

|  |    |            |        |        |   |
|--|----|------------|--------|--------|---|
| Jh. geol. Landesamt<br>Baden-Württemberg | 33 | S. 263–286 | 4 Abb. | 7 Tab. | Freiburg im Breisgau<br>16. Dezember 1991 |
|--|----|------------|--------|--------|---|

# Mikrobiologischer Uraninabbau

CORNELIA SAYER \*

Uranin, Biodegradation, Grundwasser, Mikroorganismen, Bakterien  
Süddeutschland (Wildberg-Gültlingen), Fuchtbachquelle, Baden-Württemberg  
TK 25: 7318

**Kurzfassung:** An der Fuchtbachquelle (Wildberg-Gültlingen, Kreis Calw) konnte erstmals sicher ein Uraninabbau durch Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Dieser Uraninabbau findet nur unter mikroaeroben bis anaeroben Bedingungen statt. Der Abbau ist in einem Temperaturbereich von 7–25° C sicher nachweisbar, wobei sich mit abnehmender Temperatur das zeitliche Einsetzen des Uraninabbaus verzögert. Eine signifikante pH-Wert-Änderung konnte nicht festgestellt werden. Ein Co-Metabolismus mit anderen organischen Substanzen liegt nicht vor. Deutliche Abnahmen des Sauerstoffgehaltes sind durch Sauerstoffmessungen und Reduktionen von Methylenblau nachweisbar. Die Reprimierung des Uraninabbaus kann mit verschiedenen toxischen Substanzen, Antibiotika, Schwermetallen und Glucose erreicht werden. Das Einsetzen des Uraninabbaus ist an eine Mindestkonzentration von 0,01 bis 0,025 mg Uranin/l gebunden.

Durch UV-Spektralanalysen vor und nach dem Uraninabbau konnte eine Veränderung der Absorptionspeaks festgestellt werden. Für den Uraninabbau sind sehr wahrscheinlich mehrere Bakterienstämme gleichzeitig verantwortlich. Hierzu gehören Pseudomonaden und Flavobakterien sowie nicht näher identifizierbare Stämme.

## [Biodegradation of Uranine]

**Abstract:** For the first time it was possible to prove the biodegradation of uranine at the source of Fuchtbach (Wildberg-Gültlingen/Kreis Calw).

The biodegradation of uranine is caused by the activity of microorganisms and only can happen under microaerobic to anaerobic conditions. The catabolism can surely be proved in a temperature range between 7–25°C and its beginning delays with decreasing temperatures. A significant change of the pH-value could not be realized. A diminution of oxygen was found out because of oxygen measurements and a reduction of methylenblue. A delay in catabolism of uranine can be reached by toxic substances, antibiotics, heavy metals and glucose. The beginning of uranine biodegradation depends on a concentration of at least 0.01–0.025 mg

\* Anschrift des Autors: Dipl.-Geol. C. SAYER, Adlerstr. 40, D-7500 Karlsruhe

urarine/l. A change of the absorption peak of UV-spectral analysis has been ascertained before and after the catabolism. Probably there are different kinds of bacteria which are responsible for the biodegradation of uranine. Pseudomonades, flavobacterias and other not yet identified bacterias belong to these strains.

### [Biodégradation de l'uranine]

**R é s u m é:** A la source du Fuchtbach (Wildberg-Gültlingen/arrondissement de Calw) une biodégradation d'urarine par des microorganismes pouvait être prouvée pour la première fois.

La biodégradation de l'urarine est causée par l'activité des microorganismes et ne se produit que dans des conditions microaérobies à anaérobies. La dégradation est démontrée avec certitude pour des températures entre 7 et 25 °C. A température décroissante le commencement temporel de la dégradation de l'urarine ralentit. Aucune modification significative du valeur pH n'a pu être constatée. Un co-metabolisme avec d'autres substances organiques n'existe pas. Il y a des diminutions notables de la teneur en oxygène. Une suppression de la dégradation de l'urarine peut être obtenue avec de diverses substances toxiques, des antibiotiques, des métaux lourds et de la glucose. Le commencement de la dégradation de l'urarine est lié à une concentration minimum de 0,01–0,025 mg d'urarine/l.

Par des analyses U.V.-spectrales avant et après la dégradation de l'urarine, un changement des pics d'absorption pouvait être constaté. Très probablement, plusieurs souches de bactéries sont simultanément responsables de la dégradation de l'urarine tels que des pseudomonades et des bactéries flavo ainsi que des souches dont une identification précise n'est pas encore possible.

## Inhalt

|   | Seite |
|---|-------|
| 1 Einführung .....                            | 265   |
| 2 Uraninabbau im Fuchtbachquellwasser .....   | 265   |
| 2.1 Untersuchungsgebiet .....                 | 265   |
| 2.2 Markierungsversuch Nr. 713 .....          | 266   |
| 3 Einflußgrößen des Uraninabbaus .....        | 268   |
| 3.1 Untersuchungsmedium Fuchtbachwasser ..... | 268   |
| 3.1.1 Hydrochemie .....                       | 268   |
| 3.1.2 Mikrobiologie .....                     | 270   |
| 3.2 Anaerobe Versuchsbedingungen .....        | 271   |
| 3.3 Temperatur und pH .....                   | 272   |
| 3.4 Redoxbedingungen .....                    | 272   |
| 3.4.1 Redoxindikatoren .....                  | 272   |
| 3.4.2 Sauerstoffmessungen .....               | 273   |
| 3.4.3 Reduktionsmittel .....                  | 274   |
| 3.5 Co-Metabolismus .....                     | 275   |
| 3.6 Reprimierung .....                        | 275   |
| 3.6.1 Ausgewählte toxische Substanzen .....   | 275   |
| 3.6.2 Schwermetalle .....                     | 277   |
| 3.6.3 Antibiotika .....                       | 277   |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.6.4 | Glucose .....  | 278 |
| 4     | Spezielle Versuche zum mikrobiellen Abbau von Uranin ..... | 278 |
| 4.1   | Induktion .....  | 278 |
| 4.2   | Metabolismus .....   | 280 |
| 4.3   | Mikroorganismen .....                                      | 282 |
| 5     | Diskussion .....   | 284 |
|       | Literatur .....  | 286 |

## 1 Einführung

Der Fluoreszenzfarbstoff Uranin ist der bekannteste und am häufigsten eingesetzte Markierungsstoff bei hydrogeologischen Untersuchungen. Das ist auf seine Eigenschaften wie sehr gute Wasserlöslichkeit, chemische Resistenz, geringe Sorptionsneigung im Untergrund und Ungefährlichkeit für Mensch und Umwelt (KÄSS 1964) zurückzuführen. Deshalb wurde Uranin lange Zeit als idealer Markierungsstoff angesehen.

Das Geologische Landesamt Baden-Württemberg führt jedes Jahr zahlreiche Markierungsversuche mit Uranin durch. Beim Markierungsversuch Nr. 319 (Aalen-Ebnat vom 28. Juni 1982) wurden Diskrepanzen zwischen den Farbbeobachtungen vor Ort und den im Labor bestimmten Meßwerten festgestellt, die den Verdacht auf einen Uraninabbau zwischen Probenahme und Analyse aufkommen ließen.

Schon LUKAS (1959) erwähnte den Uraninabbau, der durch die Tätigkeit im Wasser lebender Mikroorganismen, vor allem nitrifizierender Bakterien, hervorgerufen werden sollte.

In meiner Diplomarbeit konnte ich in dem ausgesuchten Testgebiet an der Fuchtbachquelle (Wildberg-Gültlingen) einen mikrobiellen Uraninabbau nachweisen. Mit Unterstützung des Geologischen Landesamts wurden weiterführende Untersuchungen über mögliche Einflußfaktoren eines solchen Abbaus durchgeführt.

Der Verdacht erhärtete sich beim Färbeversuch Nr. 657 (Wildberg-Gültlingen vom 5.5.1986), als nach einer deutlich sichtbaren Grünfärbung des Wassers der Fuchtbachquelle kein entsprechender fluorimetrischer Nachweis des Uranins erbracht werden konnte. Beim Nachversuch Nr. 711 am 8.1.1987 wurde ein Fluoreszenzverlust im Labor bestätigt.

Unter Uraninabbau ist **nicht** die Verwertung des Uranins als Kohlenstoffquelle und dessen Metabolismus zu niedermolekularen Substanzen zu verstehen. Der Begriff Abbaubarkeit wurde vielmehr als Synonym für den raschen Fluoreszenzverlust des Uranins benutzt.

## 2 Uraninabbau im Fuchtbachquellwasser

### 2.1 Untersuchungsgebiet

Die Fuchtbachquelle liegt auf der zur Stadt Wildberg-Gültlingen (Kreis Calw) gehörenden Gemarkung. (Abb. 1). Dieses Gebiet gehört landschaftlich zum Heckengäu, dem

Übergangsbereich zwischen dem Schwarzwald im Nordwesten und den eigentlichen Gäuflächen im Südosten. Als Ablagerungen finden sich der Obere Buntsandstein, der Muschelkalk und das Quartär.

Der Obere Muschelkalk und der Mittlere Muschelkalk sind zusammen der Hauptgrundwasserleiter, den 2. Grundwasserleiter bilden die Orbicularisschichten (mu3). Die Hauptquellaustritte (Fuchtbachquelle) sind an den Mittleren Muschelkalk gebunden. Bei den Wässern handelt es sich um ausgeprägte Calcium-Hydrogencarbonat-Wässer mit pH-Werten zwischen 7,1 und 7,4.

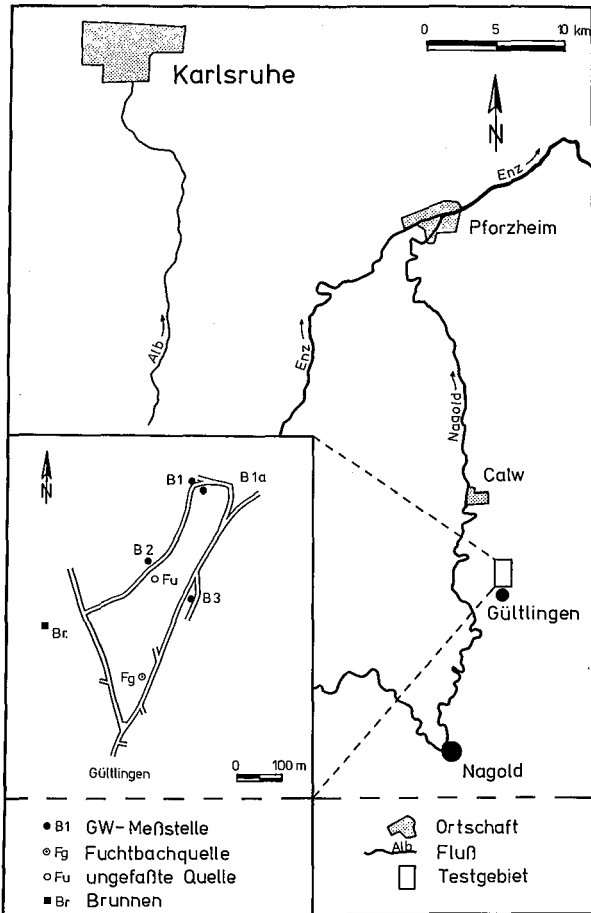


Abb. 1: Lage des Untersuchungsgebiets

## 2.2 Markierungsversuch Nr. 713

Der am 24.8.1987 von mir an der Fuchtbachquelle durchgeführte Markierungsversuch

Nr. 713 diente der genaueren Untersuchung eines möglichen Abbaus des Fluoreszenzfarbstoffes Uranin.

In die Grundwassermeßstelle B3 (Abb. 1) wurde 0,5 kg Uranin in gelöster Form eingegeben, Probeentnahmestelle war die Fuchtbachquelle. In den Wasserproben konnten bereits 7 h nach der Einspeisung die ersten Farbstoffspuren nachgewiesen werden, und es ergab sich eine typische Farbdurchgangskurve (Abb. 2a). Die erste Probenuntersuchung fand 2 oder 3 Tage nach der Entnahme statt.

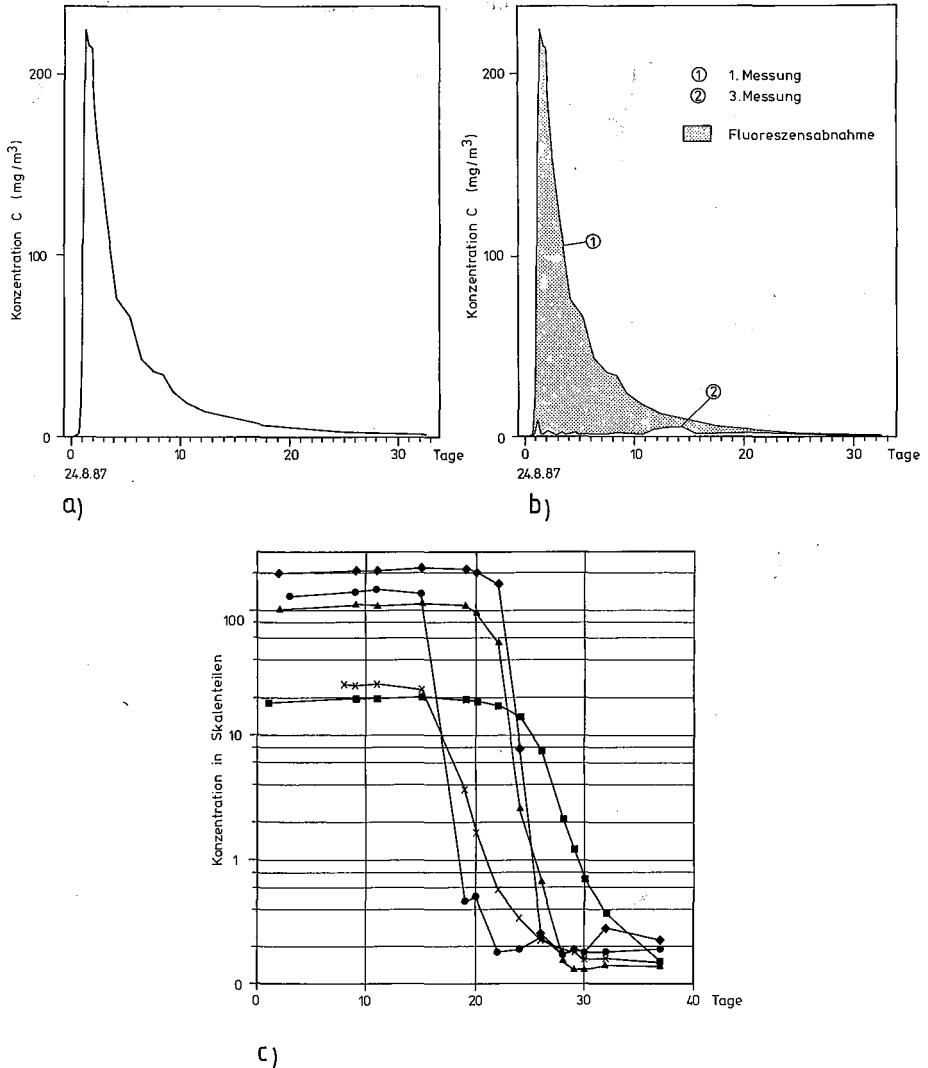


Abb. 2: Farbdurchgangskurve (a), Uraninabnahme Gesamtproben (b) und Einzelproben (c)

Die Untersuchung der Proben erfolgte im Institut für Angewandte Geologie der Universität Karlsruhe mittels des Spektralfluorimeters Perkin Elmer LS-3. Als Meßprinzip lag das Synchron-Scan-Verfahren (BEHRENS 1971) zugrunde. Die Nachweisgrenze liegt bei  $7 \cdot 10^{-6}$  mg/l Uranin (Labor Karlsruhe).

Um einen Überblick über den möglichen Fluoreszenzverlust zu erhalten, wurden 5 Proben aus der Gesamtprobenserie (bestehend aus 67 Einzelproben) ausgewählt: zwei Proben aus dem aufsteigenden Ast der Durchgangskurve, die Probe mit dem maximalen Gehalt an Uranin und zwei Proben aus dem absteigenden Ast der Durchgangskurve. Diese Proben wurden in einem engen zeitlichen Abstand fluorimetrisch auf ihren Gehalt an Uranin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß erst nach einer gewissen Stehzeit der Proben im Labor ein Abbau des Uranins beginnt. Die Proben des absteigenden Astes zeigten eine Fluoreszenzabnahme bereits 12 Tage nach der Probeentnahme, die Probe mit dem maximalen Uraningehalt nach 20 Tagen und die beiden Proben des aufsteigenden Astes nach 21 bzw. 26 Tagen. Nach 36 Tagen wurden alle Proben nochmals untersucht, und es ließen sich jetzt Fluoreszenzverluste von 96–99% im Vergleich zur ersten Probenuntersuchung nachweisen. Das bedeutet, daß innerhalb von 36 Tagen ein fast vollständiger Uraninabbau stattgefunden hat. Die Konzentrationsabnahmen der Gesamtproben und der ausgewählten Einzelproben sind in Abb. 2b und 2c aufgezeichnet.

Da mit einem mikrobiellen Uraninabbau von Beginn an gerechnet worden war, wurde bei der Entnahme ein Teil der Proben doppelt genommen und diese mit 1 ml Formaldehyd 35% versetzt. Das Formaldehyd wirkt bakterizid. Bei diesen Proben, die im gleichen Zeitabstand wie die Gesamtproben untersucht wurden, ergaben sich keine bedeutenden Uraninverluste.

Bemerkenswert ist die Feststellung, daß erst oberhalb einer gewissen Schwellenkonzentration ein Abbau einsetzt. Bei den Blindproben des Versuchs 713 (24. August 1987) war eine Grundlast an Uranin vom Versuch 711 vom 8. Januar 1987 vorhanden, die keinem Abbau mehr unterlag. Die folgende Farbstoffwelle des Versuchs 713 wurde dagegen bis zu dieser Grundlast und teilweise noch darunter abgebaut.

### **3 Einflußgrößen des Uraninabbaus**

#### **3.1 Untersuchungsmedium Fuchtbachwasser**

##### **3.1.1 Hydrochemie**

Interessant erschien es nun, in Laborversuchen die Einflußgrößen und die daraus resultierenden Rahmenbedingungen für einen Uraninabbau herauszufinden. Dabei ist vorzusetzen, daß der Begriff Uraninabbau nicht in streng mikrobiologischem Sinne verwendet wurde.

Das Fuchtbachwasser wurde im Untersuchungszeitraum (November 1988–Mai 1990) zweimal einer hydrochemischen Analyse unterzogen. Diese Analysen wurde vom Chemischen Labor des Geologischen Landesamtes Freiburg durchgeführt (Tab. 1).

Das Wasser der Fuchtbachquelle entstammt dem Mittleren Muschelkalk. Deutlich ausgeprägt ist somit die Dominanz der Erdalkalien Calcium und Magnesium bei den Kationen sowie des Hydrogencarbonats und Sulfats bei den Anionen.

Tab. 1: Chemische Analysen des Fuchtbachwassers

|                     | Oktober 1989              | Februar 1990              |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| T                   | 9,3 °C                    | 9,1 °C                    |
| pH                  | 7,3                       | 7,3                       |
| ELF                 | 807 µS/cm                 | 721 µS/cm                 |
| O <sub>2</sub>      | 10,60 mg/l                | 10,00 mg/l                |
| CO <sub>2</sub>     | 33,00 mg/l                | 26,40 mg/l                |
| F                   | 0,13 mg/l                 | 0,15 mg/l                 |
| SiO <sub>2</sub>    | 6,00 mg/l                 | 9,50 mg/l                 |
| HBO <sub>2</sub>    | 0,03 mg/l                 | 0,06 mg/l                 |
| CSB (Mn-VII, sauer) | 0,40 mg O <sub>2</sub> /l | 0,72 mg O <sub>2</sub> /l |
| Gesamthärte :       | 8,30 mmol (eq)/l          | 8,14 mmol (eq)/l          |
| Carbonathärte:      | 6,53 mmol (eq)/l          | 6,12 mmol (eq)/l          |

Kationen: alle Angaben in mmol (eq)/l

|                 |      |      |
|-----------------|------|------|
| Na              | 0,22 | 0,22 |
| K               | 0,03 | 0,02 |
| NH <sub>4</sub> | 0,01 | 0,00 |
| Ca              | 6,84 | 7,04 |
| Mg              | 1,46 | 1,10 |
| Fe              | 0,00 | 0,00 |
| Mn              | 0,00 | 0,00 |
| Summe           | 8,56 | 8,38 |

Anionen: alle Angaben in mmol (eq)/l

|                  |      |      |
|------------------|------|------|
| HCO <sub>3</sub> | 6,53 | 6,12 |
| Cl               | 0,48 | 0,44 |
| NO <sub>3</sub>  | 0,19 | 0,17 |
| NO <sub>2</sub>  | 0,00 | 0,00 |
| SO <sub>4</sub>  | 1,77 | 1,33 |
| HPO <sub>4</sub> | 0,00 | 0,00 |
| Summe            | 8,97 | 8,06 |

### 3.1.2 Mikrobiologie

Die Temperatur des Fuchtbachwassers beträgt im Mittel  $9,3^{\circ}\text{C}$ . Bei der im Fuchtbachwasser vorhandenen Population handelt es sich überwiegend um psychrophile Bakterien, deren optimale Wachstumsbedingungen zwischen  $10$  und  $20^{\circ}\text{C}$  liegen (RHEINHEIMER 1985). Neben der Temperatur ist auch der pH-Wert bedeutsam. Das pH-Optimum für das Wachstum der Bakterien befindet sich zwischen  $6,5$  und  $8,5$ ; im Fuchtbachwasser liegt der pH-Wert bei  $7,1-7,4$ .

#### Keimzahlbestimmung

Im Fuchtbachwasser wurde im Untersuchungszeitraum monatlich die Lebendkeimzahl bestimmt. Darunter ist die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) insgesamt zu verstehen, vgl. Abb. 3.

Mit diesem Verfahren konnte jedoch nicht die vollständige natürliche Mischpopulation im Wasser erfasst werden.

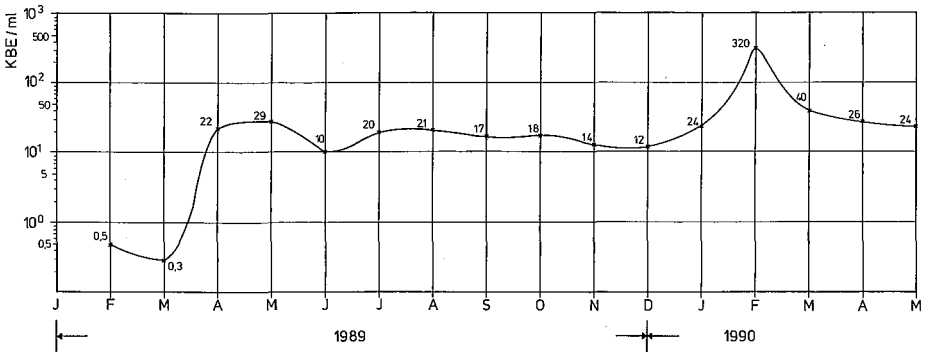


Abb. 3: Anzahl koloniebildender Einheiten im Fuchtbachwasser

#### Identifizierung der Mikroorganismen

Von den auf CPS-(Casitone-Pepton-Stärke) und PYE-Agar (Pepton-Hefeextrakt) gewachsenen Kolonien wurden durch mehrmaliges Ausstreichen Reinkulturen gezüchtet und versucht, diese aufgrund morphologischer, biochemischer und physiologischer Merkmale zu identifizieren.

Anhand dieser Untersuchungen konnten die Bakterien weitestgehend klassifiziert werden. Es herrschten Gram-negative, sporenlose Stäbchen vor. Gram-positive Formen konnten nicht nachgewiesen werden.



Die am häufigsten vertretenen Kolonien sind zur Gattung *Pseudomonas* zu rechnen. Die meisten Pseudomonaden gehören zur *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe mit biovar I, II, III und IV. Desweiteren konnten *Ps. putida* und *Ps. chlororaphis* identifiziert werden. Nicht näher bestimmbar, aber ebenfalls zu den Pseudomonaden gehörende Spezies sind unter *Pseudomonas* sp. zusammengefaßt worden.

Die Familie der Enterobacteriaceae ist durch die Gattungen *Hafnia* mit *H. alvei* und *Serratia* mit *S. marcescens* vertreten.

Die Gattung *Alcaligenes* ist mit *A. paradoxus* vorhanden. (Die Familienzugehörigkeit der Gattung ist unbekannt.)

Daneben sind die Gattungen *Cytophaga* (Fam. Cytophagales) sowie *Janthinobacterium lividum* zu finden.

Zu erwähnen sind auch die Flavobakterien mit *Flavobacterium aquatile*, vermutlich *Fl. ferrugineum* und ein nicht näher identifizierbares *Flavobacterium* sp.

Einige Kulturen sind mit den herkömmlichen Testverfahren jedoch nicht bestimmbar gewesen, da sie auf den für die Tests relevanten Nährmedien kein Wachstum zeigten. Auch ließen sich einige Bakterienstämme nicht mit den verwendeten Nährmedien in Kultur nehmen.

### 3.2 Anaerobe Versuchsbedingungen

Der Uraninabbau fand bisher immer in geschlossenen Glasflaschen statt. Es stellte sich nun die Frage, ob nur unter diesen Bedingungen ein Abbau stattfinden kann.

Hierzu wurden 3 Fuchtbachquellwasserproben mit jeweils 1 mg/l Uranin beimpft. Die Probe 1 wurde luftdicht verschlossen (anaerobe Bedingungen), die Probe 2 befand sich in einem Kolben mit einem luftdurchlässigen Zellstoffstopfen (aerob) und die Probe 3 wurde autoklaviert. Alle drei Versuchsansätze wurden unter gleichen und gleichbleibenden Bedingungen, in Alufolie verpackt, bei 25 °C inkubiert. Sämtliche Proben waren deutlich sichtbar grün gefärbt.

Nach 22 Tagen hatte sich die anaerob inkubierte Probe sichtbar entfärbt. Durch Konzentrationsmessungen (Spektralfluorimeter Perkin Elmer LS-3) konnte dies bestätigt werden. Insgesamt wurden 15 vollständige Wiederholungen dieser Versuchsreihe durchgeführt. Die Konzentrationswerte einer Versuchsreihe sind in Tab. 2 angegeben. Bei den Wiederholungen wurden keine Konzentrationsmessungen durchgeführt, sondern nur noch ein sichtbarer Abbau des Uranins vermerkt. Das Ergebnis lautete:

|               |  |
|---------------|--|
| anaerob:      | in allen 15 Wiederholungen kam es in Zeiträumen von 20–30 Tagen zu einem deutlich sichtbaren Uraninabbau |
| aerob:        | kein Abbau in allen 15 Versuchen   |
| autoklaviert: | kein Abbau in allen 15 Versuchen   |

Tab. 2: Konzentrationswerte von Uranin-Fuchtbachwasser [in Skalenteilen]

| Fuchtbachwasser | 1. Tag | 22. Tag | 121. Tag |
|-----------------|--------|---------|----------|
| anaerob         | 3530   | 26      | —        |
| aerob           | 3420   | 3218    | 3091     |
| autoklaviert    | 3518   | 3395    | 3210     |

### 3.3 Temperatur und pH

Der Uraninabbau konnte bei Temperaturen von 20–25 °C sicher nachgewiesen werden. Es wurden daraufhin Fuchtbachwasserproben mit einer Uraninkonzentration von 1 mg/l bei 7°, 25°, 30° und 37 °C inkubiert. Erwartungsgemäß entfärbte sich die bei 25 °C inkubierte Probe nach 26 Tagen. Bei den weiteren Proben konnte zu diesem Zeitpunkt keine sichtbaren Veränderungen festgestellt werden. Diese wurden weiterhin unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Nach insgesamt 117 Tagen entfärbte sich auch die bei 7 °C inkubierte Probe, während die beiden anderen Proben weiterhin konstante Uraninkonzentrationen aufwiesen. Nach 10monatiger Inkubationszeit zeigte sich bei den noch verbliebenen beiden Proben keine sichtbare Veränderung.

Die nach der Uraninabnahme in verschiedenen Proben gemessenen pH-Werte schwankten zwischen 6,2 und 8,4. Die Veränderung des pH-Wertes wurde nicht durch den Uraninabbau hervorgerufen. Geringe pH-Werte von 6,2 und 6,8 wurden insgesamt nur 2 mal gemessen. Alle anderen pH-Werte lagen wesentlich höher.

### 3.4 Redoxbedingungen

#### 3.4.1 Redoxindikatoren

Zur Feststellung der Redoxbedingungen wurden zwei Reduktionsindikatoren für biologische und biochemische Prozesse, Methylenblau und Triphenyltetrazoliumchlorid, im Fuchtbachwasser untersucht. Beide Reduktionen äußern sich in Farbreaktionen.

Versuchsansatz:

15 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen  
Substanz der Konzentration 0,01 % und 0,001 % in der Lösung vorliegend  
Kontrollprobe mit 1 mg Uranin/l im Fuchtbachwasser  
Inkubation bei 25 °C  
mit Alufolie abgedeckt

Insgesamt 12 mit Methylenblau versehene Fuchtbachwasserproben entfärbten sich in einem Zeitraum von 20–25 Tagen. Bei 6 weiteren untersuchten Proben ergab sich keine Reaktion.

Bei Triphenyltetrazoliumchlorid konnte in keiner Probe eine Reaktion beobachtet werden.

Das Methylenblau wird in einem rH-Bereich von 13,5–15,5 reduziert. Nach HÖLTING (1989) wird das Milieu als „vorwiegend schwach reduzierend“ bezeichnet. Um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, wurden weitere Redoxindikatoren untersucht. Indigotetrasulfonat für einen rH-Wert von 11,5–13,5 sowie Indigotrisulfonat für einen rH-Bereich von 9,5–12. Auch diese beiden Indikatoren zeigen noch schwach reduzierendes Milieu an. Der Versuchsansatz ist derselbe wie oben beschrieben.

In keinem der mit diesen Redoxindikatoren versehenen Versuchsröhrchen zeigte sich eine Entfärbung dieser Farbstoffe.

### 3.4.2 Sauerstoffmessungen

Des weiteren wurden Sauerstoffmessungen mit dem Bachofer Sauerstoffmeßgerät Nr. 409 durchgeführt.

Die Probemenge betrug jeweils 2 ml und die Versuche fanden bei 25 °C und Atmosphärendruck statt. Da dieser von Tag zu Tag schwankt, sind leichte Diskrepanzen beim Vergleich der gemessenen Sauerstoffwerte möglich. Es wurde der Sauerstoffgehalt im Fuchtbachwasser vor und nach dem Uraninabbau bestimmt. Als Kontrollprobe diente eine nicht mit Uranin versetzte Fuchtbachwasserprobe. Die frischen Proben wurden zuerst 24 h bei 25 °C inkubiert, um Fehlerquellen, hervorgerufen durch Temperaturunterschiede, zu vermeiden. Die Probenflaschen wurden luftdicht verschlossen (Zudrehen der Verschlusskappe) und blieben die Versuchszeit über im Brutschrank bei 25 ° in Ruhe stehen. Die Probemengen wurden für die Messungen abpipettiert.

Nach 24 h Inkubation bei 25 °C betrug der Sauerstoffgehalt im Fuchtbachwasser, mit und ohne Uranin, 2,27 mg/l. Nach dem Uraninabbau lagen die Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0,02 und 0,63 mg/l. Die Abnahme des Sauerstoffgehaltes über den Zeitraum des Uraninabbaus betrug zwischen 72 und 99%. Die Proben, denen kein Uranin zugesetzt worden war, zeigten im gleichen Zeitraum ebenfalls eine deutliche Sauerstoffabnahme. Die Konzentrationswerte betrugen zwischen 1,02 und 0,038 mg/l, was einem Sauerstoffverlust von 38–98% entspricht.

In beiden Versuchsansätzen, mit jeweils insgesamt 10 Proben, wurde also eine deutliche Abnahme des Sauerstoffgehaltes über den gleichen Zeitraum festgestellt.

Tab. 3: Sauerstoffkonzentration (mg/l) im Fuchtbachwasser

Versuchsansatz 1 – Fuchtbachwasser mit Uranin; Versuchsansatz 2 – Fuchtbachwasser ohne Uranin  
(jeweils 10 Proben)

| Probe | nach 24 h | nach dem Uraninabbau |       |
|-------|-----------|----------------------|-------|
| 1     | 2,27      | 0,038                | 0,075 |
|       |           | 0,027                | 0,215 |
|       |           | 0,630                | 0,310 |
|       |           | 0,260                | 0,095 |
|       |           | 0,020                | 0,260 |
| 2     | 2,27      | 1,020                | 0,430 |
|       |           | 0,200                | 0,210 |
|       |           | 0,038                | 0,054 |
|       |           | 0,320                | 0,075 |
|       |           | 0,450                | 0,320 |

### 3.4.3 Reduktionsmittel

Die Reduktionen von Methylenblau sowie die Sauerstoffmessungen im Fuchtbachwasser zeigen, daß sich im Verlaufe der Stehzeit der Proben schwach reduzierende Bedingungen einstellen.

Mit dem Reduktionsmittel 1,4 Dithio-DL-threitol wurden diese reduzierenden Bedingungen schon zu Versuchsbeginn geschaffen und der Uraninabbau unter diesen Bedingungen beobachtet.

Versuchsansatz:

10 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen

1 mg/l Uranin

Dithiothreitol 1 mM (mmol/l)

Kontrollproben mit 1 mg Uranin/l im Fuchtbachwasser

es wurde frisches und schon mehrfach entfärbtes Fuchtbachwasser verwendet

jeweils 10 Versuchsröhrchen pro Ansatz

Inkubation bei 25°C

mit Alufolie abgedeckt

Die Kontrollprobe des schon zuvor mehrfach entfärbten Fuchtbachwassers zeigte nach 6 Tagen einen sichtbaren Uraninabbau. Zu diesem Zeitpunkt war in den mit 1,4 Dithio-DL-threitol versetzten Proben noch eine deutliche Grünfärbung vorhanden. Auch nach mehrmonatiger Inkubation konnte kein Uraninabbau in den mit 1,4 Dithio-DL-threitol versetzten Fuchtbachproben nachgewiesen werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei den frischen Fuchtbachwasserproben.

### 3.5 Co-Metabolismus

Der Abbau des Uranins erfolgt unter unbeeinflussten Bedingungen innerhalb von 20–30 Tagen. Mit der Zugabe von verschiedenen organischen Substanzen wurde die Möglichkeit eines Co-Metabolismus untersucht. Co-Metabolismus bedeutet, daß durch die Gegenwart einer weiteren organischen Substanz eine andere, in diesem Fall Uranin, rascher umgesetzt werden kann.

Für diesen Versuch wurden organische Stoffe verwendet, die von den meisten Bakterien verwertet werden können.

Versuchsansatz:

15 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen

Uraninkonzentration 1 mg/l

organische Substanz: Glucose, Kaliumacetat, Pepton, Hefe, Lactose

in folgenden Konzentrationen in der Lösung vorliegend: 0,01 % und 0,001 %

Kontrollprobe mit 1 mg Uranin/l im Fuchtbachwasser

Inkubation bei 25°C

mit Alufolie abgedeckt

Die Kontrollprobe entfärbte sich nach 31 Tagen vollständig, während die mit organischen Substanzen versetzten Proben noch deutlich sichtbar grün gefärbt waren; ein Co-Metabolismus war nicht vorhanden. Dabei wies die Probe mit einer Lactosekonzentration von 0,001 % nach 70 Tagen, die mit Glucose 0,001 % versetzte Probe einen Uraninabbau nach 118 Tagen auf. Nach 9monatiger Inkubation war in den noch verbliebenen Versuchsröhrchen kein sichtbarer Uraninabbau eingetreten.

### 3.6 Reprimierung

#### 3.6.1 Ausgewählte toxische Substanzen

Die Reprimierung des Uraninabbaus wurde mit toxischen Substanzen, Schwermetallen, Antibiotika und Glucose versucht. Einige dieser Stoffe sind Enzymgifte und können die Bioaktivität und somit den Umsatz von Substraten hemmen.

Folgende toxische Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Wirksamkeit getestet: Formaldehyd, Sublimat, Hypochlorid und Phenol.

Versuchsansatz:

10 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen

Uraninkonzentration von 1 mg/l

toxische Substanzen in folgenden Konzentrationen in der Lösung:

|              |      |       |        |         |          |
|--------------|------|-------|--------|---------|----------|
| Formaldehyd: | 3,5% | 0,35% | 0,035% | 0,0035% | 0,00035% |
| Sublimat:    | 0,1% | 0,01% | 0,001% | 0,0001% |          |
| Hypochlorid: | 0,1% | 0,01% | 0,001% | 0,0001% |          |
| Phenol:      | 0,1% | 0,01% | 0,001% | 0,0001% |          |

Inkubation bei 25 °C  
mit Alufolie abgedeckt

Während eines Zeitraumes von 4 Wochen hatte sich in keinem der Versuchsröhrchen eine Entfärbung gezeigt. Deshalb wurden CPS-Agar-Platten mit Verdünnungsausstrichen aus den einzelnen Röhrchen beimpft und bei 25 °C inkubiert. Nach 72 h Inkubation ergab sich folgendes Bild:

Sublimat wirkte als einzige Substanz bei einer Konzentration von 0,0001% schon toxisch. Bei Phenol und Formaldehyd konnte bei den geringsten Konzentrationen noch Bakterienwachstum nachgewiesen werden, in den nächsthöheren Konzentrationen jedoch nicht mehr. Lediglich Hypochlorid wirkte erst in einer Konzentration von 0,1% bakterizid.

Bei den niedrigen Konzentrationen von Phenol und Formaldehyd war trotz Bakterienwachstum auch nach 3,5 Monaten keine sichtbare Abnahme des Uraningehaltes feststellbar. Eine Ausnahme bildete das Hypochlorid in einer Konzentration von 0,0001%. Hier kam es nach 70 Tagen zu einer sichtbaren Entfärbung, d.h. zu einer Fluoreszenzabnahme.

Eine hohe Fluoreszenzlöschung wies das Sublimat auf. Schon einen Tag nach der Zugabe von Sublimat 0,1% bildete sich ein nicht auflösbarer rotbrauner Niederschlag. Die Grünfärbung war vollständig verschwunden. Auch bei den höheren Verdünnungen ergaben sich mit der Zeit Entfärbungen und rötliche Niederschläge. Diese Fluoreszenzabnahme ist auf einen rein chemischen Effekt zurückzuführen.

Nach 80tägiger Inkubation wurden die Proben auf ihre Uraningehalte fluorimetrisch untersucht (Tab. 4).

Tab. 4: Uraninkonzentration nach Zugabe toxischer Substanzen nach 80tägiger Inkubation [in Skalenteilen], Ausgangskonzentration 3500

|                 | 0,1% | 0,01% | 0,001% | 0,0001% |
|-----------------|------|-------|--------|---------|
| Formaldehyd*3,5 | 2715 | 2820  | 2850   | 2840    |
| Hypochlorid     | 3180 | 3100  | 2380   | 120     |
| Phenol          | 3510 | 3620  | 3580   | 3540    |

Aus der Tab. 4 wird ersichtlich, daß nur bei Phenol über einen längeren Zeitraum konstante Uraninmeßwerte nachgewiesen werden konnte. Bei Formaldehyd und Hypochlorid zeigten sich zum Teil erhebliche Fluoreszenzabnahmen. Ausgehend von der klein-

sten Konzentration betrugen sie bei Formaldehyd 19,3%, 19,0%, 19,8% und 22,8%. Das Hypochlorid wies Konzentrationsabnahmen von 96,6%, 32,4%, 11,9% und 9,6% auf. Bei Formaldehyd waren die Fluoreszenzverluste des Uranins chemisch bedingt, da bis zu einer Konzentration von 0,0035% Formaldehyd keinerlei Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte.

### 3.6.2 Schwermetalle

Die Schwermetalle Mangan, Kupfer und Zink lagen als Sulfatsalze vor, des weiteren wurde noch Kobaltchlorid getestet. Diese Salze wurden in destilliertem Wasser gelöst und steril filtriert.

Versuchsansatz:

15 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen

Uraninkonzentration 1 mg/l

Konzentration der Schwermetalle in den Proben: 0,01%, 0,001%, 0,0001%

Kontrollprobe mit 1 mg Uranin/l im Fuchtbachwasser

Inkubation bei 25°C

mit Alufolie abgedeckt

Ein Uraninabbau konnte in der Probe mit Kobaltchlorid 0,0001% nach 69tägiger Inkubation nachgewiesen werden. Die Abnahme der Fluoreszenz betrug 96%. Die weiteren Versuchsansätze wiesen noch keine Verminderung der Uraninfluoreszenzen auf.

Nach 8monatiger Inkubationszeit konnte kein sichtbarer Uraninabbau in den noch verbliebenen Versuchsröhrchen nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von Kobaltchlorid 0,0001% ist mit den angegebenen Schwermetallen ein Uraninabbau über einen Zeitraum von 8 Monaten sicher reprimierbar.

### 3.6.3 Antibiotika

Es wurden Penicillin und Streptomycin verwendet. Sie werden üblicherweise in Einheiten pro Milligramm (U/mg) angegeben. In diesem Fall wurden Streptomycin Sulfat (SERVA) mit 723 U/mg und Penicillin G Kalium-Salz (SERVA) mit 1536 U/mg verwendet.

Das Penicillin wirkt vor allem auf Gram-positive und viele Gram-negative Bakterien abtötend. Diese bakterizide Wirkung erstreckt sich jedoch nur auf sich im Wachstum befindende Bakterien (SCHLEGEL 1985). Das Streptomycin wirkt auf Gram-negative Bakterien.

Versuchsansatz:

15 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen

Uraninkonzentration 1 mg/l

die Antibiotika wurden in sterilem Fuchtbachwasser gelöst

Konzentration der Antibiotika in der Probe

|            |    |      |        |
|------------|----|------|--------|
| Penicillin | 20 | U/ml | Medium |
|------------|----|------|--------|

|  |   |      |        |
|--|---|------|--------|
|  | 2 | U/ml | Medium |
|--|---|------|--------|

|  |     |      |        |
|--|-----|------|--------|
|  | 0,2 | U/ml | Medium |
|--|-----|------|--------|

|              |    |      |        |
|--------------|----|------|--------|
| Streptomycin | 40 | U/ml | Medium |
|--------------|----|------|--------|

|  |   |      |        |
|--|---|------|--------|
|  | 4 | U/ml | Medium |
|--|---|------|--------|

Inkubation bei 25°C

mit Alufolie abgedeckt

In den Penicillin- und Streptomycinproben wurde nach 4wöchiger Inkubation Bakterienwachstum auf PYE-Agar nachgewiesen.

Nach 8monatiger Inkubation hatten sich keine sichtbaren Uraninabnahmen in den Proben eingestellt. Mit diesen Antibiotika kann der Uraninabbau im Fuchtbachwasser über einen Zeitraum von 8 Monaten sicher unterdrückt werden.

### 3.6.4 Glucose

Durch die Zugabe von organischen Substanzen (vgl. Kap. 3.5) konnte bei der Untersuchung des Co-Metabolismus ein zeitlich verzögert einsetzender Uraninabbau gegenüber einer natürlichen Fuchtbachwasserprobe beobachtet werden. Daher wurde Glucose als organische Substanz für die Reprimierung des Uraninabbaus ausgesucht und getestet.

Es wurden Fuchtbachwasserproben mit Uranin (1 mg/l) und sterilfiltrierter Glucoselösung versetzt. Die Glucose wurde in Fuchtbachwasser gelöst und lag in den Proben in den Konzentrationen 0,01, 0,001 und 0,0001 % vor. Zusätzlich wurden diese Proben nicht bei den üblichen 25°C sondern bei 7°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine nur mit Uranin versetzte Fuchtbachwasserprobe unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Nach 126 Tagen entfärbte sich die Kontrollprobe (Fuchtbachwasserprobe ohne Glucosezusatz). Bei den mit Glucose versehenen Proben zeigte sich auch nach 8 Monaten keine sichtbare Veränderung, die Glucose unterdrückte also den Uraninabbau.

## 4 Spezielle Versuche zum mikrobiellen Abbau von Uranin

### 4.1 Induktion

Der Fluoreszenzfarbstoff Uranin ist in der Natur ein organischer Fremdstoff. Einige Bakterienstämme sind in der Lage, solche organischen Xenobiotika über induzierbare Enzyme abzubauen. Für die Synthese dieser Fremdstoffe ist eine Induktorkonzentration erforderlich, wobei die Induktionsschwelle systemspezifisch ist.



Bei Uranin liegt die Induktionsschwelle ungefähr bei 0,01 mg/l. Dieser Wert wurde aus den Ergebnissen des Markierungsversuchs Nr. 713 an der Fuchtbachquelle vom 24. 8.1987 abgeleitet. Neben den Grundlastwerten der vorhergehenden Versuche konnte auch in den Proben mit Uraninkonzentrationen von 2–10 mg/m<sup>3</sup> kein Abbau nachgewiesen werden. Diese Konzentrationswerte sind die ersten Spuren der kommenden Farbstoffwelle des Markierungsversuches gewesen. Erst ab einer Uraninkonzentration von 10 mg/m<sup>3</sup> war ein Abbau nachweisbar. Diese Induktionsschwelle wurde in einem Laborversuch genauer bestimmt.

#### Versuchsansatz:

10 ml Fuchtbachwasser in sterilen Schraubdeckelröhrchen  
 Uraninkonzentrationen 0,1, 0,01, 0,005 und 0,001 mg/l  
 für jeden Konzentrationsbereich jeweils 5 Ansätze  
 es wurde frisches Fuchtbachwasser (a) und Fuchtbachwasser, in dem schon ein mehrfacher Uraninabbau stattgefunden hat (b), verwendet  
 optisches Kontrollröhrchen für den Einsatz des Uraninabbaus mit Uraninkonzentration 1 mg/l  
 Inkubation bei 25°C  
 mit Alufolie abgedeckt

In Tab. 5 ist das Ergebnis dieser Versuche aufgeführt. Für sämtliche Versuchsröhrchen einer Versuchsreihe war die Ausgangskonzentration gleich.

Tab. 5: Uraninabbau pro Konzentrationsbereich in %

a – frisches Fuchtbachwasser; b – Fuchtbachwasser mit Uraninabbau

|   | 0,1  | 0,01 | 0,005 | 0,001 mg/l |
|---|------|------|-------|------------|
| a | 86,3 | –    | –     | –          |
| b | 88,1 | 50,8 | 38,2  | 11,5       |

In der Versuchsgruppe a trat der Uraninabbau nach 28 Tagen Inkubation im Kontrollröhrchen mit 1 mg/l Uranin ein. Daraufhin wurden sämtliche Versuchsproben fluorimetrisch untersucht. Ein Uraninabbau konnte nur in den Versuchsröhrchen mit einer Uraninkonzentration von 0,1 mg/l nachgewiesen werden, in den Versuchsröhrchen mit geringeren Uraninkonzentrationen nicht.

Der Uraninabbau bei der Versuchsgruppe b trat nach 9 Tagen Inkubation ein. Die dann gemessenen Konzentrationswerte waren für sämtliche Versuchsproben nahezu identisch, unabhängig von der zugegebenen Ausgangskonzentration.

In der nachfolgenden Versuchsreihe (Tab. 6) wurde versucht, eine genauere Eingrenzung zu geben. Für jeden Konzentrationsbereich wurden 8 Versuchsröhrchen angesetzt. Die Ausgangskonzentration war für sämtliche Ansätze einer Versuchsreihe gleich. Es wurde frisches Fuchtbachquellwasser, jeweils 10 ml in Schraubdeckelröhrchen, verwendet; die Inkubationstemperatur betrug 25°C. Als optische Kontrolle für den Einsatz des Uraninabbaus diente eine Probe mit einer Uraninkonzentration von 1 mg/l.

Tab. 6: Uraninabbau in Skalenteilen pro Konzentrationsbereich  
u – Ursprungskonzentration; 1–8 – durchnummerierte Versuchsröhrchen

|   | 0,1  | 0,075 | 0,05 | 0,025 | 0,01 mg/l |
|---|------|-------|------|-------|-----------|
| u | 1810 | 1290  | 910  | 444   | 218       |
| 1 | 248  | 252   | 246  | 260   | 222       |
| 2 | 250  | 248   | 242  | 252   | 208       |
| 3 | 208  | 254   | 250  | 228   | 180       |
| 4 | 252  | 256   | 258  | 246   | 226       |
| 5 | 246  | 210   | 226  | 262   | 216       |
| 6 | 246  | 246   | 250  | 254   | 218       |
| 7 | 250  | 252   | 248  | 252   | 200       |
| 8 | 252  | 250   | 248  | 208   | 214       |

Ein Uraninabbau wird durch die Mikroorganismen ab einer vorhandenen Uraninkonzentration von 0,01–0,025 mg/l im Fuchtbachwasser induziert. Geringere Uraninkonzentrationen werden nicht abgebaut, wie aus Tab. 5 hervorgeht.

## 4.2 Metabolismus

Der irreversible Abbau des Uranins wurde mit Hilfe eines UV-Spektrogramms untersucht. Dieses Spektrogramm wurde mit dem Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS-Spektrometer hergestellt.

Es wurde ein Wellenlängenbereich von 200–600 nm durchfahren und die Absorption gemessen. Mit zwei frischen Fuchtbachquellwasserproben wurde ein Nullabgleich durchgeführt. Anschließend wurden die Versuchsproben gegen eine dieser Fuchtbachquellwasserproben untersucht. In Abb. 4 ist nur die von der Standardprobe verschiedene Absorption der Versuchsproben aufgetragen. Auf der x-Achse ist der Wellenlängenbereich in nm angegeben, auf der y-Achse die Absorption (einheitslos).

Abb. 4a zeigt von 200–260 nm einen gezackten Kurvenverlauf ohne ausgeprägte Peaks; daran schließt sich ein runder weitgespannter Kurvenverlauf bis 400 nm mit 2 Peaks an; im sichtbaren Bereich von 400–540 nm läßt sich eine deutliche Konzentrationskurve des Uranins erkennen. Der Peak liegt bei 490 nm mit einer Absorption von 0,138.

In Abb. 4b ist der Uraninpeak im sichtbaren Bereich zwar noch deutlich ausgeprägt, die Absorption beträgt aber nur noch 0,078 bei 490 nm. Der Abbau des Uranins hat anscheinend schon eingesetzt. Dies zeigt sich auch im UV-Bereich. Der gezackte Kurvenverlauf ist deutlicher ausgeprägt, die Absorptionspeaks sind zum Teil deutlich höher als in Abb. 4a.

In Abb. 4c ist das Uranin im sichtbaren Bereich noch nachweisbar, aber es besteht kein Vergleich zu Abb. 4a, b. Dafür haben sich im UV-Bereich zwei deutliche Peaks herausgebildet, bei 260 nm mit 0,08 und bei 214 nm mit 0,15. Der Zwischenbereich zwischen diesen beiden Peaks ist vom Kurvenverlauf sehr ähnlich dem in Abb. 4a, nur ist der Absorptionswert um ca. 0,05 höher.

Aus der Abfolge dieser drei Darstellungen ist zu ersehen, daß das Uranin zu einer oder mehreren Substanzen metabolisiert wurde, deren Absorptionsmaxima im UV-Licht bei 214 und 260 nm liegen.

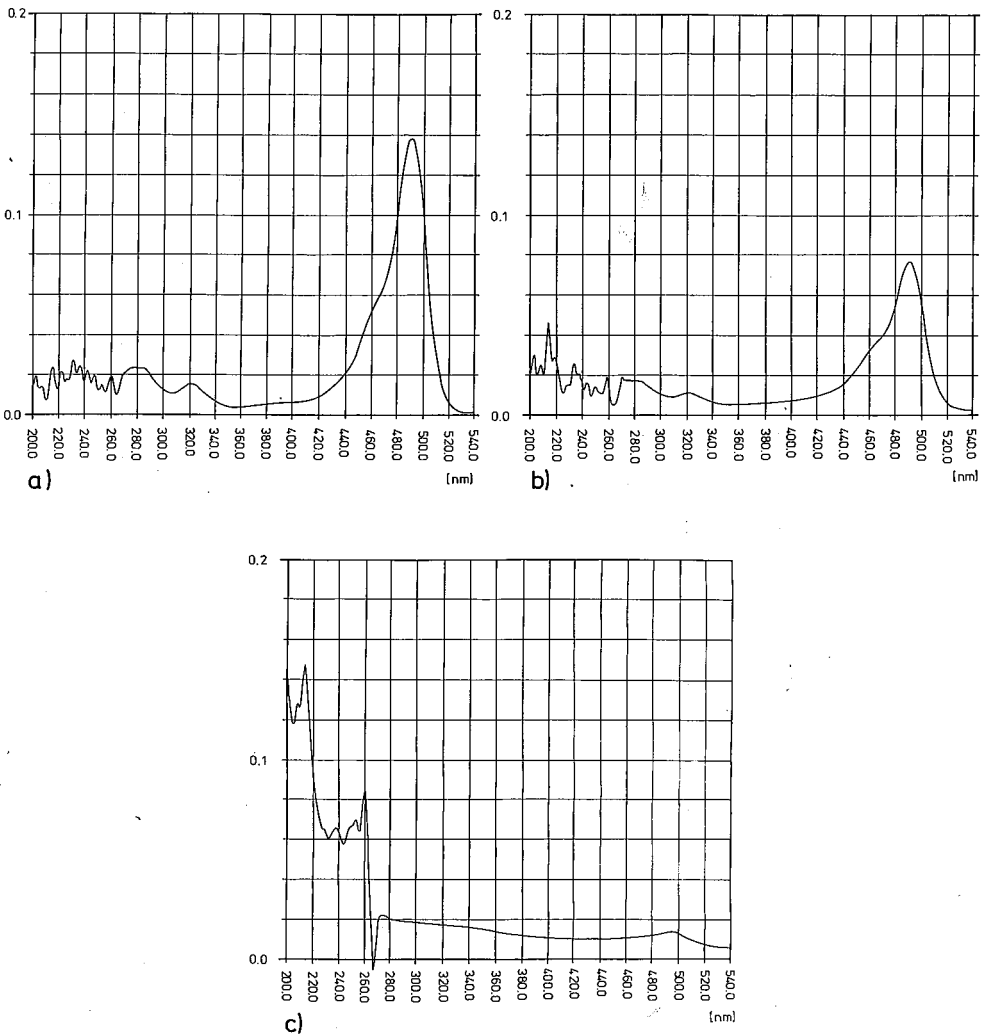


Abb. 4: UV-Spektrogramme einer Wasserprobe aus der Fuchtbachquelle

a – frische Probe mit 1 mg/l Uranin; b – dieselbe Probe 5 Tage vor dem sichtbarem Uraninabbau; c – dieselbe Probe nach dem Uraninabbau

### 4.3 Mikroorganismen

Durch Anreicherungsverfahren konnten im Fuchtbachwasser noch 6 makroskopisch unterscheidbare Bakterienstämme isoliert werden. Einer oder mehrere dieser 6 Stämme führen vermutlich einen Uraninabbau herbei.

Durch mehrfache fraktionierte Ausstriche auf PYE-Agar wurden Reinkulturen gezüchtet. Diese Reinkulturen wurden einzeln und in Kombination miteinander in steriles Fuchtbachwasser eingimpft. Die Bakterienstämme sind mit 1–6 durchnummeriert.

Versuchsansatz:

20 ml Fuchtbachwasser, steril filtriert in Schraubdeckelfläschchen

1 mg/l Uranin

Kolonien einzeln: 1, 2, 3, 4, 5, 6

kombiniert: 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 2/3, 2/4, 2/5, 2/6, 3/4, 3/5, 3/6, 4/5, 4/6, 5/6, 1/2/3, 1/3/4, 1/4/5, 1/5/6, 2/3/4, 2/4/5, 2/5/6, 3/4/5, 3/5/6, 1/2/3/4, 1/3/4/5, 1/4/5/6, 2/3/4/5, 2/4/5/6, 3/4/5/6, 1/2/3/4/5, 1/3/4/5/6, 1/2/4/5/6, 1/2/3/4/5/6

Inkubation bei 25 °C

mit Alufolie abgedeckt

Nach einer Inkubationszeit von 42 Tagen war ein nahezu vollständiger Uraninabbau bei der Versuchsreihe mit allen eingimpften Kolonien feststellbar. Daraufhin wurden Verdünnungsausstriche auf PYE-Agar und Uraninminimalmedien ausgeführt. Danach wurde 1 mg/l Uranin der Versuchslösung mit den 6 Kolonien erneut zugegeben und weiterhin inkubiert. Es trat auch hier ein sehr rascher erneuter Uraninabbau innerhalb weniger Tage ein.

Bei Ausstrichen auf PYE-Agar wuchsen sämtliche 6 Kolonien. Auffallend war das vermehrte Auftreten der sehr kleinen Kolonie Nr. 5.

#### Identifizierung

Den morphologischen Beschreibungen liegen die Termini von BIRKENBEIL (1983) zugrunde.

Morphologische Beschreibung:

Kolonie 1: weiß, mittelgroß, rund, glänzend, Rand leicht gefranst, Kolonie ist erhaben und weich.

Kolonie 2: hellgelb, mittelgroß, rund, glänzend, glattrandig, Kolonie ist erhaben und fest.

Kolonie 3: weiß, groß, unregelmäßig, glänzend, glattrandig, Kolonie ist erhaben bis konvex und schleimig.

Kolonie 4: weißdurchsichtig, klein, unregelmäßig, glänzend, Rand ist transparent, Kolonie ist konvex und weich.

Kolonie 5: creme, punktförmig, rund, glänzend, glattrandig, Kolonie ist konvex und weich.

Kolonie 6: gelb, klein, rund, glänzend, glattrandig, konvex und fest.

In Tab. 7 sind die Ergebnisse der biochemischen Tests dieser 6 Bakterienkolonien aufgelistet.

Tab. 7: Ergebnisse der biochemischen Tests der 6 Bakterienkolonien

| Kolonie/<br>Test | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6      |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Gram             | -,Stb | -,Stb | -,Stb | -,Stb | -,Stb | -, Stb |
| Ox               | +     | +     | +     | +     | +     | +      |
| Kat              | +     | +     | +     | +     | +     | +      |
| OF               | o     | KW    | o     | A     | A     | kW     |
| NO <sub>2</sub>  | +     | +     | +     | +     | -     | -      |
| N <sub>2</sub>   | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
| Gel              | +     | -     | -     | -     | -     | -      |
| Xyl              | +Sw   | +Sw   | +Sw   | -     | -     | -      |
| DTA              | +S    | -     | +S    | -     | -     | -      |
| Cit              | +     | -     | +     | -     | -     | -      |
| Geißel           | m,3-1 | -     | m,3-1 | m,1   | -     | -      |
| F                | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
| Ure              | +     | KW    | +     | KW    | KW    | KW     |
| DNAse            | +     | KW    | +     | KW    | KW    | KW     |
| Wt 4°C           | +     | -     | +     | -     | -     | -      |
| 7°C              | +     | -     | +     | +     | +     | -      |
| 37°C             | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
| 41°C             | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
| Wt auf GSP       | +     | -     | +     | -     | +w    | -      |

Legende:

|       |   |                     |       |   |  |
|-------|---|---------------------|-------|---|--|
| Gram  | - | Gramfärbung         | +     | - | positiv                                  |
| Ox    | - | Oxidase             | -     | - | negativ                                  |
| Kat   | - | Katalase            | A     | - | Alkalisierung                            |
| o     | - | oxidativ            | Gel   | - | Gelatine                                 |
| KW    | - | kein Wachstum       | DTA   | - | Dextrose-Trypton-Agar                    |
| Xyl   | - | Xylo                | Wt    | - | Wachstum                                 |
| w     | - | weak                | m,1   | - | monopolar, 1 Geißel                      |
| Cit   | - | Citrat              | m,3-1 | - | monopolar, maximal 3 Geißeln und weniger |
| F     | - | Fluoresceinbildung  | Ure   | - | Urease                                   |
| +S    | - | Wt mit Säurebildung | GSP   | - | Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar   |
| -,Stb | - | negativ, Stäbchen   |       |   |  |

Bei den Kolonien 1 und 3 dürfte es sich um zur Familie der Pseudomonaden gehörende Kolonien handeln. Die Kolonien 2 und 6 können den Flavobakterien zugerechnet werden, die Kolonien 4 und 5 können anhand dieser Tests noch nicht eingeordnet werden. Aufgrund der wiederholt durchgeführten Entfärbungsversuche mit diesen Kulturen kann keine Einzelkolonie als für den Uraninabbau verantwortlich genannt werden. Sobald diese Kulturen einzeln oder zu zweien in einer sterilen Fuchtbachwasserlösung vorliegen, läßt sich kein Uraninabbau nachweisen. Nur die Gemeinschaft aller ist hierzu fähig. Auffällig war das verstärkte Anreichern der Kolonie Nr. 5 aus den Anreicherungskulturen.

Da mit den im Labor zur Verfügung stehenden Mitteln keine Einordnung in die bestehende Bakteriensystematik möglich war, wurde eine Stammkultur zur genaueren Identifizierung nach Braunschweig, zur „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen“, eingeschickt.

Das Ergebnis lautete: „Bei dem Stamm Nr. 5 handelt es sich um ein oxidase-positives, gram-negatives Stäbchen, daß aufgrund seiner zellulären Fettsäuren und der phänotypischen Eigenschaften sicherlich zu den Pseudomonaden zu zählen ist. Eine eindeutige Identifizierung ist jedoch nicht möglich, da weitere Untersuchungen zur Chemotaxonomie dieses Organismus dafür erforderlich sind.“

## 5 Diskussion

In den vorangehenden Kapiteln wird ein mikrobiell bedingter Fluoreszenzverlust des Uranins nachgewiesen. Im Fuchtbachwasser ist eine aktuelle Abbaubarkeit dieses Farbstoffes gegeben. Das Fuchtbachwasser ist ein typisches Karstwasser des Oberen und Mittleren Muschelkalks, mit einer ausgeprägten Dominanz der Erdalkalien Calcium und Magnesium bei den Kationen sowie Hydrogencarbonat und Sulfat bei den Anionen. Die Voraussetzungen für einen Abbau sind: mikroaerobe bis anaerobe Bedingungen, sich langsam einstellende reduzierende Bedingungen (Methylenblauversuche) und ein Temperaturbereich von 7–25°C.

Sind diese Voraussetzungen gegeben und die für einen Fluoreszenzabbau notwendigen Bakterienstämme im Wasser vorhanden und stoffwechselaktiv, dann besteht die potentielle Gefahr des Uraninabbaus.

Die Fluoreszenzabnahme des Uranins wird von einer Vielzahl von Bakterienstämmen bedingt. Hierzu gehören Pseudomonaden, Flavobakterien und nicht identifizierbare Bakterienstämme. Wie auch aus dem Negativeergebnis mit 1,4 Dithio-DL-threitol ersichtlich wird, handelt es sich um einen mehrstufigen Prozeß. Wird der Abbauprozess durch Unterbleiben einer Phase gehemmt, so kann eine Abnahme der Uraninfluoreszenz nicht mehr stattfinden. Die Störung eines Teilschrittes kann durch zu rasches Einstellen von reduzierenden Bedingungen, durch zu hohe Nährstoffkonzentrationen, zu

hohe Temperaturen, zu hohe Sauerstoffgehalte (aerobe Bedingungen) sowie durch toxische Substanzen, Schwermetalle und Antibiotika hervorgerufen werden. Hieraus ist zu ersehen, daß es sich um ein äußerst sensibles System handelt.

Damit ein Uraninabbau überhaupt erst induziert wird, muß eine Mindestkonzentration von 0,01–0,025 mg Uranin/l vorhanden sein. Erst ab dieser Konzentration kann ein Fluoreszenzabbau stattfinden. Des weiteren wird das Uranin nicht vollständig umgesetzt. Die noch verbleibende Restkonzentration kann jedoch geringer sein als die für einen Fluoreszenzabbau notwendige Induktorkonzentration.

Die UV-Spektralanalyse zeigt auf, daß die Absorptionsmessung des Uranins im sichtbaren Bereich eine deutliche Durchgangskurve ergibt. Wird in der gleichen Probe die Absorption nach dem Uraninabbau bestimmt, so ist im sichtbaren Bereich keine oder nur noch eine geringe Absorption meßbar. Im UV-Bereich dagegen bilden sich zwei Peaks bei 214 und 260 nm heraus. Eine Zuordnung dieser Peaks zu einer oder mehreren Substanzen ist nicht möglich gewesen.

Möglicherweise eröffnet sich durch die UV-Spektralanalyse eine neue Untersuchungsmethode, wenn der Verdacht besteht, daß eine Fluoreszenzabnahme in den zu untersuchenden Proben schon stattgefunden hat. Voraussetzung hierfür ist eine Blindprobe des zu untersuchenden Wassers, um einen Nullabgleich durchführen zu können. Inwieweit eine quantitative Bestimmung des Uraningehaltes möglich ist, müßte anhand von Versuchsreihen herausgefunden werden.

Es erhebt sich die Frage, wie die in den letzten Jahren durchgeführten Markierungsversuche zu bewerten sind. Grundsätzlich müssen die Markierungsversuche mit negativem Ergebnis einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Besteht der Verdacht auf einen möglichen Fluoreszenzabbau des Uranins in einem zu untersuchenden Wasser, ist es sinnvoll, die Proben innerhalb von 1–2 Wochen fluorimetrisch zu untersuchen. Falls eine längerfristige Lagerung bzw. ein längerer Transportweg der Proben nicht zu umgehen ist, sollten die Proben möglichst kühl gelagert werden. Zweckmäßig ist eine Temperatur um den Gefrierpunkt, da bei dieser Temperatur die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen äußerst gering ist. Ist eine mehrmonatige Lagerung der Proben unumgänglich, müssen diese mit Zusatzstoffen zur Reprimierung versehen oder autoklaviert werden. Sämtliche Reprimierungsversuche bedeuten für die Praxis einen erheblichen Arbeitsaufwand, da jede einzelne zu untersuchende Probe mit der entsprechenden Substanz versetzt werden muß.

Ein vollständiger Verzicht auf den Fluoreszenzfarbstoff Uranin ist in der Praxis sicher nicht angebracht. In einigen Fällen, vor allem bei Karstwässern, ist jedoch eine gewisse Vorsicht notwendig. Wird ein Markierungsversuch geplant und rechnet man mit einer möglichen Abnahme der Fluoreszenz, ist es sinnvoll, Vorversuche zum Fluoreszenzabbau durchzuführen. Es sollten dann mehrere Proben vorab geprüft werden. Bestätigt sich ein solcher Verdacht, ist es zweckmäßig, diese Uraninproben sehr rasch fluorime-

trisch zu untersuchen. Die Zugabe von Substanzen zur Reprimierung des Fluoreszenzabbaus dürfte für die Praxis zu aufwendig sein.

Grundsätzlich muß gesagt werden, daß eine Probenuntersuchung so rasch wie möglich nach der Probenahme stattfinden sollte.

### Literatur

- BEHRENS, H. (1971): Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen bei ihrer Anwendung als hydrologische Markierungsstoffe. – Geol. Bavarica, **64**: 120–131; München.
- BIRKENBEIL, H. (1983): Einführung in die praktische Mikrobiologie. – Frankfurt/M. (Diesterweg).
- HÖLTING, B. (1989): Hydrogeologie. – 3. Aufl., 396 S.; Stuttgart (Enke).
- KÄSS, W. (1964): Die unmittelbare Bestimmung von Uraninspuren bei Färbeversuchen. – Steir. Beitr. Hydrogeol., **15/16**: 37–66, 7 Abb.; Graz.
- LUKAS, G. (1959): Die Färbemethoden. – In: MAURIN, V. R. & ZÖTL, J.: Die Untersuchung der Zusammenhänge unterirdischer Wässer mit besonderer Berücksichtigung der Karstverhältnisse. – Steir. Beitr. Hydrogeol., **1959** (1/2): 94–107; Graz.
- RHEINHEIMER, G. (1985): Mikrobiologie der Gewässer. – 4. Aufl., 204 S.; Stuttgart (Fischer).
- SAYER, C. (1988): Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Uranin. – Dipl.-Arb., Teil II, Univ. Karlsruhe. – [unveröff.].
- SAYER, C. (1990): Mikrobiologischer Uraninabbau. – Abschlußber. Geol. Landesamt Baden-Württemberg: 84 S., 14 Abb., 25 Tab., 1 Anl.; Freiburg i. Br.
- SCHLEGEL, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. – 6. Aufl., 571 S.; Stuttgart (Thieme).

*Manuskript eingegangen am 15. Januar 1991.*