



Microscopic and spectroscopic investigations of uranium(VI) reduction by *Desulfosporosinus hippei* DSM 8344

Stephan Hilpmann¹, Robin Steudtner¹, Björn Drobot¹, René Hübner², Frank Bok¹, Thorsten Stumpf¹, and Andrea Cherkouk¹

¹Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Resource Ecology, Dresden, Germany

²Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Ion Beam Physics and Materials Research, Dresden, Germany

Correspondence: Andrea Cherkouk (a.cherkouk@hzdr.de)

Published: 10 November 2021

Abstract. Clay formations are potential host rocks for the long-term storage of high-level radioactive waste in a deep geological repository. Bentonites are supposed to serve as backfill material, not only for a final disposal site in clay formations but also in crystalline rock. For a long-term safety assessment, various aspects must be taken into account. Besides geological, geochemical and geophysical considerations, naturally occurring microorganisms also play a crucial part in the environment of such a repository. In the event of a worst-case scenario when water enters the disposal site, they can interact with the radionuclides and change for example the chemical speciation or the oxidation state (Lloyd et al., 2002).

Desulfosporosinus spp. are an important representative of anaerobic, sulfate-reducing microorganisms, which are present in clay formations as well as in bentonites. Various studies have shown that they play a major role in the microbial communities of these surroundings (Bagnoud et al., 2016; Matschiavelli et al., 2019). A closely related microorganism to the isolated species is *Desulfosporosinus hippei* DSM 8344, which was originally found in permafrost soil (Vatsurina et al., 2008). This bacterium was used to investigate its interactions with uranium(VI) especially regarding the reduction to the less mobile uranium(IV).

Time-dependent reduction experiments in artificial Opalinus Clay pore water (Wersin et al., 2011) (100 µM uranium(VI), pH 5.5) showed the removal of about 80 % of the uranium(VI) from the supernatants within 48 h. Corresponding UV/Vis measurements of the dissolved cell pellets exhibited an increasing proportion of uranium(IV) in the cell-bound uranium. Calculations with the inclusion of extinction coefficients led to a ratio of 39 % uranium(IV) after 1 week. Therefore, a combined sorption-reduction process is a possible interaction mechanism.

Time-resolved laser-induced luminescence spectroscopy verified the presence of two uranium(VI) species in the supernatant. A comparison with reference spectra led to an assignment to a uranyl(VI) lactate and a uranyl(VI) carbonate complex. The species distribution showed a decrease of the proportion of the lactate species with time, whereas the proportion of the carbonate species remained almost constant.

Uranium aggregates are formed on the cell surface during the process, as determined by transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, uranium occurs inside and outside the cells as well as vesicles containing uranium.

These findings help to close existing gaps in a comprehensive safeguard concept for a repository for high-level radioactive waste in clay rock. Moreover, this study provides new insights into the interactions of sulfate-reducing microorganisms with uranium(VI).

Kurzfassung. Tonformationen sind potenzielle Wirtsgesteine für die Langzeitlagerung von hochradioaktivem Abfall in einem geologischen Tiefenlager. Bentonite sollen als Verfüllmaterial dienen, nicht nur für eine Endlagerstätte in Tonformationen, sondern auch in kristallinem Gestein. Für eine langfristige Sicherheitsbewertung

müssen verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Neben geologischen, geochemischen und geophysikalischen Faktoren spielen auch natürlich vorkommende Mikroorganismen eine wesentliche Rolle in der Umgebung einer derartigen Lagerstätte. Im Fall eines Worst-Case-Szenarios, wenn Wasser in die Lagerstätte eindringt, können sie mit den Radionukliden interagieren und z. B. die chemische Spezierung oder den Oxidationszustand verändern (Lloyd et al., 2002).

Desulfosporosinus spp. sind ein wichtiger Vertreter anaerober, sulfatreduzierender Mikroorganismen, die sowohl in Tonformationen als auch in Bentoniten vorkommen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass sie eine bedeutsame Rolle in den mikrobiellen Gemeinschaften solcher Umgebungen spielen (Bagnoud et al., 2016; Matschiavelli et al., 2019). Ein mit der isolierten Spezies eng verwandter Mikroorganismus ist *Desulfosporosinus hippei* DSM 8344, der ursprünglich im Permafrostboden gefunden wurde (Vatsurina et al., 2008). Dieses Bakterium wurde zur Untersuchung seiner Wechselwirkungen mit Uran (VI) eingesetzt, insbesondere hinsichtlich der Reduktion zu dem weniger mobilen Uran (IV).

Zeitabhängige Reduktionsversuche in künstlichem Opalinuston-Porenwasser (Wersin et al., 2011) (100 μ M Uran (VI), pH 5,5) ergaben die Entfernung von etwa 80 % des Uran (VI) aus den Überständen innerhalb von 48 h. Korrespondierende UV/Vis-Messungen der gelösten Zellpellets ergaben einen zunehmenden Anteil von Uran (IV) im zellgebundenen Uran. Berechnungen unter Einschluss von Extinktionskoeffizienten führten zu einem Anteil von 39 % Uran (IV) nach einer Woche. Daher stellt ein kombinierter Sorptions-Reduktions-Prozess einen möglichen Interaktionsmechanismus dar.

Mit der zeitaufgelösten laserinduzierten Lumineszenzspektroskopie wurde das Vorhandensein von 2 Uran(VI)-Arten im Überstand nachgewiesen. Ein Vergleich mit Referenzspektren führte zu einer Zuordnung zu einem Uranyl(VI)-Laktat- und einem Uranyl(VI)-Karbonat-Komplex. Die Speziesverteilung wies eine Abnahme des Anteils der Laktatspezies mit der Zeit auf, während der Anteil der Karbonatspezies fast konstant blieb.

Uranaggregate werden auf der Zelloberfläche während des Prozesses gebildet, wie durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) festgestellt wurde. Darüber hinaus kommt Uran innerhalb und außerhalb der Zellen sowie in Vesikeln vor, die Uran enthalten.

Diese Ergebnisse tragen dazu bei, bestehende Lücken in einem umfassenden Konzept von Sicherheitsvorkehrungen für ein Endlager für hochradioaktive Abfälle in Tongestein zu schließen. Außerdem liefert diese Studie neue Erkenntnisse zu den Interaktionen von sulfatreduzierenden Mikroorganismen mit Uran (VI).

References

- Bagnoud, A., Chourey, K., Hettich, R. L., De Bruijn, I., Anderson, A. F., Leupin, O. X., Schwyn, B., and Bernier-Latmani, R.: Reconstructing a hydrogen-driven microbial metabolic network in Opalinus Clay rock, *Nat. Commun.*, 7, 1–10, 2016.
- Lloyd, J. R. and Macaskie, L. E.: Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions, in: *Interactions of Microorganisms with Radionuclides*, edited by: Keith-Roach, M. J. and Livens, F. R., Elsevier, Oxford, 313–381, 2002.
- Matschiavelli, N., Kluge, S., Podlech, C., Standhaft, D., Grathoff, G., Ikeda-Ohno, A., Warr, L. N., Chukharkina, A., Arnold, T., and Cherkouk, A.: The year-long development of microorganisms in uncompacted Bavarian bentonite slurries at 30 °C and 60 °C, *Environ. Sci. Technol.*, 53, 10514–10524, 2019.
- Vatsurina, A., Badrutdinova, D., Schumann, P., Spring, S., and Vainshtein, M.: *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 58, 1228–1232, 2008.
- Wersin, P., Leupin, O. X., Mettler, S., Gaucher, E. C., Mäder, U., De Cannière, P., Vinsot, A., Gäbler, H. E., Kunimaro, T., Kiho, K., and Eichinger, L.: Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part A – Overview, experimental design and water data of an experiment in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland, *Appl. Geochem.*, 26, 931–953, 2011.