

# Sachbericht zum Verwendungsnachweis

## Verbundprojekt

Biologische Radionuklidentfernung durch Nutzung  
natürlicher Assoziationsprozesse [RENA]



### Teilprojekt B (FKZ: 02 NUK 066B)

in der Fördermaßnahme

Nukleare Sicherheitsforschung

### Autoren

**Dr. Susanne Seidel, Ariunzaya Löwe,  
Dr. Daniel Heredia,  
Prof. Dr. Thorsten Schäfer (PI)**

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Inst. f. Geowissenschaften, Burgweg 11, 07749  
Jena [thorsten.schaefer@uni-jena.de](mailto:thorsten.schaefer@uni-jena.de)

**Dr. Lea Traxler, Maximilian Herold,  
Prof. Dr. Erika Kothe (Co-PI)**

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Mikrobielle Kommunikation, Neugasse 25, 07743 Jena

**Projektlaufzeit: 01.09.2021 – 31.07.2025**

**Erstellungsdatum: 16.02.2026**

### Projektpartner

- **Teilprojekt A: Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR)**
- **Teilprojekt C: Leibniz Universität Hannover**
- **Teilprojekt D: VKTA - Strahlenschutz, Analytik & Entsorgung Rossendorf e. V.**

Dieses Forschungs- und Entwicklungs-Projekt wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und vom Projektträger Karlsruhe (PTKA) betreut. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen/ Autoren.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Inhaltsverzeichnis

I.	Teil I Kurzfassung .....	3
I.1	Aufgabenstellung .....	3
I.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens .....	3
I.3	Wesentliche Ergebnisse im Überblick .....	4
I.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	4
II.	Teil II Eingehende Darstellung .....	5
II.1	Motivation und Aufgabenstellung .....	5
II.2	Erzielte Ergebnisse .....	5
II.2.1	Charakterisierung des Ausgangsmaterials .....	5
II.2.2	Substrateigenschaften für das Wachstum von <i>S. commune</i> .....	12
II.2.3	Hydrodynamik und Elementmobilisierung: Wachstumsmonitoring an Modellporensystemen und in der Bodensäule.....	13
II.2.4	Wachstum von <i>S. commune</i> mit anderen Bodenorganismen und Einfluss auf die Mobilität und Verteilung von Radionukliden/Schwermetallen im Substrat .....	15
II.3	Darstellung des während des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf diesem Gebiet bei anderen Stellen.....	23
II.4	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	23
II.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen außerhalb des Verbundprojektes .....	23
II.6	Veröffentlichungen, Vorträge Referate, etc. Veröffentlichungen:.....	23
II.7	Literaturverzeichnis .....	25

## I. Teil I Kurzfassung

### I.1 Aufgabenstellung

Das übergreifende Ziel des Projekts war die Entwicklung einer optimierten *ex situ* Remediationsstrategie für mehrfach (hier radiochemisch und organisch kontaminierte Böden). Finales Ziel war eine bessere Vorhersagbarkeit der Remediationseffizienz und die Entwicklung eines diesbezüglichen Anwendungstools auf Basis der reaktiven Transportmodellierung. Dazu wurden die realen Kontaminationen in Bodenmaterialien im Hinblick auf ihre Mobilisierbarkeit durch und den Einbau in Pflanzen und Pilze untersucht. Diese Herangehensweise erforderte eine Analyse der Wirtsmaterialien, der Kontaminationstypen, insbesondere unterschiedliche Radionuklidspezies, und ihre Extraktionsmöglichkeiten. Zweitens müssen Pflanzen und Mikroorganismen wie beispielsweise Pilze als Remediationsfaktoren identifiziert werden und mit konventionellen Verfahren verglichen werden. Parallel ist der reaktive Transport im Bodenmaterial analytisch zu erfassen. Die inhaltliche Durchführung des Teilprojektes B erfolgte u.a. über zwei Promotionsarbeiten des Projektpartners Friedrich-Schiller-Universität Jena. Das Untersuchungsprogramm war in drei Arbeitspakete (AP) gegliedert: AP 1: Material (Kontamination/ Bodenbestandteile/ Mikrobiologie), AP 2: Mobilisierung (Remediationsprozesse/ Hydrodynamik) und AP 3: Remediationskonzept (Numerische Analyse/ Verallgemeinerungsfähigkeit).

### I.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

In situ- und ex situ-Ansätze werden für die Bioremediation von Radionuklidkontaminationen in Böden in der Nachbarschaft technischer Nuklearanlagen bzw. aufgrund natürlicher radioaktiver Materialien (sog. NORM) untersucht und diskutiert. Bisherige Projekte zur Untersuchung von Dekontaminationsmöglichkeiten von Böden und Gesteinen fokussierten auf  $^{137}\text{Cs}$  und  $^{90}\text{Sr}$ . Der reaktive Transport (experimentell-analytisch und numerisch) stand jedoch nicht im Zentrum derartiger Untersuchungen. Neben den radiologischen Bewertungen finden auch Faktoren des konventionellen Abrisses innerhalb der Umweltverträglichkeitsprüfung (UVP) bei Rückbauvorhaben Beachtung. Umweltauswirkungen schließen hier u.a. Luftschadstoffe, Partikelfreisetzung (z.B. Asbest) und Schadstoffe im Boden (bspw. Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe, PAK) ein. Vor allem Bitumenanstriche, welche insbesondere an Gebäudfundamenten und als Abdichtungen enthalten sind und bis in die 1980er Jahre aus Rückständen der Erdölraffinerien und aus Steinkohleteer hergestellt wurden, besitzen aufgrund der PAK-haltigkeit als Boden- und Grundwasserverunreinigung große Relevanz. Arbeiten zum Potential Myzel-bildender Pilze zur langfristigen Immobilisierung von Radionukliden (RN's) in Erdreich zum Zwecke einer Strahlenschutzvorsorge existieren bereits und das grundsätzliche Potenzial von Pilzen für die Sanierung von Böden und Immobilisierung von RN sowie die höhere Akkumulationsraten (z.B. für Cs) im Vergleich zu Pflanzen wurde in der Literatur in den vergangenen Jahren bereits diskutiert. Dabei wurden RN mobilisiert, auf der Oberfläche des Pilzes gebunden oder extra- und intrazellulär immobilisiert. Erwartungsgemäß haben Bodenmaterial und Pilzart einen Einfluss auf die Immobilisierung der RN. Labor- und Freilandexperimente konnten außerdem zeigen, dass gerade die Weißfäulepilze in sandigen und nährstoffarmen Böden wachsen und durch Ausscheiden signifikanter Mengen organischer Verbindungen (Exsudate) eine Mobilisierung gebundener RN bewirken können. Analysen der Feld- und Phytokammer-Versuche zeigten, dass *Schizophyllum commune* eine leichte Erhöhung der  $^{137}\text{Cs}$ -Aufnahme (des Transferfaktors) gegenüber der Kontrolle zeigte und ein verheißungsvoller Kandidat ist. Komplexe Porengeometrien und ihre Porennetzwerke verursachen oft Unsicherheiten in den numerischen Lösungsansätzen zur Transportmodellierung (z.B. Ortsauflösung, Geometriedaten). Trotz der genannten Limitierungen sind computertomografische

Verfahren ( $\mu$ CT) derzeit als zerstörungsfreie Analysenmethode eine der wichtigsten Grundlagen für die Segmentierung von Porengeometriedaten als Grundlage der numerischen Transportanalyse. Derartige Daten können durch punktuelle Untersuchungen mit höherer Ortsauflösung, bspw. Synchrotron-CT, Interferometriemikroskopie und FIB-TEM unterstützt werden. Analytisch ist die Positronenemissionstomografie (PET) zu Untersuchungen der Fließgeschwindigkeitsfelder geeignet. Hier sind Aussagen zur zeitlichen Entwicklung der Heterogenität der Fließpfade auch in komplexen Systemen, wie Böden, möglich; bspw. die Entstehung von bevorzugten Fließkanälen. Im Rahmen des Exzellenz-Clusters „Balance of the Microverse“ werden in Jena Fluoreszenzfarbstoffe für die in vivo- und in vitro-Fluoreszenzmikroskopie weiterentwickelt. Dies ermöglicht die Analyse des Pilzes im (Boden-)Substrat und gleichzeitig die Verknüpfung zum pilzlichen Stoffwechsel. Damit stehen im geplanten Projekt Werkzeuge zur Verfügung, die es erlauben, nicht nur die Verteilung des Pilzmyzels in einer Bodenmatrix zu analysieren, sondern auch deren Einfluss auf das Verhalten der Kontaminanten und die Strukturierung des Porennetzwerks durch das Pilzmyzel abzuschätzen. Die Kombination der Techniken (1) Fließpfadanalyse mit PET, (2) Analyse des Porennetzwerkes mit  $\mu$ CT und (3) Bildanalyse durch Anfärbetechniken der Veränderung der Porengeometrie aufgrund von Wurzel- und Pilzwachstum ist innovativ. In dieser Kombination existierten vor RENA noch keine Daten als Grundlage für die reaktive Transportmodellierung in biotisch veränderten Bodenmaterialien.

### **I.3 Wesentliche Ergebnisse im Überblick**

Im Fokus des Verbundprojektes RENA stand die Entwicklung einer optimierten ex-situ Remediationsstrategie für mehrfach (hier radiochemisch und organisch) kontaminierte Böden. Die Motivation war, praktikable und belastbare Parametrisierungen für numerische Simulationen zur besseren Vorhersagbarkeit der Remediations-Effizienz und die Entwicklung eines diesbezüglichen Anwendungstools auf Basis der reaktiven Transportmodellierung zu generieren. Bei den im Rahmen des Projekts gewählten kontaminierten Substraten aus Rossendorf und Rheinsberg ergab sich nach detaillierter Charakterisierung, dass es sich um gering verwitterte eiszeitliche fluviatile Sande basischen pH-Werts mit geringer Kationenaustauschkapazität (KAK) und geringen natürlichen Organikanteilen handelt. Nur geringe Gehalte an Tonmineralen und geringe Bioverfügbarkeit der untersuchten Elemente konnte ebenfalls festgestellt werden, somit stehen nur wenig Nährstoffe im Ausgangsmaterial für das Wachstum von Mikroorganismen und Pilzen zur Verfügung. Eingehende Untersuchungen zeigten einen hohen Anteil der Kontamination in der Ton- und Siltfraction, welche durch eine einfache Siebung/Schlammung separiert werden und schon signifikant das zu sanierende Substratvolumen verringern könnte. Die direkte Behandlung mit einem Weißfäulepilz (*Schizophyllum commune*) zeigte bei Zugabe von optimiertem Nährmedium ein Wachstum auf den Substraten bis zur kompletten Verschließung der Porenräume, Veränderung des Porengefüges und Permeabilitätsreduktion des Substrats in Kleinstsäulenexperimenten. Ein Upscaling dieser Versuche sollte als ein nächster Schritt angedacht werden ( $\mu$ CT Ortsauflösung eine Herausforderung). Die Verwendung von aus Pilzkulturen separierten Hyphenexsudaten zeigte eine hohe Mobilisierung von Metallen und könnte als ein Vorbereitungsschritt der Erhöhung der Metall-Bioverfügbarkeit ohne Veränderung der Porenraumgeometrie gesehen werden.

### **I.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Neben der engen Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern auch in anderen drittmittelgeführten Projekten wurden keine weiteren Stellen involviert.

## II. Teil II Eingehende Darstellung

### II.1 Motivation und Aufgabenstellung

Motivation für das Verbundprojekt waren reale standortspezifische Kontaminationen an zwei Standorten. Die Untersuchungen starteten mit dem ausgekofferten, vorbehandelten und über mehrere Jahre zwischengelagerten Material aus Rückbauprojekten des VKTA am Standort des ehemaligen Zentralinstituts für Kernforschung in Rossendorf bzw. in Abstimmung mit EWN aus dem ehemaligen Forschungsreaktor am Standort Rheinsberg. Kontaminationen mit  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  und  $^{90}\text{Sr}$  standen hierbei im Vordergrund, wobei an stabilen Isotopen in freigemessenem Material am Standort Jena gearbeitet werden konnte. Zusätzlich zu diesen Schwermetallbelastungen konnte ein letztes, freigelegtes Teilstück der spezifischen Kanalisation als co-kontaminert mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) mit frischem Material auch für mikrobiologische Untersuchungen verwendet werden. Die qualitativen und quantitativen Vergleiche mit in situ Bodenmaterial in Tschernobyl konnten aufgrund der politischen Lage während der Projektlaufzeit nicht durchgeführt werden.

Im Fokus des Verbundprojektes RENA stand die Entwicklung einer optimierten *ex situ* Remediationsstrategie für mehrfach (hier radiochemisch und organisch) kontaminierte Böden. Die Motivation dafür war, praktikable und belastbare Parametrisierungen für numerische Simulationen zur besseren Vorhersagbarkeit der Remediations-Effizienz und die Entwicklung eines diesbezüglichen Anwendungstools auf Basis der reaktiven Transportmodellierung zu generieren.

Das Teilprojekt B fokussierte deshalb auf drei Themenbereiche:

- Im AP 1 vor allem auf die detaillierte Charakterisierung der Kornmineralogie, des Anteils von kolloidalen Phasen und der Kornüberzüge (organische Kutane), Durchführung sequentieller Extraktionen zur Analyse der Bioverfügbarkeit der RN's und der Biodiversitätsanalysen am Realmaterial (mit Schwerpunkt auf Pilzen) und der (Bio)Aktivität (Lebendkulturen, Mikrobiomanalysen, Transkriptomanalysen) im Bodenmaterial zu Beginn und während der Experimente.
- Im AP 2 lag der Fokus auf der Mobilisierung als Remediationsstrategie, welche die Hydrodynamik und deren Veränderung durch Durchwurzelung mit Pilzen betraf, vor allem durch Analyse der  $\mu\text{CT}$ -Daten bzgl. der verknüpften Porosität und Permeabilitätsänderung und dem Einfluss von Metaboliten (z.B. Wurzelexsudate) und anderer gelöster Substanzen in der Mykorrhizosphäre.
- Im finalen AP 3 ging es um die Prognostizierbarkeit der Remediationskonzepts und die Übertragbarkeit auf andere kontaminierte Standorte mittels reaktiver Transportmodellierung. Konzeptionelle Idee ist die Erstellung eines Porositäts- und Kompositionsmodell mittels  $\mu\text{CT}$ -Analytik und die Herausforderungen bei der Segmentierung (Dichtekontrast, Limitation Ortsauflösung (Kornkutane), Limitation Grauwertüberlappung (Porensegmentierung)), Numerische Analyse der Transportbedingungen als Funktion der Kompaktion bzw. der Veränderung des Korngefüges durch Pilzhyphenwachstum und Berücksichtigung von Permeabilitätsanisotropien mit Hinblick auf Optimierung der Prozesse für die geplante Anwendung und das Upscaling.

### II.2 Erzielte Ergebnisse

#### II.2.1 Charakterisierung des Ausgangsmaterials

**Probennahme und Probenumfang.** Das Probenmaterial VKTA 1 (**Abb. 1**) aus Rossendorf

(ca. 30 kg, s. Tab. 1) wurde zunächst bei 40°C sechs Tage schonend getrocknet und anschließend homogenisiert. Das frische Material VKTA 2 bzw. VKTA PAK aus dem Rückbau der Kanalisation RF 83 wurde steril entnommen und gekühlt und dunkel gelagert. Darüber hinaus stand weiteres, älteres Probenmaterial zur Verfügung (**Tab. 1**). Am Standort Rheinsberg (**Abb. 1**) wurde mit ein Zoll Stechzylinder (ca. 70 g) durch senkrecht einstecken befüllt und ausgegraben, sodass das Bodengefüge möglichst erhalten blieb. Weitere Proben wurden getrocknet und homogenisiert. Aus dem Testfeld in Tschernobyl konnte kein Probenmaterial in der Projektlaufzeit gewonnen werden.



**Abb. 1:** Inaktives Probenmaterial, Oben: Rossendorf, Links: Palettenboxen, aus denen VKTA 1 entnommen wurde. Rechts: Haufwerk des Aushubs beim Abbau der RF 83 aus dem VKTA 2 (PAK) entnommen wurde. Unten: Rheinsberg, Links: Probenahmeraster an der Schutzzeltposition 5, beprobt wurden die Felder Be 8.4 bis Be.8.7 (rot markiert). Mitte: Sets aus Probenahmebehältern der jeweiligen Felder. Recht: Dunkle Lagen aus Fe-(Hydr)oxiden und Schwermineralen, Feld Be 8.6.

**Tab. 1:** Alle Probenbezeichnungen mit Probenahme-Lokationen der verwendeten Materialien.

Standort	Bezeichnung	Lokalität	Beprobung	Koordinaten WGS 84
Rossendorf	VKTA 1	Unterhalb Gebäude 30.8	Aus Lager, Mai 2022 durch VKTA bereit gestellt	51.059043 13.955809
	VKTA PAK bzw. VKTA 2	Haufwerk, ehemalige Kanalisation RF 83	Frisch entnommen im September 2022	51.061612 13.951475
	RKS-6500 (1,5-1,75 m Tiefe)	Gelände Forschungsreaktor	Bereits 2019 für Voruntersuchungen zur Verfügung gestellt	
	RKS-3500-800 (0-0,25 m Tiefe)			
Rheinsberg	RB 1	Ehemaliges Lager für aktive flüssige Abfälle, Schutzzeltposition 5, Freigelände Überwachungsbereich KB	Am 10.05.22 Rasterfeld Be 8.4	53.148610 12.990337
	RB 2		Am 10.05.22 Rasterfeld Be 8.5	53.148601 12.990348
	RB 3		Am 10.05.22 Rasterfeld Be 8.6	53.148597 12.990361
	RB 4		Am 10.05.22 Rasterfeld Be 8.7	53.148590 12.990369
	RB bzw. RB 1 - 4 bzw. RB Misch	Repräsentative Mischung aus RB 1 bis 4		

Zur Bestimmung der Korngrößenverteilung für u.a. spätere Modellierungen des Porensystems wurde das Material mittels Nasssiebungen entsprechend DIN 66165 gesiebt und der Feinanteil < 63 µm für die weitere Bearbeitung aufgefangen. Die Korngrößenverteilung der < 63µm Fraktion wurde mittels Lasergranulometrie bestimmt. Für XRD-Analysen der enthaltenen Tonminerale wurde die < 2 µm Fraktion abgetrennt. Die kombinierte Kornsummenkurve nach DIN 4022

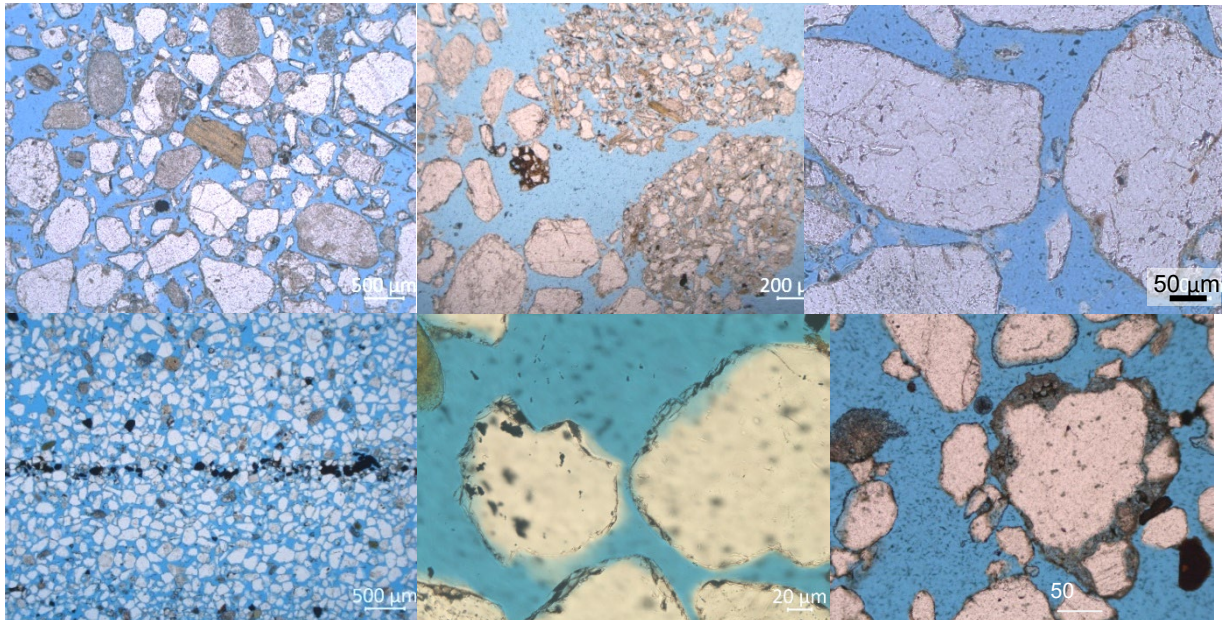
ergeben für die Materialien aus Rossendorf und Rheinsberg eine sehr ähnliche Verteilung eines eng gestuften Mittelsandes mit mehr als 90 % Sand und sehr geringem Feinanteil von ca. Gew. 6,2 % in Rossendorf und 2 - 3,5 Gew. % in Rheinsberg. Der Tonanteil beträgt zwischen 0,1 und 0,3 % Gew.%. Der Hauptteil der reaktiven Oberflächen befindet sich in der Silt- und Tonfraktion < 63 µm, welche auch die Tonminerale mit hohen Sorptionsoberflächen enthält. Der doppelt bzw. dreifach höhere Feinkornanteil am Standort Rossendorf führt daher zu einer erheblich höheren Sorptionskapazität, obwohl der prozentuale Anteil am Gesamtmaterial bei beiden gering ist. Der Anteil an gröberem Material größer 4 mm variiert unter den Proben, beträgt aber stets weniger als 3%. Einige weiteren Untersuchungen wurden an Fraktionen der Materialien vorgenommen, wo dies sinnvoll war (z.B. < 2 mm für sequentielle Extraktionen nach Zeien & Brümmer (1989); < 63 µm zur Untersuchung der Eigenschaften der Silt + Ton Fraktion. Im Folgenden ist gekennzeichnet welche Fraktionen verwendet wurden.

Die Bodenmaterialien beider Standorte zeigen nur eine sehr geringe Podsolierung und keine typischen Bodenhorizonte, sodass hier nicht von Boden im engeren Sinne gesprochen werden kann. Vielmehr handelt es sich um gering verwitterte eiszeitliche fluviatile Sande der letzten Vereisungsphase (Rossendorf: Elster-2-Stadium, Rheinsberg: Weichselkaltzeit) mit fehlender diagenetischer Überprägung und nur geringer Verwitterung. Im Folgenden wird daher die Bezeichnung (Boden-) Material oder -Substrat verwendet. Im Material aus Rheinsberg weisen Feuersteine mit chalzedonischem Gefüge bis 2-3 cm Größe eine Lage nördlich der Feuersteinkette hin.

**Mineralogisch-petrographische Charakterisierung.** Im Rahmen einer detaillierten petrographischen Auswertung wurden polierte Dünnschliffe von fünf Streupräparaten (VKTA1, RB Be 8.4-8.7) und einer ausgestochenen Bodenprobe (RB 8.6) mit erhaltenem Gefüge unter Verwendung eines Zeiss Axioplan II-Polarisationsmikroskop mit verschiedenen Vergrößerungen untersucht. Porenräume sind mit blauem Epoxydharz angefärbt. Zur digitalen Dokumentation dienten Aufnahmen einer hochauflösenden Digitalkamera (Hitachi HV-C20).

Die detritischen Komponenten des Bodenmaterials aus Rossendorf (**Abb. 2**) bestehen zu 75 % aus Quarzklasten. Es sind ca. 10% verschiedenster Lithoklasten wie Tonstein, sehr schwach zementierter kreidezeitlicher Sandstein, Gneis und Basalt enthalten. Ca. 9 % der Klasten bestehen aus Feldspäten, die nur sehr wenig Verwitterung zeigen. Dabei handelt es sich um calciumreichen Plagioklas (Andesin -  $(\text{Na,Ca})\text{Al}(\text{Si,Al})_3\text{O}_8$ ) und Orthoklas (Mikroklin -  $\text{K}[\text{AlSi}_3\text{O}_8]$ ), die zu den häufig vorkommenden Mineralen in magmatischen Gesteinen gehören. Des Weiteren sind 4% sehr gut erhaltene undeformierte Glimmerblättchen aus Muskovit und Biotit enthalten. Der Anteil an Schwermineralen liegt bei weniger als 1 %. Die Schmelzwassersande aus Rossendorf sind gut sortiert, abgerundet und gering zementiert. Die vielfältigen Klasten zeigen sehr wenig Lösungsporosität und nur geringe diagenetische Überprägung. Es sind nur wenige sekundäre Mineralphasen enthalten, insbesondere die mafischen Lithoklasten und Feldspäte zeigen nur eine sehr geringe Serizitisierung. Die Klasten sind teilweise mit geringmächtigen < 1 µm dicken Kutanen aus einem Gemisch von Tonmineralen und Fe-Hydroxiden und -Oxiden überzogen. Es handelt sich um vererbte (= primäre) schlecht kristallisierte Kutane, die auf hochauflösenden REM-Bildern keine typische Morphologie bestimmter Mineralphasen zeigen. Dabei ist zu beachten, dass die volumetrischen Anteile der Überzüge im Dünnschliff aufgrund schräger Klast-Anschnitte und geringer Tiefenschärfe (mehrere µm) bereits überschätzt werden. Im Durchlicht und Auflicht kann der Anteil realistischer abgeschätzt werden und stellte sich noch geringer dar. Auf Grund von Voruntersuchungen von Münch (2020) am Material RKS 6500 aus 1,5-1,75 m Tiefe aus Rossendorf wurden Tonkutane mit einer Mächtigkeit von 2,5-3 µm auf ca. 89% der Kornoberflächen erwartet, die teilweise

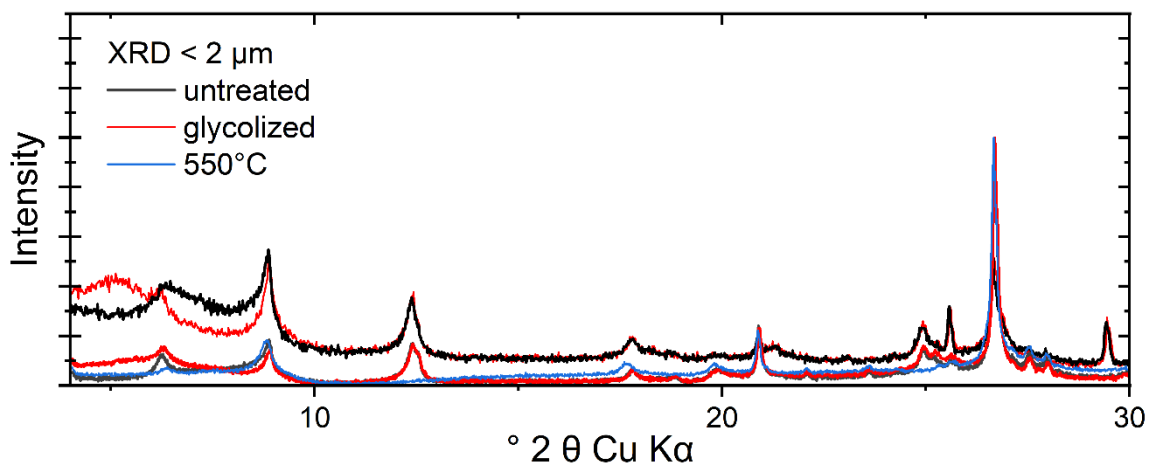
sekundär gebildet sind und eine Morphologie zeigen, die konkreten Mineralphasen zuordenbar ist (z.B. Illit, Chlorit, Illit-Smektit Wechsellagerungen). Diese sekundären Bildungen sind von großem Interesse, da sie große Anteile an der zur Pore exponierten Oberfläche und ein großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufweisen, welches für Fluid-Feststoff-Reaktionen zur Verfügung stehen. Allerdings konnte in dem hier verwendeten Material keine sekundären Kutane/Tonmineralbildungen im Porenraum bestätigt werden, welche auf die Heterogenität an einem Standort hindeutet. Die geplanten weiteren Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung der Kutane mittels Laserablation,  $\mu$ XRF und Rückstreuелеktronenbildern an der Mikrosonde waren aufgrund ihrer geringen Ausbildung unterhalb der räumlichen Auflösungsgrenze nicht sinnvoll. Des Weiteren sind im Streupräparat Gemische aus Fe-Phasen und Tonmineralen im Porenraum zu sehen, die nicht (mehr) mit den Körnern verbunden sind (**Abb. 2**). Mittels Röntgendiffraktometrie (XRD, D8 ADVANCE, Fa. Bruker) an einem orientierten Präparat der  $< 2 \mu\text{m}$  Fraktion konnten folgende Tonminerale identifiziert werden: Chlorit, Illit bzw. Muskovit und Kaolinit (**Abb. 3**). Darüber hinaus sind Bruchstücke von Quarz und Feldspäten in der  $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion enthalten. Anhand der Dünnschliffe aus Streupräparaten kann keine Aussage zur Lagerung und dem Porengefüge getroffen werden. Der geringe Anteil an Zementen und die Korngrößenverteilung lässt aber auf einen initial offenen Porenraum schließen.



**Abb. 2:** (obere Reihe) Dünnschliffbilder der Bodenproben aus Rossendorf. Links: Übersicht der Klasten: Quarz (weiß) und Feldspäte (grau). Mitte: schwach zementierte Sandsteinklasten und Eisen-Oxid zementierter Klast. Rechts: Tonmineral-Eisen-Oxid-Kutane auf Kornoberfläche und im Porenraum. (untere Reihe): Dünnschliffbilder der Bodenproben aus Rheinsberg. Links: sehr gute Kornverteilung, Schwermineralseife mit Magnetiten. Mitte: Kornoberfläche ohne Tonminerale, teilweise Magnetit (schwarz) auf den Körnern. Rechts: Karbonatzemente um Klasten (Sekundärmineralbildung).

Das Rheinsberger Material besteht zu mehr als 85 % aus Quarzklasten, der Anteil an Lithoklasten ist im Vergleich zu Rossendorf mit 3% deutlich geringer, wobei es sich hauptsächlich um Kalksteinklasten handelt, die wenig oder nicht angelöst sind. Mit 3% sind deutlich weniger Feldspäte als im Rossendorf-Material enthalten und sie sind ebenfalls nur wenig verwittert, es ist kaum Serizitisierung oder sekundäre Lösungsporosität vorhanden. Die detritischen Körner wurden nach der Verwitterung von kristallinem Gestein schnell umgelagert und nur sehr wenig diagenetisch überprägt. Es sind weder Zeichen einer beginnenden Podsolierung noch organisches Material im Porenraum zu sehen. Die Kornoberflächen sind frei von Tonkutanen (**Abb. 2**). Fe-Hydr-/Oxide wie Limonit, bestehend u. a. aus Goethit und Hämatit, und Ti-/Magnetit wurden in den Kornbuchten, auf Körnern und in den Porenräumen gefunden. Es sind nahezu keine Glimmer und Tonminerale enthalten, jedoch enthalten alle Proben  $< 0,2\%$  grün-braune

Glaukonit-Pellets, die teilweise zu Limonit oxidiert sind.



**Abb. 3:** Röntgendiffraktogramme von orientierten Proben auf Keramikträgern der < 2 µm Fraktion. Rossendorf: Chlorit (Ch), Muskovit bzw. Illit (Il), Kaolinit (Ka), Quarz (Qz), Feldspäte in Vertretung Orthoklas (Ok) und Albit (Ab) für die Plagioklasse. Rheinsberg: Nur sehr geringe Signale für Illit, Chlorit und Quarz, da zumeist amorphe Phasen vorliegen.

Im XRD der < 2 µm-Fraktion konnten nur sehr schwache Reflexe von Illit, Kaolinit und Quarz gefunden werden, der überwiegende Anteil dieser Fraktion ist amorph. An beiden Standorten sind keine Peaks von Fe-Phasen in den Diffraktogrammen enthalten. Im Schliff der ausgestochenen Bodenprobe ist das Porenraumgefüge und die Lagerung der Körner zueinander zu erkennen. Das Material ist sehr gut sortiert, gut gerundet und wenig zementiert. Als einzige sekundäre Mineralphase sind breite Calcitsäume um einzelne Körner zu erkennen, die wahrscheinlich aus der Anlösung von Kalksteinklasten und neu Ausfällung resultieren. Die großen offenen Poren sind gut miteinander vernetzt. Obwohl die detritischen Komponenten uneingeregelt erscheinen und keine Schichtung zeigen, treten gut erkennbar lagenweise Schwermineraleisen auf, die verschiedenste Schwerminerale wie Zirkon, Apatit, Granat, Turmalin und Epidot sowie viele opake Fe-Hydr-/Oxide wie schwarzen Ti-/Magnetit enthalten (**Abb. 2**). Sowohl die Fe-Hydr-/Oxide, als auch der sehr verwitterungsanfällige Apatit sind sehr gut erhalten und zeigen nur wenig Alteration. Nach einer Korngrößenfraktionierung, sind ein Großteil der Fe-Oxide/-Hydroxide in der < 63 µm Fraktion enthalten, in der < 2 µm Fraktion wieder weniger. Dies entspricht sehr gut den mikroskopisch bestimmten Korngrößen der enthaltenen Fe-Oxide/-Hydroxide (unter Beachtung von Anschnitteffekten). Die Bestimmung der Masse-spezifischen magnetischen Suszeptibilität mittels eines Bartington MS2 Susceptibility Meter mit Sensor B zeigt ebenfalls für die < 63 µm Fraktion der RB Proben mit einem Wert von  $1939,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$  eine deutliche Erhöhung gegenüber dem Gesamtmaterial mit  $136,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$  und der < 2 µm Fraktion mit  $588,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ . Für die Fraktionen von VKTA 1 zeigen sich ähnliche Verhältnisse. Aus der < 63 µm Fraktion wurden magnetisierbare Phasen magnetisch aus Suspension abgetrennt und gesondert mikroskopiert. Sie zeigen die typische Morphologie und Färbung von Magnetit. Die Oberflächen sind nur selten oxidiert. Es handelt sich nicht um sekundäre idiomorphe Bildungen, sondern um umgelagerte angerundete Körner die primär bei der Ablagerung vorhanden waren. Bei der Probenahme wurden die dunklen Lagen (**Abb. 2**) zunächst als Zeichen wechselnder Redoxbedingungen aufgrund von Poren-/Grundwasserschwankungen interpretiert. Dies ist nicht der Fall. Schwermineraleisen werden typischerweise im Überschwemmungsbereichen von Flüssen (z.B. nahe Dünen) abgelagert. Es handelt sich also nicht um sekundäre Bildungen und es sind daraus keine Aussagen über wechselnde Wasserstände bzw. Redoxbedingungen nach der Ablagerung ableitbar.

Obwohl die Materialien beider Standorte granulometrisch und diagenetisch sehr ähnlich sind,

zeigen sie aufgrund unterschiedlicher Provenienz deutliche Unterschiede in der mineralogischen Zusammensetzung und somit der möglichen Wirtsminerale für die Sorption von Radionukliden. Im Rossendorf- Material ist die Sorption an die verschiedenen Tonminerale, Glimmer und Feldspäte sowie Fe-Hydr-/Oxide und Kornkutane am wahrscheinlichsten. Wobei für die Sorption an den Feldspäten und Lithoklasten aufgrund der geringen Intraklasten-Porosität und sekundären Tonmineralbildungen weniger reaktive Oberflächen zur Verfügung stehen als zuvor angenommen. In Rheinsberg hingegen stehen nahezu keine Tonminerale und keine Kutane zur Verfügung. Eine Sorption findet am Wahrscheinlichsten an den Kalksteinklasten, Calciten und Fe-Hydr-/Oxiden statt. Für beide Standorte befinden sich der überwiegende Teil der reaktiven Oberflächen und Wirtsminerale in der  $< 63 \mu\text{m}$  Fraktion. Analysen des Projektpartners VKTA zeigten für das Material aus Rheinsberg in der  $< 2 \mu\text{m}$  Fraktion  $2,817 \text{ Bq/g}$ , in der  $< 63 \mu\text{m}$  Fraktion  $0,597 \text{ Bq/g}$  und in der Gesamtprobe  $< 0,1 \text{ Bq/g}$ .

Eine Korngrößenfraktionierung in  $< 63 \mu\text{m}$  und  $> 63 \mu\text{m}$  vor der weiteren Bearbeitung wäre somit mit einer Abtrennung der Hauptkontamination in der Feinfraktion verbunden, die einem Volumenanteil von weniger als 10% des Bodenvolumnes entspricht. Daher wird eine Klassierung durch Nasssiebung vor der weiteren getrennten Bearbeitung der zwei Fraktionen vorgeschlagen. Zusätzlich könnten im Rheinsbergmaterial die Kalksteinklasten und Calcite chemisch durch Zugabe von z.B. HCl gelöst werden. Eine Anlösung von Kornkutanen im VKTA Material durch Zugabe von Oxalsäure wäre ebenfalls denkbar als vorbereitende Maßnahme vor der folgenden Bioremediation.

**Hydrochemie (pH, elektrische Leitfähigkeit, KAK).** Die Sanierung von Bodenkontaminationen mittels Pflanzen und Pilzen ist eng mit der Bioverfügbarkeit der Kontaminanten sowie dem Nährstoff- und Feuchtigkeitsstatus des Bodens verbunden. Die Bioverfügbarkeit wiederum unterliegt einer komplexen Wechselwirkung physikalischer, chemischer und biologischer Prozesse. Physikalische Faktoren wie erhöhte Widerstände gegen das Hyphenwachstum, verursacht durch einen hohen Gehalt an Tonmineralen und geringes organisches Material, erschweren die Durchwurzelung des Bodens erheblich und erfordern einen beträchtlichen Energieaufwand. Chemische Parameter wie die Metallspezies und die Bodenchemie, inklusive des pH-Werts und des Sauerstoffgehalts, spielen eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Schwermetallen. Pilze können diese chemischen und physikalischen Bedingungen und Prozesse beeinflussen und somit maßgeblich zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Metallen im Boden beitragen (Ernst, 1996).

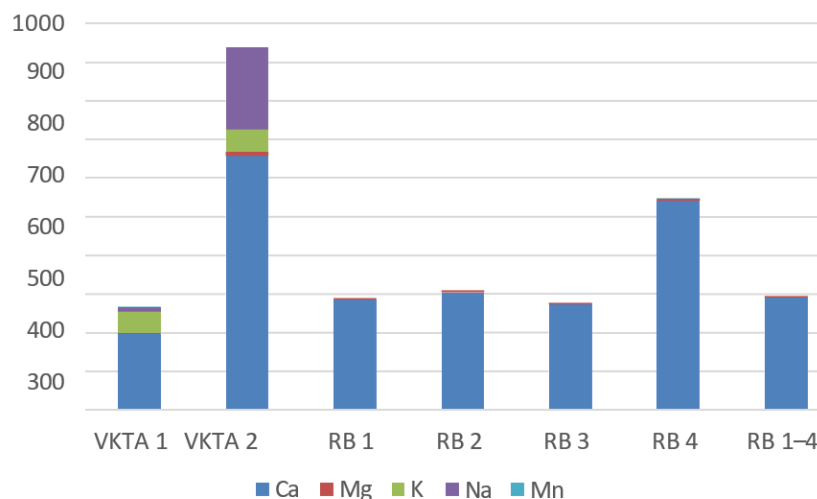
Die Komplexität der Bodenproben zeigt sich u.a. am pH-Wert mit VKTA 1 bei pH 7 und 8 und VKTA 2 mit einem pH-Wert von 8,8 in unmittelbarer Nähe zu ehemaligen Betonschächten als leicht alkalisch klassifiziert wird (Gubry-Rangin et al., 2011). Infolge der Verwitterung des Betons entsteht Calciumhydroxid ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), was zu einer Anhebung des pH-Werts führt und ein basisches Milieu im Boden schafft (Bonić et al., 2015). Bodenproben aus Rheinsberg zeichnen sich durch erhöhte pH-Werte im Bereich von 9,2 bis 9,4 aus, was auf ihre Klassifizierung als stark alkalische Böden hinweist. Wobei diese Werte für Böden ungewöhnlich hoch sind. Die hohen pH-Werte werden durch Mangel an organischen Substanzen, hohen Gehalt an basischen Ionen und Betonverwitterung (VKTA 2) begründet. Die deutlichen Abweichungen in den pH-Werten zwischen den Standorten weisen auf erhebliche Divergenzen in der Bodenreaktivität hin. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant und können auf die Standortbedingungen zurückgeführt werden. Mit Ausnahme von VKTA 2 liegen die gemessenen Werte im Bereich von 25 bis  $50 \mu\text{S/cm}$  und weisen somit auf einen niedrigen Leitfähigkeitsgrad des Bodens hin, da dieser deutlich unterhalb von  $100 \mu\text{S/cm}$  liegt. VKTA 2, mit einem Wert von  $174 \mu\text{S/cm}$ , kann hingegen zu Böden mittlerer Leitfähigkeit gezählt werden. Erst ab einem

Leitfähigkeitswert von 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  spricht man von Böden mit hoher Leitfähigkeit (Kachi et al., 2016). Die elektrische Leitfähigkeit des Bodens stellt einen Summenparameter dar, der jedoch in Böden maßgeblich vom Tongehalt bestimmt. Während sandige Materialien eine niedrige Leitfähigkeit aufweisen, ist diese bei tonhaltigen Böden hoch.

Die Elementaranalyse für Stickstoff und organischen Kohlenstoff zeigt ähnliche Stickstoffkonzentrationen von 0,20 bis 0,23 g/kg für die Proben aus Rheinsberg, während die Kohlenstoffkonzentrationen deutlich variieren. RB 3 mit einem Wert von 2,47 g/kg ist deutlich niedriger als RB 1, 2 & 4, die im Bereich von 3,70 bis 3,77 g/kg liegen. VKTA 2 zeichnet sich durch eine hohe Stickstoffkonzentration von 0,4 g/kg aus, während VKTA 1 einen deutlich niedrigeren Gehalt an organischem Kohlenstoff (OC) von 0,67 g/kg aufweist. In gemäßigten und kalten Zonen weisen Sandböden durchschnittlich eine organische Kohlenstoffkonzentration (OC) von 19 g/kg auf, während Böden in trockenen Zonen die niedrigsten Konzentrationen mit unter 5 g/kg aufweisen. An beiden Standorten handelt es sich um nährstoffarmen Boden, was sich nachteilig auf das mikrobielle und das Pflanzenwachstum während der Remediation auswirken kann.

Die Bodenproben RB 1, RB 2 und RB 3 weisen niedrige KAK im Bereich 1,0–1,3  $\text{cmol}^+/\text{kg}$  auf. RB 4 weicht von diesem Muster ab, da hier eine KAK von 1,49  $\text{cmol}^+/\text{kg}$  erreicht wird, wodurch auch die Mischprobe RB 1–4 eine höhere KAK aufweist. VKTA 2 liegt mit 3,74  $\text{cmol}^+/\text{kg}$  deutlich über den gemessenen 1,37  $\text{cmol}^+/\text{kg}$  der VKTA 1 Probe. Die Ergebnisse der effektiven Kationenaustauschkapazität und der Basensättigung unter Verwendung von Bariumchloridlösung nach DIN EN ISO 11260 zeigen, dass vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen am Austauschprozess beteiligt sind (**Abb. 4**). Dies ist bei den Proben aus Rheinsberg durch das kalkhaltige Sediment zu erwarten. In VKTA 2 ist der hohe Calciumanteil durch die Betonverwitterung erklärbar. Des Weiteren wurden in den Bariumchlorid-Auszügen der VKTA-Proben Kalium- und Natriumionen nachgewiesen, wobei VKTA 2 eine deutlich höhere Konzentration an  $\text{Na}^{2+}$  aufweist. In allen Proben konnte eine geringfügige Menge an  $\text{Mg}^{2+}$  nachgewiesen werden, während in VKTA 1 und RB 4 durch Austauschprozesse sehr niedrige Konzentrationen an Mangan-Ionen freigesetzt wurden.

Die KAK der analysierten Bodenproben erstreckt sich im Bereich von 1,0 bis 1,5  $\text{cmol}^+/\text{kg}$ , mit der Ausnahme von VKTA 2, welches einen Wert von 1,37  $\text{cmol}^+/\text{kg}$  aufweist. Vorwiegend sind Calciumkationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in die Kationenaustauschprozesse involviert. Böden mit einer niedrigen KAK weisen die Eigenschaft auf, dass Kationen leicht ausgeschwemmt werden können und somit weniger für die Wurzeln von Pflanzen verfügbar sind. Dies kann zu Nährstoffmangel und anderen Beeinträchtigungen des Pflanzenwachstums führen.



**Abb. 4:** Kationenbelegung des  $\text{BaCl}_2$ -Ausauschs (bestimmt mit ICP-MS), Angaben der y-Achse in  $\text{mg}/\text{L}$ .

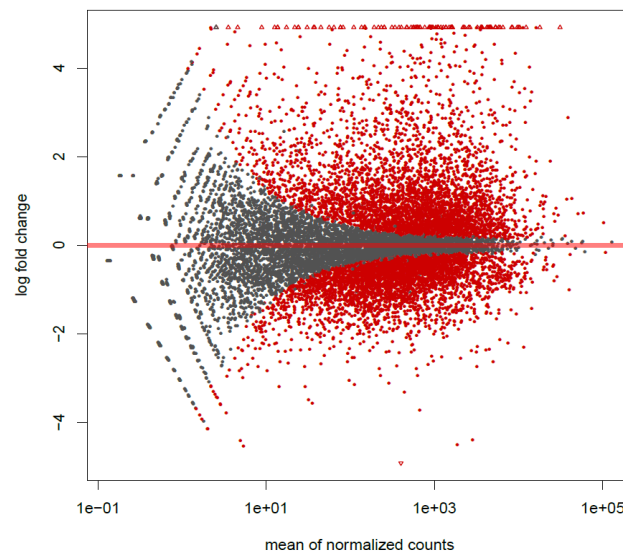
## II.2.2 Substrateigenschaften für das Wachstum von *S. commune*

Das Material aus Rossendorf war trocken, sandig und wenig humos, wie in Kapitel II.2.1 beschrieben. Für das Wachstum von *S. commune* war daher ein Anfeuchten notwendig. Ein Inokulieren mit dem feuchten, schluffig-sandigen und ebenfalls wenige Nährstoffe enthaltenden Material von Rheinsberg erschien daher sinnvoll. Es wurde auch getestet, ob durch Zugabe von Minimalmedium zusätzliche Nährstoffe für *S. commune* das Wachstum verbessern. Da beide Substrate einen alkalischen pH aufwiesen, wurde das Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten getestet, dabei konnte keine Wachstumslimitierung nachgewiesen werden. Dennoch war das Wachstum weniger ausgeprägt, als dies in früheren Versuchen an vergleichbaren Substraten beobachtet wurde. Dies konnte auf im Substrat Rheinsberg/Rossendorf enthaltene Milben zurückgeführt werden. Tatsächlich fraßen die Milben auch steril vorgezogenes Mycel vollständig auf. Lediglich auf dem Material des Haufwerkes RF83 (siehe Tab. 1) waren keine Fraßschäden zu beobachten. Hierbei handelt es sich um das mit PAK co-kontaminierte Substrat. Daher wird vorgeschlagen, besonders bei vorgetrockneten Substraten Naphthalin (ggf. Volatil) einzusetzen, um Pilzwachstum sicher zu ermöglichen. Dies wurde erfolgreich getestet; der Pilz wird durch das organische Molekül nicht im Wachstum beeinträchtigt.

**Bodenmikroorganismen aus dem Material.** Im Rahmen der Arbeiten mit den Testsubstraten aus Rheinsberg und Rossendorf war eine mikrobiologische Charakterisierung letzterer erforderlich und ein Monitoring der Veränderung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften über insgesamt vier Testzeitpunkte vorgesehen. Diese Veränderungen waren durch den Einfluss der Inokulation mit *S. commune* und die stete Anpassung der Versuchsparameter zum Zweck der Wachstumsoptimierung von *S. commune* zu erwarten. Eine erste Analyse zeigte für die Böden weitgehend unauffällige Bakterien- und Pilzgemeinschaften in beiden Substraten. Vertreter von Klassen wie Actinobacteria, Bacilli oder Clostridia korrelieren mit Nährstoffarmut und Schwermetallbelastungen (Schmidt et al., 2005; Hashmi et al., 2020). Die im Laufe des Versuchs angelegten Parameter benachteiligten und begünstigten verschiedene Gruppen von Mikroorganismen (s.u.). Beide Materialien wurden durch Plattieren auf Lebendzellzahl untersucht. Dabei kamen zwei unterschiedliche Nährmedien zum Einsatz, ein eher nährstoffarmes (MMNb) und ein eher für Pilzwachstum vorteilhaftes Vollmedium (CYM). Der noch feuchtere Boden aus Rossendorf zeigte geringere Koloniezahlen, was mit der geringeren Kontamination korrelierte.

**Interaktionen zwischen *S. commune* und Bodenisolaten.** Es konnte gezeigt werden, dass Pilze der hauptsächliche Faktor sind, der die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft determiniert (Bogdanova et al., 2023). Daher könnte das Animpfen mit *S. commune* zu einer veränderten mikrobiellen Gemeinschaft führen, die im Weiteren veränderte Abbauraten für organische Kontaminationen oder veränderte Mobilitäten von Schadstoffen bedingt. Die Bildung von Siderophoren, die auch andere Schwermetalle als Eisen komplexieren, wäre nur ein Beispiel für solche Funktionen. Daher wurden auch Reinkulturen auf ihre Fähigkeit zur Siderophorbildung untersucht. Hier zeigte sich, dass ca. 90 % aller Bodenisolat in der Lage sind, Siderophore zu bilden (Chen, 2023). Auch Konkurrenz mit anderen (Boden-)Pilzen könnte einen Einfluss auf das Wachstum von *S. commune* haben. Somit war es einerseits erforderlich, Isolate aus dem Material zu gewinnen, andererseits aber auch durch DNA-abhängige Mikrobiom- sowie Metagenomanalysen die potenziellen Eigenschaften vorhandener Mikroben zu evaluieren. Reinkulturen von Bakterien und Pilzen aus den Substraten wurden isoliert und charakterisiert. Während die bakteriellen Isolate das Wachstum von *S. commune* nicht beeinträchtigten, wurden bei den Pilzen durchaus auch negative Interaktionen beobachtet (**Abb. 5**).

**Transkriptomanalysen von *S. commune* auf Modellsubstraten.** Transkriptomanalysen, die die Antwort des Pilzes auf veränderte Umweltbedingungen spiegeln, wurden genutzt um den Einfluss sandigen Wachstumssubstrats mit molekularen Vorgängen in der Zelle zu verknüpfen. Dabei wurde steriler Quarzsand im Vergleich mit in Flüssigkultur gewachsenen Myzelien genutzt. Es zeigte sich, dass bereits der silikatische, unbelastete Boden zu einer massiven Veränderung der transkribierten Gene führt (**Abb. 5**). Dabei zeigte der Vitaminstoffwechsel eine signifikante Induktion, während Gene insbesondere des Aminosäurestoffwechsels sowie im Abbau von Xenobiotika herunterreguliert waren.



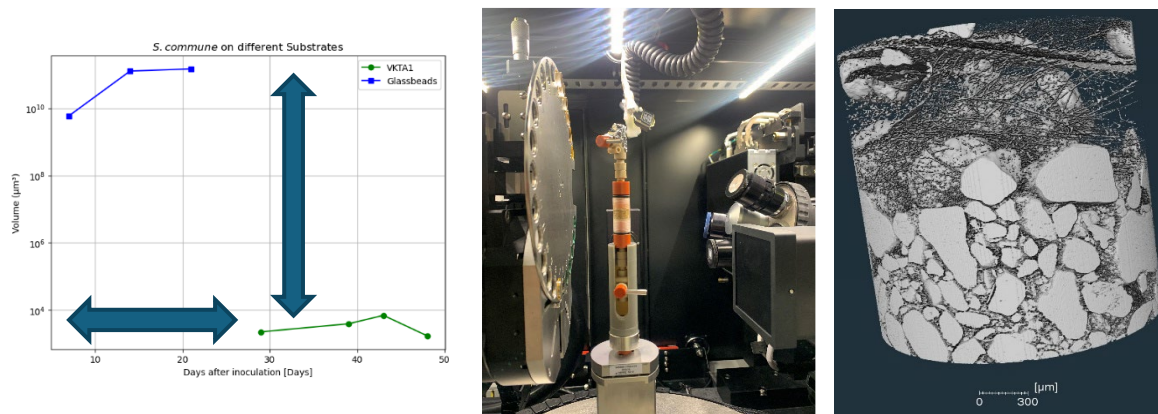
**Abb. 5:** Volcano plot der in ihrer Expression statistisch signifikant veränderte Gene (rot) von *S. commune* beim Vergleich des Wachstums in Flüssigkultur und auf sandigem Substrat.

### II.2.3 Hydrodynamik und Elementmobilisierung: Wachstumsmonitoring an Modellporensystemen und in der Bodensäule

Zur Untersuchung reaktiver Transportprozesse im Porenraum wurde zunächst ein Modellporensystem aus Glasperlen mit definierten Korngrößen vergleichbar zur Kornsummenkurve des VKTA Substrates (Tiefe von 1,5-1,75 m, vgl. Münch, 2020) simuliert. Dieses Glasperlenmodell diente als Referenzsystem, um die Segmentierung des Porenraums bei der  $\mu$ CT zu vereinfachen und idente mineralogische Bedingungen und somit Graustufen als Absorptionskontrast zur Untersuchung unter idealisierten Bedingungen zu evaluieren. Bei dem eingesetzten Pilz handelt es sich um *Schizophyllum commune* (*S. commune*) mit der Bezeichnung 12-43x4-39. Für die Inkubation des Pilzes auf den  $\mu$ CT-Probensäulen wurde ein sogenanntes Minimal-Medium verwendet (Samhammer, 2023).

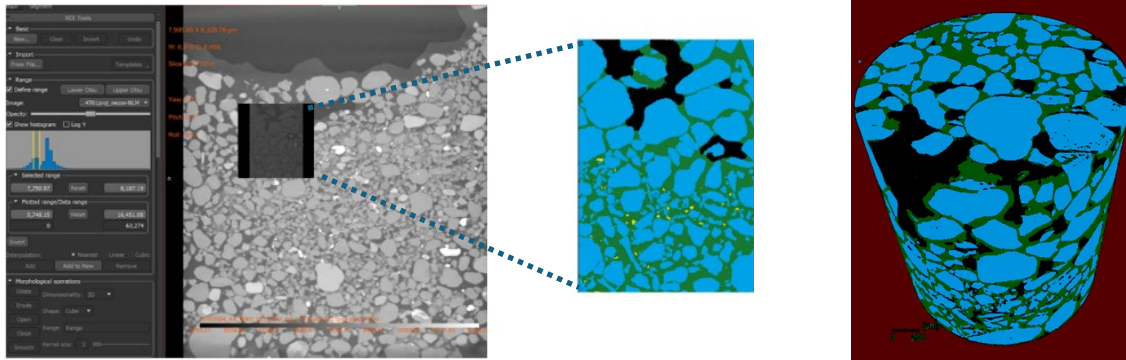
Die 3D/4D Visualisierung der Pilzbiomasse im flüssigkeitsgesättigten Porenraum des Glasperlensubstrats konnte mit einem  $\mu$ CT/3D-Röntgenmikroskop (*Zeiss Xradia 620 Versa*) realisiert werden. Bereits nach 21 Tagen war der Porenraum vollständig durch die Biomasse von *S. commune* kolonisiert (**Abb. 6**). Eine Beeinträchtigung der Wachstumsrate durch die Röntgenstrahlung wurde nicht festgestellt. In einem nächsten Schritt wurde ein kleinskaliges Säulensystem mit Bodenmaterial aus VKTA aufgebaut, um das mikrobiell beeinflusste Transportverhalten unter realitätsnäheren Bedingungen zu untersuchen. Das für das im Labormaßstab aufgebaute Säulensystem ( $\varnothing$  1 cm, L= 1 cm) ist an beiden Enden mit Ventilhähnen versehen, die eine kontrollierte Flüssigkeitsführung ermöglichen (**Abb. 6**). Mithilfe von Röntgenmikroskopie und zeitlich aufgelösten Beobachtungen konnten dabei detaillierte Einblicke in strukturelle

Veränderungen des Porenraums gewonnen werden, die durch mikrobielles Wachstum oder Mineral-Ausfällungen verursacht wurden. Zu Beginn wurde das Säulensystem sterilisiert und 90 min bei 123 °C und 2 bar autoklaviert. Die VKTA Sandprobe wurde schichtweise eingebaut, Nährmedium injiziert und unter teilgesättigten realitätsnahen Bedingungen gefahren. Für die Beimpfung der Proben mit *S. commune* wurde ein Stück von etwa 2x2mm aus Agarplatten herausgeschnitten und auf das Bodenmaterial in der Säule gelegt. Das Säulensystem wurde verschlossen und für die  $\mu$ CT positioniert und in mehreren Messreihen mit unterschiedlichen Ortsauflösungen gemessen.



**Abb. 6:** (Links) Vergleich des Wachstums von *S. commune* im Glaskugelsubstrat und VKTA-Boden (L = 2 cm,  $\varnothing$  = 1,5 cm); (Mitte): Neues Säulen-Setup (1x1cm) mit Zuflusskontrolle der Säule montiert im Probenhalter; (Rechts): Visualisierung der Hyphen im Säulensystem (Auflösung: 1.79  $\mu$ m).

Es gelang hochaufgelöst die Sporen und Hyphen von *S. commune* im Bodenmaterial sichtbar zu machen (**Abb. 6**). Das Ergebnis der Bodenprobe im Vergleich zu dem Glasperlenexperiment zeigt ein deutlich langsames Wachstum im realen Substrat und verdeutlicht die Wichtigkeit mit realen Proben zu arbeiten. Aufbauend auf der Quantifizierung physikalischer Veränderungen und Poreneigenschaften wurde in einem weiteren Schritt die Permeabilität des Säulensystems vor und nach dem Wachstum von *S. commune* experimentell erfasst. Die Messergebnisse zeigen, dass die Permeabilität vor der Inokulation mit  $5,94 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$  niedriger war als nach 91 Tagen Pilzwachstum in der Säule. Die erhöhte Permeabilität von  $3,97 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$  könnte auf eine durch biotische Aktivität bedingte Reorganisation der Porenstruktur zurückzuführen sein. Während der Kolonisierung durch *S. commune* kann es in den unkonsolidierten Substraten zu einer lokalen Umverteilung von Partikeln oder zur Bildung präferenzialer Fließpfade kommen. Für die Berechnung der Permeabilität aus den  $\mu$ CT-Daten wurden die Datensätze zuerst mit Dragonfly Pro (Version 2021.3.0.1087) mittels Non-Local-Means-Filter bearbeitet. Die zugeordneten Phasen wurden anschließend mit dem Tool Ilastik segmentiert und die Auswertung erfolgte in Avizo (Version 2020.3.1, Modul „Generate Pore Network Modeling“) (**Abb. 7**). Die Permeabilität der  $\mu$ CT-Daten wurde mit  $1,8 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$  berechnet, also ca. zwei Größenordnungen höher als real gemessen. Bei der Betrachtung segmentierter Aufnahmen zeigte sich, dass geringe Dichteunterschiede zwischen Porenraum und Pilzkolonien zu einer starken Streuung der berechneten Permeabilitätswerte führen können. Trotz dieser Schwankungen zeigte die aus der Regressionsanalyse ermittelte Permeabilität einen tendenziellen Rückgang während der Kolonisierung in der Säule.

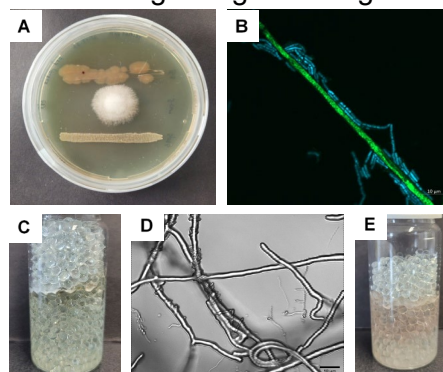


**Abb. 7:** (Links) Wachstums von *S. commune* auf VKTA-Boden (Übersichtsscan 8,4μm); (Mitte und rechts). Hochaufgelöste Aufnahme (1,7μm) in Ilastik segmentiert. Blau: Körner, Grün: Biomasse, Gelb: Nährmedium, Schwarz: Luftblasen.

## II.2.4 Wachstum von *S. commune* mit anderen Bodenorganismen und Einfluss auf die Mobilität und Verteilung von Radionukliden/Schwermetallen im Substrat

Um physiologische sowie morphologische Änderungen, die bereits in der Transkriptomanalyse sichtbar wurden, deutlicher zu machen, wurden Reinkulturen untersucht. Dabei war neben *Schizophyllum* insbesondere ein weiterer filamentöser Bodenorganismus, das Gram-positive Bodenbakterium *Streptomyces mirabilis* sowie das Endosporenbildende *Bacillus subtilis*, das damit auch längere Trockenperioden im Boden überdauern kann, interessant. Neben Dualkulturen wurden auch alle drei Partner in tripartiten Interaktionen untersucht und spezifische morphologische und physiologische Anpassungen beobachtet (**Abb. 8**). So konnte die Nutzung von *S. commune*-Hyphen als „Autobahn“ für *B. subtilis* durch Anfärbung (FISH-Technik) und das Verbinden mehrerer Hyphen des Pilzes durch Umschlingen von *Str. mirabilis* als spezifische morphologische Veränderungen gezeigt werden. Physiologische Veränderungen werden durch die Bildung von Pigmenten sichtbar. Dabei ist das durch *Str. mirabilis* gebildete braune Pigment, Melanin, dafür bekannt, zweiwertige Ionen - und damit Schwermetalle - binden zu können. Hier ist also ein direkter Einfluss auf das Überleben aller Partner der Interaktion durch ein beteiligtes Bakterium nachgewiesen.

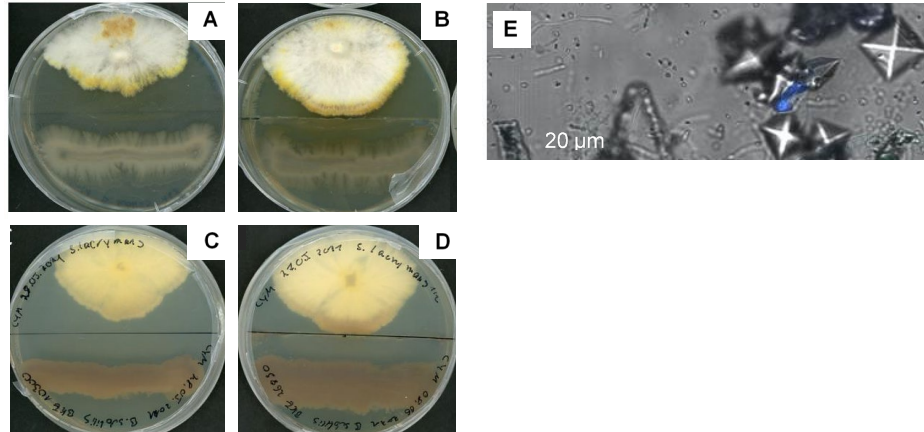
Das rosa Pulcherrimin von *B. subtilis* ist ebenfalls bekannt. Dieses Pigment limitiert das Wachstum des Produzenten. Obwohl dies zunächst wenig logisch klingt, ist es gut nachgewiesen, dass für das Ausbilden eines funktionellen Biofilms das Wachstum der einzelnen Bakterien nicht zu stark sein darf. Damit ist dieses Pigment dafür verantwortlich, dass innerhalb der Bodenmatrix – und somit auch auf den Hyphen-Autobahnen – ein Biofilm entstehen kann. Diese beinhalten insbesondere extrazelluläre Polysaccharide, die wiederum durch Quellen und Schrumpfen am Puffern sich schnell verändernder Bodenfeuchtebedingungen – und damit einhergehend der Osmolarität der Umgebung – beteiligt sind.



**Abb. 8:** Interaktion zwischen *Schizophyllum commune* und isolierten Bodenbakterien. (A) Tripartite Interaktion von *S. commune* (Mitte), *Bacillus subtilis* (oben) und *Streptomyces mirabilis* (unten). (B) Mikroskopische Darstellung des Wachstums von *B. subtilis* (blau gefärbt) an und auf Hyphen des Pilzes (grün). (C) *Str. mirabilis* und *S. commune* zeigen Induktion eines braunen Pigments an der Grenzphase der gesättigten Zone im Experiment. (D) Dabei umschlingen der schmalere Hyphen des Bakteriums

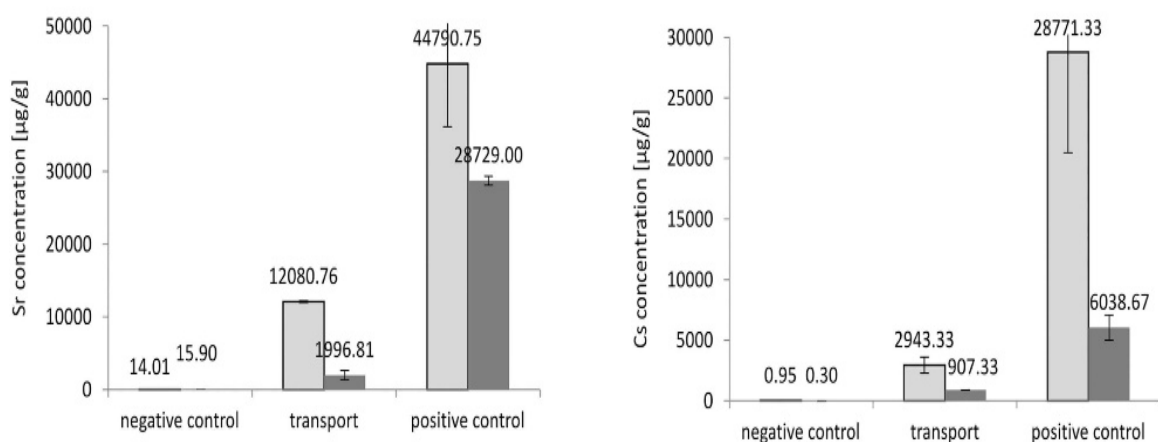
eine oder mehrere Pilzhyphen, was zu einer Bildung dicker Hyphenaggregate führt (Größenbalken 10 µm). (E) In der tripartiten Interaktion herrscht das von *B. subtilis* gebildete Pigment Pulcherriminsäure vor.

Um auch die Interaktion mit anderen Weißfäulepilzen zu untersuchen, wurde der Hauschwamm *Serpula lacrymans* mit *B. subtilis* vergesellschaftet. Hier induziert das Bakterium die Bildung des gelben Pigments Variagatsäure, das das Bakterium in seiner Verbreitung durch Schwärmen hemmt. Gleichzeitig wurde die Bildung von Biomineralen beobachtet (**Abb. 9**).



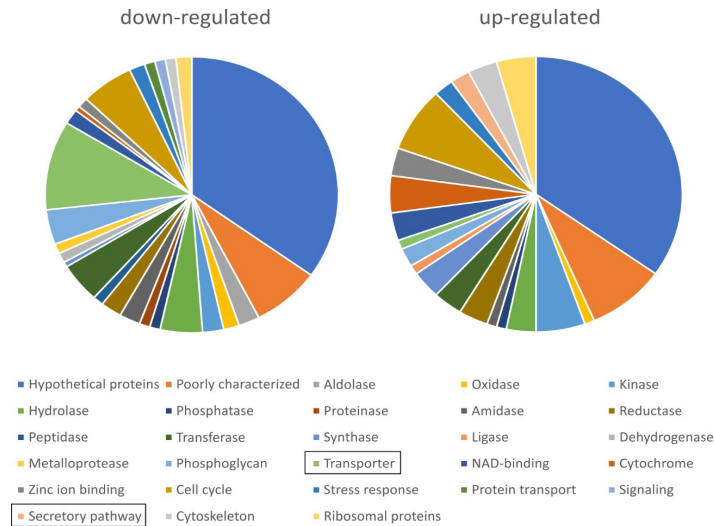
**Abb. 9:** Interaktion zwischen Pilz und Bakterium. Bei vom Zeitpunkt der gemeinsamen Inokulation erfolgte im Pilz *Serpula lacrymans* die Induktion von Variagatsäure (A) sowie im Bakterium *Bacillus subtilis* die Bildung von pinkfarbener Pulcherriminsäure (C) später als bei Zusammensetzen vorgezogener Kulturen (B, D). Gleichzeitig zeigte sich die Bildung von rhombischen Kristallen (E, teilweise mit Eigenfluoreszenz in blauer Wellenlänge; Schuchardt, 2021).

**Mobilität und Verteilung von Radionukliden/Schwermetallen im Substrat.** Durch die Hyphen des Pilzes ist ein Transport auch über luftgefüllte Porenräume hinweg möglich. Dies konnte durch Experimente mit *S. commune* gezeigt werden. So sind veränderte Verfügbarkeiten in der Bodenmatrix erklärbar (Traxler et al., 2022). Dazu wurden geteilte Petrischalen mit einer Plastikbarriere (split plates) verwendet. Auf beiden Hälften kann unterschiedliches Medium eingefüllt werden, beispielsweise mit oder ohne Cs bzw. Sr (**Abb. 10**). Durch Inokulation auf einer Seite und Wachstum der Lufthyphen über die Barriere hinweg auf die andere Seite ist es möglich zu zeigen, dass die Hyphen tatsächlich über die mehrere Zentimeter langen Strecken sowohl Cs als auch Sr transportieren können.



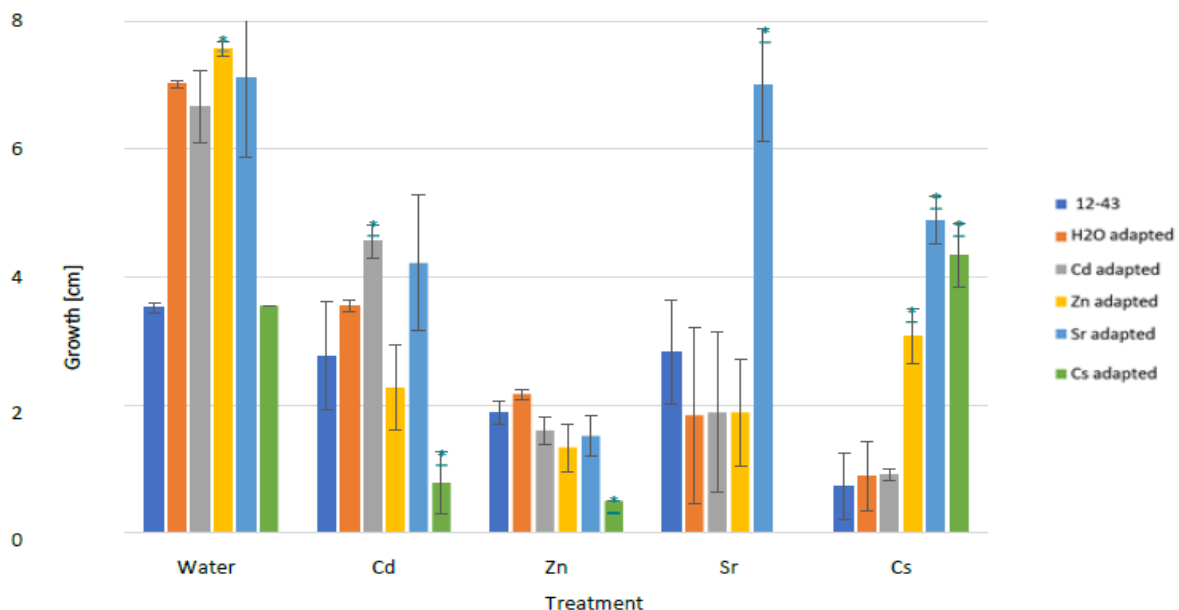
**Abb. 10:** *S. commune* vermittelte Neuverteilung von Radionukliden. Split plates wurden ohne Metall (Sr links, Cs rechte Grafik) auf beiden Seiten als negative Kontrolle, im Experiment auf der rechten, nicht inokulierten Seite der Platte (Mitte), bzw. mit Metall (linke Seite des Transport-Experiments, mittlere Grafik) oder auf beiden Seiten der positiven Kontrolle (rechte Grafik) versetzt und jeweils nur die linke Seite mit *S. commune* beimpft. Nach 14 Tagen wurde Mycel von der linken (hellgrau) bzw. rechten (dunkelgrau) Seite der geteilten Platte entnommen und die Sr/Cs-Gehalte analysiert. Hiermit konnte ein Transport über mehrere Zentimeter im Mycel gezeigt werden, der nicht auf Diffusion beruhen kann, da die Barriere mit Lufthyphen überwunden wurde.

Die Antwort von *S. commune* auf Schwermetalle führte zu einem veränderten Transkriptom. Hier waren besonders die Expression von Genen, die für Transporter bzw. Proteinen zur Sekretion von organischen Molekülen kodieren, stark reguliert (**Abb. 11**). Die Metall-vermittelten Änderungen konnten auf intrazelluläre Signaltransduktion über den Phosphatidylinositolphosphat-Weg zurückgeführt werden (Murry et al., 2021).



**Abb. 11:** Transkriptionsanalyse von *S. commune* nach Exposition auf Boden, der Cd, Sr, Cs und Zn-reich war.

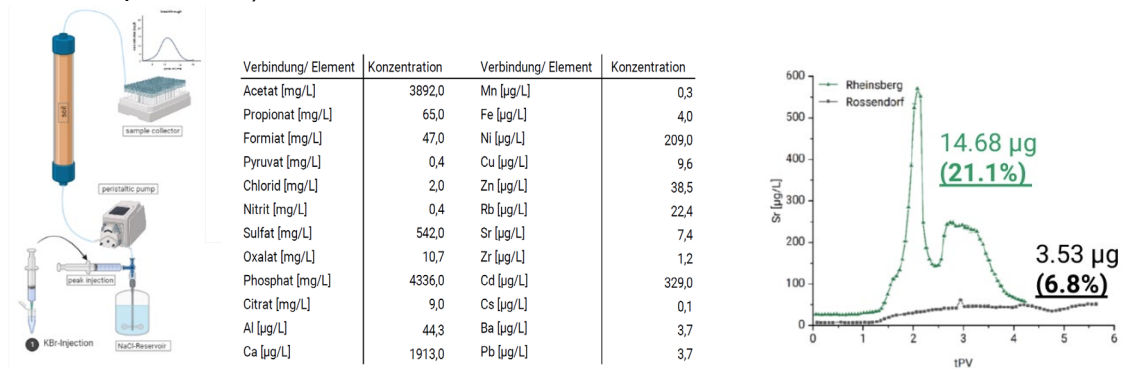
Die intrazelluläre Veränderung könnte zu einer Anpassung führen, die ebenfalls geänderte Profile zur Folge hat. Daher wurde eine Adaptation an Metalle im Medium durch seriellen Transfer vorgenommen. Die resultierenden, an erhöhte Schwermetall-Konzentrationen angepassten Stämme zeigten eine Kreuztoleranz zu anderen, vorher nicht gegebenen Metallen (**Abb. 12**). Für den an Cs adaptierten Stamm wurde gezeigt, dass diese Anpassung mit einer Veränderung der aktiv transkribierten Gene einhergeht (Traxler et al., 2022; Traxler, 2021). Dieser Stamm zeigte eine höhere Schwermetalltoleranz sowie ein verändertes Transkriptionsprofil, das metabolische Anpassungen nahelegt.



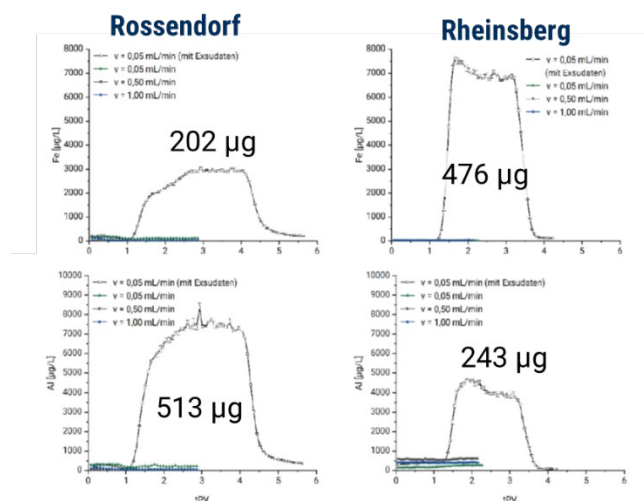
**Abb. 12:** Kreuztoleranz gegenüber Schwermetallen in an jeweils ein Metall adaptierten Stämmen von *S. commune*.

## Säulenversuche und Tracerexperimente als Grundlage für die reaktive Transportmodellierung.

Die durchgeführten Säulen- und Transportversuche konnten erfolgreich aufzeigen, welches Potenzial die Verwendung von *S. commune* in der Remediation von ex-situ-Materialien mit radioaktiven Kontaminationen hat (**Abb. 13**). Dabei wurde unter anderem gezeigt, welche Effizienz die Hyphenexsudate in der Mobilisierung von Elementen haben und inwieweit *S. commune* als Organismus zu einer Extraktion von Metallen aus verschiedenen Substraten imstande ist über den Transport in der rein wässrigen Phase hinweg. Zudem führte sowohl die Verwendung der Hyphenexsudate als auch die Anwesenheit von *S. commune* auf dem Bodenmaterial zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit der untersuchten Metalle. Durch die Veränderungen des Porenraums beim Wachstum von *S. commune* kann die Permeabilität signifikant beeinflusst werden, wobei die Ergebnisse in den kleinmaßstäblichen Säulenversuchen nicht eindeutig sind, aber überwiegend eine Permeabilitätsreduktion beobachtet wurde (siehe Diskussion in Kapitel II.2.3).



**Abb. 13:** (links) Schematischer Aufbau der Säulenversuche mit Injektion des konservativen Tracers (KBr) zur Bestimmung der hydraulischen Parameter. (Mitte) Zusammensetzung der in den Säulenexperimenten verwendeten der Hyphenexsudate. (Abbildungen verändert nach Köppner (2023)).

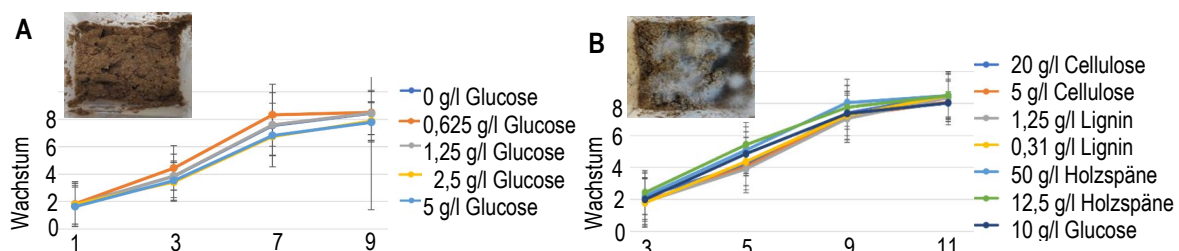


**Abb. 14:** Reaktion der Materialien aus Rossendorf und Rheinsberg auf die Injektion von Hyphenexsudaten, Mobilisierung von Fe (oben) und Al (unten) aus dem geogenen Material/Kutanen (Abbildungen verändert nach Köppner (2023)).

Mit der Verwendung von Hyphenexsudaten für die Mobilisierung von Fe-, Al- Phasen (**Abb. 14**) und Mn-Phasen (nicht gezeigt) und daran gebundene Schadstoffe wurde zudem das Problem gelöst, im Boden gewachsene Hyphen von *S. commune* für einer Verringerung der Kontamination in einem separaten Schritt extrahieren zu müssen. Für die Erstellung eines Vorhersagemodells zur Abschätzung der Remediationseffizienz sollten weitere Versuche

durchgeführt werden. Hierfür wären unterschiedliche Zusammensetzungen der Exsudate, abhängig von der Wachstumszeit von *S. commune*, sowie gezielte Versuche mit den in den Exsudaten enthaltenen organischen Säuren von Interesse. Eine Kombination aus Exsudaten und bewährten chemischen Behandlungsmethoden für kontaminierte Böden wäre ebenfalls von Relevanz für die Abschätzung der Remediationseffizienz.

**Wachstumsoptimierung für *S. commune* auf den Substraten Rossendorf und Rheinsberg.** Der für die Untersuchungen ausgewählte Pilz *S. commune* wurde auf Nährmedien mit Bodenmaterial bzw. direkt ohne Agar auf dem Substrat in Kontakt mit Luft inokuliert. Im letzteren Fall wurden flüssige Medien und verschiedene Substrate zugegeben. Tatsächlich war auch ohne Zugabe weiterer Nährstoffe das Wachstum bereits optimal. Dabei zeigt sich ein etwas schnelleres Wachstum auf dem Bodensubstrat aus Rossendorf, dieser Unterschied ist aber unerheblich (beispielhaft sind einmal unterschiedliche Glukosekonzentrationen und einmal unterschiedliche Substrate für holzzersetzende Pilze gezeigt; **Abb. 15**). Das Wachstum direkt im Boden konnte, auch wenn wenig extern sichtbares Mycel vorhanden war, mittels DNA-Extraktion und qPCR auch quantifiziert werden. Hierbei wurde Wachstum in den verschiedenen Bereichen bestimmt. So waren (trotz hoher Standardabweichung, die hier durch die Extraktion auftritt) auf Rossendorf-Substrat im Mittel an der Oberfläche 5,64 ng/µl, in der Mitte 7,48 ng/µl und an der Außenwand 4,37 ng/µl spezifische DNA von *S. commune*, während bei Rheinsberg-Substrat an der Oberfläche 54,13 ng/µl, in der Mitte 36,86 ng/µl und an der Wand 41,25 ng/µl *Schizophyllum*-DNA gewonnen wurde. Hier zeigte sich also klar ein besseres Wachstum auf dem Substrat aus Rheinberg; ein komplettes Durchwachsen des gesamten Bodenkörpers konnte aber in allen Fällen gezeigt werden.



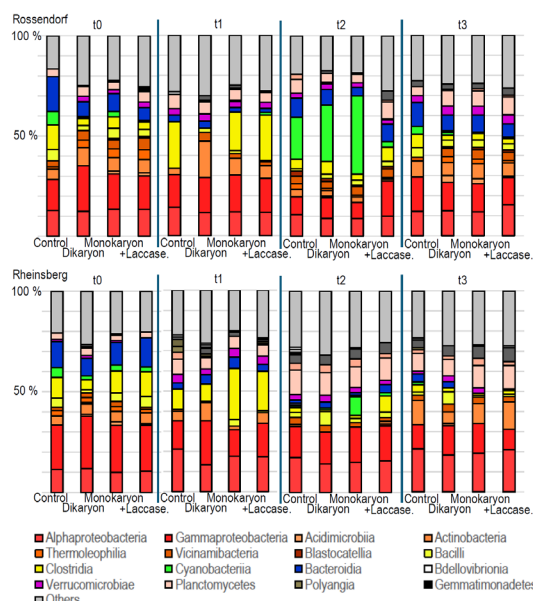
**Abb. 15:** Wachstum auf Substrat aus Rossendorf (A) und Rheinsberg (B). Getestet wurde, ob Zugabe von weiterem Substrat das Wachstum verbessert. Dabei sind unterschiedliche zugegebene Glucosekonzentrationen (A) bzw. verschiedene Substrate des ligninolytischen Abbaus (B) untersucht. Magentaboxen mit bewachsenem Boden sind eingefügt.

**Metagenom- und Mikrobiomanalysen.** In den Wachstumsexperimenten in Mesokosmen, wie sie auch zur Optimierung des Wachstums genutzt wurden, konnte die Entwicklung des vorhandenen Mikrobioms in Abhängigkeit von der Inokulation mit drei unterschiedlichen Stämmen von *S. commune* verfolgt werden. Wie schon in den vorigen experimentellen Ansätzen wurde ein Dikaryon (*S. commune* 12-43 x 4-39), ein Monokaryon (*S. commune* 4-39) sowie ein Stamm, der Laccase überexprimiert (*S. commune* Y) eingesetzt. Verglichen wurden diese Ansätze mit den ebenso behandelten, aber kein Inokulat enthaltenden Lösungen im Bodensubstrat (Control).

Nach Extraktion der Sequenzen für die ITS-Region in den Genen, die für die 18S rDNA der Pilze kodieren, konnte eine hohe Diversität bestimmt werden, die verschiedene Klassen und Ordnungen umfasst. Erwartungsgemäß sind Ascomyceten (rote und rotbraune Farben) und Basidiomyceten (beige und schwarz-braune Farben) mit insgesamt 75 % in beiden Substraten vorherrschend. Dabei unterscheiden sich aber die Verhältnisse sowohl in den vergleichbaren Proben bei t0 wie auch im Zeitverlauf stark. Dies wird auf die Mycelien, die die Bodenpartikel bei der Einwaage zusammenhalten können, zurückgeführt. Die beiden Substrate unterscheiden sich deutlich, eindeutige Trends sind aber zuzuweisen (**Abb. 16**). Lediglich eine Dominanz

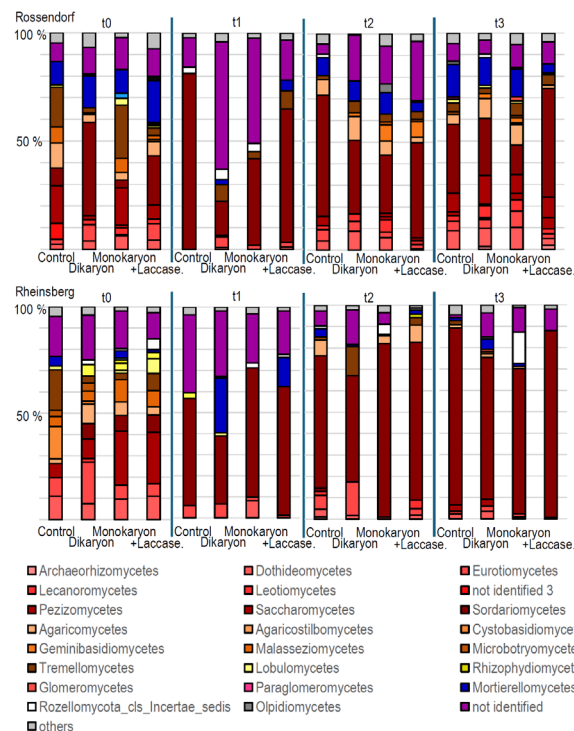
von Schimmelpilzen der *Sordariomycetes* in Rossendorf und der hefeartigen *Saccharomyces* im Substrat von Rheinsberg lässt sich am Ende der Inkubationszeit klar zuordnen. Die Biodiversität der Pilzgemeinschaften verringerte sich während der Versuchslaufzeit in Teilen (**Abb. 16**). Dabei war die Gruppe der Ascomycota ein klarer Profiteur (v.a. *Sordariomyceten*), während die Gruppe der Basidiomycota, zu der auch *S. commune* gehört, in ihren relativen Anteilen eingeschränkt (Rossendorf) oder deutlich (Rheinsberg) reduziert wurde (**Abb. 16**). Dieser Umstand kann als Hinweis auf ungünstige Wachstumsbedingungen für *S. commune* in den Testsubstraten gedeutet werden. Diese Bedingungen werden wahrscheinlich von konkurrenzstarken Bodenpilzen hervorgerufen, die in den Substraten dominant sind und das Wachstum von *S. commune* einschränken.

Bei Betrachtung der Sequenzen für die 16S rDNA konnten die bakterielle/archäelle Gemeinschaft zugeordnet werden. Im Substrat aus Rossendorf machten die Proteobacteria (rote Farben) knapp 30 % der Gemeinschaft aus, während diese Klasse im Substrat aus Rossendorf einen höheren Anteil von ca. 35 % stellt. In beiden Substraten waren Actinobacteria (orange Farben) mit ca. 10 % vertreten, während Firmicutes (gelbe Farben) ca. 20 % und Cyanobacteria mit ca. 5 % vertreten waren. Bacteroidetes (blau) stellten mit 20 % im Rossendorf- und ca. 15 % im Rheinsbergsubstrat eine weitere größere Gruppe. Eine leicht erhöhte alpha-Diversität ist mit dem etwas größeren Anteil anderer Sequenzen (graue Farbe) sichtbar, die für Sequenzen mit einem Gesamtanteil von unter 0,5 % stehen. Insgesamt glichen sich die Ansätze aber; ein deutlicher Unterschied auf Ebene der bakteriellen Klassen konnte nicht beobachtet werden (**Abb. 17**). Während die relativen Anteile der ubiquitären Bacteroidota und Firmicutes abnahmen, erhöhten sich die relativen Anteile der Verrucomicrobiae und Chloroflexi (**Abb. 16**), welche zuvor in anderen kontaminierten Substraten identifiziert wurden (Hemmat-Jou et al., 2018). Insgesamt erhöhte sich die bakterielle Biodiversität in den Substraten während des Versuchszeitraumes leicht. Im Zeitverlauf konnten zunächst (t1) die anaeroben Vertreter (Firmicutes, gelb) profitieren, während zum Zeitpunkt t2 die zur Stickstofffixierung und oxygenen Photosynthese befähigten Cyanobacteria einen deutlichen Zuwachs zeigten. Zum letzten Probenahme-Zeitpunkt (t3) ist der Anteil der Proteobacteria, Firmicutes sowie Cyanobacteria deutlich zurückgedrängt, während Actinobacteria und (teilweise schon zum Zeitpunkt t2) Verrucomicrobia sowie Planctomyces nun profitieren. Diese Trends sind in beiden Bodentypen zu beobachten.



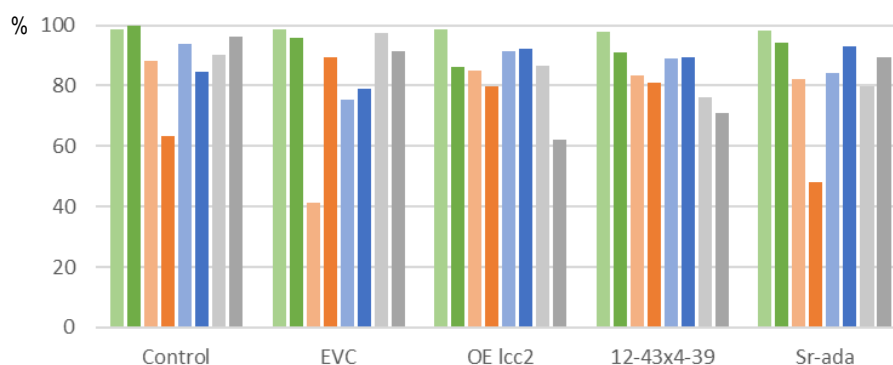
**Abb. 16:** Pilzliches Mikrobiom in Mesokosmen über die Zeit (t0 bis t3) in Abhängigkeit von der Inokulation mit unterschiedlichen Stämmen von *S. commune* (Dikaryon, Monokaryon, +Laccase).

Insbesondere die Cyanobacteria sind aber deutlich eingeschränkt durch die Inokulation des Laccase-überexprimierenden Pilzes.



**Abb. 17:** Bakteriellies Mikrobiom in Mesokosmen über die Zeit (t0: 11/22; t1: 6/23; t2: 1/24, t3: 4/24) in Abhängigkeit von der Inokulation mit unterschiedlichen Stämmen von *S. commune* (Dikaryon, Monokaryon, +Laccase).

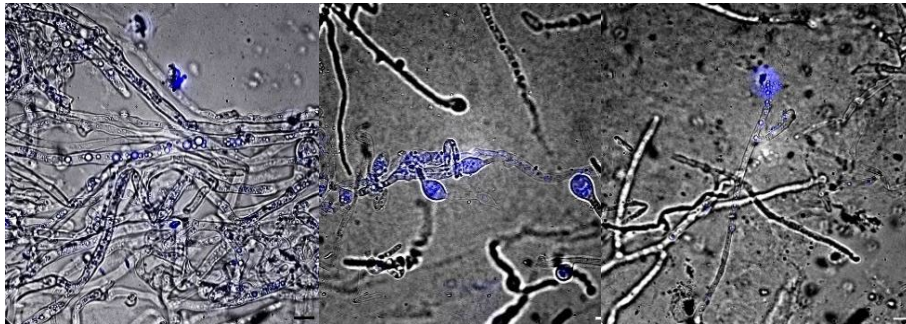
**Abbau von organischen Kontaminanten in co-kontaminierten Substrat durch *S. commune*.** Da es sich auch um co-kontaminiertes Material handelte, das neben der Belastung mit Radionukliden auch PAKs enthielt, wurde die Fähigkeit des Weißfäulepilzes, der mit Lignin auch zyklische Kohlenwasserstoffe umsetzen kann, untersucht. Hierfür wurde ein Stamm eingesetzt, der durch Überexpression des Gens für Laccase hier besonders geeignet schien (OE lcc2). Daneben kam ein neu erzeugter, an Sr adaptierte Stamm zum Einsatz (Sr-ada). Es zeigte sich, dass das Dikaryon, möglicherweise aufgrund der im Dikaryon hochregulierten Laccaseexpression, sowie der Überexpressionsstamm die im Vergleich besseren Raten der Entfernung der organischen Kontaminanten aufwiesen (**Abb. 18**).



**Abb. 18:** Entfernte PAKs (%) im Vergleich zur Kontrolle, dem haploiden Stamm (EVC), einer Laccase überexprimierenden Variante (OE lcc2), dem Dikaryon (12-43 x 4-39) und der an Sr adaptierten Version von *S. commune*. Phenanthren (grün), Fluoranthen (orange), Pyren (blau) und die Kombination der organischen Kontaminanten (grau) wurden bestimmt, jeweils in der im Bodensubstrat vorliegenden Konzentration (hellere Farbe) sowie in einer 10fach höheren Konzentration (dunklere Balken).

Dabei zeigten alle Stämme ein gutes Wachstum, das allerdings den Einfluss der PAKs spiegelte. Um die intrazellulären Mechanismen im Umgang mit den Stressoren zu testen, wurden

weiterhin Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden drei Gene ausgewählt, deren Expression im Vergleich von Wachstum auf Minimalmedium zu Wachstum auf dem co-kontaminierten Boden getestet wurde. Sowohl die Überexpression der Laccase (sichtbar als 20fach stärkere Expression) als auch die Adaptation an Schwermetallstress führten zu einem deutlich verringerten zellulären Stress, sichtbar in der geringeren Expression der Stressantwort-Gene *gst* und *mfs*. Durch die Autofluoreszenz der PAKs war es auch möglich, die Aufnahme sowie den Transport von PAKs in Hyphen zu zeigen (**Abb. 19**). Dabei wurde eine Deponierung in geschwollenen Hyphenspitzen beobachtet, die sogar aufplatzten. Diese Aufnahme deutet auf einen langsamen Abbau hin, der hier Konkurrenz mit anderen Bodenorganismen um die Abbauprodukte als Nährstoffe bewirken könnte.



**Abb. 19:** Mikroskopie der Hyphen von *S. commune*, der mit Phenanthren gewachsen war. Unterschiedliche Stadien der Aufnahme, des Transports und der negativen Wirkung auf Hyphenspitzen sind gezeigt.

**Wachstumsmonitoring mittels LC-OCD-OND.** Mittels LC-OCD-OND wurde untersucht, ob der Einfluss von *S. commune* auf das natürliche organische Material (NOM) PAK belasteter Bodenproben nach zwei Monaten Wachstum in Abhängigkeit verschiedenen Stämme nachgewiesen sowie Aussagen über den PAK-Gehalt getroffen werden können. Um ebenfalls den Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden der pH-Wert und die Leitfähigkeit aller Proben bestimmt. Die Ergebnisse der Chromatogramme zeigen einen vollkommenen Abbau der zugegebenen Nährlösung bei gleichzeitig hoher Konzentration an Abbauprodukten (Biopolymeren). Organische Säuren konnten nicht detektiert werden. Eine Abnahme von PAK kann indirekt über eine Abnahme des Bypass-Signals, in dem der hydrophobe Anteil enthalten ist, abgeschätzt werden. Ein detaillierteres Monitoring über 14 Tage Wachstumszeit bei dem ergänzend die Bildung organische Säuren mittels IC, die physikochemischen Eigenschaften pH und Leitfähigkeit sowie Elementbestimmungen mittels ICP-MS in der Bodenlösung zur Ableitung von Alterationsprozessen des Bodenmaterials durch das Pilzwachstum durchgeführt wurden, zeigten einen vollkommenen Abbau der zugegebenen Nährlösung innerhalb von 5 Tagen, einen vorübergehenden Anstieg von organischen Säuren und eine konstant über 14 Tage steigende Konzentration von Stoffwechselnebenprodukten (Biopolymeren). Über den Versuchszeitraum wurde eine Mobilisierung von Schwermetallen mit anschließender Immobilisierung festgestellt. Im Vergleich zum Wildtyp, wuchs der Laccase überexprimierte Stamm besser auf dem Bodenmaterial.

### **II.3 Darstellung des während des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf diesem Gebiet bei anderen Stellen**

nichtzutreffend

### **II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse**

(1) Die Ergebnisse zeigen konkrete Möglichkeiten zur Vorbehandlung von kontaminierten Standorten und die Parametrisierung von Transportmodellen auf. Die im Projekt RENA untersuchten Substrate zeigen trotz ihrer ähnlichen geologischen Vergangenheit schon direkte Unterschiede bzgl. der mikrobiologischen Behandlung auf, welche den Erfolg der Sanierungsstrategie verbessern, aber auch einschränken kann. Ein wichtiger Aspekt bei den Untersuchungen ist das Upscaling von Kleinstsäulenversuchen zur optimalen Ortsauflösung im  $\mu$ CT bis hin zu Freilandversuchen. Die Heterogenität der Geomaterialien war in diesem Projekt sehr eingeschränkt und allgemeingültige Aussagen im Sinne von „Endgliedern“ dieser Heterogenität können nur sehr eingeschränkt erfolgen. Das methodische Protokoll wurde im Rahmen des Projektes um eine potentielle Vorbehandlung mit Hyphenexsudaten zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit erweitert.

(2) Die Projektergebnisse zur Fluidynamik zeigen das komplexe Wechselspiel zwischen Pilzwachstum und Eindringen von Hyphen in die Porenstruktur, welche zu einer Veränderung des Korngerüsts und somit der Fluidynamik führt. Die neu gewonnenen methodischen Protokolle zur Visualisierung von Hyphen in einer silikatbasierten Porenraumgefüge sind höchst innovativ und die Daten werden als Trainingssätze für die Anwendung von KI und ML verwendet werden. Dies ermöglicht eine direkte Anschlussfähigkeit, da mit den gezeigten experimentell-analytischen Strategien quantitative Daten für eine breite Palette von Fragestellungen im Bereich des reaktiven Transports und des Entsorgungs-/ Remediationsumfeldes beantwortet werden können. Insbesondere die Anwendung in Ungleichgewichtssystemen mit unterschiedlicher Kinetik der Oberflächenreaktivität sind direkt adressierbar, um eine Vielzahl von Materialoberflächen und unterschiedliche Reaktionen (Lösung, Fällung, Sorption) zu analysieren.

(3) Die Ergebnisse wurden auf internationalen Tagungen vorgestellt und in der Fachcommunity diskutiert. Die aktive Teilnahme der Promovierenden sowie ihre Einbindung in Lehr- und Graduiertenkollegsaufgaben an der Universität ermöglichten das Hineinwachsen in die wissenschaftliche Gemeinschaft und sind ein weiterer Baustein für den Kompetenzerhalt im Bereich der nuklearen Entsorgung und des reaktiven Transports.

### **II.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen außerhalb des Verbundprojektes**

- Teilnahme an Kursen des Graduiertenprogramms der Universität Jena
- Austausch während der Doktorandenkurse innerhalb des Verbundprojekts TRAVARIS
- Austausch während der von PTKA organisierten Veranstaltungen KERNthemen 2023 und Projektträgerstatusgespräch 2023

### **II.6 Veröffentlichungen, Vorträge Referate, etc.**

#### **Veröffentlichungen:**

- 1) Bogdanova O, Kothe E, Krause K. 2023. Ectomycorrhizal community shifts at a former uranium mining site. J Fungi 9, 483.
- 2) Brangsch H, Höller M, Krauße T, Waqas M, Schroeckh V, Brakhage AA, Bunk B, Spröer C, Overmann J, Kothe E. 2022. Extremophile metal resistance: plasmid-encoded functions in *Streptomyces mirabilis*. Appl Environ Microbiol 88, e0008522.

- 3) Costa FS, Langenhorst F, Kothe E. Biomineralization of nickel struvite linked to metal resistance in *Streptomyces mirabilis*. *Molecules* 27, 3061. Harpke M, Kothe E. 2023. Biofilm formation in Gram-positives as an answer to combined salt and metal stress. *J Basic Microbiol.* doi: 10.1002/jobm.202300149.
- 4) Murry, R., Traxler, L., Pötschner, J., Krüger, T., Kniemeyer, O., Krause, K., & Kothe, E. (2021). Inositol signaling in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *J Fungi* 7, 470.
- 5) Traxler L., Shrestha J, Richter M, Krause K, Schäfer T., Kothe E. 2022. Metal adaptation and transport in hyphae of the wood-rot fungus *Schizophyllum commune*. *J Hazard Mater* 425, 127978.

#### Konferenzvorträge:

- Lena Samhammer, Susanne Lehmann, Thorsten Schäfer: **µCT monitoring of growth of *S. commune* in artificial pore space.** RENA Doktorandenworkshop Leipzig 3.-4.11.2023, Poster.
- Lea Traxler, Levke Petersen, Nicolas Köppner, Thorsten Schäfer, Erika Kothe: **The remediation potential of *Schizophyllum commune* in different contaminated soils.** Sanierungskolloquium 5.-6.10.2023 in Jena.

#### Betreute Abschlussarbeiten:

- Jördis Schuchardt. 2021. **Mikrobielle Interaktion: Analyse von Wasser aus Braunkohleflößen und Erstellen von Pilz-Bakterien-Interaktionen.** Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Linda Schönfeld. 2022. **Anwendung von SYBR Green I zur Differenzierung von anorganischen Nanopartikeln und Biokolloiden in der Fluoreszenz-Nanopartikel-Tracking-Analyse (Fluo-NTA).** Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Tilman Kinkelin. 2022. **Tritrophe Interaktion von *Serpula lacrymans* mit *Schizophyllum commune* und *Bacillus subtilis*.** Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Victoria Patricia Hory. 2023. **Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenstoffquellen auf das Wachstum von *Schizophyllum commune* in kontaminierten Böden.** Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Anna Lena Windrich. 2023. **Untersuchung der Aufnahme von Selen in *Phaseolus vulgaris* var. nanus und der Interaktion von Selen mit Wurzelexsudaten.** Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Nicolas Köppner. 2023. **Untersuchung von Schadstofftransporten in Säulenversuchen mit *Schizophyllum commune* für die Entwicklung von Bioremediationsansätzen radioaktiv kontaminierter Böden.** Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Levke Petersen. 2023. **Growth and degradation capacities of *Schizophyllum commune*.** Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Lea Chavah Traxler. 2021. **The potential of *Schizophyllum commune* for mycoremediation at the Chernobyl Exclusion Zone.** Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Flávio Silva Costa. 2023. **Biomineralization capabilities of *Streptomyces mirabilis* P16B-1: Insights into struvite and nickel-struvite synthesis and their implications.** Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Lena Samhammer. 2023: **Der Einfluss des Wachstums von *Schizophyllum commune* auf das Boden-Porenraumgefüge im Hinblick auf einen**

**Bioremediationsansatz – Röntgenmikroskopische Untersuchungen unter Einbeziehung der Bodenphysikochemie und Petrographie.** Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

## II.7 Literaturverzeichnis

- Chen, X. 2023. Charakterisierung der stickstofffixierenden Bakterien auf den Flächen eines ehemaligen Uranbergbaugebiets. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bogdanova O, Kothe E, Krause K. 2023. Ectomycorrhizal community shifts at a former uranium mining site. *J Fungi* 9, 483.
- Bonić, Z.; Ćurčić, G. T.; Davidović, N.; Savić, J., Damage of Concrete and Reinforcement of Reinforced-Concrete Foundations Caused by Environmental Effects. *Procedia Engineering* 2015, 117, 411-418.
- Ernst, W. H. O., Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Appl. Geochem.* 1996, 11 (1), 163-167.
- Gubry-Rangin, C.; Hai, B.; Quince, C.; Engel, M.; Thomson, B. C.; James, P.; Schloter, M.; Griffiths, R. I.; Prosser, J. I.; Nicol, G. W., Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108 (52), 21206-21211.
- Hashmi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). Firmicutes. In *Beneficial microbes in agro-ecology* (pp. 363-396). Academic Press.
- Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 27(9), 1281-1291.
- Kachi, N.; Kachi, S.; Bousnoubra, H., Effects of irrigated agriculture on water and soil quality (case perimeter Guelma, Algeria). *Soil and Water Research* 2016, 11 (2), 97-104.
- Köppner, M. 2023. Untersuchung von Schadstofftransporten in Säulenversuchen mit *Schizophyllum commune* für die Entwicklung von Bioremediationsansätzen radioaktiv kontaminierter Böden. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Murry, R., Traxler, L., Pötschner, J., Krüger, T., Kniemeyer, O., Krause, K., & Kothe, E. (2021). Inositol signaling in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *J Fungi* 7, 470.
- Münch, N., Verteilung von Cs, Eu & Co in mineralischen Phasen des Bodens auf dem Gelände des Forschungszentrums Dresden Rossendorf. 2020, Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena: Jena.
- Schmidt, A., Haferburg, G., Sineriz, M., Merten, D., Büchel, G., & Kothe, E. (2005). Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Geochemistry*, 65, 131-144.
- Traxler L, Shrestha J, Richter M, Krause K, Schäfer T, Kothe E. 2022. Metal adaptation and transport in hyphae of the wood-rot fungus *Schizophyllum commune*. *J Hazard Mater* 425, 127978.
- Zeien, H.; Brümmer, G. W., Chemische Extraktion zur Bestimmung der Schwermetallbindungsformen in Böden. *Mittlgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* 1989, Sonderh. 59/I, 505–510.