

# **Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten**

## **Leitfadenelement Grundwasserpfad – Mikrobiologie**

**(Grundlage: Anlage zum Bericht „Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten – Mikrobiologisch induzierte Freisetzung von natürlichen Radionukliden aus Halden mit dem Sickerwasser“ (StSch 4555) vom Oktober 2008 der G:E:O:S: Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH)**

**Bundesamt für Strahlenschutz, Dezember 2008**

Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Vorraussetzungen und Lebensbedingungen von Mikroorganismen .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Orientierungsuntersuchung Sickerwasserpfad - Durchführung von experimentellen Untersuchungen zur Relevanz mikrobiologischer Prozesse .....</b>	<b>2</b>
3.1	<i>Ermittlung der Wasserhaltekapazität nach DIN ISO 11274.....</i>	<i>2</i>
3.2	<i>Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Bodenatmung nach DIN ISO 16072.....</i>	<i>2</i>
3.3	<i>Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Enzymaktivität.....</i>	<i>2</i>
3.4	<i>Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Mikrokalorimetrie' .....</i>	<i>2</i>
<b>4</b>	<b>Hauptuntersuchungen Sickerwasserpfad .....</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>Spezialuntersuchungen Sickerwasserpfad - Quantifizierung mikrobiologischer Prozesse.....</b>	<b>2</b>
5.1	<i>Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährmedien .....</i>	<i>2</i>
5.2	<i>Mikroskopische Aufnahmen.....</i>	<i>2</i>
5.3	<i>Durchführung von Desoxyribonukleinsäure-basierten (DNA) Methoden .....</i>	<i>2</i>
<b>6</b>	<b>Parameterbestimmung zur Quelltermbeschreibung auf der Grundlage der Spezialuntersuchungen, Prognoserechnungen.....</b>	<b>2</b>
6.1	<i>Chemische und physikalische Untersuchung des Materials und Analyse von Bindungsformen .....</i>	<i>2</i>
6.2	<i>Identifizierung möglicher Energielieferanten für mikrobiologische Prozesse .....</i>	<i>2</i>
6.3	<i>Auswahl von Mikroorganismenkulturen für Elutionsversuche.....</i>	<i>2</i>
6.4	<i>Durchführung von parallelen Suspensionsversuchen .....</i>	<i>2</i>
6.5	<i>Nachrechnung der Suspensionslaugungsversuche .....</i>	<i>2</i>
6.6	<i>Durchführung von parallelen Perkulationsversuchen .....</i>	<i>2</i>
6.6.1	<i>„Kleine“ Säulen.....</i>	<i>2</i>
6.6.2	<i>„Große“ Säulen .....</i>	<i>2</i>
6.7	<i>Modellierung der Radionuklidfreisetzung aus Säulenversuchen und Präzisierung der Modellparameter.....</i>	<i>2</i>
6.8	<i>Durchführung einer Freisetzungsprognose .....</i>	<i>2</i>
<b>7</b>	<b>Quellenverzeichnis.....</b>	<b>2</b>
<b>8</b>	<b>Glossar.....</b>	<b>2</b>

## **1 Einleitung**

Um Entscheidungen über die Sanierung von Halden und Absetzanlagen des Alt- und Uranerzbergbaus auf der Grundlage einheitlicher, wissenschaftlich begründeter und zugleich ökonomisch vernünftiger Methoden zu treffen, hat das Bundesamt für Strahlenschutz den „Leitfaden zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten“ entwickelt. Im Forschungsvorhaben StSch „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 ggf. zu berücksichtigen sind. In einem Expertengespräch zur „Mikrobiologie in Halden und Absetzanlagen“ wurden folgende Positionen erarbeitet:

- 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 Methoden zur effektiven Erfassung der freisetzungsrelevanten Mikroorganismen und ihrer Stoffwechselaktivität (Metallsulfidoxidation) sowie der Schadstoff-/ Radionuklidmobilisierung.
- 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 Biofilme 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.

Den Ausgangspunkt für sämtliche Betrachtungen bildet der „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten“. Dieser Leitfaden beinhaltet eine einfach handhabbare,

pragmatische Vorschrift zur Vorgehensweise bei der Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten. Das Grundprinzip besteht in einer schrittweisen Vertiefung der Betrachtung und der Prüfung, inwiefern jeweils detailliertere Untersuchungen notwendig sind. Das Leitfadenelement Grundwasserpfad, Anlage – Mikrobiologie, soll den vorhandenen Leitfaden hinsichtlich freisetzung relevanter mikrobiologischer Prozesse ergänzen.

Der grundsätzliche Ansatz besteht darin, den bestehenden „Leitfaden zur radiologischen Bewertung bergbaulicher Altlasten“ an den Stellen zu ergänzen, in denen mikrobiologische Prozesse zu einem abweichenden Systemverhalten führen können. Im Leitfadenelement Grundwasserpfad selbst wird dabei auf solche Situationen hingewiesen, während in der vorliegenden Anlage Mikrobiologie orientierende und Spezialuntersuchungen dargestellt werden.

Unabhängig vom jeweiligen mikrobiologischen Prozess kann die Vorgehensweise dabei in folgende Schritte unterteilt werden (Abbildung 1):

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 (Abschnitt 2) – Relevanzverdachtsprüfung. Fehlen geeignete Wachstumsbedingungen, können weitere mikrobiologische Untersuchungen entfallen.
2. Durchführung einfacher experimenteller Untersuchungen zur Bestätigung oder Zurückweisung des Relevanzverdachts (Abschnitt 3).
3. Ist im Ergebnis dieser Untersuchungen die Relevanz nachgewiesen, so wird die Durchführung von Spezialuntersuchungen zur Quantifizierung der mikrobiologischen Prozesse notwendig (Abschnitt 5).
4. Parameterbestimmung zur Quelltermbeschreibung auf der Grundlage der Spezialuntersuchungen (Abschnitte 6.1 bis 6.6).
5. Prognose von Freisetzung und Transport innerhalb der Quelle (Abschnitte 6.7 und 6.8).

## Leitfadenelement Grundwasserpfad Anlage - Mikrobiologie

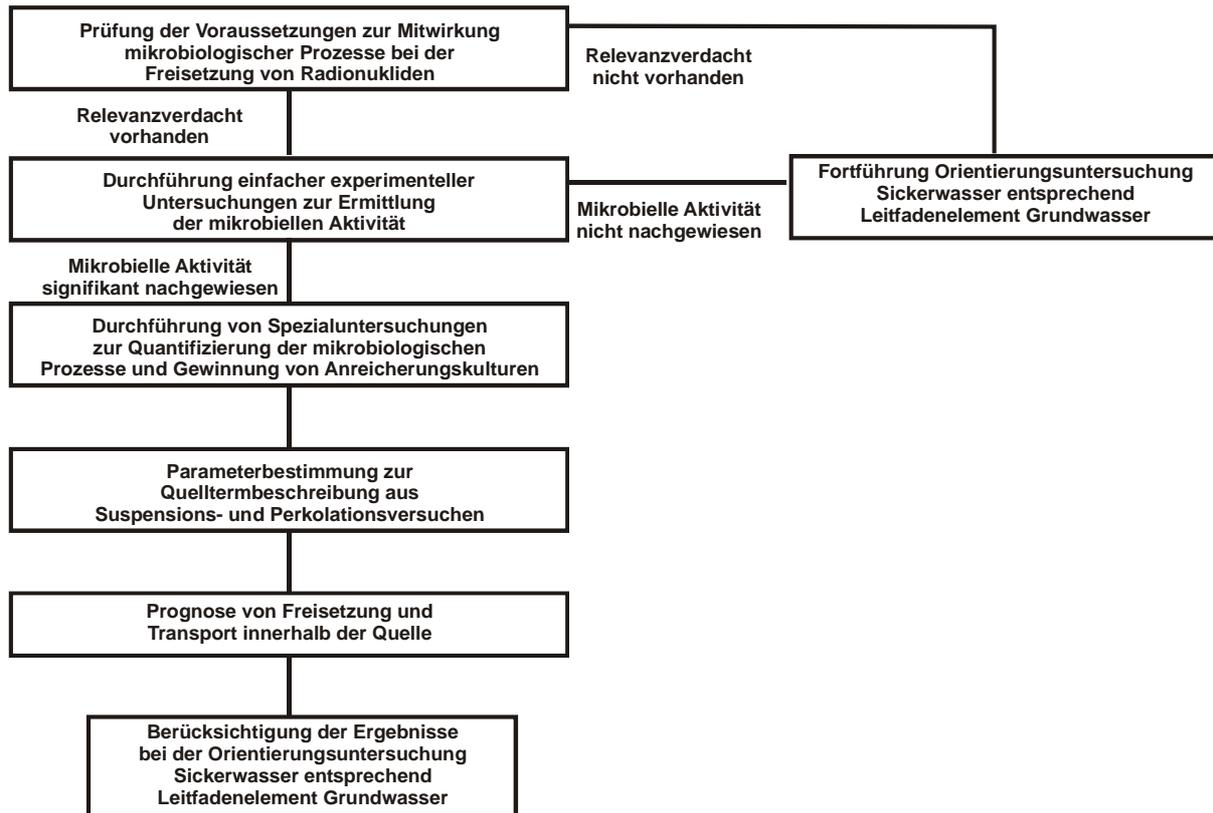


Abbildung 1: Gesamtmethodik zur Ermittlung der Relevanz von mikrobiologischen Prozessen auf die Freisetzung von Radionukliden aus Haldenmaterial

## 2 Voraussetzungen und Lebensbedingungen von Mikroorganismen

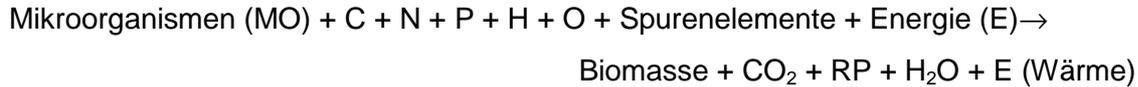
Mikroorganismen haben sich an die unterschiedlichen Lebensräume und Lebensbedingungen angepasst. Es ist ihnen möglich, bei unterschiedlichen Temperaturen, in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff, bei hohen Salzkonzentrationen und extremen Drücken zu leben und sich zu vermehren. Zur Aufrechterhaltung von Lebensprozessen werden eine Kohlenstoff-, eine Energie- sowie eine Protonenquelle benötigt. In Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Quellen lassen sich die verschiedenen Mikroorganismen in Gruppen einordnen. Werden als Kohlenstoffquelle  $\text{CO}_2$  aus der Luft oder Karbonat aus Wasser genutzt, handelt es sich um autotrophes Wachstum, bei Nutzung organischer Verbindungen um heterotrophes Wachstum. Als Energiequelle können Mikroorganismen abgebaute und umgewandelte chemische Verbindungen (Chemotrophie) oder auch das Sonnenlicht (Fototrophie) nutzen. Die Bereitstellung von Protonen erfolgt durch Umbau anorganischer Verbindungen (Lithotrophie) oder abgebauter organischer Verbindungen (Organotrophie).

**Leitfadenelement Grundwasserpfad  
Anlage - Mikrobiologie**

---

Aus der Beschreibung der Lebensbedingungen und der zum Biomasseaufbau benötigten Elemente kann nach Gleichung 1 ein mikrobieller Wachstumsprozess in seiner allgemeinen Form dargestellt werden.

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 CO<sub>2</sub> neben Wasser und Reaktionsprodukten (RP) an die Umgebung abgegeben. Da alle Wachstumsprozesse exotherm sind, wird ebenfalls Wärme an die Umgebung abgegeben. Bei den Reaktionsprodukten kann es sich um unterschiedliche Verbindungen wie anorganische und organische Säuren (Fettsäuren), Methan, Alkohole, Exopolysaccharide, Siderophore oder weitere komplexbildende Substanzen handeln. Dadurch sind sehr variable Wechselwirkungen mit Radionukliden möglich, die zu einer veränderten Radionuklidmobilität führen können.

Die Energiebereitstellung erfolgt über einen Elektronentransport von einem Elektronen liefernden Partner (Donator) zu einem Elektronen aufnehmenden Reaktionspartner (Akzeptor) (Tabelle 1). Ein Teil der bei diesem Prozess freiwerdenden Energie wird für das Aufrechterhalten der Lebensfunktionen der Mikroorganismen verwendet.

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

Elektronen-Donatoren	S <sup>2-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sup>0</sup> , SCN <sup>-</sup> , Se <sup>2-</sup> , U <sup>4+</sup> , Sb <sup>3+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , As <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , H <sub>2</sub> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sup>2-</sup> , (W <sup>3+</sup> , Mo <sup>3+</sup> , V <sup>3+</sup> , Co <sup>+</sup> )
Elektronen-Akzeptoren	O <sub>2</sub> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sup>0</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sup>2-</sup> , SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , U <sup>6+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Mn <sup>4+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , As <sup>5+</sup> , Sb <sup>5+</sup> , (W <sup>6+</sup> , Mo <sup>5+</sup> , V <sup>5+</sup> , Co <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Hg <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> )

Bei den Spezies in Klammern sind Oxidations- und Reduktionsprodukte aufgeführt, die durch cometabole Prozesse gebildet werden.

Daneben sind von Mikroorganismen durchgeführte Oxidations- und Reduktionsprozesse bekannt, deren Energieausbeute nicht für Wachstumsprozesse genutzt werden kann. Sie werden deshalb als cometabole Prozesse bezeichnet, die dann ablaufen, wenn die Mikroorganismen ausreichend mit Energie versorgt sind.

In Hinblick auf die Prüfung, ob die Voraussetzungen für mikrobielles Wachstum gegeben sind, müssen daher die zur Bildung von Biomasse und neuer Zellen benötigten Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und eine Reihe von essentiellen Spurenelementen (z. B. Eisen, Kupfer, Mangan, Zink) sowie möglich Energielieferanten (vgl. Tabelle 1) analytisch nachgewiesen werden.

Eine Zusammenstellung der in Bergbauhalden und Bergbauhabitaten vorkommenden Mikroorganismen erfolgte in [BMU 2005]. In [GEOS 2008] ist eine ausführliche Beschreibung mikrobiell beeinflusster Freisetzung- bzw. Fixierungsprozesse von Radionukliden wie saure oder alkalische Laugung, unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen sowie von komplexbildenden Prozessen dargestellt.

### **3 Orientierungsuntersuchung Sickerwasserpfad - Durchführung von experimentellen Untersuchungen zur Relevanz mikrobiologischer Prozesse**

Der Nachweis der mikrobiellen Aktivität in Haldenmaterialien kann durch nachfolgende Labormethoden erbracht werden:

- Bestimmung der Bodenatmung
- Ermittlung von Enzymaktivitäten
- mikrokalorimetrische Messungen.

Da mikrokalorimetrische Messungen, die Bestimmung der Bodenatmung bzw. der Enzymaktivität kostengünstige Standardmethoden und zudem in mikrobiologischen Laboratorien weit verbreitet sind, sind diese Verfahren bei der Orientierungsuntersuchung zu bevorzugen. In [GEOS 2008] wurden diese Methoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf radionuklidführenden Haldenmaterialien vergleichend getestet und bewertet. Alle Methoden besitzen einen breiten Anwendungsbereich<sup>1</sup>.

Für ein einheitliches Vorgehen zur Ermittlung der aktuellen mikrobiellen Aktivität von Haldenmaterial wird die folgende Probenvorbereitung empfohlen:

- Übernahme der Probe vom Feld in das Labor, Lagerung der Probe bei 4 °C bis zur weiteren Probenbehandlung (ggf. im Kühlschrank) – Hinweis: Sollen anaerobe Prozesse abgebildet werden, sind bei der Lagerung entsprechende Maßnahmen zur Verhinderung eines Sauerstoffzutritts zu ergreifen.

---

<sup>1</sup> Die mikrokalorimetrische Messmethode kann langsam ablaufende Prozesse mit geringen thermischen Leistungen nicht abbilden (z. B. Sulfatreduktion).

- Gegebenenfalls Zerkleinerung des lufttrockenen Haldenmaterials auf Körnungen < 2 mm
- Einstellung des Wassergehaltes des Probenmaterials auf eine Wasserhaltekapazität (WHK) auf 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität
- Durchführung der Experimente in mindestens vier Versuchsansätzen: je zwei unbehandelt und steril. Die Sterilisation erfolgt durch ein geeignetes Verfahren (z. B. Zugabe von 0,3 g/L Natriumazid, Autoklavieren, Behandlung mit 3%igem Natriumdodecylsulfat)
- Befüllung der Versuchsgefäße unter Einsatz einer sterilen Werkbank für aerobe Versuche bzw. für anaerobe Versuche nach Begasung mit einer Stickstoff- Wasserstoff- Kohlendioxid- Gasmischung in der Anaerobox
- Prüfung der Keimfreiheit des Sterilversuche nach Versuchsende entsprechend Abschnitt 5.1.

Die Durchführung der Versuche erfolgt bei 25°C. Zur Bewertung, ob mikrobiologische Prozesse die Mobilität von Radionukliden beeinflussen können, werden die Ergebnisse der Versuche mit unbehandeltem und vergiftetem Probenmaterial miteinander verglichen. Als „relevant“ werden mikrobiologische Prozesse eingestuft, wenn die mikrobielle Aktivität der unbehandelten Probe um mindestens 30% gegenüber der sterilisierten Probe erhöht ist. Ist der Nachweis relevanter mikrobiologischer Aktivität erbracht, schließen sich Spezialuntersuchungen an (s. Abschnitt 5). Ist eine mikrobiologische Relevanz nicht gegeben, wird die Orientierungsuntersuchung Sickerwasser entsprechend dem Leitfadenelement Grundwasser fortgeführt. Die Vergleichsparameter der einzelnen Untersuchungsmethoden sind bei der jeweiligen Verfahrensbeschreibung aufgeführt.

### **3.1 Ermittlung der Wasserhaltekapazität nach DIN ISO 11274**

Neben der Matrix eines Bodens bestimmen vor allem Kornverteilung und Porenraum, dessen Wassergehalt, der großen Einfluss auf die mikrobielle Aktivität eines Bodens hat. Die Wasserhaltekapazität ( $WHK_{max}$ ) eines Bodens gibt an, wie viel Wasser ein Boden gegen die Schwerkraft festhalten kann, ohne dass Sickerwasser aus dem Bodenkörper austritt. 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 2

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

mit

- a  $H_2O$ -Aufnahme pro 100 g naturfeuchtem Boden
- b  $H_2O$ -Gehalt in 100 g naturfeuchtem Boden
- c Trockengewicht von 100 g naturfeuchtem Boden

### **3.2 Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Bodenatmung nach 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 erfolgt aufgrund der Volumenänderungen der Gase Sauerstoff und Kohlendioxid (z. B. durch Messungen mit dem OxiTopC-System). Bei aeroben Prozessen wird Sauerstoff verzehrt und Kohlendioxid gebildet, während bei anaeroben Prozessen organischer Kohlenstoff abgebaut und Kohlendioxid gebildet wird. Sowohl bei aeroben wie anaeroben Prozessen wird das beteiligte Kohlendioxid chemisch durch den Zusatz von z. B. KOH oder NaOH gebunden. Die resultierende Druckänderung wird mittels Drucksensoren erfasst und über das Ideale Gasgesetz (Gleichung 3) in die umgesetzte Stoffmenge des Gases umgerechnet (Details siehe GEOS 2008).

Gleichung 3

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

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]

Für die Versuche werden 70 g naturfeuchtes Haldenmaterial, das auf eine Wasserhaltekapazität von 50% eingestellt wird, in die OxiTopC-Messflaschen eingewogen, der Messkopf verschlossen und die Messflasche in einen Brutschrank (T= 25°C) gestellt. Die Versuchszeit beträgt mindestens 7 Tage. Die Drucksensoren werden zur Verlaufskontrolle täglich ausgelesen. Aus dem Vergleich der mittleren Gasbildungsraten (Gasumsatz/Zeit) von unbehandeltem und vergiftetem Haldenmaterial kann eine Bewertung der Relevanz der mikrobiellen Prozesse vorgenommen werden.

Bei anaeroben Versuchen mit Haldenmaterialien, bei denen eine Methangasbildung vermutet wird, muss nach Versuchsende eine Gasprobe aus der Messflasche entnommen und die Gaszusammensetzung bestimmt werden. Hieraus kann abgeschätzt werden, ob eine Druckänderung im Messgefäß infolge der Kohlendioxid- und / oder Methanproduktion erfolgt ist.

### **3.3 *Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Bestimmung der Enzymaktivität*<sup>2</sup>**

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 (z. B. Fluoreszeindiacetat) verwendet, die durch unspezifische Transportersysteme leicht von aktiven Zellen aufgenommen werden können. Die Reduktion des Fluoreszeindiacetats ist mit einer gut messbaren Farbänderung verbunden. Das entstehende, farbige Fluoreszein ist polar und akkumuliert in der Zelle. Die Ermittlung der Enzymaktivität bietet eine einfache und sensitive Möglichkeit aktive Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) und andere aktive Organismen (Algen, Protozoen, tierische Zellen) zu quantifizieren. Sporen und ruhende Zellen nehmen aufgrund

---

<sup>2</sup> Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg: Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung, Kapitel 8.5 Methoden der Aktivitätsbestimmung, Materialien zur Altlastenbearbeitung, Band 7, April 1991

der inaktiven bzw. nicht vorhandenen Transportsysteme kein Fluoreszeindiacetat auf und zeigen daher keine oder allenfalls geringe Färbung (Details siehe GEOS 2008).

In 250 ml Erlenmeyerkolben werden 2 g der zu untersuchenden auf 50 % Wassergehalt eingestellten Haldenmaterialprobe (unbehandelt, vergiftet) eingewogen, mit Alufolie verschlossen und 24 Stunden bei 25°C konditioniert. Hiernach werden jedem der Kolben 30 ml Phosphatpuffer (Kalium/Natriumphosphatpuffer pH 7,6) sowie 500 µl der Fluoreszeindiacetat-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml hinzugefügt und danach 3 h bei 24°C im Wasserbad geschüttelt. Nach 3 Stunden werden den Inkubationsansätzen jeweils 29,5 ml Aceton zugesetzt. Nach Homogenisierung der Probe werden 1,5 ml jeder Suspension in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß zentrifugiert. Die Extinktion wird von 1 ml des klaren Überstandes bei 490 nm gegen Phosphatpuffer in einer Plastikzelle mittels Photometer bestimmt und die Fluoreszein-Konzentration über eine zuvor aufgenommene Kalibrierkurve ermittelt. Die ermittelten Extinktionen werden zwischen unbehandeltem und vergiftetem Haldenmaterial verglichen. Auf dieser Grundlage wird die Relevanz der mikrobiellen Aktivität bewertet.

### **3.4 Ermittlung der mikrobiellen Aktivität durch Mikrokolorimetrie<sup>3,4</sup>**

Die Kalorimetrie ist eine Methode zur Ermittlung von Wärmemengen, die bei chemischen, physikalischen oder biologischen Prozessen ausgetauscht werden. Kalorimetrische Messungen zur Bestimmung des Wärmeflusses können isotherm oder adiabatisch durchgeführt werden (z. B. Thermal Activity Monitor 2277 (TAM) der Firma Thermometric, Details siehe [GEOS 2008]).

Für die Messungen werden zylindrische Edelstahllampullen mit einem Volumen von 4 ml eingesetzt. Alle Messungen werden mit einer Einwaage von 4 g Haldenmaterial, das auf 50 % Wassergehalt eingestellt wurde, durchgeführt. Danach werden die Edelstahllampullen luftdicht abgeschlossen. Der Start der kalorimetrischen Messungen hat in einem Zeitfenster von 20 – 30 min nach Befüllung der Edelstahllampulle zu erfolgen. Die Messung sollte mindestens 24 Stunden andauern. Langsam ablaufende Prozesse mit geringen thermischen Leistungen können nur in längeren Versuchszeiten (>24 Stunden) abgebildet werden (z. B. Sulfatreduktion). Die erreichten mittleren thermischen Leistungen (freigesetzte Wärme/Zeit)

---

<sup>3</sup> Schippers, A., Mikrokolorimetrie als Kurzzeit-Meßverfahren zur Bestimmung mikrobieller Laugungsaktivität in Bergbaualllasten. DECHEMA-Jahrestagungen '95, Wiesbaden, 1995

werden aufgezeichnet und die Messkurven des unbehandelten mit vergiftetem Haldenmaterial verglichen. Die Auswertung der Messkurven erfolgt nach Einstellung einer konstanten Versuchstemperatur ab ca. 3 Stunden nach Messbeginn. Das Auswertungsende wird auf das Versuchsende festgelegt. Unter Einbeziehung mikrobiologischen Expertenwissens kann das Auswertungsende begründet vorverlegt werden.

#### **4 Hauptuntersuchungen Sickerwasserpfad**

Für die Hauptuntersuchung sind keine weiteren mikrobiologischen Untersuchungen notwendig, da bereits der Untersuchungsschritt „Orientierungsuntersuchung“ für die durchgeführten mikrobiologischen Screeningmethoden Aussagen zur Relevanz der Mikrobiologie bei der Radionuklidfreisetzung erbringt. Zusätzliche Untersuchungen in der Hauptuntersuchung sind daher für die durchzuführenden Prognoserechnungen nicht zielführend.

#### **5 Spezialuntersuchungen Sickerwasserpfad - Quantifizierung mikrobiologischer Prozesse**

Mit den mikrobiologischen Spezialuntersuchungen wird das Ziel verfolgt dominante mikrobielle Populationen näher zu charakterisieren (Ermittlung von Zellzahlen) sowie Anreicherungskulturen für weitere Versuche (siehe Abschnitt 6) zu erhalten. Diese Untersuchungen dienen vor allem der Verbesserung des Prozessverständnisses unter den gegenwärtigen und zukünftigen Bedingungen ohne Handlungsstörungen bei der Freisetzung von Radionukliden (Benennungen von Familien, Gattungen oder Arten).

Zur Quantifizierung der in Haldenmaterialien aktiven Mikroorganismen können die folgenden laborativen Möglichkeiten angewandt werden:

- Herstellung von Anreicherungskulturen
- Mikroskopische Aufnahmen
- Durchführung von Ribonukleinsäure-basierten (RNA) und Desoxyribonukleinsäure-basierten (DNA) Methoden.

In GEOS 2008 erfolgen detailliertere Beschreibungen zur Durchführung von Versuchen mit Anreicherungskulturen. Die weiteren aufgeführten Quantifizierungsmethoden sind prinzipiell zur Beschreibung der mikrobiellen Population geeignet. Sie wurden in GEOS 2008 nicht eva-

---

<sup>4</sup> S. Wentzien, R. Hallmann, W. Sand (1994). Mikrokalorimetrische Zellzahlbestimmungen von acidophilen litho-autotrophen Bakterien. In: Texte 29/94 - Überwachungsmethoden Gentechnik, W. Dubbert, J.M. Lopez Pila (Hrsg.) Umweltbundesamt, Berlin, Seite 297-305

liefert und sind daher in den Abschnitten 5.2 bis 5.3 nur grundsätzlich in ihrem Untersuchungsprinzip beschrieben.

### **5.1 Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährmedien**

Das zu untersuchende Haldenmaterial wird mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%ige Lösung von NaCl in destilliertem Wasser) im Feststoff-Flüssig-Verhältnis von 1:10 ca. 0,5 Stunden suspendiert (Mindestmenge >10 g naturfeuchtes Haldenmaterial). Hiermit werden die am Haldenmaterial befindlichen Mikroorganismen vom Feststoff abgelöst und in das Eluat überführt. Nach ca. 10minütigem Sedimentieren des Haldenfeststoffes werden aus der Elutionslösung je 1 ml in ein Nährmedium pipettiert. Das Nährmedium wird bei 25°C über maximal 14 Tage inkubiert und nach dieser Versuchszeit die Zellzahl ermittelt. Unter Verwendung verschiedener Nährmedien können unterschiedliche Mikroorganismen angereichert werden.

Für Haldenmaterialien mit neutralen / alkalischen Boden-pH-Werten werden folgende Nährmedien eingesetzt:

- R2A-Medium<sup>5</sup> 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 werden folgende Nährmedien eingesetzt:

- Overlay solid Medium für acidophile Mikroorganismen nach Johnson und Hallberg

Des Weiteren werden 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 - Ermittlung der Keimzahlen von Thiobacillus denitrificans (nitratreduzierende schwefeloxidierende Mikroorganismen)

---

<sup>5</sup> DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

Heterotrophe Mikroorganismen:

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

Abbildung vorwiegend reduzierender 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)
- 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

Die Zusammensetzung der verschiedenen Nährmedien kann GEOS 2008 entnommen werden.

## **5.2 Mikroskopische Aufnahmen**

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen in Haldenmaterial sind fluoreszenzmikroskopische Methoden sinnvoll, da die Zellen jeweils mit einem Farbstoff angefärbt werden können und so von Mineralpartikeln 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.

## **5.3 Durchführung von Desoxyribonukleinsäure-basierten (DNA) Methoden**

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

kation 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) gelelektrophoretisch getrennt und charakterisiert. Die damit generierten molekularen Fingerabdrücke ermöglichen die zeit- und kostensparende Analyse einer Vielzahl von mikrobiellen Gemeinschaften unter verschiedenen Bedingungen.

## **6 Parameterbestimmung zur Quelltermbeschreibung auf der Grundlage der Spezialuntersuchungen, Prognoserechnungen**

Das Ziel von Spezialuntersuchungen im Kontext des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten besteht darin, quantitative Aussagen zum zukünftigen Freisetzungverhalten von Radionukliden zu liefern. Als Methode wurde eine Kombination von Laboruntersuchungen und prognostischen Modellierungen entwickelt, die grundsätzlich allgemein ist, aber bisher nur für Migrationsprozesse von konventionellen Schwermetallen (im Besonderen Zink) unter aeroben Bedingungen geprüft wurde. Die Übertragbarkeit auf anaerobe Prozesse und auf Radionuklide steht bisher aus.

Die Methode besteht aus folgenden Teilschritten, die in den Kapiteln 6.1 bis 6.8 beschrieben werden:

1. Chemische und physikalische Untersuchung des Haldenmaterials sowie Analyse von Bindungsformen
2. Identifizierung möglicher Energielieferanten für mikrobiologische Prozesse
3. Auswahl geeigneter Mikroorganismenkulturen, die die vorhandenen Energiequelle unter den vorherrschenden Umgebungsbedingungen (oxidierend oder reduzierend, pH-Wert) verwerten können. Vorzugsweise sind Mikroorganismen zu berücksichtigen, die in den Anreicherungskulturen nachgewiesen wurden.
4. Durchführung von parallelen Schüttelkolbenversuchen zur Abschätzung, ob sich eine mikrobiologisch induzierte Freisetzung einstellt.
5. Die Schüttelversuche werden mit einem Freisetzungsmodell nachgerechnet und Populationsparameter der Mikroorganismengemeinschaft bestimmt.
6. Durchführung von Säulenversuchen unter Berücksichtigung der vorherrschenden Milieubedingungen.

7. Nachrechnung der Säulenversuche mit den Parametern aus den Schüttelkolbenversuchen und ggf. Präzisierung der Modellparameter.
8. Durchführung von Freisetzungs- und Transportprognose innerhalb der Quelle.

### **6.1 Chemische und physikalische Untersuchung des Materials und Analyse von Bindungsformen**

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, Trockenrohdichte ( $b_{pS}$ ) nach DIN 18125-2, Kornrohdichte ( $\rho_s$ ) 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 Mesanleitungen

##### **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)**

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

##### **Ermittlung von organischen Inhaltsstoffen (Gesamtgehalte)**

- Total Organic Carbon (TOC)

### **Physikochemische Eigenschaften**

- Kationenaustauschkapazität, Säurepufferungskapazität

### Mineralogische Untersuchungen

- Quantitative Röntgenphasenanalyse
- Mikroskopische Untersuchung von Dünn- und Anschliffen

## **6.2 Identifizierung möglicher Energielieferanten für mikrobiologische Prozesse**

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

## **6.3 Auswahl von Mikroorganismenkulturen für Elutionsversuche**

Aus dem 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.

## **6.4 Durchführung von parallelen Suspensionsversuchen**

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 möglichst wöchentlich auf die in 6.2 und 6.3 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 entsprechend Abschnitt 5.1 überprüft.

### **6.5 Nachrechnung der Suspensionslaugungsversuche**

Zur Identifikation und Bestimmung wichtiger Populationsparameter werden die Ergebnisse der Schütteltests mit einem Transport- oder Freisetzungsmodell nachgerechnet, welches die mikrobiologischen Prozesse in geeigneter Weise abbilden kann (siehe Abschnitt 6.7). Als wesentliche Parameter sollten die Stoffabbaurate, die Populationsdichte der Mikroorganismen, die Wachstumsraten, die Stoffkonzentration bzw. der Stoffgehalt sowie der Ertragskoeffizient ermittelt werden. Detaillierte Ausführungen zur Erlangung der Prognoseparameter befinden sich in [GEOS 2008]. Zur besseren Nachvollziehbarkeit werden im Folgenden die mathematischen Grundlagen aufgeführt.

Das grundlegende Modell zur Beschreibung des Freisetzungsverhaltens geht auf Monod [MONOD 1949] zurück. Den Ausgangspunkt bildet der Zusammenhang zwischen Stoffabbaurate  $\mu$  und der Konzentration des Energielieferanten  $s$ :

Gleichung 4

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

wobei:

$\mu_{\max}$  - maximale Stoffabbaurate

$K_s$  - Halbsättigungskonstante

Die Ansätze, welche eine Entwicklung der Mikroorganismenpopulation berücksichtigen, besitzen zwei getrennte unabhängige Variablen. Zur vollständigen Prozessbeschreibung wird deshalb eine unabhängige Modellgleichung benötigt. Eine solche wurde von [SIMKINS & ALEXANDER 1994] in Form einer Massenbilanzgleichung formuliert:

Gleichung 5

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

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. Damit kann die Abhängigkeit von der Populationsdichte eliminiert werden. Im Ergebnis entsteht:

Gleichung 6

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

$\mu_{\max}$  - maximale Stoffabbaurate

$K_s$  - Halbsättigungskonstante

$s$  - Stoffkonzentration bzw. Stoffgehalt ( $s_0 -$  Stoffausgangskonzentration)

$x_0$  - Ausgangspopulationsdichte

$Y$  - Ertragskoeffizient

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

Nachdem diese Gleichung in ein mathematisches Modell implementiert wurde, werden die vier verschiedenen Suspensionslaugungsversuche (steril, ohne Beimpfung und mit Beimpfung) nachgerechnet. Dabei wird angenommen, dass die Parameter  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$  und  $s_0$  nicht von der Beimpfung abhängig sind. Die zeitliche Entwicklung der Änderung der Konzentration des Energielieferanten  $\frac{ds}{dt}$  kann gemessen werden. Damit ist es möglich, den Parameter  $\frac{x_0}{Y}$

für jeden der Versuche anzupassen. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass zur Beschreibung der Versuche die Berücksichtigung einer initialen Porenwasserkonzentration, welche vom kon-

kreten Material abhängt, zu berücksichtigen ist. Deshalb ist es notwendig, neben den Suspensionslaugungsversuchen auch Perkolationsversuche durchzuführen, um ausreichend Daten zur Bestimmung aller Parameter zur Verfügung zu haben. Dabei kann angenommen werden, dass die Anfangsbedingung hinsichtlich der Populationsdichte und der Stoffkonzentration im Ausgangsmaterial gleich derjenigen bei den Suspensionslaugungsversuchen ist.

### **6.6 Durchführung von parallelen Perkolationsversuchen**

Säulenversuche bilden die natürlichen Verhältnisse modellhaft ab und dienen der Ergänzung und Verifizierung der in den Suspensionslaugungsversuchen ermittelten Prognoseparameter. Mit den Perkolationsversuchen können zusätzlich zu den Suspensionslaugungsversuchen unabhängige Messdaten zur Bestimmung der Modellparameter erlangt werden. Dazu werden neben der Freisetzungskinetik auch die Durchströmung und die Transportprozesse im teilgesättigten Bodenkörper modellhaft abgebildet. Die Bestimmung der Transportparameter sollte durch Untersuchungen mit einem inerten Tracer erfolgen im Nachgang zu den Perkolationsversuchen an derselben Säule.

Perkolationslaugungen werden über einen Zeitraum von 6 – 12 Monaten in unterschiedlichen Säulenmaßstäben mit unbeimpften Haldenproben unter Berücksichtigung der in Abschnitt 6.3 bestimmten Milieubedingungen unter Laborbedingungen durchgeführt. Die Durchströmungsrate der Säulen sollte den natürlichen Bedingungen mit maximal 1000 mm/a möglichst nachempfunden werden. Bei einer Länge der Säulen von 20 cm und einer mittleren Wassersättigung von 10% resultiert eine Verweilzeit des Wassers von ca. einer Woche. Die Analyse sollte möglichst in einem wöchentlichen Rhythmus auf die in 6.2 und 6.3 ermittelten dominanten chemischen Prozessparameter, auf die relevanten Radionuklide und auf pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit sowie Redoxpotential erfolgen. Auch bei größeren Säulen ist ein wöchentlicher Messrhythmus sinnvoll, da dadurch das Durchbruchverhalten gut nachvollzogen werden kann.

Für Versuche unter anaeroben Bedingungen wird folgende Vorgehensweise empfohlen:

1. Versuche in kleinen Säulen können in einer Anaerobox durchgeführt werden
2. Versuche in großen Säulen sollten unter Schutzgas (z. B. Gemische aus Kohlendioxid und Stickstoff) zur Vermeidung von Sauerstoffzutritten in die Säulenanlage hinein durchgeführt werden.

### **6.6.1 „Kleine“ Säulen**

Das Fassungsvermögen der kleinen Säulen sollte mindestens 5 kg betragen. Die Säulenperkolationen sollten mit Haldenmaterial der Korngrößenfraktion < 20 mm durchgeführt werden. Erfahrungsgemäß tragen diese Fraktionen signifikant zum Stoffaustragsverhalten bei, da der Austrag aus gröbereren Fraktionen in der Regel vernachlässigbar ist. Die Säulendimension muss ein Verhältnis von Höhe zu Innendurchmesser von 2 bis 4 aufweisen, um einen ausreichenden Kontakt des Elutionsmittels mit der Festphase zu gewährleisten. Die Säulen sind mit abnehmbaren Abdeckungen zur Reduzierung von Verdunstungseffekten auszustatten, die Zuleitung des Elutionsmittels erfolgt über eine Dosierpumpe aus dem Vorratsgefäß in die Säulen. Die Haldenproben werden entsprechend der natürlichen Lagerungsdichte<sup>6</sup>, in die Säulen eingebaut. Die Beaufschlagung der Säulen erfolgt mit einer Niederschlagsmenge von 1000 mm/a von oben. Das Sickerwasser wird aufgefangen und möglichst wöchentlich auf die in 6.2 und 6.3 ermittelten dominanten chemischen Prozessparameter, auf die relevanten Radionuklide und auf pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit sowie Redoxpotential analysiert. Je nach Radionuklidzusammensetzung des Ausgangsmaterials und der damit erwarteten Eluatzusammensetzung wird die Erlangung von Mischproben über einen längeren Versuchszeitraum zugelassen. Hierfür ist eine sachliche Begründung vorzulegen.

### **6.6.2 „Große“ Säulen**

Die „großen“ Säulen sollten mit einem Fassungsvermögen von ca. 100 kg konzipiert werden, um Maßstabsübertragungen vom Schüttelkolben über „kleine“ Säulen auf „große“ Säulen mit Hilfe der Freisetzungs- und Transportprognoserechnungen vornehmen zu können. Die Säulendimension muss ein Höhen:Innendurchmesser von 2 bis 4 aufweisen, um einen ausreichenden Kontakt des Elutionsmittels mit der Festphase zu gewährleisten. Die Säulen sind mit abnehmbaren Abdeckungen auszustatten, die Zuleitung des Elutionsmittels erfolgt über eine Dosierpumpe aus dem Vorratsgefäß in die Säulen. Die Haldenproben werden möglichst naturnah, der natürlichen Lagerungsdichte entsprechend, in die Säulen eingebaut. Die Beaufschlagung der Säulen mit dem Elutionsmittel wird unter Annahme einer Niederschlagsmenge von 1000 mm/a eingestellt. Sickerwasser wird aufgefangen und wöchentlich auf die in 6.2 und 6.3 ermittelten dominanten chemischen Prozessparameter, auf die relevanten Radionuklide und auf pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit sowie Redoxpotential analysiert. Je nach Radionuklidzusammensetzung des Ausgangsmaterials und der damit erwarteten

ten Eluatzusammensetzung wird die Erlangung von Mischproben über einen längeren Versuchszeitraum zugelassen. Hierfür ist eine sachliche Begründung vorzulegen.

### **6.7 Modellierung der Radionuklidfreisetzung aus Säulenversuchen und Präzisierung der Modellparameter**

Grundsätzlich können Simulationsprogramme für die Nachrechnung und die Freisetzungsprognose eingesetzt werden, die eine Abbildung der physikalischen und mikrobiologischen Prozesse erlauben, welche in den Suspensionslaugungsversuchen, in den Perkolationsversuchen und auch im realen System zu erwarten sind. Dies ist z. B. beim Programm GOLD-SIM 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 Grundlage für die modellhafte Beschreibung bildet Gleichung 6. Neben der Dynamik der Feststoffumsetzung kann auch die Dynamik der Populationsdichte berechnet werden. Die dafür notwendigen Parameter werden gewonnen, indem mit dem Freisetzungsmodell die Suspensionslaugungs- und die Perkolationsversuche nachgerechnet und die Parameter dabei angepasst werden.

### **6.8 Durchführung einer Freisetzungsprognose**

Nachdem die mikrobiologischen Populationparameter anhand der Nachrechnung der Laboruntersuchungen bestimmt wurden, kommt es darauf an, unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse möglichst einfache Ansätze für die Freisetzungsprognose 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. Eine Vereinfachung der Ansätze gelingt für einige Spezialfälle, die weiter unten charakterisiert werden.

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.

---

<sup>6</sup> Naturnahe Lagerungsbedingungen können nach Augenschein im Gelände abgeschätzt werden. Der Einbau in die Versuchssäulen erfolgt mit einer gestörten Probe in Annäherung an die Lagerungsdichte.

Die Umsatzrate für den für das Wachstum der Mikroorganismenpopulation maßgeblichen Energielieferanten wird entsprechend Gleichung 6 berechnet. Entsprechend dieser Gleichung ist die Freisetzungsrate zu Beginn der Freisetzung ( $s=s_0$ ):

Gleichung 7

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

Unter der Bedingung  $\frac{x_0}{Y} \geq s_0$  entspricht dies auch gerade der Maximalkonzentration. Dies ist der Fall, wenn sich bereits die maximale Populationsdichte der Mikroorganismen eingestellt hat.

Für alle anderen Fälle ist keine Vereinfachung möglich und es ist Gleichung 6 in Ansatz zu bringen.

Die Freisetzungsrate  $a_i$  für das Radionuklid  $i$  wird aus der Stöchiometrie der Stoffgehalte bzgl. des Energielieferanten umgesetzt:

Gleichung 8

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

Dabei muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass diese Vorgehensweise eine Analyse der Bindungsformen der Radionuklide voraussetzt und nur auf solche Radionuklide anwendbar ist, die bei der Umsetzung des Energielieferanten mit freigesetzt werden. In praktischen Fällen kann es sich beim Energielieferanten bspw. um sulfidische Bindungsformen (z.B. Pyrit) handeln.

## **7 Quellenverzeichnis**

- [BMU 2005] Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten und Erweiterung des Anwendungsbereiches, Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz BMU-2005-672
- [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
- [GEOS 2008] Methodische Weiterentwicklung des Leitfadens zur radiologischen Untersuchung und Bewertung bergbaulicher Altlasten – Mikrobiologisch induzierte Freisetzung von natürlichen Radionukliden aus Halden mit dem Sickerwasser, 31.03.2008, G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH, Auftraggeber BfS
- [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
- [SIMKINS & ALEXANDER 1994]: Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl Environ. Microbiol. 47 (1984), S. 1299 - 1306
- [MONOD 1949]: The growth of bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiol. 3 (1949), S. 371-394

## **8 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>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 Fluoreszenz <u>in situ</u> Hybridisierung, 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 Energielieferanten bei dessen mikrobiologischer Umsetzung produziert wird.

**Leitfadenelement Grundwasserpfad  
Anlage - Mikrobiologie**

---

<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.
<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>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
<b>Rate</b>	Größe eines Stoffumsatzes pro Zeiteinheit. Es kann sich sowohl um Abbau (Abbaurrate) als auch um Wachstum (Wachstumsrate) handeln, Wichtige Raten im Bereich der Dynamik mikrobiologischer Populationen sind die Abbaurrate 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> oly-morphism 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

**Leitfadenelement Grundwasserpfad  
Anlage - Mikrobiologie**

---

<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>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>
<b>16S-rRNA-Gen</b>	in allen Organismen vorhandene Nukleotidsequenz zur Klassifizierung von Organismen. Diese Sequenz enthält phylogenetische Information.