund führen zur Aufnahme von Radionukliden in das Grund- und Tiefenwasser. Über das Grundwasser gelangen die Radionuklide in das Trink- und Oberflächenwasser, wobei in beiden Fällen wenig über den Anteil der mikrobiologischen Prozesse bekannt ist. Das Forschungsprojekt sollte die Freisetzung der Radionuklide aus den Gesteinen, den Transport über die Wasserphase zur Erdoberfläche und die Freisetzung an der Erdoberfläche untersuchen. Die möglichst genauen Kenntnisse der beteiligten hydrogeochemischen und mikrobiologischen Prozesse tragen gezielt zur Reduzierung des negativen Einflusses der Radionuklide auf das Trinkwasser bei. Dazu wurden neben mineralogischen und hydrogeochemischen Prozessen besonders die mikrobiellen Konsortien und ihr Einfluss auf formationsbezogenen Unterschiede der Spurenelementchemie bei den Gesteinen des Mittleren Buntsandsteins (Untersuchungsgebiet Hattorf, Thüringen; die Grundwässer enthalten häufig Urangelhalte $>10 \mu\text{g/L}$), bei Schwarzpeliten (Bergwerk Morassina, Thüringen; hohe Radionuklid-, u.a. Uran- und Radiumgehalte sowie hohe Emanationsraten) und bei Rhyolithen (Heilquellen bei Bad Kreuznach, Rheinland-Pfalz; neben Uran und Radium ist Radon-Emanation bekannt) prozessorientiert untersucht und neben den Radionukliden Rn, U und Th auch die Seltenen Erden Elemente als Analoga für dreiwertige Actinide untersucht. Das Teilprojekt setzte unmittelbar bei den Verbund-Schwerpunkten „Verständnis der hydrogeochemischen und biologischen (mikrobiellen) Prozesse bei der Freisetzung und beim Transport von Radionukliden“ sowie „Bewertung der Sensitivität von unterschiedlichen Reservoiren in den Kompartimenten Grundwasser und Trinkwasser“ an. Es wurden neben den Radionukliden Rn, U und Th die zum Eintrag von dreiwertigen Actiniden ins Trinkwasser relevanten Prozesse am Beispiel ihrer chemischen Analoga, der Lanthaniden untersucht und damit ein Beitrag zur Strahlenschutzvorsorge geleistet. Die Aufschlüsselung von Fraktionierungsprozessen der Lanthanide in Relation zu mikrobiellen und physikochemischen Prozessen leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der ablaufenden Prozesse.

Für die drei Untersuchungsgebiete konnten unterschiedliche Kernaussagen getroffen werden, die die jeweils vorherrschenden Prozesse definieren. So konnten im ersten Untersuchungsgebiet, dem salzföhrnden Buntsandstein bei Hattorf, salzliebende Bakterien und Archaeen isoliert werden, die Siderophore sekretieren und so Schwermetalle und Radionuklide (SM/RN) in Lösung bringen. Auch aus andere Aquiferen sind solche Siderophor-Produzenten bekannt und für Buntsandstein aus der Region um Jena beschrieben (Beyer et al. 2015). Die Siderophore binden nicht nur mit hoher Affinität Eisen, sondern können auch andere Schwermetalle komplexieren (Dimkpa et al. 2008, 2009), so dass hier die Mobilität im Grundwasser für SM/RN erhöht werden kann. Biomineralisierung zur Immobilisierung wurde dagegen vorherrschend in Karbonat-Systemen gefunden (Meier et al. 2017). Damit reihen sich die gefundenen Prozesse des Gebiets um Hattorf in andere Sandstein-Mikrobiome ein und liefern damit übertragbare Ergebnisse.

Im Untersuchungsgebiet Morassina wurde Schwarzschiefer als Quelle für Radionuklide untersucht. Hier wurden vor allem Pilze isoliert und charakterisiert. In der Tat kann der organische Kohlenstoff (bis zu 20 % des Gesteins) durch Pilze besonders gut angegriffen und abgebaut werden (Madhavan et al. 2014), was zur Freisetzung der assoziierten SM/RN führt (Wengel et al. 2006, Kirtzel et al. 2017), die damit in die Wasserphase gelangen. Damit sind auch diese Ergebnisse auf andere C_{org} -reiche Gesteinstypen übertragbar.

Im dritten Untersuchungsgebiet, den Thermalquellen und Wässern um Bad Kreuznach, konnte festgestellt werden, dass die Radiumisotopie eine bisher unvermutete Quelle nahelegt. So werden wahrscheinlich in Form von Mischwässern aus den unterliegenden Karbon- bzw. Unterrotliegend-Gesteinen bereits SM/RN in das Grundwassersystem eingespeist, die dann mit gefördert werden.

Insgesamt konnten damit in drei völlig unterschiedlichen Grundwasser-Ökosystemen die mikrobiologischen und hydrogeochemischen Prozesse der Mobilisierung von SM/RN geklärt werden und so die Basis für geeignete Vorsorgemaßnahmen geschaffen werden. Nur so wird es zukünftig möglich sein, gezielt Immobilisierungsprozesse zu identifizieren, die der Gefährdung von Mensch, Natur und Umwelt technologisch entgegen wirken können.

1. Untersuchungsgebiet Hattorf¹

Der Mittlere Buntsandstein des Germanischen Beckens wird, ausgehend vom südlichen Niedersachsen, in vier Formationen unterteilt: der Volpriehausen-Formation, der Detfurth-Formation,

¹ aus: Katja Burow, laufende Dissertation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

der Hardegsen-Formation und der Solling-Formation. Der Sandstein wurde in der Trias gebildet und befindet sich im „Südwestthüringischen Triasgebiet“ (Seidel, 2003). Es wurden mehrere Grundwassermessstellen eingerichtet, um eine Beobachtung der Grundwasserleiter hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung durch Haldensickerwässer und ein allgemeines Grundwassermonitoring an der Rückstandshalde Hattorf zu gewährleisten (Gemarkung Unterbreizbach, Flur 10, Flurstück 1110). Von einer dieser Bohrungen: GWM 24/2012 Hattorf wurde nur der Mittlere Buntsandstein beprobt (Abb. 1.1).

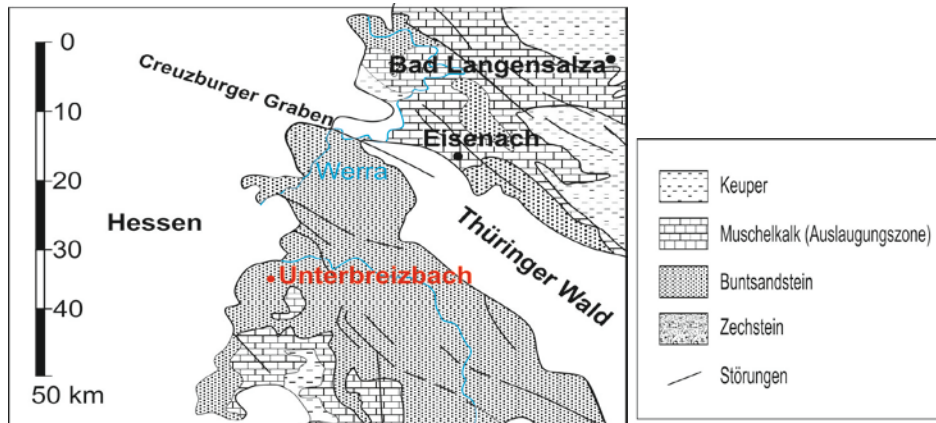


Abb. 1.1: Lage des Untersuchungsgebiets bei Hattorf im Werra-Kaligebiet. Die Rückstandshalde Hattorf liegt auf hessischem Gebiet unmittelbar nördlich Unterbreizbach.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen der Haldensickerwasser-beeinflussten Grundwasserproben, wurden die Wasserproben z.T. zunächst aufgrund des hohen Salzgehaltes vor Ort verdünnt (3,5 L Probe + 2,5 L steriles *A. dest.*). Die Proben wurden umgehend filtriert und somit die Zellkonzentration aufkonzentriert (0,2 µm; 5 L Wasserprobe/Filtereinheit). Die Filter wurden anschließend auf salzhaltigem Nährmedium (Standard I und R2A mit jeweils 10% / 20% NaCl) in Duplikaten bei 10°C inkubiert. Nach etwa 14 Tagen wurde beginnendes Koloniewachstum dokumentiert und morphologisch unterschiedliche Kolonien in Reinkultur für die anschließende DNA-Extraktion und Sequenzierung auf frisches Nährmedium überimpft. Aufgrund der geringen Koloniezahl in der Wasserprobe konnte keine cfu (colony forming units) bestimmt werden. Die fertig bearbeiteten Sequenzen wurden in einer spezifischen Datenbank (16S nucleotide dataset) mithilfe des Programmes BLAST in die biologische Systematik eingeordnet. Anhand der Sequenzierungsergebnisse der Reinisolate ist ersichtlich, dass das Haldenquellwasser eine geringe mikrobielle Diversität besitzt und sich ausschließlich aus halotoleranten, moderat halophilen und auch halophilen Mikroorganismen zusammensetzt.

Ein Großteil der halophilen Isolate ist der Abteilung γ-Proteobakterien zuzuordnen, ein physiologisch sehr diverses Reich innerhalb der Bakterien mit unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten. Neben aeroben Mikroorganismen wurden auch, basierend auf der geringen Sauerstoffkonzentration des Haldenwassers, fakultativ anaerobe als auch chemoorganotrophe Bakterien nachgewiesen. Im Vergleich dazu zeigten die mikrobiologischen Analysen der GWM 9 und 24 sowie der Quelle 1 und 10 des Untersuchungsgebietes abweichende Resultate. Bei keiner dieser beprobten Wässer wurden extremophile/halophile Mikroorganismen nachgewiesen (Abb. 1.2). Die Quelle 1, welche in diesem Fall am nächsten zur Halde lokalisiert ist, wies in diesen früheren Untersuchungen eine diverse bakterielle Gemeinschaft auf, während am Haldenfuß eine geringere Diversität sichtbar wurde. Vertreter der Proteobakterien und Firmicutes traten hier am häufigsten auf, wobei besonders *Bacillus* sp. und *Pseudomonas* sp. als dominant einzustufen waren. Auffällig bei dieser Probe war, dass einige Isolate als Pflanzenpathogene (z.B. *Erwinia* sp.) oder als im Darm lebende Enterobakterien wie *Serratia* sp. oder *Hafnia* sp. identifiziert wurden. Dies ist auf die Lage der Quelle zurückzuführen mit unmittelbarem Kontakt zur damals noch zum Probenahmezeitpunkt existenten Kuhweide und Fremdkolonisationen an der Vegetation. GWM 9, die im SGWL abgeteuft wurde, ergab eine geringe Anzahl isolierbarer Mikroorganismen, da die Wasserprobe extrem stark mit Schwebfracht (Buntsandstein) und allochthonen Material verunreinigt war und nicht der komplette Probensatz filtriert werden konnte. Der Nachweis von *Arthrobacter* sp. und *Streptomyces* sp. (Actinobacteria), welche ubiquitär in Böden vorkommen und auch nur an dieser Messstelle isoliert wurden, weist in diesem Fall auf einen oberflächennahen Einfluss hin.

Zwischen der Quelle 1 und GWM 9 befindet sich die GWM 24, welche im Kontakt mit dem HGWL steht. Hier wurde die höchste mikrobielle Diversität und eine Zellzahl von $1,7-6,2 \times 10^2$ cfu/ml

nachgewiesen. Im Allgemeinen wird in Grundwässern die Zellzahl auf 10^2 - 10^6 Zellen/cm³ definiert (Griebler und Lueders, 2009). Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft deutet auf eine charakteristische Grundwasserfauna hin, wobei ein Großteil der Isolate an das Leben in Habitaten mit leicht erhöhter Salzkonzentration angepasst ist – extrem salztolerante Arten wurden nicht nachgewiesen. Diese spezifische Grundwassermikrobiologie wurde bei keiner der anderen Proben

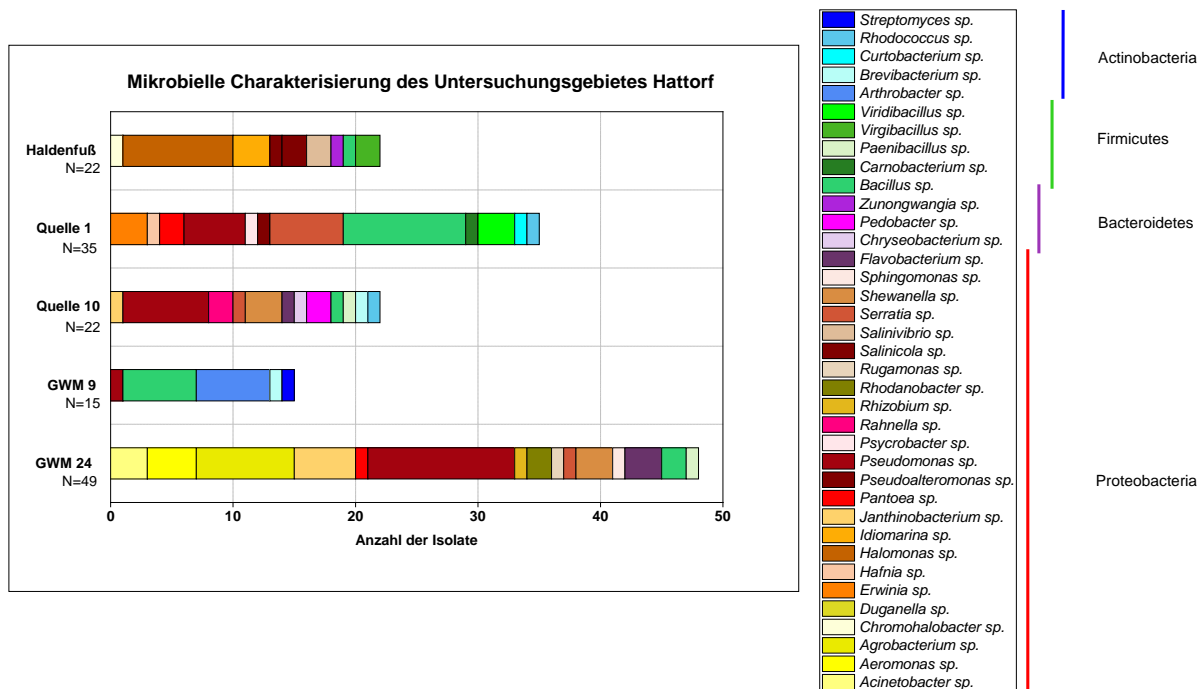


Abb. 1.2: Phylogenetische Analysen der Bakterien aus Messstellen im Untersuchungsgebiet Hattorf.

nachgewiesen. Der direkte Vergleich zwischen GWM 24 und GWM 9 zeigt beide unabhängig voneinander existenten GWL. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass die GWM 24 durch laterale Zuflüsse bzw. Zutritt von Wässern darüber liegender Aquifere beeinflusst wird. Ein Indiz hierfür ist das Vorkommen von *Agrobacterium* sp. (*Agrobacterium vitis*), eines im Boden lebenden, pflanzenpathogenen Bakteriums. Auch *Pantoea* sp. spricht für pflanzen-assoziierte Mikroben in dieser Probe. Südlich der Halde an Quelle 10 wurde eine höhere Zahl von Vertretern der Bacteroidetes neben den dominanten Proteobakterien (z.B. *Pseudomonas* sp.) gefunden, so dass diese Messstelle z.T. mit der Quelle 1 vergleichbar ist, jedoch keine mikrobielle Besonderheit aufweist.

Die im Abstrom des Haldenfußes nachgewiesene mikrobielle Gemeinschaft setzt sich ausschließlich aus halophilen bzw. halotoleranten Arten zusammen, welche in den anderen Wasserproben nicht nachgewiesen wurden. Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein bereits seit einiger Zeit stabiles System handelt, so dass sich eine angepasste Mikroflora einstellen konnte. Dagegen stehen für die anderen Probenahmestandorte, welche mikrobiologisch als höher divers einzustufen sind, externe Einflüsse im Vordergrund. Einen möglichen Einfluss der Mikroorganismen auf die Freisetzung von Schwermetallen konnte im Rahmen dieser Untersuchungskampagne nicht analysiert werden. Hierzu müssten weitere Untersuchungen an Bodenproben durchgeführt werden.

1.1 Wechselwirkungen zwischen Grundwasser und Gestein²

Die physikochemischen Parameter der an der Hattorf Halde entnommenen Grundwasserproben zeigen Temperaturen zwischen 14°C und 18°C (Tab. 1.1). Die Leitfähigkeiten variieren stark, mit der höchsten Leitfähigkeit bei GWM 9 mit 67100 µS/cm, die daher als Sole bezeichnet werden kann. Diese Probe wurde aus dem schwebenden Grundwassersleiter entnommen, der einen Einfluss der Hattorf Halde aufweist. Dagegen war GWM 37 mit 320 µS/cm nicht salzbelastet, ebenso wie der HGWL in GWM 24, die im Bereich eines süßen Grundwassers liegt. Der pH-Wert besitzt Einfluss auf die Löslichkeit von Stoffen und deren Ionen-Konzentration im Wasser. Eine Änderung des pH-Wertes in natürlichen Wässern wird überwiegend durch den Kohlensäuregehalt gesteuert. Nur relativ wenige Ionen sind über fast alle Stufen des pH-Wertes stabil. Vor allem sind das Na⁺, K⁺, NO₃⁻ aber auch Cl⁻ - Ionen. Bei Schwermetallen, Metallen im Allgemeinen und einigen Halbmetallen wird die Löslichkeit vorwiegend über den pH-Wert gesteuert. Der pH-Wert der GWM 24 befindet sich bei 7,13 und liegt damit fast im neutralen Bereich. Die GWM 37 weist einen Wert von 5,69 auf und die GWM 9 besitzt den niedrigsten Wert mit 4,29. Damit können diese beiden Grundwässer als leicht bis sauer angesprochen werden. Das Redoxpotential liegt in den Proben GWM 9 und GWM 37 bei über 500 mV (Tab. 1.2). Dagegen zeigt die GWM 24, mit 320 mV den geringsten Wert, aller untersuchten Grundwässer, auf. Vor allem die Löslichkeit von Eisen und Mangan ist entscheidend vom Redoxpotential abhängig. Allgemein kann bei einem Redoxpotential von über 400 mV von einem oxidierenden Milieu ausgegangen werden. Dies wäre in der GWM 9 und GWM 37 der Fall. Die Konzentrationen von gelöstem Sauerstoff in den Grundwasserproben GWM 9 und GWM 37 sind mit ca. 8 mg/L relativ hoch, dagegen weist die GWM 24 nur etwa 6 mg/L auf.

Die markante Zusammensetzung der drei Grundwässer der Halde Hattorf zeigen, dass die GWM 24 eine überwiegend sulfatische und die GWM 9 und die GWM 37 eine sulfatisch-chloridische Zusammensetzung zeigen. Die GWM 24 und GWM 37 liegen jedoch aufgrund ihrer Chemie näher beieinander, als die GWM 9 zur GWM 37 (Abb. 1.3). Hinsichtlich der Kationen und Anionen zählen die GWM 24 und GWM 37 zum Calcium-Typ und die GWM 9 eher zum Magnesium-reichen Grundwasser. Im Bereich der Anionen ähneln sich die GWM 9 und GWM 24 chemisch deutlich stärker, da beide Grundwässer zum Chlorid-Typ gezählt werden können.

Tab. 1.1: Im Gelände aufgenommene Parameter des Grundwassers der GWM 9, GWM 24 und GWM 37.

Datum der Probenahme	01.04.2014	21.05.2014	21.05.2014
Bemerkungen	pH Titration 7,58	leicht trüb	sehr trüb
Probenbezeichnung	Hattorf GWM 24	Hattorf GWM 9	Hattorf GWM 37
Temperatur [°C]	14,5	16,5	17,7
Leitfähigkeit [µS/cm]	1417	67100	320
pH-Wert	7,13	4,29	5,69
Redoxpotential [mV]	320	570	530
O ₂ [mg/l]	6,29	7,95	8,2
O ₂ [%]	65,8	81,6	87,7

² aus: Maren Bartsch, 2014, Bindung und Freisetzung von Radionukliden an und aus Gesteinen des Mittleren Buntsandsteins, Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena



Abb. 1.3: Darstellung der Hauptkationen und -anionen der Grundwasserproben GWM 9 (grün), GWM 24 (rot) und GWM 37 (blau) in dem Sammeldiagramm nach Schöller.

Dagegen gehört GWM 37 zum Sulfat-Typ. Neben Chlorid und Sulfat stellen auch Magnesium und Calcium wichtige Bestandteile dar, um die „Verwandtschaft“ der an der Halde Hattorf entnommenen Grundwasserproben abzuschätzen. Es zeigt sich, dass unabhängig von der Konzentration GWM 24 und GWM 37 chemisch bessere Korrelation zeigen, als dies bei GWM 9 der Fall ist. Vor allem die Calcium-Werte der GWM 9 zeigen, den deutlichen Unterschied dieser Grundwasserprobe zu GWM 24 und GWM 37 auf. Im Bereich der Anionen weisen jedoch auch GWM 24 und GWM 37 Unterschiede zueinander auf. Im Regelfall treten Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen und teils auch Mangan als Hauptkationen in den Grundwässern auf (Abb. 1.4 bis 1.8). Zu den Hauptanionen zählen meist Chlorid, Hydrogencarbonat, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat. Hiervon treten nur Chlorid, Sulfat, Magnesium, Natrium, Calcium und Schwefel in allen untersuchten Wässern als Hauptinhaltsstoffe, sprich mit einer Konzentration über 5 mg/L, auf. Auch Kalium tritt in der GWM 9 und GWM 24 als Hauptelement auf. Nur in der GWM 37 ist es mit 4,5 mg/L nicht als Haupt-, sondern als Begleitstoff zu bezeichnen. Die Elementgehalte der GWM 9 übersteigen diejenigen der GWM 24 und GWM 37 um ein Vielfaches. Die Konzentrationen von Bromid, Aluminium, Mangan, Silicium, dem gelösten, organisch gebundenen Kohlenstoff, Ammonium und Zink zeigen starke Unterschiede zwischen den Grundwässern. Strontium und Barium können für die drei Grundwässer als Begleitstoffe deklariert Phosphat zeigt mit 0,167 mg/L in GWM 24 die höchsten Konzentrationen.

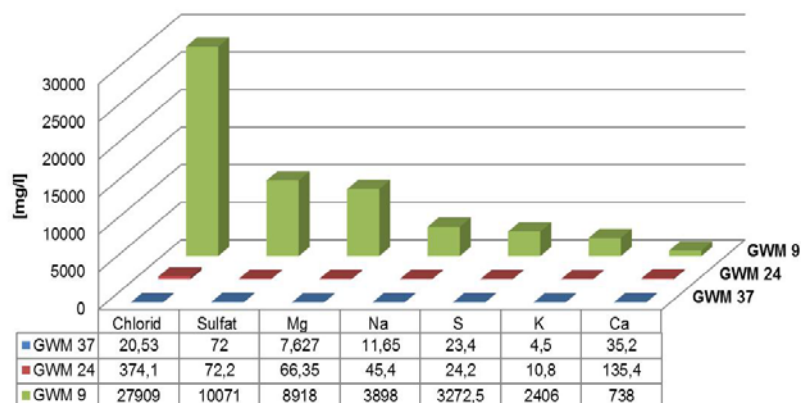


Abb. 1.4: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Chlorid, Sulfat, Magnesium, Natrium, Schwefel, Kalium und Calcium) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

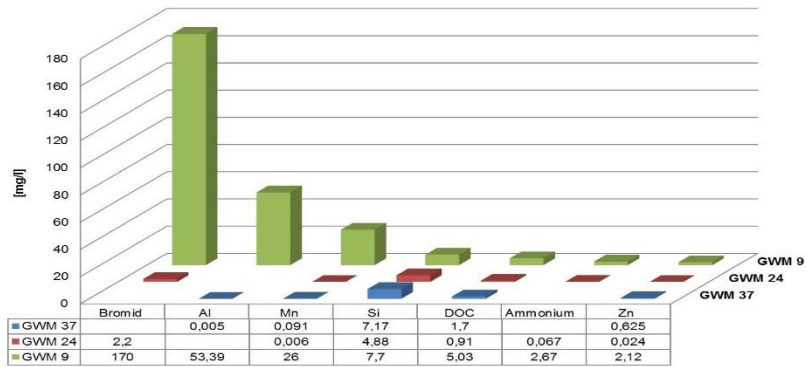


Abb. 1.5: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Bromid, Aluminium, Mangan, Silicium, gelöster organisch gebundener Kohlenstoff, Ammonium und Zink) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

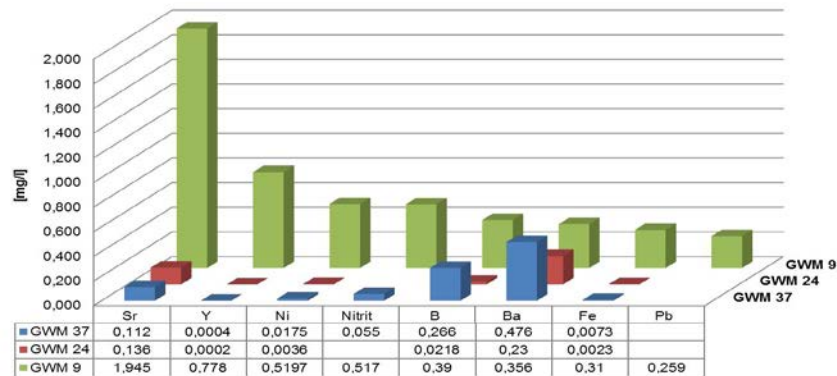


Abb. 1.6: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Strontium, Yttrium, Nickel, Nitrit, Bohr, Barium, Eisen und Blei) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

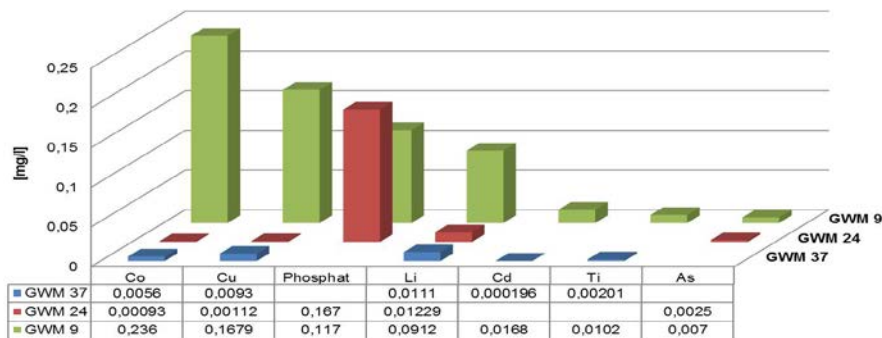


Abb. 1.7: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Cobalt, Kupfer, Phosphat, Lithium, Cadmium, Titan und Arsen) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

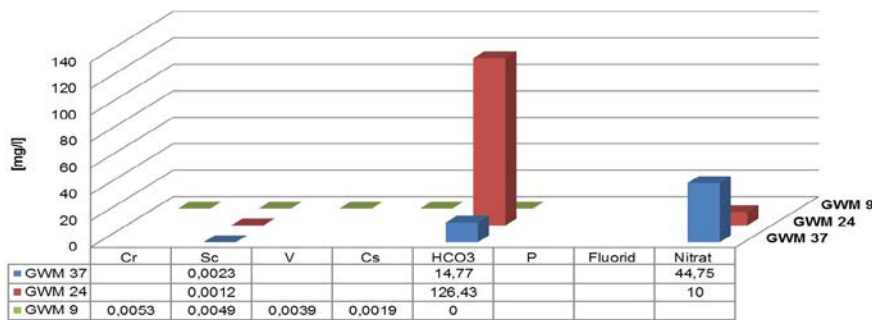


Abb. 1.8: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Chrom, Scandium, Vanadium, Caesium, Hydrogencarbonat, Phosphor, Fluorid, Nitrat) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommenen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde der Bohrkern der GWM 24 2012 HA in Südwestthüringen, in der Nähe des Dorfes Unterbreizbach am südlichen Rand der Rückstandshalde Hattdorf, analysiert. Es erfolgte die lithostratigraphische Aufnahme der von der Solling-Folge bis zur Volpriehausen-Wechselfolge abgeteufte Abfolge. Um zu klären, in welcher Formation Uran und Thorium am stärksten angereichert sind, wurden insgesamt 29 Gesteinsproben, in Form von Plugs, entnommen. Diese Plugs wurden dazu genutzt, um einerseits das Gesteinsmaterial für das Totalaufschlussverfahren aufzumahlen und andererseits, um von den gleichen Probenahmepunkten Dünnschliffe für die Durchlichtmikroskopie herzustellen. Dies sollte dazu dienen, die chemischen Daten mit dem Mineralbestand der Gesteine zu vergleichen und interpretieren zu können. Zu den weiteren Analysemethoden zählten die Elektronenstrahlmikrosonde, die LA-ICP-MS, aber auch die TC-Feststoffmessung.

Die Analyse der Gesteine der GWM 24/2012 mittels Totalaufschlussverfahren zeigt auf, dass sich die höchsten Uran- und Thorium-Konzentrationen im Bereich der Detfurth- und der Hardeggen-Wechselfolge befinden. Bereits die Untersuchungen von Barthel (1977) zeigen, dass im Buntsandstein teils höhere Uran-Gehalte ermittelt werden können. Hierbei handelt es sich jedoch meist um kleinräumige und sehr begrenzte Vorkommen. Beispielsweise im Burgsandstein des Keupers, zwischen Coburg und Nürnberg, konnten zwei Arten der Anreicherung des Urans ermittelt werden. Hierbei zeigen die Aktivarkosen erhöhte Uran-Konzentrationen vor allem in den apatitischen und den eisenoxidischen Bindemitteln. Dagegen weisen die dolomitischen Arkosen Uran meist in den karbonatischen Bindemitteln auf. Im Fall der GWM 24 2012 HA konnte nur in der Volpriehausen-Wechselfolge karbonatisches Bindemittel erkannt werden und die Uran-Gehalte liegen in dieser Schicht unter 1 µg/g. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhten Uran-Gehalte des Bohrkerns der GWM 24/2012 auf die karbonatischen Zemente zurückzuführen sind. Weitere Vorkommen von Uran in Sandsteinen konnten im Raum Murgtal-Baden-Baden/ Nordschwarzwald durch Ertle *et al.* (1977) ermittelt werden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht nur um Sedimente des Buntsandsteins, sondern vor allem um Ablagerungen des Rotliegenden und des Oberkarbons, welche in einer schmalen Senke zusammen auftreten (Barthel 1977). Es wurde erkannt, dass der Hauptanteil des Urans in diesen Gesteinen sowohl in den Glimmer-reichen, tonigen Lagen zwischen den Sandsteinen, aber auch in den Arkosen und Tonsteinen zu finden ist.

In den Gesteinen der GWM 24 2012 HA konnte mit Hilfe der Dünnschliffanalysen festgestellt werden, dass es sich bei den Proben, die einen höheren Uran- und Thorium-Gehalt zeigen, um Ton- bis Feinsandsteine mit einem untergeordneten Mittelsandanteil handelt. Dieses Ergebnis würde mit den Angaben von Ertle *et al.* (1977) und Barthel (1977) übereinstimmen. Auch konnte nachgewiesen werden, dass fast alle Schliffe mit erhöhtem Uran- und Thorium-Konzentrationen, Eisenoxid-Kutane, Apatite, aber auch Biotit und Muskovit als Glimmer enthalten. Dies lässt vermuten, dass die Hauptführung des Urans und Thoriums, wie auch in der Zusammenstellung von Barthel (1977), vor allem an diesen mineralischen Phasen gebunden ist. Um diese Annahme zu unterstützen, wurde eine Korrelationsmatrix (siehe Bartsch, 2014) der Analyse-Daten der Totalaufschlüsse erstellt. Hierbei ist festzustellen, dass vor allem Phosphor, Titan, die Seltenen Erden, Eisen und Arsen mit den Konzentrationen von Uran und Thorium einen positiven Zusammenhang erkennen lassen. Ausgeschlossen werden konnte, dass die Hauptkonzentrationen von Uran und Thorium in diesem Fall an organischem Material in den Gesteinen gebunden sind.

Vor allem die Korrelation mit Phosphor kann hierbei auf eine Anreicherung des Urans und Thoriums in den Apatiten hindeuten. Der Zusammenhang mit Titan lässt auf eine Anreicherung der Radionuklide in den Titaniten oder Rutilen der GWM 24 2012 HA schließen, da verstärkt diese titanhaltigen

Schwerminerale in den Dünnschliffen lokalisiert werden konnten. Weiterhin könnte die stark positive Korrelation von Uran und Thorium mit den Seltenen Erden, eine Anreicherung der beiden Elemente in dem tonigen Bindemittel und/oder den Schwermineralen bestätigen, da die Seltenen Erden nach Stosch (2000) verstärkt in die verschiedenen Schwerminerale und in das tonige Bindemittel der Sandsteine eingebaut sind. Auch die leicht positive Korrelation mit Eisen lässt vermuten, dass die Gehalte von Uran und Thorium entweder an den Eisenoxid-Kutanen oder andere eisenreichen Mineralen, wie dem Biotit oder einigen Schwermineralen gebunden sind. Allgemein kann gesagt werden, dass in den Gesteinen der GWM 24 2012 HA die Schwerminerale den größten Einfluss auf die Uran- und Thorium-Konzentrationen besitzen, jedoch steuern auch der Biotit, die Eisenoxid-Kutane und das tonige Bindemittel die Uran-Gehalte des Mittleren Buntsandsteins.

1.1.1 Uran- und Thorium-Gehalte der Grundwasserproben an der Halde Hattorf

Für die Beantwortung der Frage, ob Uran und Thorium aus den Gesteinen in die Wasserphase freigesetzt werden können, wurden drei Grundwasserproben am gleichen Standort der Bohrung, Nähe der Halde Hattorf, entnommen. Die Konzentrationen von Uran und Thorium in den Grundwässern der Halde Hattorf sind gering (Abb. 1.9). Hohe Uran-Gehalte korrelieren mit niedrigen Hydrogencarbonat- und Phosphat-Gehalten.

Die Analysen der Grundwässer zeigten nur geringe Gehalte an Uran und nur in einer Probe konnte Thorium nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Uran und Thorium, welche größtenteils in den Schwermineralen lokalisiert sind, nicht von dort in die Wasserphase übergehen. In den Grundwässern an der Hattorf Halde ist im Besonderen das Freisetzen des Urans aus den Tonlagen und Tonsteinen der Hardeggen- und Detfurth-Formation der wichtigste Einflussfaktor. Aus den verwitterungsbeständigen Schwermineralen gelangt vermutlich kein Uran und Thorium in die Wasserphase. Auch aus den Eisenoxid-Kutanen kann Uran und Thorium in das Grundwasser gelangen, jedoch kann wiederum nicht quantifiziert werden, in welchem Ausmaß dies an der Halde Hattorf der Fall ist.

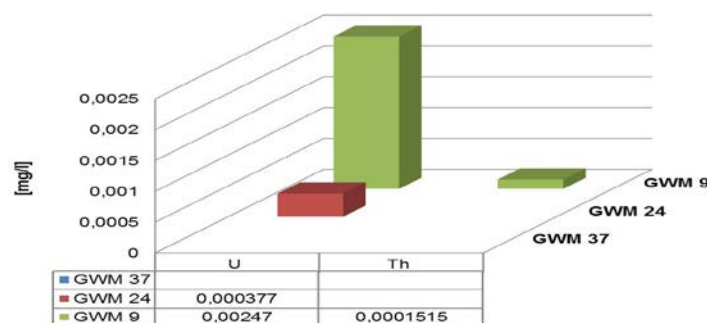


Abb. 1.9: Konzentrationen der gelösten Inhaltsstoffe (Uran, Thorium) in den drei Grundwasserproben, welche in der näheren Umgebung der Halde Hattorf entnommen wurden. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

Eine Besonderheit stellt die GWM 9 dar, welche eine Beeinflussung durch mineralisierte Wässer der Halde zeigt und zugleich die höchsten Konzentrationen an Uran und Thorium aufweist. Es lässt sich daher vermuten, dass die geringen Anteile an Tonbestandteilen in den Kalisalzlagen bzw. bestimmte Tonlagen im Buntsandstein einen Teil des Urans in der GWM 9 bedingen.

Insgesamt sind die Gehalte an Uran und anderen Radionukliden im Falle der Rückstandshalde Haattdorf sehr gering. Durch weitere Grundwasserproben könnten bessere Schlüsse darüber gezogen werden, welchen Einfluss die Sand- und Tonsteine auf die Gehalte von Uran und Thorium im Wasser zeigen und welchen Einfluss die Halde besitzt. Mittels eines größeren Probenspektrums könnten auch verlässlichere Daten darüber gewonnen werden, welche Faktoren auf die Uran- und Thorium-Mobilität in den Grundwässern der Halde Hattorf den stärksten Einfluss besitzen. Mit Hilfe von anderen, in dieser Arbeit nicht genutzter Analytik-Verfahren, können eventuell auch in den niedrig konzentrierten Grundwässern, wie der GWM 37, Uran- und Thorium-Konzentrationen bestimmt werden.

Durch Friedmann *et al.* (2007) wurden 1.566 Grundwasserproben in Bayern beprobt und untersucht. Hierbei zeigten 81,5% der Grundwässer Uran-Gehalte, die sich unterhalb von 5 µg/L befinden. Allgemein typische Konzentrationen für bundesdeutsche Grundwässer befinden sich

in dem Bereich von etwa 0,4 bis 2,4 µg/L. In etwa diesem Bereich bewegen sich auch die Analyseergebnisse der an der Halde Hattorf entnommenen Wässer. Die GWM 24 2012 HA weist eine Konzentration von 0,377 µg/L auf und liegt damit etwas unterhalb des bundesweiten Durchschnitts für Uran in Grundwässern. Die GWM 9 zeigt eine Konzentration von 2,47 µg/l und weist damit einen durchschnittlichen Uran-Gehalt auf. Ludwig und Berthold (2010) zeigen in ihrer Arbeit typische Uran-Gehalte für hessische Grundwässer. Hierbei betrachten sie besonders die Eh-pH-Bedingungen für ein U-O-H₂O-CO₂-System nach Langmuir (1978). Auch für die Wasseranalysen der Halde Hattorf wurden die Uran-Stabilitätsfelder nach Langmuir (1978) dargestellt (Abb. 1.10). Auch die GWM 37 wurde dargestellt, obwohl in diesem Wasser Uran nicht nachgewiesen werden konnte. Hierbei fällt auf, dass in der GWM 9 und GWM 24 nach den Eh-pH-Bedingungen jeweils andere Uran-Komplexe zu erwarten sind. Jedoch bezieht sich dieses Diagramm nur auf das U-O-H₂O-CO₂-System und umfasst nicht alle in der Natur möglichen Uran-Komplexe. Auch wurden diese Stabilitätsfelder im Labor entwickelt und geben daher nicht das mögliche Spektrum der verschiedenen natürlichen Einflüsse wider.

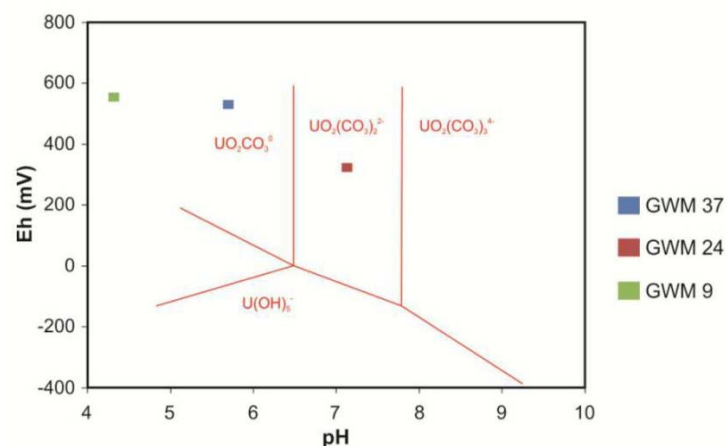


Abb. 1.10: Urankonzentrationen in den Grundwasserproben der Halde Hattorf in Abhängigkeit des Redoxpotentials und des pH-Wertes. (grün = GWM 9, rot = GWM 24, blau = GWM 37).

Nach Ludwig und Berthold (2010) treten hohe Uran-Konzentrationen in den von ihnen untersuchten hessischen Grundwässern vorwiegend in Calcit-gesättigten bzw. übersättigten Wässern auf. Dagegen zeigten Calcit-untersättigte Proben deutlich geringere Gehalte. Sowohl in der GWM 9, als auch in der GWM 24 gehört Calcium zu den Hauptinhaltsstoffen. Jedoch konnte in der GWM 9 kein Hydrogenkarbonat ermittelt werden. Dies liegt vor allem an dem sauren pH-Wert von 4,29, was vermuten lässt, dass das Grundwasser der GWM 9 Calcit-untersättigt ist. Dagegen weist die GWM 24 mit einem fast neutralen pH-Wert eher eine Calcit-Sättigung auf. Allgemein kann gesagt werden, dass die Uran- und Thorium-Gehalte jedoch immer ein Charakteristikum der regional begrenzten hydrogeologischen Randbedingungen sind. Es ist nicht ganz klar, warum die GWM 9 und die GWM 37 einen niedrigen pH-Wert aufzeigen. Auch kann nicht abgegrenzt werden, ob die niedrigen pH-Werte auf einen Einfluss der Halde zurückzuführen sind oder ob dieser pH-Wert durch die Gesteine des Mittleren Buntsandsteins im Untergrund bedingt wird. Wie bereits in den Ergebnissen der Elektronenstrahlmikrosonde gezeigt, gibt es Mineralphasen, die Schwefel enthalten (Bartsch, 2014). Diese Verbindungen könnten den pH-Wert teils stark beeinflussen. Es konnten zwar in jeder der untersuchten Proben an der Elektronenstrahlmikrosonde Verbindungen mit Schwefel lokalisiert werden, jedoch handelt es sich bei der Mineralphase in der GWM 24/2012 HA-12 (54,40 m) der Detfurth-Wechselfolge wahrscheinlich um Baryt, welches nur sehr schwer löslich ist. In der Bohrkernprobe 24/2012 HA-5 (13,74 m) und GWM 24/2012 HA-8 (26,23 m) der Hardeggen-Wechselfolgen konnten dagegen andere Schwefel-Verbindungen mit Silicium, Kalium und Aluminium ermittelt werden. Wenn diese Mineralphasen in höherer Anzahl in den Sand- und Tonsteinen vertreten sind, könnten diese einen Einfluss auf den schwebenden Grundwasserleiter besitzen und diese niedrigen pH-Werte verursachen.

Das bedeutet, dass aus der Kristallstruktur, beispielsweise des Apatits, Uran und Thorium nicht herausgelöst werden. Nur wenn das sechswertige Uran an den Kristalloberflächen adsorptiv gebunden ist, kann es von dort in die Wasserphase gelangen (Füchtbauer *et al.* 1988). Dieses Grundwasser ist vor allem durch die stark mineralisierten Wässer der Halde Hattorf beeinflusst, da diese Messstelle im direkten Zustrom der Halde liegt. Der schwebende Grundwasserleiter ist auf der

gesamten Hochfläche, auf der auch die Halde Hattorf liegt, ausgebildet (Barnasch und Beer 2012). Demnach befindet sich das Grundwasserneubildungsgebiet des schwebenden Grundwasserleiters südwestlich der Rückstandshalde im Bereich Stöckig-Ruppertshöhe. In dem Wasser der GWM 24 konnte in nur sehr geringen Mengen Uran festgestellt werden. Dieses Wasser stammt aus dem unbeeinflussten Hauptgrundwasserleiter und ist damit hauptsächlich geogen durch die Gesteine im Einzugsgebiet gekennzeichnet.

In den Buntsandsteinen des Mitteldeutschen Bruchschollenlandes zeigen die Untersuchungen von Ludwig und Berthold (2010) fast ausschließlich erhöhte Uran-Konzentrationen im Mittleren Buntsandstein Nordhessens. Mögliche Quellen für die Erhöhungen stellen demnach die Ton- und Tonsteinhorizonte der Oberen Hardegsen-Formation dar. Bei dem Kontakt des Gesteins mit dem Grundwasser entlang von Klüften kann das Uran unter idealen Eh-pH-Bedingungen aus den Tonen gelöst werden und in die Wasserphase übergehen. Dies könnte ein bestimmender Faktor sein, warum die Konzentration von Uran und Thorium in der GWM 9 in der Nähe der Halde Hattorf, die aus dem schwebenden Grundwasserleiter stammt, höher ist, als in dem Grundwasser des Hauptgrundwasserleiters. Der schwebende Grundwasserleiter ist in der stärker uranhaltigen Hardegsen-Formation ausgebildet. Wohingegen der Hauptgrundwasserleiter vor allem einen Einfluss durch die Volpriehausen-Wechselfolge aufweist. Jedoch kann dies nicht der einzig bestimmende Faktor der höheren Konzentrationen in dem Grundwasser der GWM 9 darstellen, da auch die GWM 37 in der Nachbarschaft eine Probe des schwebenden Grundwasserleiters darstellt. Die GWM 37 reicht nur bis in einer Teufe von 20,90 m u. GOK und stellt nur einen Ausbiss des schwebenden Grundwassers dar. Daher ist es möglich, dass das Grundwasser der GWM 37 nicht im direkten Kontakt zu den uranhaltigen Tonen und Tonsteinen der Hardegsen-Formation steht.

Nach Brassler *et al.* (1998) finden sich Uran-Anreicherungen bei der Entstehung von Evaporiten, wobei es in den Restlaugen der Gips- und Salzabscheidung angereichert wird. Da die GWM 9 eine starke Beeinflussung durch die Halde Hattorf aufweist und auf dieser Halde die Rückstände der Kalisalzproduktion abgelagert werden, ist zu vermuten, dass ein Teil des gelösten Urans aus diesen Produktionsrückständen stammt. Um diese These zu prüfen, müssten die Produktionsrückstände gesondert betrachtet und auf deren Uran- und Thorium-Gehalt untersucht werden. Wasser der GWM 9 weist sehr wahrscheinlich keine Beeinflussung durch phosphorhaltige Düngemittel auf, da der schwebende Grundwasserleiter nur im Gebiet der Halde Hattorf ausgebildet ist und hier keine intensive Landwirtschaft zu erkennen ist. Thorium ist im Grundwasser weitestgehend immobil und zeigt daher nur geringe Konzentrationen in der GWM 9 und konnte in der GWM 24 und GWM 37 gar nicht ermittelt werden. Diese Immobilität des Thoriums, im Gegensatz zum Uran, ist dadurch begründet, dass Thorium keine sechswertige, mobile Oxidationsstufe wie Uran ausbildet (Rose & Wright 1980). Wird Thorium in seiner vierwertigen Form aus dem Gestein gelöst, neigt es eher dazu auszufallen oder beispielsweise an Oberflächen zu adsorbieren (Kimberley 1978). Das bedeutet, selbst wenn Thorium im Wasser enthalten ist, bleibt es meist nur innerhalb von kurzen Entfernungen in Lösung (Kimberley 1978). Mit dieser Eigenschaft könnte auch erklärt werden, warum Thorium stärker, in dem weißen Bereich der Bohrkernprobe GWM 24/2012 HA-9 (28,83 m), welche nochmals getrennt in rot und weiß analysiert wurde, abgereichert ist, als das Uran. Thorium geht, im Gegensatz zu dem Uran, meist nur kurz in Lösung und adsorbiert dann an Oberflächen, wie den Eisenoxid-Kutanen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anreicherung von Uran und Thorium in den Gesteinen des Mittleren Buntsandsteins in der Bohrung GWM 24 2012 HA primär mineralisch geprägt ist. Hierbei sind vor allem die Schwerminerale Apatit, Zirkon, Titanit und Rutil die wichtigsten Träger dieser Elemente. Weiterhin haben auch die Tonlagen und Tonsteine, besonders der Hardegsen- und auch der Detfurth-Formation, Einfluss auf die Konzentration der Radionuklide. Als letzten Einflussfaktor auf die Gehalte von Uran und Thorium in den Gesteinen können die Eisenoxid-Kutane genannt werden. Wobei nicht genau abgeschätzt werden kann, in welchem Umfang diese die Konzentration von Uran und Thorium beeinflussen.

1.1.2 Seltene Erdelemente der Grundwasserproben an der Halde Hattorf

In den drei an der Halde Hattorf entnommenen Grundwässern stellen die Seltenen Erden (SEE) Spureninhaltsstoffe dar (Abb. 1.11). Die Gehalte an SEE der GWM 24 und GWM 37 konnten nicht direkt gemessen werden, da die Konzentrationen zu gering waren. Zu diesem Zweck wurden die Grundwässer der GWM 24 und GWM 37 erst angereichert, bevor die Gruppe der Lanthanoide gemessen werden konnte. Das Grundwasser der GWM 9 konnte direkt gemessen werden und musste nicht angereichert werden. Alle Muster der Grundwasserproben zeigen eine leichte Abreicherung der

leichten Seltenen-Erdelemente (LSEE). Das Yb_{norm}/Gd_{norm} Verhältnis zeigt, in allen Proben einen Wert unter eins, damit sind die schweren Seltenen Erd-Elemente (SSEE) im Vergleich zu den mittleren Seltenen-Erdelementen (MSEE) abgereichert. Dies ist auch in der Abb. 1.11 deutlich erkennbar. Die stärkste Abreicherung weist hierbei die GWM 37 auf, die schwächste Abreicherung besitzt die GWM 9. Alle Grundwasserproben zeigen eine negative Cer-Anomalie, da die Ce/Ce*-Werte unter eins liegen, jedoch ist dies bei der GWM 9 nur sehr undeutlich erkennbar, da diese die kleinste negative Cer-Anomalie aufweist. Die größte negative Ce-Anomalie zeigt die GWM 24. Die Eu/Eu*-Werte liegen in allen Proben über 0,95, jedoch zeigt nur die GWM 37 ein Eu/Eu*-Werte von über 1,05. Somit kann nur bei der GWM 37, wirklich von einer schwachen, positiven Eu-Anomalie gesprochen werden.

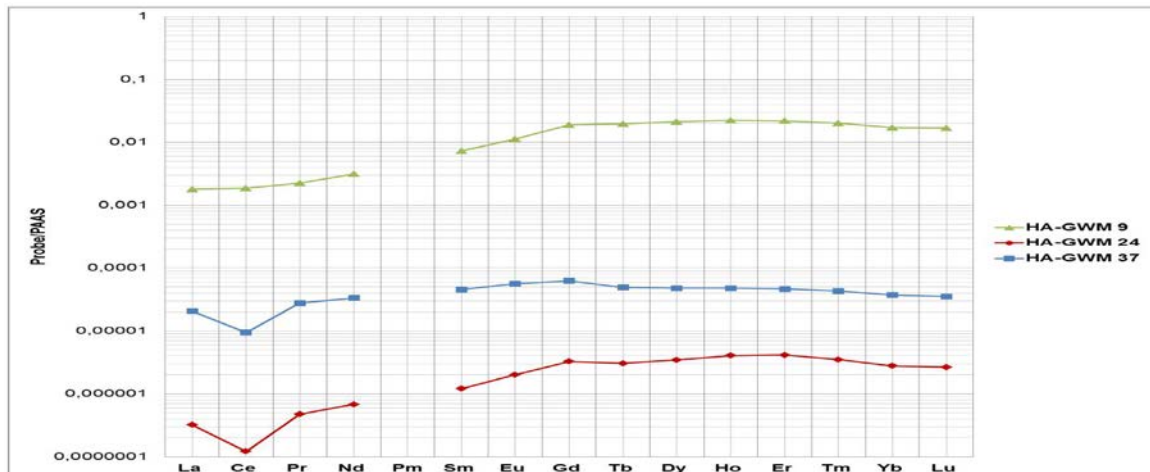


Abb. 1.11: Dieses Diagramm zeigt die Muster der Seltenen Erdelemente der drei untersuchten Grundwässer GWM 9 (grün), GWM 24 (rot) und GWM 37 (blau).

1.2 Untersuchung möglicher anthropogener Salzbelastung³

Um mögliche anthropogene Beeinflussungen der hydrogeologischen Bedingungen in den Gebieten des Kalibergbaus in der Werra-Region zu bestimmen, wurde im Gebiet um Großensee an der thüringisch-hessischen Grenze eine hydrogeologische Kartierung durchgeführt. Verschiedene Quellen aus diesem Gebiet sowie stark kontaminierte Quellen in Thüringen südöstlich der K+S Rückstandshalde Hattorf wurden hydrogeochemisch beprobt. Die Quellen nahe der Halde wurden außerdem mikrobiologisch untersucht, um den Einfluss hoher anthropogener Salzbelastungen auf die Diversität der mikrobiologischen Gemeinschaften in Grundwässern zu untersuchen. Zudem wurden bei diesen Quellen erhöhte Konzentrationen an Schwermetallen nachgewiesen, die ebenfalls zu Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft führen können. Dabei wurden aus beiden Quellen circa 100 Mikroorganismen isoliert, wobei die häufigsten Gattungen *Bacillus* sp. und *Pseudomonas* sp. waren. Die Grenzregion zwischen Thüringen und Hessen an der Werra ist stark geprägt von dem dort stattfindenden Kalisalzabbau zur Düngemittelherstellung. Schon vor 1900 wurde begonnen die Lagerstätten dort zu erforschen und Bergwerke zu errichten. Um 1920 erlebte das Revier einen großen Aufschwung, mit der Entstehung immer größerer Konkurrenten auf dem Weltmarkt um 1960 stellten viele ansässige Firmen den Kalibergbau ein oder schlossen sich mit der Zeit zu der heute noch produzierenden K+S AG zusammen.

Mit der Verarbeitung der geförderten Salze entstand viel salzhaltige Lauge. Diese wurde zuerst komplett in die umliegenden Flüsse Werra und Fulda eingeleitet. Dies beeinträchtigte die anderweitige Nutzung des Flusswassers so stark, dass schon 1913 eine Kaliabwässerkommission für die beiden Flüsse eingerichtet wurde. Da nun nur noch limitiert in die Flüsse eingeleitet werden durfte, wurde nach anderen Wegen der Laugenentsorgung gesucht. Um 1925 wurden deshalb zum ersten Mal Kaliabwässer in Merkers erfolgreich in den Plattendolomit versenkt.

³ aus: Sonja Hellwig, 2017, Hydrogeologische Kartierung der TK 10 5025-SO Großensee und hydrogeologische sowie mikrobiologische Charakterisierung salzbeeinflusster Quellen der Werra-Region, Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Versenkungsbrunnen wurden daraufhin innerhalb von fünf Jahren in allen ansässigen Kaliwerken eingeführt. Die eingeleiteten Wässer verdrängten mit zunehmender Menge jedoch zuerst das salzhaltige Wasser des Plattendolomits, um dann selbst in die grundwasserführende Schichten einzudringen, was in den 50er Jahren zu einer weitflächigen Versalzung des Grundwassers und einem Grundwasserspiegelanstieg führte. Mit neuen Verfahren zur Verarbeitung konnten die anfallenden Abwässer verringert werden. Stattdessen fielen dadurch feste Salzabfälle an, welche in der Region zu großen Halden aufgeschüttet wurden. Diese können jedoch bei ungenügender Sicherung das Grundwasser ebenfalls durch Lösung der festen Salze durch Niederschlag kontaminieren.

1.2.1 Laugenversenkung

Durch das Gebiet TK-10 5025-SO Großensee westlich der Werra zieht sich in zwei Ausbuchtungen die thüringisch-hessische Grenze. In Thüringen liegt hier der Ort Großensee. Um Großensee herum sind in Hessen die Orte Kleinensee, Hönebach, Raßdorf und Bosserode verteilt. All diese Ortschaften befinden sich innerhalb einer Mulde, welche sowohl in den Schichten als auch topographisch ausgeprägt ist, zwischen dem Richelsdorfer Gebirge im Norden und dem Säulingswald im Süden, welche ebenfalls den Großteil der Gewässer auf der Karte beinhaltet. In der Mulde bilden Flussablagerungen aus Lehm oder Schotter große Flächen aus, während im Säulingswald der Untere Buntsandstein an den Hängen ansteht und der Mittlere Buntsandstein ein zusammenhängendes Plateau bildet. Westlich von Hönebach liegt die Einzugsgebietsgrenze zwischen Werra und Fulda, sodass die meisten auf der Karte vorhandenen Bäche nach Osten in Richtung Werra abfließen (Moesta, 1876).

In der südöstlichen Ecke des kartierten Gebiets liegt eine Halde der Firma K+S des Standorts Wintershall bei Heringen. Ebenfalls von diesem K+S Standort aus wurden mehrere Versenkungsbrunnen im Gebiet um Kleinensee betrieben, von welchen manche noch aktiv sind (Abb. 1.12).

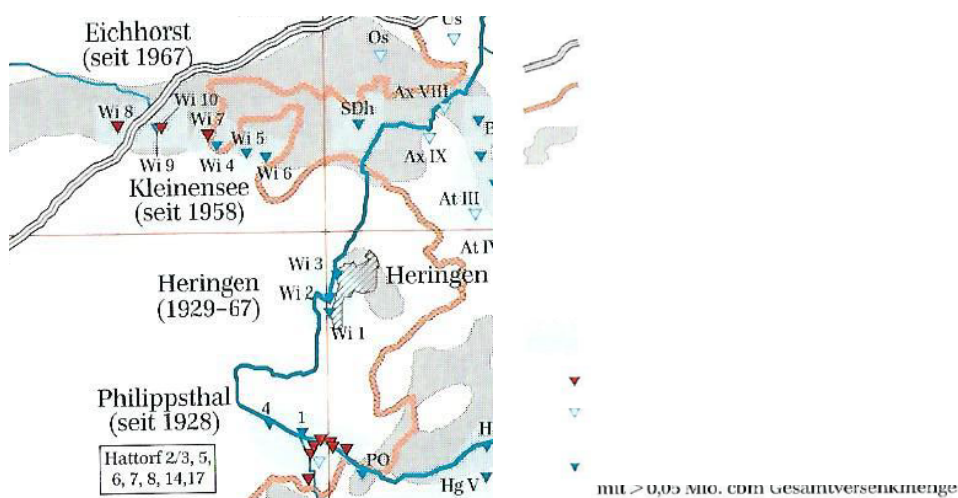


Abb. 1.12: Ausschnitt aus der Karte "Lage der Versenkgebiete und Versenkbohrungen" (Skowronek et al., 1999). Für die mikrobiologische Untersuchung wurden zwei von der Salzhalde des K+S Werks Hattorf bei Philippsthal kontaminierte Salzquellen ausgesucht.

1.2.2 Hydrogeologische Kartierung

Die beiden größten Bäche auf der Karte mit der höchsten Durchflussrate fließen von West nach Ost (Suhlbach) und von Nord nach Ost (Suhl) in der oberen Kartenhälfte im Suhlbach zusammen. Ebenfalls in der oberen Kartenhälfte gibt es noch mehrere vom Hauptsystem abgetrennte Bäche, meist mit nur sehr geringem Durchfluss. In der unteren Kartenhälfte fließt nur ein kleiner Bach nach Süden ab.

Am östlichen Kartenrand südlich des Suhlbachs in den Feldern liegt der Riethgraben. In der TK 10 ist dieser durchgehend gestrichelt, also als nicht ständig wasserführend, gekennzeichnet. Vorgefunden

wurde ein mit sehr wenig Durchfluss fließender Bach mit Leitfähigkeiten um die 2 mS/cm, welcher aus der Karte in ein angrenzendes Naturschutzgebiet fließt. Der Bachabschnitt parallel zum Feldweg wird aus einem von Südosten zufließenden Feldgraben und einem Rohrzufluss aus Süden kommend direkt bei Beginn des parallelen Abschnitts gespeist. Für diesen Feldgraben wurde keine Quelle gefunden. Vor diesen zwei Zuflüssen ist der Graben neben dem Feldweg, bis auf ein paar Pfützen direkt nach den Zuflüssen, trocken, und zeigt auch keine Spuren für gelegentliches Fließen von Wasser. Die Leitfähigkeit nimmt in Fließrichtung geringfügig ab, was an den relativ häufig vorkommenden fließenden Zuflussrohren liegen kann, welche meist eine etwas kleinere Leitfähigkeit hatten als der Bach davor. Kurz vor dem Naturschutzgebiet fängt südöstlich des Baches ein weiterer kleiner Zufluss in dieses an. Dieser Zufluss kommt aus einem kleinen See und hat eine etwas höhere Leitfähigkeit als der Bach. Im Feld nordwestlich des Bachverlaufs befindet sich eine nur spärlich bewachsene Fläche, wahrscheinlich bedingt durch dort stehendes Wasser.

Ebenfalls am östlichen Kartenrand, diesmal nördlich des Suhlbachs entspringt in einem Feldgraben ein kleiner Bach. Die Quelle mit dem meisten Durchfluss liegt in der Mitte des Feldes, wodurch der Feldgraben davor kaum Durchfluss zeigt und vor der Straße trocken wird. Die Leitfähigkeit ab der Quelle beträgt konstant 400 μ S/cm. Der Bach macht am Ende des Feldes einen scharfen Knick und fließt neben dem Weg weiter. In dieser Biegung fließt wenig Wasser aus einem Totarm zu. In einer weiteren Biegung fließt der Bach aus dem Kartenbereich heraus in einen See des Naturschutzgebiets Dankmarshäuser Rhäden.

Die drei Bachverläufe um Bosserode in der nordöstlichen Ecke der Karte zeigen einen höheren Durchfluss als die meisten anderen kleineren Systeme. Der Zufluss in Bosserode hinein kommt aus dem Norden und fließt in der Stadtmitte für eine lange Strecke unterirdisch weiter. Wahrscheinlich geht der Zufluss in dem direkt nach Osten aus dem Dorf fließenden Bach weiter, da beide eine Leitfähigkeit von konstant circa 710 μ S/cm besitzen. Unklar ist, ob der südlich unter Bosserode aus einem Rohr kommende Bach mit konstant circa 650 μ S/cm ebenfalls von unter Bosserode kommt, oder beispielsweise ein Bahnabfluss ist. In Bosserode selbst wurden weniger oberflächlich sichtbare Zuflussrohre, trocken oder wasserführend, pro Fließweg als in den anderen Dörfern kartiert, was allerdings durch die lange unterirdische Strecke nicht den Tatsachen entsprechen muss.

Am Westlichen Rand der Karte südlich der Bahnstrecke fließt ein Bach in Richtung Westen ab. Dessen zwei Bachzuflüsse beginnen beide an Rohren, welche von unter der Autobahn kommen. Der direkt von Süden kommende Bach beginnt mit einer Leitfähigkeit von unter 500 μ S/cm, welche durch einen Zufluss aus einem See auf über 700 μ S/cm ansteigt. Danach fließt er durch eine größere Nasswiese, welche die Leitfähigkeit nicht beeinflusst. Der andere Bach, welcher kaum Durchfluss zeigt, beginnt direkt nach dem Rohraustritt mit 4,5 mS/cm und fällt dann bis zum Zusammenfluss mit dem anderen Bach auf 1 mS/cm ab. Dieser Abfall ist über die gesamte Länge messbar, mit großen Wertesprüngen teilweise im Abstand von wenigen Metern. Die beiden Bäche fließen wahrscheinlich auf einem Privatgrundstück in einem Tümpel zusammen. Danach wird der Bach in einen Kanal direkt neben der Bahnstrecke geleitet. Die Leitfähigkeit nimmt im Bachverlauf von circa 770 μ S/cm zu circa 570 μ S/cm ab. An dem steilen Hang neben dem Bachbett wurde eine diffus austretende Quelle mit einer Leitfähigkeit von 221 μ S/cm kartiert, ebenso konnte beobachtet werden, dass Wasser von unter dem Hang durch die Kanalplatten zufließt. Dies lässt den Schluss zu, dass Wasser geringerer Leitfähigkeit aus dem Hang kontinuierlich das ursprüngliche Bachwasser verdünnt.

In der nordwestlichen Ecke der Karte fließen zwei Bäche geringeren Durchflusses aus höher gelegenen Terrain in ein kleines Tal nach Westen ab. Der am westlichen Kartenrand gelegene Bach fließt am westlichen Rand der Wiese im Tal, teilt sich allerdings zweimal, wodurch Nasswiesen im Tal entstehen. Der Bach verlässt danach sein Bachbett und versickert in der Nasswiese. Aus dieser bilden viele kleine Austritte, welche in der Karte als Quellen dargestellt sind, einen neuen Bach im Weggraben, welcher nach Westen einigen Tümpeln zufließt. Die Leitfähigkeit des Baches ändert sich leicht, steigt aber nicht über 180 μ S/cm. Der andere Bach beginnt, wie der erste Bach auch, außerhalb der Karte. Er fließt neben einem Weg, ebenfalls in einem größeren waldfreien Tal. Im obersten kartierten Bereich dieses Baches wurde eine am Hang gelegene Quelle kartiert. Die auf der Karte sichtbaren Zuflüsse aus kleineren Seitentälern bestehen aus kleineren Hangaustritten mit kaum Durchfluss, und fließen dem Bach auch nicht zu. Im Tal selbst liegen nur zwei kleinere Nasswiesen, wovon eine als alternativer Fließweg des Baches außerhalb des Bachbetts existiert. Bei der Wegänderung nach Westen fließt aus einer Nasswiese Wasser mit einer Leitfähigkeit von 770 μ S/cm, wahrscheinlich aus einem nicht gefundenen Austritt innerhalb dieser, zu. Dieser erhöht die Leitfähigkeit des Baches von um 150 μ S/cm vor dem Zufluss auf um die 230 μ S/cm. Außer diesem Zufluss ist in östlicher Richtung nur noch, getrennt durch lange trockene Strecken im Feldgraben, mehrere Pfützen, gespeist von einem Rohrzufluss, mit Leitfähigkeiten von 3 mS/cm. Der Bach fließt

danach in westlicher Richtung an einer alten und einer neuen Quelfassung vorbei, durch eine größere Nasswiese, und trifft am Kartenrand auf eine Straße.

Der einzige Bach der unteren Kartenblatthälfte fließt im größten südlich gelegenen Tal entlang der Straße nach Süden ab. Ursprung bilden die Abläufe zweier Quelfassungen. Die Leitfähigkeit beträgt im Kartenblatt konstant $600 \mu\text{S}/\text{cm}$ und der Durchfluss ist groß für das kleine Bachbett.

Ein Bach mit nur wenig Durchfluss befindet sich in einem Waldgebiet südlich der Autobahn. Aus einem Rohr aus Richtung der Autobahn kommend versickert der Bach oft im eigenen Bachbett, um weiter unten wieder oberirdisch weiterzufließen. Die Fließgeschwindigkeit ist teilweise sehr gering, weshalb das vorhandene Wasser manchmal eher in Pfützen steht. Die Leitfähigkeit ist am Anfang noch um die $3 \text{ mS}/\text{cm}$ hoch, fällt aber schnell, eventuell durch kleinere Zuflüsse aus dem Wald, auf danach konstante $2,5 \text{ mS}/\text{cm}$ ab. Da die kartierte Quelle neben dem Bachbett auch diese Leitfähigkeit besitzt, könnte sie auch nur ein Austritt des vorher unterirdisch fließenden Bachwassers sein, wie es im Bachbett oft vorkommt. Der Bach fließt circa 500 m durch den Wald, bis er in der Nähe der Straßen endgültig versickert und im Bachbett nur noch Pfützen stehen.

Südlich von Hönebach entlang eines Hangs fließt ein kleiner Bach mit Leitfähigkeiten von $400 \mu\text{S}/\text{cm}$ in einen Gartenteich. Er lässt sich zu drei Rohrzuflüssen zurückverfolgen, wovon nur einer viel Durchfluss hat. Dieser Zufluss könnte der Abfluss einer nicht weit entfernten Quelfassung sein. Kurz nach den Rohren versickert außerdem noch ein kleiner Zufluss, um dem Bach wahrscheinlich zuzufließen. Der kleine Zufluss fließt südöstlich des größeren Bachs mit einer Leitfähigkeit von circa $310 \mu\text{S}/\text{cm}$ aus einem Rohr unter einer Straße heraus.

Am westlichen Rand des Naturschutzgebiets Säulingssee bilden mehrere Hangaustritte, alle mit nur wenig Durchfluss, zusammen einen Zufluss in das Naturschutzgebiet. Die Leitfähigkeit bewegt sich die meiste Zeit zwischen 200 und $250 \mu\text{S}/\text{cm}$.

Zwischen Kleinensee und dem Naturschutzgebiet fließt ein kurzer Bach erst um einen Sportplatz herum und danach mit verschiedenen anthropogenen Zuflüssen zu einem unterirdischen Abfluss. Die Leitfähigkeit des Baches variiert um $300 \mu\text{S}/\text{cm}$. Der Fließweg des Baches und der vielen Zuflüsse am Ende ist oft mit orangenen Ablagerungen bedeckt.

Der Sandgraben ist ein aus drei Zuflüssen zusammenfließender Bach. Zwei davon beginnen bei Hönebach, während einer zwischen Hönebach und Großensee anfängt. Der in Hönebach beginnende Zufluss hat bis zu seiner Mündung in dem anderen Zufluss eine konstante Leitfähigkeit von $530 \mu\text{S}/\text{cm}$. Er beginnt als Rohrzufluss aus Richtung der Bahngleise.

Der Zufluss von über Hönebach beginnt mit einer Quelle und einem Hangaustritt neben einem abrutschenden Hang im Norden. Der Hangaustritt ist diffus und Ursache einer unter dem Hang ausgebildeten Nasswiese. Die Leitfähigkeit des Baches beträgt am Anfang durch diese zwei Quellen circa $800 \mu\text{S}/\text{cm}$, was im Bachverlauf durch viele Zuflüsse geringerer Leitfähigkeit auf $370 \mu\text{S}/\text{cm}$ an der Mündung mit dem Zufluss aus Hönebach gesenkt wird. Neben mehreren Rohrzuflüssen fließt auch ein kleinerer Bach aus einem Seitental, entspringend aus einer natürlichen Quelle und einem gefassten Behälter, in Form einer Nasswiese zu. Auch kurz vor der Mündung befindet sich neben dem Bach noch eine größere Nasswiese.

Die Mündung der beiden gerade beschriebenen Bäche ist von Nasswiese umgeben. Kurz darauf fließen in den Bach an einer Art Wehr mehrere mit orangen Ablagerungen verkrustete Zuflussrohre zu. Die Leitfähigkeit, welche nach der Mündung beider Zuflüsse konstant etwas über $400 \mu\text{S}/\text{cm}$ liegt, wird dadurch allerdings nicht groß beeinflusst. Der Bach fließt durch einen kurzen zopfstromförmigen Abschnitt in einen See, der auf der anderen Seite durch Rohre wieder in das Bachbett abfließt. Vor der Mündung in den nächsten See, einem privaten Fischteich, ist der nördliche Hang des Bachbetts feucht, und in den Wiesen daneben steht das Wasser. In diesem Bereich wurden drei kleinere Quellen kartiert, das Wasser fließt aber wahrscheinlich auch den gesamten Hangbereich in geringerem Ausmaß dem Bach zu. Auch in den schon beschriebenen Bereichen standen drei Quelfassungen jeweils nördlich des Bachs.

Der letzte Zufluss beginnt über Großensee nördlich der Bahngleise. Er entspringt an einer am Hang gelegenen Quelle mit $190 \mu\text{S}/\text{cm}$ und steigt bis zur Mündung auf circa $250 \mu\text{S}/\text{cm}$. Ein weiterer Ursprung dieses Bachs könnte auf einer eingezäunten Koppel liegen. Am Hang südlich des Friedhofs von Großensee treten mehrere Quellen und Hangaustritte mit Leitfähigkeiten zwischen 250 und $320 \mu\text{S}/\text{cm}$ aus, und fließen als vereinter Zufluss in den Bach. Danach wird der Bach unterirdisch bis zur Mündung mit dem Seeausflussrohren des Fischteichs geleitet.

Der nun aus allen drei Zuflüssen gespeiste Bach fließt, begleitet von vielen trockenen und fließenden kleineren Rohrzuflüssen, durch Großensee. Nach dem Ort fließt noch ein bisschen Wasser aus einer Quelle in einem Straßengraben zu, bevor der Sandgraben in den Suhlbach mündet.

Die Suhl fließt von Norden in einer großen Unterführung unter der Autobahn in das Kartenblatt. Vor dieser Unterführung sind die Hänge des Bachbetts feucht und zeigen mehrere kleine Hangaustritte. In der Unterführung fließen mehrere Rohrzuflüsse in den Bach, eines davon leitet einen aus Westen kommenden Bach aus Straßengräben ein. Die Leitfähigkeit dieses Nebenbachs beträgt am Anfang, einem von unter einer Straße kommenden Rohr, 1,4 mS/cm und vor Zufluss, bedingt durch mehrere zufließende Rohre, 1,8 mS/cm. Die Suhl verändert sich dadurch von 250 μ S/cm auf 300 μ S/cm. Nach der Unterführung fließt Wasser von einer im Hang der Autobahn gelegenen Quellen mit Leitfähigkeiten um die 260 μ S/cm zu. Im folgenden Abschnitt nach Raßdorf ist der nördliche Hang unter einer Nasswiese feucht, was vermuten lässt das Wasser dem Bach diffus zufließt. Vor und in Raßdorf münden sehr viele Rohre in den Bach, von denen nur wenige fließen und an welchen öfter orangene Ablagerungen zu finden sind. Weiter südlich fließt der Bach vor Großensee an einer Nasswiese vorbei. Ehemalige Kanalplatten liegen hier verdreht im Bachbett. Durch verschiedene Zuflussrohre steigt die Leitfähigkeit von 300 μ S/cm auf 340 μ S/cm. Nach Großensee fließt der Bach in einem Kanal über Felder bis direkt vor den Suhlbach, um dann bis zur Mündung knapp 500 m entfernt mäandrierend parallel zu fließen. Nördlich, teilweise mit sichtbaren alten Kanalplatten, stehen eine Reihe von Tümpeln in den Totarmen des wohl früher geraden Fließwegs der Suhl. In diesem Bereich steigt die Leitfähigkeit der Suhl auf 370 μ S/cm. Anschließend springt die Leitfähigkeit in der letzten Kurve vor der Mündung in den Hauptbach des Kartiergebiets auf über 500 μ S/cm. Direkt neben und im Bach sind dort viele kleine Quellen zu finden, deren Leitfähigkeiten von 8 mS/cm an der Nordseite über 3 mS/cm an der Südseite bis zu über 1 mS/cm bei Austritten im fließenden Bach reichen. An der Mündung ist die Suhl etwas breiter, und fließt deshalb langsamer als der Suhlbach. Der Durchfluss der Suhl ist hier eventuell sogar höher als der des Hauptbachs.

Auf der topographischen Karte ist der Bodengraben als weitlaufender Bach mit Ursprung südlich von Kleinensee und zwei Zuflüssen aus den südlichen Feldern dargestellt. Gefunden wurde fließendes Wasser allerdings nur bis kurz vor dem ersten eingezeichneten Zufluss, welcher trocken ist. Der Durchfluss ist sehr gering, und der Bach versickert immer wieder über lange Strecken im Bachbett. Auch die erste fließende Stelle im Bachbett sieht wie der auftauchende vorher unterirdisch fließende Bach aus, weshalb dort keine Quelle kartiert wurde. Die Leitfähigkeit schwankt in den oberirdisch leicht fließenden Bereichen zwischen 800 und 900 μ S/cm. Auch der zweite Zufluss aus den Feldern ist komplett trocken.

Der von West nach Ost fließende Suhlbach beginnt östlich von Hönebach an einem Kläranlagenausfluss und fließt daraufhin in einem sehr tiefen und steilen Bachbett neben der Straße. Nach einem kurzen Abschnitt als Zopfstrom fließt der Bach am Rand des Naturschutzgebiets Säulingssee weiter, wo der Sandgraben zufließt. Am Hang westlich des Naturschutzgebiets fließt Wasser aus mehreren Hangaustritten in einer Nasswiese durch einen Totarmtümpel zu. Auch der verwilderte Abschnitt nördlich des Baches vor der Sandgrabenmündung enthält große Nasswiesenbereiche mit einigen Quellen, die wahrscheinlich dem Bach selbst zufließen. Bis zur Mündung des Sandgrabens schwankt der Bach circa zwischen 550 und 750 μ S/cm. Durch den Zufluss sinkt die Leitfähigkeit auf unter 600 μ S/cm. Bis zur Straße bleibt der Hang auf beiden Seiten trocken. In dem Abschnitt, in dem die Suhl parallel zum Suhlbach fließt, ist der nördliche Hang, und in einem kleinerem Umfang auch der südliche Hang, durchgehend nass und von vielen Hangaustritten geprägt. Manche Austritte, vor allem im südlichen Hang, haben einen orangenen Fließweg. Die zufließende Suhl senkt die Leitfähigkeit, welche bis dahin wieder auf um 700 μ S/cm angestiegen ist, ein wenig. Die Hangaustritte und Quellen hören kurz nach der Mündung auf. Neben der Kläranlage ist auf dem Bach lokal ein großer Schmutzfilm. Der Bach teilt sich danach im Gegensatz zur Information auf der Karte nicht auf, da der eingezeichnete nördliche Fließweg wenn Wasser zu finden ist steht. Der hier zufließende Bodengraben beeinflusst die Leitfähigkeit aufgrund seines geringen Durchflusses kaum. Am Kartenrand fließt noch ein wenig Wasser aus dem Suhlbach einem Totarmtümpel zu. Der Bach verlässt die Karte mit einer Leitfähigkeit von circa 700 μ S/cm in Richtung des Naturschutzgebietes Dankmarshäuser Rhäden.

An jeder auf der Karte als Brunnen markierten Stelle konnten Quelfassungen gefunden und als gefasste Quellen kartiert werden. Natürliche Quellen und Hangaustritte wurden nur in der oberen Kartenhälfte gefunden. Diese lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen wurden viele Quellen auf größeren Hängen am Rand des Tals gefunden. Hierzu zählen die Quellen der nach Westen abfließenden Bäche, die des Sandgrabens mit Ausnahme der Quellen direkt vor dem Fischteich und der Quellen westlich des Naturschutzgebiets Säulingssee. Alle treten an den Hängen

des Tals im Mittleren Buntsandstein aus. Diese könnten entweder als Verengungsquellen oder Schichtquellen gehandelt werden. Im Westen aus dem Richelsdorfer Gebirge kommend haben diese sehr geringe Leitfähigkeiten von 100 bis 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Die westlich an den Bahngleisen entdeckten Quellen konnten zum Großteil nicht oder nicht gut gemessen werden, nur die Quelle mit 221 $\mu\text{S}/\text{cm}$ war oberhalb des Baches messbar. Die Quellen des Sandgrabens zeigen Leitfähigkeiten von 170-320 $\mu\text{S}/\text{cm}$, eine große Ausnahme jedoch bilden die zwei ersten Quellen über Hönebach mit Leitfähigkeiten um 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Die zweite Gruppe sind die direkt neben den Bächen in den Hängen austretenden Quellen, umgeben von sonst eher flachem Gelände. Dazu zählen die nassen Hänge der Suhl am oberen Kartenrand und die Quellen in der Suhl an der Mündung, die vielen Hangaustritte entlang des Suhlbachs vor der Mündung der Suhl und vor der Mündung des Sandgrabens, sowie der nasse Hang mit Austritten am Sandgraben vor dem Fischteich. Die einzelne östlich in Feldern liegende Quelle kann auch dazugezählt werden. Diese werden als Verengungsquellen eingeteilt. Im oberen Bereich der Suhl sind die Leitfähigkeiten von 170-270 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in dieser Gruppe am niedrigsten, gefolgt vom Sandgrabenabschnitt mit ähnlichen Werten. Die Hangaustritte des Suhlbachs zeigen eine höhere Leitfähigkeit von 300-450 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Die Feldquelle im Osten zeigt 408 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Auffällig in dieser Gruppe sind die Salzquellen am und im Bachbett der Suhl kurz vor der Mündung in den Suhlgraben mit Werten von 1-8 mS/cm , wobei am südlichen Hang geringere Leitfähigkeiten gemessen wurden als am nördlichen Hang.

Die Quelle im Waldgebiet unter der Autobahn mit 2350 $\mu\text{S}/\text{cm}$ liegt zwar im Buntsandstein an einem Hang, hat jedoch die gleiche Leitfähigkeit wie der Bach selbst. Wenn diese Quelle allerdings nicht unterirdisch geflossenem Flusswasser entstammt, ist dies der zweite Grundwasseraustritt mit über 1 mS/cm . Durch die Lage der Quellen an den Hängen und im Verhältnis zueinander wurden mögliche Grundwasserfließrichtungen in der skizzierten Karte eingetragen. Für die Hydrochemische Probenahme wurden aus dieser Auswahl drei Quellen beprobt. Die Salzquelle an der Suhlmündung wurde wegen der hohen Leitfähigkeit beprobt. Die meisten anderen Quellen der zweiten Gruppe besaßen zu wenig Schüttung für eine Beprobung, ebenso wie die Quellen im nordwestlichen Gebiet und die Quelle unter der Autobahn. Die Quellen des Sandgrabens über Hönebach wurden aufgrund der auffällig erhöhten Leitfähigkeiten im Vergleich zu den anderen Quellen der Art und in der Umgebung ausgewählt. Als Vergleich wurde als Dritte eine mit 288 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sehr gering leitfähige Quelle des Sandgrabens am Hang des Friedhofs von Großensee beprobt.

Auffällig waren die vielen Totarme am östlichen Kartenrand im Naturschutzgebiet, neben der Suhl bei der Mündung und neben dem Suhlbach um das Naturschutzgebiet Säulingssee. Diese hatten lokal sehr unterschiedliche Leitfähigkeiten, wobei höhere Leitfähigkeiten oft mit schmutzigem Aussehen oder neben Straßen auftraten. In den Totarmen waren oft mehrere voneinander getrennte Tümpel auszumachen, welche manchmal mit einem Rinnsal verbunden waren. Die Felder südöstlich von Kleinensee, in denen auf der Karte viele teilweise wasserführende Gräben gezeichnet waren, wiesen meistens auch keine stehenden Pfützen auf. In diesem Gebiet wurden allerdings einige Tümpel in den Feldern gefunden. Die zwei kartierten Täler südlich der Felder und nördlich der Halde wiesen neben den zwei in der Karte eingezeichneten Seen auch mehrere Pfützen entlang der Talböden auf. Die Leitfähigkeiten sowohl der Pfützen als auch der Seen variierten zwischen 20 und 80 $\mu\text{S}/\text{cm}$, was im Untersuchungsgebiet die kleinsten gemessenen Werte darstellt. Wahrscheinlich handelt es sich deshalb um Regenwasser.

1.2.3 Hydrogeochemie im Gebiet um die Halde und K+S Versenkungsbrunnen

Das Gebiet um die Halde wurde einmal umrundet, und es wurde versucht im Waldgebiet südlich von Hönebach mögliche Versenkungsbrunnen ausfindig zu machen.

Tab. 1.2: Ausgewählte Ionen, physikochemische Parameter und DOC der beprobten Quellen

	Anfang Sandgraben über Hönebach	Sandgraben Großensee Friedhof	Salzquelle Suhlmündung	Hattorf Quelle 1	Hattorf Quelle 10
UTM-Koordinaten der Zone 32	566349 5643769	568115 5643310	569129 5642788	568718 5631034	568818 5630156
T [°C]	9,3	10,4	9,3	15,7	13,4
LF [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	996	290	7880	110200	40600
pH	6,32	6,81	6,05	3,93	5,20
UH [mV]	400	400	340	540	480
O ₂ [mg/L]	8,13	5,17	0,22	-	6,22
O ₂ [%]	74,5	49	2	-	64,5
[mg/L]					
Al	0,0039	< 0,001	< 0,001	48,7	3,744
Ca	61,39	27,94	677	502	518,1
K	7,401	2,3	11,06	5617	1176
Mg	16,11	14,4405	334,5	17970	4838
Na	102,1	8,4992	367,6	8584	2274
S	10,7	5,53	5,8	6934	1859
Sr	0,267	0,099	2,49	1,92	1,3
Cl ⁻	244,3	11,38	2654	55619	15059
Br ⁻	< 0,4	< 0,16	< 4	361	94,5
SO ₄ ²⁻	30,3	16,2	17,4	20349	5405,4
NO ₃ ⁻	14,7	19,97	4	< 80	42,9
NO ₂ ⁻	< 0,02	< 0,02	< 0,02	1,40	< 0,02
NH ₄ ⁺	-	-	0,10	6,14	0,64
HCO ₃ ⁻	65,72	121,7	65,41	0	11,96
DOC [$\mu\text{g}/\text{L}$]	3,0595	0,9835	1,349	6,94	2,03
B	21,435	17,9	23,02	200	72
Ba	151	392	7988	116,25	88
Cd	< 0,5	< 0,5	< 0,5	14	8
Co	0,38	< 0,3	7,93	188	16,4
Cr	< 0,6	< 0,6	< 0,6	4,4	< 3
Cs	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3,16	0,84
Cu	0,567	< 0,3	0,81	132	13,7
Fe	290	5,1	1245	81	15
Li	5,6	16,3	62	77	44,2
Mn	55,2	< 0,5	346	19900	7870
Mo	< 0,5	< 0,5	< 0,5	9,4	2,4
Ni	3,9	0,3	13,3	461	256
Pb	< 0,05	< 0,05	< 0,05	178	11,6
Rb	1,099	0,36	1	7860	1095
U	0,12	0,516	0,451	1,69	0,346
V	< 0,5	0,7	< 0,5	10	4
Zn	3,7	1,9	12,9	1440	476
$\Sigma\text{SEE (La-Lu)}$	1,217	-	0,68	1011,715	357,855

Zwei mögliche Versenkungsbrunnen wurden entlang der Straße für Besucher der Halde gefunden. Ebenfalls in dem Waldgebiet und südöstlich der Halde wurden mehrere Kontrollschächte der Versenkleitung von K+S des Standorts Wintershall gefunden. Auf dem Rundgang um die Halde wurden keine Gewässer gefunden. Der pH-Wert der Quellen im Kartiergebiet liegt zwischen 6 und 7, während die Quellen in Hattorf eine sauren pH von bis zu 3,93 zeigen. In den zwei Wochen zwischen Kartierung und Probenahme wurde ein deutlicher Anstieg der Leitfähigkeit der Quelle über Hönebach auf fast 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ dokumentiert. Die anderen beiden Werte sind den Kartierten sehr ähnlich. Im Vergleich zu den kartierten Leitfähigkeitswerten im Gebiet der TK 10, sind die Werte der Quellen der Halde stark erhöht, mindestens um das Fünffache hinsichtlich der Salzquelle an der Suhlmündung. Bei den Sauerstoffmessungen fällt die Salzquelle an der Suhlmündung auf, welche anoxisch ist. Bei Quelle 1 konnte der Sauerstoffgehalt durch einen Sondenfehler nicht gemessen werden. Eine Auswahl der untersuchten Ionen (Tab. 1.2) zusammen mit dem DOC und den physikochemischen Parametern der fünf untersuchten Quellen wurde zur Charakterisierung der Wässer herangezogen

(Abb. 1.13, 1.14). Aus den Ergebnissen der physikochemischen Parameter und Wassertypen (Tab. 1.3) wurde entschieden, ob die im Kartiergebiet beprobten Quellen auch mikrobiologisch untersucht werden sollten. Da die Untersuchung neben Diversität auch die Salztoleranz miteinbeziehen sollte, wurden die beiden Quellen unter 1 mS/cm verworfen. Auch die Salzquelle an der Suhlmündung eignete sich aufgrund der anoxischen Bedingungen nicht für weitere mikrobiologischen Untersuchungen. Folglich wurden keine Quellen des Kartiergebietes beprobt, stattdessen zwei Quellen um die Halde Hattorf.

Tabelle 1.3: Wassertypen der beprobten Quellen

Quelle	Wassertyp
Anfang Sandgraben über Hönebach	Na-Ca-Cl
Sandgraben Großensee Friedhof	Ca-Mg-HCO ₃
Salzquelle Suhlmündung	Ca-Mg-Na-Cl
Hattorf Quelle 1	Mg-Cl-SO ₄
Hattorf Quelle 10	Mg-Cl-SO ₄

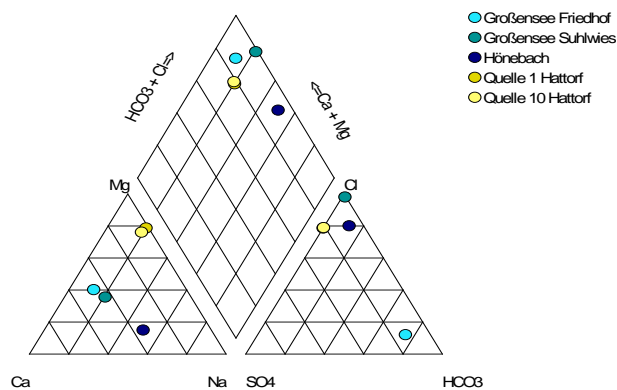


Abb. 1.13: Piper-Diagramm der Quellen.

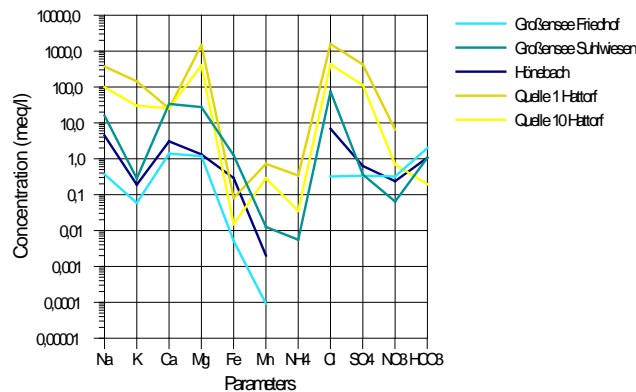


Abb. 1.14: Schoeller-Diagramm der Quellen mit ausgewählten Ionen.

Von den drei Quellen im Kartiergebiet zeigt die Salzquelle öfter höhere gemessene Werte bei den gelösten Metallen als die anderen beiden. Die Quelle über Hönebach zeigt allerdings bei der Summe aller Seltenen Erden den höchsten Wert. Die Quelle in Großensee hat meistens die niedrigsten gemessenen Konzentrationen bei den Metallen und es konnten keine Seltenen Erden nachgewiesen werden, dafür hat sie den höchsten Uranwert, und einen messbaren Anteil an Vanadium. Die Quellen um die Halde Hattorf zeigen allerdings bei fast allen gemessenen Ionen vielfach höhere Werte. Auch wurden in diesen Quellen viele Ionen bestimmt, die in den anderen Drei unter der Nachweisgrenze lagen. Die Konzentrationen der Ionen der Quelle 1 sind jedoch durchweg höher als die der Quelle 10.

Die mit Aquachem bestimmten Wassertypen der Quellen zeigen in den Quellen des Kartiergebiets eine relativ heterogene Mischung der Kationen. Bei den Anionen jedoch dominierte in der Quelle am

Friedhof das Hydrogencarbonat, während die anderen beiden Quellen und den Haldenquellen fast ausschließlich Chlorid zeigten. Sulfat erreichte bei den Quellen der Halde Hattorf den höchsten Anteil von leicht über 10 %. Bei den beiden Quellen der Halde fällt sowohl Magnesium mit einem Anteil knapp unter 90 % der Kationen auf, als auch das beide Wässer fast exakt die gleichen Verhältnisse der Ionen und somit auch den gleichen Wassertypen besitzen.

Die jeweils dominierenden Ionen sind auch im Schoeller-Diagramm gut zu erkennen. Außerdem sind die ebenfalls vielfach höheren Werte der Haldenquellen bei den Hauptionen hier gut dargestellt.

Die zwei beprobten Quellen an der Halde Hattorf zeigten zwar unterschiedlich starke Belastungen an Ionen, durch die fast identischen Wassertypen kann allerdings davon ausgegangen werden, dass beide Wässer durch die selben Prozesse kontaminiert wurden.

Für die zuvor eingeteilten Gruppen an Quellen im kartierten Gebiet sollen unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert werden.

Die erste Gruppe der Hangquellen im Mittleren Bundsandstein könnten leicht durch Verengungen des Fließquerschnitts einiger aus den umgebenden Bergen kommender Grundwasserläufe entstehen. Gegen Schichtquellen spricht auch der Aufbau des Mittleren Bundsandsteins, welcher im unteren Bereich größtenteils aus reinen Sandsteinen besteht, und in dem Untersuchungsgebiet nur selten tonige Bestandteile als kleine Wiederholung der Merkmale des Unteren Bundsandsteins besitzt (Moesta, 1876; Puff and Langbein, 2003). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass vor allem im unteren Bereich des Mittleren Bundsandsteins kleinere tonige Lagen das Grundwasser vom Versickern abhalten oder diesen Vorgang zumindest verlangsamen.

Ungeklärt bleibt jedoch, woher das Grundwasser bei der beprobten Quelle über Hönebach messbar verunreinigt wurde. Die anderen Quellen im unteren Sandgrabenverlauf haben alle viel geringere Leitfähigkeiten. Entweder die Quellen sind aus einem anderen Aquifer, oder eine lokale Kontamination des Grundwassers im Aquifer hat sich nicht ausgebreitet. Für separate Aquifere wären allerdings abgrenzende wasserstauende Schichten nötig. Durch den abrutschenden Hang neben der verunreinigten Quelle konnte die Fließrichtung des Grundwassers grob abgeschätzt werden. Diese zeigt, dass es möglich wäre, dass die Quellen wenn aus einem Aquifer stammend nur weit entfernt voneinander fließen.

Die zweite Gruppe der Hangaustritte und Quellen direkt neben und in Bachbetten könnte es sich um normale Verengungsquellen handeln, vorausgesetzt der Grundwasserspiegel beginnt direkt in den ersten Metern Boden. Damit würden in diesen Bereichen stark effluente Bedingungen herrschen. Eine weitere Möglichkeit jedoch wäre, dass Grundwasser in diesen Bereichen aufsteigt. Zwei Beobachtungen im Gelände der parallel fließenden Bäche Suhlbach und Suhl sprechen für diese Variante. Zum einen ist der Nordhang des Suhlbachs, obwohl fünf bis zehn Meter weiter nördlich die Suhl auf einem ähnlich tiefen Niveau fließt, feucht mit mehreren sichtbaren Wasseraustritten. Gäbe es einen nach Süden fließenden oberflächennahen Grundwasserleiter, würde dieser schon im Hang der Suhl austreten. Dies spricht dafür, dass im Bereich zwischen den zwei Bächen Grundwasser aufsteigt. Die zweite zu diskutierende Beobachtung sind die Austritte salzhaltiger Wässer etwas weiter bachabwärts an und in der Suhl bei der Mündung. Dabei könnte es sich um aufsteigende anthropogene Lauge oder verdrängtes salzhaltiges Formationswasser aus den Schichten des Plattendolomits handeln. Für Prozessabwässer spräche die hohe Belastung mit verschiedensten Ionen. Die Leitfähigkeit ist jedoch, verglichen mit den Quellen um die Halde, etwas niedrig für konzentrierte Laugen. Falls es sich um aufsteigende Lauge aus Versenkungen handelt, würde das von unten aufwärts fließende Wasser das natürliche Grundwasser nach oben verdrängen, wodurch die vielen beobachteten Hangaustritte und Quellen zustande kommen würden, was genau den Beobachtungen im Gelände entspricht.

1.2.4 Mikrobiologische Charakterisierung Quelle 1 und 10

Die Quellen 1 und 10 befinden sich östlich der Rückstandshalde Hattorf am westlichen Rand einer Subrosionssenke. Der schwebende Grundwasserleiter, der sich in der Umgebung der Halde ausgeprägt hat und in der GWM 24 und 9 erschlossen ist (s.o.), tritt mit den beiden Quellen an die Erdoberfläche. Damit ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluss des salzhaltigen Wassers auf die Löslichkeit von SM/RN aus dem Bundsandstein zu erfassen.

Die cfu zeigten aufgrund der geringen Zellzahlen sehr hohen Standardabweichungen (Abb. 1.15). Die Ergebnisse zeigen eine höhere Anzahl an wachstumsfähigen Bakterien in Quelle 1, wobei in beiden

Quellen auf dem Standard I Medium mehr Bakterien Kolonien bildeten als auf R2A. Die Werte zeigen im Allgemeinen eine sehr geringe Anzahl an Mikroorganismen im Grundwasser.

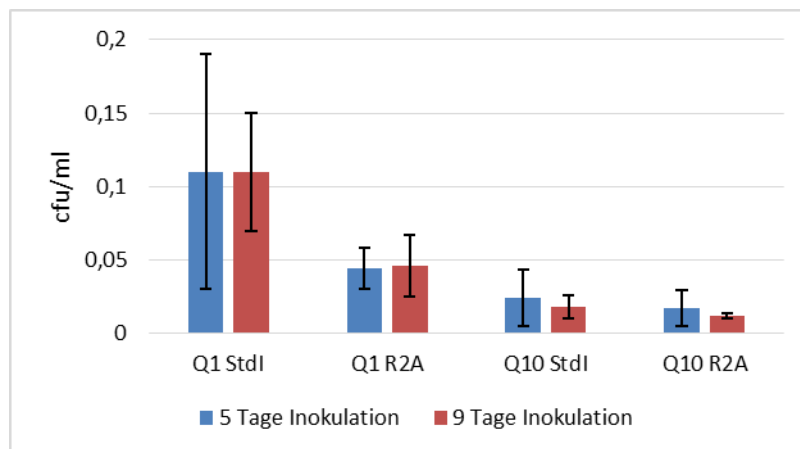


Abb. 1.15: Zellzahlbestimmung der Filterplatten

Aus Quelle 1 wurden 61 Reinkulturen isoliert, 36 auf Standard I und 25 auf R2A. Sechs davon konnten morphologisch den mehrzelligen Pilzen zugeordnet werden, von welchen vier auf R2A und zwei auf Standard I isoliert wurden. Von den Platten der Quelle 10 wurden 39 Isolate vereinzelt, 16 davon auf Standard I und 23, darunter auch zwei mehrzellige Pilze, auf R2A (Tab. 1.4). Wie viele der Isolate von welchen ursprünglichen Isolationsplatten stammen, wurde ebenfalls dokumentiert.

Tab. 1.4: Verteilung der Isolate auf Quellen und Medien

Quelle	Quelle 1		Quelle 10	
	Std I	R2A	Std I	R2A
Isolate pro Quelle	61		39	
Medium	Std I	R2A	Std I	R2A
Isolate pro Quelle pro Medium	36	25	16	23
davon mehrzellige Pilze	2	4	-	2

Die meisten Bakterien wiesen eine runde Kolonieförmigkeit auf. Neben einigen unregelmäßig wachsenden Isolaten gab es auch ein Isolat mit filamentöser Form. Teilweise konnten die Form und oft auch andere Merkmale der Isolate allerdings aufgrund des oft vorkommenden schleimigen Wachstums ohne einzelne Kolonien nicht bestimmt werden. Die Oberflächen der meisten Isolate waren glatt und glänzend, während wenige rau und matt aussahen oder eine andere Kombination der Eigenschaften aufwiesen. Bezüglich der Randformen war das Auftreten gewellter und ganzrandiger Isolate etwa gleich verteilt, wobei zwei Mikroorganismen mit filamentösen Rand und ein Isolat mit leicht gelapptem Rand isoliert wurden. Die Höhe der Kolonien der Reinkulturen war am häufigsten erhaben, es gab aber ebenfalls mehrere Isolate die je als flach, gelockt, kraterförmig und gebuckelt eingestuft wurden, womit die Isolate hinsichtlich der Höhe am stärksten variierten. Die meisten Reinkulturen wiesen eine hell beige bis weiße Farbe auf. Viele Isolate zeigten Transparenz. Weniger oft kam die Farbe Gelb in beiden Quelle vor. Ein Isolat in Quelle 1 zeigte eine tiefrote Farbe. In Quelle 1 kamen außerdem öfter sich ähnelnde lachsfarbene Kolonieförmigkeiten vor, während aus Quelle 10 nur ein Isolat ähnlicher Farbe, aber anderer Morphologie isoliert wurde. Dafür wurden in Quelle 10 auf Standard I sehr oft orange-transparente Isolate mit undurchsichtigen Stellen isoliert, die weder in Quelle 1 noch auf R2A der Quelle 10 gefunden wurden.

Bei den Salzplatten zeigten die meisten Reinkulturen bei 4-5% ein sehr gutes bis gutes Wachstum, was schon bei der nächsten Stufe von 8-9% meist auf Wachstum bis anfangendes Wachstum stark abfiel. Im häufigsten Fall war auf den letzten beiden Salzplatten entweder nur beginnendes oder gar kein Wachstum mehr sichtbar. Bei einer kleineren Gruppe an Isolaten konnte auf allen Salzplatten Wachstum festgestellt werden, allerdings ging auch hier das Wachstum mit steigender Salzkonzentration zurück. Allgemein wurde nur wenige Male bei steigender Salzkonzentration eine bessere Wertung für das Wachstum vergeben, und wenn dies der Fall war handelte es sich meistens um eine Steigerung auf beginnendes Wachstum bei 21% von keinem Wachstum bei 16%.

Tab. 1.5: Bakterien Quelle 10

Abk.	Medium und Code	Sequenzlänge	Gattung	Art
HH	StdI II 1.2	-	-	-
RR	StdI II 1.1.2	-	-	-
BB	R2A I 1.5	-	-	-
GG	StdI II 1.4	Nur R: 270	<i>Bacillus</i>	sp.
S	StdI III 1.4	1413	<i>Brevibacterium</i>	<i>frigoritolerans</i>
(C)	R2A I 1.6.1.1	1380	<i>Chryseobacterium</i>	sp.
XX	R2A II 1.3.2.S	1383	<i>Flavobacterium</i>	sp.
t.	StdI -2 I 1.1	Nur R: 432	<i>Paenibacillus</i>	sp.
bb	R2A III 1.2.1	Nur F: 623	<i>Pedobacter</i>	<i>agri</i>
(H)	R2A I 1.2.2.1	1396	<i>Pedobacter</i>	sp.
ZZ	R2A II 1.1.1	1393	<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>
aa	R2A III 1.3.1	1396	<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>
TT	R2A I 1.6.2.S	Nur F: 355	<i>Pseudomonas</i>	sp.
WW	R2A I 1.2.1	1394	<i>Pseudomonas</i>	<i>synxantha</i>
cc	R2A III 1.1.1	1406	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>
r.	R2A 0 III 1.2	1354	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>
d.	StdI III 1.1	1387	<i>Shewanella</i>	<i>baltica</i>
FF	StdI II 1.5	Nur F: 280	<i>Shewanella</i>	sp.
KK	R2A 0 I 1.2	1345	<i>Sphingomonas</i>	sp.

Tab. 1.6: Bakterien Quelle 1

Abk.	Medium und Code	Sequenzlänge	Gattung	Art
U	R2A II 1.6.1	-	-	-
a.	StdI II 1.1.1	-	-	-
h.	StdI I 1.9	-	-	-
DD	StdI II 1.3.1	-	-	-
G	StdI I 1.10	Nur R: 71	-	-
f.	StdI 0 III 1.1	1406	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>
(A)	StdI I 1.6.1	1412	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>
LL	R2A 0 III 1.1	1412	<i>Bacillus</i>	sp.
ff	StdI III 1.2.1	1412	<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>
Y	StdI I 1.7.2.1	1413	<i>Bacillus</i>	sp.
QQ	StdI 0 I 1.3	1414	<i>Bacillus</i>	sp.
k.	StdI 0 II 1.1	Nur F: 431	<i>Bacillus</i>	sp.
		Nur R: 712		
H	StdI I 1.1	Nur F: 470	<i>Bacillus</i>	sp.
		Nur R: 282		
OO	StdI II 1.4.2	Nur F: 554	<i>Bacillus</i>	sp.
		Nur R: 475		
hh	StdI II 1.8.1.1	1434	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>
u.	R2A 0 I 1.2	1382	<i>Curtobacterium</i>	<i>flaccumfaciens</i>
E	StdI II 1.2.1	1353	<i>Erwinia</i>	<i>billingiae</i>
T	R2A II 1.3.1	1404	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
I	StdI I 1.2	Nur F: 355	<i>Pantoea</i>	sp.
		Nur R: 289		
W	StdI II 1.5.2.1	Nur F: 485	<i>Pseudomonas</i>	sp.
		Nur R: 162		
z.	R2A III 1.2.1	Nur F: 591	<i>Pseudomonas</i>	sp.
		Nur R: 551		
i.	StdI 0 I 1.2	1364	<i>Rhodococcus</i>	<i>fascians</i>
PP	StdI 0 II 1.2	1366	<i>Salinicola</i>	<i>salaris</i>
b.	StdI III 1.7	1423	<i>Virgibacillus</i>	sp.
Q	StdI II 1.7	1377	<i>Viridibacillus</i>	sp.
X	StdI II 1.2.2	1408	<i>Viridibacillus</i>	sp.

Zur Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit erfolgreich amplifizierter DNA zu GATC verschickt. Bei den Produkten der 16S-PCR waren dies 45 Proben mit einer sauberen 16S rDNA-Bande und vier Proben aus den drei PCR-Produkten mit einer Bande geringerer Basenpaarlänge. Von den Hefen und Pilzen wurden je alle sieben positiven ITS-PCR-Produkte verschickt. Die mit BLAST ausgewerteten und identifizierten Gattungen und Arten sind für die Bakterien und für die Pilze dargestellt (Tab. 1.5 bis 1.7).

Tab. 1.7: Pilze Quelle 1 und 10, Hefen als Buchstaben und Pilze als Zahlen markiert

Abk.	Medium und Code	Sequenzlänge	Gattung	Art
3	StdI III 1.1.1	677	<i>Cladosporium</i>	sp.
1	R2A I 1.2	Nur F: 32 Nur R: 195	<i>Cladosporium</i>	sp.
8	R2A 1 II 1.P	Nur R: 322	<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>
6	R2A III 1.1	Nur F: 302 Nur R: 178	<i>Mucor</i>	<i>hiemalis</i>
5	R2A 0 III 1.2	Nur F: 87 Nur R: 337	<i>Phoma</i>	sp.
NN	R2A III 1.3.1	562	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>capitatum</i>
MM	R2A II 1.3.2	724	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>capitatum</i>
m.	R2A -1 II 1.1	556	<i>Leucosporidium</i>	<i>scottii</i>
w.	R2A I 1.3	600	<i>Rhodospordiobolus</i>	<i>colostri</i>
n.	R2A 0 I 1.1	2 F: 64	<i>Rhodotorula</i>	sp.
l.	R2A -1 II 1.2	737	<i>Rhodotorula</i>	<i>sphaerocarpa</i>
j.	StdI 0 I 1.1	835	<i>Rhodotorula</i>	<i>sphaerocarpa</i>
Abk.	Medium und Code	Sequenzlänge	Gattung	Art
7	R2A I 1.6.1	Nur F: 36	-	-
4	R2A I 1.3.2	Nur R: 193	<i>Cladosporium</i>	sp.

Die Wahrscheinlichkeit der richtigen Bestimmung der angegebenen Gattungen und Arten korrelierte überwiegend mit der vorhandenen Sequenzlänge, da Ergebnisse aus nur einer Ursprungssequenz Die Wahrscheinlichkeit der richtigen Bestimmung der angegebenen Gattungen und Arten korrelierte überwiegend mit der vorhandenen Sequenzlänge, da Ergebnisse aus nur einer Ursprungssequenz oder aus zwei nicht zusammenführbaren Sequenzen oft mehr gleichrangige Treffer mit höherer Varianz an Arten und Gattungen ergaben. Aber auch die zusammengefügte vollständigen Sequenzen waren nicht immer eindeutig, von welchen die wichtigsten Beispiele kurz aufgeführt werden. Bei dem Isolat f. war bei den besten Treffern neben vielen Einträgen von *Bacillus pumilus* auch ein Eintrag von *Bacillus safensis* zu finden. Bei dem Ergebnis des Isolates WW kam die am besten passende Art, *Pseudomonas synxantha*, in weiteren Ergebnissen fast gar nicht mehr vor und stattdessen war die Art *P. jessenii* dominant vertreten. Das Isolat QQ, welches durch den ähnlichsten Treffer als *Bacillus* sp. charakterisiert wurde, hat in den weiteren Ergebnissen übermäßig viele Ergebnisse der beiden *Sporosarcina* Arten *psychrophila* und *globispora*. Der Sequenzvergleich des Isolats b. ergab als beste Übereinstimmung *Virgibacillus* sp., die Gattung *Oceanobacillus* sp. war allerdings mit nur wenig schlechteren Übereinstimmungen öfter vertreten. Die beiden Isolate Q und X aus Quelle 1 ergaben beide die gleichen Übereinstimmungen mit je zwei Einträgen gleicher Übereinstimmung von den Arten *Viridibacillus arvi*, *Viridibacillus arenosi* und der Gattung *Bacillus* sp..

Häufig sequenzierte Gattungen, welche auch in beiden Quellen vorkamen, waren *Bacillus* mit zehn Zuordnungen (elf mit *Brevibacterium*) und Vertreter der Pseudomonaden mit sechs Zuordnungen. Die *Bacillus*-Isolate waren dabei überwiegend in Quelle 1 zu finden, während *Pseudomonas* gleichmäßig auf beide Quellen verteilt war. Die Gattungen *Pedobacter* und *Shewanella* wurden in Quelle 10 und die Gattung *Viridibacillus* in Quelle 1 zweimal sequenziert. Die Gattung *Rhodococcus* wurde in beiden Quellen je in Form einer anderen Art vorgefunden. Zwölf Gattungen wurden nur einmal erfolgreich sequenziert. In Quelle 10 konnten 16 verschiedene Sequenzen, fünf davon von Isolaten auf Standard I, erfolgreich in elf verschiedene Gattungen eingeordnet werden. Acht Sequenzen konnten bis auf Art-Ebene bestimmt werden. Bei Quelle 1 konnten 21 verschiedene Sequenzen bestimmt werden, von welchen nur vier auf R2A-Isolate zurückzuführen sind. Diese teilen sich ebenfalls in elf Gattungen auf. Von den 21 Sequenzen konnten neun einer bestimmten Art zugeordnet werden.

Bei den Sequenzierungsergebnissen der ITS-PCR-Produkte konnte für die meisten Hefen eine ganze Sequenz erzeugt werden, während die Sequenzen der mehrzelligen Pilze bis auf einen zu schlecht für eine zusammengefasste Sequenz waren. Bei den mehrzelligen Pilzen kam die Gattung *Cladosporium*

sp. dreimal vor. Ein Isolat dieser Gattung kam aus Quelle 10, in welcher nur zwei mehrzellige Pilze und keine Hefen isoliert wurden. Da die Sequenzierung der DNA des zweiten Pilzes kein optimales Ergebnis lieferte und eine zu geringe Sequenzlänge besaß, konnte keine eindeutige Zuordnung vorgenommen werden.

Bei den sieben Hefen der Quelle 1 gehören drei zur Gattung *Rhodotorula*, wovon zwei zur Art *sphaerocarpa* gehören. Ebenfalls zweimal wurde die Art *Cystofilobasidium capitatum* bestimmt. Die Ergebnisse des Isolates w. widersprachen zwar nicht der Einordnung zur Art *Rhodospiridiobolus colostri*, da diese Art in den besseren Übereinstimmungen ohne andere Arten dominierte, die beste und einige andere Übereinstimmungen jedoch waren Sequenzen der darüberstehenden Ordnung der *Sporidiobolales*.

Von den drei Proben mit kürzerem amplifiziertem Genabschnitt in der 16S-PCR brachte nur II von Quelle 1 bei der Sequenzierung ein verwertbares Ergebnis von 461 Basenpaaren. Bei der BLAST-Suche konnten nur wenige dazu ähnliche Sequenzen gefunden werden, welche auch verglichen mit den anderen gesuchten Sequenzen eine sehr geringe Übereinstimmung zur gesuchten Sequenz aufwiesen. Als mögliche Art konnte so *Erwinia amylovora* identifiziert werden. Da dieses Ergebnis allerdings wahrscheinlich nicht durch einen 16S-DNA Vergleich zustande kam, wird dieses Ergebnis hier separat diskutiert.

Die zweite Auszählung zeigte bei Quelle 1 eine leichte Erhöhung der cfu/ml-Werte, was bei längerer Inkubationszeit als Standard angesehen wird, da langsamer wachsende Mikroorganismen so mehr Zeit haben, sichtbare Kolonien auszubilden, während die schnell gewachsenen Kolonien bestehen bleiben. Bei Quelle 10 wurden jedoch bei der zweiten Auszählung weniger Kolonien gezählt. Dies liegt wahrscheinlich an der schleimigen Biomasse auf vier der sechs Filterplatten, wodurch Kolonien auf diesen Platten nicht gut zu erkennen waren und vor allem deren Grenzen zu anderen Kolonien schlecht bestimmbar waren. Mit voranschreitendem Wachstum erschwerte dies die Unterscheidung einzelner Kolonien noch mehr, was zu weniger sichtbaren Kolonien in späteren Wachstumsstadien führte. In diesem Fall ist das Ergebnis der ersten Auszählung genauer. Allerdings muss auch hier darauf geachtet werden, dass langsam wachsende Mikroorganismen eventuell nicht mitgezählt werden konnten.

In Grundwasser sind verglichen mit anderen Habitaten durch die geringe Nährstoffzufuhr eher geringe Diversität und Abundanz an Mikroorganismen zu finden. Trotzdem sind die berechneten 0,11-0,01 cfu/mL der Quellen bei Hattorf sehr geringe Werte, verglichen mit Grundwasserdaten anderer Arbeiten wie <10 cfu/ml (Ultee et al., 2004) bis zu 2300 cfu/ml, wobei letzterer Wert mit R2A-Medium mit Membranfiltertechnik die gleichen Methoden benutzt (Reasoner and Geldreich, 1985). Ein großer Unterschied zu diesen Untersuchungen sind jedoch die neben der geringen Nährstoffzufuhr anderen Stressfaktoren des erniedrigten pH, der hohen Belastung an gelösten Kationen wie Aluminium oder die SEE und der erhöhten Salzkonzentration im Haldengrundwasser. Die geringen cfu/ml-Werte könnten also auf eine negative Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die veränderten Umweltbedingungen (möglicherweise anthropogen beeinflusst) oder auf eine noch nicht abgeschlossene Anpassung hindeuten.

Eine weitere Erklärung für die geringen cfu/ml-Werte könnten auch die verwendeten Probenvolumina darstellen. Bei 2500 mL unverdünntem Probenvolumen pro Filterplatte müssten auf dieser Platte 2500 Kolonien gezählt werden, um einen Wert von 1 cfu/mL zu erhalten. Schon bei den in Quelle 1 ausgezählten 100-400 Kolonien in Filterplatten ist Konkurrenz um Raum als Wachstumsinhibitor denkbar. Auch können bei dichterem Wachstum einzelne Kolonien teilweise nicht mehr voneinander unterschieden werden. Bei der Ausplattierten unverdünnten Probe jedoch entsprach eine Kolonie schon 10 cfu/ml, sodass erst ab 50 cfu/ml mit dieser Methode repräsentative Werte entstehen könnten. Der Bereich zwischen circa 0,5 und 50 cfu/mL war somit in den Untersuchungen nicht abgedeckt.

Zuletzt ist es auch möglich, dass durch die Behandlung der Proben ein großer Anteil der enthaltenen Mikroorganismen nicht mehr wachstumsfähig war. Durch die Verdünnung der Proben mit *A. dest.* und der Verwendung auf normalen Medien ohne Salzzusatz konnten halophile Mikroorganismen, welche auf Salz für Wachstum angewiesen sind, nicht kultiviert werden. Falls die mikrobielle Gemeinschaft schon an die extremen Bedingungen der haldenbeeinflussten Wässer angepasst war und somit viele halophile, halotolerante und schwermetallresistente Mikroorganismen diese charakterisierten, könnte dieser Teil der eigentlich kultivierbaren Mikroorganismen so unter suboptimalen Bedingungen verloren gegangen sein.

Von der Gesamtheit aller Mikroorganismen in einer Umweltprobe ist in der Regel nur ein Bruchteil im Labor kultivierbar. Dieser Anteil koloniebildender Mikroorganismen aus der Gesamtheit aller unter dem

Mikroskop sichtbaren Zellen beträgt beispielsweise bei Meerwasser 0,001-0,01 % und bei Süßwasser 0,25 % (Amann et al., 1995). Von allen lebenden Mikroorganismen einer Grundwasserprobe konnten in einer anderen Studie circa 1% kultiviert werden (Ultee et al., 2004). Da bei den Untersuchungen der Quellen an der Halde Hattorf nur cfu/ml bestimmt wurde, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die eigentliche Zahl der in den Quellwässern vorhandenen Mikroorganismen wesentlich höher ist. Die komplette Diversität der Quellen kann bei weiteren Arbeiten mithilfe der aufgehobenen und eingefrorenen drei Filter je Quelle analysiert werden.

Um die vorkommende Diversität genauer zu beschreiben, werden die isolierten Arten und Gattungen noch genauer betrachtet. Die Gattung *Bacillus* sp. besteht aus sehr vielen unterschiedlichen Arten, mit unterschiedlichen Habitaten wie Böden (Bharti et al., 2013), Meere (Bahamdain and Fahmy, 2015) oder auch Grundwasser (Griebler and Lueders, 2009). Manche *Bacillus* Arten sind halotolerant oder halophil (Galinski and Trüper, 1994), wie der öfter in den Datenbanksuchen aufgetauchte, aber nicht isolierte *Bacillus subtilis*. Das Auftauchen dieser Art in verschiedenen Suchen könnte auf eine engere Verwandtschaft mit der gesuchten Sequenz, und somit auf ähnliche Eigenschaften wie Halotoleranz, hindeuten. Zu den einzelnen isolierten Arten konnten ebenfalls Berichte zu in diesen Quellen nötigen Eigenschaften gefunden werden. So war *Bacillus pumilus* Teil einer Studie zur Verbesserung von Pflanzenwachstum auf salzhaltigen Böden (Bharti et al., 2013) und *Bacillus simplex* zeigte ein großes Potential bei der Biosorption von Metallen (Valentine et al., 1996). Das Isolat *Brevibacterium frigoritolerans* zählt ebenfalls zu den *Bacillus*-Arten (Beesley et al., 2010).

Die Gattung *Pseudomonas* sp. ist ein häufiges Grundwasserisolat (Beyer et al., 2015) (Griebler and Lueders, 2009), welche auch einige halophile Bakterien und halotolerante Bakterien, wie der zweimal isolierte *Pseudomonas fragi*, beinhaltet (Russel, 1993).

Auch einige der nur einmal isolierten Arten konnten in Verbindung mit Halophilie oder Halotoleranz gebracht werden. In der Gattung *Flavobacterium* beispielsweise sind neben Grundwasserisolat (Beyer et al., 2015) auch auch halophile Arten ausgemacht worden (Oren, 2002). Andere an hohe Salzkonzentrationen angepasste Bakterien sind *Rhodococcus erythropolis* (Brandão et al., 2003), (Xia et al., 2017), das moderat halophile *Salinicola salaries* (de la Haba et al., 2009), *Virgibacillus* sp. (Phrommao et al., 2011) und *Shewanella* sp. (Venkateswaran et al., 1999).

Die Gattung *Shewanella* ist in diesem Artikel in mehrere Verwandtschaften unterteilt, von denen eine als halophile und eine andere als halotolerant beschrieben wird. Obwohl *Shewanella baltica* in dem Artikel kaum genannt wird, ist das Bakterium bei den Halotoleranten mit aufgelistet. Weitere Gattungen in Verbindung mit Isolation aus dem Grundwasser sind beispielsweise *Sphingomonas* sp., *Carnobacterium* sp. und *Chrysoebacterium* sp..

Neben den grundwassertypischen und salztoleranten Bakterien wurden auch viele Phytopathogene oder Endophyten isoliert, wie *Curtobacterium falccumfaciens* (Lacava et al., 2007), *Erwinia billingae* (Mergaert et al., 1999) und *Panteoa* sp (Hauben et al., 1998), *Paenibacillus* sp. (Senthilkumar et al., 2007), welcher als nicht salztolerant beschrieben wird (Zhang et al., 2012), und *Rhodococcus fascians* (Nacoulma et al., 2013), welcher auch im Grundwasser vorkommt (Griebler and Lueders, 2009). Auch die Art *Erwinia amylovora*, welche durch die falsche PCR-Amplifikation bestimmt wurde, zählt hierzu (Hauben et al., 1998).

Bis auf *Paenibacillus* sp. wurden alle gelisteten Pflanzenpathogene aus Quelle 1 isoliert. Durch den längeren Fließweg durch bewachsene Wiesen der Quelle 1 im Vergleich zu dem kürzeren geschlossenen Fließweg der Quelle 10 jeweils vor dem Probenahmeort sind in das Wasser der Quelle 1 wohl schon mehr Umweltkontaminationen eingetragen worden, welche nicht an Grundwasser oder hohe Salzkonzentrationen angepasst sind. Das wäre auch eine Möglichkeit, um die höheren cfu/ml-Werte der Standard-I-Filterplatten in Quelle 1 zu erklären, da nicht an nährstoffarme Bedingungen gewöhnte Bakterien auf den R2A-Platten nicht gut wachsen würden.

Die zwei in Quelle 10 auf Standard I vereinzelt *Shewanella*-Isolate besaßen beide die in dieser Quelle häufig isolierte Morphologie der transparent-orangen Farbe mit dunklen Flecken. Da sowohl diese Morphologie als auch die Gattung in keiner anderen Medien-Quellen Kombination zu finden war, und die anderen Isolate bei der Sequenzierung keine Ergebnisse brachten, kann vermutet werden, dass alle dieser morphologisch ähnlichen Isolate der Gattung *Shewanella* sp. angehören.

Die Gattung *Cladosporium* sp. der mehrzelligen Pilze besitzt mehrere salztolerante Arten, welche in vielen salzbeeinflussten Habitaten sogar dominieren (Sepcic et al., 2010), welche auch als einzige Gattung der Pilze in Quelle 10 gefunden werden konnte. Die Hefe *Rhodotorula sphaerocarpa*, welche dreimal in Quelle 1 isoliert wurde, wird häufig im Meer und aus Seen isoliert (Brandão et al., 2017), wodurch der Sprung zu einem salzhaltigen Grundwasserleiter als Habitat nicht sehr weit scheint.

Epicoccum nigrum dagegen ist wie viele Bakterien aus Quelle 1 ein auf Pflanzen wachsender Pilz (Baute et al., 1978).

Wie die Bakterien zeigen die Pilze auch sowohl Anpassungen an Wasserhabitate und hohe Salzkonzentrationen bei den viel isolierten Gattungen, während bei den weniger oft isolierten Gattungen entweder oft nicht beide Arten der Anpassung gefunden wurden oder statt Anpassungen Hinweise auf Kontamination aus der Umwelt gefunden werden konnten.

1.3 Vergleich der mikrobiellen Diversität in Grundwasser-Aquiferen⁴

Das in Thüringen lokalisierte Werra-Kali-Gebiet zählt zu den größten natürlichen Salzlagerstätten in Deutschland. Als Ergebnis des Kalisalzabbaus durch das Bergbauunternehmen K+S Kali GmbH verursachen die Rückstandshalden einen enormen Anteil an salzhaltigen Abwasser, welches in den Untergrund sickert und möglicherweise das Grundwasser negativ beeinflusst. Um diese Einflüsse beurteilen zu können, errichtete K+S Kali GmbH mehrere Grundwassermessstellen in der Umgebung der ESTA-Rückstandshalde Hattorf in der Nähe von Unterbreizbach. Durch das Anwenden von physiologischen und molekularbiologischen Verfahren wurden zwei potenziell durch den Salzabbau beeinflusste Grundwasser-Aquifere auf mikrobielle Diversität untersucht. Dabei wurde ein schwebender Grundwasserleiter (GWM-09) und ein tiefer liegender Hauptgrundwasserleiter (GWM-24/2012 HA) beprobt.

Es wurden physiologische Verfahren, wie zum Beispiel der Oxidation/Fermentation-Test und der Gram-Test, zur Beschreibung der isolierten Stämme durchgeführt. Durch molekularbiologische Methoden konnten die verschiedenen Grundwasserbakterien bis zur Art-Ebene genetisch bestimmt werden.

Insgesamt wurden 54 Reinkulturen für GWM-24/2012 HA und 25 für GWM-09 isoliert. Die isolierten Bakterien der beiden Aquifere unterscheiden sich morphologisch und die Mehrheit der aus dem Hauptgrundwasserleiter isolierten Stämme ist gram-negativ. Der schwebende Grundwasserleiter wird vor allem durch gram-positive Bakterien besiedelt. Die meisten Bakterienstämme aus GWM-24/2012 HA sind aerob und die Mehrheit der Isolate aus GWM-09 ist inert. Es befinden sich mehr Siderophore produzierende Bakterien im Haupt-Aquifer als im schwebenden Grundwasserleiter. Die Sequenzierung ergab eine unterschiedliche mikrobielle Diversität in beiden Aquiferen. Für GWM-24/2012 HA wurden die Bakteriengattungen *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Janthinobacterium* und *Schewanella* mit 29 unterschiedlichen Arten nachgewiesen und für GWM-09 die Gattungen *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Luteibacter* und *Pseudomonas* mit 10 verschiedenen Spezies. Es konnte gezeigt werden, dass der Haupt-Aquifer und der schwebende Grundwasserleiter eine unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung aufweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass das salzhaltige Abwasser der ESTA-Rückstandshalde Hattorf die mikrobielle Diversität beeinflusst.

1.3.1 Lebensraum Grundwasser

Der Lebensraum Grundwasser ist vor allem durch seine hydrologische, chemische und geologische Heterogenität geprägt. Für Mikroorganismen stellt dieses Ökosystem ein extremes Habitat dar. Vor allem die Nährstoffarmut (Oligotrophie), die geringe Verfügbarkeit an gelösten organischem Kohlenstoff (C_{org}), niedrige konstante Temperaturen (10-12 C) und der Mangel an Licht erfordern eine Anpassung der Grundwasserbewohner (Griebler und Mösslacher, 2003). Die mikrobielle Diversität in Aquiferen setzt sich vor allem aus heterotrophen Organismen (C_{org} -Assimilation) und lithoautotrophen Lebewesen, welche anorganische Substrate als Energiequelle verwenden, zusammen. Die Bakterienanzahl im Grundwasser variiert zwischen 10^2 10^6 Zellen=mL und in den Sedimentschichten zwischen 10^4 10^8 Zellen=mL. Zahlenmäßige Schwankungen können unter anderem durch räumliche Heterogenität, zeitliche Variabilität (Jahreszeiten) und durch Störungen, wie zum Beispiel anthropogene Verschmutzungen, auftreten (Griebler und Lueders, 2009).

Innerhalb der Domäne Bacteria lassen sich Vertreter der Abteilungen Proteobacteria, Bac-teroidetes, Actinobacteria und Firmicutes in Aquiferen nachweisen. In unberührten oberflächennahen (< 50 m) Kluft-Aquiferen sind Angehörige der Klasse α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria und Bacilli anzutreffen. Des Weiteren bewohnen neben Organismen der Abteilung

⁴ aus: Elisabeth Sommerwerk, 2014, Vergleich der mikrobiellen Diversität in Grundwasser-Aquiferen. Bachelorarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Proteobacteria auch Nitrospirae, Crenarchaeota und Bacteroidetes Karstsysteme sowie Höhlen (Griebler und Lueders, 2009).

Das Untersuchungsgebiet befindet sich im Werra-Kali-Gebiet, welches mit 1100 km² zu den größten natürlichen Salzvorkommen in Deutschland zählt. Die dort vorkommenden Kalilagerstätten werden im Norden vom Richelsdorfer Gebirge, im Nordosten vom Thüringer Wald und im Süden von der Rhön begrenzt. Die Lagerstätten des Zechsteins bildeten sich vor 250 Millionen Jahren (Oberes Perm) durch mehrere Verdunstungszyklen des damaligen Zechsteinmeeres. Dadurch entstanden mehrere flach lagernde Kaliflöze innerhalb mächtiger Steinsalz-Ablagerungen (Krupp, 2011). Durch das Bergbauunternehmen K+S Kali GmbH werden die beiden Kaliflöze „Hessen“ und „Thüringen“ untertägig abgebaut. Das vor 150 Jahren gegründete Unternehmen ist laut eigenen Angaben weltweit fünftgrößter Kaliproduzent. Jährlich werden durch K+S Kali GmbH in sechs deutschen Bergwerken kali- und magnesiumhaltige Rohsalze gefördert. Neben Bergwerken in Niedersachsen, Sachsen-Anhalt und Hessen unterhält das Unternehmen Werke in Thüringen. Seit 1905 wird im thüringischen Bergwerk Hattorf (Verbundwerk Werra) in der Nähe von Unterbreizbach an der Grenze zu Hessen Kalisalz gewonnen. Das geförderte Salz besteht zu 70 % aus Steinsalz (NaCl) und 30 % aus dem wertvollen Kalisalz. Das Endprodukt wird vor allem in der Landwirtschaft als Düngemittel eingesetzt, aber auch andere Bereiche, wie Pharmazie und Industrie sind wichtige Abnehmer des Kalisalzes.

Kalisalz besteht vor allem aus dem Mineral Carnallit ($\text{KMgCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), Halit (NaCl), Kieserit ($\text{Mg}[\text{SO}_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und Sylvin (KCl). Carnallit kommt als Bestandteil von Eva-poriten und oft in Verbindung mit Steinsalz, Kieserit und/oder anderen Salzmineralen vor. Es bildet die oberste Salzschiefer in den nord- und mitteldeutschen Kalisalz-Lagerstätten (Carnallit-Region) und stellt das wichtigste Kalisalz-Mineral dar. Das auch unter dem Namen Steinsalz bekannte Mineral Halit bildet einen Hauptbestandteil von Evaporiten (Ausscheidungs-Sedimente). Diese wechsellagern oft mit Kalisalzen und Anhydrit- beziehungsweise Gipssteinen. In der chemischen Industrie stellt Halit einen sehr wichtigen Rohstoff dar, der zum Beispiel zur Herstellung von Salzsäure, Soda oder Chlorgas benötigt wird. Kieserit zählt zur Mineralklasse der Sulfate und wird neben den Halogeniden (Carnallit, Halit, Sylvin) als Düngemittel eingesetzt. Sylvin stellt ein eher selten vorkommendes Mineral dar und ist das Ausgangsprodukt für ein hochwertiges Kalidüngersalz.

Jährlich werden durch K+S Kali GmbH 25 Mio. Tonnen Rohsalz gefördert und 20 % zu Ware verarbeitet. Die festen Fabrikrückstände (59%) werden auf obertägigen Rückstandshalden deponiert oder als Endlaugen (21 %) seit 1925 in den Plattendolomit des Zechsteins versenkt. Auch wird die hochkonzentrierte Salzsole in die Werra eingeleitet. Seit der Einführung des elektrostatischen Trennverfahrens (ES-TA) im Jahre 1981 ist es möglich, Stein- vom Kalisalz im trockenen Zustand voneinander zu trennen, sodass die Salzabwassermenge verringert werden konnte. Um mögliche Beeinflussungen der Grundwasserleiter (Hauptgrundwasserleiter, schwebender Grundwasserleiter) durch den Kalisalzabbau und die damit verbundenen potenziellen Haldensickerwässer frühzeitig zu erkennen, errichtete K+S Kali GmbH mehrere Grundwassermessstellen in der Nähe der ESTA-Rückstandshalde Hattorf, von denen zwei in dieser Arbeit beprobt und auf mikrobielle Diversität untersucht wurden.

Grundwasser stellt mit 70 % die größte Trinkwasserressource für Deutschland dar. Weil diese natürliche Ressource für die Menschheit nicht unerschöpflich ist, sollte dem Grundwasserschutz eine hohe Priorität eingeräumt werden. Dem gegenüber steht einer der wichtigsten Wirtschaftsfaktoren für Deutschland - der Export von Rohstoffen. Neben Baustoffen wie Kies und Energierohstoffen wie Braun- und Steinkohle zählen Kalisalze zur Herstellung von Düngemitteln zu den meist exportierten Rohstoffen Deutschlands. Im Vergleich der beiden Grundwasser-Aquifere treten jeweils unterschiedliche Morphologien auf (Tab. 1.8).

Tab. 1.8 Morphologie der isolierten Bakterienstämme und deren Häufigkeit

Parameter	GWM-24/2012 HA	GWM-09
Form	rund > rund mit Saum > irregulär > L-förmig > konzentrisch	rund > irregulär > L-förmig > konzentrisch = filamentös
Oberfläche	glänzend	glänzend > trüb/matt
Textur	feucht > schleimig/buttrig > trocken	trocken > feucht > schleimig
Farbe	weiß > beige > gelb > violett > orange	weiß > beige > gelb > rosa = orange
Erhebung	flach > erhöht > konvex	flach > erhöht > kraterförmig
Rand	ganzrandig > filamentös > wellig	ganzrandig > wellig = irregulär = gelappt /gewimpert

Die durchschnittliche Größe der Bakterien beträgt 3 mm. Die meisten Bakterienstämme haben eine glänzende Oberfläche, in GWM-09 lassen sich hingegen noch Bakterien mit einer trüb/matten Oberfläche beobachten. Farblich unterscheiden sich die isolierten Stämme kaum, es treten in beiden Messstationen weiße, beigefarbene, gelbe und orangene Formen auf. In GWM-24/2012 HA ließen sich hingegen auch violette und in GWM-09 rosafarbene Bakterienkolonien antreffen. (Abb. 1.16, 1.17). Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurde der Mittelwert aus der Dreifachbestimmung für beide Nährmedien gebildet (Tab. 1.9).

Bei beiden Grundwassermessstellen wurden auf dem R2A-Medium die meisten kolonie-bildenden Einheiten (cfu) festgestellt. Vergleicht man beide Aquifere miteinander, so fällt auf, dass eine höhere Zellzahl in GWM-24/2012 HA im Vergleich zu GWM-09 zu verzeichnen ist.

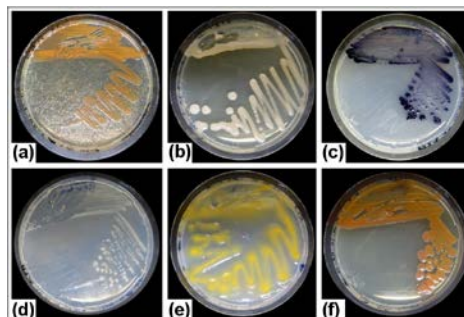


Abb. 1.16: Morphologie der isolierten Stämme von GWM-24/2012 HA, Probenkürzel: (a) -1 2 (o), (b) -3, (c) -14 (l), (d) -14 (w), (e) -16 (g) [w], (f) -20 (g) [o].

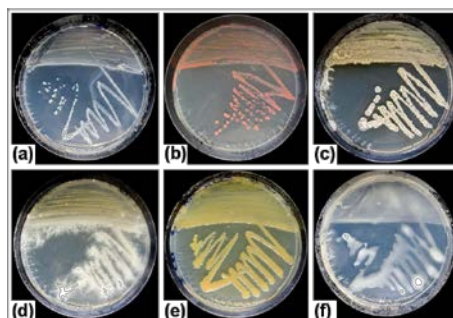


Abb. 1.17: Morphologie der isolierten Stämme von GWM-09, Probenkürzel: (a) -2, (b) -27 2, (c) -34, (d) -32, (e) -33, (f) -8.

Tab. 1.9: Vergleich der Lebendzellzahl für beide Messstationen und beide Nährmedien (Mittelwert der Dreifachbestimmung)

Nährmedium	GWM-24/2012 HA		GWM-09
R2A	$3; 5 \cdot 10^3$	c f u=mL	640,0 c f u=mL
Std I	$1; 0 \cdot 10^3$	c f u=mL	173,4 c f u=mL

Die Mehrheit der isolierten Stämme aus GWM-24/2012 HA (65 %) produziert Siderophore (Abb. 1.18). Im Vergleich dazu ist die Anzahl der Siderophore bildenden Bakterien aus GWM-09 mit 44 % geringer.

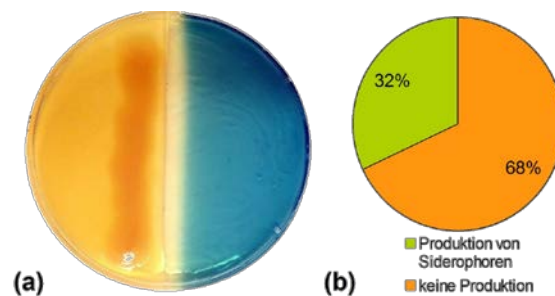


Abb. 1.18: Produktion von Siderophoren bei den vollständigen CAS-Agarplatten

Die durch die Produktion von Siderophoren hervorgerufenen Farbumschläge des blauen CAS-Mediums reichen von weiß/gelb bis rot/violett. Die Mehrheit der Siderophore bildenden Stämme von GWM-24/2012 HA (60 %) bewirkt dabei eine rote Verfärbung des Mediums (Abb. 1.19). Im Vergleich dazu bilden lediglich 7 % der positiv reagierenden Bakterienisolate aus GWM-09 Stoffe, welche eine Rot-/Violett färbung hervorrufen. Hier wurde vor allem eine Farbreaktion von blau zu weiß/gelb beobachtet.

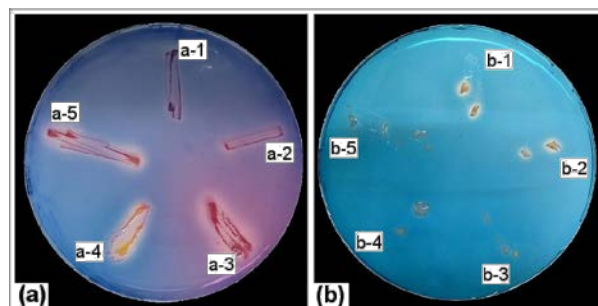


Abb. 1.19: Unterschiedliche Farbumschläge des vollständigen CAS-Tests (a) GWM-24/2012 HA, Probenkürzel: (a-1) -17 (l), (a-2) -17 (w), (a-3) -19, (a-4) -18 (o), (a-5) -18 (g), (b) GWM-09, Probenkürzel: (b-1) -28, (b-2) -14 1, (b-3) -6 1, (b-4) -1, (b-5) -2

Die für GWM-24/2012 HA hergestellten geteilten CAS-Agarplatten (Abb. 1.20) weisen widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zu den Resultaten der CAS-Platten nach Schwyn und Neilands (1987) auf. Im Vergleich zu diesen bilden nur 32 % der isolierten Stämme auf den geteilten CAS-Agarplatten Siderophore. Fünf Stämme produzierten auf diesem Medium Siderophore, wogegen dieselben Isolate auf den vollständigen CAS-Platten keine Farbreaktion zeigen.

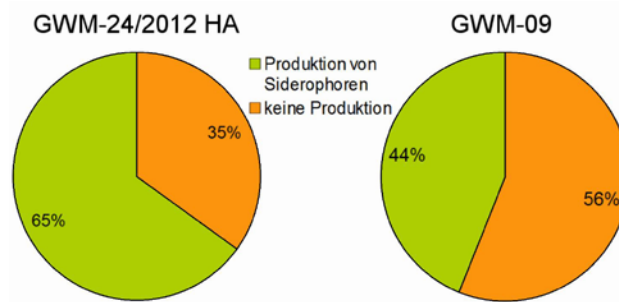


Abb. 1.20: Produktion von Siderophoren bei dem geteilten CAS-Test (GWM-24/2012 HA)-30, (b) Prozentuale Verteilung der Produktion von Siderophoren

1.3.2 Physiologische Charakterisierung

Im Oxidation/Fermentation-Test unterscheiden sich die Bakterien der beiden Aquifere hinsichtlich der Metabolisierung von Glucose (Abb. 1.21). 86 % der isolierten Stämme in GWM-24/2012 HA benötigen Sauerstoff, um Glucose zu verstoffwechseln. Jeweils vier Bakterienstämme sind fakultativ anaerob oder können keine Glucose verwerten (inert). Im Vergleich zu GWM-24/2012 HA können 72 % der Grundwasserbakterien von GWM-09 dieses Monosaccharid nicht metabolisieren. 24 % sind des Weiteren aerob und lediglich 4 % können unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen Glucose metabolisieren. Neben der Farbreaktion wurde auch die Bildung von freigesetztem Gas notiert. Insgesamt bilden 69 % der Bakterien von der Messstelle GWM-24/2012 HA und 52 % der isolierten Stämme von GWM-09 Kohlenstoffdioxid. Die Mehrheit der isolierten Stämme aus GWM-24/2012 HA sind mit 78 % gram-negativ (Abb. 1.22). Im Vergleich dazu zählen die meisten Isolate aus GWM-09 zu den gram-positiven Bakterien (88 %).

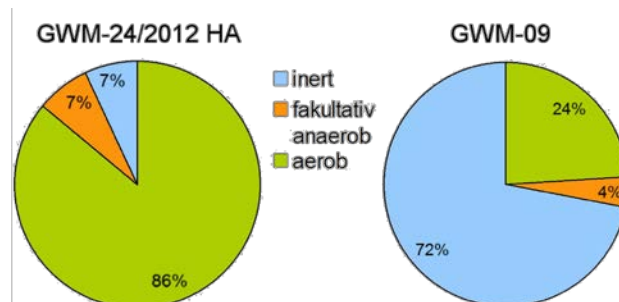


Abb. 1.21: Verschiedene Wege des Glucoseabbaus bei dem O/F-Test

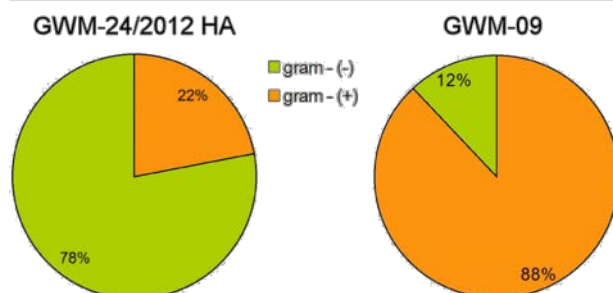


Abb. 1.22: Ergebnisse des KOH-Tests - Gramverhalten der isolierten Stämme

Durch die Sequenzierung konnten 63 Bakterienstämme bis zur Art beschrieben werden. Der Stamm mit der Bezeichnung GWM-24-9 konnte wegen zu kurzer Nukleotidsequenz nicht ausgewertet werden. In GWM-24/2012 HA wurden Bakterien der Abteilung Proteobacteria und Bacteroidetes isoliert (Abb. 1.23). Im Vergleich dazu konnten in GWM-09 neben der Abteilung Proteobacteria noch Bakterien der Abteilung Actinobacteria und Firmicutes isoliert werden. Des Weiteren konnten in GWM-24/2012 HA fünf Bakteriengattungen (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Janthinobacterium* und *Schewanella*) mit 29 unterschiedlichen Arten nachgewiesen werden. Im Grundwasser der Messstelle GWM-09 ließen sich vier Bakteriengattungen (*Bacillus*, *Arthrobacter*, *Luteibacter* und *Pseudomonas*)

mit 10 verschiedenen Stämmen aufzeigen. In beiden Messstellen waren bis auf die Gattung *Pseudomonas* ganz unterschiedliche Bakteriengattungen anzutreffen. Aus GWM-24/2012 HA konnten im Vergleich zu GWM-09 mehr unterschiedliche Bakterienarten isoliert werden. Damit weist GWM-24/2012 HA eine höhere mikrobielle Diversität auf als GWM-09.

1.3.3 Phylogenie

Einige Bakterien, wie *Bacillus* oder *Clostridium*, können bei ungünstigen Umgebungsparametern, wie in diesem Fall eine hohe Salzkonzentration, Sporen bilden. Sporen sind Überdauerungsformen und resistent gegen Trockenheit, Hitze, Strahlung und chemische Noxen. Wenn sich die Umweltbedingungen verbessern (zum Beispiel durch das Aufbringen des Probenwassers auf Nährmedien), keimen die Sporen wieder aus. Vermutlich beinhaltet das Grundwasser von GWM-09 eine hohe Sporenanzahl. Um eindeutige Ergebnisse zu erzielen, sollten neben dem KOH-Schnelltest weitere Methoden wie die Gram-Färbung angewendet werden.

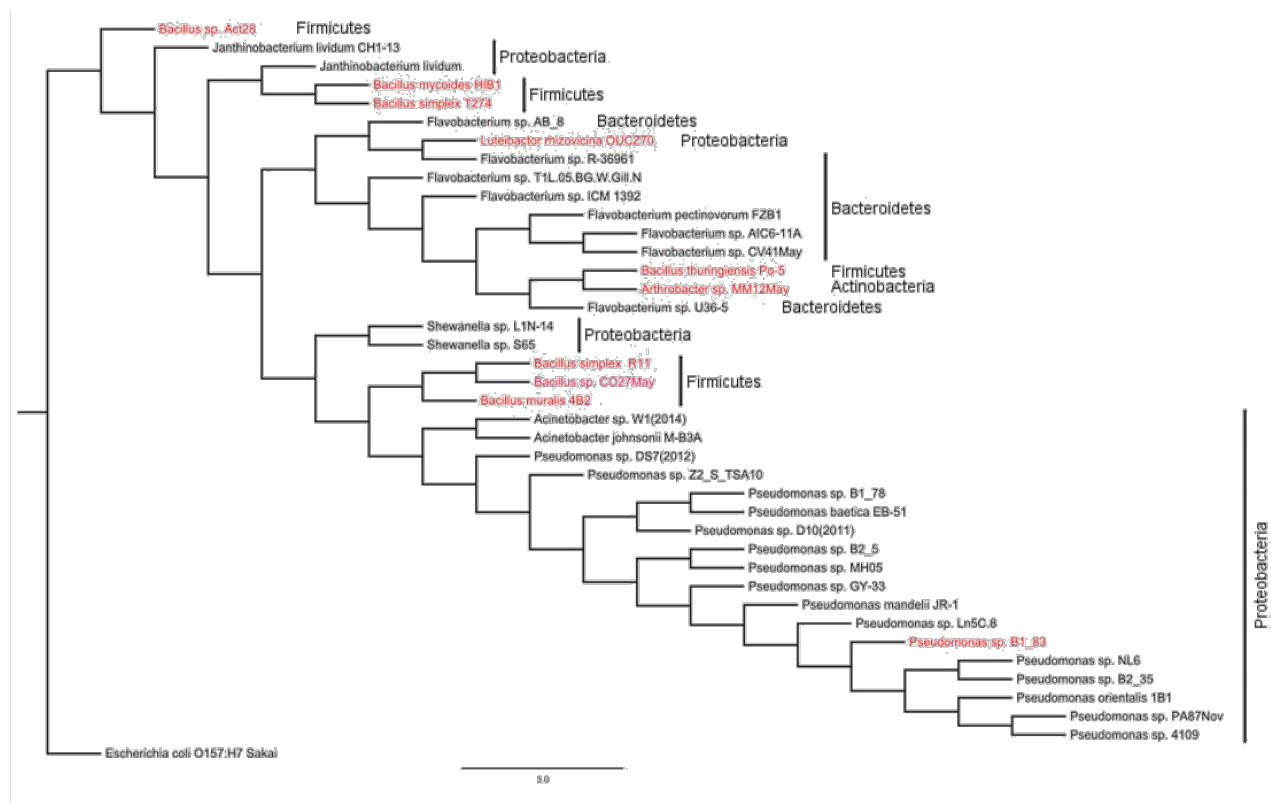


Abb. 1.23: Phylogenetischer Stammbaum für GWM-24/2012 HA (schwarz) und GWM-09 (rot)

Um die Anzahl der Sporen zu detektieren, könnte die Probe angefärbt und anschließend mikroskopiert werden. Hier besteht allerdings das Problem, dass die Unterscheidung zwischen Salzpartikel und Spore problematisch ist. Man könnte als ein weiteres Testverfahren für den Sporennachweis das Probenwasser für zwei Stunden bei 80 C aufbewahren, da bei diesen Temperaturen nur die Sporen überleben.

Nach Tiquia et al. (2007) wurden in salzreichen Grundwässern Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Halobacillus*, *Paenabacillus*, *Halomonas* und *Clostridium* nachgewiesen. Die Gattung *Bacillus* kommt dabei auch im Grundwasser-Aquifer GWM-09 vor, allerdings ließen sich halotolerante/halophile Gattungen wie *Halobacillus* oder *Halomonas* isolieren. Die Gattung *Bacillus* beinhaltet ubiquitär vertretene Bakterien, welche Sporen ausbilden können.

2. Untersuchungsgebiet Morassina

Die Schwarzschiefer, die in Osttüringen zur Uranerzgewinnung genutzt wurden, bieten ein zweites, für die Freisetzung von Radionukliden interessantes Untersuchungsobjekt. Hier wurden insbesondere Pilze isoliert und charakterisiert, deren Beitrag zur biologischen Verwitterung und damit zur Freisetzung von Radionukliden und Schwermetallen weit schlechter verstanden ist, als der von Bakterien. Dazu wurden Proben aus dem Bergwerk Morassina verwendet, die eingehend charakterisiert wurden.

2.1 Mikrobiomanalyse von Eisenpräzipitaten und saurer Grundwässer des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes „Morassina“⁵

Das ehemalige Alaunschieferbergwerk „Morassina“ befindet sich in Schmiedefeld und liegt somit im Thüringischen Schiefergebirge. Das erste Mal erwähnt wurde es 1683 als Förderstätte von Alaunschiefer, welches zur Gewinnung von Eisen- und Kupfervitriol, Alaun, Schwefel, Schwefelsäure und diversen Farberden diente (Müller 1994). Hierfür wurde das vorhandene Material entweder direkt verarbeitet oder durch Laugung des Materials der Alaunschiefer gewonnen. 1853, knapp 200 Jahre später, wurde das Bergwerk geschlossen. Erst 1951 wurde das Bergwerk durch die Sowjetische Aktiengesellschaft Wismut (SAG Wismut) wiedereröffnet, um nach radioaktivem Material zu suchen.

Der dort vorkommende Graptolithenschiefer entstand während des Silurs und besitzt in Morassina eine Mächtigkeit von bis zu 40m. Es ist zudem bekannt, dass Schiefergesteine eine hohe Konzentration von radioaktiven Elementen, wie Uran und Thorium aber auch Vanadium beinhalten können (Pacton *et al.* 2011). Neben den Primärmineralen Eisen- und Kupfervitriol gibt es in Morassina auch verschiedene sekundäre Minerale wie z.B. Kalialaun bzw. Kalinit ($KAl[SO_4]_2$), Jarosit ($KFe_3^{3+}[(OH)_6/(SO_4)_2]$), Schwertmannit ($Fe_{16}^{3+}[O_{16}/(OH)_{10}/(SO_4)_3] \cdot 10H_2O$) und Giniit ($(Fe^{2+}Fe_4^{3+}[(OH)_2/(PO_4)_4] \cdot 2H_2O)$). Bereits 1995 wurden weitere primäre Mineralbestandteile wie Illit ($(K,H_3O)Al_2[(H_2O,OH)_2/(Si,Al)_4O_{10}]$), Quarz (SiO_2), Graphit (C), Muskovit ($KAl_2[(OH)_2/AlSi_3O_{10}]$) und Pyrit (FeS_2) identifiziert.

Die dortigen Stalagmite und Stalagmite wurden zuerst von Deubel und Naumann (1929) beschrieben. Dabei fanden sie heraus, dass die Überzüge der Tropfsteine aus wasserhaltigem Diadochit besteht, welcher durch Eisen oder Kupfer bunte Farbtöne annehmen kann. Die Bildung der einzelnen Sekundärminerale kann in verschiedenen Formen auftreten. So tritt Jarosit bei fast allen gefundenen Verwitterungsbildungen in Form von Aggregaten feinkörniger idiomorpher Kristalle als Stapel von Jarositskristallen oder gelartigen Konkretionen auf. Weiterhin konnte auch bspw. Schwertmannit in verschiedenen Ausbildungen in der gesamten Mine beobachtet werden.

Gerade das Auftreten von Schwertmannit, Pyrit und Jarosit belegt, dass sich in der gesamten Mine Eisen und Schwefel in den Gesteinsschichten und Präzipitaten befindet. Durch das Gestein und die Minerale wurde auch das Grundwasser beeinflusst. Dieses liegt teilweise im sauren Milieu. Das Vorhandensein der verschiedenen Radionuklide, das saure Milieu und das eisen- und schwefelhaltige Gestein sind Faktoren dafür, dass nicht alle Organismen unter solchen Bedingungen dauerhaft leben können. Organismen, die in der Lage sind, Eisen und/oder Schwefel zu oxidieren bzw. zu reduzieren und diese Elemente als Energielieferanten nutzen zu können, sind dabei in der Lage, unter solchen Umweltbedingungen zu überleben. Zudem müssen die im Grundwasser lebenden Mikroorganismen so angepasst sein, sich unter sauren Bedingungen zu vermehren und überhaupt leben zu können.

Da das Grundwasser in Morassina einen niedrigen pH-Wert aufweist ist ein wichtiges Kriterium, das diese Mikroorganismen im sauren Milieu dauerhaft überleben können. Jedoch sind nicht alle, aus diesen drei Domänen stammende Organismen, in der Lage bei niedrigen pH-Werten zu überleben. Es muss also unterschieden werden zwischen denjenigen, die bis zu leicht saurem pH-Wert fähig sind zu überleben und denjenigen, die auch sehr niedrige pH-Werte tolerieren. In der Literatur finden sich verschiedene Klassifizierungsvorschläge. Es wird zwischen „acidotoleranten“ Organismen, welche überlebensfähig sind bis zu einem pH-Wert von 5,5, und „acidophilen“ Organismen unterschieden. Letztere sind selbst bei pH-Werten von unter 5,5 noch lebensfähig.

Solche acidotolerante Mikroorganismen sind zum Beispiel Pilze. Viele Bakterien hingegen sind acidophil, können also auch bei einem pH-Wert von unter 5,5 leben, wie zum Beispiel *Acidithiobacillus* sp. oder bestimmte Archaeen, wie *Sulfolobus* sp., welche zusätzlich auch zur Oxidation von Schwefel

⁵ Aus: Daniel Schäfer, 2015, Mikrobiomanalyse von Eisenpräzipitaten und saurer Grundwässer des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes „Morassina“, Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

befähigt sind. Weitere schwefeloxidierende Organismen bzw. Arten, die auch in der Morassina vorkommen könnten, wären *Thiomicrospira* sp. oder *Aquifex* sp.. Auch verschiedene eisenoxidierende Arten wie Vertreter der beta-Proteobakterien *Leptothrix* sp., *Gallionella* sp. und *A. ferroxidans* sowie die Archaeen *Ferroplasma* sp., *Sulfolobus* sp. und *Ferroglobus* sp. und *Ralstonia* sp. wären denkbar. In anderen Minen, wie der Lubin Mine im Südwesten Polens, bei denen durch Bergbau viele chemische Kontaminationen des Gesteins und folglich der Habitate der Mikroorganismen erfolgt sind, wurden vermehrt *Acinetobacter* sp. und *Pseudomonas* sp. (Matlakowska *et al.* 2014) identifiziert.

Untersuchungen der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR) in Hannover haben in mehreren ehemaligen Minenanlagen und ihren Deponien das Vorkommen an Mikroorganismen verglichen (Korehi *et al.* 2014). Diese Deponien befinden sich in der Nähe von Selebi-Phikwe (Botswana), Freiberg (Deutschland) und Kristineberg (Schweden). Dabei haben die Deponien der Minen gemein, dass sie alle schwefelhaltiges Gestein beinhalten und der pH-Wert des dort vorkommenden Grundwassers mit einem pH-Wert von bis zu 3,2 sehr niedrig ist. Ihre mikrobiologischen Betrachtungen beschränkten sich nur auf Bakterien. Dabei haben sie die jeweilige Bakteriengemeinschaft mittels 16S rDNA Sequenzanalyse taxonomisch zugeordnet und mit der Literatur verglichen. Sie fanden an allen Standorten Proteobacteria und Firmicutes (Korehi *et al.* 2014). Zudem wurden auch unterschiedliche Organismen in unterschiedlichen Tiefen der jeweiligen Probeorte identifiziert (Korehi *et al.* 2014). Je tiefer die Proben zum Beispiel in „Kristineberg“ entnommen wurden, umso mehr änderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Diversität. So wurden nahe der Oberfläche vermehrt Proteobacteria und Actinobacteria gefunden, während in den tieferen Proben Vertreter der Firmicutes dominanter auftraten. Dabei war eine pH-Absenkung von 6,5 auf bis zu 4,6 zu beobachten. Zudem gaben sie an, dass das Vorhandensein potenzieller Sporenbildner und grampositiver Organismen, wie Firmicutes und Actinobacteria, darauf hindeuten würden, dass ein großer Teil des Metabolismus der mikrobiellen Diversität inaktiv zu sein scheint (Korehi *et al.* 2014).

Die am meisten auftretenden Organismen gehören zu den Familien der *Alicyclobacillaceae*, *Peptococcaceae* (Firmicutes), *Hydrogenophylaceae* (Proteobacteria) und *Micrococcaceae* (Actinobacteria). Es ist also davon auszugehen, dass einige dieser Gattungen auch in der Morassina erwartet werden können. Dafür spricht bspw., dass *Hydrogenophylaceae* die Gattung der schwefelreduzierenden Bakterien *Thiobacillus* beinhaltet. Zudem werden vor allem Organismen der *Alicyclobacillaceae* erwartet, da sie acidophile eisen- und schwefeloxidierende Bakterien beinhalten. Diese drei Kriterien sind in der Mine Morassina erfüllt. Sollten nun also einige der oben genannten Organismen in der Grube Morassina nachgewiesen werden können, muss geklärt werden, in wie weit diese Organismen Einfluss auf das Freisetzen von Elementen ins Grundwasser haben.

Viele der oben genannten Elemente sind auch im Grundwasser der Grube Morassina nachgewiesen worden. Ob die Freisetzung lediglich durch eine Verwitterung im Sinne der physikalischen und chemischen Einflüsse stattgefunden hat, oder ob daran auch biologisch katalysierte Prozesse beteiligt waren, muss noch geklärt werden. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch immer klarer, dass nicht nur die chemische und physikalische Verwitterung eine Rolle spielt, also die Zersetzung von Gestein durch chemische Eigenschaften und exogene Kräfte sondern dass Pflanzen und Tiere sowie Mikroorganismen ebenfalls einen starken Einfluss darauf haben (Matlakowska *et al.* 2012). Der Begriff „Bioweathering“ bezieht sich folglich auf biologische katalysierte Prozesse.

Bei der Bodennutzung wurde bereits belegt, dass Mikroorganismen nicht nur eine essentielle Rolle im Kohlenstoffkreislauf haben (Hobara *et al.* 2014), sondern auch bei der Verwitterung von freiliegenden Mineralen (Miltner *et al.* 2009). Die organische Bodensubstanz, ist zum Beispiel einem ständigen Einfluss von physikalischen Bedingungen, wie Niederschlag und Temperaturschwankungen ausgeliefert. Aber auch chemische Einflüssen, wie der pH-Wert des Bodens, sind wichtige Faktoren. Hinzu kommt auch ein biologischer Einfluss durch die lokalen mikrobiellen Gemeinschaften (Hart *et al.* 2013). Es stellt sich die Frage, ob in der Grube Morassina die mikrobiellen Gemeinschaften in der Lage sind, die Freisetzung der Elemente in so großem Maße zu beeinflussen. Ähnliche Vorgänge wurden bereits in anderen Minen, wie z.B. der Kupferschiefermine „Lubin Mine“ in Polen, beobachtet und untersucht (Matlakowska *et al.* 2012). Dabei konnten extrazelluläre Vorgänge beobachtet werden, die darauf hindeuten, dass Mikroorganismen eine große Rolle in der Verwitterung von Mineralen haben (Matlakowska *et al.* 2012). Dabei wurde gezeigt, dass bestimmte Organismen mithilfe von Biofilmen, Vesikeln, Aminosäuren oder anderen extrazellulären Komponenten viele Minerale aus dem Gestein lösen können (Matlakowska *et al.* 2012). Sollten sich nun diese lokalen Punkte der Freisetzung an einer Wassergrenze befinden, wie die Grundwassergrenze, einem See untertage oder Ähnlichem, kann angenommen werden, dass die freigesetzten Stoffe in diese Gewässer gelangen. Dies könnte dazu führen, dass sie für Menschen eine Gefährdung darstellen können, sofern toxische

Minerale bzw. Elemente wie Uran bis ins Trinkwasser gelangen. Die Gehalte wurden bestimmt (Tab. 2.1) und die Mikrobiome analysiert.

Tab. 2.1: Radionuklidkonzentrationen im Bergwerk Morassina

	Wasserproben [Bq/l]				
	²³⁸ U	²²⁸ Th	²²⁸ Ra	²²⁶ Ra	²²² Rn
Morassina	0,95	---	0,028	0,76	5,4
pH-Wert	2,7-3,1				

2.2 Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk Morassina⁶

Der Probenahmeort „Morassina“ liegt südlich von Schmiedefeld in Thüringen im Thüringischen Schiefergebirge. Geologisch setzt sich das Gebiet aus den unteren Schichten des Graptolithenschiefers des Silurs zusammen, dessen Schichtverband an dieser Stelle nach Deubel und Naumann (1929) eine Mächtigkeit von ca. 30 bis 40 m erreicht und durch eine Wechsellagerung von Ton- und Kieselschiefern gekennzeichnet ist. Hierbei ist der Kieselschiefer in bis zu 0,2 m mächtige Lagen in den Tonschiefer bzw. Alaunschiefer eingelagert. Weitere Schichten des Silurs sind mit dem Ockerkalk und dem oberen Graptolithenschiefer im Hangenden lokalisiert, während im Liegenden der ordovizische Lederschiefer auftritt. Das Alaunschieferbergwerk „Morassina“ erstreckt sich über drei Sohlen, wobei der tiefste Punkt 85 m unter der Erdoberfläche liegt. Darüber stehen 48 bis 52 m Deckgebirge an. Das momentan befahrbare Stollensystem ist ca. 3,5 km lang und hat einen Rauminhalt von ca. 30.000 m³ (Müller, 2008). Bergbaugeschichtlich betrachtet wurde das ehemalige Alaunschieferbergwerk erstmals 1683 urkundlich erwähnt. Neben Alaunschiefer wurden aus dem Bergwerk Kupfer- und Eisenvitriol (Herstellung erfolgte aus dem Alaunschiefer) sowie Farberden, Schwefel, Schwefelsäure und Schwefelwasser (Müller, 1994) gewonnen. Da sich der Abbau dieser Elemente bzw. Verbindungen nicht mehr rentierte, wurde das Bergwerk im Jahre 1863 geschlossen. 1951 wurde das Bergwerk durch die Sowjetische Aktiengesellschaft/Sowjetisch-deutsche Aktiengesellschaft Wismut (SAG bzw. SDAG Wismut) im Zusammenhang mit der Uranerzgewinnung zur Exploration und dem anschließenden Abbau wiederholt genutzt (Müller, 2008). Während der Zeit der Stilllegung, konnte sich neben zahlreichen geologischen Gebilden, wie zum Beispiel Tropfsteinen oder Sinterbildung, auch eine mikrobiologische Vielfalt, die man unter anderem durch Pilzfruchtkörper an den bis zu 260 Jahre alten Holzstempeln erkennen kann, entwickeln. 1993 wurde das ehemalige Alaunschieferbergwerk als Schaubergwerk für den Tourismus freigegeben, wobei jedoch nur zwei der Sohlen für Besucher zugänglich sind, so dass insbesondere in der „Tiefen Sohle“, die für Besucher noch unzugängliche Sohle, interessante mikrobiologische Proben gewonnen und untersucht werden konnten.

Es ist bereits bekannt bzw. geochemisch begründet, dass Schiefer reich an Radionukliden sein kann, aber auch im Grundwasser dieses Untersuchungsgebietes konnten die radioaktiven Elemente Radon (5,04 Bq/L), Radium (0,76 Bq/L) und Uran (0,95 Bq/L) nachgewiesen werden. Welche Rolle die Mikroorganismen bei der Mobilisierung bzw. Immobilisierung von Radionukliden spielen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Über das Wasser der „Morassina“ kann weiterhin gesagt werden, dass es mit einem pH-Wert von 2,6 - 3,7 sehr sauer ist, hohe Konzentrationen an Eisen (24,14-57,86 mg/L) und moderate Konzentrationen an Sulfat (195,52–317,70 mg/L) aufweist und eine Wassertemperatur von ca. 8 °C besitzt.

2.2.1 Höhlen als Lebensraum von Mikroorganismen

Zunächst muss hier erwähnt werden, dass aufgrund der Vielfältigkeit in der Beschaffenheit von Höhlen diese als Lebensraum sehr unterschiedlich definiert sein können. Neben natürlich entstandenen Höhlen bilden von Menschen angelegte Höhlen, die dem Bergbau dienen, eine weitere Gruppe. Weiterhin ist dieser Lebensraum in seiner biologischen Vielfalt insbesondere durch die Ressource Licht definiert, da Licht über die Anwesenheit photoautotropher Organismen entscheidet. Neben dem

⁶ aus: Marie Harpke, 2015, Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“, Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie: Harpke M (2017) Spezifizierung mikrobieller (Im)mobilisierungsprozesse von Elementen und/oder Radionukliden aus Schwarzschiefer. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Licht sind Temperatur, die Anwesenheit von Wasser, dessen pH-Wert sowie die geologische Beschaffenheit und Tiefe der Höhle entscheidende Faktoren für die biologische Vielfalt. In Höhlen/Minen, die Zugang zu natürlichem Licht, wie zum Beispiel der „Höhle im Großen Thorstein“ bei Wildalpe (Steiermark), gibt es nicht nur im Eingangsbereich der Höhle Pflanzen, sondern an allen belichteten Stellen. So gibt es in dieser Höhle neben Algen und Kryptophyten, zu denen unter anderem das Moos *Neckera complanata* gehört auch zahlreiche Blütenpflanzen wie zum Beispiel *Viola biflora* oder *Geranium robertianum* (Lämmermayr, 1913).

Diese vielfältige Flora entfällt in Höhlen ohne natürlichen Zugang zum Licht, wie dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“. In diesen Höhlen gibt es nur die sogenannte Lampenflora, autotrophe Pflanzen, die sich im Bereich künstlicher Lichtquellen entwickeln (Dobat 1963). Die Lampenflora besteht hauptsächlich aus Algen (z.B. *Chlorophyceae*), Moosen (z.B. *Musci*) und Farnen (*Cystopteris*) (Passauer, 1996). In diesem Lebensraum ist neben der Lampenflora das Vorkommen von heterotrophen oder mixotrophen Algen, welche ohne Lichtquelle auf heterotrophe Ernährung wechseln können, möglich (Thomas *et al.*, 2011, Claus, 1962). Die mikrobielle Vielfalt in belichteten Höhlen ist häufig durch Cyanobakterien (Kuehn *et al.*, 1992) erweitert. Primär kommen in Höhlen ohne Licht wie zum Beispiel das ehemalige Alaunschieferbergwerk „Morassina“ oder der Movile-Höhle (Rumänien) jedoch Pilze, Bakterien und Archaeen vor. In der Movile-Höhle wurde anhand einer 16S rRNA-Genanalyse festgestellt, dass insbesondere Arten der Gamma- und Betaproteobacteria sowie einige Arten der Firmicutes, Bacteroidetes und Verrucomicrobia vorkommen (Chen *et al.*, 2009). In einer weiteren Höhle, der Lechuguilla-Höhle (New Mexico), wurde neben dem bakteriellen Vorkommen Pilze untersucht. Hierbei wurden *Aspergillus*-Arten, die mit eisen-, mangan- und schwefelreichen Präzipitaten auf Calcitschichten nahe der Wassersäule assoziiert waren, entdeckt (Cunningham *et al.*, 1995). In einer der „Morassina-Mine“ sehr ähnlichen Höhle, der Lubin-Höhle (Polen) wurden Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), Firmicutes und Actinobacteria entdeckt (Matlakowska und Sklodowska, 2009; Matlakowska *et al.* 2012), hierbei wurden jedoch keine Pilze untersucht. Diese bilden eine wichtige Gruppe der höhlenkolonisierenden Mikroorganismen. So wurden unter anderem *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. sowie *Mucor* sp. aus slowenischen Karsthöhlen isoliert. Diese mikrobiellen Gruppen sollen mit dieser Studie im ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ ebenfalls näher charakterisiert werden. Wie bereits erwähnt wurde, hat das Wasser der Grube „Morassina“ einen sehr niedrigen pH-Wert, daher kommen dort insbesondere acidophile Mikroorganismen, die an diese Bedingungen adaptiert sind, vor. In Bezug auf die mikrobielle Vielfalt sind Algen nahezu auszuschließen, da diese photosynthetisch aktiv sind und natürlicher Lichteinfall aufgrund der Höhlenstruktur bzw. der Lage des Untersuchungsgebietes nicht gegeben ist.

2.2.2 Isolate aus dem Bergwerk Morassina

Für diesen Versuch wurden alle mehrzelligen Pilzisolat über 23 Tage beobachtet. Hierbei ist erkennbar, dass die meisten Pilze eher langsam wachsen. Die schneller wachsenden Isolate, primär aus der Gattung *Mortierella* sp. und *Mucor* sp., wuchsen vorwiegend als Bodenmyzel und besaßen nur wenig oder kein Luftmyzel. Lediglich die Isolate MF 53, MF 65, MF 81 und MF 83 bildeten vergleichsmäßig viel Luftmyzel, wobei MF 83 am stärksten und schnellsten wächst. Isolate der Gattung *Sporothrix* sp. sind am langsamsten gewachsen. Dies betrifft insbesondere die Isolate MF 5 und MF 68, da diese im Vergleich zu den anderen *Sporothrix* sp. (MF 30, MF 31) noch langsamer wuchsen.

Um eine schnellere Inkubation zu erreichen, wurde getestet, ob die mehrzelligen Pilze bei Raumtemperatur schneller wachsen als im 10 °C-Inkubationsraum. Weiterhin wurden die Pilze auf ihr Wachstum in der Dunkelheit ohne jeglichen Lichteinfluss getestet, um eine mögliche circadiane Rhythmik des Wachstums auszuschließen. In der „Tiefen Sohle“ fehlen jegliche Lichteinflüsse, während der gelegentliche Lichteinfluss den Bedingungen der „Märchengrotte“ entspricht. Hierbei ist es möglich, die getesteten Pilze in drei Gruppen einzuordnen. Die erste Gruppe entspricht den Pilzen, die im Dunklen weniger wachsen als unter gelegentlichem Lichteinfluss. Weiterhin wachsen diese Pilze unter den erhöhten Temperaturbedingungen besser und besitzen eine andere Morphologie als bei 10 °C. Als Beispiele für diese Gruppe sind in Abbildung 2.1 die Isolate MF 73 und MF 1 gezeigt. MF 1 ist ein besonderes Beispiel, da es das einzige Isolat der Gruppe ist, welches nicht aus der „Tiefen Sohle“ stammt.

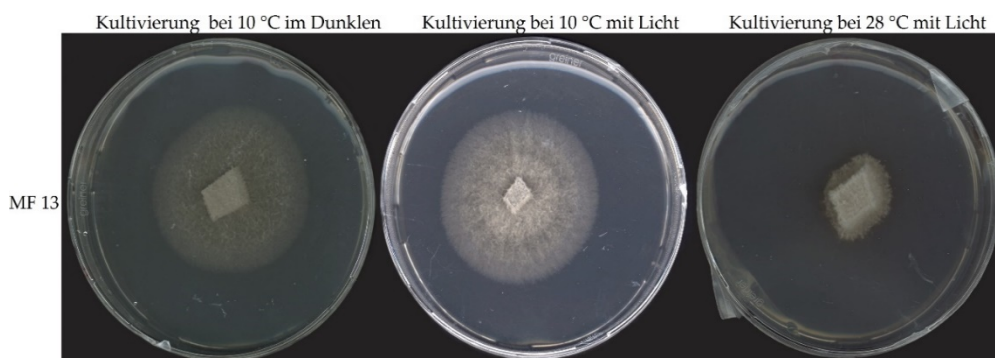


Abb. 2.1: Pilzisolat MF1 und MF73 kultiviert bei unterschiedlichen Bedingungen.

Die zweite und zugleich kleinste Gruppe enthält die Pilze, welche keine offensichtlichen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen der Inkubation bei 10 °C zwischen Dunkelheit und Lichteinfluss zeigen und bei einer erhöhten Temperatur ein verringertes Wachstum aufzeigen, die Morphologie ist ebenfalls ähnlich. Isolat MF 13 wurde hierbei insbesondere auf eine mögliche circadiane Rhythmik getestet, da es bei gelegentlichem Lichteinfluss eine Art zirkuläres Wachstum aufweist. Da dies jedoch bei den veränderten Wachstumsbedingungen verloren geht, kann eine circadiane Rhythmik ausgeschlossen werden. Ein weiteres, besonders interessantes Isolat aus dieser Gruppe ist MF 89. Bei diesem Pilz werden bei der Kultivierung bei 28 °C dunkle Pigmente in das Medium ausgeschieden.

Dieses Wachstumsverhalten ist unter anderen Bedingungen mit geringeren Inkubationstemperaturen, wie sie auch in der „Morassina“ herrschen, nicht beobachtbar. Zum Vergleich sind hier die Kultivierung bei 10 °C im Dunklen und die Kultivierung bei 28 °C mit Licht dargestellt. Ein ähnliches Verhalten weist das Isolat MF 94 auf, hier ist die Pigmentierung jedoch schwächer. In Gruppe 3 sind alle Pilze zusammengefasst, die bei erhöhten Temperaturen kein oder nur kurzzeitiges Wachstum zeigen und bei Dunkelheit ein vermindertes Wachstum aufweisen. Diese Gruppe ist die größte Gruppe..

Neben diesen 3 Hauptgruppen gibt es noch weitere Isolate, deren morphologische Unterschiede zwischen diesen Wachstumsbedingungen mit keinem der anderen Isolate vergleichbar sind oder besondere Auffälligkeiten wie zum Beispiel die MF 75 aufweisen. Dies betrifft weiterhin MF 19, MF 65 und MF 92. So entstehen bei MF 75 während der Kultivierung im Dunkeln Guttationstropfen, die unter anderen Bedingungen nicht oder erst später (weit nach der Wachstumsaufnahme) entstehen. MF 65 ist aufgrund der nahezu gleichen Wachstumsverläufe unter sämtlichen Wachstumsbedingungen nicht in eine der vorher beschriebenen Gruppen einzuordnen. Bei diesem Isolat kann man lediglich bei der Kultivierung bei 28 °C eine leichte morphologische Veränderung beobachten, hier wird weniger Luftmyzel gebildet und der Wachstumsverlauf des Myzels ist besser erkennbar, da dieses filamentöser wirkt.

Bei MF 92 zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei MF 1, jedoch ist die Sporenbildung hier scheinbar bei höheren Temperaturen beeinträchtigt, während sie bei 10 °C im Dunkeln am stärksten stattfindet, dies ist entgegengesetzt zum Verhalten von MF 1. Von besonderem Interesse ist jedoch das Isolat MF 19, denn dieses ist in seiner Morphologie hoch divers. Es wächst bei 10 °C langsam und zoniert, d.h. das Myzel wächst zunächst schnell und flach (viel Bodenmyzel), dann langsam und dick (viel Luftmyzel). Hierbei wächst der Pilz im Dunkeln schneller und bildet mehr Luftmyzel als unter Lichteinfluss. Durch dieses zonierte Wachstum wurde eine mögliche circadiane Rhythmik vermutet, welche jedoch aufgrund des nicht-zonierten Wachstums bei 28 °C ausgeschlossen werden kann.

Um eindeutig zu klären ob die Isolate, Bakterien oder einzellige bzw. anamorphe Pilze sind, wurde von sämtlichen uneindeutigen Präparaten eine Gram-Färbung angefertigt und diese unter dem Mikroskop untersucht. Hierbei ist erkennbar, dass von 67 Isolaten 17 Bakterien und 50 Hefen bzw. einzellige Pilze sind. Um eine genaue Analyse der Isolate zu erstellen, wurden diese zunächst nach ihrer Herkunft bestimmt. Ein Großteil der Isolate wurde aus dem Grundwasser der „Tiefen Sohle“ gewonnen. Insgesamt übersteigt die Anzahl der Isolate mit 64 aus der „Tiefen Sohle“ die der „Märchengrotte“ mit 37 um nahezu das Doppelte. Während in der „Tiefen Sohle“ die meisten Isolate aus dem Grundwasser gewonnen wurden, entstammen die Isolate der „Märchengrotte“ insbesondere von den Präzipitatproben (Abb. 2.3, 2.4).

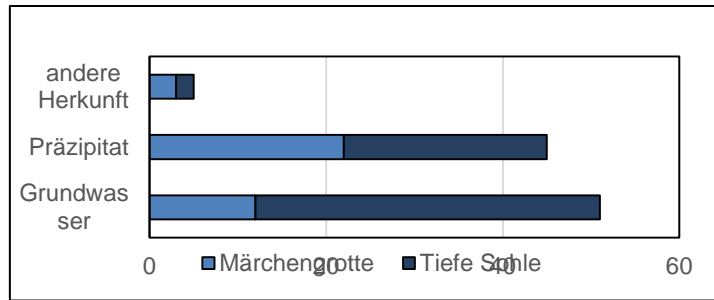


Abb. 2.3: Herkunft und Probenart der Bakterien und Pilze.

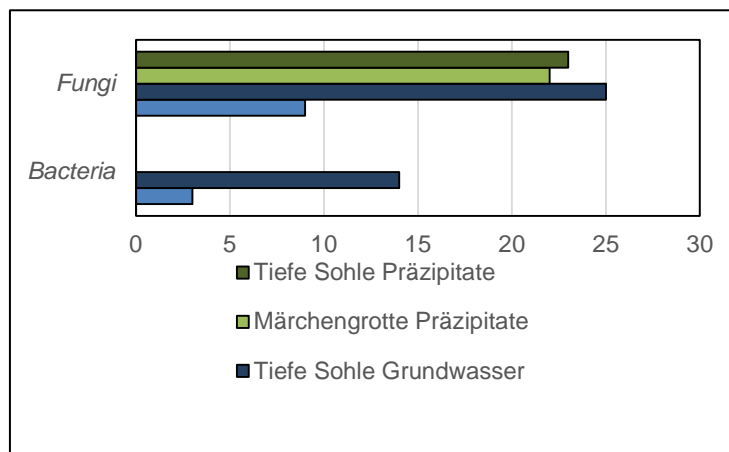


Abb. 2.4: Herkunft nach Bakterien und Pilzen.

2.2.3 Bakterien aus dem Bergwerk Morassina

Zur näheren Charakterisierung der Bakterienisolate wurde eine Gram-Färbung angefertigt (Tab. 2.2). Diese dient neben der Charakterisierung auch zur Auswahl der DNA-Extraktionsmethode, da diese von der Dicke der Zellwand abhängig ist. Bei der Färbung konnte festgestellt werden, dass alle Bakterienisolate Gram-positiv sind und eine Stäbchen- (9 Isolate) oder Kokkenform (8 Isolate) aufweisen.

Tab. 2.2: Gram-Verhalten und Morphologie-Bestimmung der Bakterienisolate.

Isolat	Gram-Verhalten	Form	Isolat	Gram-Verhalten	Form
106	Gram-positiv	Kokken	123	Gram-positiv	Stäbchen
109	Gram-positiv	Stäbchen	124	Gram-positiv	Kokken
110	Gram-positiv	Stäbchen	126	Gram-positiv	Kokken
112	Gram-positiv	Stäbchen	127	Gram-positiv	Kokken
113	Gram-positiv	Stäbchen	132	Gram-positiv	Kokken
114	Gram-positiv	Stäbchen	138	Gram-positiv	Kokken
117	Gram-positiv	Kokken	147	Gram-positiv	Stäbchen
118	Gram-positiv	Stäbchen	149	Gram-positiv	Stäbchen
119	Gram-positiv	Kokken			

Bei der Sequenzierung der Bakterien (Tab. 2.3) wird deutlich, dass diese nur durch die Gattung *Arthrobacter* sp. vertreten sind. Hierbei muss jedoch darauf verwiesen werden, dass zwei Bakterienisolate nicht sequenziert werden konnten.

Tab. 2.3: Sequenzierungsergebnisse der Bakterien-Isolate.

Isolat	Herkunft	Sequenzierung	Abteilung
106	Märchengrotte	-	-
109	Märchengrotte	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
110	Märchengrotte	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
112	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
113	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
114	Tiefe Sohle	-	-
117	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
118	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
119	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
123	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
124	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
126	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
127	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
132	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
138	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
147	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria
149	Tiefe Sohle	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobacteria

Insbesondere Isolat MF 143 (ein Isolat der Gattung *Trichosporon* sp.) konnte einen starken Biofilm bilden. Bei den Bakterien bilden die Isolate MB 138, MB149, MB 124, MB 127, MB 118 und MB 123 einen deutlichen Biofilm. Dies entspricht etwa einem Drittel der Isolate. Hierbei bildet das Isolat MB 123 den stärksten Biofilm, wobei MB 118 eine ähnlich starke Biofilmbildung aufweist. Die höchsten Werte der Bakterien liegen jedoch weit unter denen der Pilze. Die gemessene optische Dichte von MF 143 liegt bei 3,0639 und somit circa 18 Mal höher als die von MB 123 mit 0,1704. Bei den Pilzen ist erkennbar, dass einige Isolate, die MF 143, MF 134, MF 136, MF 131 und MF 137, eine vergleichmäßig sehr hohe optische Dichte aufweisen. Etwa zwei Fünftel der Isolate neigen nicht zur Biofilmbildung (Abb. 2.5).

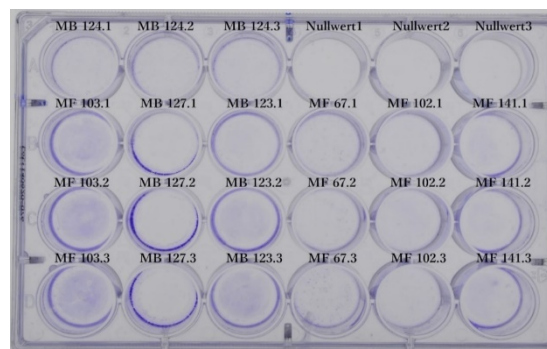


Abb. 2.5: Biofilm-Test der Isolate MF 67, MF 102, MF 103, MB 123, MB 127 und MF 141

2.2.4 Pilze aus dem Bergwerk Morassina

Bei den mehrzelligen Pilzen herrschten insbesondere die Abteilungen der Zygomycota mit 15 Isolaten und Ascomycota mit 14 Isolaten vor, wobei die Ascomycota mit neun Gattungen die höchste Diversität aufweisen. Die häufigste Gattung hierbei ist *Mortierella* sp. aus der Abteilung der Zygomycota (Tab. 2.4).

Bei der Sequenzierung der einzelligen Pilze, deren Ergebnisse in Tab. 2.5 zusammengefasst sind, ist deutlich erkennbar, dass die Zygomycota einen geringeren Anteil an der Gesamtisolatenanzahl ausmachen als die Basidiomycota und Ascomycota. Sie sind nur bei den mehrzelligen Pilzen vertreten. Es wurden keine einzelligen Pilze der Abteilung Zygomycota isoliert. Bei den Hefen sind die Basidiomycota am häufigsten und werden insbesondere durch die Gattung *Trichosporon* sp. vertreten. Wie bei den mehrzelligen Pilzen weisen auch hier die Ascomycota die höchste Artenvielfalt auf.

Tab. 2.4: Sequenzierung der Pilzisolat.

Isolat	Probenahmeort	Sequenzierungsergebnis	Abteilung
MF 5	Märchengrotte	<i>Sporothrix</i> sp.	Ascomycota
MF 7	Märchengrotte	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 13	Märchengrotte	<i>uncultured Truncatella</i> sp.	Basidiomycota
MF 17	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 18	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 19	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 20	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 22	Tiefe Sohle	<i>Geomyces</i> sp.	Ascomycota
MF 24	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 26	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 30	Märchengrotte	<i>Sporothrix</i> sp.	Ascomycota
MF 39	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 43	Märchengrotte	<i>Truncatella</i> sp.	Ascomycota
MF 47	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 53	Tiefe Sohle	<i>Mucor</i> sp.	Zygomycota
MF 54	Tiefe Sohle	<i>Geomyces</i> sp.	Ascomycota
MF 60	Märchengrotte	<i>Sordariomycetidae</i> sp.	Ascomycota
MF 61	Märchengrotte	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 65	Märchengrotte	<i>Trichoderma</i> sp.	Ascomycota
MF 68	Märchengrotte	<i>Sporothrix</i> sp.	Ascomycota
MF 69	Märchengrotte	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Ascomycota
MF 73	Tiefe Sohle	<i>Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 75	Tiefe Sohle	<i>Geomyces</i> sp.	Ascomycota
MF 81	Tiefe Sohle	<i>Uncultured Mortierella</i> sp.	Zygomycota
MF 83	Tiefe Sohle	<i>Mucor</i> sp.	Zygomycota
MF 89	Tiefe Sohle	<i>Pseudeurotium</i> sp.	Ascomycota
MF 90	Tiefe Sohle	<i>Sordariomycetidae</i> sp.	Ascomycota
MF 91	Märchengrotte	<i>Conidiobolus</i> sp.	Zygomycota
MF 93	Märchengrotte	<i>Verticillium</i> sp.	Ascomycota
MF 94	Tiefe Sohle	<i>Cosmospora</i> sp.	Ascomycota

Tab. 2.5: Sequenzierungsergebnisse der einzelligen Pilze / Hefen.

Isolat	Herkunft	Sequenzierung	Abteilung
100	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
101	Märchengrotte	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Ascomycota
102	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
103	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
104	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
105	Märchengrotte	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
107	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
108	Märchengrotte	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
111	Märchengrotte	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
115	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
116	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
120	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
121	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
122	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
125	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
128	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
129	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
130	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
131	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
133	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
134	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
135	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
136	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
137	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
139	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
140	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
141	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
142	Tiefe Sohle	<i>Yarrowia</i> sp.	Ascomycota
143	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
144	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
145	Tiefe Sohle	<i>Yarrowia</i> sp.	Ascomycota
146	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
148	Tiefe Sohle	<i>Yarrowia</i> sp.	Ascomycota
150	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
2	Märchengrotte	<i>Cryptococcus</i> sp.	Basidiomycota
6	Märchengrotte	<i>Cryptococcus</i> sp.	Basidiomycota
9	Märchengrotte	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
21	Tiefe Sohle	<i>Cryptococcus</i> sp.	Basidiomycota
23	Tiefe Sohle	<i>Trichosporon</i> sp.	Basidiomycota
31	Märchengrotte	<i>Sporothrix</i> sp.	Ascomycota
32	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
34	Märchengrotte	<i>Uncultured fungus</i>	-
36	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
42	Tiefe Sohle	<i>Microbotryozyma</i> sp.	Basidiomycota
48	Tiefe Sohle	<i>Candida</i> sp.	Ascomycota
56	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
57	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
63	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
67	Märchengrotte	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota
82	Tiefe Sohle	<i>Uncultured Tremellales</i>	Basidiomycota

2.2.5 Zuordnung der Isolate

Der Anteil der Bakterien (Abb. 2.6) bei den gewonnenen Isolaten war mit einer Gesamtzahl von 17 sehr gering. Alle Bakterienisolate gehören der Abteilung der Actinobacteria bzw. der Gattung *Arthrobacter* sp. an. Den Hauptteil der Isolate machen die fungalen Abteilungen der Basidiomycota, hier in grün dargestellt, und der Ascomycota, hier in blau dargestellt, mit jeweils 32 Isolaten aus. Die Zygomycota (gelb) machen mit 15 Isolaten eher einen geringeren Teil der Pilzisolat aus. Der Hauptteil der Basidiomycota sowie der Ascomycota stammt hierbei aus dem Grundwasser der „Tiefen Sohle“. In diesem kommen jedoch keine Zygomycota vor. Die Zygomycota sind am präsentesten in den Präzipitatproben der „Tiefen Sohle“, während sie in beiden Grundwasserproben fehlen. Eine

mögliche Verlagerung der Verhältnisse zwischen Ascomycota und Basidiomycota ist jedoch nicht auszuschließen, da 5 Isolate noch nicht erfolgreich identifiziert werden konnten.

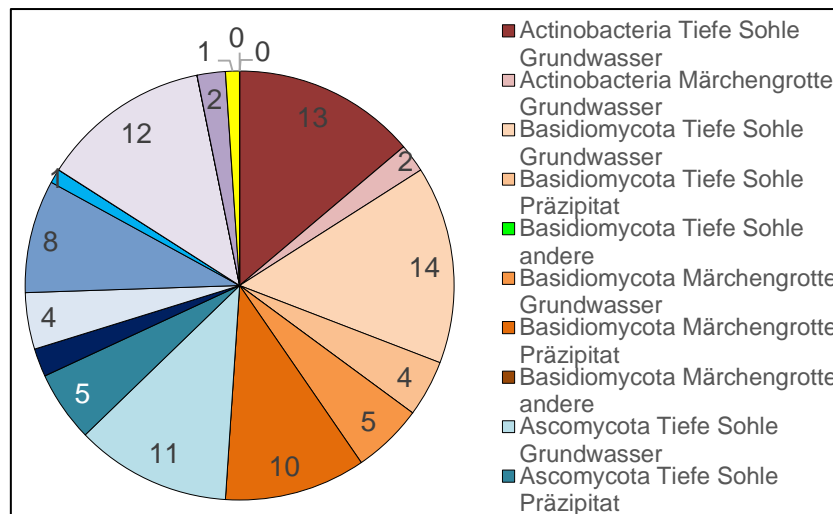


Abb. 2.6: Abteilungsanalyse der Isolate auf Herkunft und Probenart.

Eine hohe Artenvielfalt zeigten die Ascomycota, die hauptsächlich durch die Gattung *Candida* sp. mit insgesamt zwölf Isolaten vertreten sind. Neben *Candida* sp. setzen sich die Ascomycota-Isolate hauptsächlich aus den Gattungen *Sporothrix* sp. (vier Isolate), *Yarrowia* sp. (drei Isolate) und *Geomyces* sp. (drei Isolate) zusammen. Die Gattungen *Pseudogymnoascus* sp. und *Truncatella* sp. sind jeweils mit zwei Isolaten vertreten. Die restlichen Gattungen wie zum Beispiel *Cosmospora* sp. sind jeweils durch ein Isolat vertreten (Abb. 2.7, 2.8).

In Abbildung 2.9 ist erkennbar, dass die Zygomyceten der Grube „Morassina“ insbesondere durch die Gattung *Mortierella* sp. bestehen. Neben den *Mortierella*-Spezies gibt es noch zwei *Mucor*-Isolate und ein Isolat der Gattung *Conidiobolus* sp.

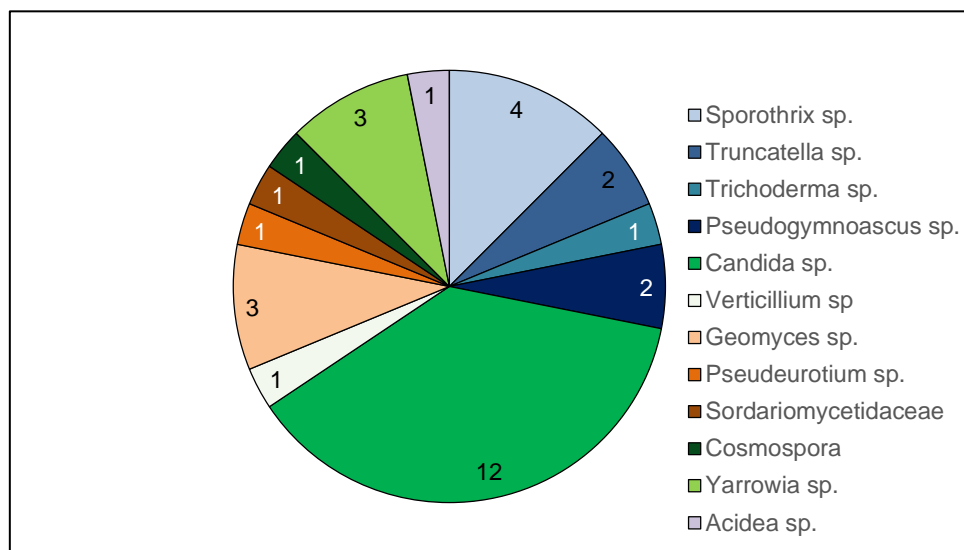


Abb. 2.7: Anzahl der vorkommenden Ascomycota-Gattungen

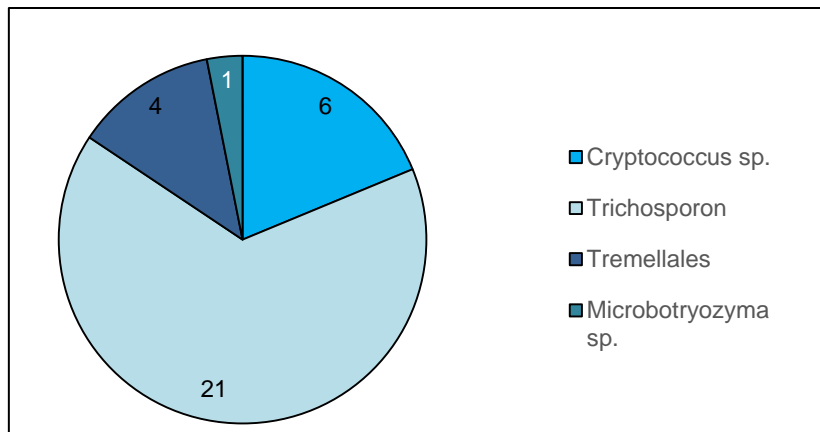


Abb. 2.8: Anzahl der vorkommenden Basidiomycota-Gattungen.

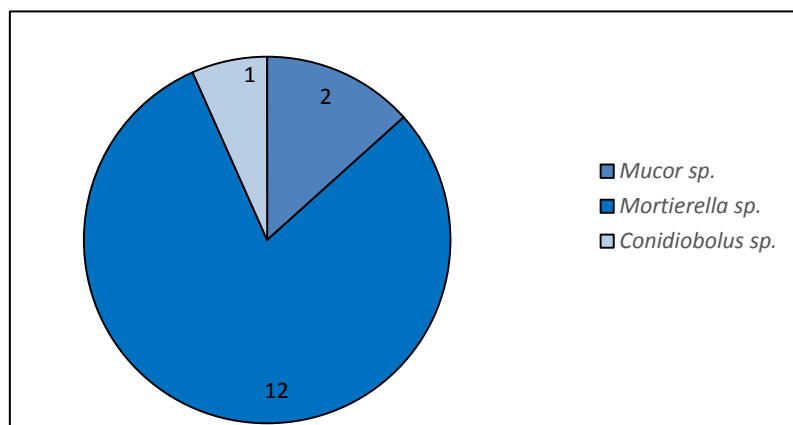


Abb. 2.9: Anzahl der vorkommenden Zygomycota-Gattungen.

Anhand der Abbildungen wird deutlich, dass die Gattungen *Trichosporon* sp., *Candida* sp. und *Mortierella* sp. am häufigsten aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ isoliert werden konnten. Somit werden alle drei Hauptabteilungen der Fungi durch eine Gattung besonders stark repräsentiert, wobei die Gattung *Trichosporon* sp. hier deutlich hervorzuheben ist, da diese nahezu doppelt so oft isoliert wurde wie die anderen Hauptgattungen.

Generell kann man zunächst sagen, dass über nahezu alle der Isolate bekannt ist, dass sie in Höhlen, meist auch in Verbindung mit sauren pH-Werten, vorkommen (Gross und Robbins, 2000). Insbesondere die Hefegattungen *Cryptococcus* sp. und *Candida* sp. wurden häufig aus dem Grundwasser isoliert (Pereira *et al.*, 2009). In dieser Studie werden nicht nur Bakterien sondern auch Pilze betrachtet, da diese nicht nur dominant in der Bodenflora sind und bei niedrigen pH-Werten vorkommen (Pilze kommen wahrscheinlich bei einer höheren pH-Wert-Spanne vor als Bakterien), sondern auch an vielen geochemischen Prozessen beteiligt sind. Weiterhin sind sie für die Bioremediation von Radionukliden und das Bioweathering verschiedener Gesteine geeignet. Die Fähigkeit von Pilze, Beton und andere Strukturmaterialien zu zersetzen, hat zudem signifikante Folgen bei der Lagerung von radioaktivem Abfällen (Burford *et al.*, 2003). Daher sollte durch weitere Studien der radionuklidakkumulierenden Mikroorganismen auch beachtet werden, welche Stoffe ebenfalls zersetzt werden können, um eine mögliche Freisetzung von Radionukliden aus dem Gestein zu verhindern bzw. zu begünstigen.

Viele der aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ isolierten Gattungen sind bereits für die Akkumulation von Schwermetallen, Metallen mit radioaktiven Isotopen und Radionukliden bekannt. Dies gilt insbesondere für Cadmium, Chrom und Uran. Da die Isolate aus einer radionuklidreichen Umgebung stammen, sind die meisten tolerant gegenüber den in der „Morassina“ vorkommenden Radionukliden und können daher zur weiteren Untersuchung verwendet werden,

wobei hier darauf geachtet werden sollte, dass die Isolate möglicherweise auch durch Menschen oder Tiere eingetragen wurden. Es konnten einige interessante Isolate wie zum Beispiel die Gattungen *Yarrowia* sp. und *Arthrobacter* sp. aus der Höhle gewonnen werden, die nun zu weiteren Untersuchungen dienen können. Dabei ist die Interaktion mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, die durch einige der Isolate ebenfalls abgebaut werden können, wichtig. Anhand der gewonnenen Daten können nun Tests zur Toleranz und Akkumulierung von Radionukliden folgen, insbesondere von den Isolaten, bei denen bereits radionuklidakkumulierende Beispiele aus der Gattung bekannt sind. Die radionuklidakkumulierende Mikroorganismen können zur Entwicklung oder Verbesserung neuer biotechnologischer Methoden benutzt werden. Dies betrifft unter anderem die Reinigung von Grundwasser sowie die Beeinflussung der Gesteins/Wasser-Interaktion. Um die Gesamtheit der mikrobiellen Gemeinschaft zu bestimmen, sind weiterführende Untersuchungen, wie zum Beispiel eine Metagenomanalyse, nötig. Für die nähere Bestimmung der Isolate bis hin zur Art sowie die Identifizierung der Schimmelpilze, die aufgrund von Kontaminationsgefahr nicht bearbeitet wurden, werden weitere Identifikationsschritte erfolgen.

2.2.6 Spezifizierung mikrobieller (Im)mobilisierungsprozesse von Elementen und/oder Radionukliden aus Schwarzschiefer

Die Studie dient zur Charakterisierung von Mikroorganismen aus einer radionuklidreichen Umgebung sowie der Erforschung mikrobieller (Im)mobilisierungsprozesse aus Schwarzschiefer. Hierbei konnte unter anderem ein noch weitestgehend unbeschriebener *Mucor durus* Stamm isoliert und charakterisiert werden, bei dem durch ICP-MS Analysen eine hohe Uransorptionskapazität von bis zu 87 % beziehungsweise rund 90 mg Uran pro Gramm Trockenmasse nachgewiesen werden konnte. Für die schwermetalltoleranten Zygomyceten *Conidiobolus* sp. und *Umbelopsis* sp. (+ *Arthrobacter* sp.) konnten im Rahmen dieser Studie zusätzlich Uranabsorptionsraten von 22,5 % bzw. 43,9 % festgestellt werden. Durch Cryo-TRLFS und REM konnte gezeigt werden, dass die Uranbindung intrazellulär bzw. an der Zellwand lokalisiert ist, wobei die Bestätigung durch TEM noch ausstehend ist. Zusätzlich konnten hohe Schwermetalltoleranzen von bis zu 50 mM Mangan(II) sowie, die für diesen Stamm erstmals beschriebene Produktion von Siderophore nachgewiesen werden, welche in *Mucor* sp. bisher nur selten nachgewiesen wurde und sich (im)mobilisierend auf Radionuklide im Gestein auswirken könnten. Zusätzlich wurde mittels LA-ICP-MS überprüft ob der Zygomycet sowie auch weitere Isolate aller Abteilung des Pilzreiches, beispielsweise *Verticillium* sp. (Ascomycota), *Cryptococcus* sp. (Basidiomycota) oder *Conidiobolus* sp. (Zygomycota) verschiedene Metalle und Radionuklide aus Schwarzschiefer akkumulieren können. Weiterhin wurden mehrere für die Bioremediation, speziell Biosorption interessante *Arthrobacter*-Stämme und *Mortierella parvispora* bzw. *Mortierella jenkinsii* Stämme charakterisiert und auf ihre Schwermetalltoleranzen gegenüber Kupfer, Nickel, Mangan und Zink sowie dem Leichtmetall Aluminium; Siderophorenproduktion und (Im)mobilisierungsfähigkeit verschiedener Radionuklide aus dem Gestein getestet.

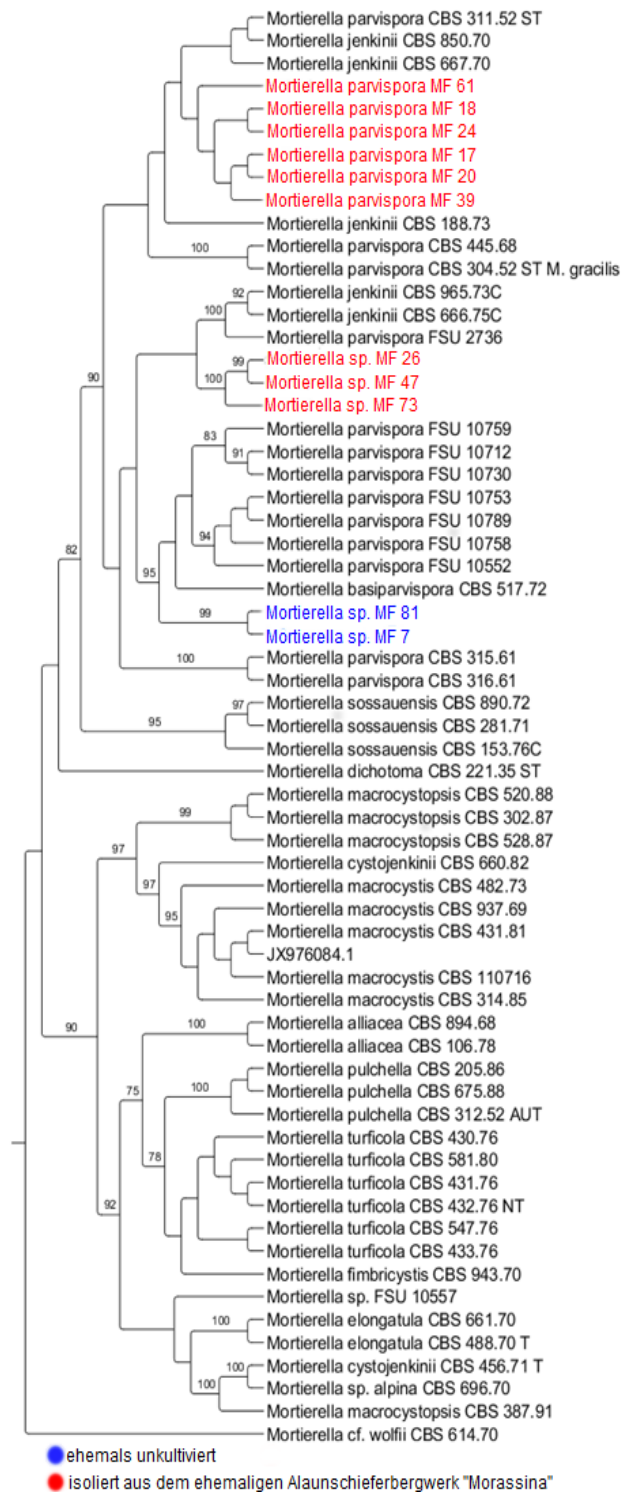


Abb. 2.10: Einordnung der gefundenen Zygomyceten.

In dieser Studie wurde hauptsächlich die Rolle der Isolate der Pilzgroßgruppe Zygomycota untersucht, da diese sehr schnellwachsende, leicht kultivierbare Mikroorganismen darstellen, welche sich gut als Testobjekte eignen. Hierbei lag der Fokus insbesondere auf den Pilzen der Gattung *Mucor*, *Mortierella*, *Umbelopsis* und *Conidiobolus*. Die Zygomyceten wurden als vielversprechende Isolate ausgewählt, da über diese bereits im Zusammenhang mit Schwermetallen hohe Akkumulationsraten bekannt sind. Zusätzlich ist beispielsweise über *Rhizopus arrhizus* bekannt, dass dieser Zygomycet bis zu 200 mg Uran bzw. Thorium pro Gramm Trockensubstanz binden kann. Insbesondere über verschiedene *Mucor*-Arten ist bekannt, dass diese sich zur Biosorption von Schwermetallen beispielsweise Kupfer; Blei; Nickel; Cadmium und Zink durch *Mucor rouxii* (Gardea-Torresday *et al.*,

1996; Yan und Viraraghavan, 2003) oder Chrom durch *Mucor hiemalis* (Tewari *et al.*, 2015) eignen. Auch bei *Mortierella* sp. wurde bereits die Fähigkeit zur Akkumulation von Cobalt (Pal *et al.*, 2006), Cadmium, Zink, Quecksilber (Krantz-Rückler *et al.*, 1996) und Selen (Zieve *et al.*, 1985) nachgewiesen. Bei *Conidiobolus* sp., der dritten untersuchten Zygomyceten-Gattung ist momentan nichts genaues bezüglich der Biosorption oder Bioremediation von Schwermetallen oder Radionukliden bekannt, jedoch konnte mittels der alkalinen Protease des Pilzes Silber aus Röntgenfilmabfall zurückgewonnen werden (Shanker *et al.*, 2010). Zusätzlich ist bekannt, dass der Zygomycet Lindan degradieren kann (Nagpal *et al.*, 2008). Auch über die Gattung *Umbelopsis* sp. ist diesbezüglich nur wenig bekannt, jedoch ist die Art *Umbelopsis isabellina* in der Lage endokrine Disruptoren, Stoffe die durch die Veränderung des Hormonsystems die Gesundheit schädigen können, abbauen kann (Janicki *et al.*, 2016).

Anhand der phylogenetischen Analysen, die in Abbildung 2.10 als Phylogramm aufgeschlüsselt sind, wird deutlich, dass die isolierten *Mortierella* sp.-Stämme alle zur *Mortierella parvispora*-Gruppe gehören und somit am nächsten mit den *Mortierella*-Arten *Mortierella parvispora* und *Mortierella jenkinii* verwandt sind. Ebenfalls ist erkennbar, dass der Hauptteil der isolierten *Mortierella* sp. Stämme, welche sowohl aus der „Tiefen Sohle“ als auch aus der „Märchengrotte“ isoliert wurden, sehr nah miteinander verwandt sind und Cluster innerhalb dieser Gruppen bilden. Am weitesten entfernt sind die isolierten *Mortierella*-Stämme von der Art *Mortierella wolfii*.

Anhand der Sequenzierung und des Datenbankvergleichs des Isolates MF 110 konnte dieses als *Umbelopsis angularis* identifiziert werden. Bei der phylogenetischen Einordnung ist jedoch erkennbar, dass das Isolat am nächsten mit einer Gruppe von *Umbelopsis ramanniana* verwandt ist. Bei der Untersuchung der Wachstumsmorphologie von *Mucor* sp. MF 83 fällt auf, dass dieser Zygomycet auf dem Vollmedium besonders viel dichtes, weißes Luftmyzel bildet, und die Sporenbildung insbesondere auf die Mitte der Platte, also dem ältesten Myzel beschränkt ist. Ein ähnliches Verhalten ist auf Malzextraktmedium (MEX) erkennbar, wobei die Sporenbildung dort weniger stark auf die Mitte beschränkt ist und der Pilz grünlicher erscheint. Besonders dünnes Luftmyzel ist bei den Minimalmedien R2A und SUP-H (SUP ohne Hefeextrakt) erkennbar, wobei der Pilz auf R2A am wenigsten Luftmyzel, dafür aber viele Sporangien bildet und eine starke phototropische Reaktion zeigt. Das Wachstum auf SUP-Medium entspricht einem gemäßigten Wachstum und bildet die Mitte zwischen dem dicken Luftmyzel auf Standard I und dem sehr dünnen Wachstum auf R2A, wobei das Sporulierungsverhalten ähnlich zu beschreiben ist.

Bei *Conidiobolus* sp. MF 91 ist bei den Minimalmedien ein Wachstum durch starkes Sporulieren zu beobachten. Hierbei wächst der Pilz zunächst wenige Millimeter auf der Platte, sporuliert anschließend und die Sporen keimen einige Millimeter weiter erneut aus. Dieses Verhalten ist zusätzlich auf dem Malzextraktmedium zu erkennen, hier ist jedoch die Myzelschicht deutlich dicker ausgeprägt als bei den beiden Minimalmedien. Besonders schlecht scheint der Pilz hierbei auf SUP-H zu wachsen. Der schnellwachsende Pilz wirkt auf Standard I gelblich beige und gibt ein dunkles Pigment in das Medium ab, wodurch dieses dunkler als normal wirkt. Auf dem SUP-Medium wächst der Zygomycet am besten wobei er eine dicke, weißliche Luftmyzelschicht ausbildet, welche auf den anderen Medien nicht beobachtet werden konnte. Die größten Wachstumsunterschiede zwischen den verschiedenen Medien sind bei dem Doppelisolat *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MF 110 erkennbar. Hierbei fällt besonders das Sporulierungsverhalten des Zygomyceten *Umbelopsis* sp. MF 110 auf. Besonders interessant ist hierbei die unterschiedliche Färbung des Myzels. Es wird deutlich, dass der Pilz auf Standard I kaum braune Sporen bildet und in einem eher flachen, matten Bodenmyzel wächst, wobei hier die Bakterien einen großen Anteil der Biomasse repräsentieren. Bei dem Minimalmedium SUP-H wirkt das Myzel weißlich, ist sehr dünn und es sind kaum bzw. keine braunen Bereiche erkennbar. Besonders stark wächst der Zygomycet auf Malzextraktmedium, wo das Luftmyzel ca. 1 cm erhaben und sehr dick ist. Hier ist auch eine starke Sporulierung erkennbar, welche nur auf SUP-Medium stärker ist. Auf dem SUP-Medium erscheint das Myzel rostbraun bis rötlich, ist ebenfalls sehr dick, jedoch nicht so erhaben im Vergleich zum MEX-Medium. Auf dem zweiten Minimalmedium, R2A, wächst der Pilz ebenfalls relativ dünn, ist jedoch braun gefärbt und es sind viele Sporangien unter dem Mikroskop bzw. Binokular erkennbar.

Um eindeutig nachzuweisen, dass die Mikroorganismen in dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ überlebensfähig sind und an die dortigen Umweltbedingungen (8 °C) angepasst sind, wurde ein Temperaturtest mit den Temperaturen 4 °C, 10 °C, 16 °C und 28 °C durchgeführt. Hierbei wurden im speziellen die Isolate *Mortierella* sp. MF 20, *Mortierella* sp. MF 26, *Mucor* sp. MF 83 und *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 näher untersucht. Der anhand der phylogenetischen Analysen als *Mortierella parvispora* identifizierte Stamm MF 20 wurde zum Untersuchen des Temperaturoptimums bei 4 °C, 10 °C, 16 °C und 28°C kultiviert. Bei dem Isolat *Mortierella* sp. MF 26

ist erkennbar, dass der Pilz bei 16°C besonders schnell wächst und bereits nach 14 Tagen die vorhandene Fläche vollkommen bedeckt. Das Wachstum bei 10°C und 4°C ist ebenfalls gut, jedoch wird der volle Platz nach einem Monat nicht bedeckt, wobei der Pilz im Anschluss noch weiterwächst. *Mucor* sp. MF 83 weist ein besonders gutes Wachstum bei 16 °C auf, hier ist die Platte bereits nach sieben Tagen vollständig mit Myzel bedeckt. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde deutlich, dass das Isolat MB110 kein reines Bakterienisolat ist, sondern sich aus Bakterium (*Arthrobacter* sp.) und Pilz (identifiziert als *Umbelopsis* sp.) zusammensetzt.

2.2.7 Interaktionen mit Schwarzschiefer

Um die Interaktion mit dem aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ gewonnenen Schwarzschieferproben zu betrachten, wurde zunächst überprüft ob dieser wachstumsfördernde bzw. -hemmende Auswirkung auf die untersuchten Isolate aufweist. Hierbei kann bei den, an den Antibiotika-Lochtest angelehnten Platten keine besondere Auffälligkeit beobachtet werden.

Aufgrund dessen wurden die ausgewählten Mikroorganismen: *Mucor* sp. MF 83, *Mortierella* sp. MF 26, *Yarrowia* sp. MF 142, *Cryptococcus* sp. MF 2 und *Arthrobacter* sp. MB 149 auf Standard I-Nährmedium, welches verschiedene Anteile von 2,5 % bis 50 % Schwarzschiefer enthielt, kultiviert. Die erhöhte Konzentration an Morassina-Schwarzschiefer im Medium hat für keinen der getesteten Mikroorganismen, mit Ausnahme von *Cryptococcus* sp. MF 21, wachstumshemmende Folgen. Bei *Cryptococcus* sp. MF 21 entstehen auf der höchsten getesteten Schieferkonzentrationen differenzierte einzelne Kolonien, welche bei geringen Konzentrationen nicht zu beobachten sind. Dort wächst der Mikroorganismus flächendeckend auf der gesamten Agarplatte. Auch bei den hyphenförmig wachsenden Pilzen konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum beobachtet werden.

Anhand des LA-ICP-MS-Analysen von *Arthrobacter* sp. MB 109 ist erkennbar, dass sowohl der Aluminiumgehalt, als auch der Urangehalt an den Stellen verringert ist, an denen der Mikroorganismus wächst. Diese Bereiche sind deutlich durch den Anstieg des Kohlenstoffgehaltes zu erkennen. Neben Uran weisen dieses Muster auch die Elemente Vanadium, Blei, Barium, Chrom und Molybdän auf, welche alle an den Stellen der Probe gehäuft vorkommen, an denen der Mikroorganismus nicht wächst. Mangan, Phosphor und Strontium weisen das Muster von C12 auf, während bei Eisen und Kupfer eine Gleichverteilung zu erkennen ist (Abb. 2.11).

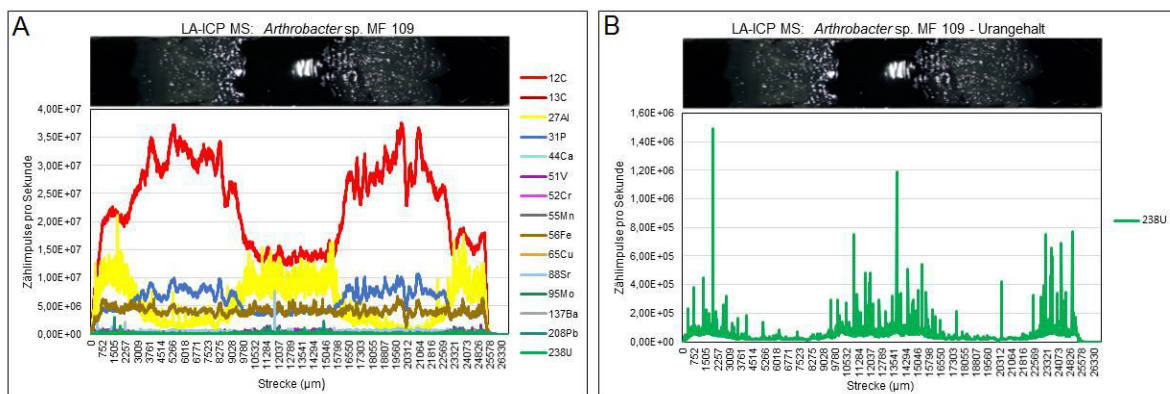


Abb. 2.11: LA-ICP-MS-Spektren von *Arthrobacter* sp. MB 109, kultiviert auf 50% Schwarzschiefer–Standard I Medium.

Anhand der Ergebnisse des Isolates *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 kann man deutlich erkennen, dass einer oder beide Organismen Uran in der Biomasse akkumuliert. Das Spektrum für Uran ähnelt im Aufbau dem für das durch die Biomasse aufgebaute C12 und Phosphor sowie dem akkumulierten Eisen, dennoch sind die Zählimpulse deutlich geringer. Das gleiche Muster kann ebenfalls für die Schwermetalle Blei, Kupfer sowie Mangan und die Erdalkalimetalle Strontium und Barium beobachtet werden. Bei Vanadium ist das Verhältnis genau umgekehrt, an den Stellen wo sich die Biomasse befindet sind die Zählimpulse pro Sekunde für Vanadium geringer als an den Stellen an denen der Mikroorganismus nicht gewachsen ist (Abb. 2.12).

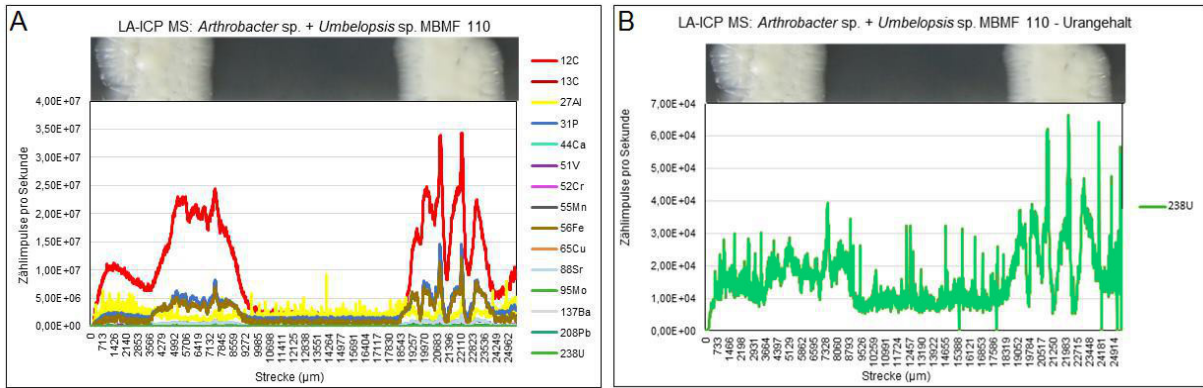


Abb. 2.12: LA-ICP-MS-Analysen von *Arthro bacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110, kultiviert auf 50% Schwarzschiefer–Standard I Medium.

Tab. 2.6: Massenspektrometrische Analyse der Isolate *Mortierella* sp. MF 26; *Mucor* sp. MF 83 und *S. commune* ptef:lcc2 - Alle Angaben in µg/g Trockenmasse.

µg/g	<i>S. commune</i>	<i>Mucor</i> sp. MF 83 (1)	<i>Mucor</i> sp. MF 83 (2)	<i>Mortierella</i> sp. MF 26 (1)	<i>Mortierella</i> sp. MF 26 (2)
Aluminium	75,2 ± 0,9	114 ± 2	118 ± 2	67 ± 0,3	47,64 ± 0,06
Vanadium	1,06 ± 0,03	2,269 ± 0,004	1,21 ± 0,09	2,001 ± 0	0,7 ± 0,04
Chrom	1,88 ± 0,05	4,9 ± 0,1	0,98 ± 0,03	9,6 ± 0,3	0,4 ± 0,01
Mangan	8,7 ± 0,1	38 ± 0,5	42 ± 1	32,8 ± 0,3	18,9 ± 0,3
Eisen	147,6 ± 0,1	370 ± 5	253 ± 3	443 ± 2	147 ± 0,8
Cobalt	1,99 ± 0,03	1,66 ± 0,02	1,465 ± 0,005	3,02 ± 0,05	2,07 ± 0,01
Nickel	0,76 ± 0,05	7,2 ± 0,1	0,76 ± 0,05	4,2 ± 0,08	0,549 ± 0,003
Kupfer	5,04 ± 0,08	7,06 ± 0,07	7,6 ± 0,1	14,1 ± 0,1	7,8 ± 0,1
Zink	29,5 ± 0,5	168,1 ± 0,09	166 ± 2	224,51 ± 0,09	145 ± 2
Strontium	6,806 ± 0,005	40,1 ± 0,5	42,3 ± 0,8	18,6 ± 0,4	8,1 ± 0,1
Molybdän	4,7 ± 0,04	5,57 ± 0,07	5,6 ± 0,1	15,48 ± 0,01	12,78 ± 0,09
Barium	3,44 ± 0,01	16,7 ± 0,2	15,92 ± 0	8,9 ± 0,1	3,09 ± 0,06
Blei	0,236 ± 0,005	0,45 ± 0,01	0,253 ± 0,008	0,65 ± 0,01	0,3 ± 0,006
Uran	0,044 ± 0,001	0,0418 ± 0,0009	0,04 ± 0,001	0,031 ± 0,0001	0,0186 ± 0

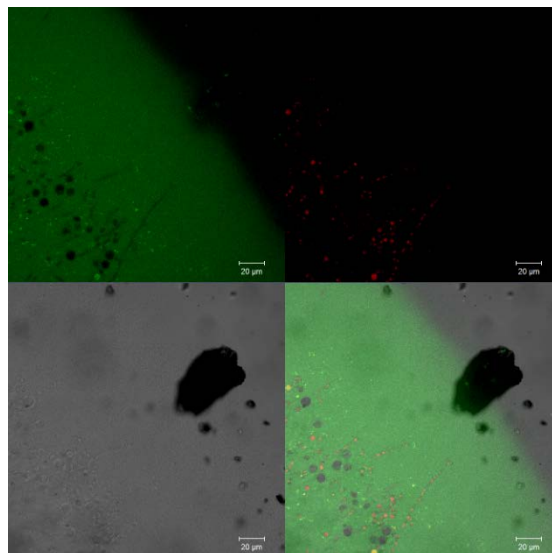


Abb.2.13: Fluoreszenzmikroskopie von *Mucor* sp. 83 kultiviert auf 50 % Schiefer-enthaltendem Standard I.

Anhand der Massenspektrometrie des getrockneten Myzels konnte deutlich gezeigt werden, dass die drei getesteten Pilze die untersuchten Metalle akkumulieren (Tab. 2.6). Insbesondere *Mortierella* sp. MF 26 sticht hier durch die vergleichsweise hohen Konzentrationen akkumulierter Metalle im Vergleich mit *Mucor* sp. MF 83 und *S. commune* hervor.

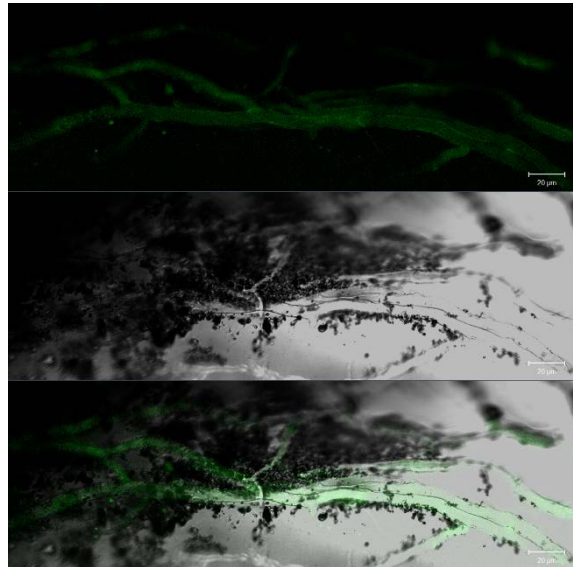


Abb. 2.14: Fluoreszenzmikroskopie von *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 kultiviert auf 50 % Schiefer-enthaltendem Standard I.

Bei der Akkumulation von Uran weist *Mortierella* sp. MF 26 hingegen die geringsten Werte auf. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Myzel, welches auf Celluphanfolie kultiviert wurde, und dem Myzel, welches direkt auf der Platte wuchs, erkennbar. Anhand der in Abbildung 2.13 gezeigten mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen von *Mucor* sp. MF 83, welcher auf Schwarzschieferpulver-enthaltendem Medium inkubiert wurde, ist erkennbar, dass der Zygomycet in Richtung des Schwarzschiefers wächst sowie Ansammlungen von Schwarzschiefer durchwächst. Zusätzlich erscheint es, als würden kleine Schwarzschieferkörner an den Hyphen angelagert sein. Durch die Fluoreszenzmikroskopie von Isolat MBMF 110 (Abb. 2.13, 2.14) konnte zunächst festgestellt werden, dass dies kein Reinisolat ist, sondern sowohl aus Pilz als auch aus Bakterium besteht. Dies ist anhand der unterschiedlichen Autofluoreszenzen der beiden Mikroorganismen zu erkennen, da die Bakterien grün fluoreszieren während der Pilz rot fluoresziert. In Abbildung 2.14 kann man zusätzlich erkennen, dass die Bakterien auf dem Schieferkorn nachweisbar sind.

Bei dem Vergleich der gesamten Oberfläche des Schieferblöckchens fällt deutlich auf, dass die relative Fläche der hell erscheinenden Flächen, welche als reiner Kohlenstoff identifiziert wurde, in der Kontrolle wesentlich höher ist, als bei den mikrobiell inokulierten Schieferblöckchen (Abb. 2.15).

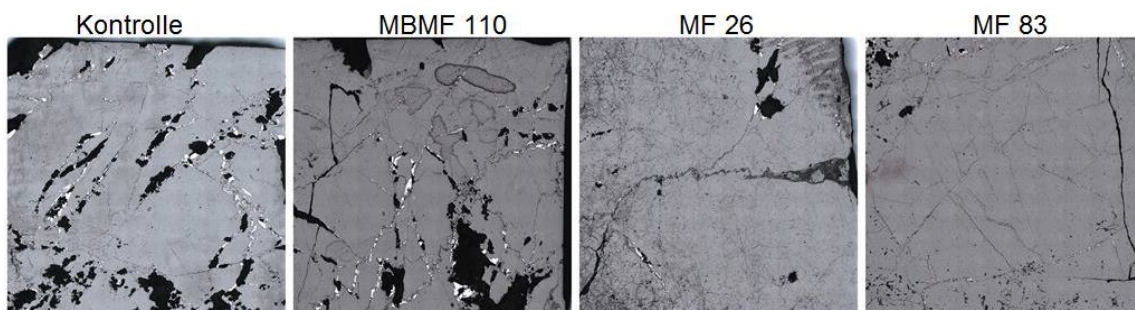


Abb. 2.15: Raman-Spektroskopie mikrobiell inokulierter Schieferblöckchen, Kantenlänge: 1 cm.

In Abbildung 2.16 wird deutlich, dass die klar abgegrenzten glatten Flächen, wie sie bei der Kontrolle erkennbar sind, durch die Inokulation mit den Mikroorganismen *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110, *Mortierella* sp. MF 26 und *Mucor* sp. MF 83 deutlich degradiert sind. Hier sind die Flächen insbesondere am Rand nicht mehr glatt abgegrenzt bzw. definiert, sondern stark uneben und

eingekerbt. Die geraden Grenzflächen zum dunkleren Substrat des Schiefers wirken zerklüftet und die weiße, glatte Oberfläche eher rau.

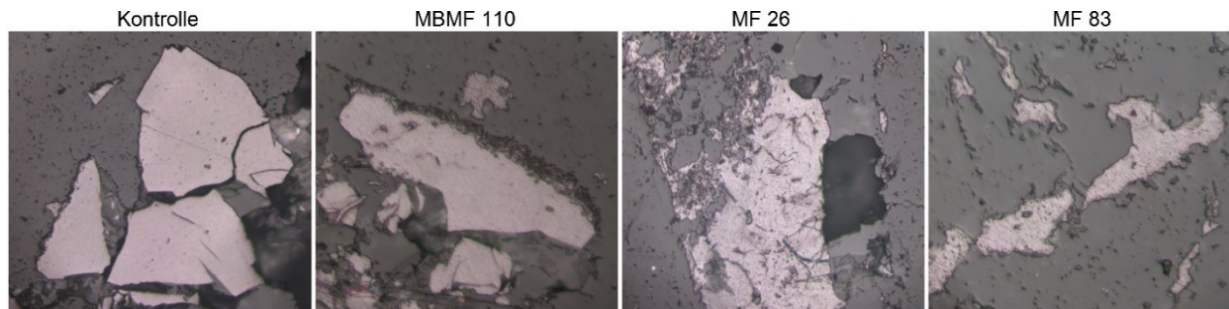


Abb. 2.16: Raman-Spektroskopie mikrobiell inokulierter Schieferblöckchen, speziell hell erscheinende, kohlenstoffreiche Flächen; Kantenlänge: 380 µm.

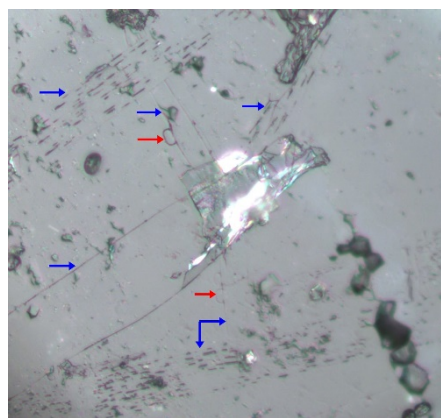


Abb. 2.17: Ätzspuren durch Wachstum von *Mucor* auf Schieferblöckchen. Hyphen (blau) und Sporen (rot) zeigen einen Einfluss auf den Schiefer.

Bei *Mucor* sp. MF 83 konnte bei der 50-fachen Vergrößerung (das Bild entspricht 138 µm x 138 µm) zusätzlich beobachtet werden, dass die Hyphen (blau) sowie auch Sporen (rot) Ätzspuren auf dem Schiefer hinterlassen, welche in Abbildung 2.17 markiert sind.

Aufgrund der Fähigkeit der beiden *Arthrobacter* sp. MB 109 und MBMF 110, auf den Schiefermedien I-III zu wachsen, wurden diese mit dem Burks-Test auf ihre Fähigkeit zur Stickstofffixierung getestet, um sicher zu gehen, dass die Organismen die Wachstumsenergie nicht aus dem Agar-Agar sondern direkt aus dem Morassina Schwarzschiefer gewinnen konnten. Ein weiterer Faktor hierfür war, dass durch Bock gezeigt wurde, dass die Konzentration von Vanadium und Molybdän in den Mikrokosmen nach 21 Tagen stark abnahm. Diese dienen als Co-Faktoren für die Nitrogenase, das Schlüsselenzym der Stickstofffixierung. Bei *Arthrobacter* sp. MB 109 ist kein Wachstum zu verzeichnen. Bei dem Doppelisolat *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 ist ein schwaches Wachstum von *Umbelopsis* sp. erkennbar, welches jedoch noch ca. zwei Wochen stagniert.

Siderophorenbildung wurde getestet, da hier ein Einfluss auf die Lösung von SM/RN aus dem Gestein erfolgen kann. Insgesamt konnten bei diesem Test alle isolierten *Arthrobacter*-Arten positiv auf die Produktion von Siderophore getestet werden. Zusätzlich konnten alle Zygomyceten positiv getestet werden. Insbesondere *Mucor* sp. MF 83 und *Conidiobolus* sp. MF 91 waren sehr stark positiv. Von 67 getesteten Isolaten sind 15 negativ. Diese gehören zu den Arten *Trichosporon* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp. und *Yarrowia* sp., welche den Hauptteil der negativen Isolate ausmachen und als Hefen wachsen. Eine geringere Anzahl der negativ getesteten Isolate wird durch hyphenförmig wachsende Pilze repräsentiert. Dazu gehören zwei *Truncatella*-Isolate, *Microbotryozyma* sp. MF 42, *Sordariomycetidae* sp. MF 90 und *Sporothrix* sp. MF 68, wobei letztere nicht auf dem Medium gewachsen sind.

Bei der Extraktion des Kulturüberstands von *Conidiobolus* sp. MF 91 mit einer C18-Kartusche konnte ein deutlicher Peak (Abb. 2.18) bei einer Retentionszeit von 2,75 min gefunden werden. Anhand dieses Ergebnisses wurde eine massenspektrometrische Analyse angefertigt.

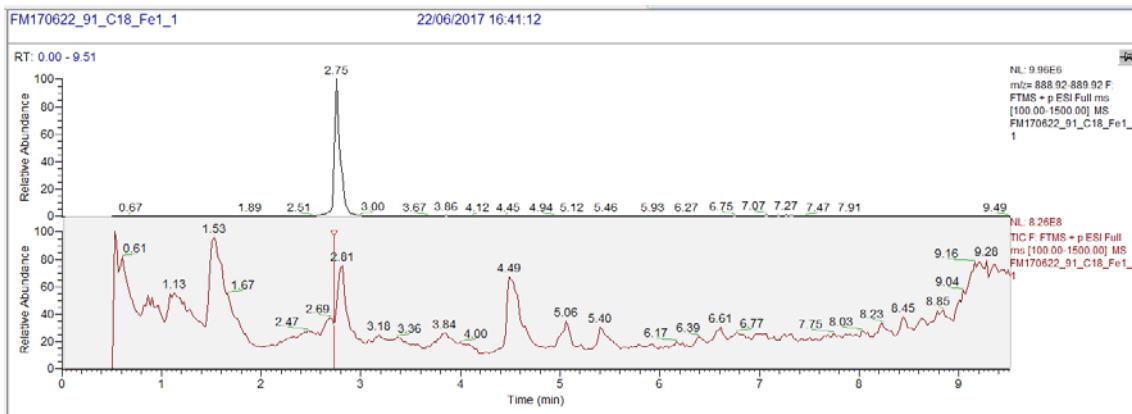


Abb. 2.18: Chromatogramm: Siderophoren-Analyse von *Conidiobolus* sp. MF 91.

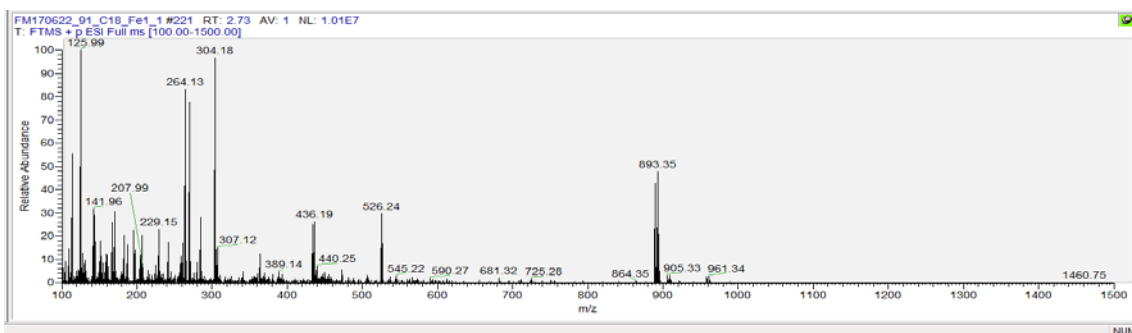


Abb. 2.19: Massenspektrometrie: Siderophoren-Analyse *Conidiobolus* sp. MF 91

Bei der Massenspektrometrie (Abb. 2.19) zeichnet sich ein eindeutiger Peak bei 893,35 ab, welcher dem Masse/Ladungs-Verhältnis der produzierten Siderophoren entspricht. Auf ihre Toleranz gegenüber Schwermetallen sowie Aluminium wurden die Mikroorganismen *Cryptococcus* sp. MF 2, *Mortierella* sp. MF 20, *Mortierella* sp. MF 26, *Mucor* sp. MF 83, *Conidiobolus* sp. MF 91, *Verticillium* sp. MF 93, *Cosmospora* sp. MF 94, *Pseudogymnoascus* sp. MF 101 und *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 sowie *Arthrobacter* sp. MB 109/112/147 untersucht. Von den hyphenförmig wachsenden Pilzen wurden hierbei Wachstumsaufnahmen angefertigt. Der Wachstumsverlauf der Bakterien und MF2 wurde photographisch mit dem Scanner dokumentiert und die Adsorption gemessen (Tab. 2.7).

Bei der Time-Resolved-Laser-Fluorescence-spectrometry der mit Uranyl nitrat kultivierten Mikroorganismen *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110, *Mucor* sp. MF 83 und *Conidiobolus* sp. MF 91 konnten eindeutige Fluoreszenzspektren aufgenommen werden (Abb. 2.20). Deutlich erkennbar ist die Vier-Finger-Struktur bei *Conidiobolus* sp. MF 91, welche typisch für Uran ist. Neben dem verschobenen Fluoreszenzmuster im Vergleich zur Kontrolle, ähnelt das Spektrum der beiden Proben eher dem der Kontrolle, wobei sich das Spektrum hier aus zwei Hauptpeaks und jeweils einer Schulter links und rechts dieser Peaks zusammensetzt, während bei der Kontrolle ein dritter Peak zwischen den beiden prominentesten Peaks liegt.

Tab. 2.7: Adsorption an die mit Uranylнитrat kultivierten Mikroorganismen.

Isolat		initiale U-Konzentration [µg/L]	U-Konzentration nach Sorption [µg/L]	Sorption [%]	Trockenmasse [g]	mg U / g Trockenmasse
<i>Mucor</i> sp MF 83	1	19200	2510	86,93	0,0089	93,76
	2	19100	283	85,18	0,0093	87,47
	3	18700	2550	86,36	0,0024	336,46
	4	20000	4200	79,00	X	X
<i>Conidiobolus</i> sp. MF 91	1	17600	14000	20,45	0,0036	50,00
	2	20900	18100	13,40	-0,0006*	X
	3	18600	14800	20,43	0,0020	95,00
	4	20000	15500	22,50	X	X
<i>Arthrobacter</i> sp. + <i>Umbelopsis</i> sp MBMF 110	1	16100	9030	43,91	0,0044	80,34
	2	12000	10200	15,00	0,0037	24,32
	3	15800	9600	39,24	0,0043	72,09
	4	14400	10600	26,39	X	X
<i>Cryptococcus</i> sp. MB 109	1	20300	19800	2,46	0,0037	6,76
	2	20500	19700	3,90	X	X
	3	20400	20400	0	X	X
	4	20500	20000	2,44	X	X
Kontrolle		19200	18900	-	X	X

X = nicht gemessen, grau markiert: Probe wurde für REM / TEM verwendet. *Wägefehler

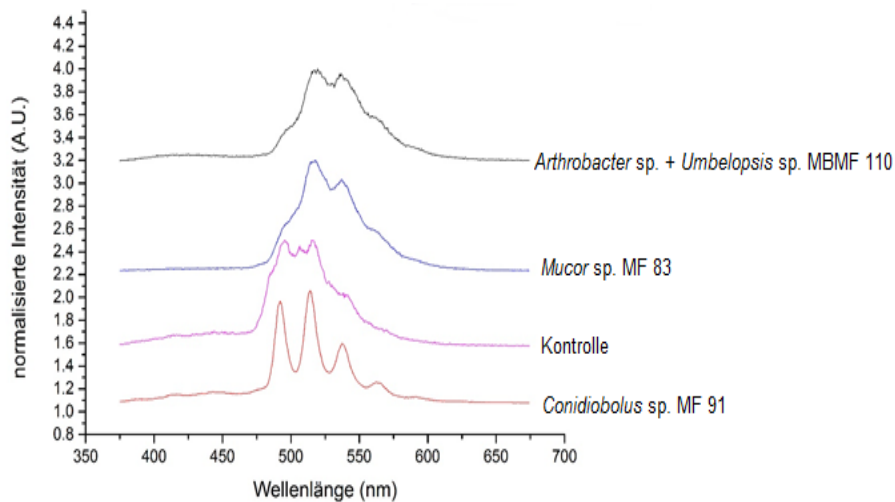


Abb. 2.20: Vergleich der normalisierten TRLFS-Spektren der Kontrolle und der Mikroorganismen *Mucor* sp. MF 83, *Conidiobolus* sp. MF 91 und *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110.

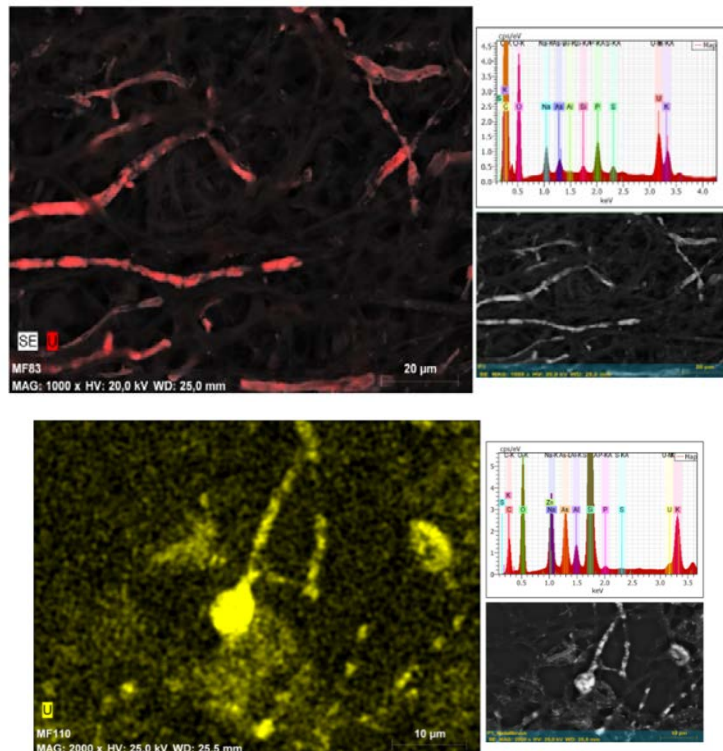


Abb. 2.21 a/b: Röntgenanalyse der REM-Aufnahme von *Mucor* sp. MF 83 (a) und *Conidiobolus* sp. MF 91 (b).

Durch die an die REM gekoppelte Röntgenanalyse (Abb. 2.21a) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem in den Hyphen akkumulierten Element um Uran, hier in rot markiert, handelt. Bei MF 91 konnten durch die REM ebenfalls Hyphen im Myzel lokalisiert werden, welche besonders in den Hyphenspitzen mit einem schweren Element beladen sind. Die Anzahl dieser Hyphen ist hierbei jedoch sehr gering. Durch die Röntgenanalyse konnte auch bei diesem Isolat festgestellt werden, dass das Uran (gelb) in diese Hyphen ab- bzw. adsorbiert wurde (Abb. 2.21b). Bei dem Doppelisolat *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 ist erkennbar, dass in einigen Hyphen ein Element mit hoher Ordnungszahl eingelagert ist. Aufgrund des Doppelisolatcharakters und zur genaueren Darstellung des Bakteriums wurden zusätzliche REM-Analysen angefertigt. Die Zellwand der Hyphen sticht visuell hervor. Unter Anwendung einer größeren Vergrößerung wird deutlich, dass scheinbar das Element in zylinderförmigen Objekten an der Zellwand eingelagert ist. Hierbei wird vermutet, dass es sich um Zellen von *Arthrobacter* sp. MB 110 handelt. Zusätzlich wird deutlich, dass das Element nicht gleichmäßig in den Hyphen verteilt ist, sondern punktuell an einigen Stellen gehäuft akkumuliert ist.

Das bei dieser Röntgenanalyse gelb markierte Uran entspricht von der Anordnung dem Rückstreuelektronenbild der REM. Somit kann durch die in Abb. 22 dargestellte Röntgenanalyse von MBMF 110 nachgewiesen werden, dass das eingelagerte schwere Element in diesem speziellen Fall in einer ausgekeimten Spore in den Hyphen Uran entspricht.

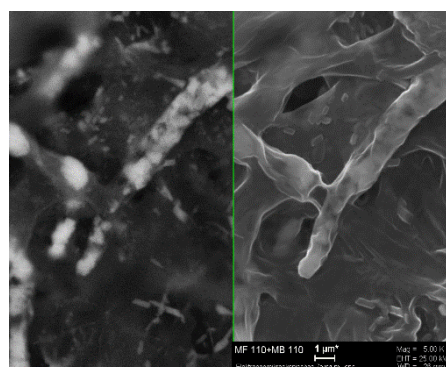


Abb: 2.22: Rückstreuelektronenbild (REM) von (*Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110).

Neben der morphologischen Charakterisierung wurden die Isolate auch auf die Fähigkeit zur Bildung von Siderophoren, Eisen-chelierende Moleküle, untersucht, da dies einer der möglichen Prozesse zur (Im)mobilisierung von Radionukliden und Schwermetallen ist (Gadd, 2004). Hierbei konnte bei allen Isolaten eine deutliche Entfärbung des Mediums in unmittelbarer Nähe des Myzels beobachtet werden. Aufgrund der sehr späten Reaktion, die erst nach ca. zwei Monaten auftrat, ist in Betracht zu ziehen, dass die Verfärbung des Mediums auch anhand von Änderungen des pH-Wertes durch sekretierte Säuren, beispielsweise Fettsäuren wie γ -Linolensäure (Dyal *et al.*, 2005) hervorgerufen werden kann. Auch dieser Prozess kann zur Gewinnung von unzugänglichem Eisen dienen. So ist beispielsweise über die Ascomyceten *Saccharomyces cerevisiae* (Lesuisse und Labbe, 1989) und *Neurospora crassa* (Howard, 1999) bekannt, dass diese durch Azidifizierung des umgebenden Mediums unzugängliches Eisen gewinnen können. Diese These wird aufgrund der mehrfach beobachteten Produktion einer gelblichen, öligen Flüssigkeit durch *Mortierella* sp. MF 26, welche für eine endgültige Aussage chemisch analysiert werden muss, gestützt. Gleichwohl ist bereits bekannt, dass Zygomyceten, speziell *Rhizopus* sp, die polycarboxylische Siderophore Rhizoferrin produzieren können (Thieken und Winkelmann, 1992). Daher ist anzunehmen, dass durch *Mortierella* sp. ebenfalls Siderophore produziert werden könnten und somit weitere Untersuchungen, beispielsweise eine Massenspektrometrie des Kulturüberstands, durchgeführt werden sollten. Diese Siderophore könnten auch für die Biotechnologie im Hinblick auf die Bioremediation von Schwermetallen interessant sein, da bereits die detoxifizierende Wirkung von mikrobiellen Siderophoren nachgewiesen werden konnten (Saha *et al.*, 2015).

Aufgrund von vielfach immer höheren Schwermetallkonzentrationen in der Umwelt, die toxische Werte erreichen können, ist es besonders wichtig, Prozesse zur Verringerung dieser Konzentrationen näher zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind hierbei die Schwermetalle Blei, Chrom, Quecksilber, Uran, Selen, Zink, Arsen, Cadmium und Nickel (Ahakya *et al.*, 2003). Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit darauf liegt, Mikroorganismen, die Radionuklide mobilisieren oder immobilisieren können, zu beschreiben, wurden die zuvor am interessantesten erscheinenden Isolate für die Hauptversuche dieser Arbeit ausgewählt. Hierzu gehören die Isolate die insbesondere bei der Untersuchung auf Siderophorenproduktion auffällig waren, wie beispielsweise *Verticillium* sp. MF 93, welcher CAS rot verfärbte, *Mucor* sp. MF 83, welcher bei dem CAS-Test besonders schnell eine positive Reaktion aufwies sowie *Conidiobolus* sp. MF 91. Zusätzlich wurden die Isolate, welche bereits in Mikrokosmentests in Hinblick auf Radionuklid(im)mobilisierung, aus mit Morassina Schwarzschiefer versetzten Flüssigmedium, welche positive Ergebnisse aufwiesen, ausgewählt.

Insbesondere das radioaktive Element Uran steht aufgrund seiner Toxizität immer wieder im Fokus der Öffentlichkeit. Diese Arbeit soll die Rolle der Mikroorganismen, die aus einer radionuklidreichen Umgebung isoliert wurden, bei der (Im)mobilisierung von Radionukliden insbesondere Uran als mögliche Sanierungsmethode klären. Hierbei stehen insbesondere die Mikroorganismen-Gesteins-Interaktionen mit Schwarzschiefer im Vordergrund dieser Studie.

Um die Sorptionsfähigkeit der Isolate *Mucor* sp. MF 83, *Conidiobolus* sp. MF 91, *Arthrobacter* sp. MB 109 und *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 zu klären, wurden diese für 48 h mit 0,1 mM Uranyl Nitrat bei pH 5 kultiviert und die Urankonzentration in der Lösung vor und nach der Sorption bestimmt. Das Spektrum der Kontrolle weist zwei Uranspezies, freies Uranyl und Uranylhydroxid, auf. Hierbei ist zu erkennen, dass *Arthrobacter* sp. MB 109 widererwarten sehr wenig bzw. kein Uran sorbiert. Die Sorptionsrate des Mikroorganismus beträgt 2,46 % und entspricht somit einer akkumulierten Masse von 6,76 mg Uran pro Gramm Biomasse, aufgrund dessen keine TRLFS durchgeführt wurde. Anhand früherer Studien unter anderem durch Carvajal *et al.* (2012) und Katsenovich *et al.* (2012), welche bis zu 90-100% Sorption nachweisen konnten, wurde eine hohe Bioadsorptionsrate von Uran durch *Arthrobacter* sp. erwartet, welche jedoch für die hier untersuchte *Arthrobacter* sp. MB 109 nicht bestätigt werden konnte. Anhand des Live/Dead-Stainings wird angenommen, dass das Bakterium bei den nötigen Kultivierungsbedingungen nur geringes bzw. kein Wachstum aufwies. Für dieses Bakterium wurde das Experiment bereits ein zweites Mal mit gleichem Ergebnis durchgeführt, so dass möglicherweise andere Kulturmedien für eine erhöhte Biomasseproduktion getestet werden sollten. Zusätzlich sollten die Experimente mit Uranylsulfat wiederholt werden, da dieses den Umweltbedingungen des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes „Morassina“ aufgrund der dort häufig vorkommenden Eisensulfat-Mineralen wie beispielsweise Jarosit stärker entspricht. Uranylsulfat kommt in dieser Form jedoch nicht in der Natur vor und ist aufgrund seiner geringeren Löslichkeit im Vergleich zu Uranyl Nitrat experimentell schwieriger nachzuweisen. Dennoch ist über *Arthrobacter* bereits bekannt, dass dieser hohe Sorptionskapazitäten für Uran aufweisen kann. So ist bereits für verschiedene *Arthrobacter*-Arten, beispielsweise *Arthrobacter simplex* (58 mg/g), *A. nicotinae* (698 mg/g) und *Arthrobacter* sp. Stamm Zn2 (108,3 \pm 1,5 mg/g), nachgewiesen worden, dass diese Uran akkumulieren und dieses hauptsächlich durch physikochemische Bindungen an die

Zellkomponenten sorbieren (Sakaguchi und Nakajima, 1991; Islam und Sar, 2016). Weiterhin wird insbesondere *Arthrobacter* sp. als möglicher Absorbent für Uran und Thorium aus Abwässern der Kernbrennstoffverarbeitung, Abraumhalden oder anderen Abfallquellen erwogen (Tsuruta, 2007). Auch wurde die Freisetzung von Uran aus Autunit durch *Arthrobacter* mit und ohne direkten Kontakt zu dem Mineral dokumentiert, welches auf die Freisetzung von organischen Säuren zurückzuführen ist. Hierbei wurde beobachtet, dass das Bakterium bei Kontakt einen Biofilm auf der Oberfläche des Wirtsminerals bildete und in die Risse eindrang (Katsenovich *et al.*, 2012). Ein ähnlicher Prozess könnte auch zur Mobilisierung von Uran aus Schwarzschiefer führen. Mögliche Sorptionsmechanismen bzw. Bindungsstellen sind hierbei die Bindung an der Zellwand, Exopolymere sowie Proteine und Fette, welche Carboxyl-, Phosphat-, Amino- oder Hydroxylgruppen enthalten. Die Bindung an die Zellwand findet hierbei primär durch physikalische und chemische Interaktionen wie Adsorption, Ionenaustausch und Komplexierung statt und ist nicht vom Metabolismus abhängig (Francis *et al.*, 2004). Durch Rasterkraftmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass uranbindende *Arthrobacter*-Stämme eine unregelmäßige Zelloberfläche aufweisen, welche möglicherweise eine vergrößerte Oberfläche zur Uranpräzipitation darstellt (Katsenovich *et al.*, 2012). Es gibt jedoch auch Nachweise dafür, dass Uran intrazellulär durch *Arthrobacter* sp. akkumuliert wird (Geissler und Selenska-Pobell, 2005). Die intrazelluläre Immobilisierung von Uran kann beispielsweise durch Phosphataseaktivitäten, welche bei *Arthrobacter* sp. jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnten, stattfinden, so dass Uran als schwerlösliches Uranphosphat gebunden ist (Martinez *et al.*, 2007). Gewöhnlich wird Uran in der Zelle anionisch gebunden oder liegt als dichte Ablagerungen vor, wobei diese Ablagerungen insbesondere aus Uranylhydrogenphosphat, Hydroxophosphato- oder Polyphosphatkomplexe bestehen. Andere Liganden, wie beispielsweise Carboxylspezies oder organische Liganden wie Ketogluconsäure, Zitronensäure, Oxalsäure oder Catechole sind ebenfalls mögliche Bindestellen für Uran (Francis *et al.*, 2004).

Bei der Analyse des, durch die TRLFS gewonnenen Spektrums für *Mucor* sp. MF 83 fällt insbesondere bei der zeitaufgelösten Darstellung auf, dass dieses aus zwei überlagerten Spektren zu bestehen scheint, was darauf hindeutet, dass Uran an mindestens zwei verschiedene chemische Gruppen gebunden ist. Hierbei kommt insbesondere die Bindung an den Zellwandbestandteil Chitosan bzw. dessen reaktive Aminogruppen in Frage, da für diese bereits die Bindungsfähigkeit von Uran nachgewiesen wurde (Eiden *et al.*, 1980). Um die funktionellen Gruppen an der Zelloberfläche zu bestimmen und somit die möglichen Bindungsstellen für Uran zu klären, müsste eine potentiometrische Titration erfolgen, wobei insbesondere die funktionellen Gruppen Carboxyl, Carboxyl/Phosphat, Phosphat/Amino und Amino/Hydroxyl vielversprechend sind (Vogel, 2011). Auch eine Bindung an phosphatische Bestandteile der Zelle ist möglich, da Phosphat stark präzipitierend auf Uran wirkt und in vielen Zellorganellen bzw. der Plasmamembran lokalisiert ist (Sivaswamy *et al.*, 2010). Im Vergleich mit anderen Spektren, beispielsweise von dem moderat-acidophilen, aus einem Uranbergwerk isolierten Ascomyceten *Coniochaeta fodinicola* sind deutliche Ähnlichkeiten erkennbar (Vázquez-Campos *et al.*, 2015). Bei diesem Pilz ist das Uran an Phosphatgruppen gebunden, wobei die prominenten Peaks nahezu übereinstimmen, hier jedoch nur zwei der vier für Uranyl typischen Peaks deutlich erkennbar sind und der erste prominente Peak eine höhere Intensität aufweist als der Zweite. Die anderen beiden Peaks sind als Schultern links und rechts der beiden Hauptpeaks erkennbar. Diese hohe Übereinstimmung zeugt von der Qualität der im Rahmen dieser Studie erzeugten Spektren. Um die Bindung an Phosphat zu bestätigen, muss ein Röntgenanalysegekoppeltes, bildgebendes Verfahren angewandt werden. Bei der Rasterelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass das Uran scheinbar intrazellulär gebunden ist, hierbei jedoch keine Gleichverteilung vorliegt, sondern das Uran in einigen Hyphen (ca. jede hundertste) konzentriert ist. Diese Hyphen wirken nahezu vollständig ausgefüllt, so dass die Hypothese, dass das Uran in abgestorbenen bzw. vollständig vakuolisierten Zellen älteren Myzels, eingelagert wird, aufgestellt werden kann. Zusätzlich konnte bei der Röntgenanalyse auch Phosphor aber auch Schwefel insbesondere an den Stellen, wo das Uran nachgewiesen wurde, gezeigt werden. Bei der Lichtmikroskopie vorhergehender Versuche konnten ebenfalls leer erscheinende, verhältnismäßig große Hyphen beobachtet werden, welche als mögliche Lager für toxische Abfälle dienen könnten. Um diese Hypothese zu bestätigen muss eine Färbung dieser Hyphen, sowie ein Stoffwechsellassay angefertigt werden, da für diese Lagerung ein aktiver Stoffwechsel in diese Hyphen induziert sein muss.

Bei der Betrachtung des Spektrums des Doppelisolates *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 wird deutlich, dass auch hier die prominenten Peaks im Vergleich mit der Kontrolle deutlich nach rechts verschoben sind, ähnlich denen von *Mucor* sp. MF 83. Auch hier sind nur zwei der vier üblichen Peaks deutlich erkennbar, jedoch mit vergleichbaren Intensitäten. Auch bei diesem Spektrum kann vermutet werden, dass das Uranyl sowohl phosphatisch als auch carboxylisch gebunden ist. Um dies

zu bestätigen muss beispielsweise eine Röntgenanalyse-gekoppelte TEM erfolgen. Bei der REM des Isolates wird auch hier deutlich, dass das Uranyl interzellulär gebunden ist, jedoch in wesentlich weniger Hyphen (ca. jede Tausendste) sichtbar im Vergleich zu *Mucor* sp. MF 83. Interessant hierbei ist, dass insbesondere die Zellwandkonturen bei geringer Auflösung heller erscheint. Bei einer stärkeren Vergrößerung fällt auf, dass sich an der Zellwand von *Umbelopsis* sp. MF 110 die Bakterien befinden, welche in der Röntgenanalyse ebenfalls eine Akkumulation von Uran aufweisen. Bei der Röntgenanalyse viel auf, dass an den gleichen Stellen auch Phosphor aber auch Schwefel gemessen werden konnte. Daher ist es möglich, dass das Uranyl in *Arthrobacter* sp. MB 110 beispielsweise an interzellulärem Phosphat gebunden ist, ähnlich dem Bakterium *Cellulomonas* sp. (Sivaswamy *et al.*, 2010), während es hingegen durch *Umbelopsis* sp. MF 110 carboxylisch gebunden sein könnte. Dies müsste ebenfalls mit TEM bestätigt werden, wobei hier sowohl die Hyphen als auch die Bakterienzellen untersucht werden müssten. Bei den Bakterienzellen sollte insbesondere auf nadelartige Fibrillen im Cytoplasma geachtet werden, da für eine weitere *Arthrobacter*-Spezies Uranpolyphosphatablagerungen dieser Art beobachtet werden konnten (Merroun *et al.*, 2006).

Besonders auffällig im Vergleich ist das Spektrum von *Conidiobolus* sp. MF 91, welches das typische Uranyl-4-Finger-Spektrum aufweist, wobei jedoch auch hier die Peaks deutlich nach rechts verschoben sind. Bei diesem Spektrum wird angenommen, dass das Uranyl sulfatisch gebunden sein könnte. Hierbei sind deutliche Ähnlichkeiten bei der Peak-Lage mit Uranylsulfat erkennbar (Arnold *et al.*, 2011). Durch ein bildgebendes Verfahren muss hierbei die genaue Lage des Urans untersucht werden, so dass Rückschlüsse über die Bindung geschlossen werden können. Bei der REM-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass das Uran nur in wenigen Hyphen (ca. jede Zehntausendste) gebunden wurde. Hierbei erscheint das Uran eher punktförmig in den Hyphen gebunden zu sein und eine Häufung konnte an den Hyphenspitzen und Septen beobachtet werden, was zu der Annahme führt, dass möglicherweise das Uran durch die produzierten Siderophore gebunden und aufgenommen wird. Zur Bestätigung dieser Annahme muss neben der Lage und Bindungsart des Urans insbesondere die Struktur der isolierten Siderophore genauer aufgeklärt werden.

Im Allgemeinen fällt bei der Röntgenanalyse der drei Isolate auf, dass hohe Peaks für die Elemente Silicium, Arsen, Zink, Aluminium und Schwefel vorliegen. Silicium und Aluminium sind durch den Aufbau des Stiftprobentellers zurückzuführen, da dieser aus Aluminium besteht und der Pilz auf einem Deckgläschen aus Glas (Siliciumoxid) aufgebracht wurde. Das Arsen ist auf die Probenbehandlung, speziell dem Waschen mit Cacodylatpuffer zurückzuführen. Bei dem Element Schwefel wird angenommen, dass dieses aus Zellbestandteilen, beispielsweise der Aminosäure Cystein, stammt. Schwefel bzw. Sulfat ist hierbei neben Phosphat eine der vermuteten Hauptbindestellen des Urans, so dass die Bindung an Sulfat oder Phosphat als Hauptaugenmerk bei der Transmissionselektronenmikroskopie gelten sollte, da beide im Vergleich zu Uran ein ähnliches Mapping aufweisen. Das Element Zink ist ein wichtiges Spurenelement und Co-Faktor vieler Enzyme, so dass dieses Element wahrscheinlich enzymgebunden in der Zelle vorliegt.

Die aus dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“ isolierten und in dieser Studie näher untersuchten Gattungen sind vielversprechende Biosorbenten für Schwermetalle und Radionuklide. Viele der Arten, insbesondere *Arthrobacter* sp. sind extrem schwermetalltolerant und können Radionuklide aus dem Schiefer in der Biomasse akkumulieren oder mobilisieren. Bei den Toleranztests der ausgewählten Isolate sollte eine genauere Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgen indem zusätzliche Konzentrationen der bereits untersuchten Schwermetalle getestet werden. Zusätzlich sollten weitere Schwermetalle wie beispielsweise Cadmium und Chrom untersucht werden und von allen Toleranztests muss eine genaue Sorptionsrate bestimmt werden um die Rentabilität zu bestimmen. Auch die Sorption von Uran konnte durch die Isolate *Mucor durus* MF 83, *Conidiobolus* sp. MF 91 und *Arthrobacter* sp. + *Umbelopsis* sp. MBMF 110 nachgewiesen werden, so dass diese zukünftig als mögliche Biosorbenten von Uran aus Abwässern der Kernbrennstoffverarbeitung, Abraumhalden oder anderen Abfallquellen dienen könnten und für Biosorptionstests im größeren Maßstab beispielsweise größerer Bioreaktoren verwendet werden sollten. Hierbei könnte durch die Bestimmung der optimalen Kultivierungsbedingungen, insbesondere durch die Bestimmung des pH-Optimums eine Optimierung und somit Steigerung der Sorptionsfähigkeit erzielt werden. Auch sollte getestet werden ob eine unterstützende Matrix beispielsweise aus Aktivkohle einen positiven Effekt auf die Sorption hat und ob durch tote Biomasse ebenfalls hohe Sorptionsraten erzielt werden können, so dass es nicht nötig ist, die lebenden Organismen in die Umwelt einzubringen sondern eine Filtermatrix aus totem Zellmaterial geschaffen werden könnte. Neben der Sorption von Uran sollten auch die Sorption weiterer Radionuklide wie Cäsium oder Europium in Erwägung gezogen werden. Interessant könnten die Isolate auch für das sogenannte Biomining werden, wobei hierfür weitere Analysen zur akkumulierten Menge der Schwermetalle bzw. Seltenen Erden nötig sind. Zusätzlich muss die Bestimmung der

Bindungsstelle bzw. Bindungsart durch eine TEM genauer überprüft werden. Die Bestimmung der Siderophorenstruktur konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden und wird derzeit noch analysiert. Für die weitere Charakterisierung der Isolate, insbesondere des selten vorkommenden *Mucor durus* MF 83 könnten noch weitere physiologische Tests, beispielsweise Enzymtests und verschiedene Färbungen, sowie eine Bestimmung des Kreuzungstyps und der dazugehörigen morphologischen Beschreibung der Zygospore erfolgen.

2.3 Einfluss von Mikroorganismen auf die Freisetzung von Elementen/ Radionukliden aus Schwarzschiefer-Proben⁷

Als Folge des intensiven Uranbergbaus der Sowjetisch (Deutschen) Aktiengesellschaft (SAG/SDAG) Wismut zwischen 1950 und 1990 in Thüringen und Sachsen entstanden eine Vielzahl an mit Radionukliden kontaminierten Altlasten. Um das gesundheitliche Gefährdungspotential durch Radionuklide in der Umwelt zu reduzieren, werden diese ehemaligen Bergbauregionen größtenteils saniert und aufbereitet werden. Natürliche vorkommende Radionuklide, wie z.B. ²³⁸U und ²³²Th, sind natürliche Strahlungsquellen. Im Allgemeinen liegt ihre effektive Dosis in Deutschland jährlich bei ca. 1-6 mSv a⁻¹ (Ritzel, 2008). Des Weiteren kommen sie häufig in Schiefen vor (Bahlburg *et al.*, 2012). Diese könnten als schwerlösliche Sulfide in euxinischen Bedingungen im marinen Bereich sedimentiert worden sein. Dies trifft aber auch für andere Elemente zu wie z.B. Kupfer, Eisen oder andere sulfidisch gebundene Metalle (Bahlburg *et al.*, 2012).

Ein Prozess zur Immobilisierung der Radionuklide ist die Biosorption. Biosorption ist die Fähigkeit einiger Mikroorganismen Metalle/Radionuklide aus einer wässrigen Lösung zu adsorbieren und anzureichern (Beveridge *et al.*, 1989). Dieser Prozess ist unter anderem vom pH-Wert und der Konzentration der Radionuklide abhängig (Guibal *et al.*, 1992). Ein weiterer Prozess ist die Bioakkumulation, ähnlich wie die Biosorption, werden hier Elemente/Radionuklide aufgenommen und in den Zellen z.B. im Cytoplasma akkumuliert und so dem System entzogen. Unter den isolierten Bakterien aus der Morassina Grotte befand sich auch *Arthrobacter* sp., welcher für den Mikrokosmen-Versuch ausgewählt wurden.

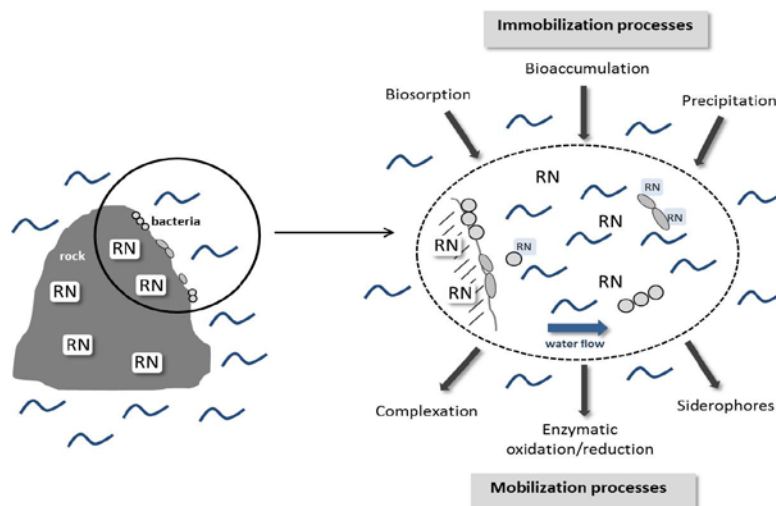


Abb. 2.23: Mikrobielle Prozesse in Gesteins-Wasser-Interaktionen.

Arthrobacter sp. ist ein gram-positives Bakterium, welches in der Lage ist eine sehr hohe Menge an Uran an der Oberfläche von Zellwandkomponenten zu sorbieren und im Cytoplasma zu akkumulieren (Geißler, 2007; Tsuruta, 2007). Dies ist allerdings sehr abhängig von den vorliegenden pH-Werten (Tsuruta, 2007). Des Weiteren hat *Arthrobacter* sp. die Fähigkeit Uran als Phosphat zu immobilisieren (Sanchez-Castro *et al.*, 2016). Zu dem kann *Arthrobacter nicotianae* z.B. auch große Mengen an Thorium adsorbieren (Tsuruta, 2004). Auch wird unter die Prozesse der Immobilisierung die Ausfällung (Präzipitation) von Elementen/Radionukliden durch Mikroorganismen eingeordnet. Manche

⁷ Aus: Stefan Bock, 2016, Einfluss von Mikroorganismen auf die Freisetzung von Elementen/Radionukliden aus Schwarzschiefer-Proben, Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Mikroorganismen sind in der Lage Biominerale wie Eisenhydroxid (Clarke *et al.*, 1997) oder Uranphosphate zu bilden und damit die gelösten Metall-/Radionuklid-Konzentrationen zu vermindern. Unter die Prozesse der Mobilisierung zählt die Komplexierung von Metallen/Radionukliden durch Mikroorganismen. Dabei werden die Metalle/Radionuklide von Oberflächen gelöst und anschließend adsorbiert/akkumuliert. Gleichwohl können die Elemente komplexiert und entlang der Fließrichtung weiter transportiert werden (Anderson *et al.*, 2011).

Solch einen Schiefer beherbergt auch das ehemalige Vitriol- und Alaunbergwerk Morassina in Thüringen. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts war bekannt, dass die austretenden Grubenwässer eine erhöhte Radioaktivität aufwiesen. Das Untersuchungsgebiet bei Schmiedefeld, Thüringen wird zusätzlich durch das dort austretende Wasser charakterisiert. Mit einer Temperatur von 8°C einen sehr sauren pH-Wert sowie hohe Konzentrationen an Eisen und Sulfat aufweist (Schäfer, 2015; Ehrhardt, 2014). Um solche Altlasten zu sanieren, müssen die Radionuklide und andere Elemente wie z.B. Chrom und Blei immobilisiert werden. Dies kann durch Bioremediation erlangt werden. Es sind bisher sechs Prozesse bekannt, welche Radionuklide mit Hilfe von Mikroorganismen immobilisieren oder mobilisieren können (Abb. 2.23; Simonoff *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2011). Das gleiche Prinzip wie bei der Komplexierung läuft auch bei der enzymatischen Oxidation/Reduktion von Elementen/Radionukliden ab, um sie z.B. von Oberflächen herauszulösen um sie danach entweder zu adsorbieren/akkumulieren oder diese entlang der Fließrichtung aus ihrer Umgebung entfernen zu können (Lovley *et al.*, 1993). Ein weiterer Prozess ist die Bildung von Siderophore. Siderophore sind Peptidgruppen, welche durch die Mikroorganismen ausgeschieden werden, um vor allem Eisen zu komplexieren. Eisen ist ein wichtiges Makronährelement unter anderem für die Zellatmung. Dies geschieht besonders in Eisen-limitierten Gebieten um Eisen zu mobilisieren und aufzunehmen (Anderson *et al.*, 2011).

Weitere Isolate aus der „Morassina“-Grotte waren auch *Mucor* sp. und *Cryptococcus* sp. *Mucor* sp. hat eine hohe Aufnahmekapazität für Metalle (Volesky *et al.*, 1995). Bei *Mucor miehei* z.B. hängt die maximale Aufnahme von Uran vom pH-Wert und der Gesamtkonzentration von Uran ab (Guibal *et al.*, 1992). *Cryptococcus* sp. hingegen hat eine Resistenz gegenüber Uran und kann dieses an Phosphat- und Carboxyl-Gruppen binden und in der Zellwand akkumulieren (Mumtaz *et al.*, 2013).

Mithilfe von Batch-Versuchen (ohne Mikroorganismen) wurde bereits die Lösungsreaktionen von Kieselsteinen aus der Morassina Grotte mit Wasser zu unterschiedlichen Verweilzeiten untersucht um die hydrogeochemischen Prozesse vor Ort besser zu verstehen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass vor allem das Wirtsgestein sowie die Verfügbarkeit von Wasser einen großen Einfluss darauf haben. Des Weiteren wird auch darauf hingewiesen, dass die mikrobiellen Tätigkeiten näher untersucht werden sollten, um ein noch besseres Verständnis für die hydrogeochemischen Abläufe zu erhalten (Ehrhardt, 2014). Der Vorteil eines solchen Mikrokosmen-Versuches ist die isolierte Betrachtung der Mikroorganismen mit der Schieferprobe in einem Medium ohne äußere Einflüsse über einen längeren Zeitraum.

In Mikrokosmen wurden die Veränderungen der gelösten SM/RN betrachtet. Die gelösten Konzentrationen von Thorium lagen über die gesamten 21 Tage des Mikrokosmen-Versuches unterhalb der Nachweisgrenze von $5 \cdot 10^{-4}$ µg/g. Die gelösten Konzentrationen von Uran lagen größtenteils oberhalb der Nachweisgrenze (Abb. 2.24). Der Blindwert lag mit einer gelösten Konzentration von $1,6 \cdot 10^{-2}$ - $1,7 \cdot 10^{-2}$ µg/g Uran oberhalb der Nachweisgrenze. Es gab über die Dauer des Versuches keine Änderung in den gemessenen Konzentrationen. Die gemessenen gelösten Konzentrationen von AB lagen nur an Tag 1 mit $1,4 \cdot 10^{-3}$ µg/g Uran oberhalb der Nachweisgrenze. Ab Tag 5 bis zum Ende des Versuches waren die gelösten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, was auf eine spezifische Sorption oder Aufnahme hindeutete.

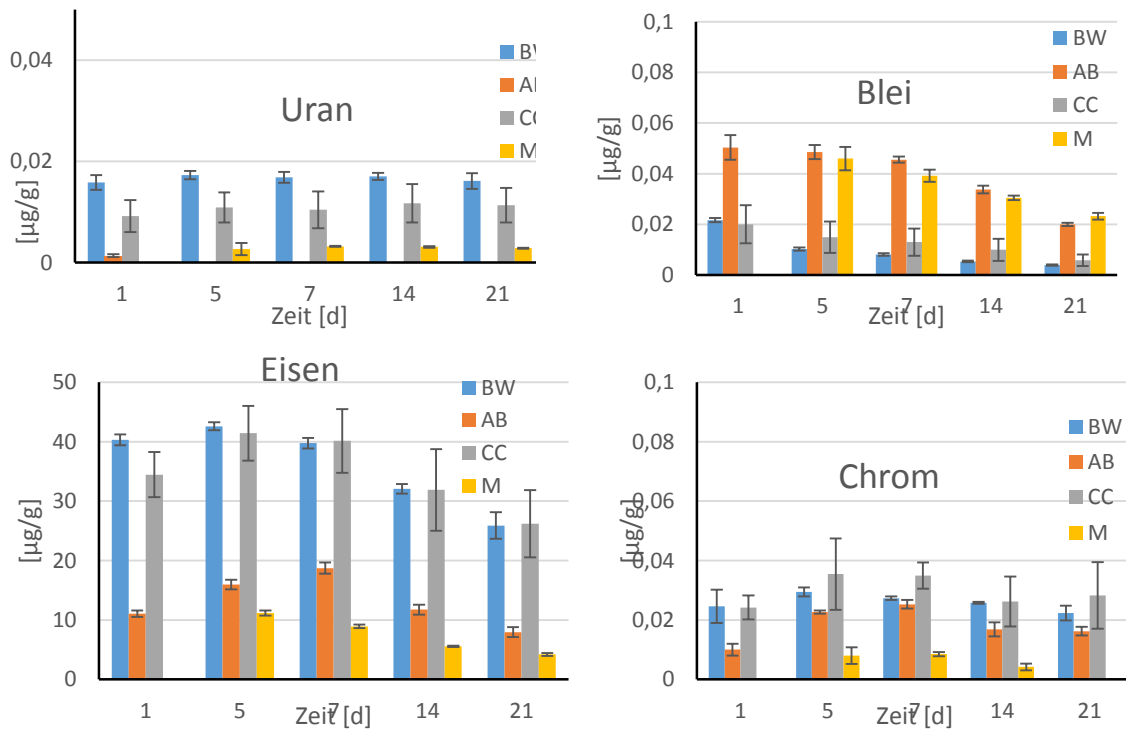


Abb. 2.24: Mittelwerte der gelösten Metalle in den Mikrokosmen ohne (BW) und mit drei Inokulationen (n=3).

Bei AB waren die höchsten gelösten Pb-Konzentrationen messbar. Auch hier ist eine Reduzierung der gelösten Pb-Konzentration zu erkennen. Die gemessenen gelösten Konzentrationen von Chrom bei M sind über die Gesamtdauer geringer als die der anderen Mikrokosmen-Ansätze. Die gelöste Cr-Konzentration von AB stieg von Tag 1 mit $1,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/g}$ auf ein Maximum von $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/g}$ an Tag 7. Ab dem 14. Tag sank die Konzentration wieder. CC zeigte ein ähnliches Verhalten. Die Mn-Konzentration stieg über die 21 Tage an. Bei Kupfer, anders als bei Vanadium, Blei, Mangan und Molybdän, waren die Konzentrationen bei BW und CC höher als bei AB und M. Da sich die gelösten Konzentrationen von *Cryptococcus* sp. und vom Blindwert ähneln, genauso wie sich *Mucor* sp. und *Arthrobacter* sp. sich ähneln, könnte man Rückschlüsse auf den pH-Wert schließen. Denn *Cryptococcus* sp. und der Blindwert sowie *Mucor* sp. und *Arthrobacter* sp. haben ähnliche pH-Werte. Die Ergebnisse der ICP-OES/MS und den Messungen der Physikochemie haben gezeigt das insbesondere *Arthrobacter* sp. und *Mucor* sp. einen Einfluss auf die Freisetzung von Elementen/Radionukliden aus Schwarzschiefern haben. Die Mikroorganismen sind somit in der Lage, zu wachsen und Elemente zu mobilisieren und immobilisieren. Der pH-Toleranz-Test hat bis auf das Herstellen von R2A Medium mit einem pH-Wert von 8 und 9 gut funktioniert und auswertbare Ergebnisse geliefert. Die Ergebnisse des pH-Toleranz-Tests zeigen, dass der pH-Wert alleine kein limitierender Faktor für das Wachstum der getesteten Mikroorganismen war und für zukünftige Toleranz-Test nur eine Nebenrolle spielen wird.

3. Untersuchungsgebiet Bad Kreuznach

Bad Kreuznach befindet sich im Überschneidungsbereich des Mainzer Beckens und des permokarbonen Saar-Nahe Beckens. Seine Bedeutung verdankt Bad Kreuznach den radonhaltigen Mineral- und Thermalwässern, die in zahlreichen alten und fünf aktuellen Mineralbrunnen erschlossen wurden und werden. Die Brunnen sind im Tal der Nahe in etwa Nord-Süd-Richtung aufgereiht. Das Tal hat sich in den massigen Härtling des Kreuznacher Rhyoliths entlang von NNE-SSW-streichenden Brüchen tief eingeschnitten. Der Kreuznacher Rhyolith ist im Oberrotliegenden in die karbonischen und permischen Gesteine zähplastisch intrudiert und teilweise als hochviskose Lava ausgeflossen. Dabei hat es die karbonischen und permischen Gesteine hochgeschleppt und in südlicher Richtung auf die Oberrotliegend-Gesteine überschoben (Lorenz 1973). Auf diese Weise sind heute Gesteine aus dem tiefen Untergrund unterhalb des Rhyoliths lateral zum Rhyolith an der Erdoberfläche aufgeschlossen.

Die Mineralbrunnen erschliessen den Rhyolith, der von quartären Nahe-Ablagerungen bedeckt ist (Abb. 3.1). Beprobte wurden die Karlsbader Bäderquelle (ca 18°C, 25 mS/cm), die Theodorshaller Thermalquelle (ca 26°C, 27 mS/cm), der Hauptbrunnen (ca 24°C, 21 mS/cm) sowie die Inselbäderquelle (ca 16°C, 31 mS/cm), die alle einen leicht sauren pH von 6,6–6,9 und geringe O₂-Sättigung (< 4%) bei einer Dichte von 1.01 g cm⁻³ aufwiesen. Es handelt sich um NaCl-Wässer mit maximal 18 g/L Lösungsinhalt. Lösungsinhalt und Temperatur schwanken zwischen den einzelnen Fassungen, SO₄²⁻ ist unter der Nachweisgrenze, da es zur Ausscheidung von Baryt kommt und bis zu 100 mg/L Barium in den Wässern gelöst enthalten ist. Typisch zeigt Ca weiterhin eine deutliche Konzentrationen, daneben Sr, NH₄, Li, Br, F und J (Hemfler & Büchel 1995). Die Nahe führt in Abhängigkeit von der Abflussmenge ein gering mineralisiertes Nahe Ca-Na-(Mg-)HCO₃-Cl Wasser. In der Gasphase führt das Wasser Methan, Stickstoff und das Edelgas Radon. Die Hydrochemie erwies sich bei der neueren Beprobung als stabil mit Werten für Th < 0.01 µg/L, Cd, Co, Cr, Cu, Pb < 1.5 µg/L, Ni < 2.2 µg/L und Zn 48-105 µg/L (Abb. 3.2). Weiterhin wurden Fe (5.8–13.3 mg/L), U (bis 0.23 µg/L), hohe CH₄-Konzentrationen (30-40 Vol.-%) und hohe N₂-Konzentrationen (60 Vol.-%) von der Bäderverwaltung beschrieben. Die Seltenen Erden zeigten das Fehlen der Gd-Anomalie, die im Nahewasser auftritt.

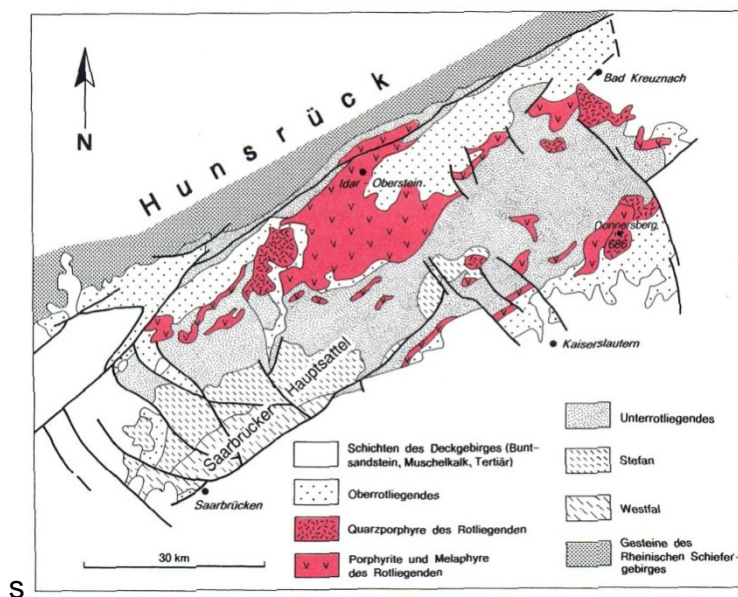


Abb. 3.1: Geologie des Untersuchungsgebiets Bad Kreuznach (Hempfler 1993).

Der Druckspiegel der Mineralwasserbrunnen steht in der Regel höher als der Wasserspiegel der alluvialen Grundwässer. So gelangt es über einzelne geöffnete Klüfte in den rhyolithischen Gesteinen an die Erdoberfläche. Nur bei Hochwasserereignissen und bei überkapazitiver Förderung steht der Druckspiegel der Mineralwasserbrunnen tiefer, als das Flußwasser der Nahe bzw. die Grundwasserspiegel der alluvialen Aquifere. In diesen Fällen kann es bei nicht allzu tiefer Verrohrung und Abdichtung zu bakteriologischen und hydrochemischen Stoffeinträgen in das Mineralwassersystem kommen.

Die Herkunft des Mineral- und Thermalwassers ist bisher nicht wirklich geklärt. Hölting (1969) nimmt eine Herkunft aus dem Saar-Karbon als sulfatreduzierte Muschelkalk-Wässer an. Im Gegensatz dazu

halten Hemfler & Büchel (1995) eine Herkunft aus den tertiären Beckensedimenten des Oberrheingrabens im Gefolge eines konvektiven Wärmetransports (Person & Garven (1992) für wahrscheinlich. Einzig sicher bezüglich der Herkunft schien der Radon-Gehalt der Quellwässer aus dem Rhyolith zu stammen, den die Mineral- und Thermalwässer die obersten Kilometer (?) bei ihrem Aufstieg durchfließen. Da jedoch die Radiumisotopenverhältnisse zwischen den Mineral- und Thermalwässern und dem potenziellen rhyolithischen Wirtsgestein nicht übereinstimmen (s. Tab. 3.1), wurden andere Gesteine untersucht, die als Quelle für Radon in Frage kommen.

Nach Bültemann & Strehl (1969), Barthel (1974) und Reé & Emmermann (1974) gibt es eine ganze Reihe von Porphyrmassiven in mehr als 30 km Entfernung südwestlich des Kreuznacher Rhyoliths im Saar-Nahe-Gebiet, die Uranvererzungen als mögliche Quelle für den Radongehalt der Mineral- und Thermalwässer von Bad Kreuznach beinhalten (Pophyr entspricht in etwa dem Gesteinsbegriff des Rhyoliths). In unmittelbarer Umgebung des Kreuznacher Rhyoliths treten Uranvorkommen allerdings nur in bituminösen Tonsteinen bzw. im Kontaktbereich zwischen Sandsteinen und Tonsteinen auf. Im letztgenannten Fall treten die Vererzungen in Verbindung mit kohligem Material ehemaliger Baumstämme bzw. in Verbindung zu linsenförmigen Pyritvererzungen auf. Die erhöhten Gehalte betragen bis zu 1,6 % U_3O_8 . Als Mineralisationen treten Pechblende (Uraninit, UO_2) und Coffinit $U^{4+}[(SiO_4)(OH)_4]$ auf.

Aus diesem Grund wurden mehrere sedimentäre und einige vulkanische Gesteinsproben des Rotliegenden südlich des Kreuznacher Rhyoliths beprobt, dort wo die diese Gesteine vom Kreuznacher Rhyolith aus der Tiefe hochgeschleppt und in südlicher Richtung aufgeschoben wurden. Der Kreuznacher Rhyolith indrudierte im Oberrotliegenden (Lorenz 1973).

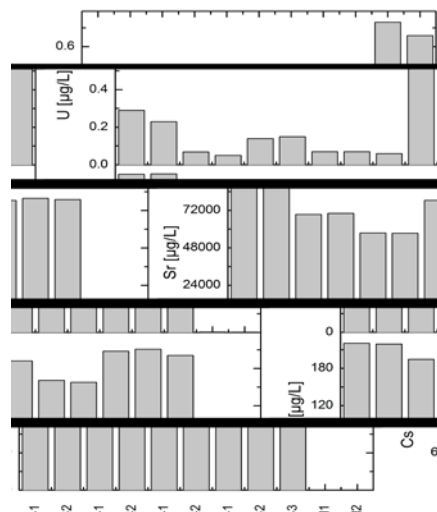


Abb. 3.2: Uran-, Strontium- und Cäsium-Gehalte der beprobten Quellen von Bad Kreuznach.

3.1 Radionuklid-reiche Gesteins-Wasser-Systeme: eine hydrochemische und mikrobiologische Studie⁸

Die Ra-Gehalte in den Quellen zeigen eine deutlich höhere Konzentration von ^{226}Ra gegenüber ^{228}Ra (Tab. 3.1). Das rhyolitische ehemals vermutete Wirtsgestein zeigt hingegen ein umgekehrtes Isotopen-Verhältnis (Tab. 3.2). Somit ist nicht wahrscheinlich, dass die erhöhten ^{226}Ra -Konzentrationen in den Thermalwässern nicht nur vom Speichergestein Rhyolith stammen, sondern weitere ^{226}Ra -Quellen dieses System beeinflussen.

Tab. 3.1: Gamma-spektrometrische Vermessung der Wasserproben

Ra [Bq/L]	2002	2007	2012	2014
^{226}Ra	28 *	21 *	15 *	23,3
^{228}Ra	15,3 *	13,5 *	9,6 *	15,5
$^{228}Ra/^{226}Ra$	0,56	0,64	0,64	0,67

⁸⁸ laufende Dissertation von Katja Burow, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tab. 3.2: Gamma-spektrometrische Vermessung von Rhyolith-Proben.

^{238}U	^{230}Th	^{226}Ra	^{228}Th	^{228}Ra
2014 [Bq/kg]	[Bq/kg]	[Bq/kg]	[Bq/kg]	[Bq/kg]
50.0 ± 6.0	< 142.0	46.3 ± 2.8	104.0 ± 6.0	103.0 ± 7.0

Es wurde daher davon ausgegangen, dass karbonische und/oder permische Gesteine, die unterhalb des Kreuznacher Rhyoliths liegen und ebenfalls von den Mineral- und Thermalwässern durchflossen werden, zum $^{226}\text{Ra}/^{228}\text{Ra}$ -Verhältnis beitragen. Hierfür wurden verschiedene Gesteine unterschiedlicher geologischer Formationen aus der Umgebung der Bad Kreuznacher Thermalwässer beprobt und gammaspektrometrisch analysiert (Abb. 3.3) (VKTA, Dresden).



Abb. 3.3: Eine Auswahl der beprobten Gesteine zur gammaspektrometrischen Analyse.

Im Falle der Karlshaller Bäderquelle zeigen die Ergebnisse (Abb. 3.4) keine Korrelation zwischen den untersuchten Gesteinen und den analysierten Thermalwässern. Im Falle des Theodorshaller Brunnens konnte überraschender Weise aber ein direkter Zusammenhang zwischen den analysierten bituminösen Tonsteinen und dem vulkanischen Gesteinen und den Mineralwässern festgestellt werden. Folglich können diese Gesteinstypen ein weiteres Aquifergestein darstellen und somit das Ra-Isotopenverhältnis im Aquifer beeinflussen. Tonsteine jedoch sind eher grundwasserstauende Schichten und folglich ist die Funktion als Aquifergestein in diesem Zusammenhang eher fraglich. Allerdings handelt es sich um diagenetisch verfestigte, harte Gesteine, die infolge der Intrusion des Kreuznacher Rhyoliths eine Klüftung erfahren haben und so doch als Wirtsgesteine für Radon in Frage kommen. Für eine eindeutige Aussage sollten die Ergebnisse nochmal verifiziert werden.

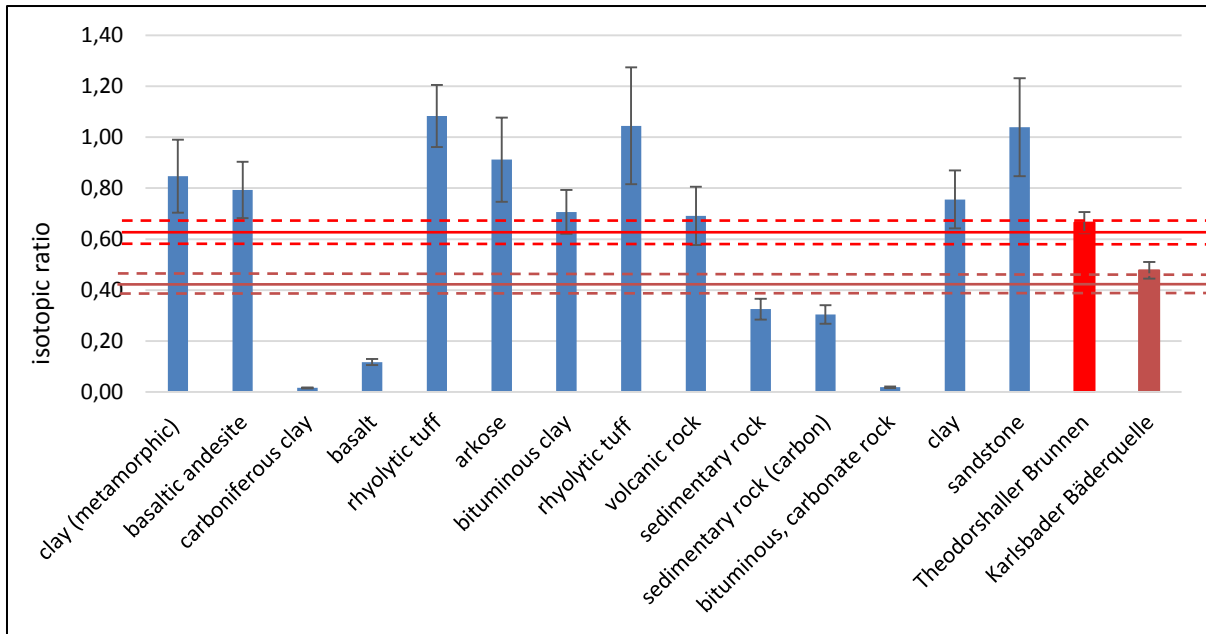


Abb. 3.4: Isotopenverhältnisse 0,72.²³²Th/²³⁸U der untersuchten Grundwässer und Gesteine.

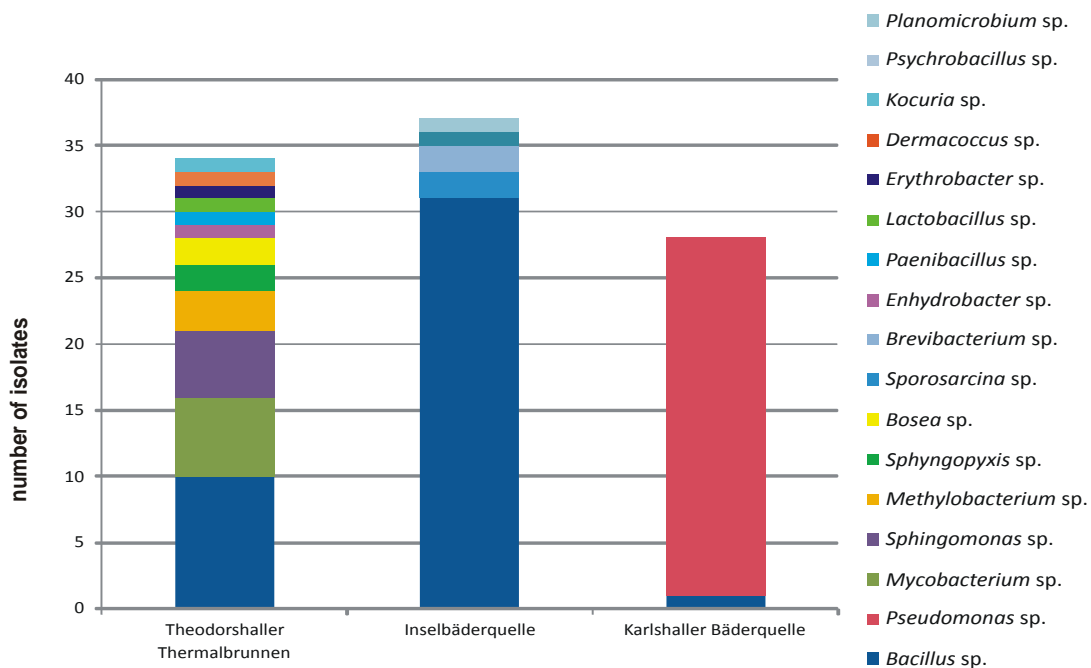


Abb. 3.5: Zusammensetzung des Mikrobioms der untersuchten Wässer

Bekannte mikrobielle Prozesse, die zu einer Immobilisierung Radionuklidien führen, sind für *Pseudomonas* sp. durch Biosorption von U und Th nachgewiesen worden (Sufia *et al.*, 2009). Weiterhin ist bekannt, dass *Pseudomonas stutzeri* und *Bacillus sphaericus* durch Biosorption von Pu(IV)-Polymeren an die Biomasse gebunden wird (Panak und Nitsche, 2001) sowie *P. fluorescens* durch Präzipitation von Sr/U-Carbonaten (Anderson und Apanna, 1994; Francis *et al.* 2000, Panak & Nitsche (2001), Kazy *et al.* (2009), John *et al.* (2001) und Burow *et al.* (2014a, 2014b). Dagegen kann *Microbacterium flavescens* durch Siderophorproduktion zur Lösung und Akkumulation von Pu(IV) beitragen.

Die mikrobiologischen Analysen ergaben im Thermalwasser der Theodorshalle Quelle eine andere Mikrobiom-Zusammensetzung (Abb. 3.5). Durch Isolierung und anschließende Charakterisierung konnte Siderophorenbildung bei *Bacillus jeotgali*, *Mycobacterium hodleri*, *Brevibacterium* sp., *Frigoritolerans* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus hwajinpoensis* und *Bacillus pumilus* gezeigt werden. Damit ist ein Einfluss auf die Lösung von SM/RN gegeben. Damit ist die große Rolle der Mikroben bei der Mobilisierung von Radionukliden auch hier sehr wahrscheinlich, doch müssen die Rollen der einzelnen Stämme noch spezifiziert werden.

Literatur

- Ahalya N, Ramachandra TV, Kanamadi RD (2003) Biosorption of heavy metals. *Res J Chem Environ* 7, 71-79.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169.
- Anderson S, Appanna VD (1994) Microbial formation of crystalline strontium carbonate. *FEMS Microbiology Letters* 116, 43-48.
- Anderson C, Johnson A, Moll H, Pederson K (2011) Radionuclide geomicrobiology of the deep biosphere. *Geomicrobiol J* 28, 540-561.
- Arnold T, Baumann N, Krawczyk-Bärsch E, Brockmann S, Zimmermann U, Jenk U, Weiß S (2011) Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment. *Geochim Cosmochim Acta* 75, 2200-2212.
- Bahamdain L, Fahmy F, Lary S, Amy M (2015) Characterization of some *Bacillus* strains obtained from marine habitats using different taxonomical methods. *Life Sci J* 12, 58-63.
- Bahlburg H, Breikreutz C (2012) *Grundlagen der Geologie*. Springer, Heidelberg.
- Baute MA, Deffieux G, Baute R, Neveu A (1978) New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. *J Antibiotics* 31, 1099-1101.
- Barthel F.H. (1974): Review of uranium occurrences in Permian sediments in Europe, with special reference to uranium mineralizations in Permian sandstones. Reprint from "Formation of Uranium Ore Deposits". International Atomic Energy Agency, Vienna, 183/34, 277-289.
- Beesley CA, Vanner CL, Helsel LO, Gee JE, Hoffmaster AR (2010) Identification and characterization of clinical *Bacillus* spp. isolates phenotypically similar to *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol Lett* 313, 47-53.
- Beveridge TJ, Doyle R J (1989) *Metal ions and bacteria*. Wiley, New York
- Beyer A, Rzanny M, Weist A, Möller S, Burow K, Gutmann F, Neumann S, Lindner J, Musse S, Brangsch H, Stoiber-Lipp J, Lonschinski M, Merten D, Büchel G, Kothe E (2015) Aquifer community structure in dependence of lithostratigraphy in groundwater reservoirs. *Env Sci Poll Res* 22, 19342-19351.
- Bharti N, Yadav D, Barnawal D, Maji D, Kalra A (2013) *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress. *World J Microbiol Biotechnol* 29, 379-387.
- Brandão LR, Vaz ABM, Espírito Santo LC, Pimenta RS, Morais PB, Libkind D, Rosa LH, Rosa CA (2017) Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. *Fungal Ecol* 28, 33-43.
- Brandão PFB, Clapp JP, Bull AT (2003) Diversity of nitrile hydratase and amidase enzyme genes in *Rhodococcus erythropolis* recovered from geographically distinct habitats. *Appl Environ Microbiol* 69, 5754-5766.
- Burford EP, Fomina M, Gadd GM (2003) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineral Mag* 67, 1127-1155.
- Bültemann H.W. & Strehl U. (1969): Uranvorkommen im Saar-Nahe-Gebiet. Geologisches Landesamt Rheinland-Pfalz, interner Bericht.
- Carvajal DA, Katsenovich YP, Lagos LE (2012) The effects of aqueous bicarbonate and calcium ions on uranium biosorption by *Arthrobacter* G975 strain. *Chem Geol* 330, 51-59.
- Chen Y, Wu L, Boden R, Hillebrandt A, Kumaresan D, Moussard H, Baclu M, Lu Y, Colin Murell J (2009) Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur-and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J* 3, 1093-1104.
- Clarke WA, Konhauser KO, Thomas JC, Bottrell SH (1997) Ferric hydroxide and ferric hydroxysulfate precipitation by bacteria in an acid mine drainage lagoon. *FEMS Microbiol Rev* 20, 351-361.
- Cunningham KI, Northup DE, Pollastro RM, Wright WG, LaRock EJ (1995) Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ Geol* 25, 2-8.
- de la Haba RR, Sanchez-Porro C, Marquez MC, Ventosa A (2009) Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 963-971.
- Deubel F, Naumann E (1929) Erläuterungen zur Geologischen Karte von Preußen und benachbarten deutschen Ländern. Lieferung 301, Blatt 3181. Gräfenhal, Berlin.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G, Kothe E (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 107, 1687-1696.
- Dimkpa C, Svatos A, Merten D, Büchel G, Kothe E (2008) Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol* 54, 163-172.
- Dobät K (1963) Höhlenalgen bedrohen die Eiszeitmalereien von Lascaux. *Die Höhle* 14, 41-45.

- Dyal SD, Bouzidi L, Narine SS (2005) Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Res Int* 38, 815-829.
- Ehrhardt R (2014) Hydro-Geochemische Untersuchungen in dem ehemaligen Alaunschieferbergwerk „Morassina“. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Eiden CA, Jewell CA, Wightman JP (1980) Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. *J Appl Polym Sci* 25, 1587-1599.
- Francis AJ, Dodge CJ, Gillow JB, Papenguth HW (2000) Biotransformation of uranium compounds in high ionic strength brine by a halophilic bacterium under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2311-2317.
- Francis AJ, Gillow JB, Dodge CJ, Harris R, Beveridge TJ, Papenguth HW (2004) Uranium association with halophilic and non-halophilic bacteria and archaea. *Radiochim Acta* 92, 481-488
- Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119.
- Galinski EA, Trüper HG (1994) Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15, 95-108.
- Gardea-Torresdey JL, Cano-Aguilera I, Webb R, Tiemann KJ, Gutiérrez-Corona F (1996) Copper adsorption by inactivated cells of *Mucor rouxii*: effect of esterification of carboxyl groups. *J Hazard Mater* 48, 171-180.
- Geißler A (2007) Prokaryotic microorganisms in uranium mining waste piles and their interactions with uranium and other heavy metals. Dissertation, Berakademie Freiberg.
- Geißler A, Selenska-Pobell S (2005) Addition of U (VI) to a uranium mining waste sample and resulting changes in the indigenous bacterial community. *Geobiology* 3, 275-285.
- Griebler C, Lüders T (2009) Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biol* 54, 649-677.
- Griebler C, Mösslacher F (2003) Grundwasser-Ökologie. *Facultas*, Wien.
- Gross S, Robbins EI (2000) Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia* 433, 91-109.
- Guibal E, Roulph C, Le Cloirec P (1992) Uranium biosorption by a filamentous fungus, *Mucor miehei* pH effect on mechanisms and performances of uptake. *Water Res* 26, 1139-1145.
- Hart KM, Kulakova AN, Allen CCR, Simpson AJ, Oppenheimer SF, Masoom H, Courtier-Murias D, Soong R, Kulakov LA, Flanagan PV, Murphy BT, Kelleher BP (2013) Tracking the fate of microbially sequestered carbon dioxide in soil organic matter. *Environ Sci Technol* 47, 5128-5137.
- Hauben L, Moore ERB, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* 21, 384-397.
- Hemfler M., Büchel, G. (1995): Diffuse Stoffeinträge im Bad Kreuznacher Mineralbrunnensystem und Ansätze zu seiner Sanierung. *Z. dt. Geol. Ges.* 146, 250-262.
- Hobara S, Osono T, Hirose D, Noro K, Hirota M, Benner R (2014) The roles of microorganisms in litter decomposition and soil formation. *Biogeochemistry* 118, 471-486.
- Höltling B. (1969): Zur Herkunft der Mineralwässer in Bad Kreuznach und Bad Münster a.St. *Notizbl. Hess. L.-Amt für Bodenforschung.* 97, 367-378.
- Howard DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiol Rev* 12, 394-404.
- Islam E, Sar P (2016) Diversity, metal resistance and uranium sequestration abilities of bacteria from uranium ore deposit in deep Earth stratum. *Ecotox Environ Safety* 127, 12-21.
- Janicki T, Krupiński M, Długoński J (2016) Degradation and toxicity reduction of the endocrine disruptors nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 4-cumylphenol by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *Biores Technol* 200, 223-229.
- John SG, Ruggiero CE, Hersman LE, Tung C-S, Neu MP (2001) Siderophore mediated plutonium accumulation by *Microbacterium flavescens* (JG-9). *Environ. Sci. Technol.* 35, 2942-2948.
- Katsenovich YP, Carvajal DA, Wellman DM, Lagos LE (2012) Enhanced U (VI) release from autunite mineral by aerobic *Arthrobacter* sp. in the presence of aqueous bicarbonate. *Chem Geol* 308, 1-9.
- Kawai F, Zhang D, Sugimoto M (2000) Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 189, 143-147.
- Kazy SK, D'Souza SF, Sar P (2009) Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization. *J. of Hazardous Materials* 163, 65-72
- Kirtzel J, Siegel D, Krause K, Kothe E (2017) Stone-eating fungi: Mechanisms in bioweathering and the potential role of laccases in black slate degradation with the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Adv Appl Microbiol* 99, 83-101.
- Korehi H, Blöthe M, Schippers A (2014) Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Res Microbiol* 165, 713-718.
- Krantz-Rülcker C, Allard B, Schnürer J (1996) Adsorption of IIB-metals by three common soil fungi – comparison and assessment of importance for metal distribution in natural soil systems. *Soil Biol Biochem* 28, 967-975.
- Kuehn KA, O'Neil RM, Koehn RD (1992) Viable photosynthetic microalgal isolates from aphotic environments of the Edwards Aquifer (Central Texas). *Stygologia* 7, 129-142.
- Lacava PT, Li W, Araujo WL, Azevedo JL, Hartung JS (2007) The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *J Microbiol* 45, 388-393.
- Lämmermayr L (1913) Die grüne Pflanzenwelt der Höhlen. Kaiserlich-Königliche Hof- und Staatsdruckerei.
- Lesuisse E, Labbe P (1989) Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 135, 257-263.
- Lorenz V., 1973. Zur Altersfrage des Kreuznacher Rhyoliths unter besonderer Berücksichtigung der Stratigraphie und Überschiebungstektonik in seiner südlichen Umrandung (Saar-Nahe-Gebiet, SW-Deutschland). *N. Jb. Geol. Paläont. Abh.*, 142, 139-164.

- Madhavan S, Krause K, Jung E-M, Kothe E (2014) Differential regulation of multi-copper oxidases in *Schizophyllum commune* during sexual development. *Mycol Progr* 13:1199-1206.
- Martinez RJ, Beazley MJ, Taillefert M, Arakaki AK, Skolnick J, Sobczyk PA (2007) Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide-and metal-contaminated subsurface soils. *Environ Microbiol*, 9, 3122-3133.
- Matlakowska R, Sklodowska A (2009) The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures. *J Appl Microbiol* 107, 858-866.
- Matlakowska R, Wlodarczyk A, Slominska B, Sklodowska A (2014) Extracellular elements-mobilizing compounds produced by consortium of indigenous bacteria isolated from Kupferschiefer black shale – implication for metals biorecovery from neutral and alkaline polymetallic ores. *Physicochem Problems Mineral Processing* 50, 87-96.
- Matlakowska R, Skłodowska A, Nejbart K (2012) Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine. *FEMS Microbiol Ecol* 81, 99-110.
- Meier A, Singh MK, Kästner A, Merten D, Büchel G, Kothe E (2017) Microbial communities in carbonate rocks-from soil via groundwater to rocks. *J Basic Microbiol* 57, 752-761.
- Merroun M, Nedelkova M, Rossberg A, Hennig C, Scheinost AC, Selenska-Pobell S (2006) Interaction mechanisms of uranium with bacterial strains isolated from extreme habitats. *Royal Soc Chem* 305, 47-49.
- Miltner A, Klindler R, Knicker H, Richnow H-H, Kästner M (2009) Fate of microbial biomass-derived amino acids in soil and their contribution to soil organic matter. *Org Geochem* 40, 978-985.
- Müller K (1994) Das Schaubergwerk Morassina im Schwefelloch bei Schmiedefeld. Gemeinde Schmiedefeld, Schmiedefeld.
- Müller K (2008) 325 Jahre Schwefel- und Vitriolhütte 15 Jahre Schaubergwerk, Morassina, Förderkreis Morassina, Schmiedefeld.
- Mumtaz S, Streten-Joyce C, Parry DL, McGuinness KA, Lu P, Gibb KS (2013) Fungi outcompete bacteria under increased uranium concentration in culture media. *J Environ Radioact* 120, 39-44.
- Nacoulma AP, Vandeputte OM, De Lorenzi M, El Jaziri M, Duez P (2013) Metabolomic-Based study of the leafy gall, the ecological niche of the phytopathogen *Rhodococcus fascians*, as a potential source of bioactive compounds. *Int J Mol Sci* 14, 12533-12549.
- Nagpal V, Srinivasan MC, Paknikar KM (2008) Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane (lindane) by a non-white rot fungus *Conidiobolus* 03-1-56 isolated from litter. *Indian J Microbiol* 48, 134-141.
- Oren A (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28, 56-63.
- Pacton M, Schmid T, Gorin G, Massault M, Stadler J (2011) Cretaceous black shale. A window into microbial life adaptation. *Terra Nova* 23, 362-368.
- Pal A, Ghosh S, Paul AK (2006) Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. *Biores Technol* 97, 1253-1258.
- Panak P, and Nitsche H (2001) Interaction of aerobic soil bacteria and plutonium (VI). *Radiochim Acta* 89: 499–504.
- Passauer U (1996) *Chrysosplenium alternifolium* L. in der Lurgrotte – erstmals eine Blütenpflanze in einer "Lampenflora". *Ann Naturhist Museum Wien* 98B, 51-56.
- Pereira VJ, Basílio MC, Fernandes D, Domingues M, Paiva JM, Benoliel MJ, Crespo MT, San Romão MV (2009) Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Water Res* 43, 3813-3819.
- Person M. & Garven G. (1992): Hydrologic Constraints on Petroleum Generation within Continental Rift Basins: Theory and Application to the Rhine Graben. *The Am. Ass. Petrol. Geol.* 76, 468-488.
- Phrommao E, Rodtong S, Yongsawatdigul J (2011) Identification of novel halotolerant bacillopeptidase F-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. *J Appl Microbiol* 110, 191-201.
- Puff P, Langbein R (2003) Buntsandstein. In: Seidel GH (Ed) *Geologie von Thüringen*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp. 326-341.
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49, 1-7.
- Reé C. & Emmermann K.-H. (1974): Sedimentäre Uranvorkommen in Rheinland-Pfalz. *Mainzer geowiss. Mitt.*, 3, 81-94.
- Ritzel S (2008) Natürliche Radionuklide in der Umwelt - Vorkommen, anthropogene Einflüsse und radiologische Relevanz in ausgewählten Bergbaugebieten Deutschlands. Dissertation, Universität Hannover.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Poll Res* 23, 3984-3999.
- Sakaguchi T, Nakajima A (1991) Accumulation of heavy metals such as uranium and thorium by microorganisms. In: Smith RW, Misra M (Eds) *Mineral bioprocessing*. The Minerals, Metals and Materials Society, pp.309-322.
- Sánchez-Castro I, Amador-García A, Moreno-Romero C, López-Fernández M, Phrommavanh V, Nos J, Descostes M, Merroun ML (2016) Screening of bacterial strains isolated from uranium mill tailings porewater for bioremediation purposes. *J Environ Radioact* 166, 130-141.
- Schäfer D (2015) Metagenomanalyse saurer Grundwässer und geogener Präzipitate des ehemaligen Alaunschieferbergwerkes Morassina. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160, 47-56.
- Seidel G (1995) *Geologie von Thüringen*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

- Senthilkumar M, Govindasamy V, Annapurna K (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr Microbiol* 55, 25-29.
- Sepecic K, Zalar P, Gunde-Cimerman N (2010) Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. *Marine Drugs* 9, 43-58.
- Shankar S, More SV, Laxman RS (2010) Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu Univ J Sci Eng Technol* 6, 60-69.
- Simonoff M, Sergeant C, Poulain S, Pravikoff MS (2007) Microorganisms and migration of radionuclides in environment. *Comptes Rendus Chimie* 10, 1092-1107.
- Sivaswamy V, Boyanov MI, Peyton BM, Viamajala S, Gerlach R, Apel WA, Sani RK, Dohnalkova A, Kemner KM, Borch T (2011) Multiple mechanisms of uranium immobilization by *Cellulomonas* sp. strain ES6. *Biotechnol Bioeng* 108, 264-276.
- Skowronek F, Fritsche JG, Aragon U, Rambow D (1999) Die Versenkung und Ausbreitung von Salzabwasser im Untergrund des Werra-Kaligebietes. *Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie, Wiesbaden*.
- Tewari N, Vasudevan P, Guha BK (2005) Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochem Eng J* 23, 185-192.
- Thieken A, Winkelmann G (1992) Rhizoferrin: A complexone type siderophore of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiol Lett* 94, 37-41.
- Thomas DJ, Boyd M, Crowell KM, Curtwright AE, Foll MN, Kuehl MM, McQueen VM, Middaugh CR, Moore VM, Moreno M, Morgan C, Powers M, Robinson G, Schram MD, Ward K, Ong HC (2011) A biological inventory of Meacham Cave (Independence County, Arkansas). *J Arkansas Acad Sci* 65, Article 18.
- Tiquia SM, Davis D, Hadrid H, Kasparian S, Imsail M, Sahly R, Singh J, Murray KS (2007) Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of Southeastern Michigan. *Environ Technol* 28, 297-307.
- Tsuruta T (2004) Cell-associated adsorption of thorium or uranium from aqueous system using various microorganisms. *Water Air Soil Poll* 159, 35-47.
- Tsuruta T (2007) Removal and recovery of uranium using microorganisms isolated from north american uranium deposits. *Am J Environ Sci* 3, 60-66.
- Ultee A, Souvatzi N, Maniadi K, König H (2004) Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J Appl Microbiol* 96, 560-568.
- Vázquez-Campos X, Kinsela AS, Collins RN, Neilan BA, Aoyagi N, Waite TD (2015) Uranium binding mechanisms of the acid-tolerant fungus *Coniochaeta fodinicola*. *Environ Sci Technol* 49, 8487-8496.
- Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 705-724.
- Vogel M, Günther A, Rossberg A, Li B, Bernhard G, Raff J (2010) Biosorption of U (VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Sci Total Environ* 409, 384-395.
- Volesky B, Holan ZR (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol Prog* 11, 235-250.
- Wengel M, Kothe E, Schmidt CM, Heide K, Gleixner G (2006) Degradation of organic matter from black shales and charcoal by the wood-rotting fungus *Schizophyllum commune* and release of DOC and heavy metals in the aqueous phase. *Sci Total Environ* 367, 383-393.
- Xia M, Liu Y, Taylor AA, Fu D, Khan AR, Terry N (2017) Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California. *Int Biodeter Biodegrad* 123, 70-77.
- Yan G, Viraraghavan T (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res* 37, 4486-4496.
- Zhang G, Li S, Xue Y, Mao L, Ma Y (2012) Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles* 16, 35-43.
- Zieve R, Ansell PJ, Young TWK, Peterson PJ (1985) Selenium volatilization by *Mortierella* species. *Transact Brit Mycol Soc* 84, 177-179.