

**G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH**

## **Bericht**

***Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur  
radiologischen Untersuchung und Bewertung  
bergbaulicher Altlasten – Mikrobiologisch indu-  
zierte Freisetzung von natürlichen Radionukliden  
aus Halden mit dem Sickerwasser***

**Auftraggeber:** Bundesamt für Strahlenschutz  
Willi-Brandt-Str. 5  
38226 Salzgitter

Halsbrücke, den 31.03.2008

Dr. Horst Richter  
Geschäftsführer

***Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten – Mikrobiologisch induzierte Freisetzung von natürlichen Radionukliden aus Halden mit dem Sickerwasser***

<b>Auftraggeber:</b>	Bundesamt für Strahlenschutz Willi-Brandt-Str. 5 38226 Salzgitter
<b>Projekt-Nr. G.E.O.S.:</b>	50070060
<b>Bearbeitungszeitraum:</b>	September 2007 – März 2008
<b>Bearbeiter:</b>	Dr. Pinka, Dr. Glombitza, Dr. Kahnt, Dr. Fischer, A. Patzig
<b>Seitenzahl Text:</b>	113
<b>Anlagen:</b>	4

Halsbrücke, den 31.03.2008

.....  
Dr. René Kahnt  
Geschäftsbereichsleiter  
Wasser-Energie-Biotechnologie

.....  
Dr. Jana Pinka  
Projektleiterin

Inhaltsverzeichnis

<b>Impressum</b> .....	<b>7</b>
<b>0 Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Veranlassung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Naturwissenschaftliche Grundlagen der Radionuklidfreisetzung/-fixierung</b> .....	<b>13</b>
2.1 Grundlagen.....	13
2.2 Eigenschaften und grundlegendes Verhalten der Radionuklide .....	16
2.3 Mögliche Prozesse zur Freisetzung und zum Transport.....	21
2.3.1 Einleitung .....	21
2.3.2 Saure Laugung / Mobilisierung .....	23
2.3.2.1 Direkte Oxidation und Freisetzung der gebildeten Radionuklide.....	23
2.3.2.2 Umwandlung der Sulfide in Sulfat.....	25
2.3.2.3 Indirekte Freisetzung durch Oxidation mit einem Oxidationsmittel.....	25
2.3.2.4 Indirekte Freisetzung durch Komplexbildung .....	26
2.3.2.5 Andere säurebildende Prozesse zur Mobilisierung .....	27
2.3.2.6 Reduzierende Prozesse unter sauren Bedingungen.....	29
2.3.3 Freisetzung bei neutralen und alkalischen pH-Werten.....	29
2.3.3.1 Desorptionsprozesse.....	29
2.3.3.2 Reduzierende Bedingungen - Sulfatreduktion (Freisetzung von Ra).....	30
2.3.3.3 Reduzierende Bedingungen und Uran.....	30
2.3.3.4 Methylierung / Dimethylierung, Bildung metallorganischer Verbindungen.....	31
2.3.3.5 Komplexbildung.....	31
2.4 In Bergbauhalden nachgewiesene Prozesse .....	33
2.4.1 Vorkommende Mikroorganismen.....	33
2.4.2 Saure Laugung.....	34
2.4.3 Alkalische Laugung .....	35
2.4.4 Reduzierende Prozesse / Gasbildung .....	35
2.4.5 Komplexbildende Prozesse .....	35
<b>3 Laborverfahren zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität sowie zur Charakterisierung von mikrobiologischen Populationen</b> .....	<b>35</b>
3.1 Mikrobielle Aktivität.....	36
3.1.1 Bodenatmung.....	36
3.1.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten (Dehydrogenase-Aktivität, Hydrolyse von Fluoreszeindiacetat).....	38
3.1.3 Mikrokalorimetrie .....	39
3.1.4 Isotopenfraktionierung (C13/12, S34/32, Fe56/54) .....	41

3.1.5	Radiotracer.....	42
3.2	<i>Mikrobielle Quantifizierung</i> .....	42
3.2.1	Anreicherung.....	42
3.2.2	Mikroskopie.....	44
3.2.3	Biomasse - Chloroform-Fumigation-Extraktion- Methode (CFE).....	45
3.2.4	DNA basierte Methoden.....	45
3.2.5	RNA basierte Methoden.....	46
3.3	<i>Mikrobielle Diversität</i> .....	47
3.3.1	PLFA-Profile.....	47
3.3.2	Anreicherung.....	47
3.3.3	Immunologische Testsysteme.....	48
3.3.4	DNA basierte Methoden.....	48
3.3.5	RNA basierte Methoden.....	48
3.4	<i>Zusammenfassung</i> .....	48
<b>4</b>	<b>Untersuchungen an ausgewählten Haldenmaterialien</b> .....	<b>49</b>
4.1	<i>Beschreibung Standort A</i> .....	50
4.2	<i>Beschreibung Standort B</i> .....	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse der mikrobiologischen Laborverfahren</b> .....	<b>55</b>
5.1	<i>Probenvorbereitung</i> .....	55
5.2	<i>Versuchsmethoden und –durchführung, Versuchsergebnisse</i> .....	56
5.2.1	Ermittlung der Wasserhaltekapazität nach DIN ISO 11274.....	58
5.2.2	Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Bodenatmung (DIN ISO 16072).....	59
5.2.3	Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Enzymaktivität nach [LUBW 1991].....	62
5.2.4	Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Mikrokalorimetrie nach [SCHI 1995, WEN 1994].....	64
5.3	<i>Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen</i> .....	71
5.3.1	Material A.....	71
5.3.2	Material B.....	73
5.4	<i>Schlussfolgerungen aus den durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen</i> .....	73
5.4.1	Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährmedien.....	75
<b>6</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die Ableitung von Handlungsempfehlungen</b> .....	<b>79</b>
6.1	<i>Schwerpunkt 1: Entwicklung von Screeningmethoden</i> .....	80

6.2	<i>Schwerpunkt 2: Entwicklung von Methoden für Spezialuntersuchungen</i>	81
<b>7</b>	<b>Methodische Grundlagen zur Durchführung der Spezialuntersuchungen</b>	<b>82</b>
7.1	<i>Rahmenbedingungen</i>	82
7.2	<i>Beschreibung des untersuchten Materials</i>	83
7.3	<i>Auswahl der Schadstoffe</i>	84
7.4	<i>Auswahl der Mikroorganismen</i>	85
7.5	<i>Versuchsdurchführung</i>	85
7.6	<i>Theoretische Grundlagen Modellierung mikrobiologischer Stoffumsätze</i>	87
7.6.1	<i>Klassifizierung der Ansätze</i>	87
7.6.1.1	<i>Empirische Ansätze</i>	87
7.6.1.2	<i>Modellansätze ohne Wachstum</i>	88
7.6.1.3	<i>Ansätze mit Wachstum</i>	90
7.7	<i>Grundlagen für die Parameterbestimmung</i>	93
7.8	<i>Beschreibung des Modells</i>	94
7.9	<i>Vereinfachung des Modellansatzes für den Quellterm</i>	95
<b>8</b>	<b>Überarbeitung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>103</b>
9.1	<i>Verwendete Quellen</i>	103
9.2	<i>Weiterführende Literatur</i>	109
<b>10</b>	<b>Glossar</b>	<b>111</b>

Anlagenverzeichnis

Anlage 1	Zusammensetzung der Nährmedien
Anlage 2	Charakterisierung der Haldensickerwässer am Standort A
Anlage 3	Charakterisierung der Haldensickerwässer am Standort B
Anlage 4	Beispielhafte Darstellung der Spezialuntersuchungen

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenstellung von Elektronen liefernden (Donatoren) und von Elektronen aufnehmenden (Akzeptoren) Spezies für mikrobielle Laugungsprozesse .....	23
Tabelle 2:	Mikroorganismen in Uranhalden nach [Selenska-Pobell2002] .....	34
Tabelle 3:	Laborative Möglichkeiten zur Beschreibung mikrobieller Prozesse .....	36
Tabelle 4:	Vergleich von Ergebnissen der durchgeführten Screeninguntersuchungen und Darstellung der Relation der Ergebnisse zur unbehandelten Probe für das Material A (Ergebnisse aus 2 Messungen).....	72
Tabelle 5:	Vergleich von Ergebnissen der durchgeführten Screeninguntersuchungen und Darstellung der Relation der Ergebnisse zur unbehandelten Probe für das Material B (Ergebnisse aus maximal 2 Messungen).....	73
Tabelle 6:	Ergebnisse der Versuche mit Screening-Medien .....	76
Tabelle 7:	Ergebnisse der Versuche mit Spezial-Medien.....	77

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Uran-Radium-Zerfallsreihe (Quelle: www.periodensystem.net).....	14
Abbildung 2:	Uran-Actinium-Zerfallsreihe (Quelle: www.periodensystem.net) .....	15
Abbildung 3:	Thorium-Zerfallsreihe (Quelle: www.periodensystem.net).....	15
Abbildung 4:	Eh-pH-Diagramm für Ra – O – H – C – S [BROO 1988].....	19
Abbildung 5:	Eh-pH-Diagramm für Fe – S – U - O- H (Little 1997) .....	25
Abbildung 6:	Umwandlung des U <sup>6+</sup> -Zitratkomplexes in den U <sup>4+</sup> -Zitratkomplex.....	29
Abbildung 7:	Eh-pH-Diagramm für wasserlösliche Uranspezies .....	31
Abbildung 8:	Anaerobox zur Durchführung von Versuchen unter Sauerstoffausschluss.....	37
Abbildung 9:	Dokumentation von Prozessen durch Überwachung der Gasmenge (Foto: Katalog VWR International GmbH) .....	38
Abbildung 10:	Enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Fluoreszeinderivaten (nicht fluoreszierend) zu Fluoreszein (fluoreszierend) .....	39
Abbildung 11:	Beispiel für Anreicherungskulturen auf plattiertem Medium.....	44
Abbildung 12:	DNA – basierte Methoden (PCR-Technik) .....	46
Abbildung 13:	Haldenmaterial von Standort A .....	55
Abbildung 14:	Haldenmaterial von Standort B .....	56
Abbildung 15:	Ergebnisse von Messungen im OxiTop-Messsystem unter aeroben Bedingungen für das Haldenmaterial des Standortes A.....	60
Abbildung 16:	Ergebnisse von Messungen im OxiTop-Messsystem unter anaeroben Bedingungen für das Haldenmaterial des Standortes B.....	62
Abbildung 17:	Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen für das Haldenmaterial des Standortes A.....	63

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

Abbildung 18: Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen für das Haldenmaterial des Standortes B.....	64
Abbildung 19: Schnittdarstellung TAM (Quelle Thermometric) .....	65
Abbildung 20: Messprinzip mit Zwillingsanordnung im TAM (Quelle Thermometric.....	65
Abbildung 21: Edelstahlampulle und schematische Darstellung der Anordnung der Ampullen in der Kalorimereinheit .....	66
Abbildung 22: Ergebnisse kalorimetrischer Messungen für das Haldenmaterial des Standortes A.....	67
Abbildung 23: Thermische Leistung zu definierten Zeiten, Haldenmaterial des Standortes A* .....	68
Abbildung 24: Ergebnisse kalorimetrischer Messungen für das Haldenmaterial des Standortes B.....	69
Abbildung 25: Vergleich von kalorimetrischen Messungen der Haldenmaterialien Standorte A und B .....	70
Abbildung 26: Eisen- und Schwefelzyklus .....	78
Abbildung 27: Ergebnisse der Anreicherung von Mikroorganismen auf Spezialmedien.....	79
Abbildung 28: Schematischer Aufbau der 5 kg – Kolonnen .....	86
Abbildung 29: Kolonnen mit einem Fassungsvermögen von ca. 100 kg .....	86
Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Stoffabbaurate nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit beispielhaften Parametern.....	89
Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf des Stoffgehaltes nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit beispielhaften Parametern .....	89
Abbildung 32: Phasen in der Populationsentwicklung von Mikroorganismen.....	91
Abbildung 33: Beispielhafte Darstellung der Implementierung der Monod Kinetik in GOLDSIM (Bildschirmfoto) .....	94
Abbildung 34: Einbindung der Orientierungsuntersuchung in die Gesamtmethodik zur Charakterisierung der radiologischen Relevanz des gesamten Grundwasserpfades von Halden [GRS 2003] .....	97
Abbildung 35: Schema zur Methodik der Orientierungsuntersuchung zum Sickerwasserpfad .....	98
Abbildung 36: Übersicht über geochemische Milieus, unter denen mikrobielle Freisetzungs- und Fixierungsprozesse ablaufen können .....	100
Abbildung 37: Schema zur Methodik der Hauptuntersuchung zum Sickerwasserpfad.....	101
Abbildung 38: Gesamtmethodik zur Ermittlung der Relevanz von mikrobiologischen Prozessen auf die Freisetzung von Radionukliden aus Haldenmaterial .....	102

## Impressum

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des Auftraggebers (Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) übereinstimmen.

## 0 Zusammenfassung

Im „Leitfaden zur radiologische Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus“ wurde bisher eine mikrobiell induzierte Freisetzung nicht berücksichtigt. Mit dem BMU-Bericht „Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten und Erweiterung des Anwendungsgebietes“ aus der Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz wurde aufgezeigt, dass für die im Leitfaden geschilderten Fälle Sickerwasser-pH > 6 + Boden-pH > 6 + Verhältnis Karbonat-Pufferkapazität / Säurebildungspotential  $\geq 3$  (Fall 1) bzw. Sickerwasser-pH < 4,5 + Boden-pH < 4,5 + Verhältnis Karbonat-Pufferkapazität / Säurebildungspotential  $\ll 3$  (Fall 2) durch mikrobiell induzierte Prozesse es zu einer erhöhten Radionuklidfreisetzung kommen kann. Somit ist die im Leitfaden für diese beiden Spezialfälle getroffen Aussage, dass eine Beurteilung des Freisetzungsverhaltens ohne aufwändige Folgeuntersuchungen erfolgen kann, gegebenenfalls hinfällig.

Im vorliegenden Bericht wird zunächst der Kenntnisstand zu mikrobiellen Prozessen bei der Freisetzung / Fixierung von Radionukliden zusammengestellt. Anschließend werden mikrobiologische Laborverfahren geprüft, ob diese geeignet sind, die mikrobielle Aktivität in Haldenmaterialien abzuschätzen. Aus diesen Ergebnissen werden Handlungsempfehlungen zu freisetzungsrelevanten mikrobiologischen Prozessen abgeleitet, wobei das Freisetzungsverhalten von Radionukliden über eine Integration von mikrobiellen Prozessen in Rechencodes prognostiziert werden soll.

Eine Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war, bestehende mikrobiologische Methoden hinsichtlich ihrer Eignung zur Abschätzung mikrobiologischer Aktivitäten in Haldenmaterialien zu bewerten. Hierfür wurden vergleichende Versuche mit den Methoden Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokolorimetrie durchgeführt. Folgende vergleichende Versuchsvarianten wurden unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen durchgeführt:

1. Unbehandeltes Haldenmaterial
2. Vergiftetes Haldenmaterial (0,3 g/L Natriumazid)
3. Haldenmaterial mit Zugabe von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Sauerstoffregime

4. Haldenmaterial mit Zugabe von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Sauerstoffregime und weiteren Energiequellen
5. Haldenmaterial mit Zugabe einer weiteren Energiequelle.

Für die Experimente wurden zwei radioaktive Haldenmaterialien zu Testzwecken ausgewählt, wobei das Material von Standort B den Fall 1 des Leitfadenelementes: Sickerwasser-pH > 6 + Boden-pH > 6 + Karbonat-Pufferkapazität > 3x Säurebildungspotential und das Material von Standort A den Fall 2: Sickerwasser-pH < 4,5 + Boden-pH < 4,5 + Karbonat-Pufferkapazität < Säurebildungspotential repräsentieren.

In den Versuchen mit dem Haldenmaterial des Standortes A konnte mit allen genannten Methoden sowohl durch die Zugabe von Mikroorganismen als auch durch die Zugabe einer Energiequelle die mikrobielle Aktivität der im unbehandelten Haldensubstrat befindlichen Populationen nachgewiesen und erfasst werden.

In den Versuchen mit dem Haldenmaterial des Standortes B erbrachten lediglich die Bodenatmung sowie die enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Fluoreszeinderivaten hinsichtlich des Nachweises mikrobieller Aktivität Ergebnisse, die Aussagen über die mikrobiellen Prozesse ermöglichten. Aufgrund fehlender thermischer Leistung im Versuchszeitraum von 24 Stunden wurden mittels Mikrokolorimetrie keine verwertbaren Ergebnisse erlangt.

Für die Methode der Bodenatmung können Versuchsaapparaturen verwendet werden, die in den meisten chemischen Dienstleistungslaboratorien zu Bestimmung des BSB<sub>5</sub> eingesetzt werden. Die Methode erfordert geringen Vorbereitungsaufwand. Ergebnisse können aber erst nach ca. 1 Woche Versuchszeit erlangt werden. Die Versuchsauswertung ist unkompliziert.

Von den getesteten Methoden zum Nachweis mikrobieller Aktivität ist die Ermittlung der Enzymaktivität von Bodenproben operativ am einfachsten durchzuführen. Sie erfordert eine geringe Versuchsvorbereitung und kann in jedem Dienstleistungslabor ausgeführt werden. Nach Aufnahme einer Kalibrierkurve am Photometer können die Ergebnisse unmittelbar abgelesen werden.

Mit der Methode der Mikrokolorimetrie können nach kurzer Probenvorbereitung bei geringer Substanzmenge rasch Hinweise auf chemische Prozesse mit kleinen Wärmeänderungen, die mikrobiologisch determiniert sind, erlangt werden. Langsam ablaufende Prozesse mit geringen thermischen Leistungen konnten in der gewählten Versuchsdauer von 24 Stunden

nicht abgebildet werden (Sulfatreduktion). Die verwendete Messapparatur gehört nicht zur Routineausstattung von chemischen bzw. mikrobiologischen Laboratorien und hat einen erhöhten Anschaffungspreis.

Neben der Durchführung von Methoden, die die mikrobielle Aktivität belegen sollen, erfolgte zudem eine Beschreibung der in den Haldenmaterialien befindlichen Populationen durch Anreicherung auf Nährmedien. Hierzu wurden Screening-Medien für alkalische und saure pH-Bedingungen, die im Sickerwasser der Haldenmaterialien vorherrschen, erprobt. Die Ergebnisse der Anreicherungsversuche zeigen, dass im Haldenmaterial des Standortes B Mikroorganismen aktiv sind, die auch in neutralen / alkalischen Screening-Nährmedien angereichert werden können. Umgekehrt sind im sauren Overlay solid Medium zahlreiche acidophile Mikroorganismen im Haldenmaterial A nachzuweisen.

Die Anreicherungen in Spezialnährkulturen unterstreichen die Dominanz bestimmter Arten unter den gegebenen pH-Bedingungen. Beispielhaft sind zu nennen: schwefel- und eisenoxidierende Mikroorganismen im sauren pH-Bereich und schwefeloxidierende, nitratreduzierende Mikroorganismen im alkalischen Bereich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit den erprobten Methoden die aktuelle mikrobielle Aktivität als Summenparameter ermittelt werden und in die durchzuführenden Orientierungsuntersuchungen im „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten“ integriert werden können. Eine detaillierte Bestimmung der Mikroorganismen, die im Haldenmaterial aktiv sind und somit eine Radionuklidfreisetzung induzieren können, ist über deren Anreicherung in speziellen Kultivierungsmedien möglich.

Im Rahmen von Spezialuntersuchungen werden die notwendigen Parameter für eine Freisetzungsprognose bestimmt. Neben physikalischen und chemischen Parametern müssen anhand von Säulen- und Schüttelversuchen die Populationsparameter der für die Freisetzung relevanten Mikroorganismen bestimmt werden. Dies wird durch eine Nachrechnung der genannten Versuche mit einem Simulationsprogramm realisiert, wobei die Dynamik der für die Freisetzung dominanten Mikroorganismen beschrieben wird. Die Freisetzungsprognose erfolgt analog zur Nachrechnung der Laborversuche unter Berücksichtigung der entsprechenden Haldenparameter.

Grundsätzlich können solche Simulationsprogramme für die Nachrechnung und die Freisetzungsprognose eingesetzt werden, die eine Abbildung der physikalischen und mikrobiologi-

schen Prozesse erlauben, welche in den Suspensionslaugungsversuchen, in den Perkolationsversuchen und auch im realen System zu erwarten sind. Dies ist z. B. beim Programm GOLDSIM möglich, bei dem der Freisetzungsmechanismus, d.h. die mathematischen Gleichungen, vom Nutzer vorgegeben werden können. Für vereinfachte Betrachtungen ist bspw. auch eine Implementierung der notwendigen Gleichungen in MS-EXCEL möglich.

Die in diesem Projekt entwickelte Anlage Mikrobiologie als Ergänzung des bestehenden Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten, Leitfadenelement Grundwasser wurde den Autoren des bisherigen Leitfadenelementes Grundwasser (Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit (GRS) GmbH) zur Kenntnis und Beurteilung übersandt. In einer Stellungnahme seitens der GRS wird die Feststellung getroffen, dass die Erweiterung des Leitfadenelementes um die Einbeziehung mikrobieller Prozesse eine konsistente und kompatible Bereicherung darstellt. Die empfohlenen Hinweise und Ergänzungen wurden bei der Ausarbeitung der Anlage Mikrobiologie berücksichtigt.

Weiterführende Arbeiten sollten zur Ermittlung der Höhe des veränderten Radionuklidaustrages in Abhängigkeit von der mikrobiellen Aktivität durchgeführt werden und Gegenstand eines weiterführenden Forschungsvorhabens sein. Die im Untersuchungsbericht dargestellte Vorgehensweise zur Prognose von mikrobiell beeinflussten Radionuklidausträgen wurde bisher nicht an einem Modellstandort demonstriert. Das in der Anlage 4 beschriebene Beispiel bezieht sich auf mikrobielle induzierte Stoffausträge von konventionellen Schadstoffen. Daher sollte eine Übertragung der vorgeschlagenen Vorgehensweise Gegenstand eines neuen Forschungsvorhabens werden, um auch die in der Anlage Mikrobiologie getroffenen Aussagen zu verifizieren.

## 1 Veranlassung und Aufgabenstellung

Um Entscheidungen über die Sanierung von Halden und Absetzanlagen des Alt- und Uranerzbergbaus auf der Grundlage einheitlicher, wissenschaftlich begründeter und zugleich ökonomisch vertretbarer Methoden zu treffen, hat das Bundesamt für Strahlenschutz den „Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten“ entwickelt. Im Forschungsvorhaben „Mikrobiologie in Halden und Absetzanlagen“ [BMU 2005] wurde aufgezeigt, dass mikrobiell induzierte Stoffumsätze einen wesentlichen Beitrag zur Radionuklidfreisetzung über den Wasserpfad leisten können und bei einer Sanierungsentscheidung zu berücksichtigen sind. Im Anschluss an das genannte Forschungsvorhaben fand am BfS ein Expertengespräch zur „Mikrobiologie in Halden und Absetzanlagen“ statt, bei dem folgende gemeinsame Positionen erarbeitet wurden:

- I. In allen Halden und Absetzanlagen des Alt- und Uranbergbaus sind Mikroorganismen aktiv, die die Freisetzung von Schwermetallen/Radionukliden kontrollieren, indem sie Redoxreaktionen steuern, die Schwermetalle/Radionuklide mobilisieren oder fixieren und/oder Schwermetalle/Radionuklide in ihrer Biomasse akkumulieren. Insofern bildet eine vornehmlich geochemisch geprägte Betrachtungsweise die in der Natur ablaufenden Prozesse unzureichend ab.
- II. Mikrobielle Populationen sind in Abhängigkeit vom Nährstoff- und Energieangebot und damit immer standortspezifisch ausgeprägt. Es existieren bewährte Methoden zur effektiven Erfassung der jeweils freisetzungrelevanten Informationen.
- III. Es gibt eine Reihe von Rechencodes, von denen einige über die Option zur Transportsimulation verfügen (gekoppelte Modelle). Für die mathematische Erfassung der mikrobiellen Prozesse werden speziell abzuleitende Quell- und Senkenglieder in diese Rechencodes implementiert. Diese Vorgehensweise ist bereits heute in der Praxis üblich.
- IV. Einige mikrobiologische, aber auch geochemische Phänomene und Transportprozesse, die für die Freisetzung von Schwermetallen/Radionukliden relevant sind, sind heute zwar bekannt, für die Einbeziehung in Freisetzungsprognosen aber nicht ausreichend gut untersucht (z. B. Grenzflächenchemie, Transportphänomene wie Biofilm und Kolloide).
- V. Die Berücksichtigung der Mikrobiologie und die Durchführung einer biogeochemischen Modellierung erhöht die Sicherheit der Freisetzungsprognose und stellt die Dosisermittlung als eine Grundlage für die Sanierungsentscheidung auf eine zuverlässigere Basis.

Im Nachgang zu dieser Fachdiskussion wurde durch das Bundesamt für Strahlenschutz das Forschungsvorhaben FKZ S01020703: "Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Mikrobiologisch indu-

zierte Freisetzung von natürlichen Radionukliden aus Halden mit dem Sickerwasser" ausgeschrieben. Das BfS hat hierfür die G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH am 13.08.2007 beauftragt. Dabei wurden folgende Teilaufgaben festgelegt:

1. Erarbeitung einer in sich geschlossene Darstellung der naturwissenschaftlichen Grundlagen
2. Entwicklung von Handlungsempfehlungen zur Untersuchung, Modellierung und Bewertung freisetzungsrelevanter Prozesse
3. Entwurf zur Erweiterung des Leitfadenelementes Grundwasserpfad um die Belange der Mikrobiologie
4. Abstimmung des Entwurfes zum Leitfadenelement mit den Autoren des bisherigen Leitfadenelementes Grundwasser (Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit) sowie Beratungsleistungen

Den Ausgangspunkt für sämtliche Betrachtungen bildet der „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten, Leitfadenelement Grundwasser bei Halden des Alt- und Uranbergbaus“. Dieser Leitfaden beinhaltet eine einfach handhabbare, pragmatische Vorschrift zur Vorgehensweise bei der Bewertung bergbaulicher Altlasten. Das Grundprinzip besteht in einer schrittweisen Vertiefung der Betrachtung und der Prüfung, inwiefern jeweils detailliertere Untersuchungen notwendig sind. Die vorliegende Studie soll den vorhandenen Leitfaden hinsichtlich der Wirkung mikrobiologisch induzierter Freisetzungsprozesse ergänzen, weil diese bisher nicht ausreichend betrachtet wurden und teilweise zu einem abweichenden Systemverhalten führen können.

Der grundsätzliche Ansatz besteht darin, den „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten“ an den Stellen zu ergänzen, an denen es unter Einbeziehung mikrobiologisch induzierter Freisetzungsprozesse zu einem abweichenden Systemverhalten gegenüber einer rein geochemischen Betrachtungsweise kommen kann. Im Leitfadenelement selbst wird dabei auf solche Situationen hingewiesen und welche Konsequenzen sich hinsichtlich der Untersuchung und der Prognose ergeben. Gegebenenfalls notwendige Spezialuntersuchungen werden dann in der Anlage Mikrobiologie zum Leitfadenelement dargestellt.

Unabhängig vom jeweiligen mikrobiologischen Prozess kann die Vorgehensweise dabei in folgende Schritte unterteilt werden:

1. Prüfung der Voraussetzungen zur Mitwirkung mikrobiologischer Prozesse bei der Freisetzung von Radionukliden anhand vorliegender Informationen zu den Milieubedingungen sowie zum Inventar an Mikroorganismen und Radionukliden – Relevanzverdachts-

prüfung. Fehlen geeignete Wachstumsbedingungen, können weitere mikrobiologische Untersuchungen entfallen.

2. Durchführung einfacher experimenteller Untersuchungen zur Bestätigung oder Zurückweisung des Relevanzverdachts.
3. Ist im Ergebnis dieser Untersuchungen die Relevanz nachgewiesen, so wird die Durchführung von Spezialuntersuchungen zur Quantifizierung der mikrobiologischen Prozesse notwendig.
4. Parameterbestimmung zur Quelltermbeschreibung auf der Grundlage der Spezialuntersuchungen .
5. Prognose von Freisetzung und Transport innerhalb der Quelle.

Aus diesen Arbeitsschritten folgt unmittelbar, dass eine quantitative Beschreibung mikrobiologischer Prozesse in der Regel stets die Durchführung von Spezialuntersuchungen und deren Auswertung voraussetzt.

Der vorliegende Bericht umfasst den fachlichen Kenntnisstand und die Handlungsempfehlungen für:

- mikrobielle Prozesse bei der Freisetzung / Fixierung von Radionukliden
- laborative Möglichkeiten zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität in Haldenmaterialien
- Darstellung von mikrobiellen Prozessen in Rechencodes

sowie Ergebnisse aus durchgeführten Versuchen zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivitäten an ausgewählten Haldenmaterialien zusammen.

Alle im Forschungsvorhaben erlangten Erkenntnisse sind in die Überarbeitung des Leitfadens eingegangen und werden als separates Dokument dem Auftraggeber übergeben.

## **2 Naturwissenschaftliche Grundlagen der Radionuklidfreisetzung/-fixierung**

### **2.1 Grundlagen**

Uranminerale sind die bedeutendsten Quellen bergbaulich bedingter Strahlenemission. Die häufigsten Uranisotope U-238 und U-235 sind langfristig nicht stabil (Uran-Radium-Zerfallsreihe - Abbildung 1, Uran-Actinium-Zerfallsreihe - Abbildung 2). Uran tritt, wegen der vergleichbaren Ionenradien, oft in diadochem Ersatz für verschiedene Elemente, z. B. Zirkonium, Thorium, Cerium, Yttrium, Calcium in Mineralien auf. Von diesen Elementen ist vor allem Thorium mit seinem Isotop Th-232 von Bedeutung, weil es ebenfalls nicht stabil ist

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

(Thorium-232-Zerfallsreihe - Abbildung 3). Das Verhältnis des Thoriumgehaltes zum Urangehalt beträgt z. B. in magmatischen Gesteinen im Mittel 3-4.

Die oben genannten Zerfallsreihen werden durch die in alphabetischer Reihe aufgelisteten Elemente: Actinium, Astat, Bismut, Blei, Francium, Polonium, Protactinium, Radium, Radon, Thallium, Thorium, Uran gebildet.

Ausgehend von deren relevanten Halbwertszeiten wurden diejenigen mit einer großen Halbwertszeit ausgewählt, da eine längere Stabilität als Voraussetzung für eine mikrobiologische Konzentrationsveränderung während des Langzeitverhaltens angenommen wurde. Des Weiteren wurde Radon in der Betrachtung ausgeschlossen, da dessen Transport über Sickerwasser vernachlässigbar ist (Edelgas). Diese ausgewählten Elemente sind: Actinium, Bismut, Blei, Radium, Polonium, Protactinium, Thorium, Uran.

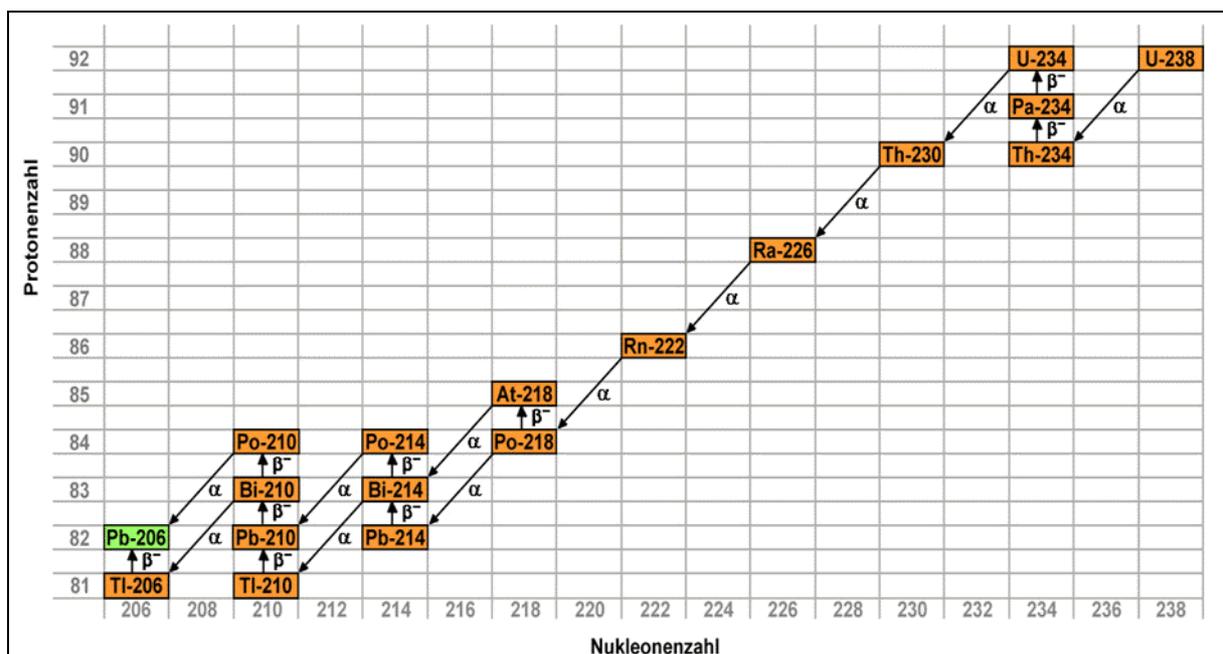


Abbildung 1: Uran-Radium-Zerfallsreihe (Quelle: [www.periodensystem.net](http://www.periodensystem.net))

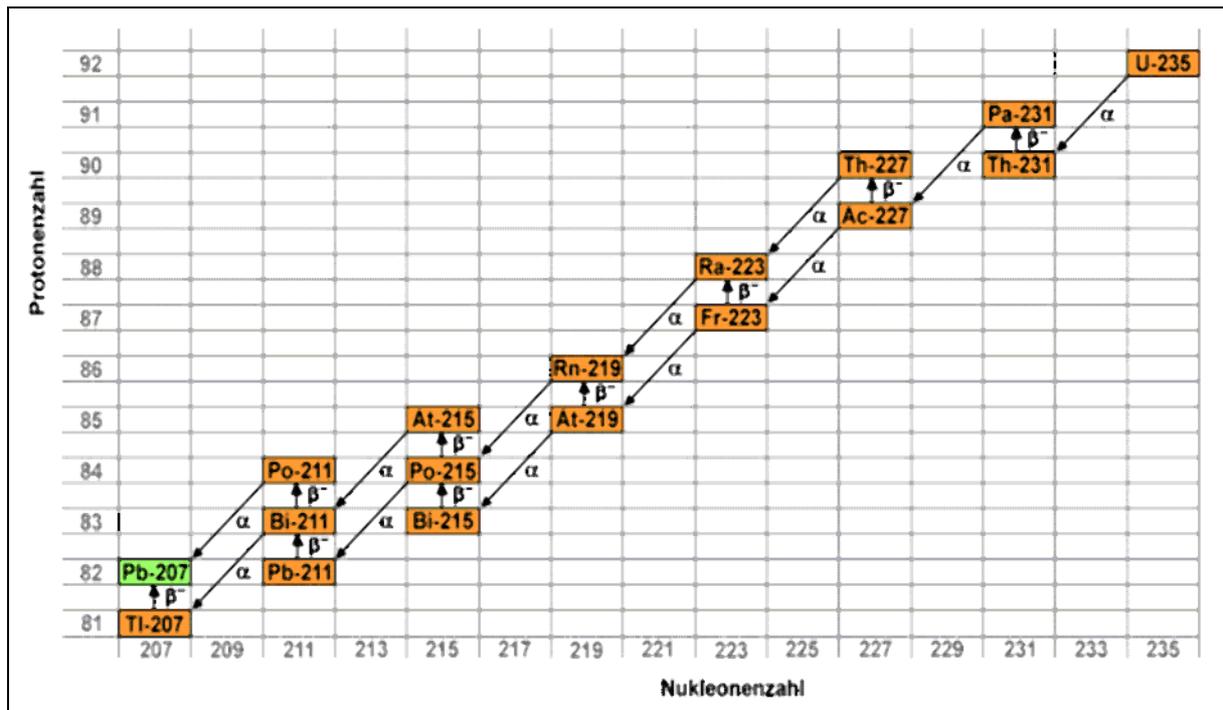


Abbildung 2: Uran-Actinium-Zerfallsreihe (Quelle: [www.periodensystem.net](http://www.periodensystem.net))

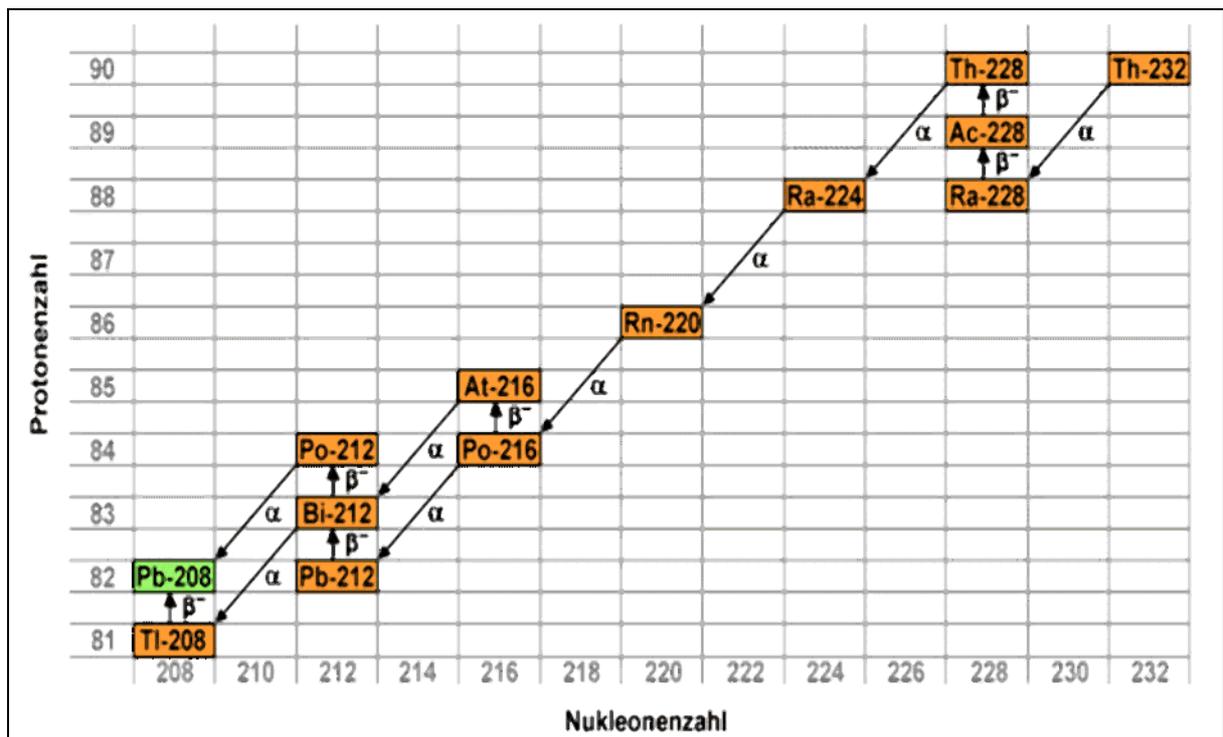


Abbildung 3: Thorium-Zerfallsreihe (Quelle: [www.periodensystem.net](http://www.periodensystem.net))

## **2.2 Eigenschaften und grundlegendes Verhalten der Radionuklide**

Aus den chemischen Eigenschaften der Radionuklide sollen Hinweise über die Existenz wasserlöslicher Verbindungen und aus den Löslichkeiten sich ergebende Konzentrationen sowie mögliche zu erwartende Zustände abgeleitet werden. Die in diesem Kapitel aufgeführten physiko-chemischen Daten sind

- H. U. Vogel, Chemikerkalender, Springer-Verlag Berlin Göttingen Heidelberg 1956
- Dans Lax Tabellenbuch für Chemiker und Physiker, Springer-Verlag 1957
- A.F. Hollemann E. Wiberg Lehrbuch der anorganischen Chemie Walter De Gruyter & Co Berlin 1960
- D'Ans/Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964
- Anorganikum Lehr- und Praktikumsbuch der anorganischen Chemie Autorenkollektiv VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1973
- Internet - Wikipedia, D. G. Brookins Eh-pH Diagrams for Geochemistry Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1988 ISBN 3 - 540 - 18485 - 6

entnommen.

### Actinium, Protactinium

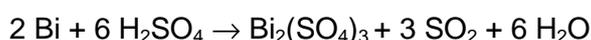
Zur Gruppe der Actinoide gehören neben Actinium / Protactinium die für diesen Bericht relevanten Elemente Thorium, Protactinium und Uran. Actinium / Protactinium ähneln in ihren Eigenschaften den Alkalimetallen. An der Luft überziehen sie sich rasch mit einer Oxidschicht, die in feuchter Luft zum Hydroxid weiterreagiert. Mit Wasser und/oder Säuren reagieren sie heftig unter Wasserstoffbildung. Alle bekannten Verbindungen sind dreiwertig.

### Bismut

Bismut ist vorwiegend dreiwertig, aber auch ein-, und fünfwertige Verbindungen sind bekannt. Bismut (V) – ist ein starkes Oxidationsmittel.

Bismut(III)-Salze sind in starken Säuren bei niedrigen pH-Werten stabil und lassen sich aus Säuren und Bismutoxid herstellen. Bei neutralem pH-Wert zersetzen sie sich im Wasser und hydrolysieren zu basischen Salzen.

- $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  zersetzt sich mit Wasser zu  $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$
- Vorkommen, Existenz als Oxid ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , Bismut / Bismutocker), Sulfid ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ , Bismutglanz, Bismutin), Selenid, gediegen
- Wichtige Reaktionen:





- Halogenide sind bekannt,
  - -trifluorid, -pentafluorid, -fluoroxid
  - Monochlorid, -trichlorid, -chloroxid
  - Monobromide, -tribromide, -bromoxide
  - Monoiodide, -triiodide, -iodoxid
  - $\text{BiCl}_3$  zerfällt im Wasser zu Bismutchloroxid
- Stabilitäten: unter sauren oxidierenden Bedingungen existiert  $\text{Bi}_6\text{O}_6^{6+}$  in einem pH-Bereich von 1 - 6 und Eh-Bereich von 0 bis + 1,2 V. Im neutralen alkalischen Gebiet liegt unter oxidierenden Bedingungen  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  vor. Unter reduzierenden Bedingungen existiert im alkalischen  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  ebenso wie unter schwach oxidierenden und sauren Bedingungen (Eh - 0,3 bis +0,4 V und im pH-Bereich 0 – 10).

### Blei

Gelöstes Blei existiert in der zweiwertigen und vierwertigen Form. Blei(II)-Sulfat existiert unter oxidierenden Bedingungen bis zum pH-Wert von ca. 6, danach existiert bis zu einem pH-Wert von 12 das Blei(II)-Karbonat. Blei(II)-Sulfid ist über den ganzen pH-Bereich vorwiegend unter reduzierenden Bedingungen stabil. Die Löslichkeiten wichtiger Bleiverbindungen sind:

- $\text{PbCO}_3$ :  $0,15 \cdot 10^{-3}$  g/100 g Wasser – 20°C
- $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ : 52,2 g /100 g Wasser – 20°C
- $\text{PbSO}_4$ :  $4,21 \cdot 10^{-3}$  g/100 g Wasser, – 20°C
- $\text{Pb}(\text{SO}_4)_2$ : praktisch unlöslich
- $\text{PbS}$ :  $1,3 - 8,6 \cdot 10^{-5}$  g/100 g Wasser – 20°C

Besonders gut löslich ist das Blei(II)- Nitrat. Aber auch das Sulfat und das Karbonat besitzen noch eine bemerkbare, wenn auch geringe Löslichkeit.

Bekannt sind auch bleiorganische Verbindungen, wie zum Beispiel  $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ . Diese zeigen ein lipophiles Verhalten, die Löslichkeit in Wasser ist vernachlässigbar.

### Radium

Radium spielt bei den Betrachtungen von Mobilität und zu erwartender Aktivität eine besondere Rolle, weil bereits sehr geringe Konzentrationen zu hohen Aktivitäten führen. Deshalb sollen hier Betrachtungen über die Löslichkeiten von Radiumverbindungen und die Wechselwirkungen mit mikrobiellen Systemen angestellt werden.

- Radium gehört zu den Erdalkalimetallen und kommt als Ion im zweiwertigen positiven Zustand vor.
- Schwerlösliche Salze bzw. Salze mit einer geringen Löslichkeit sind  $\text{RaSO}_4$ ,  $\text{RaCO}_3$  und  $\text{RaCrO}_4$ . Dabei variieren die Angaben über die Löslichkeit von  $\text{RaSO}_4$  in einem Bereich von  $0,21 \cdot 10^{-3} \text{ g/100 ml}$  bei  $20^\circ\text{C}$  und  $20 \mu\text{g/L}$  ebenfalls bei  $20^\circ\text{C}$ .

Die Halogenide (Fluorid) sind nur mäßig löslich, Nitrate und Acetate sind dagegen leicht löslich.

Wenn Ra gebunden wird, dann stehen deshalb in der Regel bevorzugt die Anionen  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  für eine Bindung als  $\text{RaSO}_4$  und  $\text{RaCO}_3$  in Analogie zu Mg, Ca, Sr und Ba zur Verfügung. Die Löslichkeiten der Erdalkalikarbonate sind (Angaben in g/100 g Wasser):

- $\text{BeCO}_3$  keine Angaben es zersetzt sich und bildet BeO
- $\text{MgCO}_3$  0,106
- $\text{CaCO}_3$   $1,5 \cdot 10^{-3}$  (bei  $18^\circ\text{C}$ )
- $\text{SrCO}_3$   $1,0 \cdot 10^{-3}$  (bei  $20^\circ\text{C}$ )
- $\text{BaCO}_3$   $1,62 \cdot 10^{-3}$  (bei  $13^\circ\text{C}$ )
- $\text{RaCO}_3$  keine Angaben, schwer bzw. gering löslich, deshalb wird in erster Näherung eine vergleichbare Löslichkeit wie Bariumkarbonat angenommen.

Wechselwirkungen zwischen Radium, Karbonat und Sulfat:

Wenn Ra als Karbonat im Wasser gebunden werden soll, dann ist der  $\text{HCO}_3^-$ -Gehalt im Wasser von Bedeutung. Dieser wird neben geogenen und chemischen Prozessen vor allem auch durch biologische Reaktionen beeinflusst. So wird Radium durch eine Alge (Caracea) mit einer maximalen Konzentration von  $60 \text{ Bq/g TS}$  (entspricht  $1620 \cdot 10^{-6} \mu\text{g Ra/g TS}$  bzw.  $1,6 \mu\text{g / kg TS}$ ) gebunden [KAL 2002]. Dabei ist eine Bindung des Radium durch pflanzlich gebildetes  $\text{CO}_2$  möglich und denkbar. Dies würde die Konzentrationsschwankungen zwischen Tag und Nacht bzw. Sommer und Winter durch den  $\text{CO}_2$  - Bildungszyklus sowie die Konzentrationsabhängigkeiten, die durch die das Wachstum beeinflussenden Faktoren wie - Temperatur, Nährstoffe, Sauerstoffgehalt hervorgerufen werden, erklären. Oszillierende Ra Konzentrationen in Wetlands deuten auf diese Zusammenhänge hin [KAL 2002, KIE 2004]]. Die andere Möglichkeit einer Bindung an Sulfat ist ebenfalls gegeben. Da in der Biomasse in der Regel 2% Schwefel in Sulfaten bzw. anderen S- Verbindungen (z.B. Aminosäuren) gebunden ist, ist deshalb auch die Bindung als  $\text{RaSO}_4$  denkbar. Eine Rückrechnung über den

Ra-Gehalt in der Biomasse und Analyse der Biomasse soll deshalb zu Aussagen über die mögliche Bindung führen.

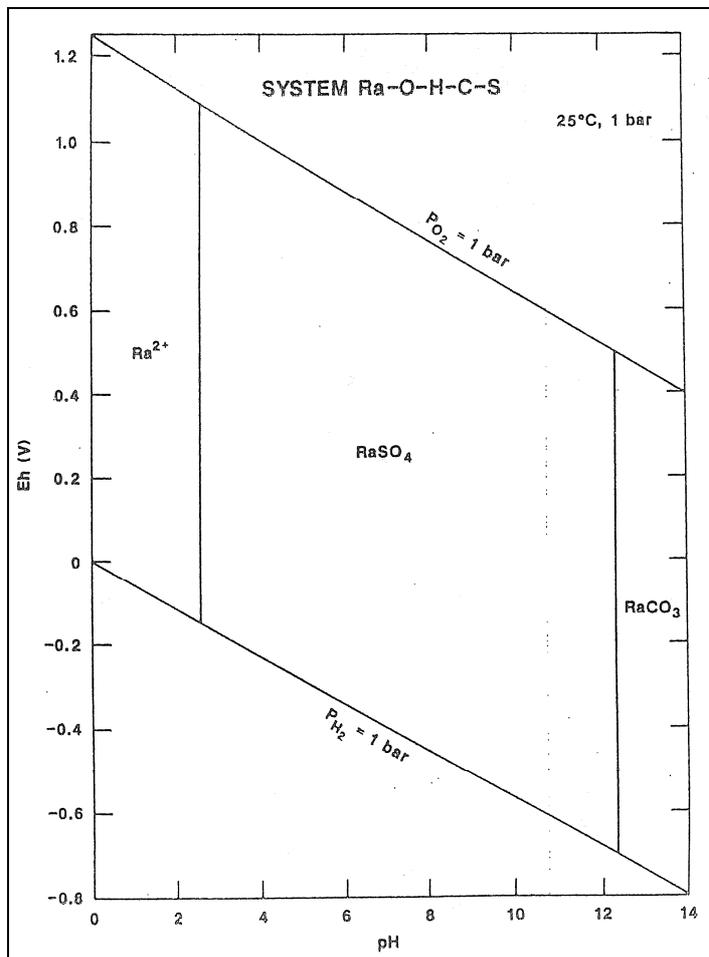


Abbildung 4: Eh-pH-Diagramm für Ra – O – H – C – S [BROO 1988]

Das Eh - pH-Diagramm für Radium in Gegenwart von O - H - C - S zeigt eine Stabilität von RaSO<sub>4</sub> über einen großen pH- und Redoxbereich. Erst bei pH 2,6 wird RaSO<sub>4</sub> aufgelöst und es werden Ra<sup>2+</sup>-Ionen gebildet. Bei hohen pH-Werten, die über 12,4 liegen, wird RaSO<sub>4</sub> durch RaCO<sub>3</sub> ersetzt.

Potenzielle Bindung von Ra an Karbonaten:

Die Abtrennung von Radium durch Karbonat aus Wasser ist eine Funktion der [HCO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>-Konzentration und allen den Größen, wie pH-Wert und Temperatur, die den [HCO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>-Gehalt beeinflussen. Zudem ist die Ra Abtrennung eine Funktion des Biomasse/Algenmenge-Verhältnis.

Da RaCO<sub>3</sub> eine Molmasse von 286 g/Mol aufweist, können 60 mg CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 226 mg Ra binden, wenn es als Ra-226 vorliegt. Wenn, wie in vielen Drainagewässern 300 – 400 mg/L HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

gelöst sind, dann können damit rechnerisch 1.130 mg Ra als  $\text{RaCO}_3$  ( $41,85 \cdot 10^6$  mBq/L, Annahme:  $27 \cdot 10^{-6}$   $\mu\text{g Ra} = 1$  Bq) gebunden werden. Die Löslichkeit des Radiumkarbonats wird wie die des  $\text{BaCO}_3$  mit  $1,62 \cdot 10^{-3}$  g /100g Wasser = 16 mg/L angenommen, d. h. ca. 12,8 mg Ra bleiben folglich gelöst ( $12,8$  mg Ra/L =  $47,36 \cdot 10^7$  Bq/L ( $473,6 \cdot 10^6$  Bq/L)). Das bedeutet, dass trotz der geringen Löslichkeit die Aktivität durch das gelöste Radium noch sehr hoch bleibt. Die Radiumkonzentration im Wasser reicht bei einer Radiumkonzentration von 3.000 – 4.000 mBq/L (3 – 4 Bq/L), entsprechend einer Konzentration von  $108 \cdot 10^{-6}$   $\mu\text{g Ra/L}$ , nicht an das Löslichkeitsprodukt heran. Dadurch ist auch keine Abnahme der  $\text{HCO}_3^-$  Werte zu erwarten.

Die Löslichkeiten der Sulfate sind (Angaben in g /100g Wasser):

- $\text{SrSO}_4$              $11,4 \cdot 10^{-3}$
- $\text{BaSO}_4$              $0,23 \cdot 10^{-3}$
- $\text{RaSO}_4$              $0,21 \cdot 10^{-3}$  bzw. 20  $\mu\text{g/L}$

Die Löslichkeiten von  $\text{RaCO}_3$  und  $\text{RaSO}_4$  müssten in der gleichen Größenordnung liegen. Deshalb sind die gleichen Überlegungen und Schlussfolgerungen bei  $\text{RaSO}_4$  zutreffend, wie sie für  $\text{RaCO}_3$  diskutiert und abgeleitet worden sind. Aus dem Eh – pH-Diagramm kann aber eine Bindung an das Karbonat unter den meisten betrachteten pH-Werten weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine besondere Bedeutung besitzt die Bindung von Radium an das Sulfat in Biomassen. Schwefel ist elementar für den Aufbau von S-haltigen Aminosäuren notwendig. Die Konzentration S-haltiger Aminosäuren beträgt ca. 2% im Protein (bei Hefen). Ein ähnlicher Wert dürfte bei Bakterien erwartet werden. Der Anteil an anorganischen Ionen (damit ist die Summe aller Ionen zu verstehen) liegt bei ca. 1 % in einer Zelle [FRI 1990]. Das entspricht einer Konzentration von 10 mg/g TS. Wenn die gebundene Menge von 60 Bq auf  $\text{RaSO}_4$  umgerechnet wird - bedeutet das 1,6 ng Ra gebunden als  $\text{RaSO}_4$  und eine Menge von 2,28 ng  $\text{RaSO}_4$  oder eine notwendige Menge an  $\text{SO}_4$  von 0,68 ng. Diese dürfte in einer Biomassemenge von 1 g enthalten sein.

Somit ist eine Bindung von Radium als Karbonat aber auch als Sulfat in Gegenwart von Mikroorganismen möglich, sofern die pH-Werte das zulassen.

### Polonium

Polonium existiert, unter reduzierenden Bedingungen zwischen pH 2 und pH 10 als elementares Po, wobei bei tiefen pH-Werten hohe Redoxpotenziale für die Existenz notwendig sind. Es ist ebenfalls eine PoS-Modifikation möglich,  $\text{PoO}_2$  ist unter oxidierenden Bedingungen stabil und von Bedeutung, besonders unter neutralen / alkalischen Bedingungen, während unter sauren oxidierenden Bedingungen  $\text{Po}^{2+}$  in gelöster Form existiert.

### Thorium

Einige Verbindungen von Thorium sind recht gut wasserlöslich. Dazu zählen vor allem das Nitrat und das Sulfat.

$\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$       181 g/100 g Wasser (bei 20°C)

$\text{Th}(\text{SO}_4)_2$               1,38 g/100 g (bei 20°C)

### Uran

Es sind sehr viele Uranverbindungen bekannt. Bekannteste lösliche Verbindungen sind:

- Uranylsulfat:  $\text{UO}_2\text{SO}_4$                       Löslichkeit 17,4 g/100 g Wasser (bei 15,5 °C)
- Uranylkarbonate:  $\text{Na}_4[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]$       gut löslich, ähnlich wie Uranylsulfat  
                                  $(\text{NH}_4)_4[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]$       gut löslich
- Uranylnitrat:  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$       119,3 g/100 g Wasser (bei 20°C)
- Uranylacetat:  $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$       8 g / 100 g Wasser (bei 15 °C)
- Uranylphosphat:  $\text{UO}_2\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$       unlöslich in Wasser, löslich in  $\text{HNO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - Lösung

## **2.3 Mögliche Prozesse zur Freisetzung und zum Transport**

### **2.3.1 Einleitung**

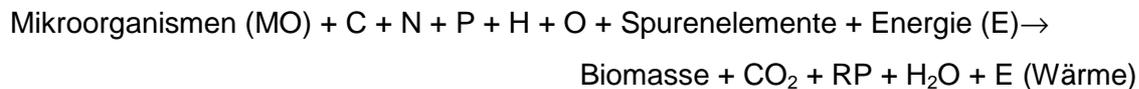
Die folgende Darstellung der mikrobiell induzierten Freisetzungs- und Transportprozesse ist eine Ergänzung und Erweiterung der im Abschlussbericht „Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten und Erweiterung des Anwendungsbereiches“ [BMU 2005] zusammengestellten Ergebnisse und Recherchen.

Mikroorganismen haben sich, bedingt durch die Entwicklung der Erde, an die unterschiedlichen Lebensräume und Lebensbedingungen angepasst. Dadurch ist es ihnen möglich geworden, bei unterschiedlichen Temperaturen (kryophiles bis extrem thermophiles Wachs-

tum), in Gegenwart von Sauerstoff (aerobes Wachstum) und bei Abwesenheit von Sauerstoff (anaerobes Wachstum) sowie bei hohen Salzkonzentrationen (halophiles Verhalten) und extremen Drücken (barophiles Verhalten) zu leben und sich zu vermehren. Als Kohlenstoffquelle für die Zellsubstanzsynthese werden dabei entweder  $\text{CO}_2$  aus der Luft über das Kohlenäuregleichgewicht im Wasser (autotrophes Wachstum) oder organische Verbindungen (heterotrophes Wachstum) verwendet. Wenn die Energie für die in den Mikroorganismen ablaufenden Prozesse und ihr Wachstum sowie ihre Vermehrung aus den abgebauten und umgewandelten chemischen Verbindungen gewonnen wird, existiert ein chemotrophes Verhalten, im Gegensatz zu den Fällen, wo die Energie aus dem Sonnenlicht bezogen wird (fototrophes Wachstum). Eine weitere wichtige Reaktion für die Lebensprozesse ist die Bereitstellung von Protonen für katabole und anabole Prozesse. Wenn Wasserstoff durch den Umbau anorganischer Verbindungen geliefert wird, existiert ein lithotropher Wachstumsprozess. Stammt der benötigte Wasserstoff aus den abgebauten organischen Verbindungen, existiert ein organotropher Prozess.

Die nachfolgende Gleichung zeigt einen mikrobiellen Wachstumsprozess in einer allgemeinen Form.

Gleichung 1



Mikroorganismen benötigen für die Bildung von Biomasse und neuen Zellen durch Zellvermehrung Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und eine Reihe von essentiellen Spurenelementen (z. B. Eisen, Kupfer, Mangan, Zink). Dabei wird in der Regel  $\text{CO}_2$  neben Wasser und Reaktionsprodukten (RP) an die Umgebung abgegeben. Da alle Wachstumsprozesse exotherm sind, wird ebenfalls Wärme an die Umgebung abgegeben.

Die Reaktionsprodukte werden je nach der Art der Bildung als Primär- oder Sekundärmetabolite bezeichnet. Bei ihnen kann es sich um die unterschiedlichsten Verbindungen wie anorganische und organische Säuren (Fettsäuren), Methan, Alkohole, Exopolysaccharide, Siderophore oder weitere komplexbildende Substanzen handeln. Durch die Vielzahl gebildeter Substanz sind die Voraussetzungen für unterschiedlichste Wechselwirkungen mit Radionuklid gegeben, die zu einer veränderten Spezierung und somit zu einer Mobilisierung aber auch zu einer Immobilisierung führen können.

Die Energiebereitstellung erfolgt über einen Elektronentransfer von einem elektronenliefernden Partner (Donator) zu einem elektronenaufnehmenden Reaktionspartner (Akzeptor). Ein Teil der bei diesem Prozess freiwerdenden Energie wird für das Aufrechterhalten der Lebensfunktionen der Mikroorganismen verwendet. Die Tabelle 1 listet Elektronen-Donatoren und Elektronen-Akzeptoren auf, die für das Wachstum der Mikroorganismen genutzt werden können. Daneben sind auch mikrobiologische Oxidations- und Reduktionsprozesse bekannt, deren Energie aber nicht für Wachstumsprozesse genutzt werden kann. Sie werden deshalb als cometabole Prozesse bezeichnet, die nur ablaufen, wenn den Mikroorganismen eine andere Energiequelle in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. Die betreffenden Spezies sind in Klammern der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenstellung von Elektronen liefernden (Donatoren) und von Elektronen aufnehmenden (Akzeptoren) Spezies für mikrobielle Laugungsprozesse

Elektronen-Donatoren	$S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$ , $S_4O_6^{2-}$ , $SO_3^{2-}$ , $S^0$ , $SCN^-$ , $Se^{2-}$ , $U^{4+}$ , $Sb^{3+}$ , $Cu^+$ , $Sn^{2+}$ , $As^{3+}$ , $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $H_2$ , $NH_4^+$ , $NO^{2-}$ , ( $W^{3+}$ , $Mo^{3+}$ , $V^{3+}$ , $Co^+$ )
Elektronen-Akzeptoren	$O_2$ , $SO_4^{2-}$ , $SO_3^{2-}$ , $S^0$ , $PO_4^{3-}$ , $ClO_3^-$ , $NO_3^-$ , $NO_2^-$ , $SeO_4^{2-}$ , $U^{6+}$ , $Fe^{3+}$ , $Mn^{4+}$ , $Cr^{6+}$ , $As^{5+}$ , $Sb^{5+}$ , ( $W^{6+}$ , $Mo^{5+}$ , $V^{5+}$ , $Co^{3+}$ , $Hg^{2+}$ , $Hg^+$ , $Ag^+$ )

## 2.3.2 Saure Laugung / Mobilisierung

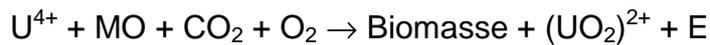
### 2.3.2.1 Direkte Oxidation und Freisetzung der gebildeten Radionuklide

Eine Freisetzung von Radioaktivität durch direkte Oxidation von Mikroorganismen aus Erzen betrifft vor allem Uran. Das ist sowohl bei Uran(IV)- als auch bei Uran(VI)-haltigen Mineralen möglich. Dabei sind  $U^{6+}$ -haltige Minerale leicht durch Säuren mobilisierbar, während  $U^{4+}$ -haltige Minerale schwer löslich sind und erst oxidiert werden müssen. Generell können die für eine Laugung in Frage kommenden Uranerze in 3 Gruppen eingeteilt werden [DUTR 1976].

- Primäre Oxide wie Uraninit ( $UO_2$ ), Pechblende ( $U_3O_8$ )
- primäre Minerale wie Brannerit ( $UTi_2O_6$ ) oder Coffinit ( $USiO_4 \cdot n H_2O$ ), in denen Uran mit anderen Metalloxiden vergesellschaftet ist,
- Sekundärminerale, die hexavalentes Uran enthalten wie Karnotit ( $K_2(UO_2)_2(VO_4)_2 \cdot 3 H_2O$ ), Autunit ( $Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 10 H_2O$ ) oder Ningyoit ( $(Ca, U)_2(PO_4)_2 \cdot n H_2O$ )

Das im Uraninit und in der Pechblende vorkommende Uran  $U^{4+}$  kann durch mikrobielle Prozesse in den sechswertigen Zustand überführt werden.

Gleichung 2

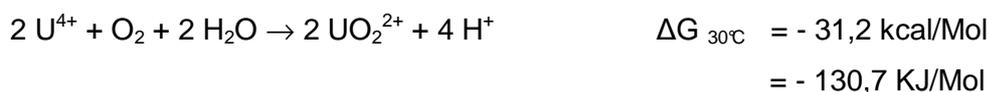


Dabei wird das Uran(IV) von chemolithoautotroph und aerob wachsenden Mikroorganismen als Energiequelle genutzt und zu U(VI) oxidiert. Abhängig vom pH-Wert und der Bildung von Uranylionen wird eine Mobilisierung als Uranylsulfat oder Uranylcarbonat erfolgen.

Bekanntester Mikroorganismus für die direkte Uranoxidation sowie auch für eine indirekte Oxidation über das gebildete  $\text{Fe}^{3+}$  im Zusammenhang mit der Pyritoxidation ist *Acidithiobacillus ferrooxidans*, der fähig ist,  $\text{U}^{4+}$  zu  $\text{UO}_2^{2+}$  zu oxidieren, wobei die Energieausbeute ausreicht,  $\text{CO}_2$  zu fixieren. Aus den Energieumsätzen bei der Oxidation des  $\text{U}^{4+}$  zu  $\text{U}^{6+}$  als alleinige Energiequelle kann ein Uranverbrauchskoeffizient, der eine notwendige Uranmenge von 50 - 100 g U für die Bildung von 1 g Biomasse zeigt, abgeleitet werden [GLOM 1987]. Ebenso kann *Thiobacillus acidophilus*  $\text{U}^{4+}$ , allerdings ohne Energiekonservierung oxidieren [DISP 1981], [DISP 1982], [EHRL 1996].

Manometrische Studien der Sauerstoffaufnahme bei der Uranoxidation mit gewaschenen Zellsuspensionen von *Thiobacillus ferrooxidans* zeigten die nachfolgende Stöchiometrie und ergaben eine freie Reaktionsenthalpie von  $\Delta G > 30 \text{ kcal/Mol}$  [TUOV 1986].

Gleichung 3



Die Stabilitätsgrenzen des Uraninit sind aus dem Eh-ph-Diagramm von U - Fe- S- H - O (Abbildung 5) nach Little et. al. 1997 [LITT 1997] ableitbar. Diese Zustände sind insbesondere auch für die Abtrennung des Urans durch reduzierende Prozesse wichtig.

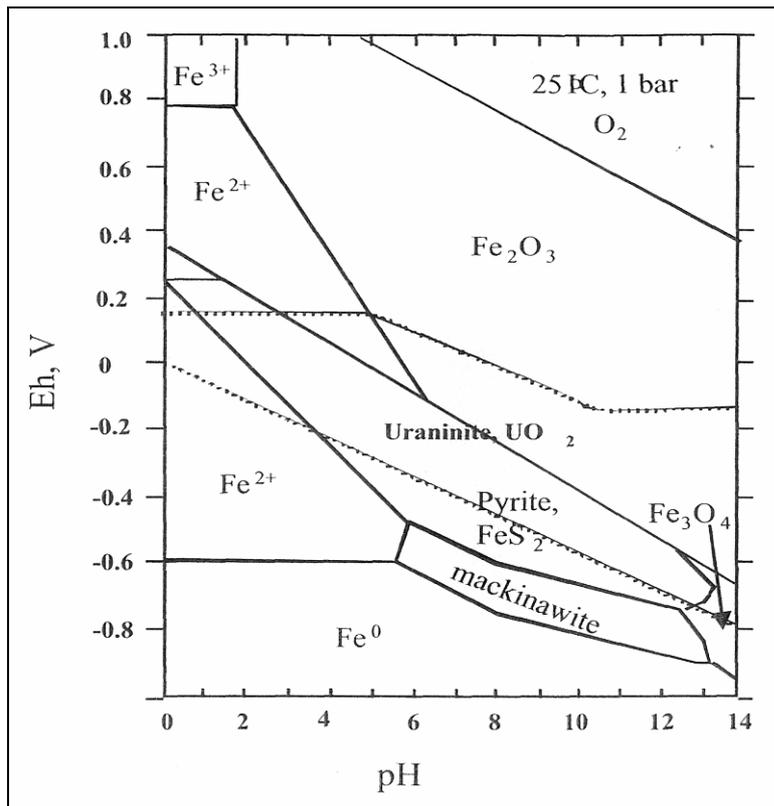
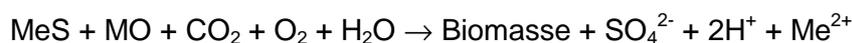


Abbildung 5: Eh-pH-Diagramm für Fe – S – U - O- H (Little 1997)

### 2.3.2.2 Umwandlung der Sulfide in Sulfat

Die Umwandlung von Sulfiden in Sulfat durch Mikroorganismen erfolgt unter Freisetzung von Protonen und der Bildung von Schwefelsäure.

Gleichung 4



Gleichung 4 gilt nahezu für alle Metallsulfide sowie für alle radiologisch relevanten Sulfide. Dadurch können Schwermetalle und Radionuklide mobilisiert werden ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Th}^{4+}$  und eventuell Bi, Po). Für Uran und Radium sind keine Sulfidminerale bekannt.

### 2.3.2.3 Indirekte Freisetzung durch Oxidation mit einem Oxidationsmittel

Oxidationsmittel sind in der Regel  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, andere Oxidationsmittel sind  $\text{As}^{5+}$  oder  $\text{Cr}^{6+}$ . Ebenso soll an dieser Stelle die katalytische Wirkung von  $\text{Ag}^+$  genannt werden.

Der Oxidationsprozess mit  $\text{Fe}^{3+}$  ist ein Folgeprozess der mikrobiellen Eisenoxidation im Zusammenhang mit der Sulfidauflösung. Das gebildete  $\text{Fe}^{3+}$  wirkt als Oxidationsmittel sowohl dem Sulfid gegenüber und beschleunigt dadurch den Prozess als auch gegenüber oxidierbaren Kationen wie z. Bsp. Uran(IV). Die Rolle der Mikroorganismen besteht dabei in der Regenerierung des Oxidationsmittels und der weiteren Oxidation von gebildetem, elementarem Schwefel zur Schwefelsäure. Dadurch besitzt der Prozess den Charakter einer autokatalytischen Reaktion. Die ablaufenden Prozesse sind in den Gleichungen 5a) bis 5e) dargestellt.

Gleichung 5

- a)  $\text{FeS} + \text{MO} + \text{CO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasse} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + \text{Fe}^{3+}$
- b)  $2 \text{Fe}^{3+} + \text{FeS} \rightarrow 3 \text{Fe}^{2+} + \text{S}^0$
- c)  $\text{Fe}^{2+} + \text{MO} + \text{CO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasse} + \text{Fe}^{3+}$
- d)  $\text{S}^0 + \text{MO} + \text{CO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasse} + \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$
- e)  $2 \text{Fe}^{3+} + \text{U}^{4+} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{Fe}^{2+} + (\text{UO}_2)^{2+}$

Die katalytische Wirkung des Silbers beruht auf einem zusätzlichen Spaltungsprozess der Sulfide, der auf die festeren Bindungen, gleichbedeutend mit niedrigen Löslichkeiten, der Silbersulfide im Vergleich zu anderen Metallsulfiden zurückzuführen ist (Löslichkeiten:  $\text{Ag}_2\text{S} = 14 \cdot 10^{-6}$ ,  $\text{CuS} = 33,6 \cdot 10^{-6}$ ,  $\text{FeS}_2 = 0,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $\text{FeS} = 0,44 \cdot 10^{-3}$  g/100 g Wasser). Dadurch werden andere Metallsulfide schneller aufgelöst. Die anschließende mikrobielle Auflösung des gebildeten Silbersulfides setzt die Silberionen wieder frei und ermöglicht eine weitere Spaltung der vorhandenen Sulfide (Gleichungen 6a und 6b).

Gleichung 6

- a)  $2 \text{Ag}^+ + \text{CuFeS} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{Ag}_2\text{S} + \text{Cu}^+ + \text{Fe}^{2+} + \text{SO}_4^{2-}$
- b)  $\text{Ag}_2\text{S} + 2 \text{O}_2 + \text{MO} \rightarrow 2 \text{Ag}^+ + \text{SO}_4^{2-}$

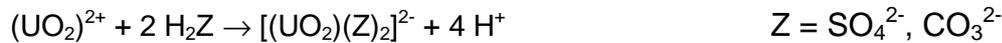
Auf diese Weise ist eine Freisetzung von Uran (vgl. Gleichung 5e) sowie von allen als Sulfiden vorkommenden Radionukliden mit Ausnahme von Radium möglich.

### *2.3.2.4 Indirekte Freisetzung durch Komplexbildung*

Eine Komplexbildung kann mit anorganischen Säuren wie Schwefelsäure, Kohlensäure aber auch mit Phosphorsäure und / oder Arsensäure erfolgen. Die Bildung der sehr gut löslichen Uranylkarbonat- und Uranylsulfatkomplexe durch das sechswertige Uran ist weitgehend be-

kannt und wird für die Gewinnung des Urans durch mikrobielle und chemische Laugungsprozesse genutzt.

Gleichung 7



Unter sauren und reduzierenden Bedingungen ist aber auch eine Mobilisierung des  $\text{U}^{4+}$  durch eine Komplexbildung mit Phosphorsäure und Arsensäure möglich [GEIP 2002]. Diese Mobilisierung beruht auf der Folgereaktion von Phosphat und Arsenat mit dem weitgehend unlöslichen  $\text{U}^{4+}$  unter Freisetzung eines Protons, wobei vor allem das Arsenat als Produkt eines mikrobiellen Oxidationsprozesses aufzufassen ist. Das ist dann der Fall, wenn z. B. Arsenopyrit oxidiert und aufgelöst wird und  $\text{As}^{3+}$  mikrobiell zu  $\text{As}^{5+}$  oxidiert wird.

Gleichung 8



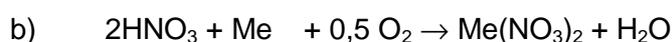
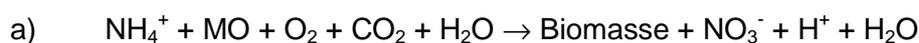
Die Existenz solcher Komplexe wurde im Konzentrationsbereich von  $2 \cdot 10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M durch Messungen des Absorptionsmaximum bei Wellenlängen von ca. 660 nm mit UV – Vis Analysen und Laser induzierter fotoakustischer Spektroskopie nachgewiesen (645, 656, 667 nm für das Phosphatsystem und 645, 662 nm für den Arsenatkomplex [GEIP 2002].

### 2.3.2.5 Andere säurebildende Prozesse zur Mobilisierung

Weitere säuregenerierende Prozesse, die zur Auflösung von Mineralen und Freisetzung von Kationen führen sind:

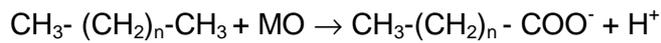
- die Nitrifikation durch Oxidation von  $\text{NH}_4^+$ , das aus dem Abbau von Eiweißverbindungen aus der Zersetzung von organischem Material resultiert. Auch bei der N – Fixierung von dazu geeigneten Mikroorganismen wird Säure gebildet. Gute wasserlösliche Nitrate sind vor allem Bleinitrat und Thoriumnitrat.

Gleichung 9



- Fettsäurebildende Prozesse bzw. die Bildung weiterer organischer Säuren

Gleichung 10



Fettsäuren werden beim Abbau von paraffinischen (aliphatischen) Kohlenwasserstoffen sowie aromatischer Kohlenwasserstoffe nach Ringspaltung und besonders bei Stickstoffmangel gebildet. Bei Stickstoffmangel kann keine vollständige Verstoffwechslung der Kohlenwasserstoffe erfolgen und die Bildung von Protein wird verhindert. Die Kohlenwasserstoffe bleiben in einer oxidierten Form bestehen.

Bekannte Prozesse sind:

Die Zitronensäure- und Oxalsäurebildung aus Paraffin durch *Aspergillus niger* [ECK 1980] die Gluconsäurebildung durch Umwandlung von Methanol [VAN 1994] und die Bildung von Fettsäuren aus der n - Alkanfraktion des Dieselöls durch Mikroorganismen. Alle diese Verbindungen bilden mit Schwermetallen und Radionukliden stabile lösliche Komplexe, die ein Ausfällen der gelösten Schwermetalle verhindern. Der Nachweis, dass die gebildeten Produkte, insbesondere die organischen Säuren, mit Uran Organokomplexe bilden, wurde von Francis und Dodge in mehreren Publikationen durch die Bildung von mikrobiellen Metall-Zitrat- und Oxalatkomplexen gezeigt [FRAN 1992], [FRAN 2002].

Sowohl Uran(VI) als auch Uran(IV) kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Mikroorganismen solche Komplexe bilden, die dann je nach Löslichkeit entweder zum Abscheiden oder zur Migration des Urans führen. Die Stabilität dieser Komplexe ist von der jeweiligen Struktur abhängig. Im Gegensatz zu abbaubaren  $\text{Fe}^{3+}$ -Zitratkomplexen bilden Uran(VI)-Ionen einen bi-Komplex, der nicht abbaubar ist und von anaeroben und vorwiegend sulfatreduzierenden Mikroorganismen zu einem U(IV)-Komplex mit Zitrat oder Oxalat reduziert werden kann. Dabei fällt aber das im Komplex gebundene  $\text{U}^{4+}$  im Gegensatz zu dem nicht gebundenen  $\text{U}^{4+}$  nicht aus, sondern verbleibt in der Lösung [GANE 1997]. Ebenso ist die Bildung eines Fe-U-Zitratmischkomplexes der Zusammensetzung 1:1:1 - Fe:U:Zitrat bekannt, der ebenfalls nicht oder nur schwer abbaubar ist und in der Lösung verbleibt [DODG 1997].

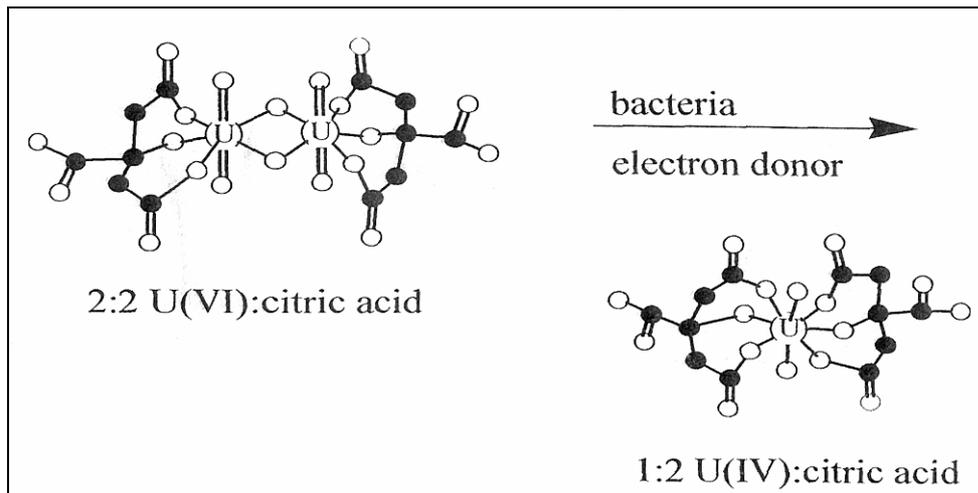


Abbildung 6: Umwandlung des  $U^{6+}$ -Zitratkomplexes in den  $U^{4+}$ -Zitratkomplex

### 2.3.2.6 Reduzierende Prozesse unter sauren Bedingungen

Seit kurzem ist eine Sulfatreduktion auch unter sauren Bedingungen bekannt [STO 2007]. Dadurch ist besonders eine Freisetzung von Radium durch die Reduzierung des Sulfates auch unter sauren pH-Bedingungen zu erwarten.

### 2.3.3 Freisetzung bei neutralen und alkalischen pH-Werten

Eine Freisetzung von Radionukliden unter neutralen und alkalischen Bedingungen durch mikrobielle Prozesse kann auf Desorptionsreaktionen, Reduktionsprozessen, der Bildung von metallorganischen Verbindungen oder einer Komplexbildung z.B. durch Bildung von Karbonatkomplexen beruhen.

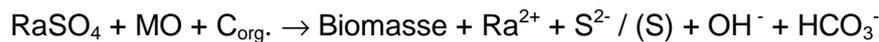
#### 2.3.3.1 Desorptionsprozesse

Wenn Radionuklide sorptiv an Zellwände und Bestandteile von Mikroorganismen gebunden sind, dann ist durch eine Verschiebung der pH-Werte und der Veränderung der elektrischen Ladung der Bindungsstellen eine Freisetzung zu erwarten. So findet eine Freisetzung von sorptiv gebundenem Ra durch Desorption von einer organischen Matrix im neutralen / alkalischen pH-Bereich bevorzugt zwischen pH 5 – 8 statt. Ebenso ist eine Freisetzung von sorptiv gebundenem Uran bei pH-Werten von  $> 6$  sowie im sauren Gebiet bei pH-Werten von  $< 4,5$  bekannt und wurde durch die Wechselwirkungen von Ra und Uran mit *Methylobazillus* MB 127 nachgewiesen [GLOM 1995]. Umfangreiche Untersuchungen zur Biosorption und Desorption von Radium, Uran und Thorium wurden von Tsezos durchgeführt und 1990 zusammenfassend dargestellt [TSEZ 1990].

### 2.3.3.2 Reduzierende Bedingungen - Sulfatreduktion (Freisetzung von Ra)

Eine Freisetzung erfolgt weiterhin durch Auflösung der Mineralmatrix, wenn Sulfat durch Mikroorganismen zu Sulfid reduziert wird und das Sulfid aus dem System durch Ausfällungen oder als Schwefel entfernt wird [MCR 1980].

Gleichung 11



### 2.3.3.3 Reduzierende Bedingungen und Uran

Sechswertiges Uran kann als Folge einer Sulfatreduktion durch die Bildung von Uranylkarbonat mobilisiert werden. Der gleiche Effekt ist zu beobachten, wenn eine organische Kohlenstoffquelle abgebaut wird und als Folge Hydrogenkarbonat entsteht.

Die Abbildung 7 zeigt das Eh – pH-Diagramm für gelöste Uranspezies in Lehm-porenwasser einer Lehmschicht. Dabei ist unter reduzierenden Bedingungen das Entstehen von amorphem Uran(IV) möglich. Dadurch können mit Wassermolekülen lösliche Uran(IV)-Verbindungen gebildet werden.

Gleichung 12



Das bestätigten Messungen der Löslichkeit unter alkalischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 8 und in Gegenwart von  $\text{CO}_2^{2-}/\text{HCO}_3^-$  bei einer Konzentration von  $\text{HCO}_3^-$  von  $1,2 \cdot 10^{-2}$  Mol/L und einem TOC von 103 mg C/L, die eine Urankonzentration von  $3,9 \cdot 10^{-6}$  Mol/L (= ca. 1 mg/L) ergaben, wobei der Hauptteil der Uranspezies  $\text{U}(\text{OH})_4$  ist und der Karbonatkomplex bzw. die Karbonatkonzentration nicht die Freisetzung verändert hat [DELE 2002].

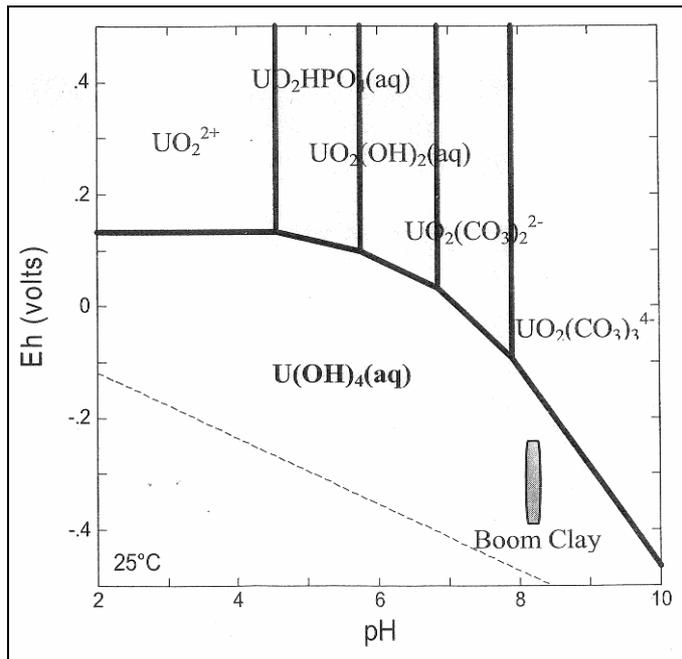


Abbildung 7: Eh-pH-Diagramm für wasserlösliche Uranspezies

#### 2.3.3.4 Methylierung / Dimethylierung, Bildung metallorganischer Verbindungen

Unter reduzierenden Bedingungen sind eine Reihe von Mikroorganismen, insbesondere auch sulfatreduzierende Mikroorganismen in der Lage, eine Mobilisierung von Metallkationen durch die Bildung metallorganischer Verbindungen zu erreichen [BRI 1988]. Solche metallorganischen Verbindungen sind neben Quecksilber, Zinn, Kobalt, Germanium auch von Blei und Thallium (kurzlebige Isotope in oben aufgeführten Zerfallsreihen) bekannt. So ist bei Thallium eine Bildung von Dimethylthallium in den Bergbaufloatationsrückständen bei der Laugung von Thalliumsulfiden durch neutrophile Proteobakterien festgestellt worden. Dabei wird Thallium durch die Spaltung vom Sulfid freigesetzt und durch Mikroorganismen, die wahrscheinlich Cobalamine für die Übertragung von Methylgruppen in den Bakterienzellen besitzen, methyliert. Da Thallium toxisch ist, deutet dieser Prozess auf eine Detoxifikation für die Mikroorganismen hin. Das Dimethylthallium ist sehr stabil und wird an die Umwelt abgegeben [SKL 2003]. Über den weiteren Verbleib in der Umwelt liegen keine Informationen vor.

#### 2.3.3.5 Komplexbildung

Eine Komplexbildung mit Schwermetallen ist bei der Bildung von  $\text{CN}^-$ -Ionen, von Siderophoren oder dem Auftreten von Huminsäuren und deren Derivaten zu erwarten.

Bei einer Reihe von Mikroorganismen wurde die Möglichkeit der Bildung und Abgabe von  $\text{CN}^-$  Ionen beobachtet [CLAW 1913]. Zu diesen Mikroorganismen gehören die Bakterien u. a. *Chromobacter violaceum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* und die Pilze z. B. *Marasmius oreades*, *Clitocybe* sp., *Polysporus* sp.. Viele von ihnen sind in der Gemeinschaft der normalen Bodenbakterien anzutreffen. Die Bildung findet vorwiegend im neutralen bis alkalischen pH-Bereich in der stationären Phase des Wachstums einer Mikroorganismenkultur, wenn keine weitere morphofunktionelle Differenzierung erfolgt, statt.

Es ist weiterhin bekannt, dass fast alle Übergangsmetalle, mit Ausnahme der Lanthaniden und Actinoiden, mit  $\text{CN}^-$ -Ionen sehr gut wasserlösliche Komplexe bilden. Deshalb wurde in jüngster Vergangenheit analysiert, inwieweit in Gegenwart dieser Mikroorganismen ein Auflösen von Metallen durch  $\text{CN}^-$ -Komplexbildung möglich ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass beträchtliche Mengen an Metallen durch die Bildung von Cyanoverbindungen komplexierbar waren. So wurden bei Cyanidkonzentrationen von 2 - 4 mg/L, Dicyanoaurate bis zu 0,7 mg/L, mobilisiertes Silber bis zu 17 mg/L oder als Tetracyanoplatinat von 62,5 mg/L gemessen [FAR 2004] [BRAND 2007]. Eine Mobilisierung von Pb und Bi durch  $\text{CN}^-$  sollte deshalb in Betracht gezogen werden.

Ähnlich wie Schwermetalle durch organische Säuren aus einer Mineralmatrix freigesetzt und als Komplex gebunden werden können, wirken Huminstoffe und Huminsäuren als Komplexbildner und sind in der Lage Schwermetalle und Radionuklide zu mobilisieren und vorwiegend kolloidal gebunden zu transportieren [BEN 1988], [SAC 2006]. Je nach Größe der Huminsäuren, ausgehend von den Fulvosäuren bis zu den Braun- und Grauhuminsäuren, variieren der Säuregrad und die Löslichkeit und damit auch ihr Einfluss auf die Mobilität.

Eine besondere Komplexform sind Eisenhydroxikomplexe mit und ohne Beteiligung von Sulfat. Diese sind in der Lage, Uran sorptiv zu binden und auf diese Weise zu transportieren. So konnte bei Analysen des Grubenwassers der Urangrube Königstein gezeigt werden, dass bei einem pH-Wert von 4,2 Schwertmannit in der Lage ist, 6,9 g-U(VI)/kg-Schwertmannit an der Oberfläche komplex zu binden [WALT 2002]. Die Konzentrationen des kolloidal und komplex gebundenen Urans in dem sauren Drainagewasser und dem Flutungswasser der Grube lagen bei 2 – 3 mg/L und die Partikelgröße der Eisenverbindungen bei 100 – 150 nm. Ebenso waren Po-210 und Pb-210, Th und Ac sorptiv gebunden. Aussagen über die Sorption von Radium an Eisenhydroxiden wurden in dem Bericht nicht getroffen. Die Beträge des gebundenen Uran sind dabei sehr pH-abhängig und können sich bereits bei geringen pH-Änderungen von wenigen Zehntel Einheiten stark verändern [ZÄNK 2002]. Das Stabilitätsoptimum für das

kolloidal gebundene Uran liegt in einem pH-Bereich zwischen 4-6. Bei tieferen pH-Werten überwiegt die Speziation als Sulfatokomplex, bei höheren pH-Werten die Speziation als Karbonatkomplex.

Siderophore sind von Mikroorganismen gebildete Substanzen, die auf der Basis von Stickstoffverbindungen zur Komplexbindung mit Eisen fähig sind und durch die sehr enge Bindung auch in der Lage sind, Eisen dann aufzulösen, wenn es in Verbindungen mit sehr geringen Löslichkeiten existiert. Die Bildung von Siderophoren erfolgt in der Regel bevorzugt bei einem neutralen pH-Wert und bei Eisenmangel. Die bekannten von verschiedenen Mikroorganismen produzierten Siderophore werden in 3 Gruppen eingeteilt - die Catecholate, die Hydroxamate und die  $\alpha$  - hydroxy / Keto-Carboxalate [MÜL 2005]. Die wichtigsten sind: Enterobactin oder Enterochelin - ein Katecholderivat, Aerobactin ein Hydroxamderivat und Rhodotorulinsäure ebenfalls ein Hydroxamderivat [EHR 1996]. 1 Mol mit einem Molgewicht von 300 - 2000 Da bindet in der Regel 1 - 2 Mol (56 - 112 g) Eisen. Die je Gramm Mikroorganismen produzierten Mengen sind recht unterschiedlich. So liegen die produzierten Mengen bei *Staphylococcus* sp. zwischen 3 - 383  $\mu\text{M}$ . Mit dieser Menge können zwischen 0,4 und 42 mg Fe solubilisiert und gelöst werden, wenn das Molverhältnis zwischen Eisen und Siderophore 2:1 beträgt.

## **2.4 In Bergbauhalden nachgewiesene Prozesse**

### **2.4.1 Vorkommende Mikroorganismen**

Eine Zusammenstellung der in Bergbauhalden und Bergbauhabitaten vorkommenden Mikroorganismen ist in einer Reihe von Publikationen enthalten und hier in Tabelle 2 dargestellt [SEL 2002a] [SEL 2002b] [GEI 2003].

Tabelle 2: Mikroorganismen in Uranhalden nach [Selenska-Pobell2002]

<b>Gattung</b>	<b>Klasse</b>	<b>Herkunft</b>
<i>Acinetobacter</i>	γ-Proteobacteria	Gittersee
<i>Anammox</i>	Plactomycteales	Gittersee
<i>Burkholderia</i>	β-Proteobacteria	Gittersee
<i>Desulfocapsa</i>	δ-Proteobacterium	Gittersee
<i>Desulfuromonas</i>	δ-Proteobacteria	Gittersee
<i>Flavobacterium</i>	Flavobacteria	Gittersee
<i>Magnetobacteria</i>	Nitrospira	Gittersee
<i>Nitrosomonas</i>	β-Proteobacteria	Gittersee
<i>Paenibacillus</i>	Bacilli	Gittersee
<i>Pelobacter</i>	δ-Proteobacterium	Gittersee
<i>Rhodobacter</i>	α-Proteobacteria	Gittersee
<i>Shewanella</i>	γ-Proteobacteria	Gittersee
<i>Acidithiobacillus</i>	γ-Proteobacteria	Gittersee, Johanngeorgenstadt
<i>Acidobacterium</i>	Acidobacteria	Gittersee, Johanngeorgenstadt
<i>Aeromonas</i>	γ-Proteobacteria	Gittersee, Johanngeorgenstadt
<i>Pseudomonas</i>	γ-Proteobacteria	Gittersee, Johanngeorgenstadt, Schlema
<i>Desulfobacter</i>	δ-Proteobacterium	Gittersee, Schlema
<i>Nitrosococcus</i>	γ-Proteobacteria	Johanngeorgenstadt
<i>Rasbo</i>	α-Proteobacteria	Johanngeorgenstadt
<i>Bradyrhizobium</i>	α-Proteobacteria	Johanngeorgenstadt, Schlema
	Grüne Bakterien	Schlema
	Grüne Schwefel Bakterien	Schlema
<i>Bacillus</i>	Bacilli	Schlema
<i>Enthoteonella</i>	δ-Proteobacterium	Schlema
<i>Geobacter</i>	δ-Proteobacterium	Schlema
<i>Nitrospina</i>	δ-Proteobacterium	Schlema
<i>Sarcobium</i>	γ-Proteobacteria	Schlema
<i>Zooglea</i>	β-Proteobacteria	Schlema

### 2.4.2 Saure Laugung

Die sehr oft nachgewiesene Bildung von sauren Drainagewässern in Halden ist auf die Oxidation von Sulfiden zurückzuführen und mit dem Freisetzen von Schwermetallen und Radionukliden verbunden [NOR 1990]. Von entscheidender Bedeutung für die Bildung und Aufrechterhaltung eines solchen Prozesses ist dabei die Menge an sulfidischen Mineralen und der Gehalt an säurebindenden Bestandteilen in einer Halde. In der Regel werden Halden mit einer Summe aus Mg und Ca sowie  $\text{CO}_3^{2-}$  von > 30 % als nicht laugbar eingestuft. Das bedeutet aber nicht, dass es keine Oxidationsprozesse der Sulfide gibt. Die dabei freigesetzten Schwermetalle und Radionuklide werden nur nicht mit einer sauren Drainagelösung transportiert, sondern können mit einem neutralen Sickerwasser als Nitrate oder Sulfate das System verlassen.

### **2.4.3 Alkalische Laugung**

Die bekannteste alkalische Mobilisierung von Radionukliden ist die sodaalkalische Laugung. Dabei wird ein basisches oder neutrales Material mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und  $\text{NaHCO}_3$  in einem bestimmten Verhältnis gemischt und anschließend gelaugt [BER 1973]. Unter natürlichen Bedingungen ist eine solche Laugung nicht zu erwarten, jedoch die Bindung von Radionukliden an  $\text{CO}_3^{2-}$  und die nachfolgende Freisetzung.

### **2.4.4 Reduzierende Prozesse / Gasbildung**

Unter Sauerstoffmangel finden reduzierende Prozesse statt. Sie sind in der Regel mit einer Bildung und Mobilisierung von  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$  verbunden. Sofern Radium als  $\text{RaSO}_4$  gebunden vorliegt, wird bei einer Reduktion des Sulfates zu Sulfid Radium freigesetzt. Wenn ausreichend organischer Kohlenstoff zur Verfügung steht, ist ebenso die Entstehung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  zu beobachten, wenn ausreichend organischer Kohlenstoff zur Verfügung steht. Dabei findet besonders in feuchten Gebieten / Biotopen auch die Bildung von metallorganischen Verbindungen durch Alkylierung statt.

### **2.4.5 Komplexbildende Prozesse**

Komplexbildende Prozesse sind vor allem an die Existenz von extrazellulären Polysacchariden und Siderophoren gebunden.

Andere Komplexbildner sind Fettsäuren, Cyanide, Eisenhydroxisulfatkomplexe und Huminsäuren, die ebenfalls Schwermetalle und Radionuklide binden können.

## **3 Laborverfahren zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität sowie zur Charakterisierung von mikrobiologischen Populationen**

Eine Vielzahl von miteinander vernetzten mikrobiellen Vorgängen in Halden beeinflusst die Mobilität von Radionukliden. Für die Beschreibung dieser Prozesse sind Untersuchungen durchzuführen, die die mikrobielle Aktivität standortbezogen quantitativ und qualitativ erfassen. Die nachfolgende Tabelle 3 fasst die Möglichkeiten der Bestimmung von mikrobiellen Populationen zusammen. Die Untersuchung der Mikrobiologie in Halden lässt sich in die folgenden drei Kategorien einteilen: 1. Mikrobielle Aktivität (Stoffumsatz), 2. Mikrobielle Quantifizierung (Biomasse, Zellzahlen), 3. Mikrobielle Diversität (verschiedene Organismen). Im Anschluss erfolgt eine kurze Erläuterung der Methoden.

Tabelle 3: Laborative Möglichkeiten zur Beschreibung mikrobieller Prozesse

Mikrobielle Aktivität	Mikrobielle Quantifizierung	Mikrobielle Diversität
Bodenatmung	Anreicherung	PLFA-Profile
Enzymaktivitäten	Mikroskopie	Anreicherung
Mikrokalorimetrie	Biomasse (CFE)	Immunologische Testsysteme
Isotopenfraktionierung (C13/12, S34/32, Fe56/54)	DNA basierte Methoden	DNA basierte Methoden
Radiotracer	RNA basierte Methoden	RNA basierte Methoden

Die Abkürzungen dieser Tabelle werden im Glossar erläutert.

### 3.1 Mikrobielle Aktivität

#### 3.1.1 Bodenatmung

Die Bestimmung der Bodenatmung ist eine Standardmethode der Bodenmikrobiologie. Diese Methode wurde bisher auf Material von Bergbauhalden kaum angewendet, sodass deren Anwendbarkeit auf Bergbauhalden bislang nicht belegt werden konnte (ausgenommen Bodenabdeckungen).

Die Rate der Bodenatmung (Sauerstoff-Aufnahme oder Kohlendioxid-Abgabe bezogen auf Zeiteinheit und Bodenmasse) ist eine der allgemeinen Messgrößen, durch die die mikrobielle Stoffwechselaktivität bzw. die mikrobielle Stoff-Umsetzung in einem Boden quantifiziert werden kann. Die Basal- oder Grundatmung hängt wesentlich von der im Boden präsenten mikrobiellen Biomasse und der Verfügbarkeit von C-Substraten aus dem Abbau von Humusstoffen und frischen pflanzlichen oder tierischen Rückständen ab. Beide Faktoren stehen in Wechselbeziehung miteinander: Es entwickelt sich mikrobielle Biomasse bis zu einem solchen Umfang, dass der durch Abbau-Stoffwechsel mögliche Substratgewinn gerade ihre Erhaltung gewährleistet. Die Bodenatmung zeigt dementsprechend die aktuelle Abbaurate bodeneigenen organischen Materials an. Außer den beiden genannten Faktoren beeinflussen auch Bodenfeuchte, -temperatur, im ungestörten Boden auch der Verdichtungsgrad und andere Faktoren die Atmungsrate.

Durch Zusatz von möglichst universell und leicht verwertbaren Substraten hebt man die in Böden in der Regel gegebene C-Begrenzung auf, und man beobachtet eine gegenüber der Basal-Atmungsrate gesteigerte „Substrat-induzierte Atmung“ (SIR, auch als potenzielle Atmungsaktivität bezeichnet). Diese setzt im typischen Fall kurz nach dem Substratzusatz ein und bleibt für einige Stunden konstant, bis dann die Mikroflora zu wachsen bzw. sich zu vermehren beginnt. Damit ist dann eine progressiv zunehmende Steigerung der Atmungsrate verbunden. Die SIR-Rate (vor Einsetzen des Wachstums bzw. der Vermehrung) zeigt die potenzielle Stoffwechselaktivität der aktiven, nicht-ruhenden Mikroflora an, soweit sie auf das

oder die gewählten Substrate reagiert. Diese Methode ist mit geringen Veränderungen an der Versuchsdurchführung auch für die Bestimmung der Stoffwechselrate unter anaeroben Bedingungen geeignet (Abbildung 8, Abbildung 9).

Die Methode zur Bestimmung der Bodenatmung ist standardisiert (DIN ISO 16072). Diese Methode gibt Auskunft über die mikrobielle Aktivität in einer Probe unter der aktuellen und zukünftigen Nährstoffsituation. Aussagen zum Einfluss auf die Mobilität von Radionukliden sind möglich. Gegenwärtig werden solche Bestimmungen nach der OxiTop-Methode durchgeführt. Dabei werden die Veränderungen der Gaszusammensetzung durch die vorhandenen Mikroorganismen in einem geschlossenen Gasraum analysiert.



Abbildung 8: Anaerobbox zur Durchführung von Versuchen unter Sauerstoffausschluss



Abbildung 9: Dokumentation von Prozessen durch Überwachung der Gasmenge (Foto: Katalog VWR International GmbH)

Damit der Gasraum über der Probe mit Inertgas gefüllt werden kann, besitzt die Messflasche seitliche Anschlussstutzen. Diese Anschlussstutzen sind mit Septen verschlossen, so dass nach erfolgter Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  mit Haldenmaterial der resultierende Druck in der Messflasche ermittelt und auf die Konzentrationsveränderung geschlossen werden kann.

### 3.1.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten (Dehydrogenase-Aktivität, Hydrolyse von Fluoreszeindiacetat)

Bakterien, Pilz- und andere Eukaryonten-Zellen enthalten im Cytoplasma und als Komponenten der Atmungskette wasserstoffübertragende Enzyme („Dehydrogenasen“), deren Aktivitäten vielfach summarisch als Ausdruck der allgemeinen Stoffwechselaktivität von Einzelzellen, Geweben und Populationen in Böden, Sedimenten u. ä. angesehen und gemessen werden. Anstelle der physiologischen Wasserstoffakzeptoren werden künstliche verwendet, deren Reduktion mit einer gut messbaren Farbänderung verbunden ist. Die Reduktion der Wasserstoffakzeptoren erfordert Reduktionsäquivalente [H] bzw. Elektronen. Wenn [H]-Donatoren, letztlich also oxidierbare Substrate, aus zelleigenen oder exogenen Beständen nicht ausreichend verfügbar sind, können die Dehydrogenasen nur beschränkt agieren; man misst eine aktuelle Aktivität des Bodens, die durch die Verfügbarkeit oxidierbarer Substrate begrenzt sein könnte. Durch Zusatz von Glucose oder einem oder mehreren anderen Substraten kann die Begrenzung aufgehoben werden; unter diesen Bedingungen würde theoretisch eine aussagekräftigere potenzielle Aktivität der Mikroflora gemessen.

Als künstlicher Wasserstoffakzeptor wird bei den Messungen Fluoreszeindiacetat verwendet. Die hydrolytische Spaltung von Fluoreszeindiacetat durch Lipasen, Esterasen und bestimmten Proteasen zu Fluoreszein bietet eine einfache und sensitive Möglichkeit aktive Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) und andere Organismen (Algen, Protozoen, tierische Zellen) zu quantifizieren (Abbildung 10).

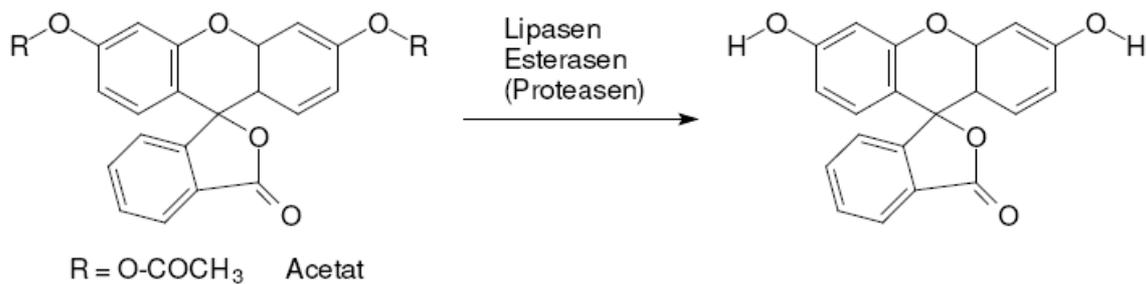


Abbildung 10: Enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Fluoreszeinderivaten (nicht fluoreszierend) zu Fluoreszein (fluoreszierend)

Die unpolaren farblosen Derivate des Fluoreszeins können durch unspezifische Transportsysteme leicht von aktiven Zellen aufgenommen werden. Das entstehende, reduzierte, farbige Fluoreszein ist polar und akkumuliert in der Zelle. Sporen und ruhende Zellen nehmen aufgrund der inaktiven bzw. nicht vorhandenen Transportsysteme kein Fluoreszein auf und zeigen daher keine oder allenfalls geringe Färbung.

Mit der Ermittlung der Enzymaktivität kann die biochemische Aktivität der mikrobiellen Population unter der aktuellen und zukünftigen Nährstoffsituation abgeschätzt werden. Insgesamt ist die Bestimmung der Enzymaktivität eine Methode mit geringem Zeitaufwand und kann auch ohne mikrobiologisches Spezialwissen und in gut ausgestatteten chemischen Laboratorien bei Vorhandensein von Photometern ausgeführt werden.

### 3.1.3 Mikrokolorimetrie

Die Kalorimetrie ist eine Methode zur Ermittlung von Wärmemengen, die bei chemischen, physikalischen oder biologischen Prozessen ausgetauscht werden. Die Vorteile dieser Messmethode liegen in ihrem nicht-invasiven Charakter und in der zeitnahen und kontinuierlichen Messwerterfassung. Die Universalität der Kalorimetrie ist insbesondere für biologische Fragestellungen von großer Bedeutung; alle Lebensvorgänge sind mit einem Austausch von Wärme verbunden. Das kontinuierlich anstehende Wärmesignal erlaubt damit ein Online-Monitoring metabolischer Aktivität und die Erfassung von Stoffwechselprozessen. Kalorimetrische Messungen sind unabhängig von elektrochemischen und optischen Eigenschaften des Probenmaterials und können deshalb sehr universell und ohne aufwendige Probenvorbereitung eingesetzt werden.

Die verfügbaren Kalorimeter lassen sich nach Betriebsart, Messprinzip und Größe der Messzelle unterscheiden. In der Literatur werden für mikrobiologische Fragestellungen vor allem die Messung des Wärmeflusses (Wärmeflusskalorimeter) und die Ermittlung von Temperaturdifferenzen (isoperibole Kalorimeter) eingesetzt. Im letzten Fall wird der Wärmeaustausch zwischen temperaturkonstanter Umgebung konstruktiv möglichst gering gehalten. Die gemessene Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen der Temperatur in der Messzelle und Umgebungstemperatur ist entsprechend der kalorimetrischen Grundgleichung (Gleichung 13) proportional der ausgetauschten Wärme ( $q$ ). Eine Umrechnung der ermittelten Temperaturdifferenz in eine thermische Leistung, als Maß für die mikrobielle Aktivität, ist nach Gleichung (Gleichung 14) möglich. Die isoperibolen Mikro-Kalorimeter werden vorwiegend bei sehr langsam ablaufenden Reaktionen eingesetzt, welche mehrere Stunden bis Jahre dauern.

Gleichung 13

$$q = c_p \Delta T$$

Gleichung 14

$$P(t) = \frac{\Delta T(t)}{R_{th}} + c_p \cdot \frac{d\Delta T(t)}{dt}$$

P = Wärmeleistung

$\Delta T$  = Temperaturdifferenz

$R_{th}$  = Wärmewiderstand

$c_p$  = Wärmekapazität

Das Prinzip der Wärmeflusskalorimetrie basiert auf der Messung des Wärmeflusses über eine definierte Wärmeleitstrecke. Zur Erfassung des Wärmeflusses dienen Thermosäulen. Wärmeflusskalorimeter werden in der Regel als Zwillingssysteme konzipiert um die Messempfindlichkeit zu verbessern. Referenz- und Messzelle befinden sich in einem Thermoblock auf einer konstanten Temperatur.

Der Einsatz der Kalorimetrie zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Bodenmikroorganismen ist in der Literatur zur Lösung unterschiedlichster Fragestellungen zu finden. Häufig wird mit kalorimetrischen Methoden die Wirkung toxischer Substanzen auf die mikrobielle Aktivität untersucht [YAO 2007, YAO 2008, RONG 2007]. Andere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der kalorimetrischen Charakterisierung der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Abbau unterschiedlichster Problemstoffe [CRI 2001, CRI 2004, PRA 2003, KOGA 2001] oder

es wird die Wärmefreisetzung als Indikator für die mikrobielle Aktivität unterschiedlichster Proben genutzt [CRI 2004, BAR 2007, ROD 2007, KOGA 2003]. Das große Potential der Kalorimetrie in der Biohydrometallurgie zeigen die Arbeiten von Sand et al. [SCHR 1993, ELB 2000, SCHI 2001]. Eine Übersicht, insbesondere den Einsatz verschiedener kalorimetrischer Methoden betreffend, wird von Barros et al. in [BAR 2007a] gegeben.

Die Messung der Wärmefreisetzung als Indikator der mikrobiellen Aktivität kann dabei sowohl unter Zusatz von Kohlenstoff- bzw. Energiequellen (potenzielle Aktivität) erfolgen oder es wird unter Einstellung definierter Feuchtegehalte die mikrobielle Basisaktivität (aktuelle Aktivität) ermittelt [BAR 2007]. Zur Interpretation werden die zeitlichen Kurvenverläufe und die gemessene Wärmeleistungen innerhalb definierter Zeiträume herangezogen.

Die Mikrokolorimetrie misst sehr empfindlich die z. B. bei der Pyritoxidation frei werdende Reaktionswärme, wobei die Wärmemenge mit der Oxidationsrate korreliert. Mittels Differenzmessung vor und nach Abtöten von Mikroorganismen lassen sich sowohl die chemische als auch die potenzielle biologische Pyritoxidationsrate mit Haldenproben von wenigen Gramm bestimmen. Die Methode ist robust, schnell, einfach zu handhaben und sehr kostengünstig. Sie wurde bereits auf zahlreichen Haldenstandorten erfolgreich angewendet [SCHI 2000], [SCHI 2005], [ELB 2000], [ÖHL 2001]. Anhand der Wärmeproduktion können Aussagen über die Aktivität der in der Probe vorhandenen Mikroorganismen getroffen werden.

### **3.1.4 Isotopenfraktionierung (C<sup>13</sup>/C<sup>12</sup>, S<sup>34</sup>/S<sup>32</sup>, Fe<sup>56</sup>/Fe<sup>54</sup>)**

Die Fraktionierung stabiler Isotope wird auch von mikrobieller Aktivität bestimmt. Die Messung der Isotopenverhältnisse anorganischer, chemischer Verbindungen von C, S und Fe in Haldenproben lassen somit Rückschlüsse auf mikrobielle Prozesse zu. Reaktionsraten für einzelne Prozesse lassen sich jedoch nicht ableiten.

Untersuchungen der stabilen Isotope von Kohlenstoff und Schwefel in organischen Verbindungen können eingesetzt werden, um Kenntnisse über Herkunft und mikrobielle Umwandlungen dieser Stoffe zu erhalten.

Bei mikrobiell gesteuerten Abbauprozessen findet häufig eine Verschiebung der Isotopenverhältnisse von der Ausgangssubstanz zum Produkt statt. Solche Isotopenfraktionierungsprozesse sind für anorganische Verbindungen z.B. bei Denitrifikation, Sulfatreduktion oder Methanbildung bzw. -Oxidation bekannt und gut untersucht. Für den Abbau von organischen

Schadstoffen sind im Rahmen des BMBF Förderschwerpunktes KORA Untersuchungen zur Isotopenfraktionierung beim mikrobiellen Abbau dieser Schadstoffe durchgeführt worden [KORA].

Beim mikrobiellen Abbau werden bevorzugt chemische Verbindungen mit leichteren Isotopen umgesetzt. Somit kommt es zu einer progressiven Anreicherung schwererer Isotope in der Ausgangssubstanz, während das Produkt demgegenüber eine Abreicherung aufweist.

Solche Untersuchungen liefern im Ergebnis Aussagen über stattfindende mikrobielle Prozesse mit bekannter Isotopenfraktionierung. Aussagen zum Einfluss auf die Mobilität von Radionukliden sind im begrenzten Umfang möglich. Die Methode ist noch im Forschungsstadium und daher für eine Etablierung im Leitfadenelement Grundwasser nicht geeignet. Die Messungen der Isotopenverhältnisse sind technisch aufwendig und kostenintensiv.

### **3.1.5 Radiotracer**

Diese empfindliche Methode mit  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  als Radiotracer wird zur Bestimmung von mikrobiellen Sulfatreduktionsraten in marinen Sedimenten verbreitet angewendet. Die Anwendung für Halden ist viel versprechend, aber bislang nicht dokumentiert. Ein Radioisotopenlabor und speziell geschultes Personal sind erforderlich. Es ist mit einem erhöhten Kostenaufwand zu rechnen.

## **3.2 Mikrobielle Quantifizierung**

### **3.2.1 Anreicherung**

Anreicherungen und daraus abgeleitete quantitative Angaben geben allgemein an, wie viele Mikroorganismen an einem Standort unter festgelegten Kulturbedingungen vermehrungsfähig sind. Die Bedingungen werden dabei in der Regel so gewählt, dass vermeintlich möglichst viele aerobe bzw. anaerobe Organismen wachsen.

Mittels mikrobieller Anreicherungen lassen sich spezifische Gruppen von kultivierbaren Mikroorganismen (z.B. Fe(II)-Oxidierer, Schwefel-Oxidierer, Fe(III)-Reduzierer, Sulfat-Reduzierer) quantifizieren. Dabei können feste Nährböden (z.B. Agaroseplatten) als auch Flüssigmedien wie bei der MPN (most-probable-number)-Methode eingesetzt werden. Es wird jedoch immer nur der kultivierbare Anteil der Gesamtpopulation erfasst, er beträgt in Abhängigkeit von der Populationszusammensetzung zwischen 10 und 80 %.

Anreicherungen erfassen also einen durch die Kulturbedingungen bestimmten Ausschnitt der Mikroflora eines Standorts (Boden, Wasser, Haldenmaterial o. a). Die angelegten Kulturen werden bei einer Standard-Temperatur (z.B. 30 °C) bebrütet. Nach einer festzulegenden Zeit werden die angelegten Anreicherungen auf das Vorhandensein von Mikroorganismen überprüft.

Der Ausschnitt der erfassten Mikroflora wird u. a. durch folgende Faktoren bestimmt:

- die Nährstoff-Zusammensetzung und -Konzentrationen des Mediums, den pH-Wert
- die Bebrütungsbedingungen: aerob oder anaerob, Temperatur, Lichteinfall
- die Bebrütungsdauer.

Darüber hinaus beeinflusst aber auch das Verfahren bei der Vorbereitung des Probenmaterials das Ergebnis. Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nur dann untereinander vergleichbar, wenn eine strikt einheitliche Methodik eingehalten wird. Diese ist in der Regel vorher festzulegen. Dabei können standardisierte Methoden aus der Trinkwasser- und Bodenmikrobiologie herangezogen und modifiziert werden (DIN EN ISO 19458 08/2006, DIN EN ISO 5667, DIN 38402, DIN ISO 10381).

Die gezielte Anreicherung von bekannten Stoffwechselspezialisten (Denitrifikanten, Sulfatreduzieren, Autotrophen) gibt in der Praxis die Möglichkeit, Umsatzraten unter optimierten und naturnahen Bedingungen zu bestimmen und diese als Grundlage für weitere Berechnungen zu nutzen.

Die Bestimmung von Mikroorganismen durch Anreicherungen ist für einige mikrobielle Arten standardisiert. Durch Anreicherungen werden Aussagen unter idealisierten Bedingungen (Nährstoffe, Umgebungsbedingungen) erhalten.



Abbildung 11: Beispiel für Anreicherungskulturen auf plattiertem Medium

Kultivierungsmethoden sind praktisch in jedem mikrobiologischen Labor durchführbar. Sie sind allerdings zeitaufwendig, sowohl in der Probenaufarbeitung als auch aufgrund der Inkubationsdauer.

### 3.2.2 Mikroskopie

Mikroskopische Analysen von natürlichen Populationen können eine Vielzahl an Informationen über Zellgrößen und –anzahl, ihre Heterogenität liefern.

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen gibt es mehrere mikroskopische Methoden. Allerdings sind Mikroorganismen anhand ihrer Morphologie kaum identifizierbar. Durchlichtmikroskopie ist zwar gut für Kulturen einsetzbar, jedoch nicht für Haldenproben, da Zellen nicht von Partikeln unterschieden werden können. Für Haldenproben sind fluoreszenzmikroskopische Methoden sinnvoll, da die Zellen mit einem Farbstoff angefärbt werden können und so von Partikeln unterscheidbar sind. Bei der Gesamtzellzahlbestimmung werden DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoffe (DAPI, Acridinorange, SybrGreen) verwendet. Dabei können lebende nicht von toten Zellen unterschieden werden. Diese Unterscheidung ermöglicht FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung). Bei dieser Methode wird 16S ribosomale RNA mit Gensonden markiert. Die Sequenz der Gensonde erlaubt zudem die spezifische Quantifizierung einzelner Bakteriengruppen oder –Gattungen (z.B. den Pyritoxidierer *Leptospirillum* sp.). Speziell für Halden eignet sich die modifizierte, empfindlichere Methode CARD-FISH.

Die mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl ist standardisiert. In Bezug auf Halden sind mikroskopische Methoden bislang nicht automatisierbar und erfordern einen erheblichen

Zeiteinsatz von geschultem Personal. Diese Methode gibt Auskunft über die Anzahl von mikrobiellen Zellen in der Probe.

### **3.2.3 Biomasse - Chloroform-Fumigation-Extraktion- Methode (CFE)**

Die mikrobielle Biomasse ist in zweierlei Hinsicht von Interesse: sie repräsentiert das Stoffwechselfotenzial, das alle Umsetzungen im Boden bewirkt und stellt andererseits ein Reservoir für Nährstoffe (N, C, P usw.) dar, die nach dem Absterben der Mikroorganismenzellen pflanzenverfügbar werden.

Die CFE-Methode beruht auf der Überlegung, dass die Zellen der Bodenmikroorganismen gezielt abgetötet werden und in Autolyse übergehen. Dadurch wird ein Teil der C-Verbindungen, die die Zellmassen ausmachen, mit wässrigen Lösungen extrahierbar. Messgröße und Grundlage der Bestimmung der Biomasse bzw. des meistens angegebenen Biomasse-C ist also der Zuwachs an Kohlenstoff, der nach dem Abtöten aus einer Bodenprobe im Vergleich zu einer entsprechenden unbehandelten Probe extrahiert werden kann. Es muss dabei angenommen werden, dass die Mikroorganismen-Gesellschaften, so unterschiedlich sie in verschiedenen Böden sein mögen, sich im Durchschnitt gleich verhalten, also einer gleich raschen Autolyse unterliegen.

Diese Methode gibt Auskunft über den Gehalt des extrahierbaren Biomasse-Kohlenstoffs in einer Probe. Damit kann die Größe der mikrobiellen Population abgeschätzt werden. Die Identifizierung einzelner Mikroorganismen bzw. deren Gattungen und Familien ist mit dieser Methode nicht möglich. Für die Belange des Leitfadenelementes ist diese Methode nicht geeignet, da eine möglichst genaue Kenntnis der Mikroorganismenpopulation für die Ermittlung der Populationsparameter bei der Feissetzungsprognose benötigt wird (vgl. 7.6).

### **3.2.4 DNA basierte Methoden**

Das derzeit größte Potenzial zur phylogenetischen und funktionalen Charakterisierung von Bakterien bietet die Analyse der Desoxyribonukleinsäuren (DNA).

Basierend auf der Amplifikation des 16S-rRNA-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität eines Habitats entwickelt. Die PCR-Produkte werden anhand ihrer Basensequenzunterschiede je nach Schmelzverhalten (DGGE und TGGE), sekundärer Faltung der einzelsträngigen DNA (SSCP) oder nach enzymatischer Aufspaltung (T-RFLP) gelelektrophore-

tisch getrennt und charakterisiert. Die damit generierten molekularen Fingerabdrücke ermöglichen die zeit- und kostensparende Analyse einer Vielzahl von mikrobiellen Gemeinschaften unter verschiedenen Bedingungen. Diese Methoden können mit geringfügigen Ergänzungen auch unter Verwendung von Ribonukleinsäure durchgeführt werden.

Durch Ermittlung von Nukleinsäure-Fingerprints können Aussagen über die Mikroorganismenpopulation gewonnen werden.



Abbildung 12: DNA – basierte Methoden (PCR-Technik)

Ähnlich wie FISH erlaubt die quantitative real-time PCR eine spezifische Quantifizierung einzelner Bakteriengruppen oder –Gattungen. Dazu wird DNA zuvor aus Haldenproben extrahiert. Insgesamt ist diese Methode weniger zeitaufwendig als FISH und leichter automatisierbar. Real-time PCR eignet sich somit auch zum Monitoring, die Kosten für das chemische Verbrauchsmaterial sind allerdings erheblich.

### **3.2.5 RNA basierte Methoden**

Seit langem ist bekannt, dass der Gehalt an Ribonukleinsäuren (RNA) einer Zelle abhängig vom physiologischen Zustand bzw. von der Aktivität des Organismus ist [GASS 1985]. Daher werden durch die Extraktion von RNA hauptsächlich metabolisch aktive Bakterien erfasst. Die Detektion von Boten-RNA (mRNA) analysiert speziell das genetische Potential, welches von der Zelle unter den gegebenen Bedingungen exprimiert wird.

Im einfachsten Fall der Analyse bestätigt der qualitative Nachweis von RNA in den untersuchten Proben, das Vorhandensein von lebender Biomasse. Aufwendigere Analysen kön-

nen Aussagen über die Art der mikrobiellen Aktivität geben. Sie erlauben verschiedene bekannte Stoffwechselaktivitäten nachzuweisen.

Ribosomale Nukleinsäure (RNA) befindet sich in jeder aktiven Zelle. Messenger RNA (mRNA) entsteht bei der Transkription von Genen, z.B. ist *dsr* ein spezifisches Gen aller Sulfat reduzierenden Bakterien, welches das Enzym dissimilatorische Sulfitreduktase kodiert. Die Menge an *dsr* mRNA korreliert mit der Aktivität Sulfat reduzierender Bakterien. mRNA lässt sich zwar aus Reinkulturen isolieren, eine quantitative Extraktion von mRNA aus Umweltproben ist jedoch noch Gegenstand der Forschung. Arbeiten über Bergbauhalden sind nicht bekannt.

### **3.3 Mikrobielle Diversität**

#### **3.3.1 PLFA-Profile**

PLFA (phospholipid fatty acids) sind chemische Bestandteile der Zellwände von Mikroorganismen, wobei die Zusammensetzung der PLFA bei verschiedenen Bakterien und Archaeen unterschiedlich ist. Eine PLFA-Analyse erlaubt somit eine Aussage über die mikrobielle Diversität, ist aber gegenüber den DNA- und RNA-basierten Methoden deutlich weniger aussagekräftig und wird seit der Etablierung der Gentechnik zur Charakterisierung von Mikroorganismen weniger genutzt.

Die Verwendung dieser Methode gibt Auskunft über das Vorkommen von Mikroorganismen mit bekanntem PLFA-Muster. Ob z.B. Pyrit oxidierende Mikroorganismenpopulationen in Halden mittels PLFA identifiziert werden können, ist unbekannt. Dagegen existieren ältere Arbeiten zur taxonomischen Charakterisierung von Thiobazillen unter Verwendung dieser Methode [LANE 1985], [STAH 1987], [WOES 1984].

#### **3.3.2 Anreicherung**

Wie unter 3.2.1 dargelegt, kann sowohl in Flüssigkulturen als auch auf festen Nährböden angereichert werden, um spezifische Gruppen von kultivierbaren Mikroorganismen zu erfassen. Die Methode ist z.B. für Fe(II)- und Schwefel oxidierende Bakterien (Pyritoxidierer) etabliert. Es wird jedoch immer nur der kultivierbare Anteil der Gesamtpopulation erfasst. Wird dabei auf eine quantitative Aussage verzichtet (siehe 3.2.1) ist der Arbeitsaufwand deutlich geringer.

### **3.3.3 Immunologische Testsysteme**

Bei immunologischen Testsystemen werden für bestimmte Mikroorganismen spezifische Antikörper eingesetzt, um die Zellen zu markieren. Dies erlaubt somit eine Aussage über die mikrobielle Diversität, ist aber gegenüber den DNA- und RNA-basierten Methoden deutlich weniger aussagekräftig.

Diese Methoden geben Auskunft über das Vorkommen von Mikroorganismen mit bekannten Proteinmustern. Ein Nachweis z.B. Pyrit oxidierender Mikroorganismenpopulationen in Haldden mittels immunologischer Testsysteme konnte bisher nicht erbracht werden. Aussagen zum Einfluss auf die Mobilität von Radionukliden sind im begrenzten Umfang möglich.

### **3.3.4 DNA basierte Methoden**

Es gibt zahlreiche PCR-basierte „DNA-Fingerprinting“-Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität in Umweltproben, wie z.B. T-RFLP, DGGE, RAPD oder ARDRA. Zur kompletten Analyse der Diversität bietet sich Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA an. DNA-basierte Methoden wurden erfolgreich auf Bergbauhalden angewendet. Sie eignen sich zum Monitoring und sind kostengünstig, sofern auf eine umfangreiche Sequenzierung verzichtet wird.

### **3.3.5 RNA basierte Methoden**

RNA basierte Methoden zur Erfassung der Diversität entsprechen den unter 3.3.4 beschriebenen Methoden. Im Unterschied zu DNA wird im Falle von RNA zuvor eine reverse Transkription von RNA zu DNA durchgeführt. Der Vorteil einer RNA- gegenüber einer DNA-Diversitätsanalyse liegt in der bevorzugten Erfassung aktiver Zellen. Nachteilig ist vor allem die aufwendigere RNA-Extraktion, die Spezialwissen erfordert.

## **3.4 Zusammenfassung**

Aus der Aufstellung der möglichen Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in Boden bzw. Boden ähnlichen Material wird ersichtlich, dass einige der Methoden eine breite Anwendung finden und auch standardisiert sind, wohingegen andere Methoden sehr speziell in ihrer Anwendung und ihren apparativen Voraussetzungen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich als Standardmethoden wegen der Handhabbarkeit, der Eindeutigkeit der Ergebnisse und aus ökonomischen Gründen zur Er-

fassung mikrobieller Aktivitäten die Bodenatmung, die Mikrokalorimetrie (z. B. zur Ermittlung der potenziellen mikrobiellen Pyritoxidationsrate) und Radiotracer (mikrobielle Sulfatreduktionsrate) anbieten. Damit lassen sich wichtige mikrobielle Aktivitäten in Bergbauhalden erfassen. Gebräuchliche Einsatzmethoden für die mikrobielle Quantifizierung sind Kultivierungsmethoden (Anreicherungen) und real-time PCR. Fluoreszenzmikroskopische Methoden sind als ergänzende Untersuchung für Proben mit hohen Zellzahlen sinnvoll. Um Aussagen über die mikrobielle Diversität zu erlangen, bieten sich ebenfalls DNA basierte Methoden und Anreicherungsverfahren an. Sind zum Beispiel speziell Pyritoxidierer von Interesse, kann gut auf Kultivierungsmethoden zurückgegriffen werden.

Für dieses vorliegende Projekt wurden von den oben aufgeführten Methoden die *Bodenatmung*, *Enzymaktivitäten*, *Mikrokalorimetrie* und *Anreicherungsverfahren* vergleichend auf ihre Eignung zur Relevanzbewertung mikrobiologischer Prozesse geprüft. Sofern diese Verfahren geeignet sind, sind diese aufgrund der vergleichsweise einfach handhabbaren Techniken und somit auch der leichten Etablierung in chemischen bzw. mikrobiologischen Laboratorien bei der Ableitung konkreter Handlungsempfehlungen zur Untersuchung, Modellierung und Bewertung der freisetzungrelevanten mikrobiologischen Prozesse in Halden zu bevorzugen.

## **4 Untersuchungen an ausgewählten Haldenmaterialien**

Im bestehenden Leitfadenelement Grundwasser wurden zwei Fälle identifiziert, bei denen künftig kein gesteigerter Stoffaustrag im Vergleich zur gegenwärtigen Situation prognostiziert wurde. Diese Fälle sind:

Fall 1: Sickerwasser-pH > 6 + Boden-pH > 6 + Karbonat-Pufferkapazität > 3x Säurebildungspotential

Fall 2: Sickerwasser-pH < 4,5 + Boden-pH < 4,5 + Karbonat-Pufferkapazität < Säurebildungspotential

Allerdings wurde in [BMU 2005] gezeigt, dass diese Aussage unter Berücksichtigung mikrobieller Prozesse gegebenenfalls hinfällig ist. Für die Durchführung der laborativen Untersuchungen zur Relevanzabschätzung mikrobiologischer Prozesse wurde daher das Hauptaugenmerk auf Haldenmaterial dieser beiden Fälle gelegt. Das Material A repräsentiert dabei den Fall 2 und das Material B den Fall 1.

Zunächst werden die beiden Standorte in Hinblick auf Mineralogie, Chemismus und Vererzung kurz dargestellt sowie wichtige Freisetzungsprozesse formuliert. Danach werden die mit dem Haldenmaterial durchgeführten Versuche beschrieben und ausgewertet.

### **4.1 Beschreibung Standort A**

Das Material des Standortes A stammt von einer Mischhalde, wobei sich das abgelagerte Bergematerial aus Granit/Granodiorit und unvererzten Sedimenten zusammensetzt. Bei den lagerstättenspezifischen Primärmineralen handelt es sich um Pyrit, Markasit, Sphalerit, Galenit, Hämatit, Limonit. Das Gesamthaldenvolumen beträgt ca.  $4 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ , die Mächtigkeit liegt zwischen 10 m und 45 m.

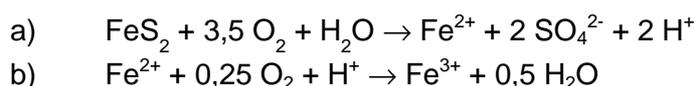
Das Schwermetall- und Radionuklidinventar liegt auf Grund der Heterogenität der eingelagerten Materialien sowohl in mobiler als auch gebundener Form im Haldenkörper vor. Die abgelagerten sulfidischen Minerale leisten einen wesentlichen Beitrag zum Säurebildungspotential im Haldenkörper.

Als geochemische Freisetzungsprozesse sind zu nennen:

- Oxidation von Sulfiden (z. B. Pyrit) und nachfolgende Sekundärmineralneubildung (z. B. basische Eisensulfate)
- Auflösungsprozesse durch schwefelsaure Wässer, Verstärkung von Verwitterungsprozessen (z. B. Pechblende, Tone, Glimmer, Karbonate) und nachfolgende Sekundärmineralneubildung.

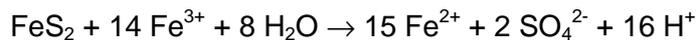
Die Verwitterung (Oxidation) von Sulfiden (Pyrit, Markasit, Arsenopyrit, Sphalerit, Galenit) erfolgt in vergleichbaren Prozessen und soll am Beispiel von Pyrit beschrieben werden (vgl. 2.3.2.3). Forciert werden diese chemischen Umsätze durch mikrobielle Aktivitäten, z. B. durch Mikroorganismen der Gattung Acidithiobacilli (Gleichung 15 bis Gleichung 18).

Gleichung 15



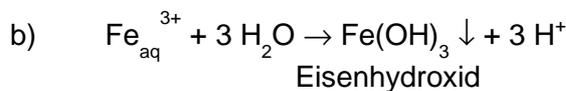
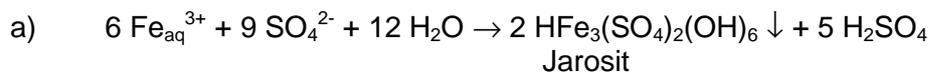
Fe(III) kann den Pyrit selbst oxidieren, was wiederum zur Schwefelsäurebildung führt:

Gleichung 16



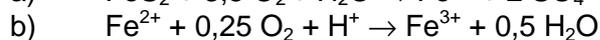
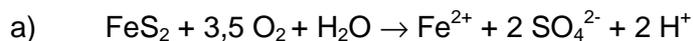
Die Oxidation wird überlagert von den abiotischen Protolysereaktionen der  $\text{Fe}^{3+}$ - Ionen, die bei geringen pH-Werten (1,5 bis 4,5) zu basischen Eisensulfaten wie Schwertmannit oder Jarosit (Gleichung 17) bzw. bei höheren pH-Werten zu Eisenhydroxisulfaten und Eisenhydroxid führen (durch Alterung Überführung in Goethit / Limonit unter Sulfatfreisetzung).

Gleichung 17



Zusammenfassend ergibt sich aus der Pyritverwitterung und z. B. der Eisenhydroxidfällung:

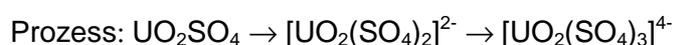
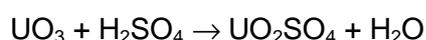
Gleichung 18



Bei einer vollständigen Oxidation des Pyrits und einer anschließenden Ausfällung des dabei freigesetzten Eisens als Eisenhydroxid werden pro Mol Pyrit insgesamt vier Mol Säure ( $\text{H}^+$ ) produziert. Diese bei der vollständigen Pyritoxidation freigesetzte Gesamtacidität resultiert folglich aus der Summe der Sulfidacidität sowie der Eisenacidität.

Viele zum Mineralbestand der Halde gehörenden Minerale sind unter Einwirkung von Schwefelsäure löslich bzw. ihre Kristallstruktur wird nachhaltig beeinträchtigt. Die chemischen Reaktionen der Auflösung von Pechblende ( $\text{UO}_3$ ) durch den Angriff von Schwefelsäure sind in Gleichung 19 exemplarisch dargestellt.

Gleichung 19



Reaktionsprodukt: Uranylsulfat, Disulfatouranat bzw. Trisulfatouranat.

Durch das Fehlen nennenswerter karbonatischer Minerale wird das migrierende Haldensickerwasser durch die Auflösung / Fällung eisen- und aluminiumreicher Mineralphasen gepuffert (Tonminerale, Glimmer, basische Eisen- und Aluminiumoxide / -hydroxide).

Am Haldenfuß befindet sich ein Absetzbecken zum Sammeln von Hang- und Sickerwässern, die der Wasserbehandlung zugeführt werden. Die Zuführung des Sickerwassers erfolgt durch dessen Fassung an zwei definierten Sickerwasseraustrittspunkten und die Überleitung in das Absetzbecken über offene Gräben. Weitergehende Informationen zum Chemismus der Haldensickerwässer finden sich im Anhang 2.

### **4.2 Beschreibung Standort B**

Gegenstand des Uranbergbaues am Standort B waren marine Schichtpakete aus Tonstein, Schluff- und Sandstein mit Dolomitlagen, in denen eine Anreicherung von Uran und Schwermetallen stattgefunden hat. Die Halden um die Tagebaue am Standort B, mit Höhen von bis 60 m, wurden aus dem Tagebauabraummaterial geschüttet. Die lithologische Zusammensetzung der Kippsubstrate schwankt daher in weiten Grenzen. Das Haldenmaterial setzt sich neben dem Deckgebirgs- und Zwischenmittelmateriale der Lagerstätten aus „tauben“ Rückständen nach der Uranerzsortierung zusammen. Mineralogisch-petrographische Untersuchungen am Haldenmaterial liegen nicht vor. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass das Haldenmaterial die mineralogische Zusammensetzung der Gesteine der Lagerstätte widerspiegelt. Diese setzen sich zusammen aus (Reihenfolge entspricht dem geologischen Aufbau in der Lagerstätte vom Liegenden zum Hangenden):

- Ordovizischem Phycodenschiefer, einem graugrünem phyllitischen Tonschiefer, der aus einem feinstkörnigen Gemenge von Glimmern, Quarz ( $\text{SiO}_2$ ), wenig opaker Substanz (Pyrit –  $\text{FeS}_2$ ) besteht; Trümmer im Tonschiefer setzen sich vorwiegend aus Quarz, wenig Karbonat (Siderit ( $\text{FeCO}_3$ )) und Sulfiden (Pyrit, Chalkopyrit ( $\text{CuFeS}_2$ ), Bornit ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), Sphalerit ( $\text{ZnS}$ ), Galenit ( $\text{PbS}$ ), Chalkosin ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) und Covellin ( $\text{CuS}$ )) zusammen
- Basalkonglomerat, einem Gerölle, vorwiegend aus phyllitischen Tonschiefern, untergeordnet aus Quarzit, Lydit, Diabas, Grauwacken, Granit, Quarzporphyr, lokal hämatisiert ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), Gerölle mit tonigen, karbonatischen und kieseligen Bindemitteln, zum Teil Träger einer Uranvererzung
- Gesteine der unteren grauen Serie (auch untere graue Folge), Wechsellagerung von Sandstein, sandigem Schiefertone und Dolomit ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ),
- Gesteine der unteren roten Serie (auch untere rote Folge), rotbraune, schwach sandige, gering verfestigte Schiefertone aus einer engen Wechsellagerung von hellrotbraunen

sandigen Lagen und dunkelrotbraunen tonigen Lagen mit bis zu 0,2 m mächtigen, nicht horizontbeständigen grauen bis gelblichen Dolomitbänken

- Gesteine der oberen grauen Serie (auch obere graue Folge), schluffig ausgebildeter graue Schiefertone, reich an organischer Substanz, häufiges Auftreten von Dolomitkonkretionen, Träger der bauwürdigen Uranvererzung, untergeordnet graugrüne bis rotbraune, z. T. sandige und karbonatreiche Schiefertone mit zwischengelagerten feinnittelkörnigem Sandstein
- Plattendolomit, graugelbes-bräunliches, plattiges und klüftiges Festgestein
- Gesteine der oberen roten Serie (auch obere rote Folge), sandige Schiefertone von roter bis rötlichgelber Farbe, untergeordnet schwach verfestigte Sandsteine, Quarzgeröllbänke und sandige Dolomitbänke
- Sedimente des unteren Buntsandsteins, rot- und gelbbraune Sande und Kiese
- Quartäre Ablagerungen, Lehme

Als Freisetzungprozess von Uran aus den Halden des Standortes B wird postuliert, dass die Verwitterung von Dolomit (nach Gleichung 20 und Gleichung 21) sowie der Umsatz organischer Materie durch mikrobielle Aktivität (nach Gleichung 22 bis Gleichung 24) zur Freisetzung von Hydrogenkarbonat und zur Laugung von Pechblende (Gleichung 25) führt.

Gleichung 20



Gleichung 21

- $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{Ca}(\text{HCO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$
- $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2 \leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + 2 \text{HCO}_3^{2-}$
- $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2 \leftrightarrow \text{Mg}^{2+} + 2 \text{HCO}_3^{2-}$

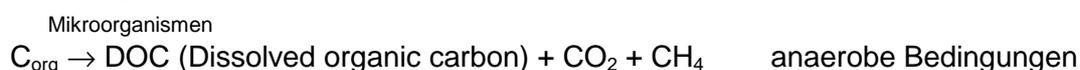
Gleichung 22



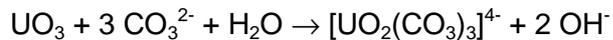
Gleichung 23



Gleichung 24



Gleichung 25



Bei der Analyse der Haldensickerwässer zeigte sich, dass kein Karbonat in Lösung nachgewiesen wurde. Damit kommt das Karbonation sehr wahrscheinlich nicht als Laugungsmittel in Frage. Die hohen Gehalte an Hydrogenkarbonat in den Wasseranalysen der Haldensickerwässer deuten auf einen engeren Zusammenhang der Freisetzung von Uran durch Hydrogenkarbonat hin. In [DePablo 1999] wird die oxidative Auflösung von Pechblende in Abhängigkeit von der Hydrogenkarbonatkonzentration bei unterschiedlichen Temperaturen (10, 25, 45 und 60°C) beschrieben. Der Autor kommt zur Schlussfolgerung, dass die nachfolgenden Schritte zur Freisetzung von Uran aus Pechblende führen:

1. Initiale Oxidation der Urandioxidoberfläche
2. Bindung von Hydrogenkarbonat an den Uran(VI)-Plätzen der oxidierten Schicht im Mineral
3. Freisetzung des entstandenen Uran(VI)-karbonatkomplexes.

Hierfür wurde eine Gleichung für die Freisetzungsrates von Uran durch Hydrogenkarbonat formuliert:

Gleichung 26

$$r = \frac{k_1 k_2 \{> \text{UO}_2\}_{\text{tot}} [\text{O}_2] [\text{HCO}_3^-]}{k_{-1} + k_2 [\text{HCO}_3^-] + k_1 [\text{O}_2]}$$

Uran kann durch oxidative Auflösung von in den Haldenmaterialien befindlicher nicht umgesetzter Pechblende freigesetzt werden. Dies hängt von der Sauerstoffverfügbarkeit ab (Bildung von Uran(VI)). Hydrogenkarbonat als Komplexbildner kann aus der Dolomitauflösung nachgeliefert werden (siehe Karbonatverwitterung). In Abhängigkeit vom CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Haldenkörper wird Dolomit aufgelöst und die konsekutive Hydrogenkarbonatbildung führt zur entsprechenden Uranfreisetzung. Je höher der CO<sub>2</sub>-Partialdruck, desto mehr Karbonate werden gelöst, desto mehr Hydrogenkarbonat gebildet.

In Anhang 3 können weitergehende Information zum Chemismus der Haldensickerwässer am Standort B nachgeschlagen werden.

## 5 Ergebnisse der mikrobiologischen Laborverfahren

### 5.1 Probenvorbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit standen je 30 kg radiologisch relevantes Haldenmaterial von Standort A und B zur Verfügung.

Das Material des Standortes A ist ein Haufwerk verschiedener Sandsteinvarietäten, zum Teil stark limonitisiert, und feinem erdigen tonigen Material (Abbildung 13).



Abbildung 13: Haldenmaterial von Standort A

Das Material des Standortes B ist ein Gemisch der Grauen Serie. Als Mineralien kommen in dieser Probe vor: Tonminerale, Glimmer, Quarz, wenig Feldspat, Karbonat sowie Hämatit. Daneben ist die graue Folge durch organische Substanzen geprägt, die zum Teil Träger der Uranvererzung ist (Abbildung 14).



Abbildung 14: Haldenmaterial von Standort B

Im Riffelteiler erfolgte eine Aufteilung des jeweiligen Materials. Eine repräsentative Teilprobe wurde entnommen und auf Korngrößen  $< 2$  mm aufbereitet. Hiernach erfolgten die Untersuchungen:

- Ermittlung von mikrobiellen Aktivitäten durch die laborativen Methoden: Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokalorimetrie.
- Anreicherung von in Haldenmaterial befindlichen Mikroorganismen auf den Nährmedien

## **5.2 Versuchsmethoden und –durchführung, Versuchsergebnisse**

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, eine Methodik zur Ermittlung der Relevanz mikrobiologischer Aktivitäten in Haldenmaterialien zu entwickeln. Hierfür wurden vergleichende Versuche mit den Methoden Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokalorimetrie durchgeführt. Zudem erfolgte eine Beschreibung der in den Haldenmaterialien befindlichen Populationen durch Anreicherung auf Nährmedien.

Die mikrokalorimetrischen Messungen erfolgten am Institut für Physikalische Chemie der TU Bergakademie Freiberg. Alle weiteren Messungen wurden im Mikrobiologischen Labor der G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH durchgeführt.

Die Versuche wurden mit den oben aufgeführten 2 Haldenmaterialien der Standorte A und B durchgeführt. Mit dem Material des Standortes A soll die mikrobielle Aktivität bei oxidierenden Prozessen, die zu einer Versauerung des Haldensickerwassers führen (Fall 2 des Leitfadenelementes Grundwasser < pH 4,5) und mit Material des Standortes B die mikrobielle Aktivität bei reduzierenden Prozessen, die zu einer pH-Wert-Anhebung in den alkalischen pH-Bereich (Fall 1 des Leitfadenelementes Grundwasser > pH 6,0) führen, nachgewiesen werden. Gegenläufige Prozesse (z. B. Versauerungsprozesse unter reduzierenden Bedingungen) sind nicht relevant und wurden daher nicht in Versuchen abgebildet.

Zur Vergleichbarkeit der durchgeführten Untersuchungen wurde immer Material mit der Körnung < 2 mm und einer definiert eingestellten Wasserhaltekapazität eingesetzt. Die Messungen fanden bei 25°C statt.

Folgende vergleichende Versuche wurden durchgeführt:

Aerobe Prozesse an Material des Standortes A

1. Unbehandeltes Probenmaterial mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
2. Vergiftetes (0,3 g/L Natriumazid) Probenmaterial mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
3. Probenmaterial mit Zugabe von Acidithiobacilli mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
4. Probenmaterial mit Zugabe von Acidithiobacilli / mit Eisen(II)-Lösung als Energiequelle (Modifiziertes 9 K-Medium)
5. Probenmaterial mit Zugabe einer Eisen(II)sulfat-Lösung (Modifiziertes 9 K-Medium).

Anaerobe Prozesse an Material des Standortes B

6. Unbehandeltes Probenmaterial mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
7. Vergiftetes (0,3 g/L Natriumazid) Probenmaterial mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
8. Probenmaterial mit Zugabe von sulfatreduzierenden Mikroorganismen mit eingestellter Wasserhaltekapazität (50% von  $WHK_{max}$ )
9. Probenmaterial mit Zugabe von sulfatreduzierenden Mikroorganismen / mit Acetat-Lösung als Energiequelle (Modifiziertes Postgate's-Medium)
10. Probenmaterial mit Zugabe einer Natriumacetat-Lösung (Modifiziertes Postgate's-Medium)

Alle Versuche wurden als Doppelversuche konzipiert. Zum Teil mussten Einzelversuche verworfen werden, so dass nur ein Versuchsergebnis in die Auswertung einbezogen werden konnte (z. B. mikrokalorimetrische Messungen).

### 5.2.1 Ermittlung der Wasserhaltekapazität nach DIN ISO 11274

Die Wasserhaltekapazität eines Bodens wird vor allem von der Korngrößenverteilung und dem Porenraum bestimmt, wobei die maximale Wasserhaltekapazität ( $WHK_{max}$ ) eines Bodens angibt, wie viel Wasser ein Boden gegen die Schwerkraft festhalten kann, ohne dass Sickerwasser aus dem Bodenkörper austritt. Der Wassergehalt eines Bodens hat großen Einfluss auf die mikrobielle Aktivität. Generell begünstigen hohe Wassergehalte unterhalb der Sättigung die mikrobielle Aktivität. Daraus ergibt sich ein Optimum für die mikrobielle Aktivität bei möglichst hohen Wassergehalten verbunden mit einem möglichst hohen Gasaustausch im Porenraum. Ein Maximum der mikrobiellen Aktivität wird erfahrungsgemäß bei Werten zwischen 50 und 60 % der  $WHK_{max}$  erlangt.

Die Ermittlung der maximalen Wasserhaltekapazität erfolgte im befeuchteten Sandbad. Das Sandbad wird mit Wasser vollständig gesättigt. Überschüssiges Wasser wird abgetrennt und ein feuchtes Tuch wird auf den Sand gelegt. In Parallelproben wird der Wassergehalt des naturfeuchten Bodens bestimmt.

Die Berechnung der Wasserhaltekapazität  $WHK_{max}$  erfolgt nach:

Gleichung 27

$$WHK_{max} = \frac{(a + b)}{c} \cdot 100 = H_2O / 100g \text{ Trockengewicht}$$

mit

- a H<sub>2</sub>O-Aufnahme pro 100 g naturfeuchtem Boden
- b H<sub>2</sub>O-Gehalt in 100 g naturfeuchtem Boden
- c Trockengewicht von 100 g naturfeuchtem Boden

Folgende maximale Wasserhaltekapazitäten wurden für die eingesetzten Haldenmaterialien ermittelt:

- Haldenmaterial Standort A (Sandsteinvarietäten): 26 %
- Haldenmaterial Standort B (Graue Folge): 35 %.

## 5.2.2 Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Bodenatmung (DIN ISO 16072)

Eine der gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität ist die Bestimmung der Bodenatmung, in der die Menge des freigesetzten Kohlendioxids oder die Menge des verbrauchten Sauerstoffs bestimmt werden. Diese Methode ist zum Beispiel als Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs  $BSB_5$  bekannt.

Der Nachweis einer Atmung ist aufgrund der Volumenänderungen der Gase Sauerstoff und Kohlendioxid prinzipiell relativ einfach zu führen. So führen Verbrauch und Bildung gasförmiger Reaktionspartner zu Druckänderungen, die mittels Drucksensoren (z. B. Messungen im Projekt mit dem OxiTopC-System) gemessen werden. Das System besteht aus einer Probenflasche mit definierter Probemenge und Gasvolumen, dem OxiTop-Messkopf und einem  $CO_2$ -Absorber (Abbildung 9). So wird bei aeroben Prozessen der von den Mikroorganismen benötigte Sauerstoff aus dem über der Probe stehenden Luftraum geliefert. Gleichzeitig wird das gebildete  $CO_2$  durch Absorber (z. B. NaOH, KOH) gebunden und entfernt. Der Druck in der Messflasche sinkt und wird mit Hilfe des Drucksensors aufgezeichnet. Mit Hilfe des idealen Gasgesetzes nach Gleichung 28 kann aus der Druckänderung direkt auf die Menge benötigten Sauerstoffs geschlossen werden.

Gleichung 28

$$n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T}$$

Mit

n	Anzahl der Mole des gebildetes Gases [mol]
p	Gasdruck [Pa]
V	Gasvolumen [m <sup>3</sup> ]
R	Gaskonstante [8,314 J/(mol·K)]
T	Inkubationstemperatur [K]

Beim aeroben Abbau, der mit dem Haldenmaterial des Standortes A nachempfunden werden soll, wird durch Oxidationsprozesse der im Gasraum befindliche Sauerstoff nach Gleichung 15 bis Gleichung 18 verbraucht. Die einzelnen Versuche wurden nach Versuchsplan in Abschnitt 5.2 durchgeführt. Es kam dabei das routinemäßig verwendete Verfahren zur Ermittlung des biochemischen Sauerstoffbedarfs zur Anwendung. Hierfür wurden 70 g Probenmaterial mit auf 50 % eingestellter Wasserhaltekapazität eingewogen (Volumen der Messflaschen: 1.167ml). Das Haldenmaterial ist karbonatfrei, sodass eine Kohlendioxidproduktion

aus der Karbonatzersetzung ausgeschlossen werden konnte. Die Atmungsaktivität wurde über ca. 7 Tage hinweg registriert.

Die Abbildung 15 zeigt die mit dem OxiTop-Messsystem berechnete verbrauchte Sauerstoffmenge je Gramm Trockenmasse. Am rechten Rand des Diagramms ist der Sauerstoffverbrauch des letzten Messwertes der jeweiligen Versuchsreihe angegeben. Die Sauerstoffverbrauchsrate ist für alle Versuche annähernd linear. Eine maximale Sauerstoffverbrauchsrate von reichlich  $1 \text{ mg O}_2/[\text{g TS}\cdot\text{d}]$  wurde für die Versuche mit Zugabe von Eisen(II)-Lösung mit und ohne Acidithiobacilli ermittelt. In den Versuchen mit Zugabe von Acidithiobacilli ohne Energiequelle bzw. unter Verwendung unbehandelten Haldenmaterials beträgt die Sauerstoffverbrauchsrate etwa  $0,5 \text{ mg O}_2/[\text{g TS}\cdot\text{d}]$ .

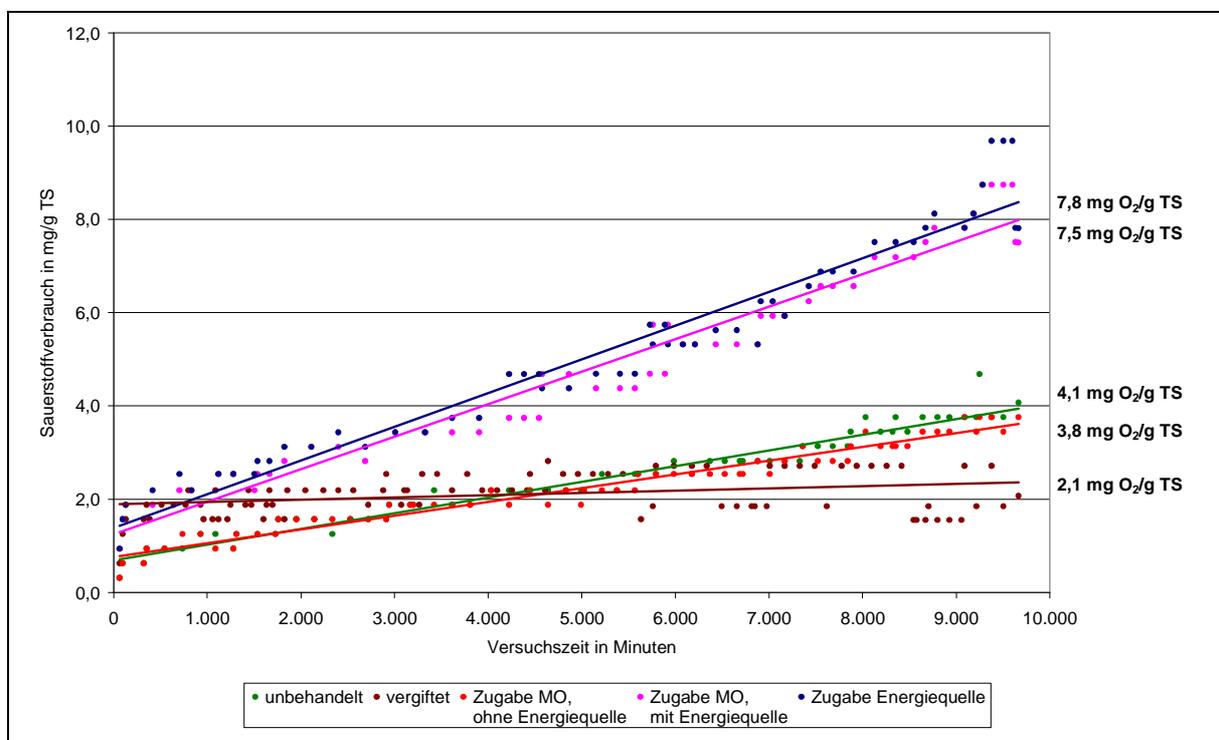


Abbildung 15: Ergebnisse von Messungen im OxiTop-Messsystem unter aeroben Bedingungen für das Haldenmaterial des Standortes A

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die Zugabe von Mikroorganismen ohne zusätzliche Energiequelle zu keiner Erhöhung der mikrobiellen Aktivität der ohnehin im Haldenmaterial befindlichen Population führte. Die Zugabe von Eisen(II)-Lösung zum unbehandelten Haldenmaterial ohne zusätzliche Mikroorganismen führt zum gleichen Sauerstoffverbrauch wie der Zusatz von Mikroorganismen und Eisen(II)-Lösung. Das bedeutet, dass die Eisen(II)-Lösung lediglich zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch durch eine erhöhte Aktivität

der acidophilen eisenoxidierenden Mikroorganismen, die sich im Haldenmaterial a priori befunden haben, geführt hat. Eine Zugabe von nicht an das Haldenmaterial angepassten Mikroorganismen erbrachte daher keine weitere Erhöhung, sondern dieselben Sauerstoffverbräuche. Im Gegensatz zu den mikrobiell induzierten Sauerstoffverbrauchswerten bleibt der Sauerstoffverbrauch bei den Proben mit inhibierten Mikroorganismen konstant auf einem sehr niedrigen Niveau. Der prozentuale Unterschied in der ermittelten Sauerstoffverbrauchsrate zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material liegt bei ca. 50%.

Beim anaeroben Abbau, der mit dem Haldenmaterial des Standortes B nachempfunden werden soll, entsteht durch Bildung von  $\text{CO}_2$  (und  $\text{CH}_4$ ) infolge des Abbaus organischen Kohlenstoffs ein Druckanstieg im Gasraum der in der Anaerobox befüllten und gasdicht verschlossenen Messflasche (Versuchsplan siehe Abschnitt 5.2). Das gebildete  $\text{CO}_2$  wird durch Einspritzen eines  $\text{CO}_2$ -Absorbers (z.B. Kalilauge  $\text{KOH}$ ) in den Köcher über einen Septenzugang der Messflasche absorbiert. Die Absorption führt daraufhin zu einer Druckabnahme im Gasraum. Der Gasdruck(abfall) wird im OxiTop-Messkopf erfasst und über den gesamten Versuchszeitraum automatisch gespeichert.

Die Berechnung des entstandenen Gases  $\text{CO}_2$  (und  $\text{CH}_4$ ) infolge der anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen erfolgt nach dem Idealen Gasgesetz (Gleichung 28). Die Entstehung von Methan ist nach derzeitigem Kenntnisstand für Halden des Uranerzbergbaus nicht bekannt (ausgenommen Mischhalden von Berge- und Deponiematerial, z. B. Halde Steinsee, Johannegeorgenstadt). Um eine Methanbildung während der Versuchszeit auszuschließen und bei späteren Interpretationen zu berücksichtigen, sollte am Versuchsende die Gaszusammensetzung im Messsystem überprüft werden.

Für das Haldenmaterial des Standortes B sind die Ergebnisse der durchgeführten Versuche in der Abbildung 16 dargestellt. Neben den Druckkurven sind die ermittelten Gasmolmengen des letzten Messwertes der jeweiligen Versuchsreihe aufgetragen. Eine maximale Kohlendioxidproduktion von 1,61 mmol  $\text{CO}_2$  wurde in den Versuchen mit Zugabe von Energiequelle und sulfatreduzierenden Mikroorganismen erreicht. Eine deutlich geringere  $\text{CO}_2$ -Produktion entstand in den Versuchen mit unbehandeltem Haldenmaterial (1,13 mmol  $\text{CO}_2$ ) und unter Zugabe von Mikroorganismen ohne Energiequelle (0,81 mmol  $\text{CO}_2$ ) bzw. nur von Energiequelle (0,87 mmol  $\text{CO}_2$ ). Mit hoher Wahrscheinlichkeit bilden diese Versuche die Tatsache ab, dass im Haldenmaterial befindliche heterotroph lebende Populationen in der Lage sind, den Kohlenstoff des Haldenmaterials zu verwerten. Zusätzlich eingebrachte Energiequellen

bzw. die Erhöhung der Keimzahlen brachten im Vergleich dazu keine Steigerung der Atmungsaktivitäten. Das kann auf die langen Adaptationszeiten bei anaeroben Prozessen zurückgeführt werden. Im Gegensatz hierzu sind bei den Versuchen mit zugeführten Mikroorganismen diese bereits als Laborkultur auf die ebenfalls zugegebene Energiequelle angepasst.

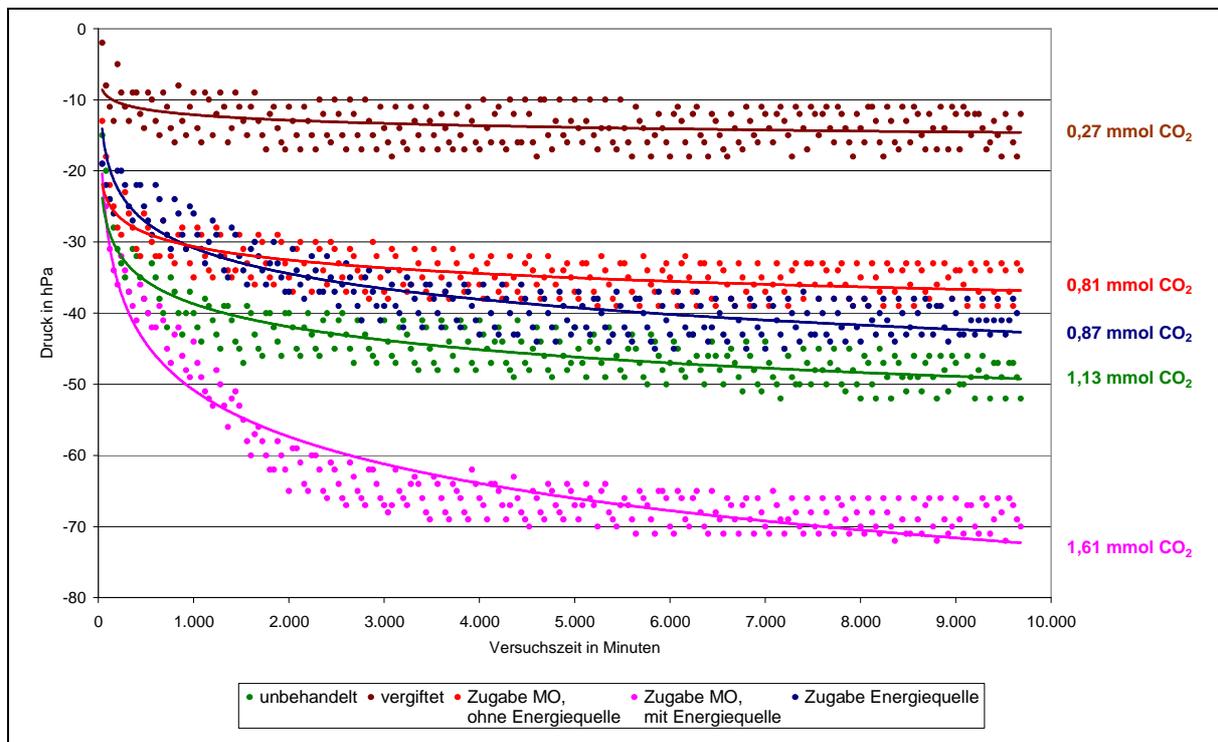


Abbildung 16: Ergebnisse von Messungen im OxiTop-Messsystem unter anaeroben Bedingungen für das Haldenmaterial des Standortes B

Der prozentuale Unterschied in der ermittelten Kohlendioxidproduktion zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material liegt bei ca. 80 %.

### 5.2.3 Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Enzymaktivität nach [LUBW 1991]

Ausführliche Erläuterungen zur Ermittlung der Enzymaktivität durch Bestimmung der Hydrolyserate von Fluoreszeindiacetat erfolgten in Abschnitt 3.1.2.

In 250 ml Erlenmeyerkolben wurde 2 g der zu untersuchenden, auf 50 % Wassergehalt eingestellten Bodenprobe eingewogen (Versuchsplan siehe Abschnitt 5.2). Alle Kolben wurden entsprechend des Versuchsplanes präpariert, mit Alufolie verschlossen und 24 Stunden bei 30°C konditioniert. Hiernach wurden jedem der Kolben 30 ml Phosphatpuffer (Kali-

um/Natriumphosphatpuffer pH 7,6) sowie 500 µl der Fluoreszeindiacetat-Stammlösung (Fluoreszeindiacetatstammlösung: 2 mg/ml) hinzugefügt und danach 3 h bei 24°C im Wasserbad geschüttelt. Im Anschluss wurde den Inkubationsansätzen jeweils 29,5 ml Aceton zugesetzt. Nach Homogenisierung der Probe wurden 1,5 ml jeder Suspension in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß abzentrifugiert und die Extinktion von 1 ml des klaren Überstandes bei 490 nm gegen Phosphatpuffer in einer Plastikkuvette mittels Photometer (vorherige Aufnahme einer Fluoreszein-Eichkurve) gemessen.

Die Ergebnisse für die Versuchsansätze mit Haldenmaterial der Standorte A und B sind aus der Abbildung 17 und Abbildung 18 ersichtlich. Die Versuche bilden aufgrund der kurzen Konditionierungsphase von 24 Stunden die aktuelle mikrobielle Aktivität der in den Haldenmaterialien befindlichen Mikroorganismen ab. Eine Zugabe der Energiequelle zum Substrat bewirkt kurzfristig keine messbar verstärkte Enzymaktivität. Insgesamt kann man aber feststellen, dass die Anhebung der Keimzahlen abhängig von der Zugabe der Mikroorganismen ist und zu einer deutlichen Steigerung der enzymatischen Aktivität gegenüber der unbehandelten Proben bzw. vergifteten Proben führte. Daher ist für eine spätere Handlungsempfehlung lediglich der Vergleich zwischen unbehandelten und vergifteten Versuchsansätzen sinnvoll. Der prozentuale Unterschied der mikrobiellen Enzymaktivität wird daher zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material ermittelt und liegt für Standort A bei ca. 50 % und für Standort B bei ca. 30 % .

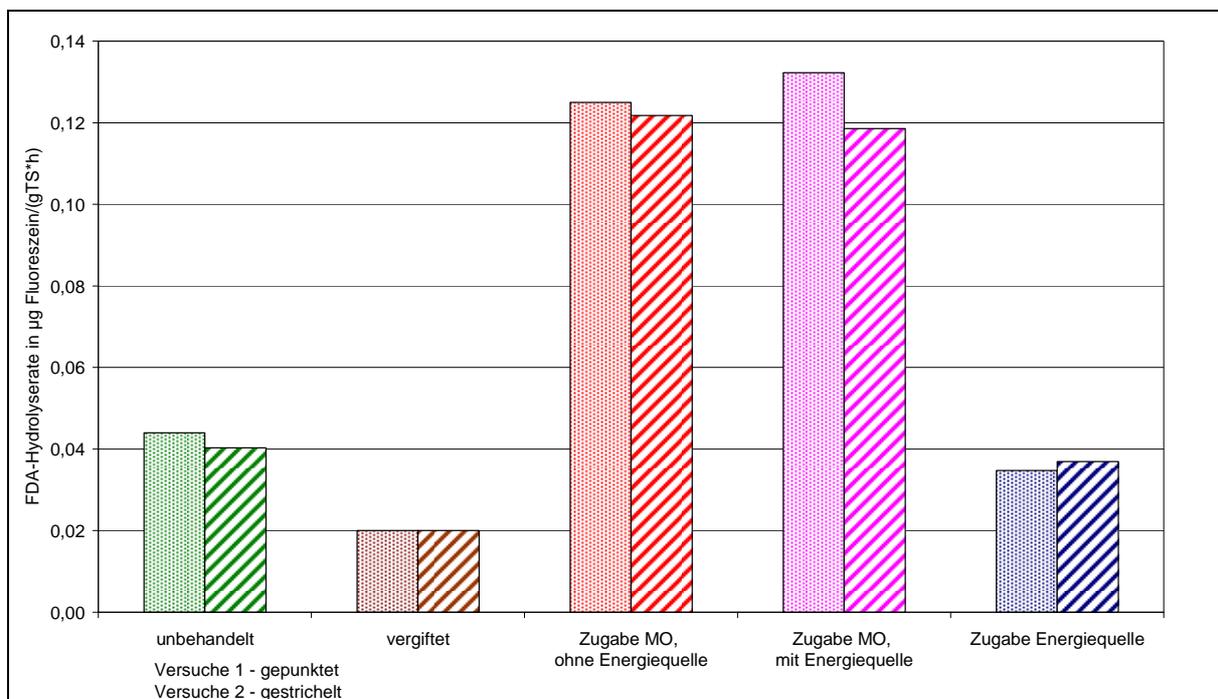


Abbildung 17: Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen für das Haldenmaterial des Standortes A

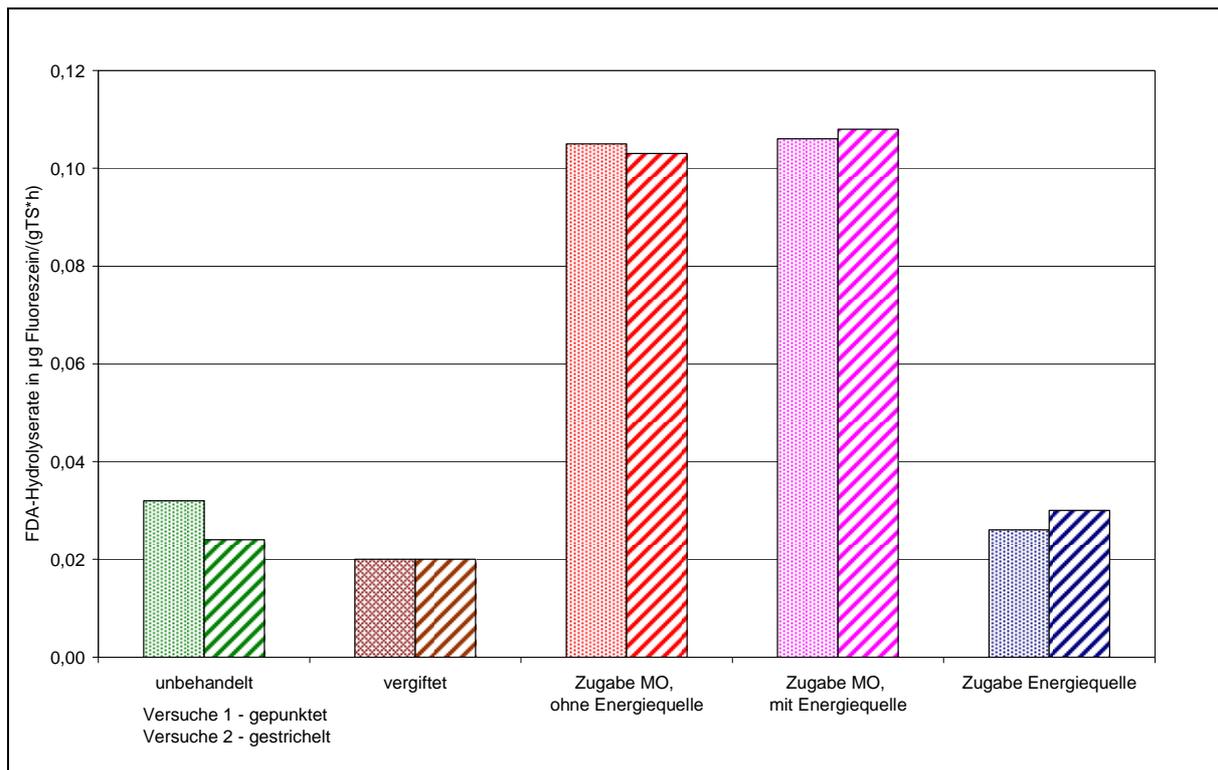


Abbildung 18: Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen für das Haldenmaterial des Standortes B

Der prozentuale Unterschied in der ermittelten mikrobiellen Enzymaktivität zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material liegt für Standort A bei ca. 50 % und für Standort B bei ca. 30 %.

Insgesamt ist die die Bestimmung der Enzymaktivität eine Methode mit geringem Zeitaufwand und kann auch ohne mikrobiologisches Spezialwissen und in gut ausgestatteten chemischen Laboratorien bei Vorhandensein von Photometern ausgeführt werden.

#### 5.2.4 Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Mikrokolorimetrie nach [SCHI 1995, WEN 1994]

Für die vorzustellende kalorimetrische Messmethode wurde ein Wärmeflusskalorimeter, der Thermal Activity Monitor 2277 (TAM) der Firma Thermometric, Schweden, eingesetzt. Die Abbildung 19 zeigt das TAM in einer Schnittdarstellung und das Messprinzip mit Zwillingsanordnung (Abbildung 20).

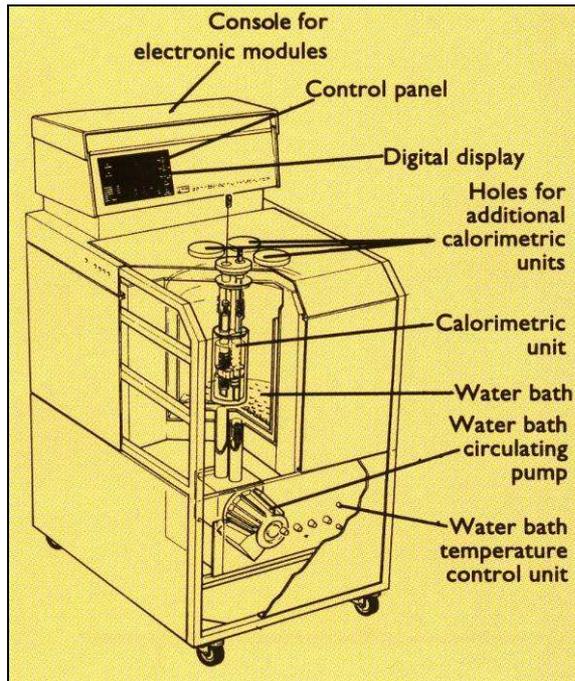


Abbildung 19: Schnittdarstellung TAM (Quelle Thermometric)

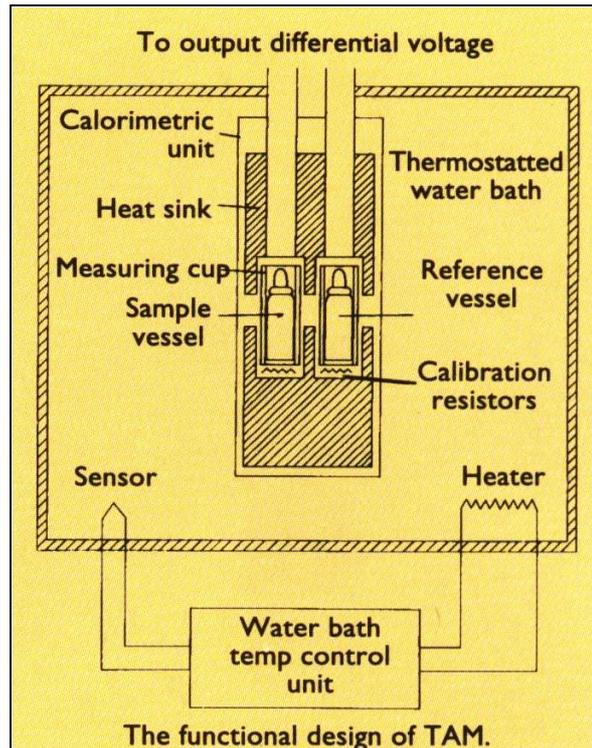


Abbildung 20: Messprinzip mit Zwillingsanordnung im TAM (Quelle Thermometric)

Der Wärmefluss (thermische Leistung) erfolgt über die Thermosäulen. Die quantitative Bestimmung der ausgetauschten Leistung  $P(t)$  ist über die in den Thermosäulen generierte Spannung  $U(t)$  gegeben. Die ausgetauschte Wärmemenge  $\Delta Q$  kann aus dem Integral des Spannungs-Zeit-Signals entsprechend Gleichung 29 ermittelt werden.

Gleichung 29

$$\Delta Q = \int P \, d(t) = K \int U \, d(t)$$

Für die Messungen wurden zylindrische Edelstahllampullen mit einem Volumen von 4 ml eingesetzt (Abbildung 21). Vor jeder Befüllung wurden die Ampullen gereinigt und dampfsterilisiert. Die Befüllung erfolgte unter Einsatz einer sterilen Werkbank bzw. nach Begasung mit einer Stickstoff- Wasserstoff- Kohlendioxid- Gasmischung in der Anaerobbox. Anschließend wurden die Ampullen gasdicht verschlossen.

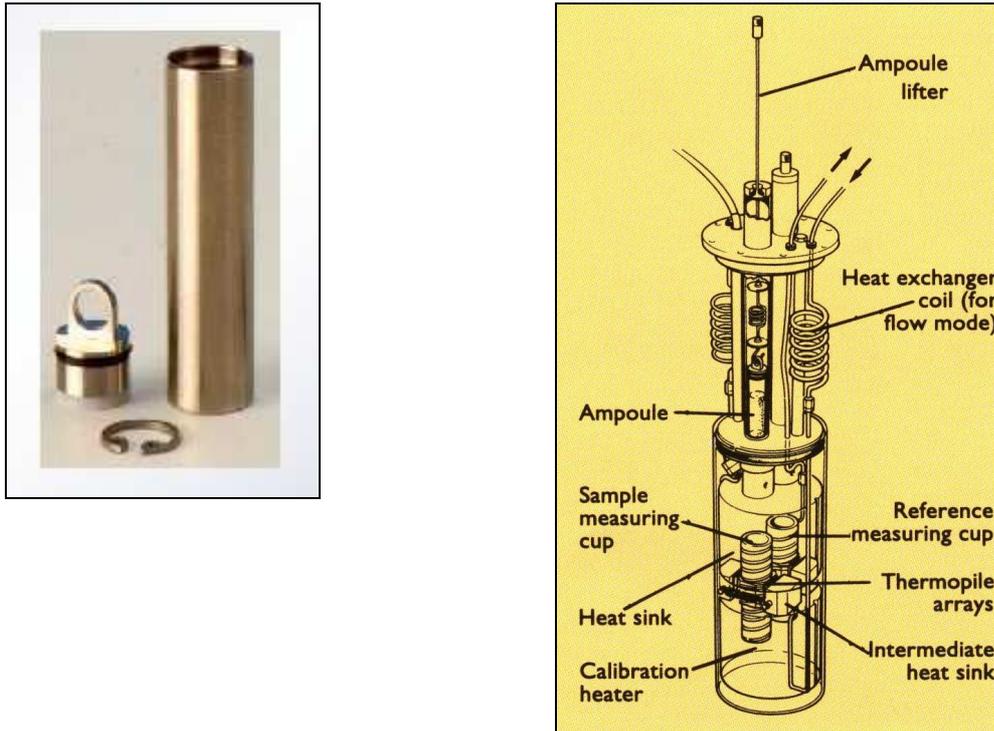


Abbildung 21: Edelstahlampulle und schematische Darstellung der Anordnung der Ampullen in der Kalorimereinheit

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit beiden Haldenmaterialien durchgeführt. Die Versuche mit dem Material des Standortes A erfolgten unter aeroben Bedingungen. Die Messungen unter Verwendung von Haldenmaterial des Standortes B wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (Versuchsplan siehe Abschnitt 5.2).

Alle Messungen wurden mit einer Einwaage von 4 g Haldenmaterial, das auf 50 % Wassergehalt eingestellt wurde, durchgeführt. Der Start der kalorimetrischen Messungen erfolgte in einem Zeitfenster von 20 – 30 min nach Befüllung der Edelstahlampulle. Die Versuchszeit wurde auf 24 Stunden festgelegt.

Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der Versuche mit Haldenmaterial des Standortes A. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die zusammengehörigen Messungen sind mit a und b bzw. durchgezogene Linie und gepunktete Linie gekennzeichnet. Es ist eine gute Reproduzierbarkeit der a und b-Messungen zu verzeichnen. Eine Ausnahme stellen hierbei die Versuche 4 dar. Aus diesem Grund erfolgten unter identischen Bedingungen auch drei Messungen (4a-4c). Zu beachten ist dabei, dass diese Messungen mit einem zeitlichen Abstand von jeweils etwa einer Woche (4a 22.02., 4b 29.02., 4c 04.03.08) durchgeführt wurden und deshalb eine Alterung des Haldenmaterials nicht ausgeschlossen werden kann, obwohl eine Lagerung in Dunkelheit durchgeführt wurde. Allerdings ist die Probe aufgrund

ihres Wassergehaltes während der Lagerung weiterhin mikrobiologisch aktiv. Diese Alterung während der Lagerung im Labor findet auch naturgemäß in der Halde selbst statt, so dass man immer nur eine momentane mikrobielle Aktivität bestimmen kann. Erwartungsgemäß zeigt das vergiftete Haldenmaterial die geringste thermische Leistung. Vergleicht man die Versuche 1 (ohne Eisenlösung) und 5 (mit Eisenlösung) findet man auch hier die erwartete höhere Aktivität (höhere thermische Leistung) bei Versuch 5. Die Unterschiede in den thermischen Leistungen der Versuche 1 (unbehandeltes Probenmaterial) und 3 (Zusatz von Acidithiobacilli) sind gering. Hier hätte man eine höhere Aktivität bei den Versuchen 3 vermuten können.

Versuche 1 - 5

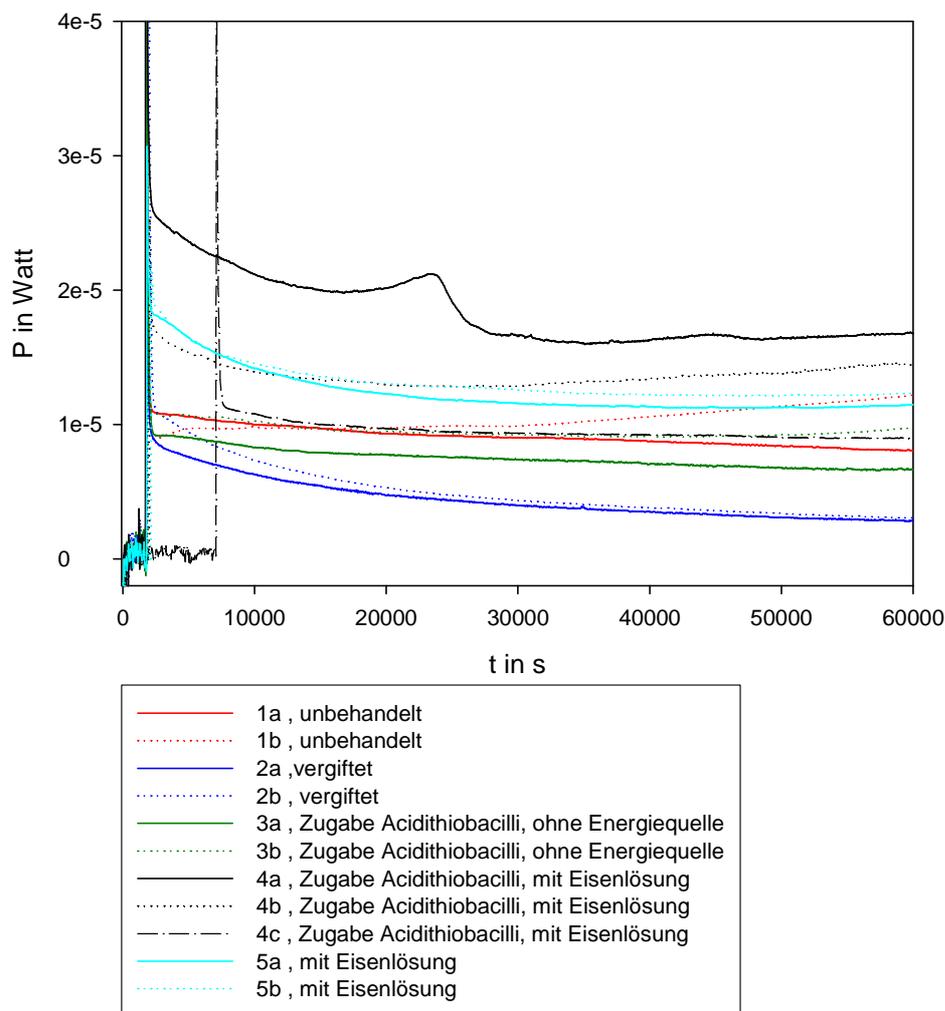


Abbildung 22: Ergebnisse kalorimetrischer Messungen für das Haldenmaterial des Standortes A

Der starke exotherme Peak zu Beginn der Messung ist auf das Einführen der Ampulle in die Kalorimereinheit zurückzuführen. Bei der Messung 4c lag eine zeitliche Verzögerung vor. Hier können die Werte erst nach 2 Stunden (entspricht 7200s) zur Bewertung herangezogen werden.

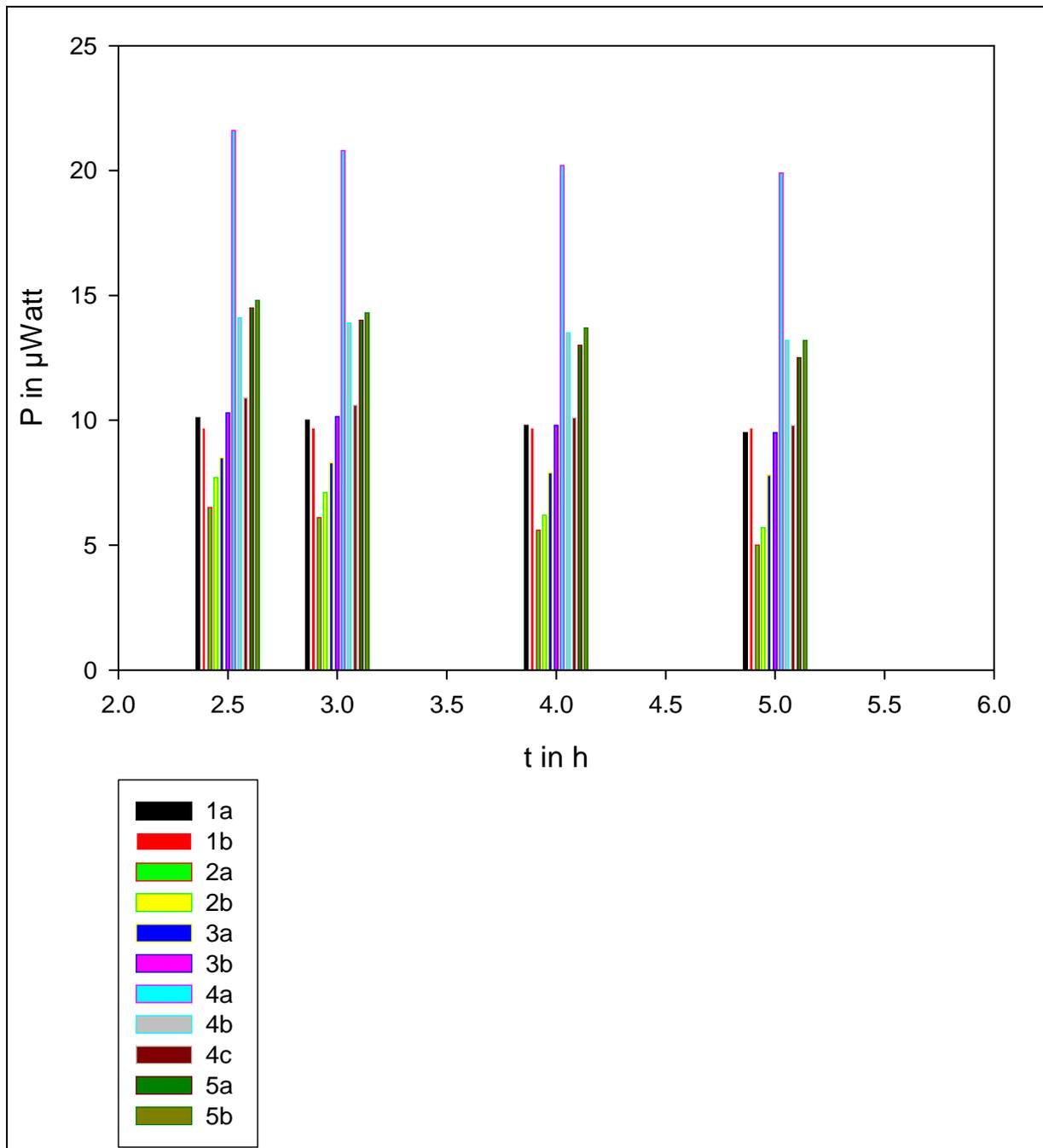


Abbildung 23: Thermische Leistung zu definierten Zeiten, Haldenmaterial des Standortes A\*

\* Die Balkengrafik wurde aus den Messkurven errechnet. Dafür wurde die Wärmeleistung bei t= 2,5; 3,0; 4,0 und 5,0 Stunden ausgewertet. Durch zusätzliche Umrechnungen für t= 3,5 und 4,5 Stunden können keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden.

In der Abbildung 23 ist ein Balkendiagramm mit den thermischen Leistungen der einzelnen Versuche bei definierten Zeiten abgebildet. Diese Darstellung bestätigt die gute Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen, insbesondere dann, wenn die Wiederholungsversuche zeitnah durchgeführt werden. Des Weiteren ist die hohe Differenzierung in den thermischen Leistungen ersichtlich.

Der prozentuale Unterschied in der thermischen Leistung zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material liegt bei ca. 70 %.

Die Abbildung 24 zeigt den zeitlichen Verlauf der anaeroben Versuchsreihen. Die erreichten thermischen Leistungen sind bedeutend geringer. In den Messkurven sind auf Grund der geringen thermischen Leistung keine Unterschiede zu interpretieren (Leistungsauflösung bei  $\pm 1\mu\text{W}$ ).

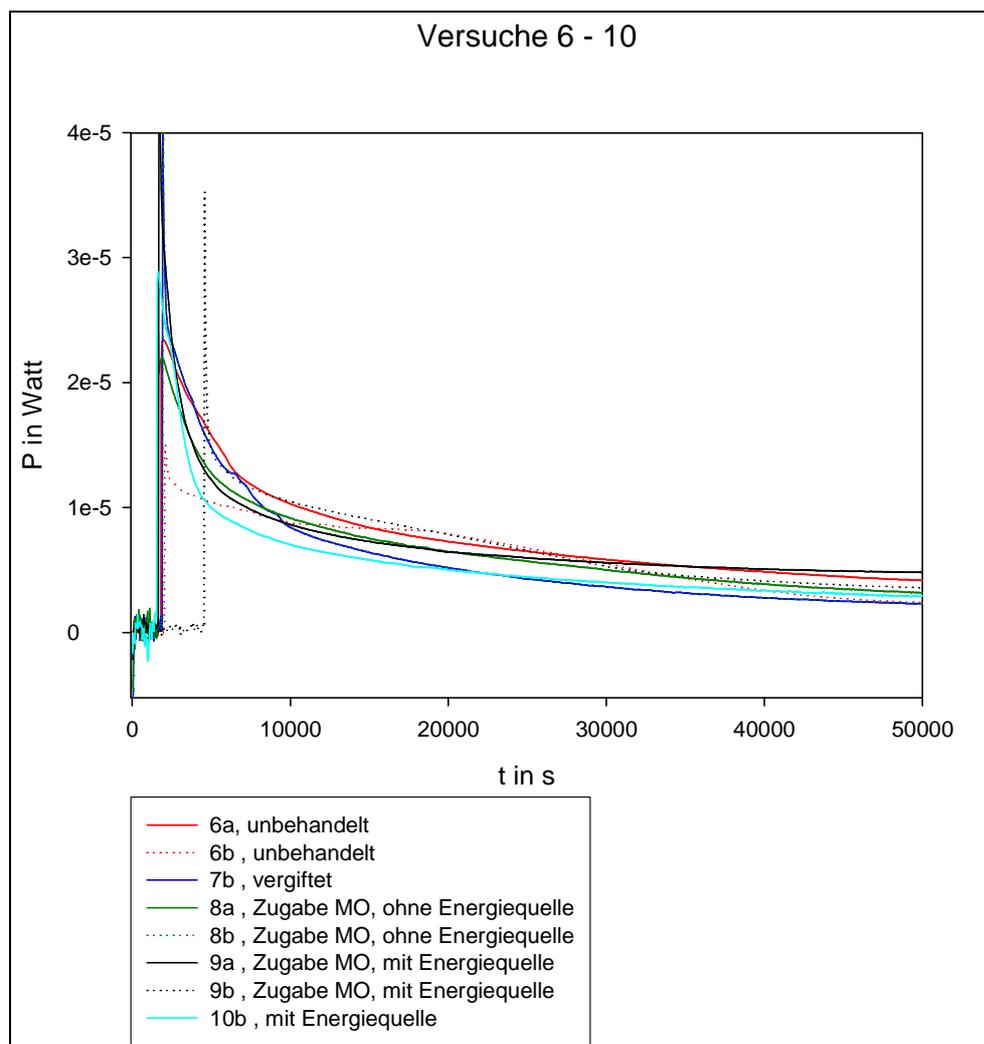


Abbildung 24: Ergebnisse kalorimetrischer Messungen für das Haldenmaterial des Standortes B

Der prozentuale Unterschied in der thermischen zwischen den Versuchen mit vergiftetem und unbehandeltem (natürlich vorliegendem) Material liegt bei ca. 10 %.

Besonders eindrucksvoll ist der Unterschied der mikrobiellen Aktivität der beiden Messreihen in Abbildung 25 zu sehen. Hier wurden Haldenmaterial 1 und 2 (unbehandelt) miteinander verglichen. Der Unterschied im zeitlichen Verlauf ist sehr markant. Die aerobe Messreihe zeigt ein sehr schnelles Einschwingen der thermischen Leistung auf ein höheres Niveau als die anaerobe Messung.

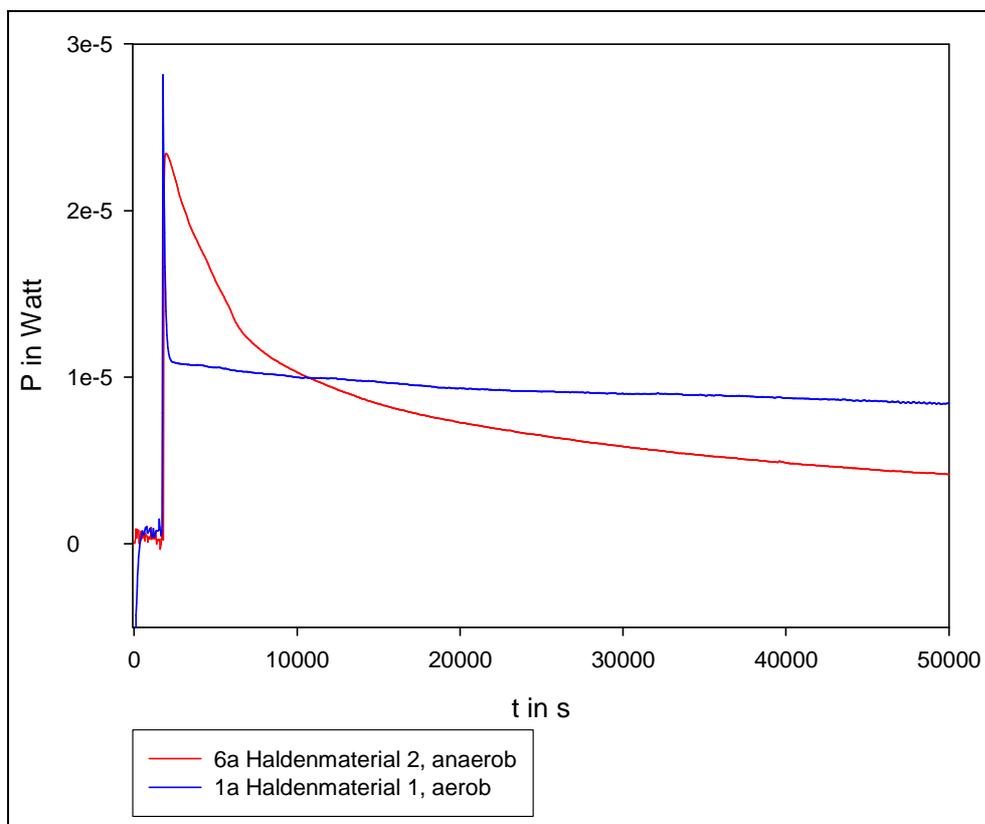


Abbildung 25: Vergleich von kalorimetrischen Messungen der Haldenmaterialien Standorte A und B

Zusammenfassend kann zu den Ergebnissen der beiden Versuchsreihen ausgeführt werden, dass mit der gewählten kalorimetrischen Messmethode nach relativ kurzer Messzeit von 3 - 4 Stunden die mikrobielle Aktivität unter aeroben Bedingungen gut erfasst werden kann. Es ist keine aufwendige Vorbehandlung der Proben erforderlich. Durch gezielte Wahl der Energiequelle kann die thermische Leistung erhöht und damit die Empfindlichkeit der Messung verbessert werden. Für anaerobe Bedingungen ist diese Methode in der gegenwärtigen Form zur Bewertung der mikrobiellen Aktivität ungeeignet. Durch die Weiterentwicklung der

kalorimetrischen Technik, beispielsweise die Entwicklung des TAM 48 für einen hohen Probandendurchsatz, sind 48 parallele Messungen mit hoher thermischer Empfindlichkeit durchführbar [LEM 2002].

### **5.3 Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen**

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen der Untersuchungsmethoden Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokalorimetrie vergleichend dargestellt und hinsichtlich einer Eignung als Screeningmethode bewertet werden. Der Vergleich erfolgt dabei jeweils für die 5 verschiedenen Präparationsformen:

Für die Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich der Relevanz von mikrobiologischen Prozessen sind dabei die ersten drei von besonderem Interesse, weil:

- Der Vergleich von „Unbehandelt“ mit „Vergiftet“ verdeutlicht, ob mikrobiologische Prozesse für das jeweilige Material überhaupt eine signifikante Rolle für die Stoffumsätze spielen. Wenn ein deutlicher Unterschied zwischen „Unbehandelt“ und „Vergiftet“ besteht, dann bedeutet dies, dass die Mikroorganismen im Ausgangsmaterial aktiv sind und damit einen Beitrag zu den Stoffumsätzen liefern.
- Der Vergleich „Unbehandelt“ mit „Zugabe von MO“ zeigt, ob bei der Zugabe von für das Material geeigneten Mikroorganismen die Aktivität signifikant zunimmt. Daraus kann abgeleitet werden, ob sich die mikrobiologischen Prozesse bei höheren Mikroorganismenkonzentrationen weiter verstärken können. Dabei werden aber Kenntnisse des Ausgangsmaterials und der für das Material geeigneten Mikroorganismenpopulation vorausgesetzt.

Bei der Bewertung der Ergebnisse der durchgeführten Messreihen ist zu berücksichtigen, dass die dargestellten Ergebnisse der drei Untersuchungsmethoden jeweils linear zur mikrobiologischen Aktivität sind. Dadurch ist es möglich, jeweils den Messwert der unbehandelten Probe (also des Ausgangsmaterials) als Bezugsgröße anzusetzen und aus der Relation der anders präparierten Proben direkt auf eine Abnahme oder Zunahme der mikrobiologischen Aktivität zu schließen.

#### **5.3.1 Material A**

In der nachfolgenden Tabelle 4 wurden Ergebnisse zum Ende der jeweiligen Messung dargestellt. Im Sinne eines Vergleiches bzw. einer Normierung wird das Ergebnis der jeweiligen

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

---

Messung zum Messwert für die unbehandelte Probe ins Verhältnis gesetzt. Ist der resultierende Wert deutlich kleiner 1, so ist die mikrobiologische Aktivität entsprechend geringer als in der unbehandelten Probe. Ist der Wert größer 1, so hat die mikrobiologische Aktivität zugenommen.

Tabelle 4: Vergleich von Ergebnissen der durchgeführten Screeninguntersuchungen und Darstellung der Relation der Ergebnisse zur unbehandelten Probe für das Material A (Ergebnisse aus 2 Messungen)

	Unbehandelt	Vergiftet	Zugabe von MO	Zugabe von MO u. Energiequelle	Zugabe Energiequelle
Sauerstoffverbrauchsrate [mg O <sub>2</sub> / g TS · d]	0,6 ± <0,1	0,3 ± <0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,05	1,2 ± <0,1
Sauerstoffverbrauchsrate Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1,8</b>	<b>1,9</b>
Enzymaktivität in µg Fluoreszein / g TS · d	0,0018 ± 0,0002	0,0008 ± <0,0001	0,0051 ± 0,0001	0,0052 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0001
Enzymaktivität Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,4</b>	<b>2,8</b>	<b>2,9</b>	<b>0,8</b>
Thermische Leistung in µW / g TS · d	3,8 ± 0,8	1,1 ± <0,1	3,1 ± 0,6	5,0 ± 1,3	4,0 ± 0,3
Thermische Leistung Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>

Der Vergleich der Spalten „Unbehandelt“ mit „Vergiftet“ zeigt für alle Verfahren, dass die Aktivität bei den vergifteten Proben auf 30-50% abgenommen hat. Daraus resultiert, dass im Ausgangsmaterial mikrobiologische Umsetzungsprozesse vorhanden sind. Zudem ist festzustellen, dass hier alle drei Untersuchungsmethoden vergleichbare Ergebnisse liefern.

Der Vergleich der Spalten „Zugabe von Mikroorganismen“ mit „Unbehandelt“ zeigt für das Material A kein eindeutiges Bild. Während für die Bodenatmung und für die Mikrokalorimetrie nach Zugabe von Mikroorganismen in etwa analoge Ergebnisse wie für die unbehandelten Proben erzielt werden, nimmt die Enzymaktivität zu. Diese Zunahme wird durch die Untersuchungsmethode selbst hervorgerufen, weil durch die Zugabe von „frischen Mikroorganismen“ entsprechend viele Enzyme vorhanden sind. Diese „frischen Mikroorganismen“ sind allerdings noch nicht an das Material adaptiert, weshalb daraus keinerlei Aussage abgeleitet werden kann.

Zusammenfassend können somit lediglich die Ergebnisse von Bodenatmung und Mikrokalorimetrie bewertet werden. Die Zugabe der Mikroorganismen führt nicht zu einer Erhöhung der mikrobiologischen Aktivität. Da die Messzeit jeweils auf wenige Tage begrenzt war, können daraus allerdings auch keine Aussagen abgeleitet werden, ob längerfristig eine Erhö-

hung der mikrobiologischen Aktivität zu erwarten ist. Dazu sind die Untersuchungen entsprechend länger, analog zu den Spezialuntersuchungen durchzuführen.

### 5.3.2 Material B

Die Ergebnisse der drei Untersuchungsmethoden werden analog zu Material A zusammenfassend tabellarisch dargestellt (Tabelle 5). Auch hier wird wieder das Verhältnis zur unbehandelten Probe gebildet.

Tabelle 5: Vergleich von Ergebnissen der durchgeführten Screeninguntersuchungen und Darstellung der Relation der Ergebnisse zur unbehandelten Probe für das Material B (Ergebnisse aus maximal 2 Messungen)

	<b>Unbehandelt</b>	<b>Vergiftet</b>	<b>Zugabe von MO</b>	<b>Zugabe von MO u. Energiequelle</b>	<b>Zugabe Energiequelle</b>
Kohlendioxidproduktion in mmol CO <sub>2</sub> /g TS · d	0,0025 ± 0,0001	0,0006 ± <0,0001	0,0018 ± 0,0001	0,0036 ± 0,0001	0,0019 ± 0,0001
Bodenatmung Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>
Enzymaktivität in µg Fluoreszein/g TS · d	0,0012 ± 0,0003	0,0008 ± <0,0001	0,004 ± 0,0001	0,004 ± 0,0001	0,001 ± 0,0002
Enzymaktivität Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>1</b>
Thermische Leistung in µW / g TS · d	1,0 ± 0,3	0,9	0,9	1,5 ± 0,3	1,0
Mikrokalorimetrie Relation zu unbehandelt	<b>1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>1,4</b>	<b>1</b>

Der Vergleich für das Material B der Spalten „Unbehandelt“ mit „Vergiftet“ zeigt zwar für alle Verfahren, dass die Aktivität bei den vergifteten Proben abgenommen hat, jedoch nicht so eindeutig wie bei Material A. Daraus resultiert, dass im Ausgangsmaterial mikrobiologische Umsetzungsprozesse keine so entscheidende Rolle spielen wie bei Material A.

### 5.4 Schlussfolgerungen aus den durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen

Ziel der durchgeführten Messreihen war die Identifikation einer Methode, mit der zeitnah die Relevanz von mikrobiologischen Prozessen in einem Haldenkörper bewertet werden kann. Dazu wurden die Untersuchungsmethoden Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokalorimetrie geprüft. Anhand der vergleichend durchgeführten Untersuchungen können die folgenden Aussagen getroffen werden:

### **Feststellungen:**

- Die Versuchsvariationen mit Haldenmaterial (unbehandelt, vergiftet, Zugabe von Mikroorganismen, Zugabe von Mikroorganismen und Energiequelle, Zugabe von Energiequelle) zeigen, dass für weiterführende Interpretationen zur Relevanz der Mikrobiologie ein Vergleich der gemessenen mikrobiologischen Aktivitäten zwischen unbehandelten Proben und vergifteten Proben hinreichend ist. Die Zugabe von Mikroorganismen bzw. Energiequellen erbrachte keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn.
- Der Vergleich der gemessenen mikrobiologischen Aktivitäten zwischen unbehandelten Proben und vergifteten Proben zeigt für alle drei Untersuchungsmethoden vergleichbare Ergebnisse. Die mikrokolorimetrische Messmethode kann die langsam ablaufenden Prozesse mit geringen thermischen Leistungen nicht abbilden (z. B. Sulfatreduktion).
- Anhand dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass bei Material A mit hoher Wahrscheinlichkeit mikrobiologische Prozesse bei der Freisetzung von Radionukliden beteiligt sind, während dies bei Material B nicht der Fall ist. Diese Feststellung kann für die untersuchten Materialien aus der detaillierten Kenntnis des Materials bestätigt werden.
- Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bodenatmung sowie der Mikrokolorimetrie zeigen bei allen Proben jeweils in der Tendenz vergleichbare Ergebnisse (Ausnahme Abbildung sulfatreduzierender Prozesse mittels Mikrokolorimetrie).
- Die Messung der Enzymaktivität ist für Proben bei denen Mikroorganismen zugegeben wurden, nicht aussagefähig.

### **Schlussfolgerungen:**

- Für einen Nachweis mikrobiologischer Aktivität sollten jeweils mindestens unbehandelte Proben mit vergifteten Proben verglichen werden. Als „relevant“ werden mikrobiologische Prozesse eingestuft, wenn die mikrobielle Aktivität der unbehandelten Probe um mindestens 30% gegenüber der sterilisierten Probe erhöht ist. Das 30%-Kriterium ist zwar kein wissenschaftlich begründeter Wert, aber alle Versuchsergebnisse zeigen, dass ab diesem Quotient ein großer Einfluss mikrobiologischer Prozesse angenommen oder ausgeschlossen werden kann.
- Für die Untersuchung der Aktivität sind für diese beiden genannten Präparationsformen alle drei untersuchten Methoden anwendbar. Die mikrokolorimetrische Messmethode kann die langsam ablaufenden Prozesse mit geringen thermischen Leistungen nicht abbilden (z. B. Sulfatreduktion).
- Die Frage, ob die Aktivität der mikrobiologischen Prozesse weiter zunehmen kann, kann mit den dargestellten Untersuchungen nicht geprüft werden, da der Messzeitraum zu gering ist.

#### 5.4.1 Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährmedien

Für Anreicherungskulturen wurden verschiedene Nährmedien verwendet, deren Zusammensetzung in Anlage 1 aufgeführt ist. Nachfolgende Medien wurden im Sinne eines Screenings für die beiden Haldenmaterialien verwendet:

Für Haldenmaterialien mit neutralen / alkalischen Boden-pH-Werten:

- R2A-Medium zur Ermittlung der Keimzahl aerober Mikroorganismen
- SGM-Medium zur Ermittlung der Keimzahl von Hefen/Pilzen
- Schaedler-Medium zur Ermittlung der Keimzahl anaerober Mikroorganismen

Für Haldenmaterialien mit sauren Boden-pH-Werten:

- Overlay solid Medium für acidophile Mikroorganismen nach Johnson und Hallberg ([RAW 2007])

Des Weiteren wurden Anreicherungskulturen mit den nachfolgend aufgeführten Medien erlangt, die der Charakterisierung von speziellen Gattungen bzw. Arten dienen:

#### Abbildung vorwiegend oxidativer Prozesse:

*Autotrophe Mikroorganismen:*

- Modifiziertes 9K-Medium - Ermittlung der Keimzahlen eisen(II)- und schwefeloxidierender Mikroorganismen
- DSMZ 832-Medium<sup>1</sup> - Ermittlung der Keimzahlen von Thiobacillus denitrificans (nitratreduzierende schwefeloxidierende Mikroorganismen)

*Heterotrophe Mikroorganismen:*

- DSMZ 756-Medium - Ermittlung der Keimzahl von Nitrobacter (nitritoxidierende Mikroorganismen)

#### Anreicherungsmedien für Mikroorganismen für vorwiegend reduzierende Prozesse:

*Heterotrophe Mikroorganismen:*

- Sulfolobus, DSMZ 88-Medium - Ermittlung der Keimzahl acidophiler sulfatreduzierender Mikroorganismen
- Modifiziertes Postgate`s-Medium - Ermittlung der Keimzahl sulfatreduzierender Mikroorganismen
- DSMZ 579-Medium - Ermittlung der Keimzahlen von Geobacter (eisen(III)reduzierende Mikroorganismen)

---

<sup>1</sup> DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

- DSMZ 803-Medium - Ermittlung der Keimzahlen der Sphaerotilus-Leptothrix-Gruppe (eisen(III)reduzierende Mikroorganismen)
- DSMZ 141-Medium - Ermittlung der Keimzahl methanogener Mikroorganismen
- Modifiziertes DSMZ 1-Medium - Ermittlung der Keimzahl von denitrifizierenden Mikroorganismen

Eine Zählung der Zellzahlen im mikroskopischen Bild des wässrigen Eluates der Haldenmaterialien im Verhältnis Fest:Flüssig von 1:10 erbrachte folgende Ergebnisse:

- Haldenmaterial Standort A: 1,95E+08 kbE/g TS<sup>2</sup>
- Haldenmaterial Standort A: 1,75E+08 kbE/g TS.

Wie in 5.4.1 beschrieben, wurden zunächst Kultivierungsmedien getestet, um für saure bzw. alkalische pH-Wert-Bedingungen die vorhandenen Mikroorganismenpopulation zu ermitteln. Mit diesen Versuchen können bei der Orientierungsuntersuchung in Hinblick auf einen langfristigen Austrag von Radionukliden Erkenntnisse über die in Haldenmaterialien aktiven Mikroorganismengruppen erlangt werden.

Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Versuche mit den genannten Screening-Medien zusammen.

Tabelle 6: Ergebnisse der Versuche mit Screening-Medien

	<b>R2A</b>	<b>SGM</b>	<b>Schaedler</b>	<b>Overlay solid Medium</b>
	<b>aerobe Keimzahl</b>	<b>Hefen/ Pilze</b>	<b>anaerobe Keimzahl</b>	<b>acidophile Mikroorganismen</b>
Haldenmaterial Standort A, saurer pH-Wert	5,80E+02	4,40E+02	4,40E+02	2,0E+02
Haldenmaterial Standort B, alkalischer pH-Wert	1,25E+05	1,18E+03	2,08E+03	0
pH-Wert des Mediums	7,2	5,4	7,4	2,5

Die mit den weiteren Nährmedien erlangten Anreicherungen spezieller Gruppen bzw. Arten sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

---

<sup>2</sup> kbE/g TS – koloniebildende Einheiten pro Gramm Trockensubstanz

Tabelle 7: Ergebnisse der Versuche mit Spezial-Medien

	<b>9K (1/2 Eisen)</b>	<b>DSMZ 832</b>	<b>DSMZ 756</b>	<b>Sulfolobus Medi- um, DSMZ 88</b>
	<b>acidophile red. Eisen- und Schwefelverbin- dungen Oxidierer</b>	<b>Thiobacillus denitrificans</b>	<b>Nitrobacter</b>	<b>saure SRB</b>
Haldenmaterial Standort A, saurer pH-Wert	2,30E+02	0	2,30E+03	0
Haldenmaterial Standort B, alkalischer pH-Wert	0	5,65E+05	2,30E+06	0
pH-Wert des Mediums	2,4	6,8-7,0	7,4 - 7,6	2,0

	<b>Mod. Postgate`s</b>	<b>DSMZ 579</b>	<b>DSMZ 803</b>	<b>DSMZ 141</b>	<b>DSMZ 1</b>
	<b>Sulfatreduzierer</b>	<b>Geobacter</b>	<b>Sphaerotilus- Leptothrix</b>	<b>Methanogene</b>	<b>Denitrifizierer</b>
Haldenmaterial Standort A, saurer pH-Wert	4,30E+02	0	0	0	0
Haldenmaterial Standort B, alkalischer pH-Wert	4,30E+03	0	6,39E+05	0	9,00E+01
pH-Wert des Mediums	7,5	6,7-7	7,1	7	7,1

Die Ergebnisse der Anreicherungsversuche zeigen, dass im Haldenmaterial des Standortes B Mikroorganismen aktiv sind, die auch in neutralen / alkalischen Screening-Nährmedien angereichert werden können. Umgekehrt sind im sauren Overlay solid Medium zahlreiche acidophile Mikroorganismen im Haldenmaterial A vorhanden.

Die Anreicherungen in den Spezialnährkulturen unterstreichen die Dominanz bestimmter Arten unter den vorgegebenen pH-Bedingungen. Beispielhaft sind schwefel- und eisenoxidierende Mikroorganismen im sauren pH-Bereich und schwefel- und nitratreduzierende Mikroorganismen im alkalischen Bereich zu nennen.

Es kann aber auch festgestellt werden, dass einige Mikroorganismen unter variablen Umgebungsbedingungen existieren können. Genannt seien hier die sulfatreduzierenden und die nitritoxidierenden Mikroorganismen. Das unterstreicht die Aussagen, die bereits in [BMU 2005] getroffen wurden, dass sich Biozönosen aufgrund gegenseitig bedingender Wechselwirkungen, z. B. bei der Lieferung von Energie, Nährstoffen etc. einstellen können.

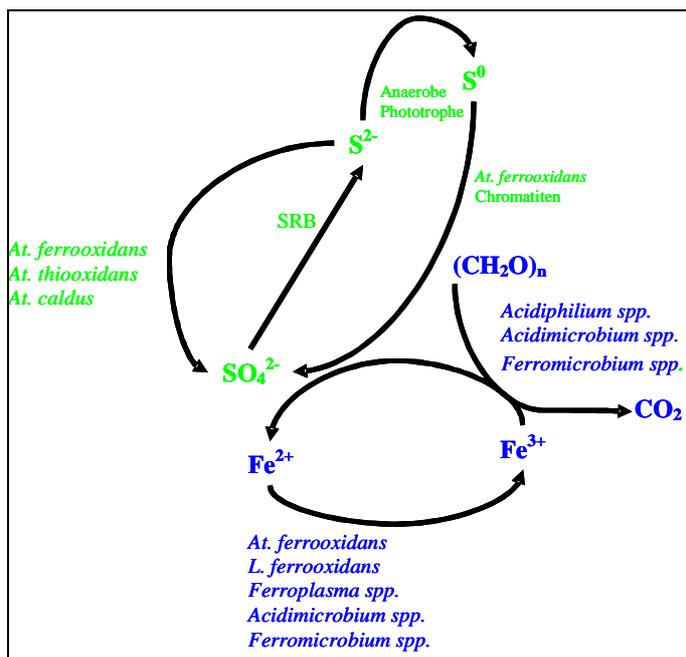


Abbildung 26: Eisen- und Schwefelzyklus

In Haldenkörpern findet eine Reihe von biogeochemischen Reaktionen statt, die durch biogeochemische Zyklen miteinander verknüpft sind. So kann ein Produkt einer Reaktion den Startpunkt für eine weitere Reaktion darstellen oder im Ergebnis einer Reaktion werden die physikalisch-chemischen Bedingungen so verändert, dass eine weitere Reaktion stattfinden kann. Im folgenden Schema - Eisen- und Schwefelkreislauf (Abbildung 26) - wurden die verschiedenen und wesentlichsten Reaktionen und die sie katalysierenden Mikroorganismen ohne Berücksichtigung sekundärer chemischer Prozesse dargestellt.

Im unteren Teil der Abbildung ist der Eisenkreislauf (blau) und im oberen Teil der Schwefelkreislauf (grün) skizziert.

Die Ergebnisse der Anreicherung von Mikroorganismen aus den beiden Haldenmaterialien sind in der Abbildung 27 graphisch dargestellt. Aus der Anwesenheit und Menge bestimmter Mikroorganismen kann auf die zu erwartenden mikrobiologischen Prozesse geschlossen werden, die zu einer Radionuklidfreisetzung führen und für weiterführende Sanierungsentscheidungen (Wie entwickelt sich eine Halde unter bestimmten Umgebungsbedingungen?) von Bedeutung sein können. Für das saure Wasser sind das Oxidationsprozesse, für das alkalische Wasser vorwiegend reduzierende, aber auch oxidierende Prozesse bei neutralen bzw. alkalischen Bedingungen (z. B. Stickstoffkreislauf).

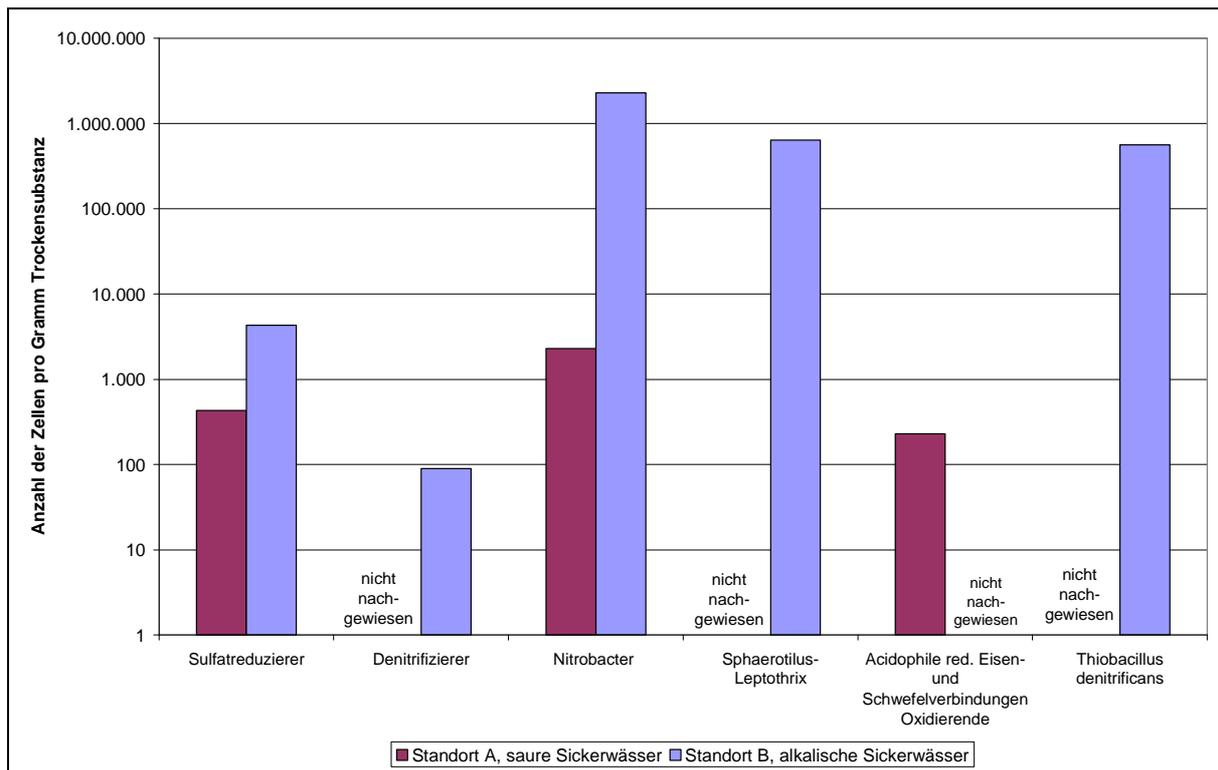


Abbildung 27: Ergebnisse der Anreicherung von Mikroorganismen auf Spezialmedien

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit der Verwendung der Übersichtsmedien für die relevanten pH-Bereiche die Existenz von denjenigen Mikroorganismen, die für die Radionuklidfreisetzung von Bedeutung sind (siehe Abschnitt 2.3), nachgewiesen werden kann. Mit den mikrobiologischen Spezialuntersuchungen wird das Ziel verfolgt dominante mikrobielle Populationen näher zu charakterisieren (Ermittlung von Zellzahlen) sowie Anreicherungskulturen für weitere Versuche zu erhalten. Zudem können diese Mikroorganismen bei der Ermittlung von Populationsparametern bei der Freisetzungsprognose (vgl. Kapitel 7) gezielt eingesetzt werden.

Insgesamt ist die Erlangung von Keimzahlen von Mikroorganismen eine Methode mit erhöhtem Zeitaufwand und kann nur bei Vorliegen mikrobiologischen Wissens und in mikrobiologisch ausgestatteten Laboratorien ausgeführt werden.

## 6 Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die Ableitung von Handlungsempfehlungen

Das grundsätzliche Ziel der vorliegenden Studie besteht darin, eine Methodik zu entwickeln, wie mikrobiell induzierte Freisetzungsprozesse im Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten, Leitfadenelement Grundwasser implementiert werden können, ohne die Konzeption des bisherigen Leitfadens wesentlich zu verändern.

Das Ziel dieser Weiterentwicklung hatte dabei insbesondere zwei Schwerpunkte:

1. Die Prüfung, welche der vorhandenen Screeningmethoden geeignet ist, mit denen schnell und effektiv bewertet werden kann, ob mikrobiologische Prozesse für die Stoffumsätze und damit auch für die Radionuklidfreisetzung relevant sind.
2. Die Entwicklung von Methoden für die Spezialuntersuchungen, mit denen die mikrobiologischen Prozesse quantitativ charakterisiert werden können, so dass eine Prognose der zukünftigen Freisetzung möglich wird.

### **6.1 Schwerpunkt 1: Entwicklung von Screeningmethoden**

Für den ersten Schwerpunkt wurden zunächst die bekannten mikrobiologischen Untersuchungsmethoden zusammengestellt und charakterisiert. Auf dieser Grundlage wurden die drei Methoden Bodenatmung, Enzymaktivität und Mikrokalorimetrie anhand von zwei ausgewählten Haldenmaterialien in einer Vielzahl von Messreihen angewendet und die Ergebnisse verglichen. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde herausgearbeitet, dass für die Feststellung, ob für ein Haldenmaterial mikrobiologische Prozesse eine Rolle bei den Stoffumsetzungen spielen, jeweils der Vergleich zwischen unbehandelten und vergifteten Proben aussagefähig ist. Zudem hat sich gezeigt, dass für diesen Vergleich die Ermittlung der Bodenatmung und der Enzymaktivität geeignet sind, um die Relevanz der mikrobiologischen Prozesse nachzuweisen. Die Methode der Mikrokalorimetrie kann langsam ablaufende Prozesse mit geringen thermischen Leistungen, wie sie für anaerobe Prozesse bekannt sind, nicht ausreichend erfassen. Daher sollte die Anwendung dieser Methode auf aerobe Prozesse beschränkt bleiben.

Die Untersuchungen waren dabei zunächst darauf gerichtet, mit welchen standardisierten mikrobiologischen Laborverfahren die mikrobielle Aktivität adäquat ermittelt werden kann. Aus den Ergebnissen zur mikrobiellen Aktivität kann die Relevanz mikrobiologischer Prozesse bewertet werden. In diesem Schritt ist ein direkter Bezug zur Radionuklidfreisetzung noch nicht möglich, da hierzu langwierige Spezialuntersuchungen notwendig sind. Es wird somit angenommen, dass eine Radionuklidfreisetzung eine direkte oder indirekte Folge der jeweils nachgewiesenen mikrobiologischen Umsetzungsprozesse ist. Umgekehrt bedeutet dies, dass die Mikrobiologie keine Rolle für die Radionuklidfreisetzung spielt, wenn die Aktivität von Mikroorganismen insgesamt sehr niedrig bzw. nicht nachweisbar ist.

Zusammenfassend wird eingeschätzt, dass mit den drei geprüften Untersuchungsmethoden der Nachweis zur Relevanz mikrobiologischer Prozesse möglich ist. Damit besteht die Möglichkeit, schnell und effektiv entsprechende Screeninguntersuchungen durchzuführen.

### **6.2 Schwerpunkt 2: Entwicklung von Methoden für Spezialuntersuchungen**

Das Ziel von Spezialuntersuchungen im Kontext des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten besteht darin, quantitative Aussagen zum zukünftigen Freisetzungsverhalten von Radionukliden abzuschätzen. Dies schließt auch die Ermittlung der dominanten mikrobiellen Populationen sowie die Herstellung von Anreicherungskulturen für weitere Versuche ein.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen ist es dazu notwendig, die jeweiligen Adaptionszeiten der Mikroorganismen an das vorhandene Material zu berücksichtigen. Diese betragen in der Regel mehrere Wochen bis Monate. Damit war es im zeitlichen Rahmen des vorliegenden Projektes nicht möglich, langwierige Säulenexperimente zur Ermittlung der Populationsparameter durchzuführen. Deshalb beruhen die Vorschläge zu den durchzuführenden Spezialuntersuchungen auf eigenen Erfahrungen, die insbesondere aus Untersuchungen zur mikrobiell induzierten Schwermetallmobilisierung im Rahmen des BMBF-Projektes Sickerwasserprognose [GEOS 2006] vorliegen. Darin wurde eine Methode als Kombination von Laboruntersuchungen und prognostischen Modellierungen entwickelt, die grundsätzlich allgemein anwendbar ist.

Im Rahmen des o. g. Projektes wurde die Methode allerdings nur auf die Schwermetallfreisetzung unter oxidierenden Verhältnissen angewendet werden. Eine Übertragung auf Freisetzungsprozesse von Radionukliden wird aus Analogieüberlegungen angenommen, ist bisher jedoch nicht durchgeführt worden. Da die beschriebene Methode allgemein gültig sein müsste, ist prinzipiell von einer Übertragbarkeit auch auf anaerobe Prozesse auszugehen. Allerdings steht ein Beweis zur Übertragbarkeit dieser Methoden auf reduzierende Verhältnisse weiterhin aus.

Die nachfolgend beschriebene Methode besteht aus Teilschritten, die zunächst Kenntnisse des Haldenmaterials, der Bindungsformen der betrachteten Elemente und Radionuklide und den daraus die ableitbaren möglichen mikrobiellen Prozesse sowie der Bestimmung des mikrobiologischen Inventars zusammenträgt. Im weiteren Abarbeitungsverlauf werden Stoff-

freisetzungen mittels laborativer Versuche festgestellt, Parameter für Prognoserechnungen erlangt und die eigentliche Prognoserechnung durchgeführt.

1. Chemische und physikalische Untersuchung des Materials und Analyse von Bindungsformen
2. Identifizierung möglicher Energielieferanten für mikrobiologische Prozesse
3. Die Auswahl der Mikroorganismenkulturen orientiert sich an den identifizierten Energiequellen und nachgewiesenen Mikroorganismen. Zusätzlich werden in diesem Schritt die Umgebungsbedingungen (oxidierend oder reduzierend, pH-Wert) festgelegt.
4. Durchführung von parallelen Schüttelkolbenversuchen über einen Zeitraum von ca. 1- 3 Monaten mit jeweils unterschiedlichen Beimpfungen. Dies schließt sowohl unbeimpfte als auch sterilisierte (vergiftete) Proben sowie mindestens zwei unterschiedliche Beimpfungsmengen an Mikroorganismen mit ein. Die Schüttelkolben werden wöchentlich chemisch analysiert. Anhand der Analysen kann eingeschätzt werden, ob sich eine mikrobiologisch induzierte Freisetzung einstellt.
5. Die Versuche werden mit einem Freisetzungmodell nachgerechnet und entsprechende Parameter der Mikroorganismenpopulation identifiziert. Das Modell muss die physikalischen und die mikrobiologischen Prozesse, welche in den Suspensionslaugungsversuchen, in den Perkolationsversuchen und auch im realen System zu erwarten sind, abbilden.
6. Durchführung von Säulenversuchen unter Berücksichtigung der ermittelten Milieubedingungen und Durchführung von möglichst wöchentlichen Beprobungen. Die Durchströmungsrate der Säulen sollte maximal im Bereich von etwa 1000 mm/a gewählt werden.
7. Nachrechnung der Säulenversuche mit den Parametern aus den Schüttelkolbenversuchen und ggf. Präzisierung der Modellparameter.
8. Durchführung von Freisetzungs- und Transportprognose innerhalb der Quelle. Dazu wird das gleiche Vorgehen gewählt wie bereits im Leitfaden dargestellt. Die anzusetzende Maximalkonzentration der Radionuklide wird aus den an der Nachrechnung der Säulenversuche gewonnen Parametern mit einem entsprechend vereinfachten Modellansatz bestimmt (Vernachlässigung der Adaptionphase der Mikroorganismen).

## **7 Methodische Grundlagen zur Durchführung der Spezialuntersuchungen**

### **7.1 Rahmenbedingungen**

Da die Durchführung und Verifizierung der methodischen Grundlagen für die Durchführung von Spezialuntersuchungen zur Bestimmung des Quellterms für die Radionuklidfreisetzung

außerhalb des Rahmens des vorliegenden Projektes lag, wird auf methodische Grundlagen zurückgegriffen, die im Rahmen des BMBF-Projektes Sickerwasserprognose [GEOS 2006] für die mikrobiologisch induzierte Freisetzung von Schwermetallen entwickelt wurden. Obwohl die dort entwickelte Methode zunächst allgemein gehalten ist, wurde sie im Rahmen des o. g. Projektes lediglich im Bereich oxidierender Bedingungen getestet und überprüft.

Trotzdem eine Übertragung auf die Freisetzung von Radionukliden nahe liegend ist, steht eine entsprechende Überprüfung und Verifizierung aus und ist dringend zu empfehlen.

Die Methode beruht allgemein auf den in Abschnitt 6.2 aufgeführten Arbeitsschritten. Allerdings erfolgt in der Darstellung keine Differenzierung der dort dargestellten Arbeitsschritte 5 bis 8. Vielmehr werden in den Abschnitten 7.6 bis 7.8 die theoretischen Grundlagen für diese Arbeitsschritte detailliert beschrieben. Die Nachrechnung der Laborversuche und die Prognose für den Haldenkörper beruhen auf den gleichen Ansätzen.

Um diese Vorgehensweise zu illustrieren, wird in Anlage 4 ein Beispiel (Freisetzung von Zink aus sulfidischer Matrix) aus dem o. g. BMBF-Projekt Sickerwasserprognose [GEOS 2006] für die Arbeitsschritte 1-8 wiedergegeben. Die nachfolgende Erläuterung ist hingegen allgemeiner gehalten.

### **7.2 Beschreibung des untersuchten Materials**

Zur Beschreibung des Haldenmaterials sind für die spätere prognostische Abschätzung nachfolgende bodenphysikalische, chemische und mineralogische Untersuchungen notwendig. Sie sollen Hinweise und eine Abschätzung über die Art und den Umfang einer möglichen mikrobiologisch induzierten Freisetzung von Radionukliden erlauben. Die bodenphysikalischen Parameter sind zur Konzeptionierung der Perkulationsversuche notwendig. Anhand der chemisch-mineralogischen Parameter können freisetzungsrelevante mikrobiologisch induzierte Reaktionen identifiziert werden, die gemeinsam mit den bodenphysikalischen Parametern für die Modellierung benötigt werden.

#### Bodenphysikalische Untersuchungen:

- Bestimmung Trockenmasse ( $m_F$ ) nach DIN 38414/S2, Trockenrohddichte ( $\rho_s$ ) nach DIN 18125-2, Kornrohddichte ( $\rho_s$ ) nach DIN ISO 11508
- Ermittlung der Korngrößenverteilung DIN 18123
- Bestimmung des hydraulischen Durchlässigkeitskoeffizient nach DARCY

Chemische Untersuchungen nach den in der Analytik geltenden DIN-Vorschriften oder Mes-  
sanleitungen

**Ermittlung der Hauptkomponenten (Gesamtgehalte):**

- Silizium, Aluminium, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, Mangan, Barium, Schwefel, Sulfat, Sulfid, Karbonat, Chlorid, Nitrat, Fluorid, Phosphat, Total Inorganic Carbon (TIC)

**Bestimmung der Spurenelemente (Gesamtgehalte):**

- Blei, Zink, Chrom, Cadmium, Cobalt, Nickel, Kupfer, Arsen, Selen, Quecksilber, Vanadium, Zinn, Uran

**Bestimmung der Aktivität der Nuklide (Gesamtgehalte)**

- U-238, U-234, Th-230, Ra-226, Pb-210, Po-210, Th-232, Ra-228, Th-228, U-235, Pa-231, Ac-227

**Ermittlung von organischen Inhaltsstoffen (Gesamtgehalte)**

- Total Organic Carbon (TOC)

**Physikochemische Eigenschaften**

- Kationenaustauschkapazität, Säurepufferungskapazität

Mineralogische Untersuchungen

- Quantitative Röntgenphasenanalyse
- Mikroskopische Untersuchung von Dünn- und Anschliffen

**7.3 Auswahl der Schadstoffe**

In diesem Arbeitsschritt erfolgt eine Auswertung, welche der potenziellen Energielieferanten aus Tabelle 1, Seite 23 in den chemischen Untersuchungen mit dem Haldenmaterial detektiert wurden und somit als Energielieferanten für mikrobiologische Prozesse zur Verfügung stehen.

Zusätzlich zu den Energielieferanten erfolgt eine Auswahl der Radionuklide, welche durch eine Umsetzung des Energielieferanten oder von Folgereaktionen (bspw. Pufferungsreaktionen) freigesetzt werden. Dieser Schritt setzt i.d.R. umfangreiches Spezialwissen voraus.

#### **7.4 Auswahl der Mikroorganismen**

Aus der Kenntnis über die mikrobielle Population im Haldenmaterial sowie der vorhandenen Energielieferanten der Haldenmatrix, können die dominanten mikrobiell induzierten Prozesse unter Einbeziehung mikrobiologischen Expertenwissens beschrieben werden. Aus diesem Prozessverständnis heraus können die an den chemischen Prozessen beteiligten Mikroorganismenkulturen identifiziert und für weiterführende Elutionsversuche ausgewählt werden. Dieser Untersuchungsschritt schließt die Festlegung der Milieubedingungen (oxidierend oder reduzierend, pH-Wert) mit ein.

#### **7.5 Versuchsdurchführung**

Für die Bestimmung der Ausgangsparameter werden zum einen Suspensionslaugungen (Schüttelversuche) und zum anderen Perkolationslaugungen (Säulenversuche) durchgeführt.

Mit der Durchführung von Suspensionsversuchen kann abgeschätzt werden, ob sich eine mikrobiologisch induzierte Freisetzung einstellt. Die Suspensionsversuche sollten mit Haldenmaterial der Korngrößenfraktion < 20 mm durchgeführt werden. Es werden Suspensionslaugungen über einen Zeitraum von 1- 3 Monaten mit jeweils unterschiedlichen Beimpfungen unter den relevanten Umgebungsbedingungen (aerob / anaerob) durchgeführt. Dies schließt sowohl unbeimpfte als auch sterilisierte (vergiftete) Proben sowie unterschiedliche Beimpfungsmengen (mindestens zwei unterschiedliche Zellzahlkonzentrationen) an Mikroorganismen mit ein. Die Suspensionlaugung erfolgt analog zur DIN 38414-S4 im Fest:Flüssig-Verhältnis von 1:10. Die chemische Analyse erfolgt wöchentlich auf die ermittelten dominanten chemischen Prozessparameter, auf die relevanten Radionuklide und auf pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit sowie Redoxpotential. Anhand der Analysen kann eingeschätzt werden, ob mikrobiologische Prozesse einen relevanten Beitrag zur Radionuklidfreisetzung beisteuern. Bei der Dimensionierung der Versuche ist zu beachten, dass für die genannten Analysen ausreichend Eluat zur Verfügung gestellt werden kann. Die unbeimpften und beimpften Eluate werden nach Versuchsende auf die dominanten Mikroorganismenkulturen untersucht. Die mitgeführten vergifteten Versuchsansätze werden auf Keimfreiheit überprüft. Hierzu werden folgende Nährmedien mit Eluat der Suspensionslaugung beimpft und beobachtet, ob sich Mikroorganismen entwickeln:

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

- R2A-Medium zur Ermittlung der Keimzahl aerober Mikroorganismen
- SGM-Medium zur Ermittlung der Keimzahl von Hefen/Pilzen
- Schaedler-Medium zur Ermittlung der Keimzahl anaerober Mikroorganismen.

Für die Durchführung der Perkolationslaugungen (Säulenversuche) wird idealerweise eine

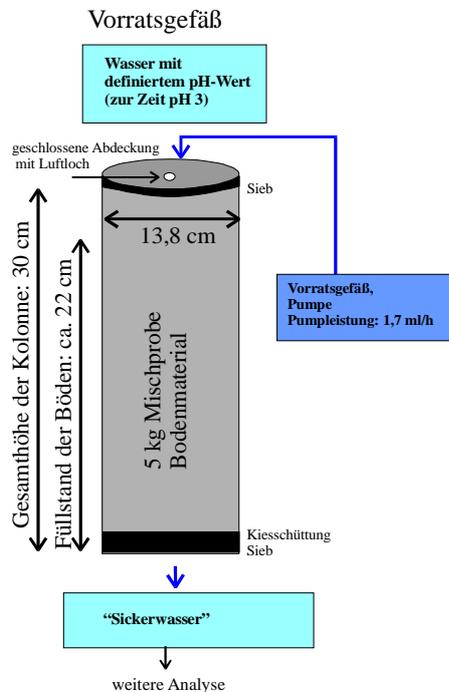


Abbildung 28: Schematischer Aufbau der 5 kg – Kolonnen



Berieselte Kolonne:  
ungesättigte Bodenzone

Geflutete Kolonne:  
gesättigte Bodenzone

Messblock mit  
Aufzeichnung von in-  
situ-Parametern

Vorratsgefäß  
Elutionsmittel  
Sickerwasser

Abbildung 29: Kolonnen mit einem Fassungsvermögen von ca. 100 kg

Die Beaufschlagung der Säulen mit dem Elutionsmittel wurde unter Annahme einer Niederschlagsmenge von 1000 mm eingestellt. Sie beträgt für die Oberfläche von  $0,015 \text{ m}^2$   $1,7 \text{ ml/h}$ .

Klimabox eingesetzt, die neben der Temperierung des Innenraumes die Einstellung der atmosphärischen Umgebungsbedingungen zulässt. Für die Versuchsdurchführung können Säulen mit einem Fassungsvermögen von ca. 5 kg eingesetzt werden.

Die Säulen sind mit abnehmbaren Abdeckungen ausgestattet, die Zuleitung des Elutionsmittels erfolgt über eine Dosierpumpe aus dem Vorratsgefäß in die Säulen. Das Sickerwasser wird in Schraubflaschen aufgefangen und wöchentlich analysiert.

Die dotierten Bodenproben werden möglichst naturnah, der natürlichen Lagerungsdichte entsprechend, in die Säulen eingebaut.

Zusätzlich zu den Säulen mit ca. 5 kg Fassungsvermögen sind im Sinne der Absicherung der Maßstabsübertragung auch größere Säulen (Fassungsvermögen ca. 100 kg mit ca. 1,00 m Länge) zu empfehlen.

Wie in den kleineren Säulen wird für die Elutionsmittelzugabe ein Niederschlag von 1.000 mm nachempfunden und als entsprechende Rate über die Kolonnen mittels Dosierpumpe beaufschlagt.

## **7.6 Theoretische Grundlagen Modellierung mikrobiologischer Stoffumsätze**

### **7.6.1 Klassifizierung der Ansätze**

Die Oxidation von sulfidischen Verbindungen erfolgt unter Beteiligung von Mikroorganismen, speziell durch den Bakterienstamm *Acidithiobacillus*. Diese Tatsache ist bereits seit ca. 100 Jahren bekannt und kommt in zahlreichen kommerziellen Laugungsprozessen zur Anwendung. Dennoch trägt die quantitative Beschreibung in der Regel phänomenologischen Charakter. Aus der Literatur [Projektarbeit GEOS 2003, RÖßNER 1996] sind unterschiedliche Ansätze bekannt, die nachfolgend kurz umrissen werden sollen. Es soll dabei unterschieden werden zwischen:

- empirischen Ansätzen
- Ansätzen ohne Wachstum der Population
- Ansätzen mit Wachstum der Population.

#### *7.6.1.1 Empirische Ansätze*

Diese Ansätze besitzen insbesondere eine historische Bedeutung, weil die im Untergrund ablaufenden Prozesse des mikrobiellen Stoffabbaus nur wenig phänomenologisch begründet waren. Nach [HAMAKER 1972] gilt:

Gleichung 30

$$-\frac{ds}{dt} = v = k * s^m$$

Dabei sind:

- $v$  - Stoffabbaurate
- $k$  - Stoffabbaukonstante
- $s$  - Stoffkonzentration bzw. Stoffgehalt
- $m$  - Ordnung der Reaktion

Spezialfälle dieses Ansatzes sind Reaktionen nullter ( $m=0$ ) und erster ( $m=1$ ) Ordnung. Bei Reaktionen nullter Ordnung ist die Stoffabbaurate konstant. Damit nimmt die Stoffkonzentration linear mit der Zeit ab. Bei Reaktionen 1. Ordnung unterliegt die Stoffkonzentration einem Exponentialgesetz.

Gleichung 31

$$s = s_0 * \exp(-k * t)$$

Eine Anpassung der Parameter  $k$  und  $s_0$  kann über Regression erfolgen.

Diese Ansätze sind im Zusammenhang mit dem Abbau organischer Stoffe durch Mikroorganismen entwickelt worden und deshalb für die Beschreibung der Auflösung sulfidischer Bodenkörper, die bei Haldenmaterialien eine bedeutende Rolle spielen, nur eingeschränkt anwendbar.

### 7.6.1.2 Modellansätze ohne Wachstum

Bereits 1913 wurde durch [MICHAELIS & MENTEN 1913] ein stärker phänomenologisch begründeter Modellansatz vorgeschlagen. Dieser lautet:

Gleichung 32

$$-\frac{ds}{dt} = v = v_{\max} * \frac{s}{K_m + s}$$

Dabei sind:

$v_{\max}$  - maximale Stoffabbaurate

$K_s$  - Halbsättigungskonstante

Es wird unterstellt, dass die Anzahl von Mikroorganismen konstant ist. Für den Stoffabbau wird nachfolgend beispielhaft eine Kurve mit zunächst willkürlichen Parametern für sämtliche Parameter dargestellt.

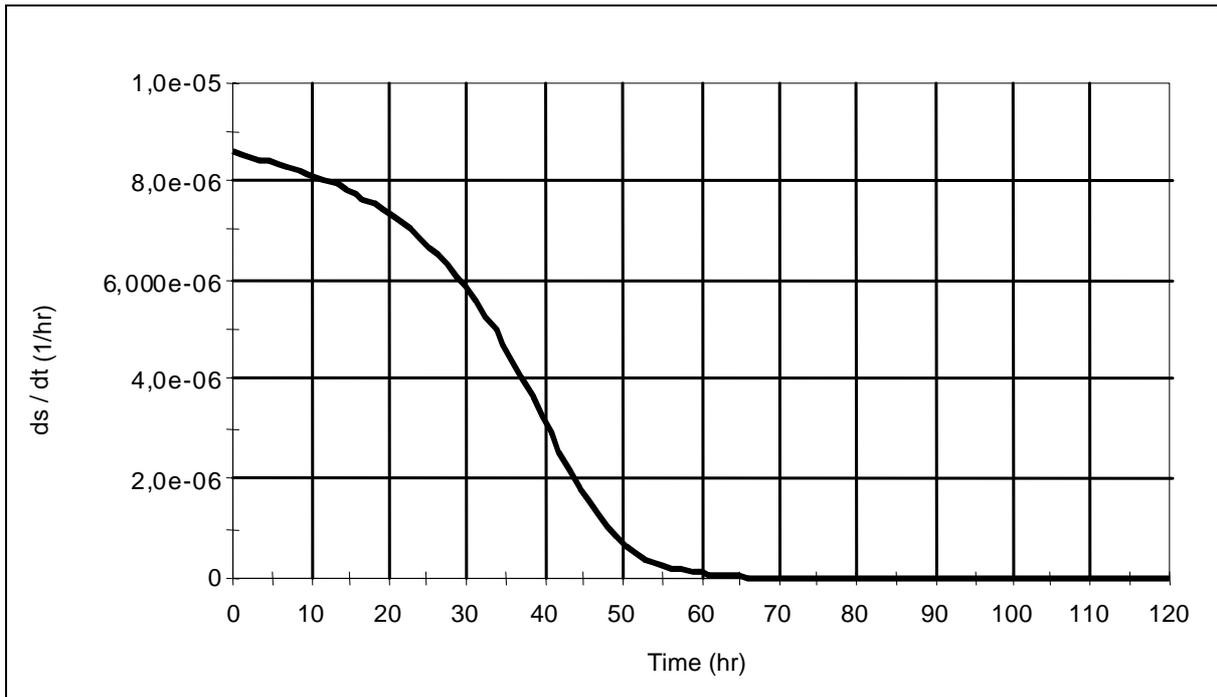


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Stoffabbaurate nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit beispielhaften Parametern

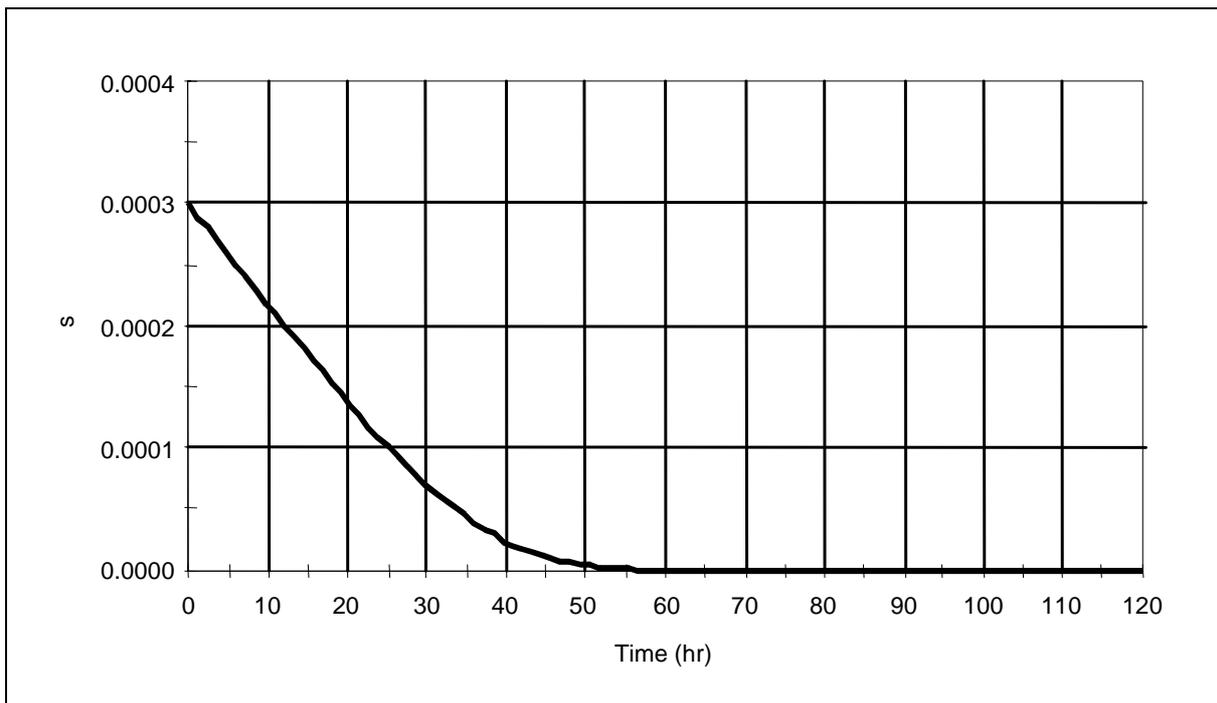


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf des Stoffgehaltes nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit beispielhaften Parametern

Es wird sowohl die Abbaurate als auch der Feststoffgehalt des Energielieferanten als Funktion der Zeit dargestellt.

### 7.6.1.3 Ansätze mit Wachstum

Hierbei wird davon ausgegangen, dass durch den Oxidationsprozess zusätzlich Biomasse produziert wird. Die Mikroorganismenpopulation wird durch ihre Dichte  $x$  beschrieben. Es wird angenommen:

Gleichung 33

$$-\frac{ds}{dt} = v = \frac{1}{Y} * \frac{dx}{dt}$$

Dabei sind:

$v$  - Stoffabbaurate

$x$  - Populationsdichte der Mikroorganismen

$s$  - Stoffkonzentration bzw. Stoffgehalt

$Y$  - Ertragskoeffizient

Das Populationswachstum wird als eine Reaktion 1. Ordnung dargestellt:

Gleichung 34

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x$$

Hierbei ist  $\mu$  die spezifische Wachstumsrate der Mikroorganismen. Diese kann in einem geschlossenen System ohne Stofftransfer in verschiedene Phasen unterteilt werden:

Phase I: lag-Phase in der sich die Mikroorganismen adaptieren

Phase II: exponentielles Wachstum entsprechend Gleichung 34

Phase III: stationäre Phase in der Wachstumsrate gleich der Absterberate ist

Phase IV: Absterberate ist größer als die Wachstumsrate

Diese Phasen sind schematisch in nachfolgender Abbildung 32 aus [RÖßNER 1996] dargestellt.

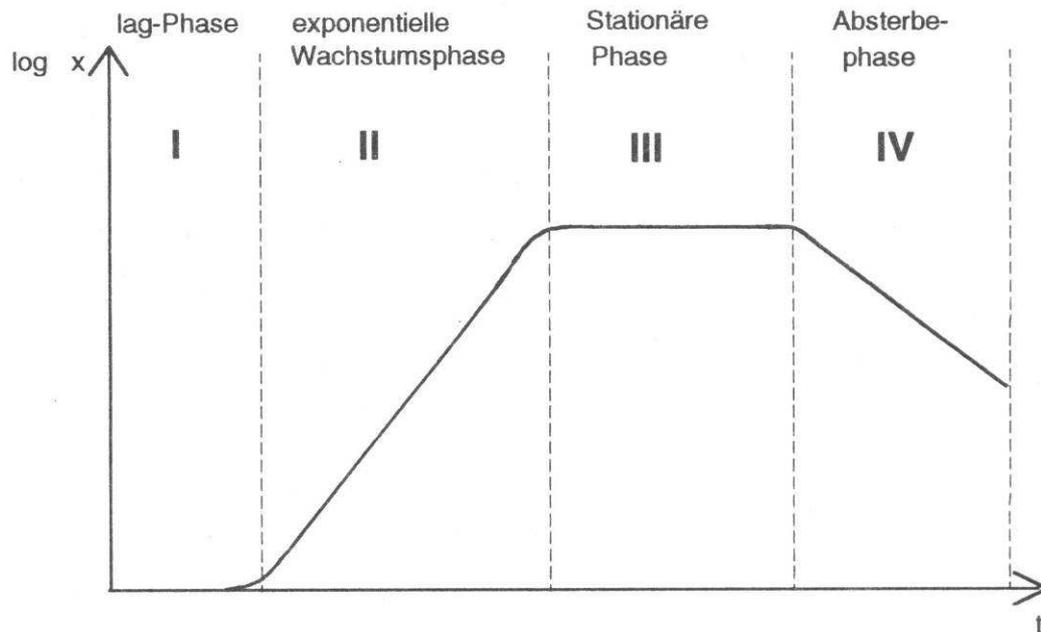


Abbildung 32: Phasen in der Populationsentwicklung von Mikroorganismen

Nach [SCHMIDT 1992] kann die spezifische Wachstumsrate als Funktion der Populationsdichte aufgefasst werden:

Gleichung 35

$$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{x}{x_{\max}} \right)$$

wobei:

$\mu_{\max}$  - maximale Stoffabbaurate

$x_{\max}$  - maximale Populationsdichte der Mikroorganismen

Dieses Modell besagt, dass die spezifische Wachstumsrate Null wird, sobald die maximale Populationsdichte der Mikroorganismen erreicht ist. Es gelingt mit diesem Modell in der Regel gut, das Populationswachstum in Batchversuchen zu beschreiben. Es liefert jedoch keinen Ansatz, das Verhalten der Populationsentwicklung aus phänomenologischer Sicht besser zu verstehen.

Ein stärker phänomenologisch begründetes Modell für die Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate ist das von [MONOD 1949]:

Gleichung 36

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}$$

wobei:

$\mu_{\max}$  - maximale Stoffabbaurate

$K_s$  - Halbsättigungskonstante

Die Ansätze, welche eine Entwicklung der Mikroorganismenpopulation unterstellen, besitzen zwei getrennt unabhängige Variablen. Dadurch ist es im Gegensatz zur Michaelis-Menten-Kinetik nicht möglich, sämtliche Parameter anhand des beobachteten Stoffabbaus über Anpassung zu ermitteln. Zur vollständigen Prozessbeschreibung wird deshalb eine unabhängige Modellgleichung benötigt. Eine solche wurde von [SIMKINS & ALEXANDER 1994] in Form einer Massenbilanzgleichung formuliert:

Gleichung 37

$$s_0 + q * x_0 = s + q * x$$

wobei:

$s_0$  - Stoffausgangskonzentration

$x_0$  - Ausgangspopulationsdichte

$q = \frac{1}{Y}$  - inverse Ertragskoeffizient (Umsetzung an Metallsulfid)

Das Produkt  $q * x_0$  entspricht der Stoffmenge, die notwendig ist, um die Ausgangspopulationsdichte  $x_0$  zu produzieren. Analog ist  $q * x$  die Stoffmenge die, notwendig ist, um die Populationsdichte  $x$  zu produzieren.

Unter Berücksichtigung der Gleichung 33 und Gleichung 34, Gleichung 36 und Gleichung 37 kann die Abhängigkeit von der Populationsdichte eliminiert werden. Im Ergebnis entsteht:

Gleichung 38

$$-\frac{ds}{dt} = \underbrace{\mu_{\max} * \frac{s}{K_s + s}}_{\text{Zunahme Biomasse}} * \underbrace{\frac{1}{Y} * (x_0 + (s_0 - s)Y)}_{\text{Substratbedarf für Biomasse gesamt}} = \mu_{\max} * s * \frac{\frac{x_0}{Y} + s_0 - s}{K_s + s}$$

Diese Gleichung bildet den Ausgangspunkt zur Anpassung von Stoffabbaukurven ohne die explizite Kenntnis des tatsächlichen Populationswachstums der Mikroorganismen.

### **7.7 Grundlagen für die Parameterbestimmung**

Neben der Vielzahl, der im Rahmen des BMBF-Projektes Sickerwasserprognose [GEOS 2006] durchgeführten Untersuchungen, können aus vorlaufenden Untersuchungen Aussagen zu Schlüsselparametern abgeleitet werden. Dies betrifft insbesondere Aussage zu maximalen Wachstumsraten der Mikroorganismen, wie sie insbesondere in den Monod-Ansatz einfließen.

So sind aus der Literatur Daten zu maximalen Wachstumsraten der Mikroorganismenpopulation in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat angegeben. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Übertragbarkeit nur eingeschränkt gegeben ist. So sind bspw. in [Projektarbeit GEOS 2003] maximale Verdopplungszeiten von *Acidithiobacillus* von 5-6 h für Eisen- und von ca. 180 h für Schwefelsubstrate angegeben. Die maximale Wachstumsrate kann aus der minimalen Verdopplungszeit entsprechend:

Gleichung 39

$$\mu_{\max} = \frac{1}{T_2} * \ln(2)$$

berechnet werden. Darin ist:

$T_2$  - minimale Verdopplungszeit

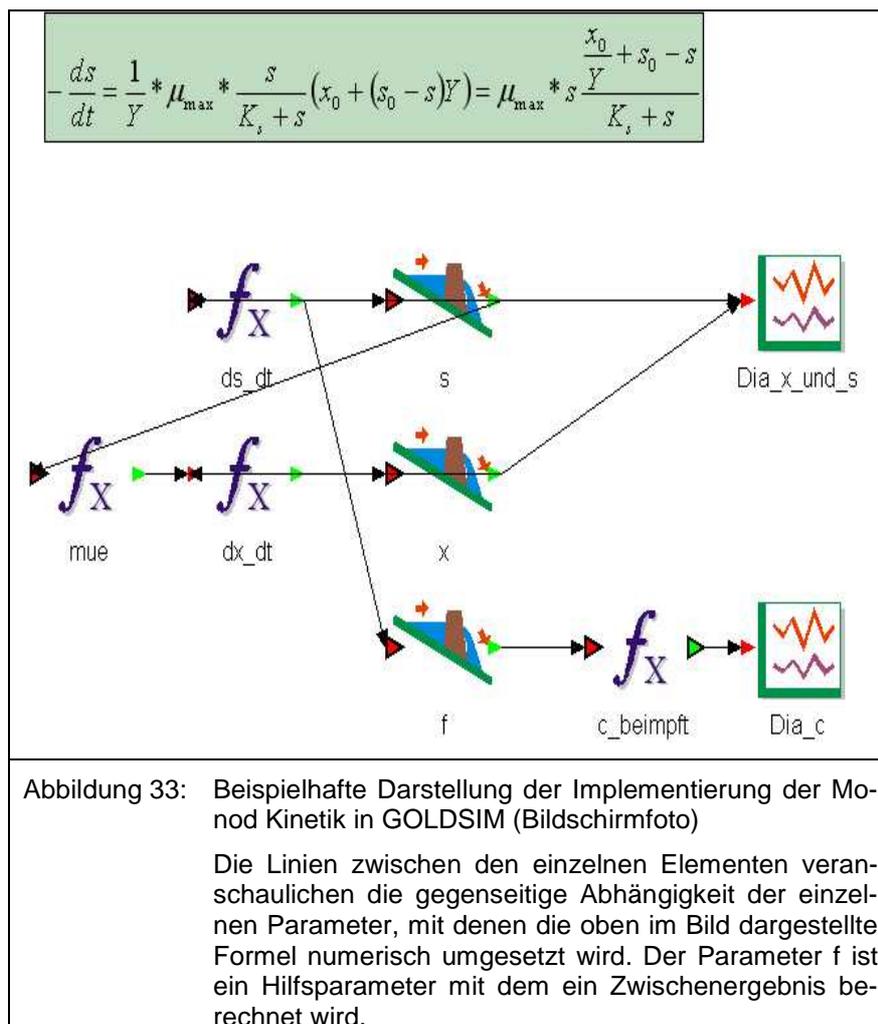
Als Ausgangspunkt können jeweils maximale Wachstumsraten in Abhängigkeit vom Energielieferanten aus der Literatur entnommen werden. Wie aus Gleichung 38 deutlich wird, ist das Zeitverhalten der Freisetzung von  $x_0$  bzw. von  $Y$  nur vom Quotienten  $\frac{x_0}{Y}$  abhängig. Damit kann auch nur dieser Quotient an den Experimenten parametrisiert werden.

Es wird davon ausgegangen, dass der Ertragskoeffizient unabhängig von der vorhandenen Populationsdichte ist. Damit kann dieser zunächst willkürlich festgelegt werden. Die Anpassung erfolgt anhand der Ausgangspopulationsdichten  $x_0$ .

Zusätzlich wird angenommen, dass die Halbsättigungskonstante  $K_s$ , sowie die maximale Stoffabbaurate  $\mu_{\max}$  nicht vom Substrat abhängen.

Damit erfolgte die Anpassung der maximalen Stoffabbaurate  $\mu_{\max}$ , der Halbsättigungskonstanten  $K_s$  sowie des Ertragskoeffizienten  $Y$  an alle Experimente (wie dargelegt ist die Wahl von  $Y$  willkürlich). Die tatsächliche Freisetzungskinetik wurde anhand der Ausgangspopulationsdichte  $x_0$  für jedes Substrat angepasst.

### 7.8 Beschreibung des Modells



Die Grundlage für die modellhafte Beschreibung bildet Gleichung 38. Diese wurde in GOLDSIM implementiert. Obwohl Gleichung 38 lediglich die Dynamik der Feststoffumsetzung beschreibt, wurde auf der Grundlage der Gleichung 33 und Gleichung 34 auch die Dynamik der Populationsdichte berechnet. Die Implementierung auf der Grundlage einzelner GOLDSIM-Elemente wird beispielhaft in nachfolgender Abbildung 33 veranschaulicht.

## **7.9 Vereinfachung des Modellansatzes für den Quellterm**

Nachdem die mikrobiologischen Parameter anhand der Nachrechnung der Laboruntersuchungen bestimmt wurden, kommt es darauf an, unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse möglichst einfache Ansätze für die Prognose zu entwickeln. Um eine Kompatibilität mit den im „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten“ dargestellten Prognoseansätzen herzustellen, sollten die Parameter dazu genutzt werden, um insbesondere die zu erwartenden Maximalkonzentration der einzelnen Radionuklide im Sickerwasser vorherzusagen.

Diese Maximalkonzentration kann dann als zu erwartende Sickerwasserkonzentration angesetzt und mit dem Ausschlusskriterium verglichen werden. Insbesondere kann diese Konzentration zusammen mit dem unterirdischen Abfluss als Randbedingung für eine Ausbreitung von Radionukliden im Grundwasser verwendet werden.

Die Umsetzungsrate für den für das Wachstum der Mikroorganismenpopulation maßgeblichen Energielieferanten wird entsprechend Gleichung 38 berechnet. Nach erfolgter Anpassung resultiert daraus eine maximale Umsetzungsrate entsprechend:

Gleichung 40

$$-\left. \frac{ds}{dt} \right|_{\max} = \mu_{\max} * \frac{s_0}{K_s + s_0} * \frac{x_0}{Y}$$

Dabei wurde angenommen, dass die maximale Abbaurate zu erwarten ist unter der Bedingung  $s = s_0$ . Diese Annahme setzt voraus, dass die Mikroorganismenpopulation an den Standort / Substratverhältnissen adaptiert sind. Ist diese Voraussetzung nicht erfüllt, so ist keine Vereinfachung der Ansätze möglich.

Die Freisetzungsrate  $a_i$  für die Radionuklide  $i$  wird aus der Stöchiometrie der Stoffgehalte bzgl. des Energielieferanten umgesetzt. Wie erläutert, ist diese Methode nicht anwendbar für solche Radionuklide, die nicht an die Freisetzung des dominanten Energielieferanten oder entsprechender Folgereaktionen (bspw. Pufferreaktionen) angekoppelt sind, d.h. mit diesem proportional freigesetzt werden. Dabei muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass diese Vorgehensweise eine Analyse der Bindungsformen der Radionuklide voraussetzt. In praktischen Fällen kann es sich beim Energielieferanten bspw. um sulfidische Bindungsformen (z.B. Pyrit) handeln.

Gleichung 41

$$\frac{da_i}{dt} = \alpha_i \frac{ds}{dt}$$

mit:

$\alpha_i$  - Stöchiometrie des Radionuklides zum Energielieferanten

## **8 Überarbeitung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus**

Untersuchungen zum Nachweis der Existenz und der möglichen Auswirkung mikrobiologischer Prozesse sollten sowohl in der geochemischen Orientierungsuntersuchung als auch der Hauptuntersuchung des Leitfadens (Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus) implementiert werden.

Ausgehend von der vorgeschlagenen Methodik der Orientierungsuntersuchung zum Sickerwasserpfad (Abbildung 34 aus [GRS 2003]) sind die beiden Fälle:

Fall 1

Sickerwasser-pH > 6 + Boden-pH > 6 + Karbonat-Pufferkapazität > 3x Säurebildungspotential

Fall 2

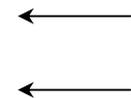
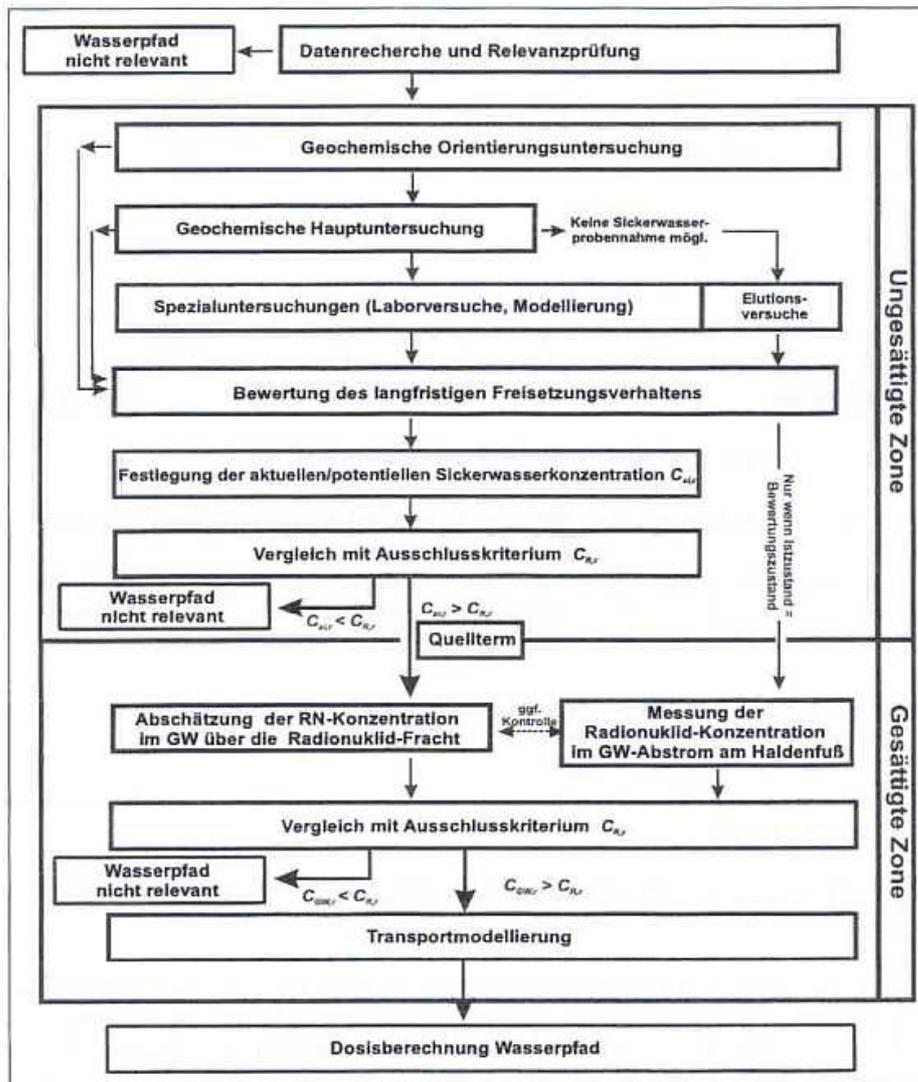
Sickerwasser-pH < 4,5 + Boden-pH < 4,5 + Karbonat-Pufferkapazität < Säurebildungspotential

genannt, bei denen keine langfristige Erhöhung eines Schadstoffaustrages zu erwarten ist.

Im Ergebnis der Studie von [BMU 2005] war aber zu sehen, dass es sowohl in den Bereichen pH-Wert <4,5 und pH-Wert >6 zu Veränderungen bzw. zu einer Erhöhung des Austrages an Radionukliden durch mikrobielle Prozesse kommen kann.

Da das mit Sicherheit nicht in jedem Fall zu erwarten ist, sollen bereits während der Orientierungsuntersuchung Erkenntnisse zur mikrobiellen Aktivität an den Haldenstandorten erlangt werden, bei denen hierdurch eine Veränderung bzw. eine Steigerung der Radionuklidfreiset-

zung zu erwarten ist (Abbildung 34). Als qualifizierte Methoden werden hierfür die Ermittlung der Atmungsaktivität (die Bestimmung der aktuellen Bodenatmung) bzw. mikrokalorimetrische Messungen vorgeschlagen<sup>3</sup>.



Einbindung mikrobiologischer Untersuchungen in die Gesamtmethodik zur Charakterisierung der radiologischen Relevanz des gesamten Grundwasserpfades von Halden

Abbildung 34: Einbindung der Orientierungsuntersuchung in die Gesamtmethodik zur Charakterisierung der radiologischen Relevanz des gesamten Grundwasserpfades von Halden [GRS 2003]

<sup>3</sup> Die mikrokalorimetrische Messmethode kann die langsam ablaufenden Prozesse mit geringen thermischen Leistungen nicht abbilden (z. B. Sulfatreduktion).

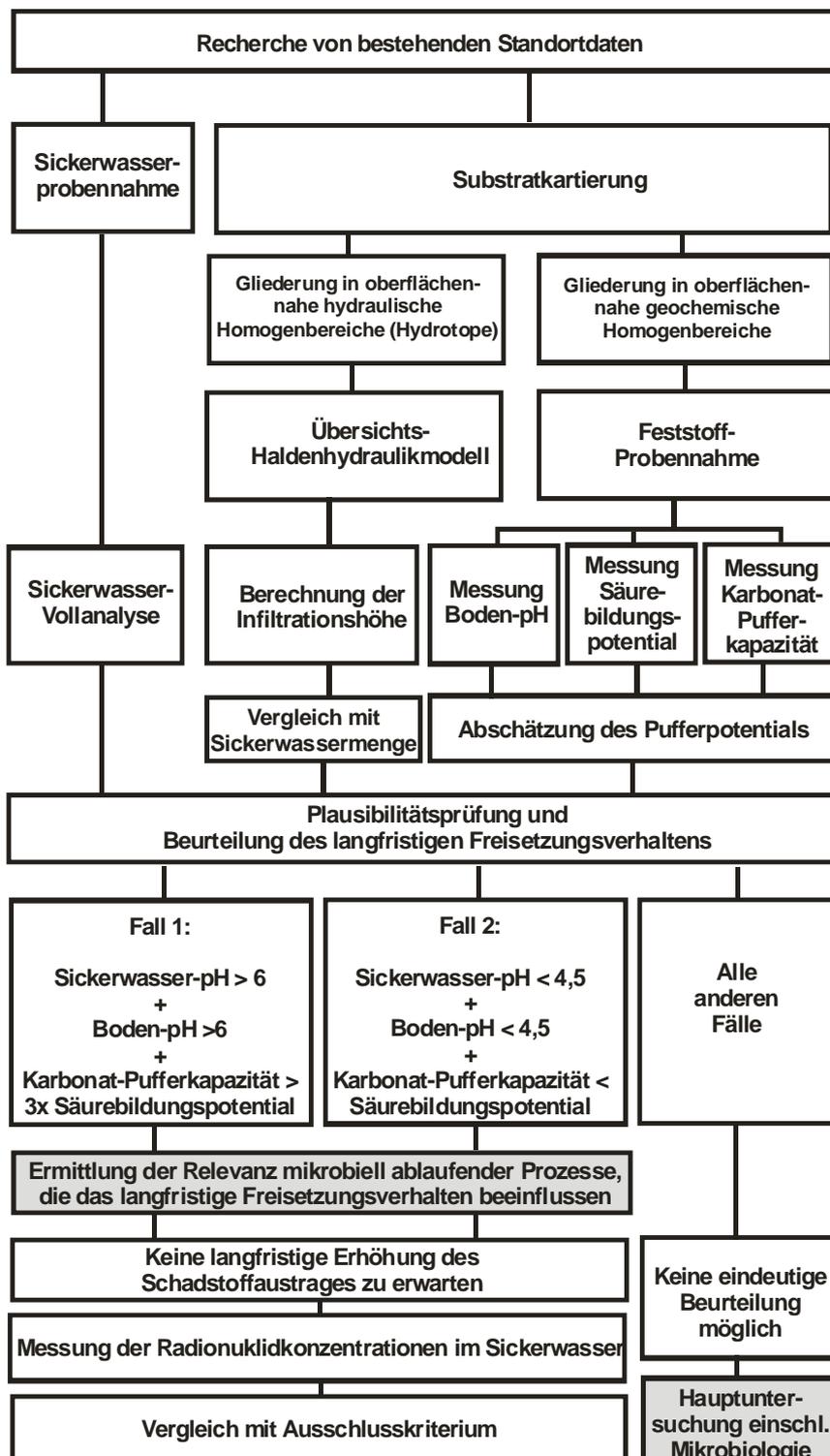


Abbildung 35: Schema zur Methodik der Orientierungsuntersuchung zum Sickerwasserpfad

Für den Fall 1, der Prozesse im neutralen / alkalischen Bereich abbilden soll, sollen die Versuche dahingehend ausgerichtet werden, z. B. nachfolgende ausgewählte Fragen zu beantworten:

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

- Kann durch mikrobielle Sulfatreduktion Radiumsulfat reduziert und somit Radium freigesetzt werden?
- Kann Uran durch freigesetztes Karbonat / Hydrogenkarbonat aus dessen Verbindungen nachgelaugt und damit auch im neutralen bis alkalischen Milieu emittiert werden?
- Welche Rolle spielen Phosphationen? Kann es bei einem Phosphatangebot zu einer Freisetzung durch Uranylphosphat kommen?
- Welche weiteren Radionuklide können in diesem pH-Bereich freigesetzt werden, z. B. Thoriumkarbonat neben Uranylkarbonat?
- Sind oxidative Prozesse zur verstärkten Freisetzung von Radionukliden durch einen mikrobiellen Stoffumsatz denkbar?

Für den Fall 2, der Prozesse im sauren Bereich abbilden soll, sollen die Versuche dahingehend ausgerichtet werden, z. B. nachfolgende ausgewählte Fragen zu beantworten:

- Ist eine U-Freisetzung von der  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration oder der Mikroorganismenkonzentration abhängig? Werden lösliche Komplexe, wie Uranylsulfate gebildet? Ist diese Bildung von der  $\text{Fe}^{3+}$ -Genese abhängig.
- Kann Uran durch andere Komplexbildner wie Huminsäuren, Fettsäuren mobilisiert werden?
- Wird Radium in Abwesenheit von Sulfat mobil?
- Welche weiteren Radionuklide können in diesem pH-Bereich freigesetzt werden?
- Ist eine Remobilisierung von Radium aus  $\text{RaSO}_4$  unter reduktiven Verhältnissen potenziell möglich?

Für den Fall 3 (alle anderen Fälle) des vorliegenden Leitfadens wird aufgrund keiner eindeutigen Beurteilung eine Hauptuntersuchung empfohlen. Diese sollte die Prüfung auf mikrobielle Prozesse bzw. die Anwesenheit von Mikroorganismen enthalten.

Eine Übersicht über geochemische Beschaffenheiten, bei denen mögliche mikrobielle Radionuklidfreisetzungs- und Fixierungsprozesse ablaufen können und die durch Versuche abgebildet werden sollten, zeigt Abbildung 36. In diese Abbildung wurden milieuanzeigende Elementspecies mit aufgenommen. Die Species in höheren Oxidationsstufen stehen für ablaufende oxidierende Prozesse, die Species in niedrigen Oxidationsstufen stehen für ablaufende reduzierende Prozesse.

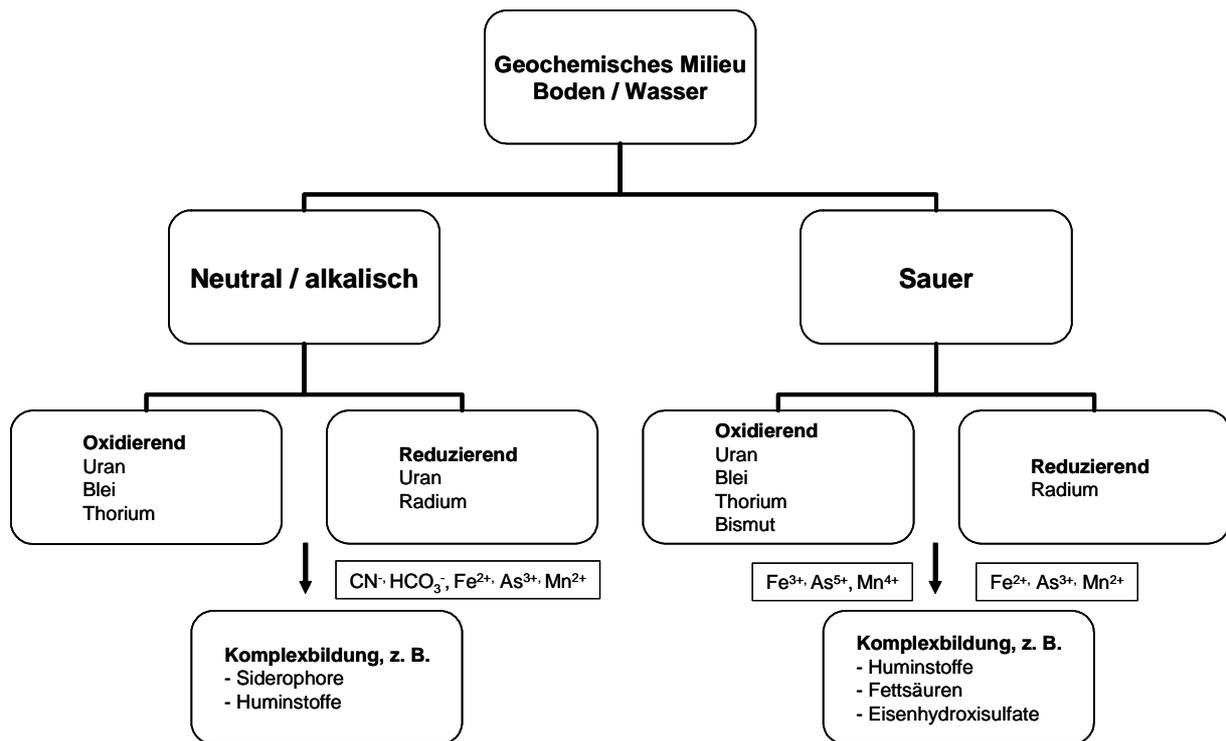


Abbildung 36: Übersicht über geochemische Milieus, unter denen mikrobielle Freisetzungs- und Fixierungsprozesse ablaufen können

Neben der Ermittlung der mikrobiellen Aktivität im Haldensubstrat bzw. Sickerwasser ist daher eine chemische Analyse von großer Bedeutung für das Prozessverständnis möglicher mikrobiologischer Umsetzungsreaktionen. Für mikrobiologische Lebensprozesse sind insbesondere die Gehalte der Komponenten (C organisch / C anorganisch, N, P, Wassergehalt), Sulfat, Sulfid, Nitrat, Eisen sowie die Kenntnis über das geochemische Milieu, z. B. Eh- und pH-Wert (oxidierend oder reduzierend) oder CSB - als Hinweis auf oxidierbare Bestandteile wichtig.

Bei positiven, auf mögliche mikrobielle Prozesse deutende oder mikrobielle Prozesse zulassende, Ergebnissen erfolgen in der Hauptuntersuchung (Abbildung 37):

- der Nachweis von aeroben chemolithotrophen Mikroorganismen (z. B. eisen- bzw. sulfidoxidierende Mikroorganismen)
- der Nachweis von anaerob lebenden Mikroorganismen (z. B. sulfatreduzierender, denitrifizierender, methanogener Mikroorganismen).

Hierfür können neben der Methode der Anreicherung in Nährmedien und der nachfolgenden Keimzahlbestimmung, mikroskopische Untersuchungen und die Durchführung von DNA Analysen empfohlen werden.

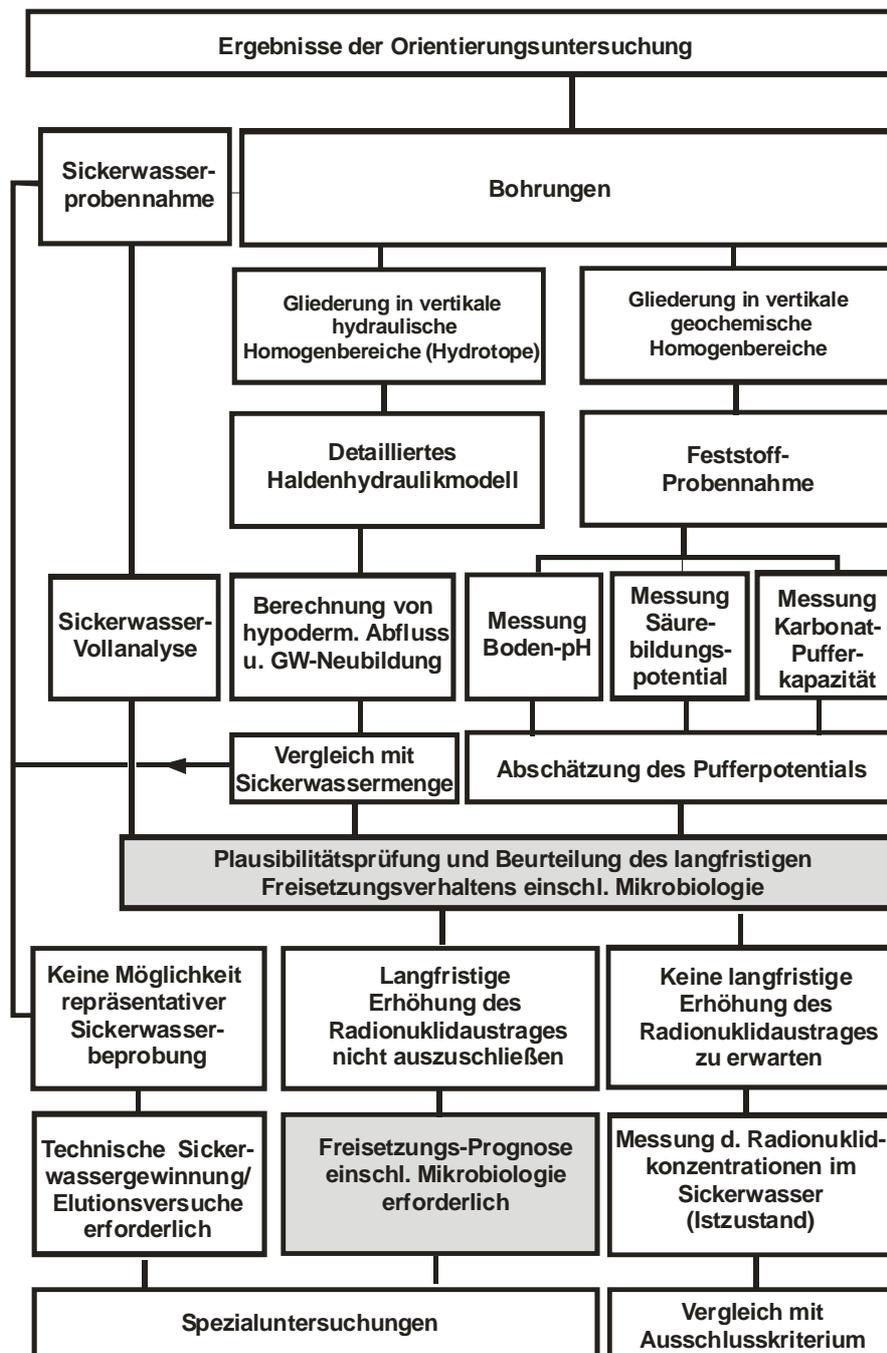


Abbildung 37: Schema zur Methodik der Hauptuntersuchung zum Sickerwasserpfad

Die empfohlenen Hinweise und Ergänzungen wurden bei der Ausarbeitung einer Anlage Mikrobiologie für den „Leitfaden zur radiologische Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus“ berücksichtigt. Diese Anlage wurde dem Bundesamt für Strahlenschutz in einem separaten Dokument übergeben.

## Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten

In die Abbildung 38 gehen die aus dem vorliegenden Bericht erlangten Erkenntnisse ein, sodass eine unabhängig vom jeweiligen mikrobiologischen Prozess durchzuführende Vorgehensweise in folgende Schritte unterteilt werden kann:

1. Prüfung der Voraussetzungen zur Mitwirkung mikrobiologischer Prozesse bei der Freisetzung von Radionukliden anhand vorliegender Informationen zu den Milieubedingungen sowie zum Inventar an Mikroorganismen und Radionukliden – Relevanzverdachtsprüfung. Fehlen geeignete Wachstumsbedingungen, können weitere mikrobiologische Untersuchungen entfallen.
2. Durchführung einfacher experimenteller Untersuchungen zur Bestätigung oder Zurückweisung des Relevanzverdachts.
3. Ist im Ergebnis dieser Untersuchungen die Relevanz nachgewiesen, so wird die Durchführung von Spezialuntersuchungen zur Quantifizierung der mikrobiologischen Prozesse notwendig.
4. Parameterbestimmung zur Quelltermbeschreibung auf der Grundlage der Spezialuntersuchungen.
5. Prognose von Freisetzung und Transport innerhalb der Quelle.

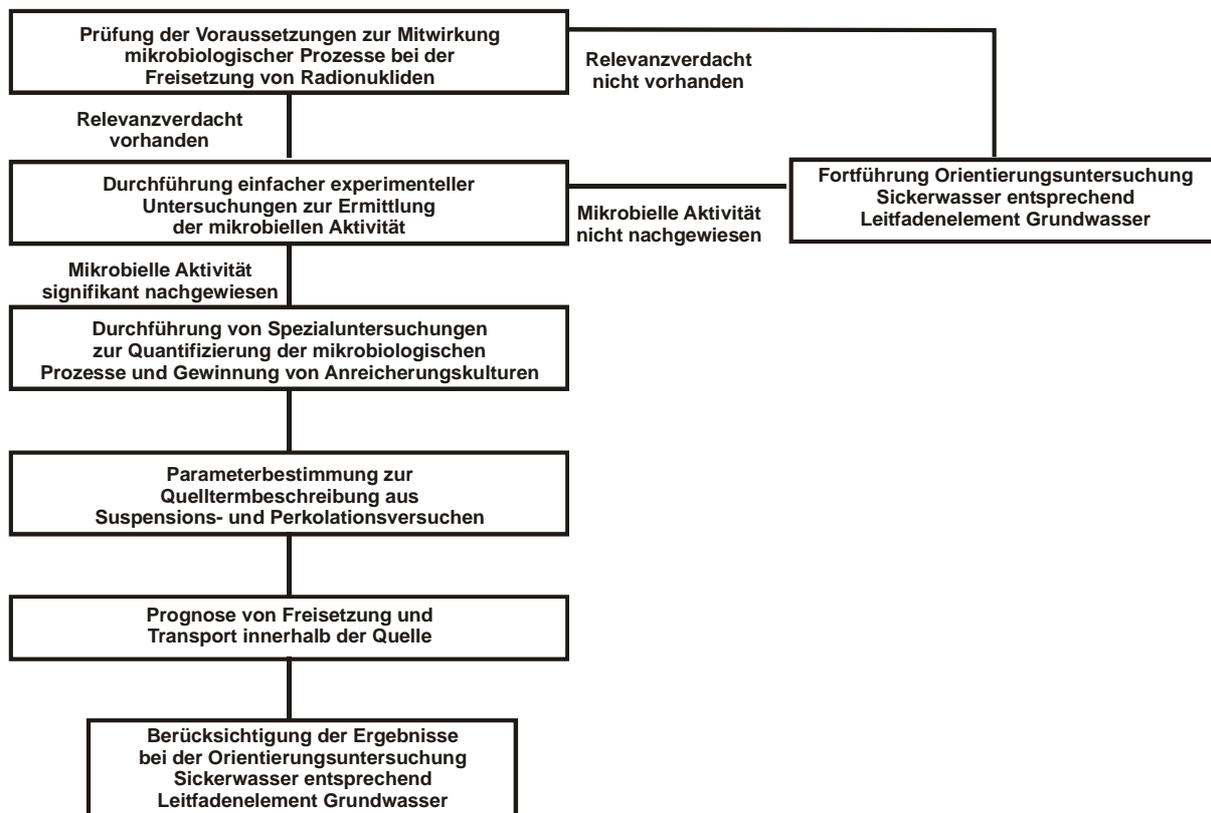


Abbildung 38: Gesamtmethodik zur Ermittlung der Relevanz von mikrobiologischen Prozessen auf die Freisetzung von Radionukliden aus Haldenmaterial

## 9 Quellenverzeichnis

### 9.1 Verwendete Quellen

- [BAR 2007] Barros, N.; Gallego, M.; Feijoo, S. Sensitivity of calorimetric indicators of soil microbial activity. *Thermochimica Acta* (2007), 458(1-2), 18-22.
- [BAR 2007a] Barros, N.; Salgado, J.; Feijoo, S. Calorimetry and soil. *Thermochimica Acta* (2007), 458(1-2), 11-17
- [BEN 1988] Bennett P.C., Melcer M. E., Siegel D.I., Hassett The dissolution of Quartz in dilute aqueous solution of organic acids at 25°C, *Geo chim. Cosmochim. Acta* 52:1988) 1521 - 1530
- [BER 1973] Bernhardt K., Damm W., Hydrometallurgie des Urans Teil II Technologische Grundlagen, Lehrmaterial für die Berufsausbildung SDAG Wismut 1973
- [BMU 2005] Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten und Erweiterung des Anwendungsbereiches, Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz BMU-2005-672
- [BRAND 2007] Brandl H., Lehmann St., Faramarzi M. A., Mobilisation of silver, gold and platinum from solids materials by HCN - forming microorganisms in: *Advanced Materials Res. Vol. 20 – 21* (2007) 50- 53 / Biohydrometallurgy: from the single cell to the environment, Proceedings of the 17th international Biohydrometallurgy Symposium 2 – 5 Sept. 2007 Frankfurt / Main Germany Eds: A. Schippers, W. Sand, F. Glombitza, S. Wilscher ISSN 1022-6680
- [BRI 1988] Brinckman F.E., Olson G.J., Global Biomethylation of the Elements: Its Role in the Biosphere Translated to New Organometallic Chemistry and Biotechnology in: *The Biological Alkylation of Heavy Elements* Eds.: P.J. Craig, F. Glockling Royal soc. of Chemistry 1988 pp 168 - 196, ISBN 0 - 85186 - 716 - 2
- [BROO 1988] Brookins D.G., Eh-pH Diagrams for Geochemistry Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1988 ISBN - 3-540-18485-6
- [BUNDESTAG 1998] Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz- BBodSchG), 17.3.1998
- [BUNDESREGIERUNG 1999]: Bundes - Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV), 12.7.1999
- [CLAW 1913] Clawson B.J., Young C.,C., *J. Biol. Chem.* 15(1913) p 419
- [CRI 2001] Critter, Silvana A. M.; Airoidi, Claudio. Application of calorimetry to microbial biodegradation studies of agrochemicals in oxisols. *Journal of Environmental Quality* (2001), 30(3), 954-959
- [CRI 2004] Critter, Silvana A. M.; Freitas, Sueli S.; Airoidi, Claudio. Microcalorimetric measurements of the metabolic activity by bacteria and fungi in some Brazilian soils amended with different organic matter. *Thermochimica Acta* (2004), 417(2), 275-281.

- [DELE 2002] Delecaut G., De Caniere P., Wang L., Maes N., Solubility of an uranium(IV) amorphous phase under geochemical conditions representative for the direct disposal of spent nuclear fuel in Boom Clay in: Uranium in the aquatic environment - Eds.: B.J. Merkel, B. Planer – Friedrich, Chr. Wolkersdorfer Proceedings of the int. Conference Uranium Mining and Hydrology III Freiberg – 15 – 21 September 2002 Springer Verlag ISBN 3 – 540-43927-7, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York pp. 197 – 206
- [DePablo, 1999] De Pablo, J. et al.: The oxidative dissolution mechanism of uranium dioxide, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 63, No. 19/20, pp. 3097–3103, 1999
- [DISP 1981] DiSpirito A.A., Tuovinen O.H., Oxygen uptake coupled with uranous sulfate oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*. *Geomicrobiol. J.* 2:275-291 (1981)
- [DISP 1982] DiSpirito A.A., Tuovinen O.H., Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Arch. Microbiol.* 133:28-32 (1982)
- [DODG 1997] Dodge C.J, Francis A.J., *Environ. Sci. Technol.* (1997) 31:3062-3067
- [DUTR 1976] Dutrizac J.E., MacDonald R. J., Ferric Ion as a Leaching Medium *Miner Sci Eng* 6 (1976) 59
- [ECK 1980] Eckardt F.E., Webley M., Scott R.O., Microbial degradation of silicates, Release of cations from aluminosilicate minerals by yeasts and filamentous fungi. pp 107 - 116 in: *Biodeterioration, the proceedings of the fourth international Biodeterioration symposium* Eds.: Oxley T.A. Becker G., Allsop D., Berlin, Pitman, London 1980
- [EHRL 1996] *Geomicrobiology* Ehrlich H. L. 3 rd Edition, (1996) Marcel Decker Inc. NY ISBN 0-8247-9541-5
- [ELB 2000] Elberling, B.; Schippers, A.; Sand, W.. Bacterial and chemical oxidation of pyritic mine tailings at low temperatures. *Journal of Contaminant Hydrology* (2000), 41(3-4), 225-238
- [FAR 2004] Faramarzi M.A., Stagars M., Pensini E., Krebs W., Brandl H. J. *Biotechnol* 113 (2004) 321 - 326
- [FRAN 1992] Francis A.J., Dodge C.J., Gillow J.B., 1992 *Nature* 356:140-142
- [FRAN 2002] Microbial transformation of Uranium Complexed with Organic and Inorganic Ligands in: Uranium in the aquatic environment - Eds.: B.J. Merkel, B. Planer – Friedrich, Chr. Wolkersdorfer Proceedings of the int. Conference Uranium Mining and Hydrology III Freiberg – 15 – 21 September 2002 Springer Verlag ISBN 3 – 540-43927-7, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York pp. 447 - 454
- [FRI 1990] Fritzsche W. *Mikrobiologie*, UTB - Uni -Taschenbücher Gustav Fischer Verlag Jena 1990, ISBN 3 - 334 - 00236 - 5
- [GANE 1997], Ganesh R., Robinson K. G., Reed G. R., Saylor G. S., *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 63: 4385-4391
- [GASS 1985] Gassen H. G., Martin A., Bertram S., *Gentechnik, Einführung in Prinzipien und Methoden*, VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1985

- [GEI 2003] Geißler A., Molekulare Analyse der bakteriellen Diversität in Uranbergbauhalden, Diplomarbeit TU Bergakademie Freiberg 2003
- [GEIP 2002 ] Geipel G., Bernhard G., Brendler V., Complex formation of Uranium IV with Phosphate and Arsenate in: Uranium in the aquatic environment - Eds.: B.J. Merkel, B. Planer – Friedrich, Chr. Wolkersdorfer Proceedings of the int. Conference Uranium Mining and Hydrology III Freiberg – 15 – 21 September 2002 Springer Verlag ISBN 3 – 540-43927-7, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York pp. 367 – 376
- [GEOS 2006] Analyse mikrobiologischer Prozesse und Wechselwirkungen mit anorganischem Material zur Freisetzung und Fixierung von anorganischen Schadstoffen und modellhafte Darstellung der Ergebnisse zur Vervollständigung der Sickerwasserprognose, Abschlussbericht 17.02.2006, G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH, Auftraggeber BMBF
- [GLOM 1987] Glombitza F., 1987 Geobiotechnologie - unveröffentlichtes Manuskript
- [GLOM 1995] F. Glombitza, L. Eckardt, A. Hummel, Biosorption of the separation of radionuclides from drainage and process waters of the uranium mining industry. - ASME 1995 (1451 - 1454) Eds: S. Slate, R. Baker, G. Benda ISBN: 0 - 7918 - 1219 - 7
- [GRS 2003] Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten - Leitfadenelement Grundwasserpfad bei Halden des Alt- und Uranbergbaus. Im Auftrag des BfS im Rahmen des Forschungsvorhabens 4295. Mai 2003
- [HAMAKER 1972] Decomposition: quantitative aspects In: Goring, C.A.I. and J.W. Hamaker (eds.) Organic Chemicals in Soil Environment. New York, Marcel Dekker, 1972
- [KAL 2002] Kalin M., Smith M. P. et. Al., Ecosystems restoration incorporating minerotrophic ecology and Stoneworts that accumulates <sup>226</sup>Ra, in: Uranium in Aquatic Environment Eds., Merkel B. J., Planer-Friedrich, B., Springer Verlag 2002, pp 495-504, ISBN 3-540-43927-7
- [KIE 2004] Kießig, G., Kunze, Chr., Küchler, A., Zellmer, J., Kalin. M., Kostengünstige passive Nachsorgelösungen mit einem constructed wetland auf der Grundlage von Prognosen der Entwicklung des Flutungswassers der Grube Pöhla, in: Proceedings 55. Berg- und Hüttenmännischer Tag, 18.06.2004, Treatment Technologies for Mining Impacted Water, TU Bergakademie Freiberg, Institut für Geologie, Eds.: B. Merkel, H. Schaeben, Chr. Wolkersdorfer, A. hasche, 113 – 118
- [KOGA 2003] Koga, Kunimasa; Suehiro, Yasutaka; Matsuoka, Shun-Taro; Takahashi, Katsutada. Evaluation of growth activity of microbes in tea field soil using microbial calorimetry. Journal of Bioscience and Bioengineering (2003), 95(5), 429-434.
- [KOGA 2001] Koga, Kunimasa; Hiraoka, Shinichi; Kim, Yeong Su; Hagiwara, Daisuke; Suehiro, Yasutaka; Sakamoto, Yasuko; Takahashi, Katsutada. Calorimetric studies on the ability of organic matter decomposition by microbes in different kinds of soils. NetsuSokutei 28(2), 54-61 (2001)
- [KORA] Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Grundwässer und Böden. BMBF- Förderschwerpunkt. 2002 – 2007. [www.natural-attenuation.de](http://www.natural-attenuation.de)

- [LAC 1970] Lacey, D.T., Lawson, F.: Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*. 12 (1970), 29 – 50
- [LAGA 1994] Mitteilungen der Länderarbeitsgemeinschaft Abfall LAGA (1994): Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen / Abfällen – Technische Regeln – Erich Schmidt Verlag
- [LANE 1985] Lane D. J., Stahl D. A., Olsen G. J., Heller D. J., Face N. R., *J. Bacteriol.* 136 (1985) 75 – 81
- [LEM 2002] Lemke, Thomas. Microcalorimetry with high sample throughput. *LaborPraxis* (2002), 26(2), 68-69.
- [LITT 1997] Little B.J., Wagner P. A., Lewandowski Z., *Reviews in Mineralogy* Vol. 35 (1997)
- [LUBW 1991] Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg: Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung, Kapitel 8.5 Methoden der Aktivitätsbestimmung, Materialien zur Altlastenbearbeitung, Band 7, April 1991
- [MCR 1980] Mc Ready R.G., *Hydrometallurgy* 5 , 109 - 116 (1980)
- [MICHAELIS & MENTEN 1913] Kinetics of invertase action. *Z. Biochem.* 49, 1913
- [MONOD 1949] The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3 (1949), S. 371-394
- [MÜL 2005] Müller-Graff K., Siderophore Fe<sup>3+</sup> Aufnahme durch Bakterien Pilze und Pflanzenwurzeln, Vortrag "Anorganisch - Chemisches Fortgeschrittenen Praktikum" Ltg. Prof. Krämer 06.05.2005
- [NOR 1990] Norris P., *Acidophilic Bacteria and their Activity in Mineral Sulfide Oxidation*, in *Microbial Mineral Recovery* Eds: H. L. Ehrlich, C. L. Brierley McGraw-Hill Publishing Company ISBN 0 - 07 - 007781 - 9 1990, pp 3 - 28
- [ÖHL 2001] Öhlander, B., Carlsson, E., Holmström, H., Elander P., MiMi – Characterization of the tailings and the till cover in impoundments 1 und 1B, Kristineberg mine, northern Sweden, Report MiMi 2001:2, revised 2004, The MISTRA-programme MiMi, Mitigation of the environmental impact from mining waste, Lulea, Schweden, 2004
- [POST 1966] Postgate J.R., *Laboratory Practice* 1966 15 No 11 239
- [PRA 2003] Prado, Alexandre G. S.; Airoidi, Claudio. A toxicity view of the pesticide picloram when immobilized onto a silica gel surface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2003), 376(5), 686-690.
- [Projektarbeit GEOS 2003] Grundlagen, Kinetik, Stöchiometrie, Zusammenhänge der Eisen II Oxidation durch eisenoxidierende Bakterien (Acidithiobazilli)
- [RAW 2007] Rawlings D. E., Johnson D. B., *Biomining*, Springer-Verlag, 2007, ISBN-13 987-3-540-34909-9

- [ROD 2007] Rodriguez-Anon, J.; Proupin-Castineiras, J.; Villanueva-Lopez, M.; Nunez-Fernandez, O.. Development of an experimental procedure to analyse the soil health state' by microcalorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2007), 87(1), 15-19.
- [RONG 2007] Rong, Xing-Min; Huang, Qiao-Yun; Jiang, Dai-Hua; Cai, Peng; Liang, Wei. Isothermal microcalorimetry: a review of applications in soil and environmental sciences. *Pedosphere* (2007), 17(2), 137-145.
- [RÖßNER 1996] Dissertation, Proceedings des Dresdner Grundwasserforschungszentrums e.V., Kinetik mikrobieller Stoffumwandlungsprozesse im Grundwasserleiter mit Hilfe von Labormodellen, 1996
- [SAC 2006] Sachs S., Geipel G., Mibus J., Bernhard G., Impact of humic acid on the uranium migration in the environment, in: *Uranium in the environment - Mining Impact and the Consequences*, Eds.: B.J. Merkel, A. Hasche – Berger, Springer Verlag ISBN 3 – 540-28363-8, Springer Berlin Heidelberg New York 2006 pp 107 – 116
- [SCHI 1995] Schippers, A., Mikrokalorimetrie als Kurzzeit-Meßverfahren zur Bestimmung mikrobieller Laugungsaktivität in Bergbaualtlasten. DEHEMA-Jahrestagungen '95, Wiesbaden, 1995
- [SCHI 2000] Schippers. A., Jozsa, P.-G., Sand, W., Kovacs, Zs. M., Jelea, M., Microbiological Pyrite Oxidation in a Mine Tailings Heap and Its Relevance to the Death of Vegetation, *Geomicrobiology* 17 (2000), 151 – 162
- [SCHI 2001] Schippers. A; Jozsa P G; Kovacs Z M; Jelea M; Sand W Large-scale experiments for microbiological evaluation of measures for safeguarding sulfidic mine waste. *Waste management (New York, N.Y.)* (2001), 21(2), 139-46
- [SCHI 2005] Schippers. A, Kock, D., Geomicrobiological investigation of two different mine waste tailings generating acid mine drainage, in: *IBS 2005 Cape Town*, 25. – 29. September 2005, Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Biohydrometallurgy Symposium, Eds.: S.T.L. Harrison, D.E. Rawlings, J. Petersen, 667 – 676, ISBN 1-920051-17-1
- [SCHMIDT 1992] Models for studying the population ecology of microorganism in natural systems. In Hurst, Ch.J. (ed.): *Modelling the metabolic and physiologic activities of microorganism*. New York: Wiley & Sons, 1992
- [SCHR 1993] Schroeter, Achim W.; Sand, W.. Estimations on the degradability of ores and bacterial leaching activity using short-time microcalorimetric tests. *FEMS Microbiology Reviews* (1993), 11(1-3), 79-86.
- [SEL 2002a] Selenska - Pobell S., Diversity and activity of bacteria in uranium waste piles in: *Interactions of microorganisms with radionuclides* Eds.: Keith-Roach, Livens 225 - 254

- [SEL 2002b] Selenska - Pobell S., Flemming K., Tzvetkova T., Raff J., Schnorpfeil M., Geißler A., Bacterial communities in Uranium mining waste piles and their interaction with heavy metals in: Uranium in the aquatic environment - Eds.: B.J. Merkel, B. Planer – Friedrich, Chr. Wolkersdorfer Proceedings of the int. Conference Uranium Mining and Hydrology III Freiberg – 15 – 21 September 2002 Springer Verlag ISBN 3 – 540-43927-7, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York pp.455 - 464
- [SIMKINS & ALEXANDER 1994] Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl Environ. Microbiol. 47 (1984), S. 1299 – 1306
- [SILV 1959] Silverman M.P., Lundgren D.C., Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bacteriol. 77:642-647, 1959
- [SKL 2003] Sklodowska A., Golan M., Matlakowska R., The role of microorganisms in dispersion of thallium compounds in the environment, in: Proceedings of the 15 th international Symposium on Biohydrometallurgy IBS 14. – 19. 09. 2003 Athen, "A sustainable technology in evolution" Part II Eds.: M. Tsezos, A. Hatzikioseyan, E. Remoundaki , National technical University of Athens, Electronic means of production - pp. 1237 - 1245, N. J. Zographakis ISBN - 960 - 88415 - 2 - 6
- [STAH 1987] Stahl D.A., Lane D. J., Olsen G.J., Heller D.J., Schmidt T.M., Pace N.R., Internat. J. of System. Bacteriol. 37 ( 1987 ) 116 - 22
- [STO 2007] Storch A., Tröger K., Hoth N., Knöller K., First Evidence of Active Sulphate reduction in a lignite Mine Dump Site at Low pH values - the Plessa Site, in: Advanced Materials Res. Vol. 20 – 21 (2007) 2001- 2004 / Biohydrometallurgy: from the single cell to the environment Proceedings of the 17 th international Biohydrometallurgy Symposium 2 – 5 Sept. 2007 Frankfurt / Main Germany Eds: A. Schippers, W. Sand, F. Glombitza, S. Wilscher ISSN 1022-6680
- [STU 1972] Stumm-Zollinger, E. Die bakterielle Oxydation von Pyrit. Archiv für Mikrobiologie, 83 (1972), 110 - 119
- [TSEZ 1990] Tsezos, M. Engineering Aspects of Metal Binding by Biomass in: Microbial Mineral Recovery, Eds.: H. L. Ehrlich, C. L. Brierley, McGraw - Hill Publishing Company pp. 325 – 339 (1990) ISBN 0 – 07 – 007781 - 9
- [TUOV 1986] Tuovinen O.H. Some characteristics of iron-oxidizing Thiobacilli isolated from uranium mine leach liquors pp 56 - 63 in: Biogeotechnology of metals Eds. : G.I. Karavaiko, S.N. Grouedev UNEP 1985, Moscow centre of international Projects GKNT
- [VAN 1994] Vandevivere P., Welch S. A., Ullmann W. J., Kirchman D. L. enhanced dissolution of silicates minerals by bacteria at near-neutral pH Microb. Ecol. 27:1994 241 - 251
- [WALT 2002] Walter M., Arnold T., Funke H., Reich T., Bernhard G., Sorption of Uranium (VI) onto Schwertmannite – EXAFS investigations in: Uranium in the environment - Mining Impact and the Consequences, Eds.: B.J. Merkel, A. Hasche – Berger, Springer Verlag ISBN 3 – 540-28363-8, Springer Berlin Heidelberg New York 2006 pp. 395 – 398

- [WEN 1994] S. Wentzien, R. Hallmann, W. Sand (1994). Mikrokolorimetrische Zellzahlbestimmungen von acidophilen litho-autotrophen Bakterien. In: Texte 29/94 - Überwachungsmethoden Gentechnik, W. Dubbert, J.M. Lopez Pila (Hrsg.) Umweltbundesamt, Berlin, Seite 297-305
- [WOES 1984 ] Woese C.R., Weisburg W. C., Paster B. J., Hahn C. M., Tanner R. System Appl. Microbiol. 5 ( 1984) 327 - 36
- [YAO 2007] Yao, Jun; Xu, Chaoqian; Wang, Fei; Tian, Lin; Wang, Yanxin; Chen, Huilun; Yong, Zhou; Choi, Martin M. F.; Bramanti, Emilia; Maskow, Thomas. An in vitro microcalorimetric method for studying the toxic effect of cadmium on microbial activity of an agricultural soil. *Ecotoxicology* (2007), 16(7), 503-509.
- [YAO 2008] Yao, Jun; Tian, Lin; Wang, Yanxin; Djah, Atakora; Wang, Fei; Chen, Huilun; Su, Chunli; Zhuang, Rensheng; Zhou, Yong; Choi, Martin M. F.; Bramanti, Emilia. Microcalorimetric study the toxic effect of hexavalent chromium on microbial activity of Wuhan brown sandy soil : An in vitro approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2008), 69(2), 289-295
- [ZÄNK 2002] Zänker H., Richter W., Hüttig G., Moll H., Colloid borne Uranium in Mine Waters, in: Uranium in the aquatic environment Eds.: B. J. Merkel, B. Planer-Friedrich, Chr. Wolkersdorfer, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2002 pp. 399 – 406 ISBN 3 – 540-43927 - 7 28363-8

## **9.2 Weiterführende Literatur**

- [GANES 1999] Ganesh R., Robinson K. G., Chu L., Kucsmas D., Reed G. R., *Wat. Res.* (1999) 33:3447-3458
- [GLOM 1979] F. Glombitza, B. Heinritz, Thermodynamik mikrobieller Prozesse, *Ztschrft. Allgem. Mikrobiologie* 19 (3) 171 - 179 (1979)
- [GLOM 1984] F. Glombitza, B. Heinritz, M. Ringpfeil, Die Verwendung thermodynamischer und kinetischer Gesetzmäßigkeiten zur Interpretation des Begriffes physiologischer Zustand *Acta Biotechnologica* 4 (1984) 101 – 108
- [GLOM 1984 a] Dr. F. Glombitza, Die Abhängigkeit der Ausbeutekoeffizienten von der Umwelt bei aeroben Zellsubstanzsynthesen und deren biochemisch-energetische und thermodynamische Interpretation, Dissertation zum Dr. sc. nat., Forschungsbereich Chemie der Akademie der Wissenschaften der DDR am 24. 10. 1984
- [HEIN 1980] B. Heinritz, E. Stichel, T. Bley, A. Steudel, F. Glombitza, W. Babel, Yield coefficients in dependence on milieu conditions and cell states, *Ztschrft. Allgem. Mikrobiologie* 20(4) 283 (1980)
- [HEIN 1981] B. Heinritz, E. Stichel, T. Bley , A. Steudel, F. Glombitza, W. Babel, Influence of the perturbation on continuous steady state cultivation of the yeast *Lodd. elong.* on Hydrocarbons, *Ztschrft. Allgem. Mikrobiologie* 21 (8) 581 – 86 ( 1981)

- [HEIN 1982] B. Heinritz, E. Stichel, G. Rogge, T. Bley , F. Glombitza, Theoretische Berechnungen von energetischen Wirkungsgraden biologischer Stoffwandlungen in Biomasse und Vergleich mit experimentellen Werten, Ztschrft. Allgem. Mikrobiologie 22 (8) 535 – 544 ( 1982)
- [HEIN 1983] B. Heinritz, P. Stoll, F. Glombitza, Heat flow measurements in aerobic microbial growth processes with a non isothermal calorimeter operating directly in the fermentor, Acta Biotechnologica 3(1) 85 - 89 (1983)
- [IAEA 2002] The Uranium Production Cycle and the Environment, Proceedings of the international Symposium of the IAEA and OECD Vienna 2 – 6 10. 2000, printed by the IAEA 2002 ISSN 1011- 4289
- [MER 2002] Uranium in the aquatic environment - Eds.: B.J. Merkel, B. Planer – Friedrich, Chr. Wolkersdorfer Proceedings of the int. Conference Uranium Mining and Hydrology III Freiberg – 15 – 21 September 2002 Springer Verlag ISBN 3 – 540-43927-7, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York
- [MER 2006] Uranium in the environment - Mining Impact and the Consequences, Eds.: B.J. Merkel, A. Hasche – Berger, Springer Verlag ISBN 3 – 540-28363-8, Springer Berlin Heidelberg New York 2006
- [SCHN 1982] J. Schneider, F. Glombitza, M. Ringpfeil, Einfluss von Prozessvariablen auf die Ausbeute- und Erhaltungskoeffizienten bei Zellsubstanzsynthesen Abh. AdW der DDR N2 (1982) S. 139 - 147

## 10 Glossar

<b>acidophil</b>	Organismen, die optimal an einen niedrigen pH- Wert (pH 4 und niedriger) angepasst sind
<b>aerob</b>	Bezeichnung für die Lebensweise von Organismen, die zum Leben Sauerstoff benötigen
<b>anaerob</b>	Bezeichnung für die Lebensweise von Organismen, die zum Leben keinen freien Sauerstoff benötigen
<b>ARDRA</b>	Abkürzung für <u>A</u> mplified <u>r</u> DNA <u>r</u> estriction <u>a</u> nalysis, PCR-Methode zur molekularen Typisierung von Mikroorganismen
<b>Atmungsaktivität</b>	beschreibt den biochemischen Sauerstoffbedarf und gibt die Menge an Sauerstoff an, die Mikroorganismen in einer Probe in einem bestimmten Zeitraum bei einer Temperatur von 20° C verbrauchen, um die Inhaltsstoffe der Probe aerob abzubauen
<b>Autolyse</b>	bezeichnet die Zersetzung der mikrobiellen Zelle durch zelleigene Enzyme
<b>autotroph</b>	Aufbau zelleigener Kohlenstoffverbindungen aus anorganischen Kohlenstoffquellen (CO <sub>2</sub> )
<b>Bodenatmung</b>	Atmungsaktivität einer Bodenprobe, Veränderung des Sauerstoffgehaltes und/oder des CO <sub>2</sub> Gehaltes in einer Bodenprobe, hervorgerufen durch mikrobielle Prozesse. Es wird zwischen der potenziellen und der aktuellen Atmungsaktivität unterschieden. Die potenzielle stellt die maximal mögliche Atmungsaktivität nach Zugabe aller Nährstoffe dar, die aktuelle Atmungsaktivität erfasst die Veränderungen der Konzentration in der Bodenluftzusammensetzung durch die Mikroorganismen ohne irgendwelche Zusätze.
<b>Card-Fish</b>	Analysenmethode, Weiterentwicklung der klassischen <u>F</u> luoreszenz <u>i</u> n <u>s</u> itu <u>H</u> ybridisierung, bei der an die Sonde statt des üblichen Fluoreszenzfarbstoffs ein Enzym gekoppelt wird, dass für ein stärkeres Farbsignal sorgt und somit die Untersuchung von Umweltproben deutlich erleichtert.
<b>chemolithotroph</b>	sind Mikroorganismen, die ihre Energie aus der Oxidation anorganischer Substanzen gewinnen
<b>Chemotroph</b>	Ernährungsform bei der Mikroorganismen ihre Energie aus der Oxidation anorganischer Substanzen gewinnen
<b>DGGE</b>	Analysenmethode, <u>D</u> enaturierende <u>G</u> radienten <u>G</u> el <u>E</u> lektrophorese
<b>DNA</b>	Abkürzung für Desoxyribonukleinsäure
<b>Ertragskoeffizient</b>	Parameter, der den Zusammenhang der Zuwachsgeschwindigkeit der Mikroorganismen mit der Abbaugeschwindigkeit des Substrates beschreibt, Er gibt an, wie viel Biomasse pro Masseneinheit des Ener-

	gielieferanten bei dessen mikrobiologischer Umsetzung produziert wird.
<b>exprimieren</b>	Im engeren Sinne bezeichnet Genexpression die Biosynthese von RNAs und Proteinen aus den genetischen Informationen
<b>FISH</b>	Analysenmethode, <u>F</u> luoreszenz <u>i</u> n <u>s</u> itu <u>H</u> ybridisierung
<b>fototroph</b>	Ernährungsform bei der Mikroorganismen ihre Energie aus der Umwandlung des Sonnenlichtes bei der Fotosynthese gewinnen
<b>Halbsättigungskonstante</b>	Parameter in Monod-Termen, der die Konzentration des Energielieferanten angibt, bei der die Substrat limitierte Wachstumsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht.
<b>heterotroph</b>	Aufbau zelleigener Kohlenstoffverbindungen aus organischen Kohlenstoffquellen
<b>lithotroph</b>	Ernährungsform, bei der Mikroorganismen ihren Wasserstoff aus anorganischen Verbindungen erhalten
<b>organotroph</b>	Ernährungsform, bei der Mikroorganismen ihren Wasserstoff aus organischen Verbindungen erhalten
<b>Overlay solid Medium</b>	Nährmedium für acidophile Mikroorganismen nach Johnson, D. B., Hallberg, K.. in Rawlings D. E., Johnson D. B., Biomining, Springer-Verlag, 2007
<b>PCR</b>	Analysenmethode, Polymerase-Kettenreaktion, aus dem engl. <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction, um die Erbsubstanz (DNA) zu vervielfältigen ohne den lebenden Organismus selbst zu benutzen
<b>PLFA-Profil</b>	Ermittlung des Profiles von Phospholipidfettsäuren, die Bestandteile der Zellwände von Mikroorganismen sind, aus dem engl. phospholipid fatty acids
<b>Populationsdichte von Mikroorganismen</b>	Parameter zur Beschreibung der Größe einer Population in Bezug auf den betrachteten Raum oder die betrachtete Fläche
<b>Postgate's Medium</b>	Nährmedium nach Postgate zur Kultivierung von sulfatreduzierenden Mikroorganismen [POST 1966]
<b>RAPD</b>	Abkürzung für <u>R</u> andomly <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA, PCR-Methode
<b>Rate</b>	Größe eines Stoffumsatzes pro Zeiteinheit. Es kann sich sowohl um Abbau (Abbaurate) als auch um Wachstum (Wachstumsrate) handeln, Wichtige Raten im Bereich der Dynamik mikrobiologischer Populationen sind die Abbaurate des Energielieferanten sowie die Wachstumsrate der Mikroorganismenpopulation. An die mikrobiologische Entwicklung angekoppelt sind in der Regel Freisetzungsraten von Radionukliden.
<b>RNA</b>	Abkürzung für Ribonukleinsäure

<b>SSCP</b>	Analysenmethode, DNA- Einzelstrang- Konformations- Polymorphismus- Analyse, aus dem engl. <u>S</u> ingle <u>S</u> trand <u>C</u> onformation <u>P</u> olymorphism analysis
<b>Stoffabbaurate</b>	Parameter zur Beschreibung der Abnahme einer Verbindung je Zeiteinheit
<b>Stoffabbaukonstante</b>	Stoffspezifische Abbaukonstante
<b>Stoffkonzentration</b>	bzw. Stoffgehalt gibt die Konzentration eines Reinstoffes in einem Stoffgemisch an
<b>TGGE</b>	Analysenmethode, <u>T</u> emperatur <u>G</u> radienten <u>G</u> el <u>E</u> lektrophorese
<b>T-RFLP</b>	Analysenmethode, Terminaler Restriktionslängenpolymorphismus, aus dem engl. <u>T</u> erminal <u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
<b>Ungleichförmigkeit</b>	Kennwert zur Charakterisierung der Korngrößenverteilung eines Bodens
<b>Wachstumsrate</b>	Zunahme der Zellenanzahl oder der Zellenmasse einer Population je Zeiteinheit
<b>9-K Medium</b>	Nährmedium nach Silverman, M. P., Lundgren, D. G. zur Kultivierung von <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> [SILV 1959]
<b>16S-rRNA-Gen</b>	in allen Organismen vorhandene Nukleotidsequenz zur Klassifizierung von Organismen. Diese Sequenz enthält phylogenetische Information.

## Anlage 1

### Zusammensetzung der Nährmedien (Abschnitt 5.4.1.)

#### Zusammensetzung R2A- Medium

Inhaltsstoff	Masse
Hefeextrakt	0,5 g
Proteose Pepton	0,5 g
Casamino Säuren	0,5 g
Glucose	0,5 g
Stärke	0,5 g
Natriumpyruvat	0,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agar Agar	15,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	7,2

#### Zusammensetzung SGM- Medium

Inhaltsstoff	Masse
Pepton aus Casein	5,0 g
Pepton aus Fleisch	8,0 g
D(+)-Glucose	10,0 g
Maltose	10,0 g
Agar Agar	15,0 g
Destilliertes Wasser	1000,0 ml
pH-Wert	5,4

#### Zusammensetzung Schaedler- Medium

Inhaltsstoff	Masse
Pepton aus Casein	10,0 g
Pepton aus Fleisch	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	1,0 g
Aminosäuren + Tris-Puffer	2,0 g
NaCl	5,0 g
Haemin	5,0 mg
Vitamin K <sub>1</sub>	0,5 mg
Agar	14,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	5,4
in anaerober Atmosphäre	

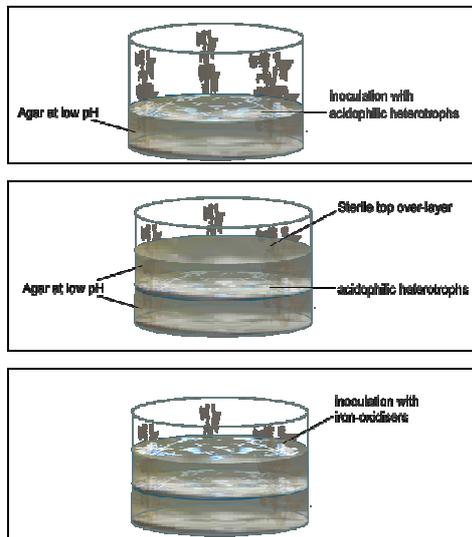
Anlage 1

Zusammensetzung des Overlay solid Medium für acidophile Mikroorganismen nach Johnson und Hallberg

Medium Code	Energiequelle	pH – Wert	Isolate
<i>Acidiphilium</i> SJH in the gel underlayer			
iFe <sub>0</sub>	Eisen (II)	~2.5	obligate Eisen-Oxidierer
Fe <sub>0</sub>	Eisen (II)/TSB <sup>1</sup>	~2.5	Eisen-Oxidierer (auch einige Heterotrophe)
FeS <sub>0</sub>	Eisen (II)/Tetrathionat/TSB	~2.5	Eisen-Oxidierer und Schwefel-Oxidierer (auch einige Heterotrophe)
FeT <sub>0</sub>	Eisen (II)/Thiosulfat/TSB	~4.0	moderate acidophile Eisen-Oxidierer, Schwefel-Oxidierer und Heterotrophe

Alle in obiger Tabelle aufgeführten Medien werden mit Agarose (z. B. Sigma Type I) bis zur Endkonzentration von 0,5 % (w/v) angemacht. In den meisten Fällen werden drei separate Lösungen hergestellt: (i) Basalsalze/TSB (oder Hefeextrakt)/(Tetrathionat oder Thiosulfat), angesäuert auf pH 2.5 und hitzesterilisiert; (ii) Eisen(II)sulfat (1 M (pH 2.0) als filtersterilisierte Stammlösung); (iii) 2%ige hitzesterilisierte Agarose-Lösung. Nach Abkühlung auf 45°C werden die drei Lösungen gemischt und auf ihre Endkonzentrationen eingestellt. Im Falle von Eisen(II) sind dies 25 mM (iFe<sub>0</sub>, Fe<sub>0</sub> and FeS<sub>0</sub> Medien), 5 mM (FeT<sub>0</sub> Medium) and 500 µM (Hefeextrakt overlay Medien). Die Endkonzentration von Tetrathionat im FeS<sub>0</sub> Medium ist 2,5 mM und von Thiosulfat (im FeT<sub>0</sub> Medium) ist 10 mM. TSB wird in einer Endkonzentration von 0,025% (w/v) in den Fe<sub>0</sub>, FeS<sub>0</sub> und FeT<sub>0</sub> Medien und Hefeextrakt in einer Endkonzentration von 0,02% zugegeben. Die kombinierten Medien werden mit *Acidiphilium* SJH und als dünne Gele in Petrischalen gegossen. Nach Verfestigung wird die sterile Top-schicht aufgebracht.

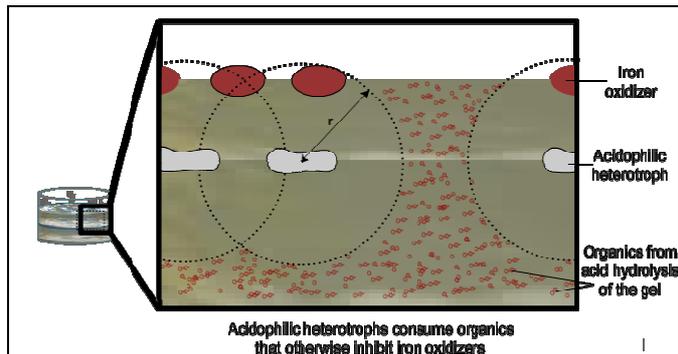
Arbeitsschritte zur Herstellung eines Overlay solid mediums



<sup>1</sup> TSB - Tryptone Soya broth

Anlage 1

Gesamtprozess



Zusammensetzung Modifiziertes 9K- Medium

Inhaltsstoff	Masse
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	22,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,02 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	2,4

Zusammensetzung DSMZ 832-Medium

Inhaltsstoff	Masse
Kaliumhydrogenphosphat	1,8 g
Natriumhydrogenphosphat	1,2 g
Magnesiumsulfat	0,1 g
Ammoniumsulfat	0,1 g
Calciumchlorid	0,03 g
Mangansulfat	0,02 g
Eisen(III)-chlorid	0,02 g
Natriumthiosulfat	10,0 g
Natriumhydrogencarbonat	0,5 g
Kaliumnitrat	5,0 g
Agar	15,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	6,8-7,0

## Anlage 1

### Zusammensetzung DSMZ 756-Medium

Inhaltsstoff	Masse
Hefeextrakt	1,5 g
Pepton	1,5 g
Natrium-Pyruvat	0,55 g
Spurenelementlösung	1,0 ml
Grundlösung	10,0 ml
Destilliertes Wasser	899,0 ml
pH-Wert	7,4
Grundlösung	
Calciumcarbonat	0,07 g
Natriumchlorid	5,0 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g
Destilliertes Wasser	1000 ml

### Zusammensetzung DSMZ 88-Medium

Inhaltsstoff	Masse
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,3 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,28 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,07 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,8 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	4,5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,22 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,03 mg
$\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,03 mg
$\text{CoSO}_4$	0,01 mg
Hefeextrakt	1,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	2,0
in anaerober Atmosphäre	

## Anlage 1

### Zusammensetzung Modifiziertes Postgate`s- Medium

Inhaltsstoff	Masse
<i>Basismedium</i>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
CaSO <sub>4</sub>	1,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Natrium-Acetat	2,5 g
<i>Zusätze</i>	
FeSO <sub>4</sub>	0,5 g
Vitamin C	0,1 g
Agar	1,5 g
Natriumdithionit	0,02 g
Natriumthioglycolat	0,1 g
Resazurin (Farbindikator)	1,0 mg
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	7,5
in anaerober Atmosphäre	

### Zusammensetzung DSMZ 579 - Medium

Inhaltsstoff	Masse
Eisen(III)-citrat	13,7 g
Natriumhydrogencarbonat	2,5 g
Ammoniumchlorid	1,5 g
Natriumhydrogenphosphat	0,6 g
Kaliumchlorid	0,1 g
Natriumacetat	2,5 g
Vitaminlösung aus DSMZ 141	10 ml
Spurenelemente aus DSMZ 141	10 ml
Natriumwolframat	0,25 mg
Destilliertes Wasser	980 ml
pH-Wert	6,7-7,0
in anaerober Atmosphäre	

### Zusammensetzung DSMZ 803 - Medium

Inhaltsstoff	Masse
Hefeextrakt	1,0 g
Pepton	1,50 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,20 g
CaCl <sub>2</sub>	0,05 g
Eisen(III)ammoniumcitrat	0,50 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 g
Eisen(II)sulfid	0,5 g
Agar	20,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	7,1

## Anlage 1

### Zusammensetzung DSMZ 141-Medium

Inhaltsstoff	Masse
Kaliumchlorid	0,335 g
Magnesiumchlorid	4,00 g
Magnesiumsulfat	3,45 g
Ammoniumchlorid	0,25 g
Calciumchlorid	0,14 g
Kaliumhydrogenphosphat	0,14 g
Natriumchlorid	18,0 g
Spurenelementlösung	10 ml
Vitaminlösung	10 ml
Ammoniumeisen(II)-sulfat	2,0 mg
Natriumhydrogencarbonat	5,0 g
Natriumacetat	1,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
Trypton	2,0 g
Resazurin	1,0 mg
Cystein- HCl	0,50 g
Natriumsulfid	0,50 g
Destilliertes Wasser	980 ml
pH-Wert	7,0
in anaerober Atmosphäre	

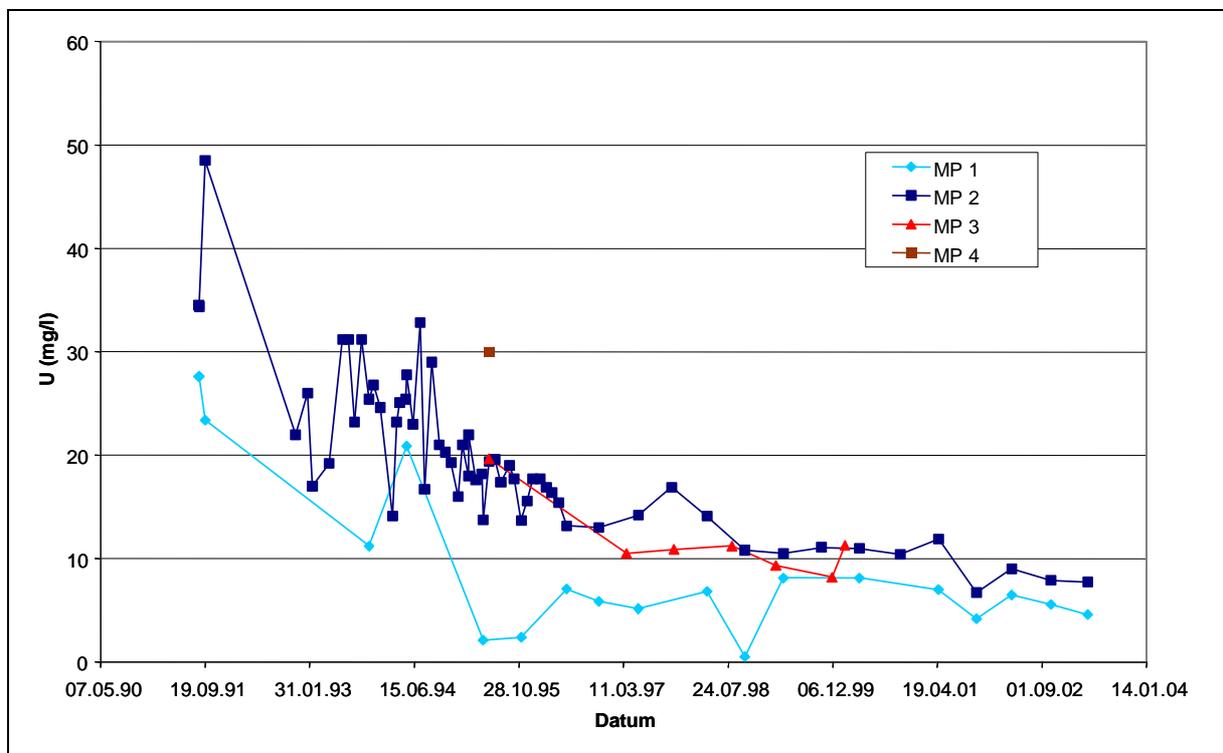
### Zusammensetzung DSMZ 1-Medium

Inhaltsstoff	Masse
Pepton aus Fleisch	7,8 g
Pepton aus Casein	7,8 g
Hefeextrakt	2,8 g
Natriumchlorid	5,6 g
D+Glucose	1,0 g
Kaliumnitrat	1,0 g
Destilliertes Wasser	1000 ml
pH-Wert	7,0
in anaerober Atmosphäre	

## Charakterisierung der Haldensickerwässer am Standort A

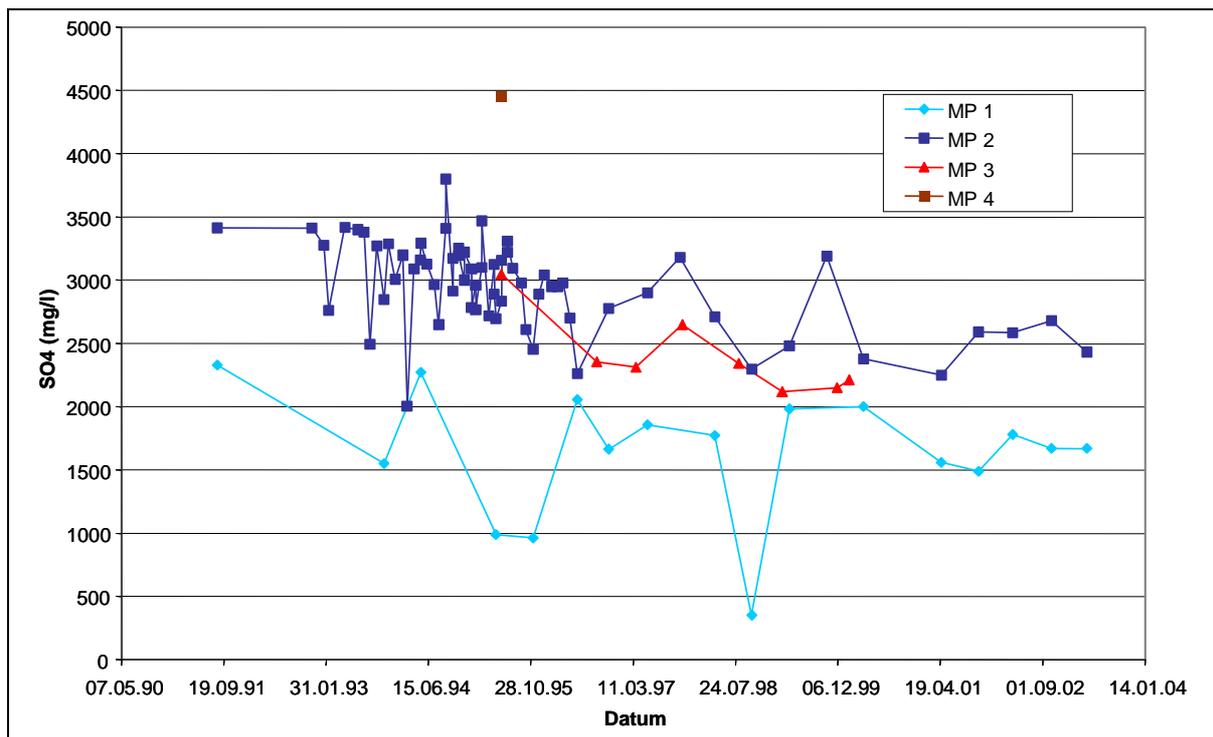
Die Sickerwässer in einer der Sickerwasserfassungen weisen saure pH-Werte zwischen 2,9 und 3,1 auf und sind durch erdalkalische, sulfat- und chloridreiche Mineralisation bis 5 g/L gekennzeichnet. Die Sickerwässer sind hydrogenkarbonatfrei. Die Urankonzentrationen werden Ende 2003 mit 6,5 mg/L bestimmt. Die zweite Sickerwasserfassung wird durch infiltrierte Niederschläge beeinflusst und zeigt aufgrund der Verdünnung geringere Stoffkonzentrationen (neutrale pH-Werte um pH-Wert 7, Leitfähigkeiten zwischen 2 bis 3 mS/cm) im Vergleich auf. Weitere im Haldenbereich befindliche Sickerwassermessstellen weisen ebenfalls eine variable hydrogeochemische Signatur der migrierenden Wässer auf. Standortabhängig schwanken die pH-Werte, der Salz- und der Schadstoffgehalt innerhalb des Haldenkörpers stark.

Zwischen der Zeit der Aufschüttung der Halde ab 1965 bis zum Beginn des Monitorings Anfang der 90iger Jahre liegen keine analytischen Daten zu austretenden Sickerwässern vor. Die Urankonzentrationen des Haldenwassers weisen eine fallende Tendenz auf. Deshalb wird vermutet, dass die Konzentrationen vor dieser Zeit auch höher gewesen sein können.

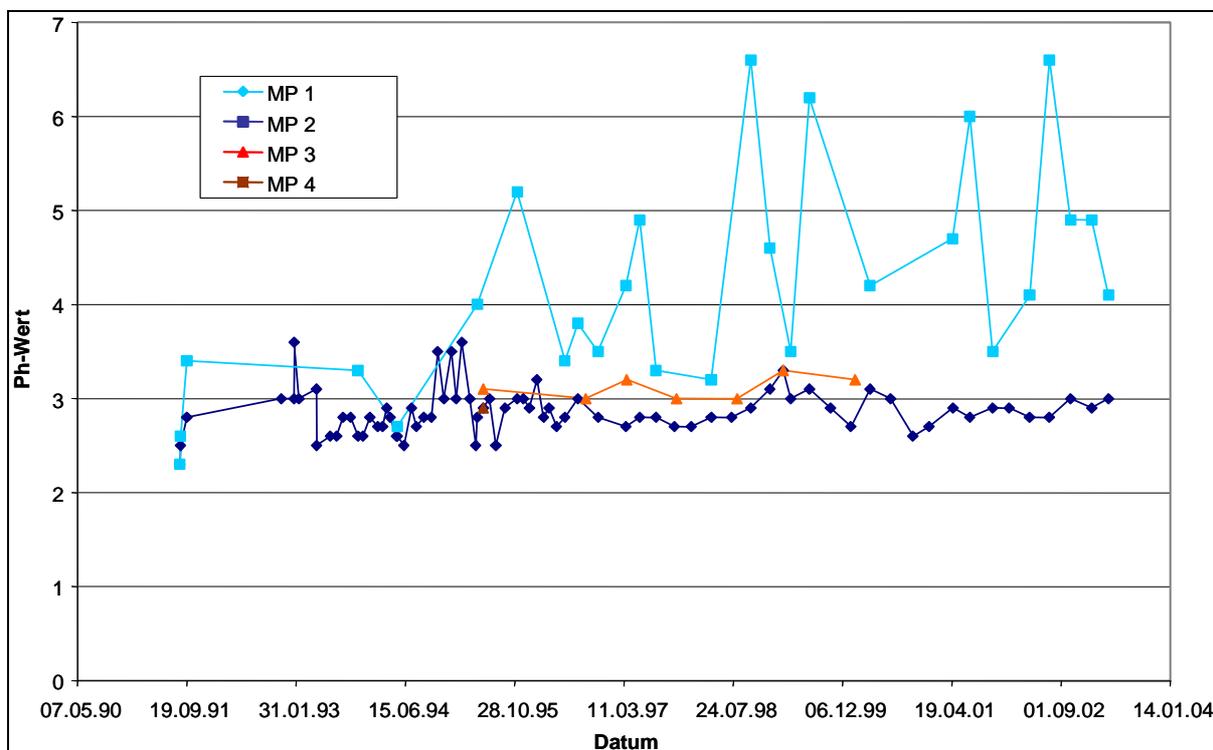


Zeitlicher Verlauf der Urankonzentrationen am Haldensickerwasserablauf des Standortes A (MP – Messpunkte von Sickerwasseraustrittsstellen)

Anlage 2



Zeitlicher Verlauf der Sulfatkonzentrationen am Haldensickerwasserablauf des Standortes A (MP – Messpunkte von Sickerwasseraustrittsstellen)



Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes am Haldensickerwasserablauf des Standortes A (MP – Messpunkte von Sickerwasseraustrittsstellen)

Anlage 2

Die Ende 2003 ermittelten Haldensickerwasserkonzentrationen sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

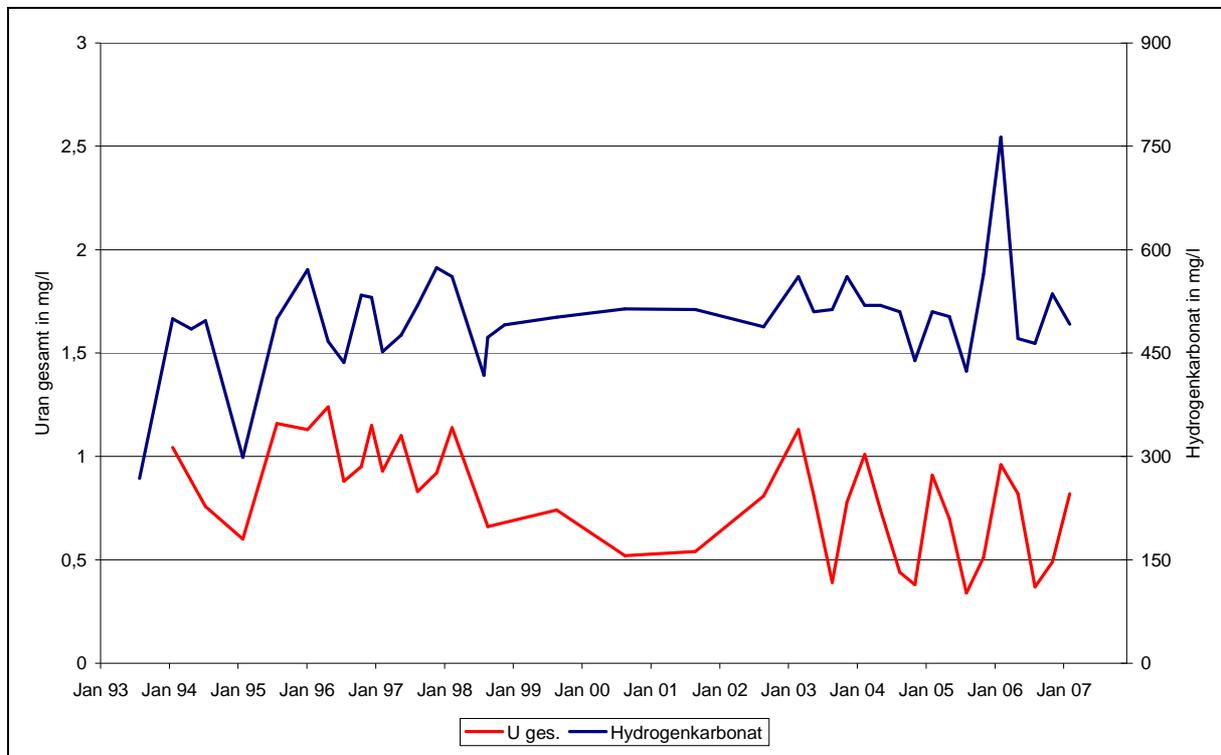
Aktuelle Zusammensetzung von Haldensickerwässern am Haldenstandort A

Parameter	Einheit	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4
pH-Wert		6	3,1	6,3	3
Eh-Wert	mV	370	690	280	610
O <sub>2</sub> -Gehalt	mg/L	9,3	10,1	0,5	0,2
Leitfähigkeit	mS/cm	2,08	5,5	7,2	5,8
Filtrattrockenrückstand	mg/L	2000	4600	5300	4900
Abfiltrierbare Stoffe	mg/L	17	kleiner Nachweisgrenze	14	160
Natrium	mg/L	21,2	390	720	425
Kalium	mg/L	8,4	8	46,2	24,9
Magnesium	mg/L	47,9	120	154	84,3
Calcium	mg/L	424	552	698	535
Eisen gelöst	mg/L	7,41	68,9	7,13	313
Mangan gelöst	mg/L	3,88	20,4	6,34	17,1
Ammonium	mg/L	1,03	18,5	3,72	36,4
Aluminium	mg/L	1,94	40,8	0,06	7,25
Chlorid	mg/L	25	567	1240	588
Sulfat	mg/L	1280	2420	1830	2620
Nitrat	mg/L	5	5,4	11	kleiner Nachweisgrenze
Hydrogenkarbonat	mg/L	45	kleiner Nachweisgrenze	217	kleiner Nachweisgrenze
Karbonat	mg/L	kleiner Nachweisgrenze	kleiner Nachweisgrenze	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Phosphat	mg/L	kleiner Nachweisgrenze	kleiner Nachweisgrenze	kleiner Nachweisgrenze	0,109
Arsen gelöst	µg/L	kleiner Nachweisgrenze	kleiner Nachweisgrenze	kleiner Nachweisgrenze	21,9
Cadmium gelöst	µg/L	50	86	5	35
Kobalt gelöst	µg/L	197	740	37	428
Kupfer gelöst	µg/L	56	263	2	34
Nickel gelöst	µg/L	482	1240	63	747
Zink gelöst	µg/L	11100	35600	647	22900
Uran gelöst	mg/L	1,96	5,15	1,88	3,19
Ra-226 gelöst	mBq/L	63	15	243	279
Ac-227 gelöst	mBq/L	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	730
Pb-i210 gelöst	mBq/L	nicht bestimmt	nicht bestimmt	86	749
Chemischer Sauerstoffbedarf	mg/L	kleiner Nachweisgrenze	41	31	77
Total Organic Carbon	mg/L	1,1	2	4,2	4,4
Dissolved Organic Carbon	mg/L	nicht bestimmt	nicht bestimmt	3,5	2,1

Anlage 3

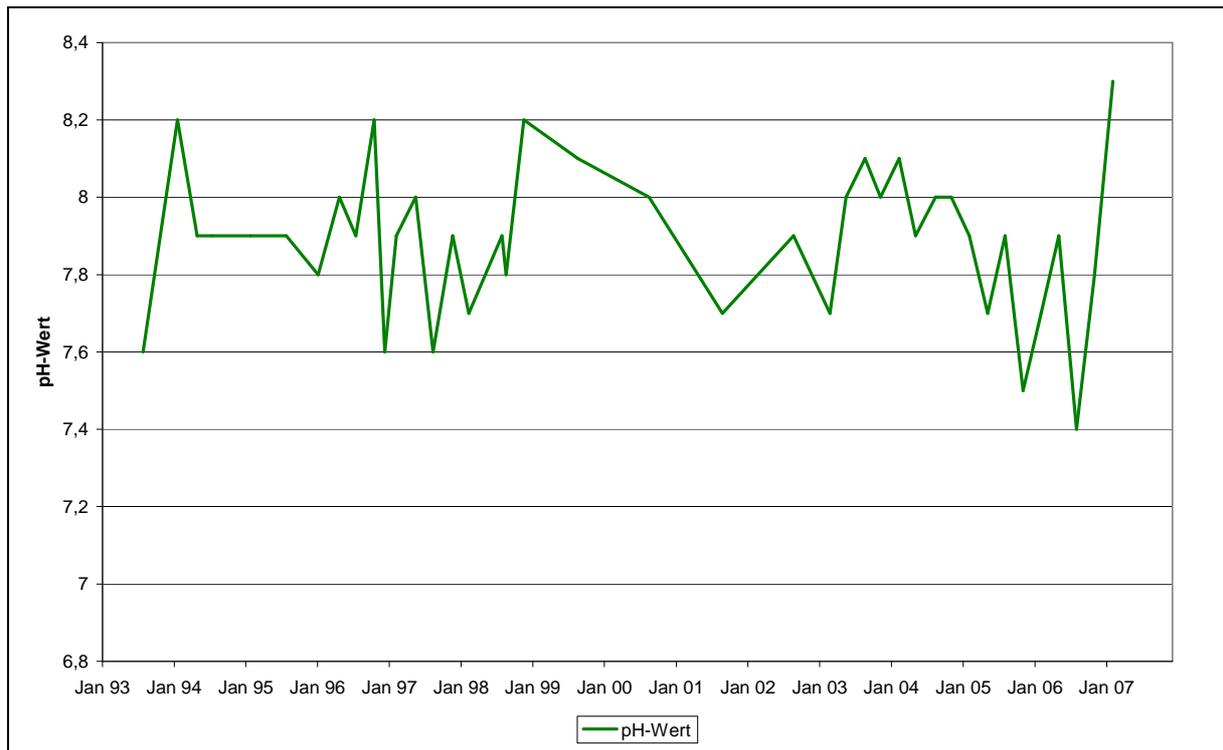
Charakterisierung der Haldensickerwässer am Standort B

Am Standort B gibt es mehrere Sickerwasseraustrittsstellen, die hohe Leitfähigkeiten bis ca. 2 mS/cm (Magnesium, Calcium, Sulfat, Hydrogenkarbonat), alkalische pH-Werte bis ca. 8 und oxidierendes Umgebungsmilieu Eh-Werte zwischen 400 und 500 mV sowie Sauerstoffsättigung aufweisen. Die Urankonzentrationen im Sickerwasser schwanken stark und erreichen im Zeitraum von Ende 1993 bis Anfang 2007 Maximalwerte von 2,6 mg/L. Zwischen der Zeit der Aufschüttung der Halde ab Anfang der 50iger Jahre bis zum Beginn des Monitorings Anfang der 90iger Jahre liegen keine analytischen Daten zu austretenden Sickerwässern vor.



Zeitlicher Verlauf der Uran- und Hydrogenkarbonatkonzentrationen am Haldensickerwasserablauf des Standortes B

Anlage 3



Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes am Haldensickerwasserablauf des Standortes B

## Anlage 4

### Beispielhafte Darstellung der Spezialuntersuchungen

#### ***Beschreibung des untersuchten Materials***

##### Wassergehalt ( $w_n$ ) und Rohdichte ( $\rho_n$ )

Vor der Versuchsdurchführung wurde an ungestört entnommenem Probengut die Rohdichte und der Wassergehalt bestimmt. Diese Parameter wurden ermittelt, um in den nachfolgenden Säulenversuchen das Material möglichst der entsprechenden naturnahen Lagerung wieder einbauen zu können.

Rohdichte und Anfangswassergehalt der untersuchten Bodenproben aus Kaltwasser

<b>Probe</b>	<b>Rohdichte in g/cm<sup>3</sup></b>	<b>Wassergehalt</b>
Oberboden (K 1)	1,91	0,08
Unterboden (K 2)	1,86	0,04

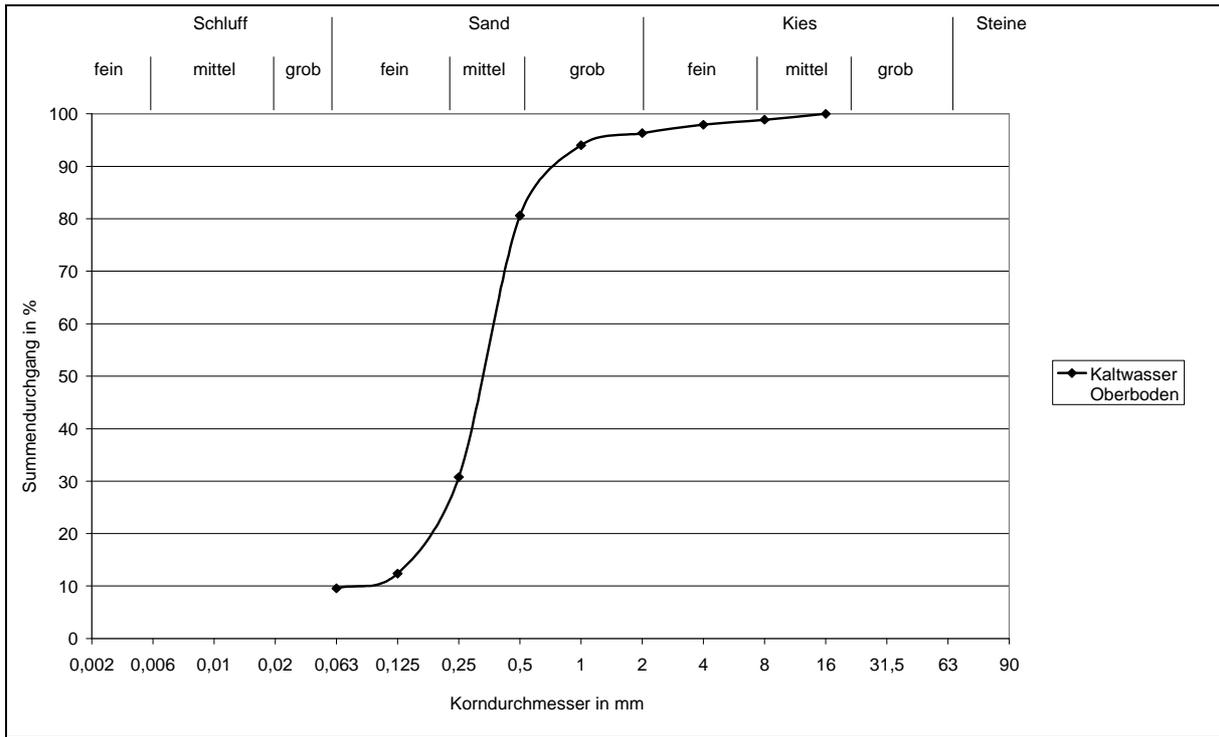
##### Reindichte (Korndichte, $\rho_s$ )

Die Korndichte ist in erster Linie von der mineralogischen Zusammensetzung des Bodens abhängig, d. h., sie entspricht der mittleren Dichte der Gesteinsminerale, aus denen sich die einzelnen Bodenkörner zusammensetzen. Für die untersuchten Feststoffproben des Kaltwasser Bodens wurden die Reindichten: Oberboden 2,66 g/cm<sup>3</sup> und Unterboden 2,65 g/cm<sup>3</sup> ermittelt. Im Vergleich hierzu seien die Dichten der Minerale genannt, die die Zusammensetzung der Bodenmaterialien dominieren: Quarz besitzt eine Dichte von 2,65 g/cm<sup>3</sup>, die Dichte von Illit schwankt in Abhängigkeit von der Elementführung zwischen 2,76 und 3,10 g/cm<sup>3</sup>. Kalifeldspat weist eine Dichte von 2,54 g/cm<sup>3</sup> auf. Plagioklase haben je nach Zusammensetzung (Mischreihe von Albit und Anorthit) Dichten zwischen 2,65 und 2,8 g/cm<sup>3</sup>.

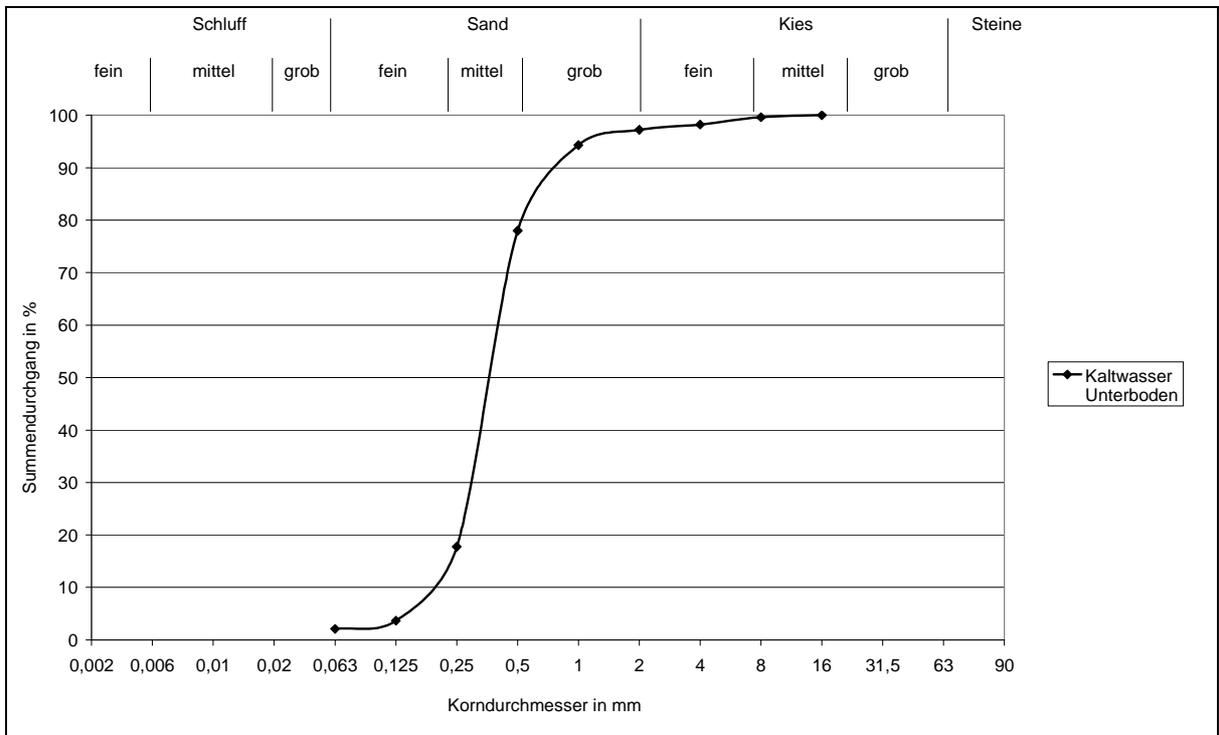
##### Korngrößenverteilung und $k_f$ -Wert-Ermittlung

Unter der Annahme, dass sich die untersuchten Bodenproben vornehmlich aus nicht bindigen Bestandteilen zusammensetzen, wurde für die Ermittlung der Korngrößenverteilung eine Siebanalyse ausgeführt. Die Ungleichförmigkeit U des untersuchten Materials ist mit Werten bis ca. 5 gering. Im Ergebnis dieser Untersuchungen muss festgestellt werden, dass das untersuchte Bodenmaterial einen sehr geringen Feinkornanteil von weniger als 10 Masse-% ( $d \leq 63 \mu\text{m}$ ) aufweist. Damit werden optimale Randbedingungen für Säulenversuche erreicht.

Anlage 4



Kornverteilung Oberboden Kaltwasser



Kornverteilung Unterboden Kaltwasser

## Anlage 4

Entsprechend der DIN 18123 wurde vor Ermittlung der Kornverteilung der Böden der organische Anteil durch Behandlung mit  $H_2O_2$  zerstört. Der entsprechende Masseverlust wies für den Oberboden einen Anteil an organischer Substanz von 2,2 Masse % aus. Der Unterboden war frei von organischer Substanz.

Der Durchlässigkeitsbeiwert wurde für den Oberboden Kaltwasser mit  $2,11 \cdot 10^{-5}$  m/s und für den Unterboden mit  $3,46 \cdot 10^{-5}$  m/s ermittelt. Die Materialien sind nach DIN 18130 als durchlässig anzusprechen. Auf der Grundlage der Kornverteilungskurve kann das Material als sandig charakterisiert werden.

### Röntgenphasenanalyse

Die Ergebnisse der durchgeführten Röntgenphasenanalyse sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

Ergebnisse der quantitativen Röntgenphasenanalyse (Angaben in Masse-%) der untersuchten Bodenproben aus Kaltwasser

<b>Probe</b>	<b>Kaolinit</b>	<b>Illit</b>	<b>Illit/Montmorillonit-Wechselagerung</b>	<b>Chlorit</b>	<b>Plagioklas</b>	<b>Kalifeldspat</b>	<b>Quarz</b>
Oberboden (K 1)	Spuren	2-3	Spuren	Spuren	3	5	89
Unterboden (K 2)	1	2-3	Spuren	Spuren	3	4	89

Die mineralogische Zusammensetzung wird durch Quarz und Feldspäte dominiert. Hauptmineral ist der Quarz. Die Feldspäte wurden summarisch zwischen 7 und 8 Masse-% ermittelt. Untergeordnet treten Illit sowie in Spuren Kaolinit, Zwei- und Dreischichtmineralwechsellagerungen und Chlorit (4-Schicht-Gitter-Minerale) auf.

### Chemische Elementanalytik

Die bereits oben diskutierte mineralogische Zusammensetzung spiegelt sich zwangsläufig auch in der chemischen Zusammensetzung des Materials wider.

Anlage 4

Ergebnisse der chemischen Elementanalytik der untersuchten Bodenproben aus Kaltwasser

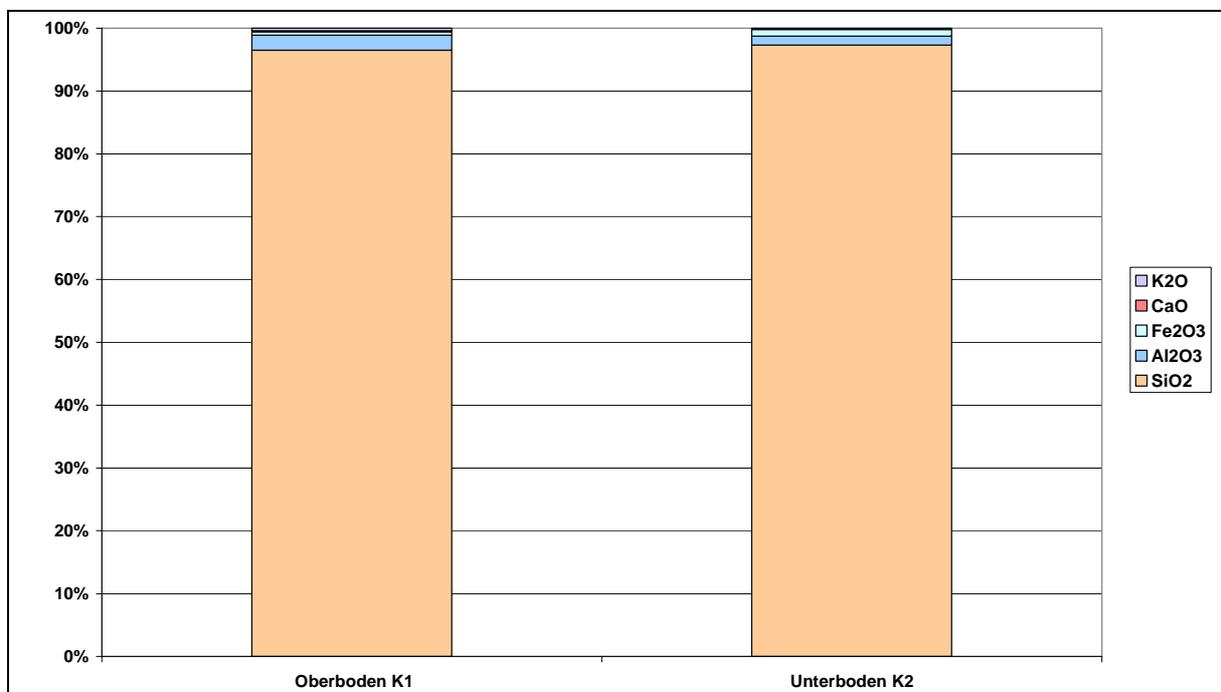
Parameter	Einheit	K1 Oberboden <2 mm	K2 Unterboden <2 mm
<b>Bestimmung in Feststoffprobe</b>			
Schwefel <sub>ges.</sub>	%	<0,1	<0,1
Kohlenstoff <sub>ges.</sub>	%	1,40	0,05
Stickstoff <sub>ges.</sub>	mg/kgTS	1110	70
Phosphor <sub>ges.</sub>	mg/kgTS	972	117
pH -Wert CaCl <sub>2</sub>		4,6/21,5°C	5,0/22,5°C
pH -Wert Wasser		5,4/23,8°C	5,9/23,8°C
<b>Bestimmung in Feststoffprobe nach Elution</b>			
Eisen wasserlös.	mg/kgTS	1,7	2,5
Eisen oxalatlös.	mg/kgTS	1360	280
Eisen dithionitlös.	mg/kgTS	2735	690
<b>Bestimmung im Flusssäureaufschluss</b>			
TiO <sub>2</sub>	%	<0,1	<0,1
SiO <sub>2</sub>	%	95,2	97,5
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	2,4	1,4
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	0,49	1,1
CaO	%	0,19	0,10
MgO	%	<0,1	<0,1
K <sub>2</sub> O	%	0,40	0,10
Na <sub>2</sub> O	%	<0,1	<0,1
<b>Bestimmung im Aufschluss nach DIN 38414-S7</b>			
Arsen	mg/kgTS	2,8	2,1
Blei	mg/kgTS	0,33	<0,2
Cadmium	mg/kgTS	<0,03	<0,03
Chrom	mg/kgTS	5,2	4,2
Mangan	mg/kgTS	56	14
Zink	mg/kgTS	34	4,4

Anlage 4

Bestimmung der potenziellen Kationenaustauschkapazität KAK und der austauschbaren Kationen des Bodens aus Kaltwasser nach DIN ISO 13536

Parameter	Verfahren (DIN)	Einheit	K1 Oberboden <2 mm	K2 Unterboden <2 mm
Kationenaustauschkapazität	ISO 13536	cmol+/kgTS	7,3	2,0
austauschbare Kationen				
Calcium	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	1,7	0,50
Magnesium	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	0,16	0,080
Kalium	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	0,044	0,036
Natrium	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	0,048	0,044
Eisen	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	0,012	0,0013
Aluminium	EN ISO 11885	cmol+/kgTS	0,025	0,0038
H+-Ionen	ISO 13535	cmol+/kgTS	5,8	1,2

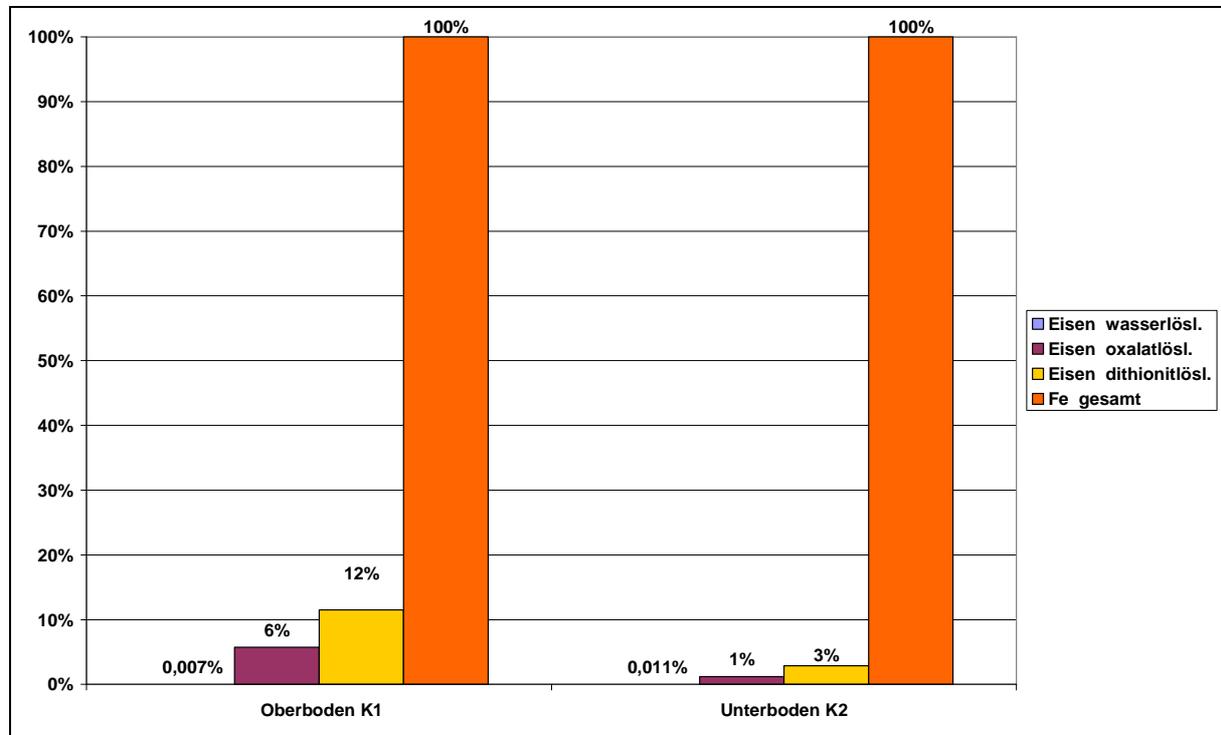
Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht, dass mehr als 95 Masse-% des Bodens durch SiO<sub>2</sub>, durchschnittlich 2 Masse-% durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, und weniger als je 1 Masse-% durch Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO und K<sub>2</sub>O zur chemischen Zusammensetzung beitragen. Überschlägige Prüfungen zeigten, dass die ermittelten chemischen Analysen mit der theoretischen chemischen Zusammensetzung der ermittelten Minerale korrespondieren.



Zusammensetzung der Hauptkomponenten der untersuchten Bodenproben aus Kaltwasser

## Anlage 4

Nur wenige Prozent des in den Bodenproben befindlichen Eisens war mit den Lösungsmitteln Wasser, Oxalsäure und Dithionit löslich.



Bestimmung der Eisenlöslichkeiten in den Bodenproben aus Kaltwasser

Von den Spurenelementen wurde kein Element in nennenswerter Größenordnung ermittelt. Die ermittelten Schadstoffe Arsen, Blei, Cadmium, Chrom und Zink gehen später in die Bilanz der den Säulen zudotierten Schadstoffe mit ein.

### **Auswahl der Schadstoffe**

Für die Untersuchung der Freisetzung und Fixierung von anorganischen Schadstoffen wurden die Metalle Zink, Cadmium, Blei sowie Arsen und Chrom vorgeschlagen. Da das Ziel der Arbeiten in einer verbesserten Prognose von Stoffeinträgen aus festen, schwach belasteten „Abfällen zur Verwertung“ in das Grundwasser besteht, wurden als Schadstoffkonzentrationen Gehalte zum Ansatz gebracht, die zwischen den Vorsorgewerten für Böden der Bundes - Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV) [BUNDESREGIERUNG 1999] und den Zuordnungswerten Z 1.1 für Feststoffe der LAGA [LAGA 1994] liegen. Diese Konzentrationen wurden gewählt, da zum einen das Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG) [BUNDESTAG 1998] dem Boden „natürliche Funktionen als Abbau-, Ausgleichs- und Aufbaumedium für stoffliche Einwirkungen auf Grund der Filter-, Puffer- und Stoffumwandlungseigenschaf-

**Anlage 4**

ten, insbesondere auch zum Schutz des Grundwassers ...“ (§ 2) zuerkennt und hierfür Vorsorgewerte für Boden auch zum Schutz des Grundwassers entwickelt wurden. Zum anderen wurden die Zuordnungswerte Z 1.1 der LAGA herangezogen, da hier für den eingeschränkten offenen Einbau von Böden Richtwerte entwickelt wurden, die davon ausgehen, dass „... selbst unter ungünstigsten hydrogeologischen Voraussetzungen .... keine nachteiligen Veränderungen des Grundwassers auftreten“.

Vorsorgewerte für Metalle der BBodSchV, Zuordnungswerte Z 1.1 für Boden der LAGA und eingesetzte Schadstoffkonzentrationen für die Säulenversuche

	Vorsorgewerte für Metalle BBodSchV (in mg/kg Trockenmasse, Feinboden, Königswasseraufschluss)			Zuordnungswerte Feststoff für Boden Z 1.1 (in mg/kg Trockenmasse)	Eingesetzte Schadstoffkonzentrationen aus Mineralen (in mg/kg Trockenmasse)
	Ton	Lehm/ Schluff	Sand		
<b>Arsen</b>				30	32
<b>Blei</b>	100	70	40	200	205
<b>Cadmium</b>	1,5	1	0,4	1	2,7
<b>Chrom</b>	100	60	30	100	108
<b>Zink</b>	200	150	60	300	313

Die Zugabe erfolgt in Form von Mineralen. Da in den Versuchsreihen Mikroorganismen (Acidithiobacilli) eingesetzt wurden, die insbesondere reduzierte Schwefelverbindungen oxidieren, wurden hierfür Zinkblende ZnS (als Träger für Zn, As, Pb und Cd), Bleiglanz PbS (als Träger für Pb) und Chromit (Fe,Mg)Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (als Träger für Cr) ausgewählt (Für Cr existieren keine sulfidischen Minerale).

**Auswahl der Mikroorganismen**

Im Projekt wurden oxidierende Verhältnisse im Sickerwasser nachgebildet. Als Mikroorganismen wurden daher Acidithiobacilli ausgewählt. Bei den interessierenden Bakterien handelt es sich um gramnegative, nichtsporenbildende Stäbchen, die meist polar begeißelt sind. Sie leben chemolithoautotroph, d. h. sie gewinnen ihre Energie durch die Oxidation von elementarem Schwefel und Schwefel- und Eisenverbindungen. Bei der Umsetzung von Schwefel bzw. Schwefel- und Eisenverbindungen, in denen die beiden Elemente niedrige Oxidationszahlen aufweisen, handelt es sich Prozess, bei dem die Sauerstoffdiffusion im Wasser den limitierenden Schritt darstellt. Acidithiobacilli verwenden das in Wasser gelöste Kohlendioxid der Luft als Kohlenstoffquelle. Acidithiobacilli bevorzugen ein saures Milieu.

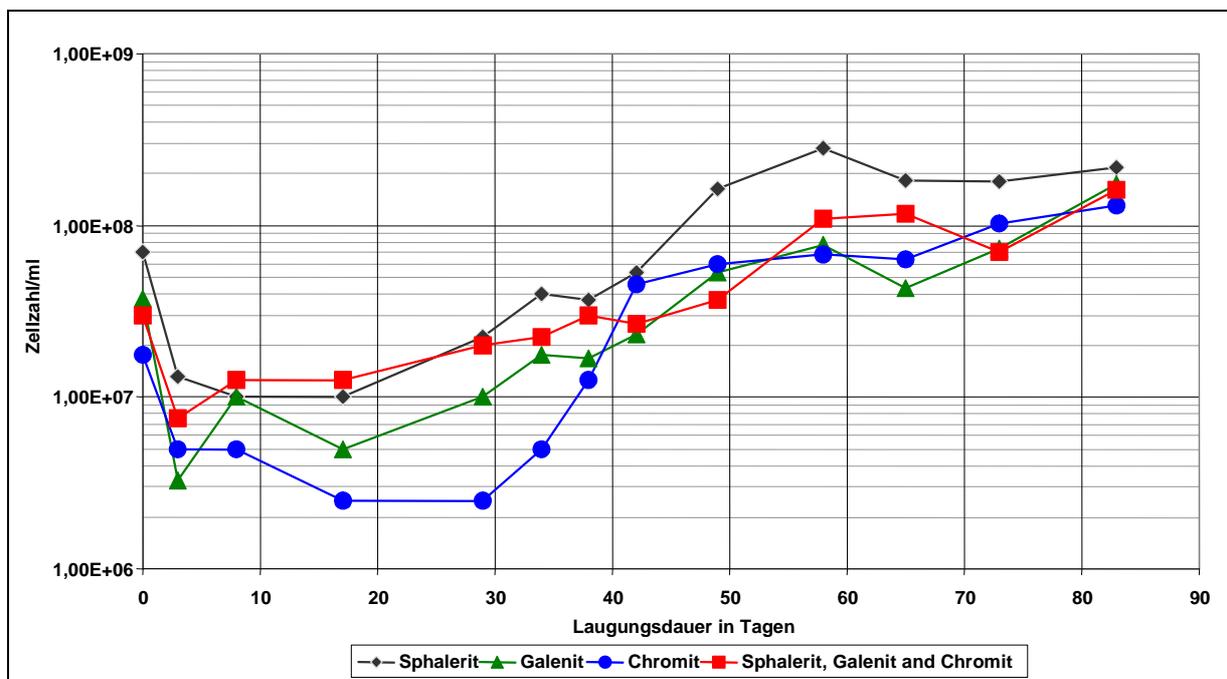
## Anlage 4

Das Gebiet der bakteriellen Pyritoxidation hat für den Aufschwung der Untersuchungen zur bakteriellen Laugbarkeit von Mineralen eine Schlüsselstellung erlangt. Die Hauptursachen dafür sind die häufige Vererzung dieses Minerals mit den interessierenden Metallverbindungen in der Natur. Die Geschwindigkeit der bakteriellen Pyritoxidation liegt im Vergleich zur rein chemischen etwa  $10^3$  bis  $10^6$  mal höher [LAC 1970]. Für die in der Natur beobachtete oxidative Auflösung von Pyrit wird eine Halbwertszeit von 10 Jahren angegeben (pH 3,  $pO_2$  20,265 kPa, 25°C) [STU 1972].

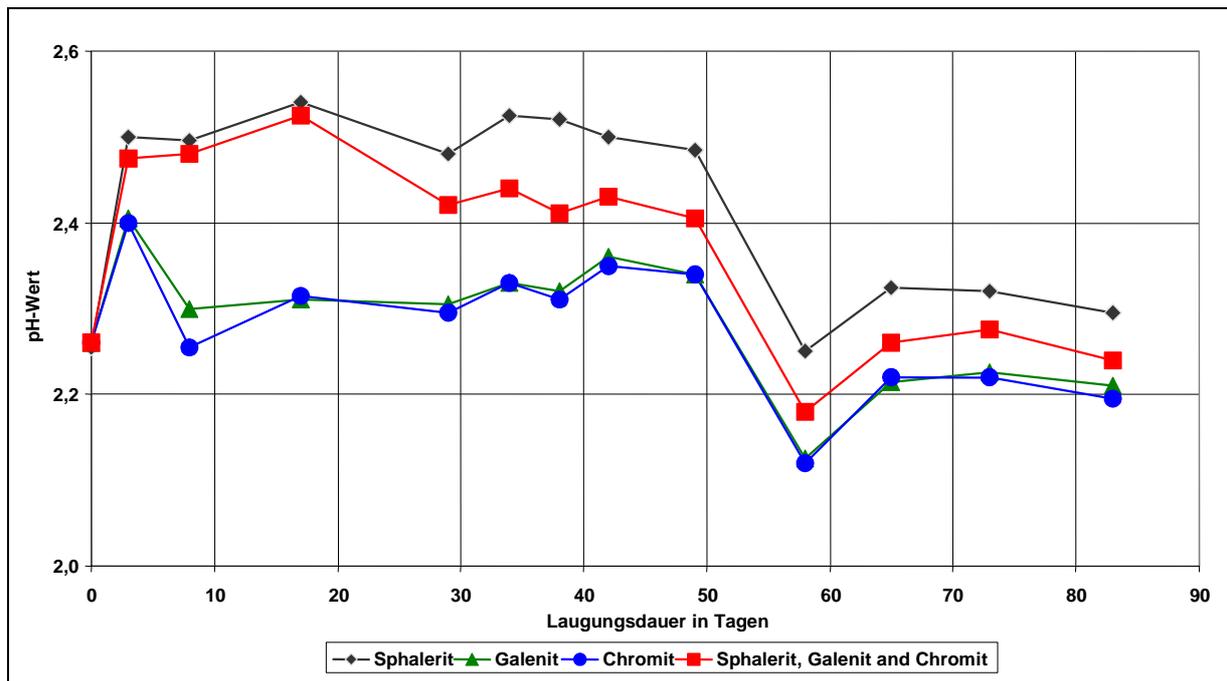
### Versuchsdurchführung

Die Laugungsversuche wurden in unterschiedlichen Dimensionen und bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Dies waren zum einen Suspensionslaugungen (Schüttelversuche) und zum anderen Perkolationslaugungen (Säulenversuche).

Die ersten Laugungsversuche wurden mit Einzelmineralen und Mineralgemischen durchgeführt. Sie dienten zunächst dazu, die eingesetzten Acidithiobacilli an die veränderten Schadstoffkonzentrationen zu adaptieren. Wie aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich, benötigten die Bakterien mindestens 40 Tage, um sich an die neuen Umgebungsbedingungen zu gewöhnen. Erst ab diesem Zeitpunkt setzte ein deutliches Wachstum ein, dass mit einem Absinken des pH-Wertes verbunden war.



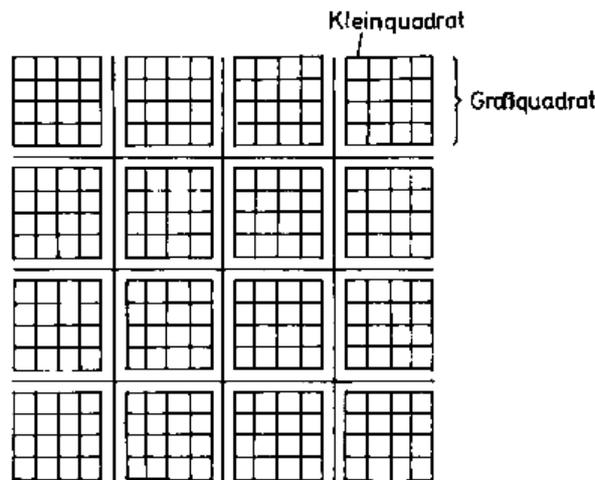
Wachstum von Acidithiobacilli auf verschiedenen Mineralen und –gemischen



pH-Wertentwicklung während des Wachstums

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellzahlen mit der herkömmlichen Bakterienzählkammer nach THOMA mit einer Kammertiefe von 0,01 mm ermittelt. In der Zählkammer erfolgt eine direkte Auszählung der lebenden Keime im mikroskopischen Durchlicht. Nach Auszählen von je vier Großquadraten, welche jeweils 16 Kleinquadrate enthalten, wird in der Diagonale der Mittelwert für ein Großquadrat errechnet und die Anzahl der Bakterien je ml Lösung nach folgender Formel bestimmt:

$$N = \text{Anzahl der Bakterien je Großquadrat} \cdot 107 : 4$$



Bakterienzählkammer nach Thoma

Die während der Adaptionversuche an die Einzelminerale gewöhnten Acidithiobacilli wurden in den weiteren Laugungsversuchen eingesetzt.

### **Suspensionslaugungen (Schüttelversuche)**

Für die Schüttelversuche wurden folgende Versuchsreihen angesetzt:

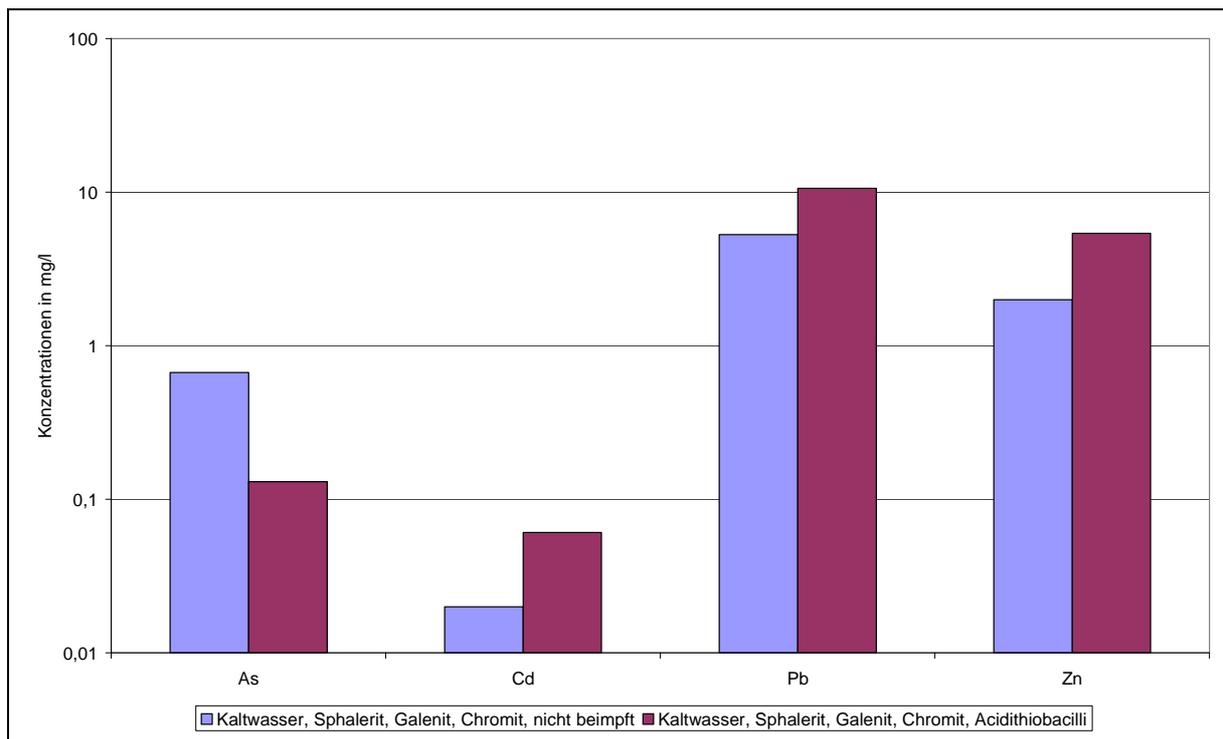
Oberboden und Unterboden Kaltwasser:

- + 50 g Boden und 0,4 g Zinkblende: Acidithiobacilli und steril
- + 50 g Boden und 0,05 g Galenit: Acidithiobacilli und steril
- + 50 g Boden und 0,15 g Chromit: Acidithiobacilli und steril
- + 50 g Boden und 0,4 g Zinkblende, 0,05 g Galenit, 0,15 g Chromit: Acidithiobacilli und steril.

Die Schüttelversuche wurden im Fest-Flüssig-Verhältnis von 1 : 10 angesetzt.

Die aufgeführten Schüttelversuche wurden das erste Mal nach 50 Tagen Laugung auf die freigesetzten Elemente untersucht. Das Ergebnis der Analyse ist für das Gemisch aus Sphalerit, Galenit und Chromit mit dem Unterboden Kaltwasser (sandiges Substrat) aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich.

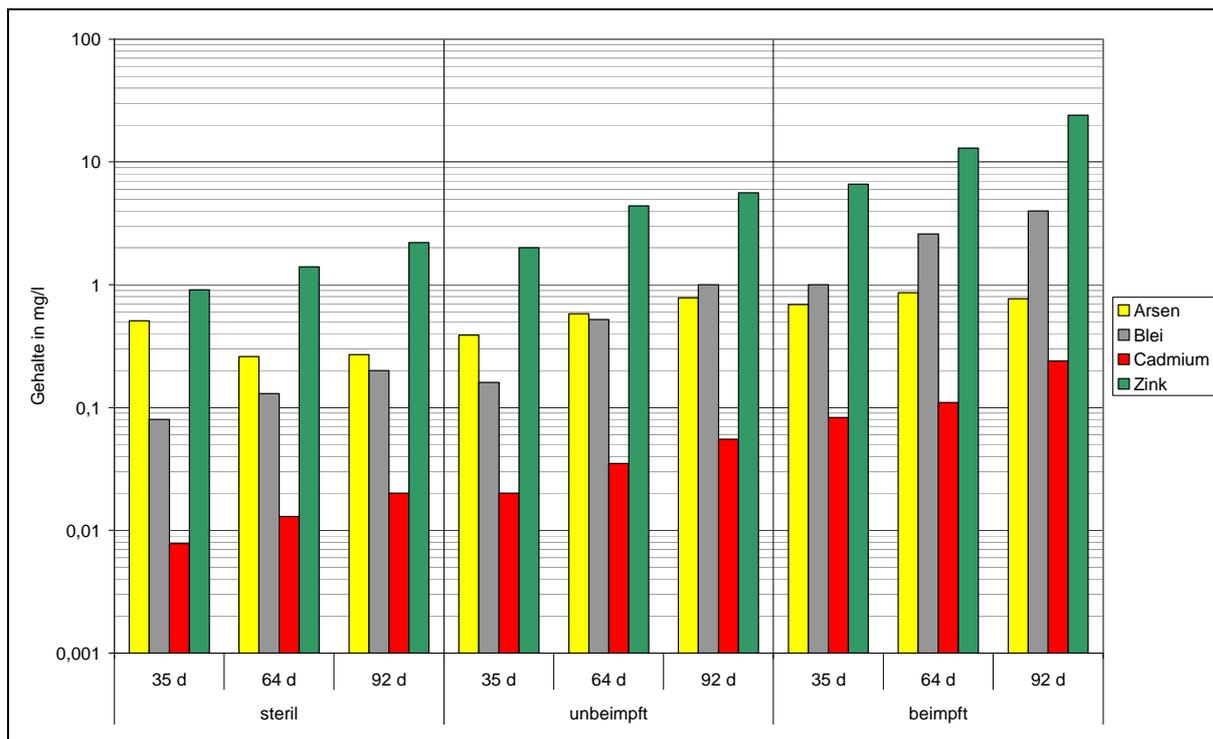
## Anlage 4



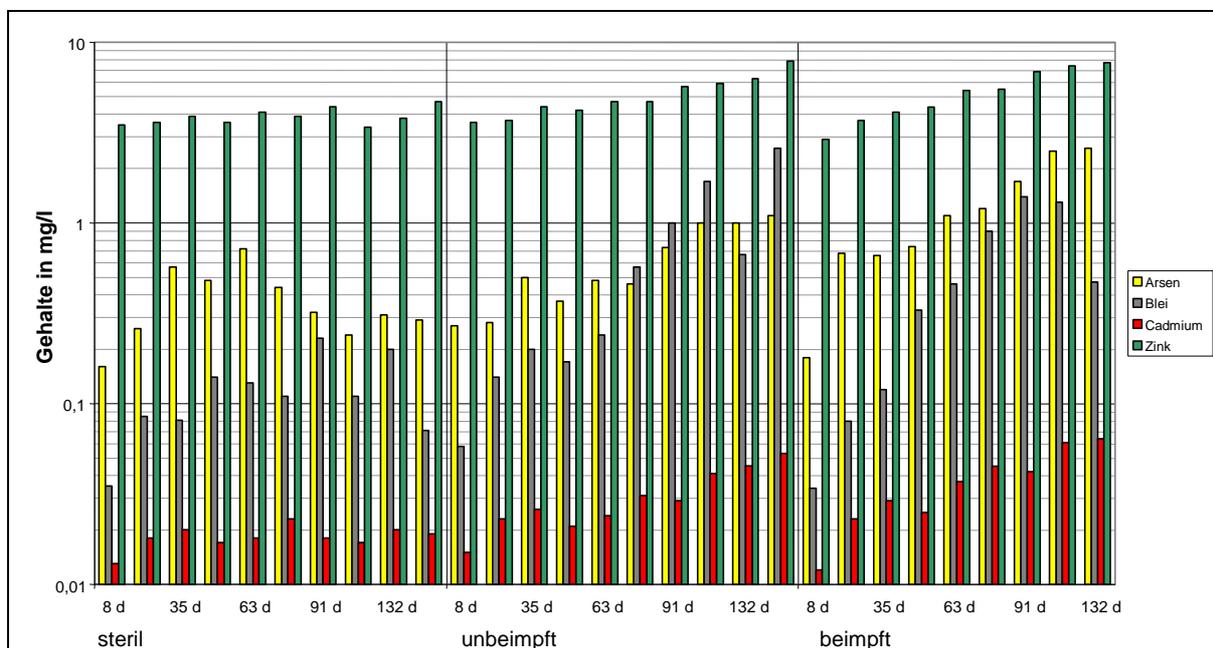
Elementgehalte im Schüttelversuch nach 50 Tagen Laugung

Da die Schadstoffkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem beimpften und dem unbeimpften Versuch zeigten, wurden die Keimzahlen in den verschiedenen Ansätzen ermittelt und die Versuche wiederholt. Interessant war die Feststellung, dass im unbeimpften Bodenmaterial bereits a priori existierende Mikroorganismenkeime eine höhere Metallfreisetzung bewirken. Problematisch stellte sich die längerfristige Sterilführung der Versuche dar. Um sterile Bedingungen zu erlangen, wurden mehrere Varianten erprobt. Zum einen wurde versucht, die Böden zu erhitzen (Autoklav). Dabei wurde allerdings die Bodenmatrix verändert. Versuche mit Ethylenoxid und Natriumdodecylsulfat führten ebenfalls nicht zum Erfolg. Auf die Mitführung von Sterilproben bei den Langzeitversuchen wurden daher im Weiteren verzichtet.

Anlage 4



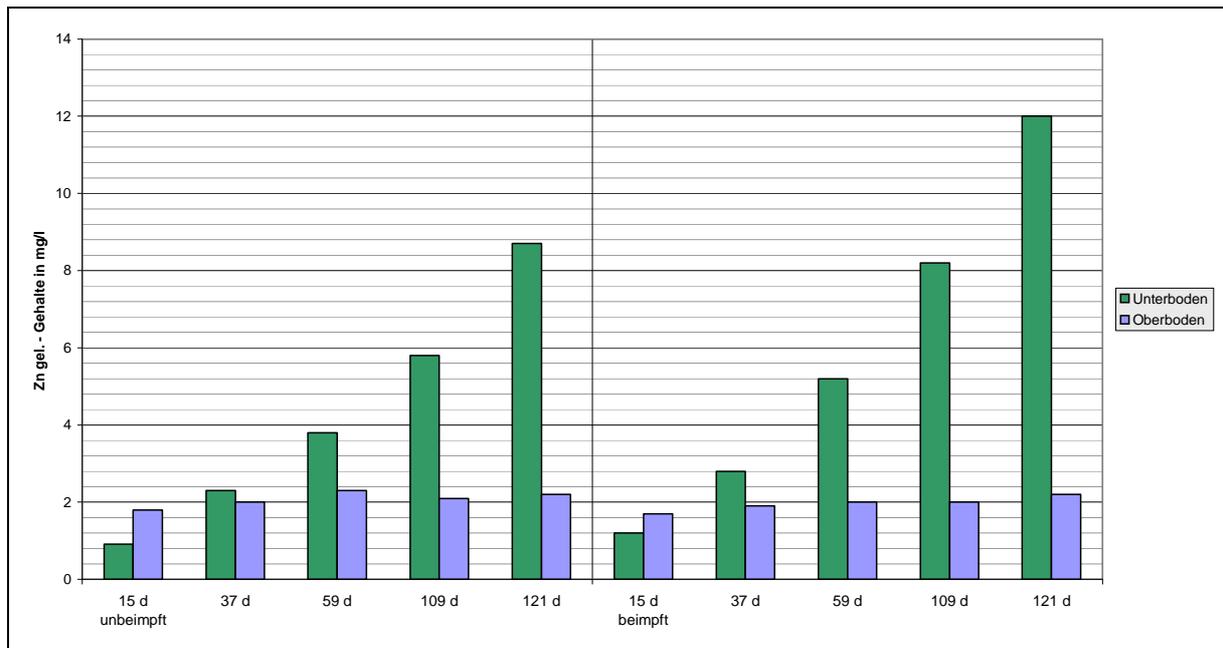
Vergleich der Stofffreisetzungsdynamik für die verschiedenen Schwermetalle am Material Unterboden Kaltwasser, Schüttellaugung



Vergleich der Stofffreisetzungsdynamik für die verschiedenen Schwermetalle am Material Oberboden Kaltwasser, Schüttellaugung

Anlage 4

Für die vorliegende Berichterstellung wurde im Weiteren das Material Kaltwasser - Unterboden als Fallbeispiel aus allen untersuchten Bodenproben ausgewählt. Hierzu werden die erlangten Ergebnisse sowohl für die Quelltermmittlung als auch für die Prognoserechnungen detaillierter dargestellt. Insbesondere wird die Interpretation auch auf das Schwermetall Zink fokussiert, um den Rahmen des Berichtes nicht zu sprengen.



Stofffreisetzungsdynamik Zink am Material Unter- und Oberboden Kaltwasser, Schüttellau-  
gung

Wie die obige Abbildung zeigt, wird während der Elution aus dem Material Kaltwasser Oberboden wesentlich weniger Zink aus dem zudosierten Zinksulfid freigesetzt als aus dem Material Kaltwasser Unterboden. Mögliche Ursachen hierfür werden nachfolgend diskutiert. Die Abbildung zeigt aber auch, dass die mikrobiell katalysierte Freisetzung von Zink aus dem Unterboden während des 121-tägigen Versuchs offensichtlich zu diesem Zeitpunkt noch nicht das Maximum erreicht hat.

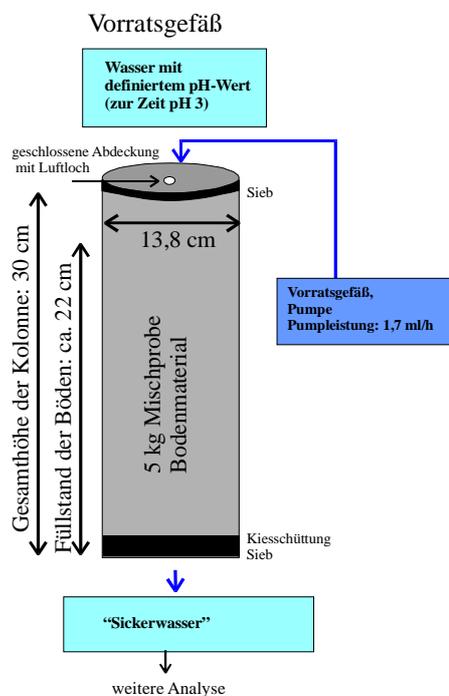
## Anlage 4

### Perkolationslaugungen (Säulenversuche)

#### „Kleine“ Kolonnen (Säulen)

Für die Durchführung der Kolonnenversuche wurde eine Klimabox gebaut, die neben der Temperierung des Innenraumes die Einstellung der atmosphärischen Umgebungsbedingungen zulässt.

Das Fassungsvermögen der Kolonnen beträgt ca. 5 kg. Die Kolonnen sind 30 cm hoch und haben einen Innendurchmesser von 13,8 cm. Die Kolonnen sind mit abnehmbaren Abdeckungen ausgestattet, die Zuleitung des Elutionsmittels erfolgt über eine Dosierpumpe aus dem Vorratsgefäß in die Kolonnen. Das Sickerwasser wird in Schraubflaschen aufgefangen und 14-tägig analysiert.



#### Schematischer Aufbau der kleinen Kolonnen

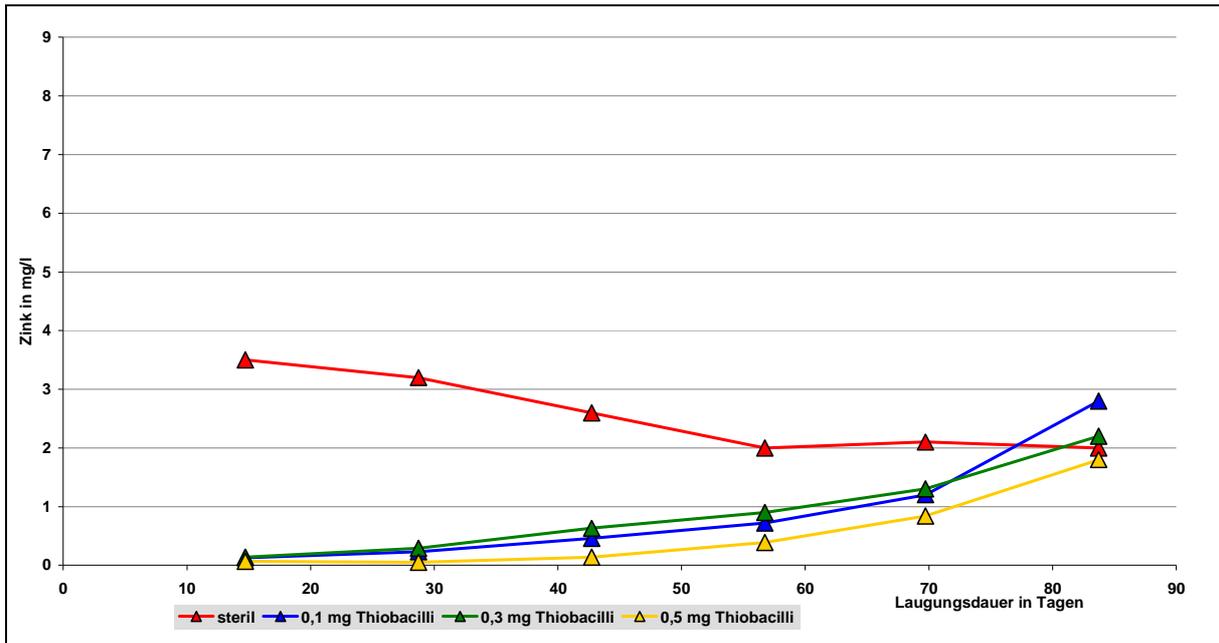
ten, wurden die ersten Versuchsreihen mit den „kleinen“ Kolonnen konsequent nach dieser Versuchsdauer abgebrochen. Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, erreicht die mikrobiell katalysierte Freisetzung von Zink offensichtlich zu diesem Zeitpunkt noch nicht das Maximum. Daher wurden, mit Verzicht auf Sterilveruche und der Einführung unbeimpfter Vergleichsversuche, die Versuchszeiten ab diesem Zeitpunkt erheblich verlängert.

Die dotierten Bodenproben wurden möglichst naturnah, der natürlichen Lagerungsdichte entsprechend, in die Kolonnen eingebaut.

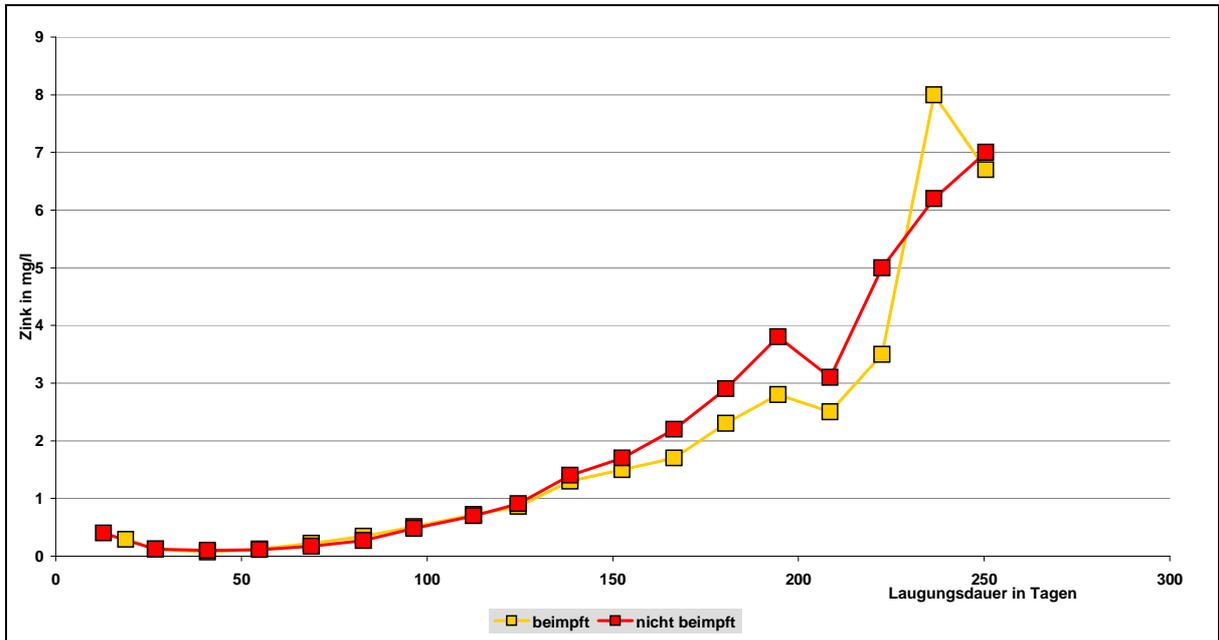
Die Beaufschlagung der Kolonnen mit dem Elutionsmittel wurde unter Annahme einer Niederschlagsmenge von 1000 mm eingestellt. Sie beträgt für die Oberfläche von 0,015 m<sup>2</sup> 1,7 ml/h.

Entsprechend der Arbeitshypothese, dass für die spätere Praktikabilität die Kolonnenversuche nicht länger als 3 Monate dauern sollten,

Anlage 4



Stofffreisetzungsdynamik Zink am Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „kleinen“ Kolonnen, pH-Wert 3



Stofffreisetzungsdynamik Zink am Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „kleinen“ Kolonnen, pH-Wert 5

Am Beispiel der Kolonnenführung bei einem pH-Wert von 5 mit einer Versuchsdauer von 250 Tagen wurde erneut das Maximum an freisetzbarem Zink nicht erreicht.

## Anlage 4

### „Große“ Kolonnen (Säulen)

Zwei „große“ Kolonnen (Fassungsvermögen ca. 110 kg mit einer Abmessung von 1,00 m Länge und 0,285 m Durchmesser) wurden mit der Absicht installiert, Maßstabsübertragungen vom Schüttelkolben über die „kleinen“ Kolonnen auf die „großen“ Kolonnen und späterhin auf die Ergebnisse der Lysimeterversuche des SIWAP-Projektes mittels Prognoserechnungen vornehmen zu können.

Die Kolonnen wurden mit einer Mischprobe sandigen Materials (Kaltwasser – Unterboden), das zuvor mit den Schadstoffen dotiert wurde, beschickt. Eine der „großen“ Kolonnen simuliert ungesättigte, eine zweite gesättigte Bodenverhältnisse. Beide Kolonnen sind mit Acidithiobacilli beimpft. Sterile bzw. nicht beimpfte Vergleichskolonnen wurden nicht mitgeführt.



Berieselte Kolonne:  
ungesättigte Bodenzone

Geflutete Kolonne:  
gesättigte Bodenzone

Messblock mit  
Aufzeichnung von in-  
situ-Parametern

Vorratsgefäß  
Elutionsmittel  
Sickerwasser

Während der Versuchszeit von ca. 3 Jahren wurden pH-Wert, Redoxpotential und Leitfähigkeit mittels Datenlogger aufgezeichnet und 14-tägig Eluatproben analysiert.

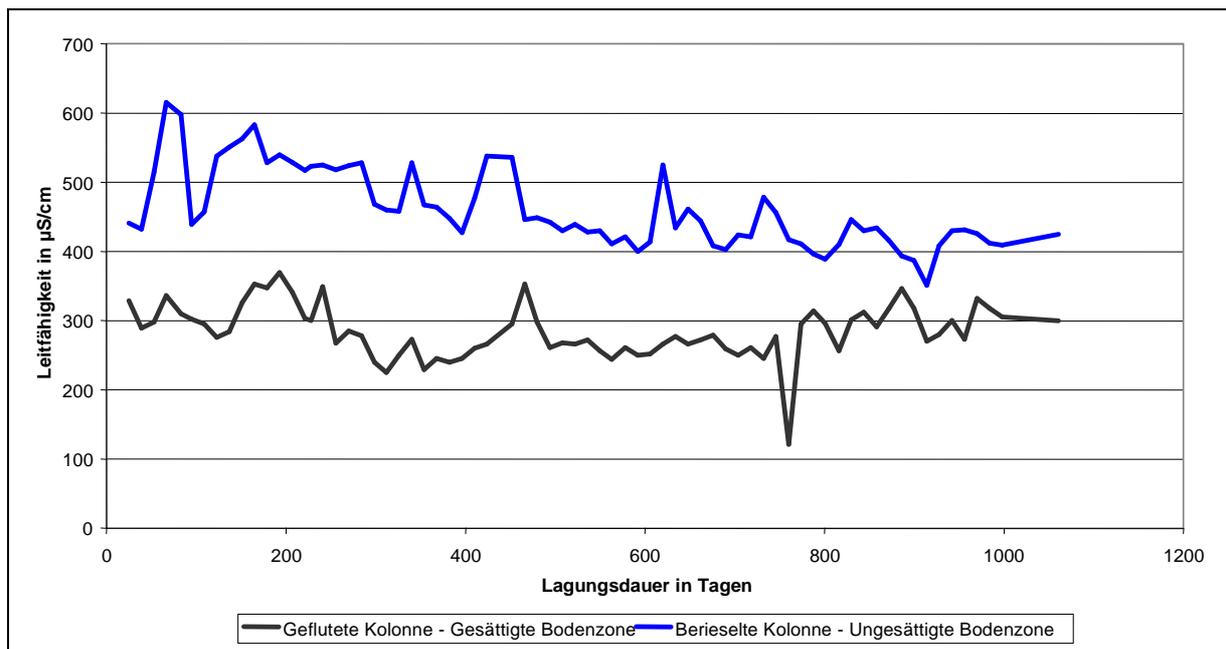
Blick auf die „großen“ Kolonnen

Wie in den kleineren

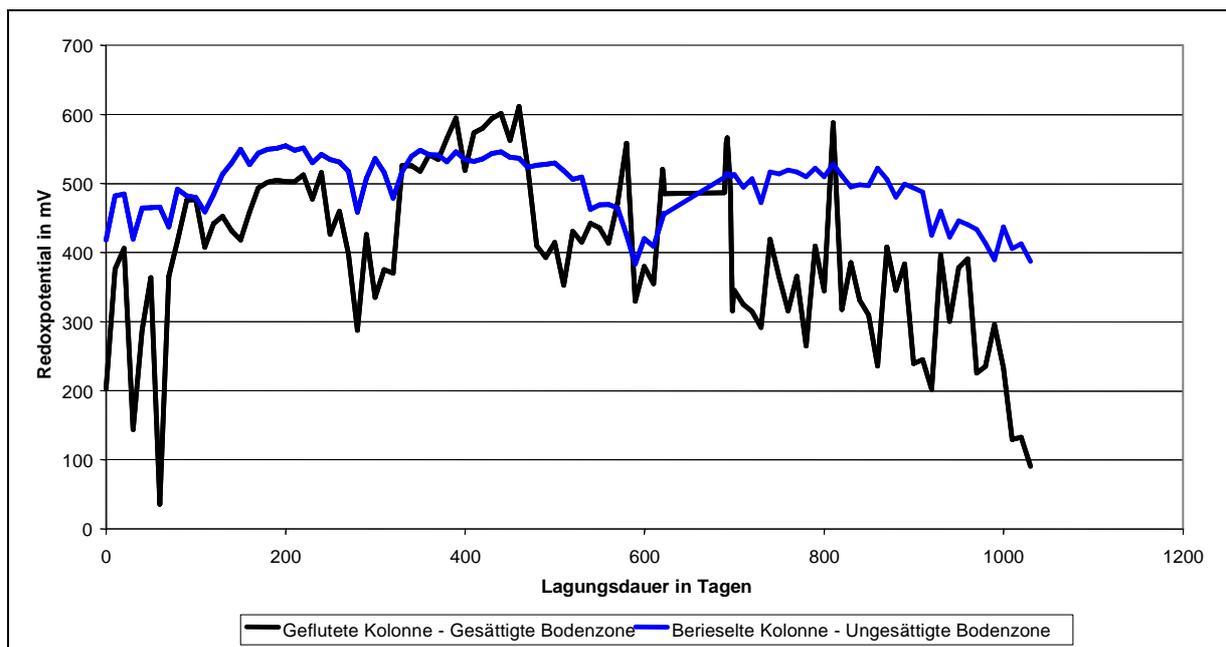
Kolonnen wird für die Elutionsmittelzugabe ein Niederschlag von 1.000 mm nachempfunden und als entsprechende Rate über die Kolonnen mittels Dosierpumpe beaufschlagt.

Die Sauerstofflimitierung führt bei Flutung der gesättigten Kolonne zu keiner Zinkfreisetzung führt, während in der ungesättigten, zeitweise berieselten Kolonne die Zinkfreisetzung bedeutende Konzentrationen erlangt, die bis zum derzeitigen Versuchsstatus andauert. Diese erhöhte Zinkfreisetzung führt auch zu einer höheren Leitfähigkeit des Eluates, während die Sauerstofflimitierung in der gesättigten Kolonne zu niedrigeren Redoxpotentialen führt als in der ungesättigten.

Anlage 4

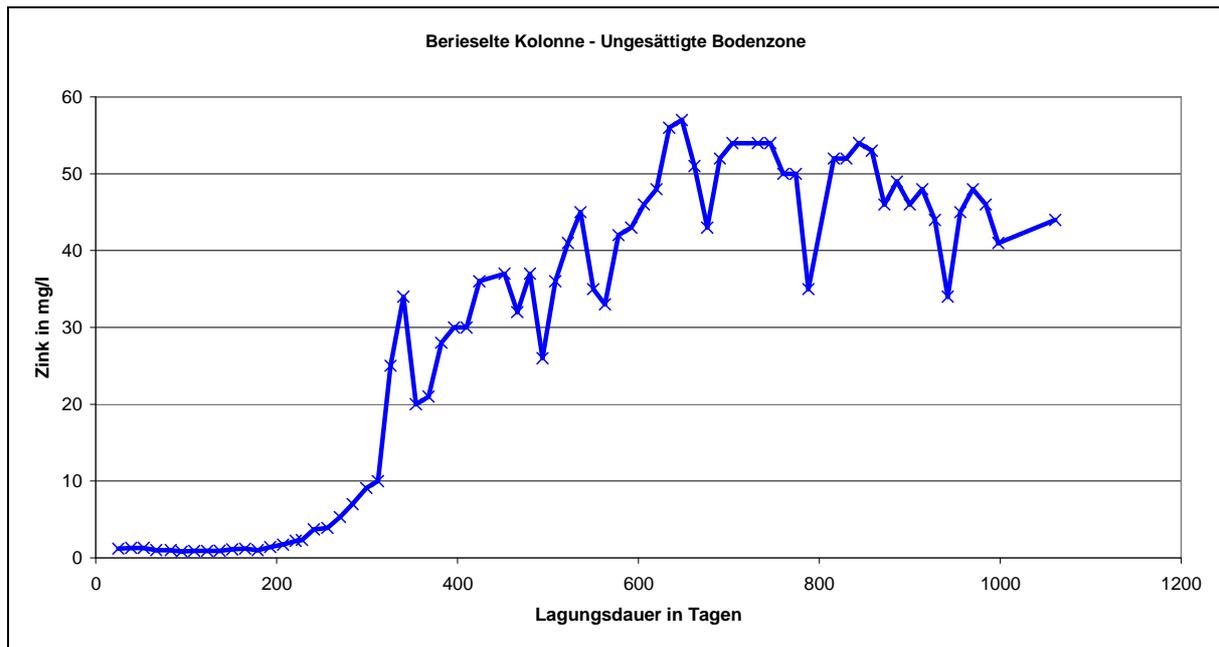


Leitfähigkeit: Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „großen“ Kolonnen, pH-Wert 5, Vergleich gesättigte und ungesättigte Bodenverhältnisse

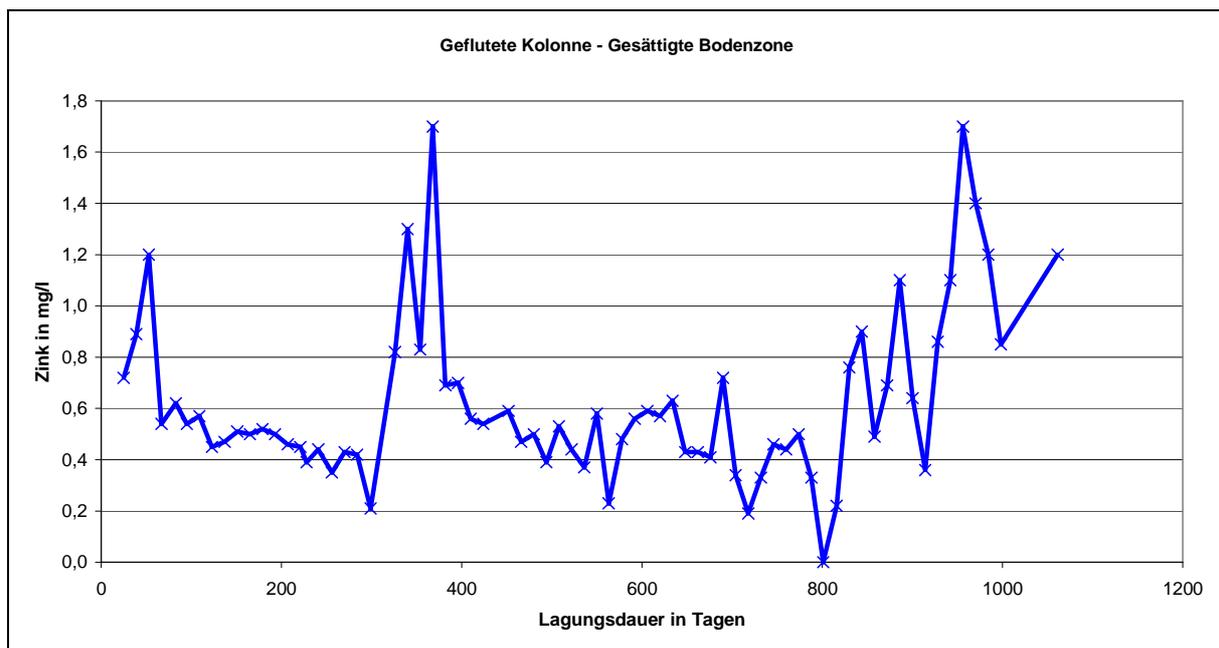


Eh-Wert: Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „großen“ Kolonnen, pH-Wert 5, Vergleich gesättigte und ungesättigte Bodenverhältnisse

Anlage 4



Stofffreisetzungsdynamik Zink am Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „großen“ Kolonnen, pH-Wert 5, ungesättigte Bodenverhältnisse



Stofffreisetzungsdynamik Zink am Material Unterboden Kaltwasser, Laugung mit „großen“ Kolonnen, pH-Wert 5, gesättigte Bodenverhältnisse

**Ergebnisse der Anpassung für das Material Kaltwasser Unterboden (KU)**

Der Zeitverlauf der Konzentrationsentwicklung bei den durchgeführten Schüttelkolbenversuchen wurde bereits ausführlich dargelegt. Bei der Nachrechnung dieser Versuche erfolgte eine Beschränkung auf die Freisetzungskinetik von Zink. Dies ist insbesondere deshalb sinn-

## Anlage 4

voll, weil ZnS im vorliegenden Fall als Hauptenergielieferant für das Wachstum der Mikroorganismenpopulation angesehen werden kann. Damit kann die Kinetik des Wachstums direkt anhand der Zinkkonzentration in Lösung beobachtet werden. Die Freisetzung der weiteren Schwermetalle, insbesondere Blei und Cadmium ist stark an die Freisetzung von Zink entsprechend der Feststoffstöchiometrie gekoppelt. Eine Beeinflussung der Populationsentwicklung ist nicht zu erwarten. Aus der Freisetzungsdynamik wird deutlich, dass sich lediglich Arsen nicht dem durch Zink vorgeprägten Trend entsprechend verhält. Es muss daher vermutet werden, dass die Freisetzung von Arsen nicht an die Populationsentwicklung von *Acidithiobacillus* gekoppelt ist.

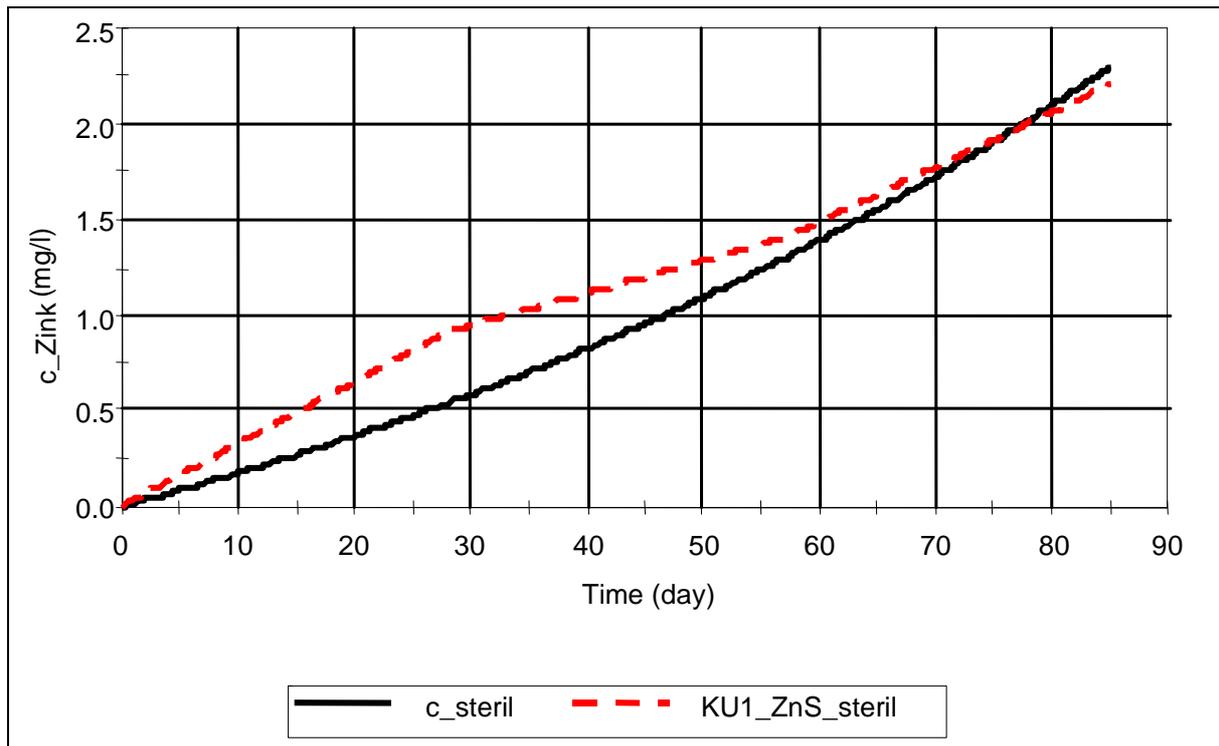
Für die Nachrechnung erfolgte zunächst eine Beschränkung auf die Untersuchungen, bei denen nur Zinkblende zugegeben wurde.

Dieses Substrat wurde bewusst als erstes betrachtet, weil bei diesem an den Experimenten eine sehr deutliche Wachstumsdynamik erkennbar war. Die nachfolgenden Bilder stellen für die

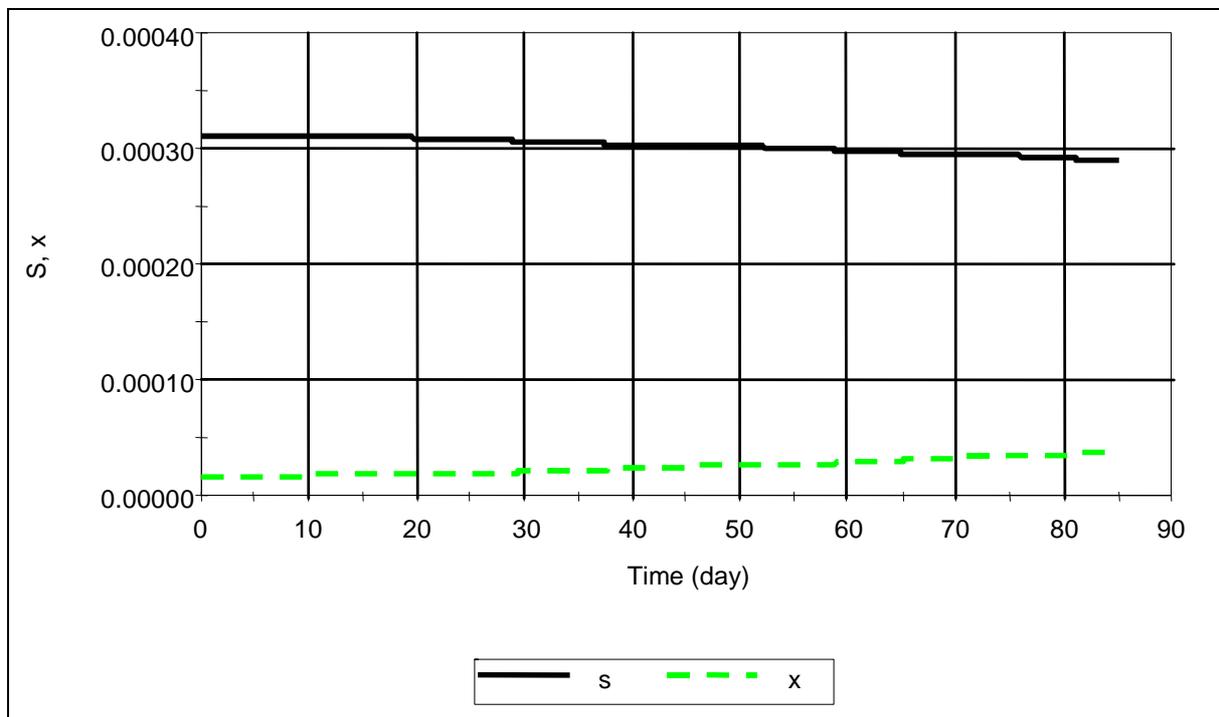
- sterile
- unbeimpfte
- beimpfte

Probe jeweils die zeitliche Entwicklung der Zinkkonzentration im Vergleich zwischen Modell und Experiment dar. Die Modellkurven sind jeweils die durchgezogenen schwarzen Linien. Die unterschiedlich gestrichelten Kurven sind die durch Linien verbundenen experimentellen Konzentrationen. Bei den unbeimpften und den beimpften wurden jeweils zwei Versuchsreihen durchgeführt, während bei den sterilen Proben nur eine untersucht wurde (Begründung siehe oben).

Anlage 4

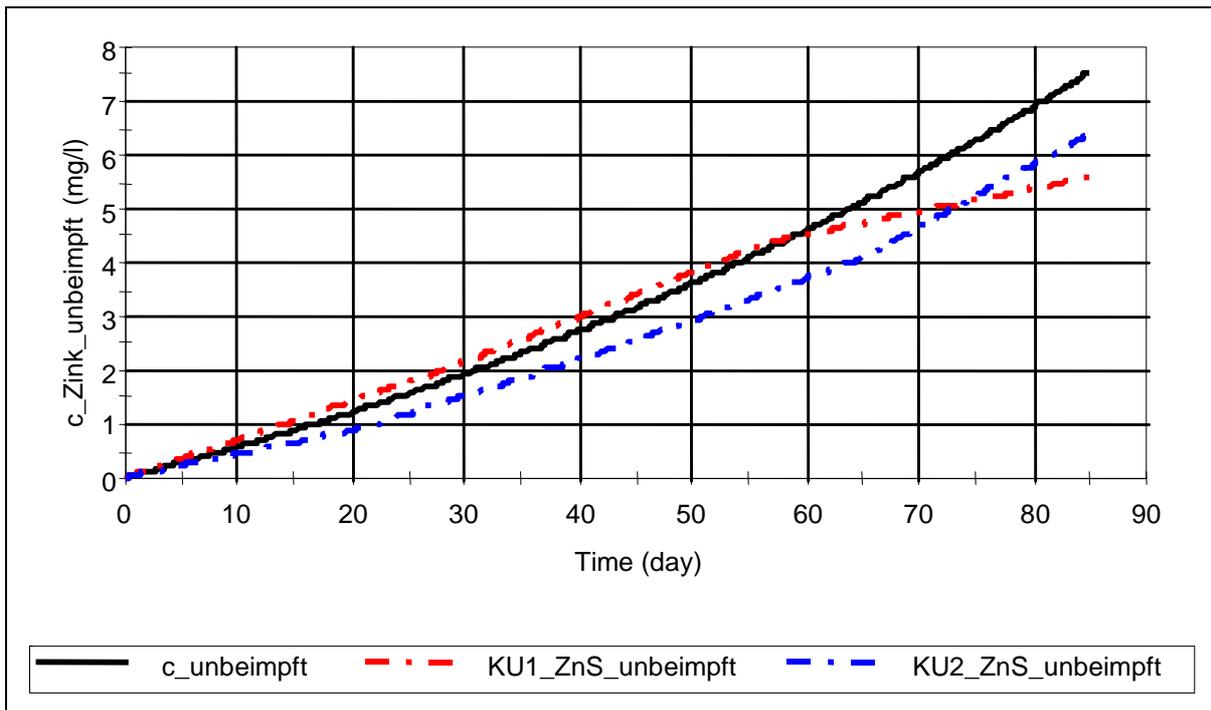


Zeitentwicklung der Zinkkonzentration für die sterile Probe des Materials Kaltwasser Unterboden. Die durchgezogene schwarze Kurve entspricht der Modellanpassung

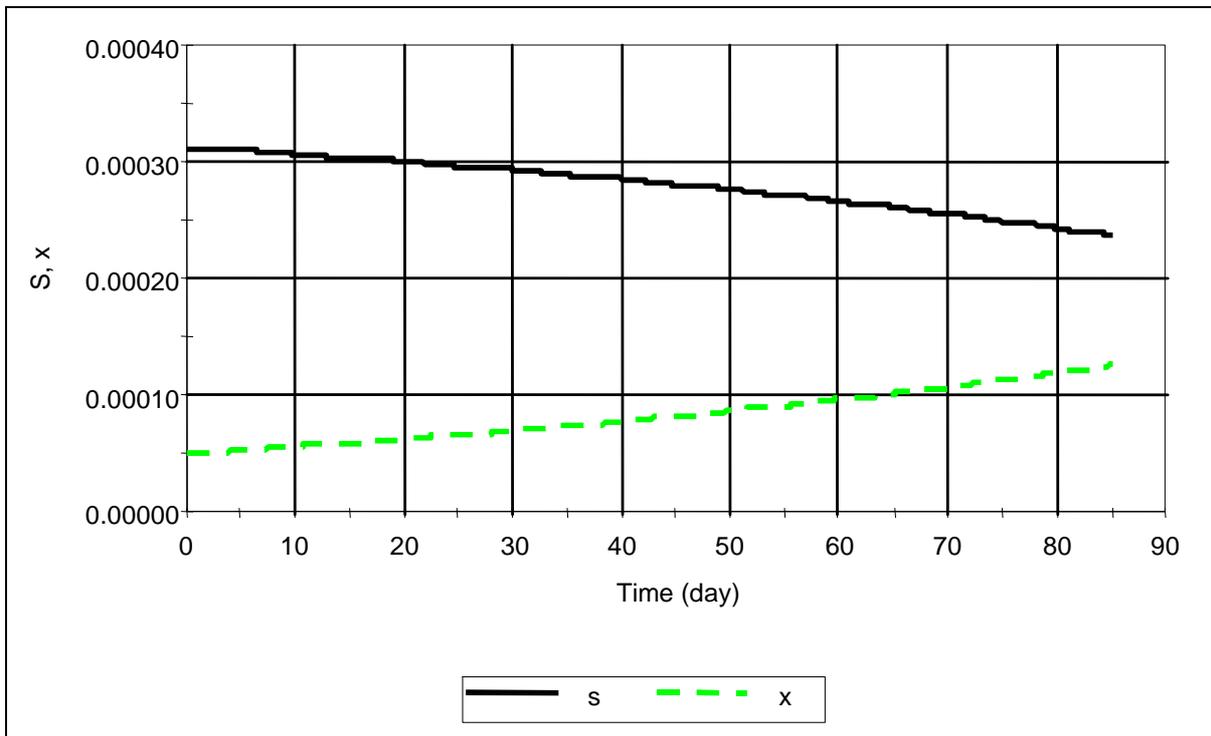


Zeitliche Entwicklung der mit dem Modell berechneten Feststoffgehalte (s) von Zink sowie der auf die Feststoffmasse bezogenen Biomasse (x) für die sterile Probe des Substrats Kaltwasser Unterboden

Anlage 4

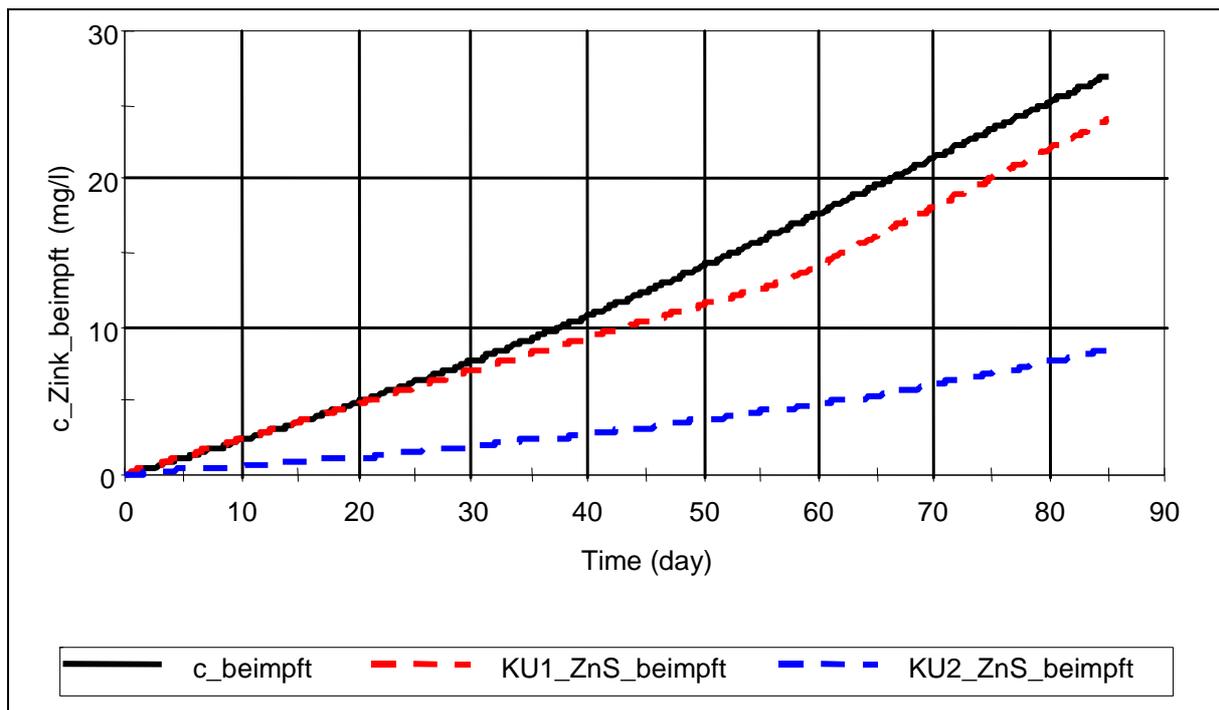


Zeitentwicklung der Zinkkonzentration für die unbeimpfte Probe des Materials Kaltwasser Unterboden. Die durchgezogene schwarze Kurve entspricht der Modellanpassung

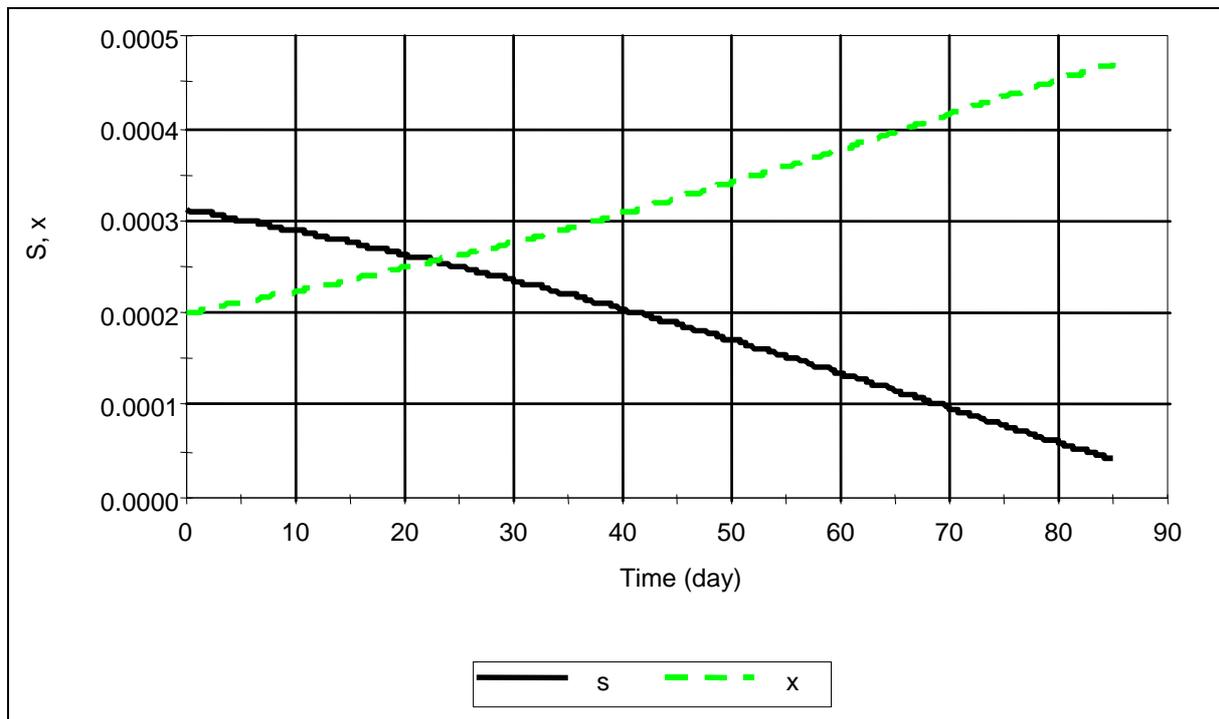


Zeitliche Entwicklung der mit dem Modell berechneten Feststoffgehalte (s) von Zink sowie der auf die Feststoffmasse bezogenen Biomasse (x) für die unbeimpfte Probe des Substrats Kaltwasser Unterboden

Anlage 4



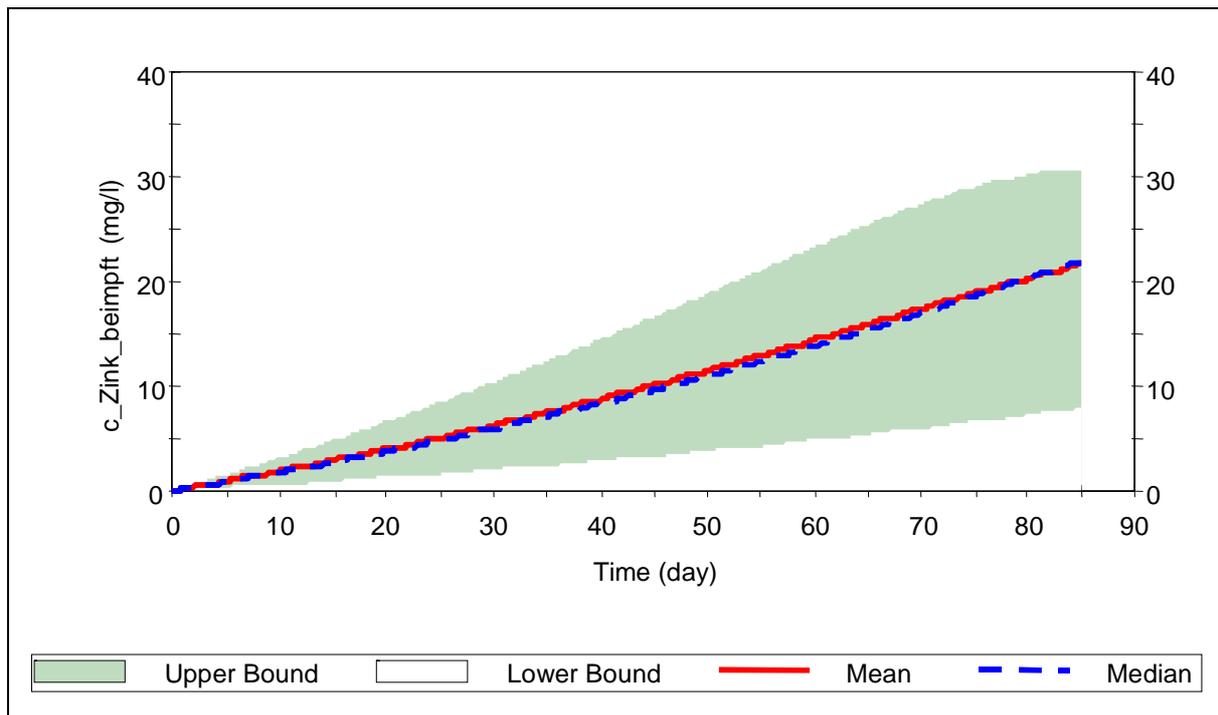
Zeitentwicklung der Zinkkonzentration für die beimpfte Probe des Materials Kaltwasser Unterboden (Die durchgezogene schwarze Kurve entspricht der Modellanpassung.)



Zeitliche Entwicklung der mit dem Modell berechneten Feststoffgehalte (s) von Zink sowie der auf die Feststoffmasse bezogenen Biomasse (x) für die beimpfte Probe des Substrats Kaltwasser Unterboden

Anlage 4

Die Zusammenstellung sämtlicher Versuche zusammen mit den angepassten Modellkurven für das Material Kaltwasser Unterboden ist in nachfolgender Abbildung dargestellt. Deutlich weichen die beobachteten Zeitverläufe der beiden durchgeführten Versuchsreihen erheblich, d.h. etwa um den Faktor 2, voneinander ab. Diese Tatsache lässt sich modelltechnisch über Verteilungsfunktionen der verwendeten Parameter im Zusammenhang mit Monte-Carlo-Verfahren abbilden. Allerdings wird die dafür notwendige Anzahl an Versuchen als nicht ausreichend betrachtet. Die nachfolgende Abbildung soll dies deshalb nur exemplarisch darstellen.



Zeitentwicklung der Zinkkonzentration für die beimpfte Probe des Materials Kaltwasser Unterboden unter Berücksichtigung einer Spannbreite für die Ausgangspopulationsdichte der Mikroorganismen

Im Ergebnis der Nachrechnung der Experimente wurden die in nachfolgender Tabelle zusammengefassten Parameter ermittelt.

Anlage 4

Modellparameter für das Substrat Kaltwasser Unterboden

Parameter	Wert
$\mu_{\max}$	0.0005 h <sup>-1</sup>
$K_s$	30 ppm
$Y$	1
$x_0$ - steril	15
$x_0$ - unbeimpft	50
$x_0$ - beimpft	200

Hier soll nochmals betont werden, dass eine Anpassung des Ertragskoeffizienten  $Y$  und der Ausgangspopulationsdichte  $x_0$  aufgrund von nachfolgender Gleichung nicht unabhängig möglich ist. Deshalb wurde  $Y$  konstant 1 gesetzt und lediglich  $x_0$  angepasst. Wenn  $Y$  aus weiteren Untersuchungen bekannt ist, so ist  $x_0$  lediglich entsprechend zu korrigieren.

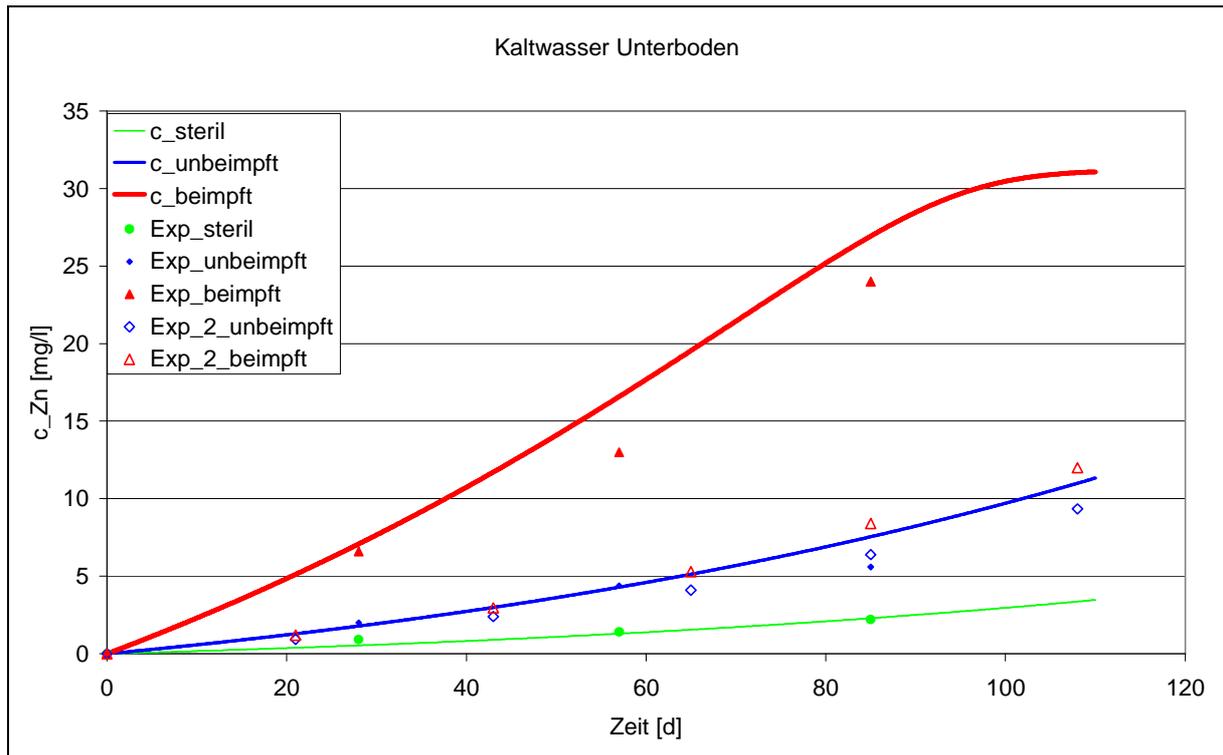
$$-\frac{ds}{dt} = \underbrace{\mu_{\max} * \frac{s}{K_s + s}}_{\text{Zunahme Biomasse}} * \underbrace{\frac{1}{Y} * (x_0 + (s_0 - s)Y)}_{\text{Substratbedarf für Biomasse gesamt}} = \mu_{\max} * s * \frac{\frac{x_0}{Y} + s_0 - s}{K_s + s}$$

Mit den entsprechend der obigen Tabelle ermittelten Parametern wurden auch die Schüttelkolbenversuche für die weiteren Substrate nachgerechnet. Eine Anpassung erfolgte lediglich anhand der Ausgangspopulationsdichte  $x_0$ . Es wurde davon ausgegangen, dass der Ertragskoeffizient  $Y$ , die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  und die Halbsättigungskonstante  $K_s$  lediglich von der Art der Mikroorganismen und von der Energiequelle abhängig sind. Da diese bei allen Schüttelkolbenversuchen mit Zugabe von ZnS identisch waren, wurden diese Parameter konstant angesetzt.

Beim Vergleich der hier ermittelten maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von 0.0005 h<sup>-1</sup> mit dem für ein vergleichbares Substrat aus der Literatur bekannten Werten von ca. 0.004 h<sup>-1</sup> ist ein Unterschied von ca. einer Größenordnung zu konstatieren. Die Ursache für diese Abweichung muss weitergehenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Anlage 4

Grundsätzlich muss jedoch daraus abgeleitet werden, dass das Adaptions- und Wachstumsverhalten der Mikroorganismen von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Dies wurde bereits in [Projektarbeit GEOS 2003] dargestellt. Da es derzeit weder theoretisch noch experimentell gelingt, den Einfluss der einzelnen Faktoren ausreichend zu separieren, ist die Durchführung von Experimenten für das jeweils konkrete Substrat nach Auffassung der Autoren alternativlos.



Vergleich der Modellkurven der Zinkkonzentrationen mit den experimentellen Werten für die verschiedenen Fahrweisen der Schüttelkolbenversuche des Materials Kaltwasser Unterboden