

# **Untersuchungen zur Charakterisierung neuartiger Ölbindematerialien sowie zur Bestimmung der Ölabbauleistung eines Mikroorganismenkonsortiums aus der Ostsee**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)  
vorgelegt an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

von

Dipl.-Chem. Janne Hähnel

geboren am 18.07.1984 in Cuxhaven

Rostock, 2016

**Gutachter:**

## 1. Gutachter:

Prof. Dr. Detlef E. Schulz-Bull

Sektion Meereschemie, Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde an  
der Universität Rostock

## 2. Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Ebinghaus

Institut für Küstenforschung, Helmholtz-Zentrum Geesthacht

**Datum der Einreichung:** 04.07.2016

**Datum der Verteidigung:** 27.06.2017

*Was lange währt, wird endlich fertig.*

Diese Arbeit wurde in mehreren Etappen von Juli 2011 bis Juni 2016 unter der Anleitung von Prof. Dr. Detlef Schulz-Bull am Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde an der Universität Rostock sowie im „home office“ angefertigt. Auf den folgenden Seiten soll nun all jenen gedankt werden, ohne die diese Arbeit nicht entstanden und auch nicht fertig geworden wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Detlef Schulz-Bull, für die Möglichkeit, im Rahmen eines so anwendungsbezogenen Verbundprojektes promovieren zu dürfen. Das Lehrschwimmbecken war zwar oftmals ziemlich kalt, aber so habe ich in den letzten Jahren einiges an Handwerkszeug für meinen zukünftigen beruflichen Werdegang zusammenpacken können. Darüber hinaus möchte ich mich für die Freiheiten bedanken, die meinen Arbeitsalltag bunt gemacht und mich immer wieder mit neuer Energie versorgt haben. Ich durfte lernen, dass eine familienfreundliche Einstellung unzählige Türen öffnen und dass man mit nicht nachlassender Ausdauer und Penetranz fast alles erreichen kann.

Den Mitgliedern meines Doktorandenkomitees, Prof. Dr. Ralf Zimmermann, Dr. Matthias Labrenz und Dr. Rolf Schneider, danke ich für die Bereitschaft, mich während meiner Doktorandenzzeit zu unterstützen und meine Arbeitsziele jedes Jahr aufs Neue zu hinterfragen.

Ich möchte den Projektpartnern des Verbundprojektes BioBind für die produktive, lehrreiche und spannende Zusammenarbeit danken. Dr. Martin Powilleit und Marcus Siewert danke ich für die zahlreichen, kuchengestützten Projekttreffen vor Ort. Dank Dr. Elena Safonova und Dr. Swetlana König weiß ich heute einiges mehr über die Welt der Kleinstlebewesen und habe mich in Leipzig stets willkommen gefühlt. Bei Dr. Holger Un behaun und Dr. Sören Tech bedanke ich mich für die kooperative Zusammenarbeit, die neben wissenschaftlichen Diskussionen auch einen unerschöpflichen Bindervorrat beinhaltet hat. Dank Christian Semlow wurden mir die Fahrten im „Professoren-Mobil“ nie langweilig und dank den Nachtschwärzern des Projektes waren auch die Zeiten jenseits der Arbeitssitzungen stets unterhaltsam und werden mir in guter, lebhafter Erinnerung bleiben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Jenny Jeschek für die unermüdliche Hilfe und stets harmonische Zusammenarbeit im Labor. Ohne die tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen und den unerschöpflichen Vorrat an aufmunternden Worten wäre ich wohl so manches Mal verzweifelt. Bei Ines Hand möchte ich mich für die offenen Arme bedanken, die sie mir und meinen Ölproben entgegen gebracht hat. Das strahlende „Gerne!“ von Astrid Lerz, wenn sie mir mal wieder einen Handschlag abgenommen oder mir mit wertvoller Laborantenerfahrung zur Seite gestanden hat, habe ich immer noch dankbar im Ohr. Irina Goldschmidt gebührt mein Dank für die vielen, kleinen Hilfestellungen im Bereich der „Chefkommunikation“.

Dr. Jerome Kaiser und Nadine Hollmann danke ich für die zur Verfügung gestellte Messzeit am GC-FID sowie für die messtechnische Unterstützung.

Mein herzlichster Dank geht an die Stammbelegschaft aus 406. Es hat immer wieder gut getan, den Raum, die Arbeit und das Leben mit Karoline Hammer und Dr. David Meyer zu teilen. Gemäß des Leitsatzes „Was in 406 passiert, bleibt in 406“ möchte ich mich auf Folgendes beschränken: Es war eine unvergesslich schöne Zeit mit euch!

Den Kollegen aus der Sektion Meereschemie danke ich für das freundliche Miteinander, die stete Bereitschaft für den wissenschaftlichen Austausch, die vielen offenen Ohren sowie für die guten Gespräche auf dem Flur oder bei den „gesellschaftlichen Events“. Ein weiterer Dank geht an die Kollegen aus der Werkstatt für ihren unerschöpflichen Ideenreichtum und die Bereitschaft diesen in die Praxis umzusetzen.

Dr. Monty Kessler sei für die Bereitstellung des Potts gedankt, auf den er mich gesetzt hat. Ohne seine klaren Worte wäre diese Arbeit niemals geschrieben worden.

Ich danke dem Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde für die finanzielle Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation in Form des „Come back to research“-Stipendiums.

Ein weiteres Mal geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Jürgen W. Einax. Er hat nicht nur meine Begeisterung für die Chemometrik geweckt, sondern mir außerdem eine Sensibilität in Bezug auf den Umgang mit analytischen Daten vermittelt, die ich nicht mehr missen möchte.

Abschließend danke ich meiner Familie, wobei ich besonders meinen Mann, Dr. Martin Hähnel, hervorheben möchte, der in den letzten Wochen und Monaten in seiner wohlverdienten Freizeit geduldiger Seelentröster, gewissenhafter Hausmann, ausdauernder Korrekturleser, liebevoller Babysitter und wissenschaftlicher Diskussionspartner in Personalunion war. Danke, dass du mich ermutigt hast, diese Arbeit zu schreiben und danke, dass du es ausgehalten und mitgetragen hast, als ich es tatsächlich gemacht habe.

*Dem großen und dem kleinen Martin*

*,,Ins Wasser fällt ein Stein,  
ganz heimlich still und leise,  
und ist er noch so klein,  
zieht er doch weite Kreise.“*

**Manfred Siebald**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Umweltbelastung durch Ölverschmutzung – das Projekt BioBind.....	1
1.2 Mikrobieller Ölabbau .....	4
1.3 Ölanalytik .....	6
1.4 Zielsetzung.....	8
<b>2 Experimenteller Teil .....</b>	<b>11</b>
2.1 Verwendete Chemikalien .....	11
2.2 Probennahme und -aufarbeitung.....	11
2.3 Messmethode .....	12
2.4 Qualitätssicherung .....	12
2.5 Datenvorbehandlung.....	14
2.6 Charakterisierung des verwendeten Öls .....	14
<b>3 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>16</b>
3.1 Charakterisierung der Eigenschaften der Ölbinden .....	16
3.1.1 Untersuchungen zu den absorbierenden Eigenschaften .....	18
3.1.2 Untersuchungen zu den desorbierenden Eigenschaften .....	25
3.2 Charakterisierung ölabbauender Mikroorganismen .....	29
3.2.1 Einfluss der Ölkonzentration auf den mikrobiellen Ölabbau .....	31
3.2.2 Einfluss der Nährstoffzugabe auf den mikrobiellen Ölabbau .....	39
3.2.3 Charakterisierung der Ölabbauleistung von Mikroorganismengemeinschaften	43
3.3 Ölausnahme der Binder und mikrobieller Ölabbau unter <i>in-situ</i> -Bedingungen .....	57
3.3.1 Versuchsaufbau .....	58
3.3.2 Untersuchungen zu der Sauerstoff- und Nährstoffsituation .....	61
3.3.3 Untersuchungen zur Ölausnahme durch die Binder .....	64
3.3.4 Ölabbau durch Mikroorganismen in Meerwasser .....	79
<b>4 Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>5 Anhang.....</b>	<b>98</b>
5.1 Verwendete Chemikalien .....	98
5.2 Probennahme und -aufbereitung.....	102
5.2.1 Standardlösungen .....	102
5.2.2 Ölbinden .....	103
5.2.3 Mikroorganismen .....	105

---

5.2.4	Experimente unter <i>in-situ</i> -Bedingungen .....	108
5.3	Messmethode .....	113
5.3.1	Öl als Gesamtmatrix (Gravimetrie).....	113
5.3.2	<i>n</i> -Alkane (GC-FID) .....	113
5.3.3	PAK (GC/MS).....	115
5.3.4	Nährstoffe (Titration und Fotometrie).....	117
5.4	Qualitätssicherung .....	117
5.4.1	Wiederfindungsraten .....	117
5.4.2	Linearität .....	119
5.4.3	Quantifizierung.....	121
5.4.4	Interne Standards.....	123
5.4.5	Blindwerte .....	127
5.4.6	Nachweisgrenze .....	127
5.5	Datenvorbehandlung und statistische Grundlagen .....	128
5.6	Zusätzliche Informationen .....	130
5.6.1	Charakterisierung des verwendeten Öls .....	130
5.6.2	Temperaturdaten der Mesokosmenexperimente .....	132
6	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>134</b>
7	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>135</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Achsenabschnitt
$\beta$	Steigung
$\mu$	„wahrer“ Wert
$\delta$	Durchmesser
$a$	Kantenlänge
$A$	Alge
$b$	Binderbelegung
$c$	Konzentration
$C$	Cyanobakterium
$d_{\text{Öl}}$	Ölfilmschichtdicke
$D^2$	sukzessive Differenzstreuung
$DS^2$	Differenz der Varianzen
diff	Differenz
$f$	Zahl der Freiheitsgrade
$F$	Fläche
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Forschungsschiff
GC	Gaschromatografie
Gl.	Gleichung
$h$	Höhe
HELCOM	Baltic Marine Environment Protection Commission – Helsinki Commission (Helsinki-Kommission)
i	Laufindex
in.	innerhalb der Analysenwerte
IS	interner, massenmarkierter Standard
j	Laufindex
Kal	Kalibrierung
m	Zahl der Messreihen
M	Messsignal
$\bar{M}$	mittleres Messsignal
min	Minimum
max	Maximum
MO	Mikroorganismen
MS	Massenspektrometer
n	Zahl der Proben
$n_c$	Zahl der Kalibrierstandards eines Konzentrationsniveaus
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PTV	programmed temperature vaporizing (temperaturprogrammierte Verdampfung)

---

PW	Prüfwert
Q	Fehlerquadratsumme
REB	Russian Export Blend
<i>Rh.</i>	<i>Rhodococcus</i>
s	Standardabweichung
$s^2$	Varianz
$s_{y,x,1}^2$	Reststandardabweichung der linearen Regression
$s_{y,x,2}^2$	Reststandardabweichung der quadratischen Regression
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SARA	saturated, aromatics, resins, asphaltenes – gesättigte Kohlenwasserstoffe, Aromaten, Harze, Asphalten
SIM	selected ion monitoring (ausgewählte Ionenaufzeichnungsfunktion)
Std	Standard
Subs	native Substanz
t	Zeit
$t_E$	Eintauchzeit
T	Temperatur
TU	Technische Universität
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency (Umweltbehörde der USA)
V	Volumen
VPS	Vorsorgeplan Schadstoffunfallbekämpfung
w	Massenanteil in %
WFR	Wiederfindungsrate
WFR <sub>rel</sub>	relative Wiederfindungsrate
x	Messgröße
$\bar{x}$	Mittelwert einer Messgröße
$x^*$	ausreißerverdächtiger Wert
$x_{NG}$	Messgröße an der Nachweisgrenze
y	Informationswert
$\hat{y}$	aus der Gleichung der Anpassung berechneter Informationswert
zw.	zwischen den Analysenwerten

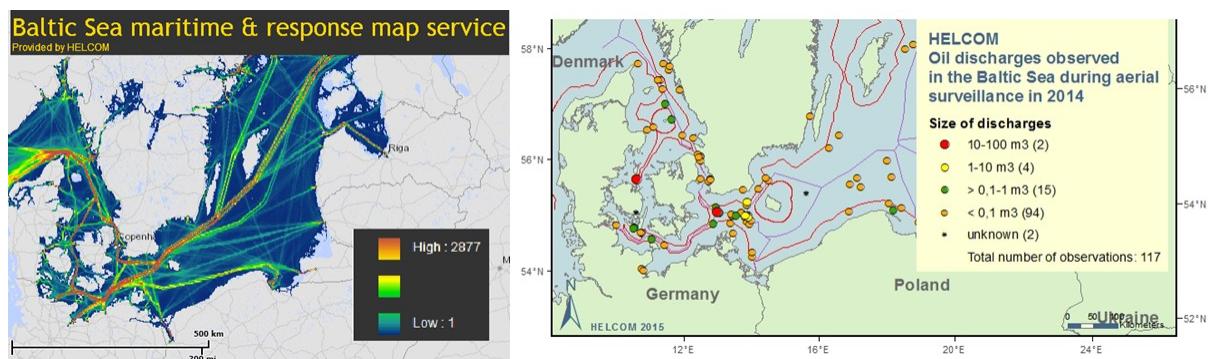
---

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Verbundprojektes mit dem Titel „Luftgestützte Beseitigung von Verunreinigungen durch Öl mit biogenen Bindern“ (Kurztitel: BioBind) durchgeführt. Gefördert wurde das Projekt vom 01.07.2011 bis 30.06.2014 vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie im Rahmen des Forschungsprogramms für Schiffbau, Schifffahrt und Meerestechnik 2011-2015 „Maritime Technologien der nächsten Generation“ (Förderkennzeichen: 03SX308). Im Jahr 2015 erreichte das Projekt bei den GreenTec Awards, Europas größtem Umwelt- und Wirtschaftspreis, in den Kategorien „Wasser und Abwasser“ sowie „Galileo Wissenspreis“ eine Platzierung unter den ersten drei Nominierungen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Umweltbelastung durch Ölunfälle – das Projekt BioBind

Als eines der größten Brackwassermeere der Welt beherbergt die Ostsee ein ganz besonderes und einzigartiges Ökosystem.<sup>[1]</sup> Dieses Ökosystem wird jeden Tag durch den immensen Schiffsverkehr und das damit verbundene Havarierisiko einer potentiellen Gefährdung ausgesetzt. Das Verkehrsaufkommen auf der Ostsee ist seit zehn Jahren ungefähr gleichbleibend hoch und insbesondere exponierte Gebiete wie der Fehmarnbelt/Langelandsbelt oder die Kattegatrinne gleichen einer vielbefahrenen Autobahn (siehe Abbildung 1).<sup>[2]</sup>



**Abbildung 1:** Verkehrsdichte in der südwestlichen Ostsee (Automatisches Identifikationssystem, monatlicher Mittelwert 2011; links); Öleinträge in der südwestlichen Ostsee im Jahr 2014, die von der Helsinki-Kommission (HELCOM) mittels Flugüberwachung detektiert wurden (rechts).<sup>[3]</sup>

Das über die Ostsee transportierte Ölvolume nahm in den letzten Jahren konstant zu und auch für die nächsten Jahre wird ein weiterer Anstieg prognostiziert.<sup>[4]</sup> Allein für das über die Ostsee transportierte Exportvolumen von russischem Öl wird bis 2020 mit einer Zunahme von 60 % auf 180 Millionen Tonnen gerechnet.<sup>[4]</sup> Mit dem erhöhten Transportvolumen steigt das Risiko für eine größere Ölunfall (mit einem Ölvolume von 300 t bis 5000 t).<sup>[4,5]</sup> In den letzten Jahren nahm die Zahl der Schiffsunfälle auf der Ostsee zu und erreichte im Jahr 2013 mit 150 registrierten Unfällen den höchsten Wert der letzten zehn Jahre.<sup>[2]</sup> Bezogen auf die gesamte Ostsee wurden 38 % der Unfälle durch Kollisionen und 29 % der Unfälle durch Grundberührungen verursacht.<sup>[2]</sup> Jeweils über die Hälfte dieser Unfälle, 59 % der Kollisionen und 54 % der Grundberührungen, fanden in der südwestlichen Ostsee statt.<sup>[2]</sup> In den letzten zehn Jahren resultierte aus 4 % bis 10 % der Schiffsunfälle eine Verschmutzung beziehungsweise eine Schadstoffbelastung.<sup>[2]</sup> Im Jahr 2013 wurde das Risiko von Ölverschmutzungen durch Schiffsunfälle speziell für die deutsche Küste als „hoch“ eingestuft.<sup>[6]</sup> Jeder Schadstoffaustritt birgt das Risiko einer immensen Gefährdung und Belastung des marinen Ökosystems.

Während es in der Ostsee bei der Betrachtung von Ölunfällen ab 5000 t durch Schiffsunfälle vor allem um die Risikoeinschätzung und -prävention geht, stellen mutwillige, illegale Ölunfälle eine gegenwärtige Quelle der Verschmutzung dar.<sup>[4]</sup> Mittels Luftüberwachung der HEL-

sinki-Kommission (HELCOM) konnten im Jahr 2014 117 illegale Öleinträge detektiert werden (siehe Abbildung 1).<sup>[7]</sup> Seit dem Jahr 2000 konnte damit eine Abnahme der illegalen Öleinträge von 476 Einträgen pro Jahr auf etwa ein Viertel konstatiert werden.<sup>[7]</sup> Bei dieser Art der Ölverschmutzung handelt es sich zumeist um Einträge geringen Volumens. Im Jahr 2014 waren 93 % der detektierten Ölmengen kleiner als 1 m<sup>3</sup>.<sup>[7]</sup> Trotz der abnehmenden Zahl der illegalen Öleinträge und ihres vergleichsweise geringen Volumens sind die negativen Auswirkungen dieser Einträge auf die marine Umwelt der Ostsee sichtbar und nachweisbar.<sup>[4]</sup> Gelangt Öl in das marine System, kann es dort erheblichen Schaden anrichten.<sup>[8,9]</sup> Dabei können sowohl kurzfristige Schädigungen, wie zum Beispiel die meist tödlichen Ölverschmutzungen im Gefieder von Seevögeln, als auch langfristige Schädigungen, zum Beispiel durch die Bioakkumulation toxischer Ölkomponenten im Gewebe mariner Organismen oder die Persistenz einzelner, zum Teil toxischer Ölbestandteile in der Umwelt, auftreten.<sup>[9]</sup> Vor allem in den empfindlichen Küstengebieten sind die Auswirkungen oft verheerend, da sie unter anderem als Ruhe- und Brutplätze für Seehunde und Seevögel dienen.<sup>[10]</sup> Besonders gefährdet ist auch der ökologisch wichtige Pflanzenbewuchs der Küsten, zum Beispiel Salzwiesen.<sup>[8,10]</sup> Doch nicht nur die ökologischen Schäden sind bei einer umfassenden Betrachtung zu berücksichtigen, sondern auch die ökonomischen in Form von Reinigungskosten, Produktionsverlusten, Einnahmeeinbußen in Fischerei und Tourismus sowie Strafverfolgungskosten.<sup>[11]</sup> Es ist daher von allgemeinem Interesse, Ölverunreinigungen in See- und Küstengebieten möglichst zeitnah beseitigen zu können.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Ölbekämpfung/-beseitigung im marinen Bereich. Einen umfassenden Überblick dazu liefert das Bekämpfungshandbuch des Vorsorgeplans Schadstoffunfallbekämpfung (VPS), dem die folgenden Informationen entnommen sind.<sup>[11]</sup> In Deutschland werden in der Regel physikalische Anwendungen, wie zum Beispiel Ölsperren, Pumpen oder Adsorbermaterialien, bei der Bekämpfung einer Ölavarie eingesetzt. Neben diesen physikalischen/mechanischen Anwendungen können auch biologische Verfahren zur Förderung der natürlichen Reinigungsprozesse angewendet werden.<sup>[11,12]</sup> Dabei soll der mikrobielle Ölabbau durch die Ausbringung von Nährstoffen und/oder ölabbauenden Mikroorganismen unterstützt und beschleunigt werden. Diese Möglichkeit wird bislang in Deutschland allerdings aufgrund mangelnder Belege hinsichtlich der positiven Erfolgsaussichten nicht genutzt. Ein drittes Anwendungsgebiet stellt der Einsatz von Chemikalien dar, die eine gezielte Veränderung der Öleigenschaften bewirken. Dabei können zum Beispiel Substanzen zur Verfestigung und Stabilisierung oder auch zur Herabsetzung der Oberflächenspannung des Öls eingesetzt werden. Eine Reduzierung der Oberflächenspannung des Öls führt zu einer erleichterten Dispersion in der Wasserphase. Durch den Einsatz sogenannter Dispergatoren soll die Kontamination sensibler Küstenbereiche verhindert und der natürliche mikrobielle Abbau durch die Vergrößerung der Öloberfläche in der Wasserphase erleichtert werden. Aufgrund der potentiellen Toxizität dieser Substanzen ist eine Ausbringung grundsätzlich sorgfältig abzuwägen. In Deutschland ist der Einsatz solcher Verbindungen in Nord-

und Ostsee gemäß des Bonn- und Helsinkiabkommens nicht erlaubt. Lediglich in Ausnahmefällen ist eine eventuelle Ausbringung vor den nord- und ostfriesischen Inseln möglich. Eine weitere Bekämpfungsmethode, die in Deutschland grundsätzlich nicht gestattet ist, ist das „*in-situ-Burning*“, das Verbrennen des Öls auf See. Auch hier sind jedoch Ausnahmeregelungen möglich.<sup>[11]</sup>

Bei der Ostsee handelt es sich insgesamt um ein flaches Meer mit einer mittleren Tiefe von 52 m, wobei die Wassertiefe insbesondere im südwestlichen Teil oftmals lediglich bis zu 20 m beträgt.<sup>[13]</sup> Die deutsche Außenküste umfasst von Flensburg bis Ahlbeck eine Länge von 720 km.<sup>[14]</sup> Während die Küstenlinie in Schleswig-Holstein vor allem von Fördern- und Buchtenküste repräsentiert wird, sind in Mecklenburg-Vorpommern vor allem die flachen Boddenküsten zu finden.<sup>[15]</sup> Die üblicherweise in Nord- und Ostsee eingesetzten Ölbekämpfungssysteme arbeiten in der Regel schiffsbasiert. Von einem Ölbekämpfungsschiff aus werden mechanische Anwendungen durchgeführt, um das ausgetretene Öl zu begrenzen und aufzunehmen. Der Tiefgang dieser Ölbekämpfungsschiffe macht ihren Einsatz in Flachwassergebieten und küstennahen Bereichen unmöglich und stellt somit gerade in Bezug auf die Ostsee einen wesentlichen Schwachpunkt der bestehenden Systeme dar. Im Rahmen der Ölbekämpfung gelten Flachwassergebiete aufgrund der technischen Einschränkungen als am schwierigsten zu schützen.<sup>[11]</sup>

Bei den aktuell eingesetzten Ölbekämpfungssystemen handelt es sich um technisch aufwändige und teure Systeme. Aus diesem Grund werden die genannten Systeme erst ab einem Mindestvolumen von mehreren Hundert oder Tausend Tonnen Öl aktiviert und eingesetzt. Wie bereits ausgeführt basiert der Großteil der Ölverschmutzungen jedoch auf illegalen Einträgen, die fast ausschließlich unter einem Volumen von 1 m<sup>3</sup> liegen. Diese geringen Mengen werden mit den bestehenden Systemen nicht bekämpft und führen so in ihrer Akkumulation zu einer beträchtlichen Belastung des Ökosystems Ostsee.<sup>[4]</sup>

Um die Grenzen der bestehenden Ölbekämpfungssysteme zu erweitern und neue Einsatzgebiete zu schaffen, startete im Jahr 2011 ein Verbundprojekt mit dem Titel „Luftgestützte Beseitigung von Verunreinigungen durch Öl mit biogenen Bindern“ (Kurztitel: BioBind).<sup>[16]</sup> Gefördert wurde das Projekt, in dem verschiedene Projektpartner - Universitäten, Forschungsinstitute und Unternehmen - tätig waren, vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie. Das Projekt BioBind setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: (1) Entwicklung von Ölbindern aus biologisch abbaubaren Materialien, auf denen ausgewählte, ostseetypische Mikroorganismen immobilisiert werden, die den natürlichen, bakteriellen Ölabbau unterstützen, (2) Etablierung einer Technologie zur luftgestützten Ausbringung der entwickelten Ölbinden, (3) Erarbeitung eines luftgestützten, kostengünstigen Systems zur Ölerkennung und -überwachung, (4) Anpassung von see- und landseitigen Bergetechniken. Mit dieser vor allem in ihrer Kombination neuartigen Herangehensweise an die marine Ölbekämpfungsthematik war es das Ziel des Projektes BioBind, bestehende Lücken in der Ölbekämpfung auf See und in den Küstengebieten zu schließen und dabei den Fokus auf kleine

Ölhavarien bis zu einem Volumen von 50 t zu legen. Zielgebiete für den Einsatz des Systems „BioBind“ sind vor allem küstennahe Flachwassergebiete sowie ökologisch sensible Regionen, wie zum Beispiel der Nationalpark Vorpommersche Boddenlandschaft (siehe Abbildung 2).

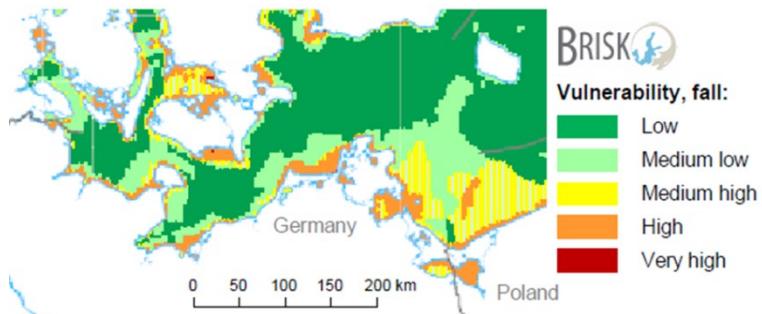


Abbildung 2: Darstellung der ökologischen Sensibilität im Bereich der südwestlichen Ostsee in Bezug auf Ölenträge.<sup>[17]</sup>

## 1.2 Mikrobieller Ölabbau

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen, zum Beispiel Bakterien oder Pilze, in der Lage sind, Ölkontaminationen in der Umwelt als Kohlenstoffquelle zu nutzen.<sup>[18,19]</sup> Ebenso ist bekannt, dass diese natürlichen Ölabbauer nahezu ubiquitär vorhanden sind.<sup>[20,21]</sup> Es wurden sowohl Einflussfaktoren wie Temperatur, Sauerstoffzufuhr oder Nährstoffversorgung als auch das Abbauverhalten in verschiedenen Umweltkompartimenten untersucht.<sup>[22-24]</sup> Motivation für zahlreiche Untersuchungen zur Bioremediation im marinen Bereich waren die immer wieder auftretenden immensen Ölkontaminationen durch Tankerunglücke, wie zum Beispiel die Havarie der *Exxon Valdez* vor der Küste Alaskas im Jahr 1989 oder die Havarie der *Prestige* vor der galizischen Küste im Jahr 2002. Bei der Explosion auf der Bohrplattform zur Erdölexploration *Deepwater Horizon* im Golf von Mexiko im Jahr 2010 handelt es sich um die aktuellste Ölhabarie, bei der es zu einem Ölaustritt von mehreren Millionen Litern kam.<sup>[25]</sup> Dieser Ölunfall lenkte erneut sowohl den Fokus der allgemeinen Presse als auch den der Wissenschaft verstärkt auf die Diskussion über den Einsatz chemischer Dispergatoren und den natürlich stattfindenden mikrobiellen Ölabbau. Während industriell synthetisierte Dispergatoren in der Regel eine nicht zu vernachlässigende Eigentoxizität aufweisen, nutzen ölabbauende Mikroorganismen sogenannte Biotenside, die ebenfalls dispergierende Eigenschaften aufweisen, jedoch weitaus weniger toxisch zu sein scheinen.<sup>[22]</sup>

Es ist bekannt, dass eine einzelne Mikroorganismenspezies oft nur ein begrenztes Spektrum der im Öl vorhandenen Verbindungen abbauen kann.<sup>[18]</sup> Werden ausgewählte Mikroorganismen miteinander kombiniert, zum Beispiel ölabbauende Bakterien und Cyanobakterien, kann eine symbiotische Biozönose entstehen und das Spektrum der abbaubaren Verbindungen wird dadurch effizient erweitert.<sup>[26,27]</sup> Wirkt ein solches Konsortium, können sowohl aliphatische

als auch aromatische Verbindungen des Erdöls abgebaut werden.<sup>[28]</sup> Spricht man allgemeinhin von mikrobiellem Ölabbau, ist damit in der Regel kein Abbau der Erdölkohlenwasserstoffe zu Wasser und CO<sub>2</sub> beziehungsweise CH<sub>4</sub> gemeint, sondern vielmehr eine Transformation der im Öl vorkommenden Verbindungen zu (polareren) Abbauprodukten.<sup>[29]</sup> Auf die molekulare Komplexität der Ausgangsmatrix Öl ist es zurückzuführen, dass der Großteil der mikrobiellen Abbauprodukte sowie deren mögliche Toxizität bislang weitestgehend unbekannt sind. Als Resultat gibt es sowohl Studien, die eine Abnahme der Toxizität nach erfolgreicher Bioremediation angeben, als auch Studien, die eine Zunahme der Toxizität postulieren.<sup>[29,30]</sup> Das Ausmaß der Toxizität hängt von mehreren Faktoren ab, auf deren Einfluss hier kurz eingegangen werden soll.

Die Grundlage des mikrobiellen Abbaus stellt das Erdöl als bislang nicht vollständig charakterisierte Ausgangsmatrix dar. Dabei gibt es nicht „das eine Erdöl“; verschiedene Öle können verschiedene Charakteristika aufweisen.<sup>[31]</sup> Werden im Rahmen von Toxizitätsuntersuchungen unterschiedliche Öle verwendet, kann bereits die molekulare Variation dieser Ausgangsstoffe in unterschiedlichen Abbauprodukten resultieren, deren Toxizität dann als logische Konsequenz verschieden sein kann. Mikrobielle Abbaupfade wurden bislang an einzelnen, im Öl vorkommenden Molekülen und Molekülgruppen, zum Beispiel *n*-Alkanen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), untersucht und dargelegt.<sup>[20,32,33]</sup> Welche Ölabbauprodukte in einem komplexen Erdöl entstehen können, ist bislang nicht im Detail bekannt, sodass auch keine detaillierten Toxizitätsstudien auf molekularer Ebene durchgeführt werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mikroorganismenspezies unterschiedliche Abbauwege initialisieren und so aus identischen Ausgangsstoffen verschiedene Abbauprodukte entstehen können.<sup>[33,34]</sup> Der Einsatz eines Mikroorganismenkonsortiums erhöht dabei die möglichen Abbaupfade und damit auch die Unsicherheit hinsichtlich der Abbauprodukte und deren potentieller Toxizität. Es ist davon auszugehen, dass auch die Versuchsbedingungen, wie Temperatur, Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie das Milieu (terrestrisch, marin), einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf den mikrobiellen Ölabbau und die Produktion vermeintlich toxischer Ölabbauverbindungen haben. Eine Verlagerung aus dem Labor ins freie Feld erhöht nochmals die Zahl der Einflussfaktoren. Hier kommen zum Beispiel Umweltbedingungen wie Sonneneinstrahlung, Wind oder Wellengang dazu, die zu einer Alterung und somit zu einer Veränderung der Ausgangsmatrix Öl führen. Allgemein verläuft der mikrobielle Ölabbau unter definierten Laborbedingungen anders, meist effizienter, als im Freiland.<sup>[21]</sup> Eine im Labor ermittelte Toxizität von Abbauprodukten muss demnach nicht zwingend auf identische Weise im Freiland auftreten. Nicht zuletzt spielt auch die Auswahl der Testorganismen eine ausschlaggebende Rolle, da Ölabbauprodukte auf verschiedene Spezies eine unterschiedliche Wirkung haben können.<sup>[35]</sup> Es wird demnach deutlich, dass vor allem eine vergleichende Diskussion über die Toxizität der Ölabbauprodukte nicht ohne weiteres möglich ist. Generell besteht auf diesem Gebiet noch viel Untersuchungsbedarf.<sup>[29,35]</sup> Die aufgeführten Herausforderungen bei der Toxizitätsbestimmung gelten in ihren Grundzügen auch für die Bestimmung der Temperaturtoleranz, der Abbaueffizienz, des Einflusses der

Nährstoffversorgung und der Übertragbarkeit der Laborergebnisse in das Freiland. Auch hier werden die Ergebnisse von den Randbedingungen, zum Beispiel der Mikroorganismenauswahl oder der Wahl der Versuchsmatrix, beeinflusst. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auf dem Gebiet des mikrobiellen Ölabbau bereits viel untersucht wurde, die Versuchsbedingungen jedoch so individuell und die Einflussfaktoren so zahlreich und in ihrer Auswirkung so gravierend sind, dass eine uneingeschränkte Übertragbarkeit allgemeiner Ergebnisse auf den konkreten Untersuchungsansatz schwierig erscheint.

Bei einem Einsatz des Systems „BioBind“ werden Ölbinder auf die mit Öl kontaminierte Wasserfläche ausgebracht. Auf den eingesetzten Ölbindern sollen sich ölabbauende Mikroorganismen befinden. Nachdem die Ölaufnahme durch die Binder abgeschlossen ist, werden die Binder im Idealfall vollständig geborgen und somit mit dem aufgenommenen Öl aus dem marinen System entfernt. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Bergung der Binder nicht realisierbar sein wird. Speziell auf den im marinen System verbleibenden Bindern soll durch das im Vorfeld aufgetragene ölabbauende Mikroorganismenkonsortium der mikrobielle Ölabbau angeregt werden. Die Migration der auf den Bindern vorliegenden Mikroorganismen in die Wasserphase mit anschließendem Abbau der dort verbliebenen, nicht absorbierten Ölreste wäre wünschenswert. Der Einsatz ostseeeigener Mikroorganismen ist erstrebenswert, da nichtindigene Spezies in der Lage sind, Veränderungen in der Struktur und der Dynamik des Ökosystems Ostsee hervorzurufen, sei es zum Beispiel als Nahrungskonkurrenten oder durch das Initialisieren von Veränderungen der Nährstoffflüsse in und aus dem Sediment.<sup>[36]</sup>

### 1.3 Ölanalytik

Es gibt Mutmaßungen darüber, dass es sich bei Erdöl um das komplexeste organische Gemisch handelt, das aktuell bekannt ist.<sup>[37]</sup> Basierend auf der Annahme, dass die Anzahl der Gene im menschlichen Genom geringer ist als die Zahl der Verbindungen im Erdöl, wurde im Bereich der erdölcharakterisierenden Analysetechniken der Begriff „petroleomics“ geprägt.<sup>[37]</sup> Überraschenderweise bewegen sich die Variationen der elementaren Ölzusammensetzung in einem eher enggefassten Rahmen. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente ist in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Übersicht der elementaren Ölzusammensetzung.<sup>[31]</sup>

Element	Vorkommen
C	83 % - 87 %
H	10 % - 14 %
N	0,1 % - 2 %
O	0,05 % - 1,5 %
S	0,05 % - 6 %
Metalle (Ni, V)	< 1000 ppm

Im Gegensatz zu der molekularen Zusammensetzung ist die prozentuale Verteilung der elementaren Bestandteile im Wesentlichen unabhängig von der Ölquelle und den Prozessschritten während der Raffinierung.<sup>[31]</sup> Eine Klassifizierung einzelner Erdöle anhand des Kohlenstoffgehaltes ist daher nicht möglich.<sup>[31]</sup> Die molekulare Zusammensetzung des Öls kann im Wesentlichen in drei Verbindungsklassen eingeteilt werden: (1) gesättigte Kohlenwasserstoffe, (2) aromatische Kohlenwasserstoffe, (3) Verbindungen, die Heteroatome (N, O, S, Metalle) enthalten.<sup>[31]</sup> Jede dieser Gruppen lässt sich in weitere Untergruppen unterteilen.<sup>[31]</sup>

Die molekulare Komplexität von Erdöl als Untersuchungsmatrix stellt eine immerwährende Herausforderung für den Bereich der Analytik dar und fungiert so als Inspiration für die Weiter- und Neuentwicklung von Analysentechniken.<sup>[38]</sup> In Abhängigkeit von der ursprünglichen Ölquelle und/oder den detaillierten Prozessschritten während der Raffinierung variieren die verschiedenen Erdöle und Erdölprodukte hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung.<sup>[39]</sup> Erweitert wird diese Komplexität im Falle einer Ölavarie durch Alterungsprozesse, wie zum Beispiel Verdampfung, Lösung, Bildung einer Öl-Wasser-Emulsion, photochemische Oxidation, mikrobieller Abbau oder auch Adsorption.<sup>[40]</sup> Bei einer Zusammensetzung aus geschätzten 100.000 Verbindungen existiert zum heutigen Zeitpunkt keine Analysentechnik, mit der es möglich ist, all diese Verbindungen aufzulösen, zu identifizieren und zu quantifizieren.<sup>[37]</sup>

Lediglich zum Teil definierte Teilmengen der Verbindungen aus der Matrix Erdöl können analysiert werden.<sup>[41]</sup> Zur Auf trennung des Erdöls in einzelne Fraktionen wird eine Vielzahl von Adsorbermaterialien und Eluenten genutzt.<sup>[40,42,43]</sup> Häufige Verwendung finden Silikagel und Aluminiumoxid als Adsorber sowie organische Lösungsmittel als Eluenten.<sup>[40,44]</sup> Für die Art der Fraktionierung gibt es verschiedene, definierte Muster, zum Beispiel die Einteilung nach SARA (saturated, aromatics, resins, asphaltenes – gesättigte Kohlenwasserstoffe, Aromaten, Harze, Asphaltenen).<sup>[45,46]</sup> Die durch Auf trennung erhaltenen Teilmengen des Erdöls können mittels verschiedener Analysentechniken untersucht werden. Da oftmals bestimmte Eigenschaften auf ganze chemische Gruppierungen und nicht nur auf einzelne Moleküle im Erdöl zutreffen, eignen sich chromatografische Verfahren in besonderem Maße.<sup>[39]</sup> Dazu zählen zum Beispiel die Gaschromatografie, die Flüssigchromatografie, die superkritische Flüssigchromatografie, die Dünnschichtchromatografie oder die Größenausschlusschromatografie.<sup>[47-50]</sup> Neben den chromatografischen Verfahren werden auch diverse andere Analysenmethoden angewendet, beispielsweise die Infrarotspektroskopie, die Gravimetrie, die Ultravio-

leitpektroskopie, die Fluoreszenzspektroskopie, die Massenspektrometrie sowie die Kernspinresonanzspektroskopie.<sup>[40,45,51-54]</sup> Durch die Kopplung verschiedener Systeme kann die Zahl der auflösbaren Verbindungen erweitert werden.<sup>[55,56]</sup> Die höchste Auflösung wird derzeit mit der Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie erreicht.<sup>[37]</sup> Bei dieser Analysenmethode ist die zu erfassende Verbindungsklasse von der eingesetzten Ionisierungsmethode abhängig.<sup>[37,38]</sup>

Bei der Analyse von Erdölkomponenten kann generell eine Unterteilung in nicht-spezifische und zielanalytenorientierte Analysen erfolgen.<sup>[40]</sup> Zu den nicht-spezifischen Methoden zählen zum Beispiel die Gravimetrie oder die Infrarotspektroskopie, während die chromatografischen Analysenmethoden in der Regel auf die Bestimmung von Zielanalyten ausgerichtet sind.<sup>[40]</sup> Welches analytische Verfahren angewendet wird, hängt von der im Vorfeld formulierten Fragestellung ab. Soll beispielsweise die Quelle eines Öleintrages identifiziert werden, eignen sich dazu die sogenannten „fingerprint“-Techniken.<sup>[57,58]</sup> Hierbei liegt der Fokus auf dem Erkennen von Mustern durch relative Anteile von Schlüsselverbindungen, der Bestimmung von Verhältnissen ausgewählter Verbindungen sowie der Identifizierung von quellenspezifischen Markersubstanzen.<sup>[57,58]</sup> Eine andere Herangehensweise erfordert zum Beispiel die qualitative, molekülspezifische Identifikation einer ausgewählten Verbindungsklasse (Zielanalyten) oder die quantitative Bestimmung definierter Ölabbauprodukte.<sup>[51,59]</sup> Hinsichtlich der Zielanalyten wurden in den vergangenen Jahren Empfehlungen ausgesprochen, die vor allem die Analyse der *n*-Alkane und der PAK beinhalten.<sup>[40,60]</sup> Die Bestimmung der *n*-Alkane mit einer Kettenlänge von *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> liefert aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich der potentiellen mikrobiellen Ölabbauaktivitäten.<sup>[40]</sup> Die isoprenoiden Verbindungen Pristan und Phytan werden dabei oft als Biomarker zum Nachweis des mikrobiellen Ölabbaus eingesetzt.<sup>[12,40]</sup> Die Siedepunkte dieser Verbindungen ähneln denen der *n*-Alkane *n*-C<sub>17</sub> und *n*-C<sub>18</sub>, jedoch erfolgt der Abbau von Pristan und Phytan im Öl durch Mikroorganismen deutlich langsamer.<sup>[40]</sup> Werden nun die Verhältnisse der detektierten Konzentrationen von *n*-C<sub>17</sub> und Pristan beziehungsweise von *n*-C<sub>18</sub> und Phytan gebildet, ist es möglich, Hinweise auf das Ausmaß des mikrobiellen Abbaus der *n*-Alkane zu erhalten.<sup>[12,40,61]</sup> Die Umweltbehörde der USA (United States Environmental Protection Agency – U.S. EPA) definierte in den 1970-er Jahren 16 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als „besonders besorgniserregende Stoffe“.<sup>[62]</sup> PAK gelten als karzinogen, mutagen und teratogen und sind daher, aber auch auf Grund ihrer Persistenz und der ubiquitären Verbreitung von bedeutender Relevanz als Schadstoffe in der Umwelt.<sup>[63-66]</sup>

## 1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des vorgestellten Verbundprojektes BioBind durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der Charakterisierung neuartiger Ölbinder aus biolo-

gisch abbaubaren Materialien sowie auf der Auswahl eines aus der südwestlichen Ostsee isolierten Mikroorganismenkonsortiums, das in der Lage ist, Erdöl möglichst effizient abzubauen. Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit den Kollegen vom Institut für Holz- und Papiertechnik der Technischen Universität (TU) Dresden und dem Institut für Biologie der Universität Leipzig. Die Ölbinder stellen in ihrer Zusammensetzung und Verarbeitung ein neuartiges Bindemittel dar, dessen Eigenschaften noch nicht umfassend charakterisiert worden sind. Auch die eingesetzten Mikroorganismen wurden bislang weder in Form von Reinkulturen noch als arrangiertes Konsortium bezüglich ihrer ölabbauenden Eigenschaften untersucht.

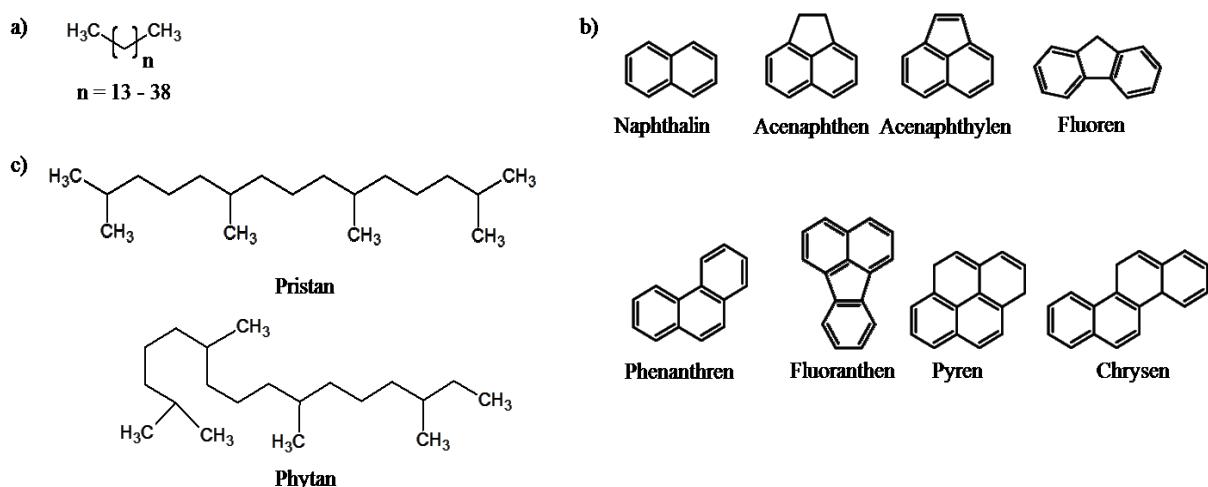
Die Zielsetzung dieser Arbeit wird in drei Schwerpunkte untergliedert. Zum einen sollen die entwickelten Ölbinder als neuartiges Bindemittel charakterisiert werden. Die angestrebte Charakterisierung umfasst dabei sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen hinsichtlich des Ölaufnahme- und -abgabeverhaltens der Binder in einem wässrigen System. In Bezug auf das marine Einsatzgebiet ist es von Interesse, die maximale Ölaufnahmekapazität der Binder bei der Ölaufnahme von einer Wasseroberfläche zu bestimmen. Dabei sollen zudem die Veränderung der Reinigungsleistung mit variierender Binderdosierung sowie die zeitliche Abhängigkeit der Ölaufnahme quantifiziert werden. Mithilfe dieser Daten wird diskutiert, welchen (ökologischen und ökonomischen) Stellenwert die entwickelten Binder im Vergleich mit bereits untersuchten Ölbindematerialien einnehmen. Da es sich sowohl bei der vorliegenden Ölfilmschichtdicke als auch bei der Wassertemperatur um potentielle Einflussfaktoren bezüglich des Ölaufnahmeverhaltens handelt, werden diese beiden Größen ebenfalls untersucht. Neben der Ölaufnahme liegt der Fokus des Weiteren auf der Ölabbgabe. Dabei ist es von besonderem Interesse, zu bestimmen, in welchem Maß die Ölbinder das gebundene Öl als Gesamtmatrix beziehungsweise einzelne Ölbestandteile bei einer mehrtägigen Verweildauer im wässrigen System desorbieren. Auch die zeitliche Abhängigkeit der Desorptionsvorgänge soll quantifiziert werden.

Im Rahmen des zweiten Schwerpunktes der vorliegenden Arbeit wird die Ölabbauleistung isolierter Mikroorganismen untersucht. Dabei sind zunächst das Ölabbauvermögen der einzelnen Reinkulturen sowie potentielle Einflussfaktoren von besonderem Interesse. Die Ölabbauleistung soll sowohl qualitativ bezüglich ihrer zeitlichen Abhängigkeit als auch quantitativ bestimmt werden. Neben dem Öl als Gesamtmatrix werden dabei auch ausgewählte Zielanalyten untersucht, auf deren Auswahl am Ende dieses Abschnittes näher eingegangen wird. Es ist davon auszugehen, dass sowohl die vorliegende Ölkonzentration als auch die Art und Menge der Nährstoffversorgung die Abbauleistung der Mikroorganismen beeinflusst. Diese Hypothese soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Basierend auf den generierten Daten wird diskutiert, inwiefern der Einsatz von Nährstoffen für den mikrobiellen Ölabbau im Freiland sinnvoll beziehungsweise notwendig ist. Neben den Reinkulturen stehen definiert zusammengesetzte Mikroorganismengemeinschaften hinsichtlich ihres Ölabbauvermögens im Fokus. Diesbezüglich gilt es, synergetische beziehungsweise hemmende Effekte,

die durch die Kombination mehrerer Mikroorganismenkulturen auftreten, zu erkennen und zu quantifizieren.

Das abschließende Ziel dieser Arbeit ist sowohl der einzelne als auch der kombinierte Einsatz von Ölbindern und Mikroorganismen unter *in-situ*-Bedingungen. Zunächst sollen dabei die Ab- und Desorptionseigenschaften der Ölbinden und die Ölabbauleistung der Mikroorganismen unter freilandähnlichen Bedingungen qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Anhand der Kombination von Ölbinden und Mikroorganismen soll zum einen überprüft werden, ob und in welchem Maß die Auftragung von Mikroorganismen die Eigenschaften der Ölbinden beeinflusst. Zum anderen ist es von Interesse, das Verhalten der Mikroorganismen auf den Ölbinden zu untersuchen. Neben einer möglichen Migration der Mikroorganismen vom Binder in die Wasserphase stehen dabei der potentielle mikrobielle Ölabbau auf den öbeladenen Bindern sowie dessen zeitliche Abhängigkeit im Fokus der Untersuchungen. Unter *in-situ*-Bedingungen soll zudem überprüft werden, ob und wie das mikrobielle Ökosystem Ostsee nahezu unbeeinflusst auf einen Öleintrag reagiert. Es wird vermutet, dass bereits die natürlich im Ostseewasser vorkommende mikrobielle Gemeinschaft in der Lage ist, ausgetretenes Öl abzubauen. Diese Hypothese soll anhand von Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Um die obigen Problemstellungen zu lösen, wird in den damit verbundenen Untersuchungen zum einen das Öl als Gesamtmatrix betrachtet, zum anderen erfolgt die Quantifizierung von *n*-Alkanen und ausgewählten, erdölspezifischen PAK. Die Bestimmung der isoprenoiden Verbindungen Pristan und Phytan soll bei den Experimenten unter *in-situ*-Bedingungen die Aussagen in Bezug auf den mikrobiellen Ölabbau ergänzen. Bei den genannten Molekülgruppen handelt es sich um klassische Zielverbindungen der Ölanalytik, deren Auswahl eine Diskussion der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext ermöglicht.<sup>[28,67,68]</sup> Die Molekülstrukturen einzelner ausgewählter Zielverbindungen sind exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung von Molekülstrukturen der *n*-Alkane (a), ausgewählter PAK (b) und zwei isoprenoïden Biomarker-substanzen (c).

## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Verwendete Chemikalien

Eine Übersicht der bei der Aufarbeitung und Messung der Proben verwendeten Chemikalien befindet sich mit Angaben zum Reinheitsgrad und zum Hersteller in Abschnitt 5.1. Dort erfolgt ebenfalls eine Auflistung der eingesetzten Standardverbindungen (Zielanalyten und massenmarkierte Verbindungen sowie die als interne Standardverbindungen verwendeten Substanzen). Angaben zur Bezeichnung, Zusammensetzung und Konzentration der zur Quantifizierung verwendeten Standardlösungen sind in Abschnitt 5.2.1 aufgeführt.

### 2.2 Probennahme und -aufarbeitung

Die Probenaufarbeitung im Rahmen der Ölanalytik erfolgte grundsätzlich nach folgendem Schema (siehe Abbildung 4). Eine detaillierte Beschreibung der im Rahmen der verschiedenen Experimente angepassten Probenaufarbeitung ist in den Abschnitten 5.2.2 bis 5.2.4 zu finden.

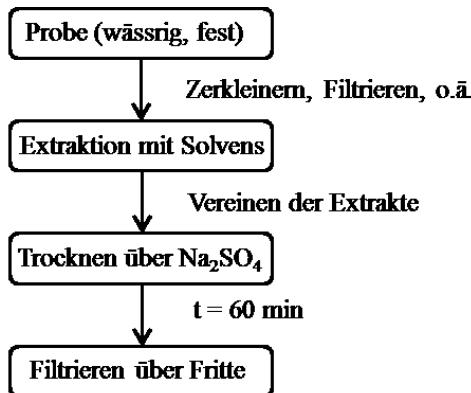


Abbildung 4: Allgemeines Fließschema der Aufarbeitungsmethode, die für jede Probe angewendet wurde.

Für die gravimetrischen Untersuchungen wurde ein definiertes Aliquot des getrockneten Extraktes in ein Probengläschen überführt und bei Raumtemperatur in den Abzug gestellt, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war.

Um die getrockneten Extrakte gaschromatografisch untersuchen zu können, war ein Reinigungsschritt notwendig. Dazu wurde ein Doppelsäulensystem verwendet, bei dem die obere Säule mit 3 g Aluminiumoxid und die untere Säule mit 3 g Kieselgel gefüllt wurde. Sowohl das Aluminiumoxid als auch das Kieselgel wurden zunächst im Ofen ausgeheizt (Aluminiumoxid:  $t = 15 \text{ h}$ ,  $T = 800 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Kieselgel:  $t = 15 \text{ h}$ ,  $T = 400 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und dann direkt vor der Anwendung mit einer definierten Masse deionisiertem Wasser (Aluminiumoxid 15 %, Kieselgel

3,5 %) deaktiviert, um den Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Bindungseigenschaften der Adsorbermaterialien zu minimieren. Die gepackten Säulen wurden zunächst mit je 10 mL Toluol und *n*-Heptan konditioniert, wobei die Säulen nicht trocken ließen. Nach der Aufgabe des Extraktes auf die Säule erfolgte die Elution mit 15 mL *n*-Heptan und 30 mL eines *n*-Heptan-Toluol-Gemisches (2:1). Das Eluat wurde bei 30 °C und 65 mbar am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 1 mL eingeengt. Für die gaschromatografischen Messungen wurde ein adäquates Aliquot entnommen und gegebenenfalls mit *n*-Heptan verdünnt beziehungsweise weiter eingeengt. Auf das vollständige Entfernen des Lösungsmittels wurde bei allen Proben verzichtet.

## 2.3 Messmethode

Die Quantifizierung der Gesamtmatrix Öl erfolgte mittels Gravimetrie. Detaillierte Informationen zur Vorgehensweise befinden sich in Abschnitt 5.3.1.

Im Rahmen der Ölanalytik wurde die Messung beider Zielanalytengruppen mittels Gaschromatografie (GC) durchgeführt, wobei die Detektion der *n*-Alkane am Flammenionisationsdetektor (FID; Thermo Scientific, Trace GC Ultra) erfolgte. Die ausführliche Beschreibung der Messmethode sowie die Angabe der Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen erfolgt in Abschnitt 5.3.2.

Die Detektion der PAK wurde mittels Kopplung eines Gaschromatografen mit einem Massenspektrometer (MS; Thermo Trace GC, Thermo Automass III MS) durchgeführt. Die Beschreibung der Messmethode inklusive der verwendeten Hauptmassen der einzelnen Verbindungen ist in Abschnitt 5.3.3 zu finden.

Die Sauerstoffmessungen erfolgten an einem HydroBios Dosimat 715 der Firma HydroBios Apparatebau GmbH. Detaillierte Informationen zu der durchgeführten Titration sowie zur Titerbestimmung der Maßlösung sind in Abschnitt 5.3.4 zu finden.

Für die Ammonium- und Phosphatmessungen wurde ein Spektralphotometer UV-mini 1240 der Firma Shimadzu Deutschland GmbH verwendet. Die Messungen wurden in einer 5 cm-Küvette bei 630 nm beziehungsweise 885 nm durchgeführt. In Abschnitt 5.3.4 erfolgt die ausführliche Beschreibung der jeweiligen Messmethode.

## 2.4 Qualitätssicherung

Im Rahmen der Qualitätssicherung erfolgte die Ermittlung und Dokumentation verschiedener Qualitätsparameter, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird. Detaillierte Ausführungen dazu sind in Abschnitt 5.4 zu finden.

Um die Qualität einer Aufarbeitungsmethode zu beurteilen, werden die Wiederfindungsraten ermittelt (siehe Abschnitt 5.4.1, Gleichung 1 und 2). Eine Beurteilung der potentiellen Verluste bei der Probenaufarbeitung einer Rohölprobe wurde anhand der Wiederfindungsraten der massenmarkierten Standardsubstanzen durchgeführt. Die ermittelten Wiederfindungsraten liegen für alle untersuchten Verbindungen im Bereich von  $100\% \pm 10\%$  (siehe Abschnitt 5.4.1, Tabelle 30). Die berechneten Werte zeigen, dass weder bei der Reinigung der Probe über dem Doppelsäulensystem noch beim Einengen am Rotationsverdampfer wesentliche Verluste der zu analysierenden Verbindungen auftreten.

Um zu überprüfen, in welchem Bereich Messsignal und Analytenkonzentration bei den eingesetzten Geräten für die Ölanalytik in einem linearen Zusammenhang stehen, wurde jeweils für die *n*-Alkane sowie für die PAK eine 10-Punkt-Kalibrierung von 0,1 mg/L bis 50 mg/L beziehungsweise von 1 µg/L bis 500 µg/L angesetzt und gemessen. Auf jedem Kalibrierniveau wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Um die Gültigkeit des linearen Regressionsmodells zu sichern, wurde der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.2, Gleichung 3).

Für die *n*-Alkane erstreckte sich der statistisch gesicherte lineare Bereich der Messmethode über wenigstens eine Größenordnung. Für den Großteil der Verbindungen konnte ein linearer Zusammenhang von Messsignal und Analytenkonzentration über zwei Größenordnungen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.4.2).

Für die PAK konnte die Linearität der Messmethode in einem Konzentrationsbereich von 1 µg/L bis 200 µg/L beziehungsweise bis 500 µg/L statistisch belegt werden (siehe Abschnitt 5.4.2, Tabelle 31).

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben wurden daher nach Möglichkeit auf ein Konzentrationsniveau innerhalb des statistisch geprüften Bereiches eingestellt.

Ist der Zusammenhang zwischen Messsignal und Analytenkonzentration linear, wird die Analytenkonzentration in der Probe mithilfe der Geradengleichung berechnet (siehe Abschnitt 5.4.3, Gleichung 4).<sup>[69]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden interne massenmarkierte Standards zur Quantifizierung verwendet. Dadurch konnten zum Beispiel Verluste bei der Aufarbeitung oder Volumenfehler bei der Injektion der Probe in das Messgerät korrigiert werden.<sup>[70]</sup> Die Quantifizierung erfolgte mittels 1-Punkt-Kalibrierung. Eine Kalibrierung über den gesamten linearen Konzentrationsbereich erfolgte in regelmäßigen Abständen, um die Voraussetzungen für die Vertretbarkeit der 1-Punkt-Kalibrierung zu überprüfen. Detaillierte Ausführungen zu den Eignungskriterien einer 1-Punkt-Kalibrierung sowie die im Rahmen der Quantifizierung verwendeten Gleichungen sind in Abschnitt 5.4.3 zu finden.

Um die Richtigkeit der Korrektur mithilfe von internen Standards gewährleisten zu können, muss überprüft werden, inwieweit sich native und massenmarkierte Substanzen gleich verhalten. Dazu wurden die sogenannten relativen Wiederfindungsraten bestimmt (siehe Abschnitt 0, Gleichung 8).

Die Werte für die relativen Wiederfindungsraten der *n*-Alkanverbindungen liegen in den durchgeführten Experimenten zwischen 75 % und 110 % (siehe Abschnitt 0, Tabelle 32). Diese berechneten Werte werden als tolerierbar angesehen und können bei der Auswertung der Versuchsdaten berücksichtigt werden.

Die relativen Wiederfindungsraten der PAK sind in Tabelle 33 in Abschnitt 0 aufgeführt. Ein Großteil der Werte liegt im Bereich von  $100\% \pm 10\%$ .

Um das Auftreten von falsch-positiven Messungen bedingt durch Hintergrundkontaminationen zu vermeiden, wurden in allen Versuchsansätzen die Blindwerte ermittelt und gegebenenfalls bei der Berechnung der Messwerte berücksichtigt (siehe Abschnitt 5.4.5).

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze stellen Grenzwerte dar, die den unteren Arbeitsbereich statistisch absichern (siehe Abschnitt 5.4.6). Sie wurden für jede Messung individuell mit der jeweiligen Gerätesoftware berechnet und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt.

## 2.5 Datenvorbehandlung

Alle verwendeten Datensätze wurden zunächst mit dem David-Test auf Normalverteilung geprüft (siehe Abschnitt 5.5, Gleichung 10).

Bei Bedarf wurden auf die Daten verschiedene statistische Testverfahren angewendet, um die Qualität der Daten auf einem definierten statistischen Niveau abzusichern oder Interpretationsansätze statistisch zu überprüfen. Dabei wurden unter anderem der Grubbs-Test, der Neumann-Test, der t-Test und der F-Test durchgeführt. Die dabei verwendeten Formeln sowie eine vollständige Übersicht der durchgeführten Test- und Analyseverfahren sind mit den entsprechenden Literaturverweisen in Abschnitt 5.5 aufgeführt.

## 2.6 Charakterisierung des verwendeten Öls

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente durchgeführt, bei denen Rohöl eingesetzt wurde (Handelsname: ROHÖL REB 1). In Tabelle 2 sind verschiedene Parameter zur Charakterisierung des verwendeten Rohöls aufgeführt. Die Parameter, die mit „a“ gekennzeichnet sind, entstammen dem dazugehörigen Sicherheitsdatenblatt.<sup>[71]</sup> Die Daten der prozentualen elementaren Zusammensetzung sind mit „b“ gekennzeichnet. Die Elementaranalyse des Rohöls wurde am Leibniz-Institut für Katalyse e.V. an der Universität Rostock durchgeführt. Dazu wurde ein Leco CHNS-932 Elemental oder ein Carlo Erba Elemental EA 1108 Analysengerät verwendet.

**Tabelle 2:** Charakterisierende Parameter des eingesetzten Rohöls. Die mit „a“ gekennzeichneten Parameter entstammen dem zugehörigen Sicherheitsdatenblatt.<sup>[71]</sup> Bei den mit „b“ gekennzeichneten Parametern handelt es sich um die Ergebnisse der Elementaranalyse.

Kurzname <sup>a</sup>	Russian Export Blend (REB)
Stockpunkt <sup>a</sup>	< -15 °C
Siedebereich <sup>a</sup>	< 30 °C - ca. 100 °C
Flammpunkt <sup>a</sup>	-20 °C
Zündtemperatur <sup>a</sup>	> 250 °C
Dampfdruck (bei 50 °C) <sup>a</sup>	ca. 70 kPa
Dichte (bei 15 °C) <sup>a</sup>	800 kg/m <sup>3</sup> - 900 kg/m <sup>3</sup>
kinematische Viskosität (bei 20 °C) <sup>a</sup>	> 4 cSt
Kohlenstoffgehalt <sup>b</sup>	86,15 %
Wasserstoffgehalt <sup>b</sup>	12,21 %
Stickstoffgehalt <sup>b</sup>	0,43 %
Schwefelgehalt <sup>b</sup>	1,00 %

Darüber hinaus wurden drei Ölproben aufgearbeitet und in Bezug auf die *n*-Alkan- und PAK-Zusammensetzung analysiert. Detaillierte Informationen zur Aufarbeitung sowie die ermittelten Konzentrationsangaben der untersuchten Zielanalyten sind in Abschnitt 5.6.1 aufgeführt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Charakterisierung der Eigenschaften der Ölbinder

Im Rahmen der Charakterisierung der Bindereigenschaften wurden sowohl das Ölaufnahme- als auch das Ölabgabeverhalten der Ölbinder in einem wässrigen System untersucht. Das Ziel war es dabei, sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die Bindereigenschaften zu ermitteln. In Laborexperimenten wurden dazu die maximale Reinigungsleistung, die zeitliche Abhängigkeit der Ölaufnahme, die Ölaufnahmekapazität sowie der Einfluss von Binderdosierung und Ölfilmschichtdicke in einem Öl-/Wassersystem untersucht. Abschließend erfolgte die Diskussion der ermittelten Ergebnisse und deren Einordnung in den wissenschaftlichen Hintergrund.

Bei dem im Projekt BioBind von den Partnern der TU Dresden entwickelten Ölbinder handelt es sich um Pinienholzfasern, die zu quadratischen Blöcken mit einer Kantenlänge  $a$  von 50 mm und einer Höhe  $h$  von 4 mm gepresst wurden (siehe Abbildung 5).<sup>[72]</sup> Die Dichte der Binder liegt zwischen 250 kg/m<sup>3</sup> und 280 kg/m<sup>3</sup>.<sup>[72]</sup>

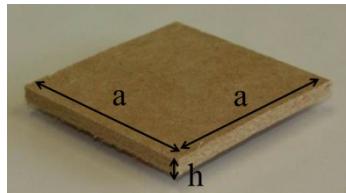


Abbildung 5: Ölbinder auf Pinienholzbasis mit einer Kantenlänge  $a$  von 50 mm und einer Höhe  $h$  von 4 mm.<sup>[72]</sup>

Um die hydrophoben Eigenschaften der Ölbinder zu verstärken, wurden die Holzfasern während der Fertigung mit einem umweltfreundlichen Additiv ( $w \approx 10\%$ ) versetzt.<sup>[72]</sup>

Im Rahmen der Binderentwicklung durch die Projektpartner der TU Dresden wurde die Ölaufnahme von der Wasseroberfläche anhand des Bindergewichtes als Summe der Öl- und Wasseraufnahme ermittelt.<sup>[72]</sup> Zudem wurde in Anlehnung an die Empfehlung durch den Beirat beim Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit („Lagerung und Transport wassergefährdender Stoffe (LTwS)“) die im Wasser verbleibende Ölmasse näherungsweise mittels Phasentrennung im Scheidetrichter bestimmt.<sup>[72,73]</sup>

In den folgenden Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, lag der Fokus auf der Charakterisierung und Quantifizierung der Bindereigenschaften in Bezug auf das marine System. Neben der Ölaufnahme von der Wasseroberfläche wurde dabei auch die potentielle Abgabe des gebundenen Öls in Abhängigkeit von der Verweilzeit des Binders in der Wasserphase bestimmt. Dabei wurden die bekannten Untersuchungsergebnisse maßgeblich erweitert und präzisiert. So erfolgte beispielsweise die vollständige Trennung von

Wasser- und Ölphase mittels mehrmaliger Extraktion (siehe Abschnitt 5.2.2). Darüber hinaus wurden Adsorptionserscheinungen des Öls an der Versuchsgefäßwand quantitativ berücksichtigt (siehe Abschnitt 5.2.2), sodass gewährleistet werden konnte, dass das gesamte im System vorhandene Öl erfasst wurde.

Bei allen Untersuchungen, die der Charakterisierung der Ölbinder dienten, wurde das Hauptaugenmerk auf die gravimetrische Analyse gelegt. Darüber hinaus waren *n*-Alkan- und PAK-Analysen aus toxikologischer und umweltrelevanter Sicht interessant (vergleiche Abschnitt 1.3). Die Aufnahme beider Substanzklassen durch die Ölbinder und somit die Entfernung aus dem marinen System ist erstrebenswert. Um die Effektivität der Ölbinder hinsichtlich der *n*-Alkan- und PAK-Aufnahme zu überprüfen und zu quantifizieren, ist die Betrachtung jeder einzelnen Verbindung dieser beiden Substanzklassen nicht notwendig. Der Fokus liegt bei dieser Fragestellung weniger auf einem substanzspezifischen, sondern mehr auf einem substanzklassenspezifischen Aufnahmevermögen. Die Ergebnisse der *n*-Alkan- und PAK-Untersuchungen werden daher jeweils als Summenparameter angegeben. Detaillierte Informationen zur Erstellung dieser Summenparameter liegen in Abschnitt 5.2.2 vor. Die detektierten Massen an Öl, summierten *n*-Alkanen und summierten PAK werden im Rahmen der Ergebnispräsentation auf die ursprünglich eingesetzte Ölmasse beziehungsweise die in dieser Ölmasse nachgewiesenen *n*-Alkan- und PAK-Massen bezogen. So ist es jeweils möglich, den prozentualen Anteil anzugeben, der im Versuchsgefäß zurückgeblieben ist. Die Ergebnisse der Analyse des eingesetzten Öls sind in Abschnitt 5.6.1 aufgeführt.

Da es sich bei den Öbindern um ein Produkt handelt, das im Idealfall zu einem späteren Zeitpunkt seine Anwendung im Freiland findet, wurden bereits die Randbedingungen in den folgenden Experimenten so gewählt, dass sie den Realbedingungen im Freiland möglichst nahe kommen. Gemäß dem VPS-Handbuch liegt bei einem Ölaustritt von 5 t nach 10 Stunden eine Ölfilmschichtdicke von 0,03 mm vor, bei einem ausgetretenen Ölvolume von 50 t beträgt die Ölfilmschichtdicke nach 10 Stunden 0,3 mm.<sup>[11]</sup> Bei diesen Angaben wurde der Einfluss von Wind und Strömung vernachlässigt. Da mit dem System „BioBind“ Ölhavarien in der Größenordnung bis zu 50 t bekämpft werden sollen, wurde in den folgenden Absorptionsexperimenten sowohl mit einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{Öl,1} = 0,03$  mm als auch mit einer Filmdicke von  $d_{Öl,2} = 0,3$  mm gearbeitet.

Im Falle eines Freilandeinsatzes folgt auf die Ölaufnahme durch die Binder deren Bergung und Entsorgung. Durch die Absorption soll das Öl lokal gebunden und eine Ausbreitung und Verteilung im Ökosystem möglichst verhindert werden. Durch die Bergung der Binder ist es im Idealfall möglich, das Öl vollständig aus dem marinen System zu entfernen. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass nicht alle ölbefeuerten Binder geborgen werden (können) und somit Binder im System Ostsee verbleiben. Daher ist es wichtig, herauszufinden, ob und in welchem Maß die Binder das einmal aufgenommene Öl unter natürlicher mechanischer Belastung, wie zum Beispiel Wellengang, wieder abgeben. Da das System „BioBind“ insbesondere in Küsten- und Flachwassergebieten eingesetzt werden soll, wurde im Rahmen des Projektes BioBind eine Zeitspanne von 20 Tagen als Minimalwert für die Schwimmfähigkeit

der Binder formuliert. Es wurde davon ausgegangen, dass innerhalb dieses Zeitrahmens die Binder entweder seeseitig geborgen wurden oder die Küste erreicht haben und an Land gespült worden sind. Basierend auf dieser projektintern getroffenen Vereinbarung wurden die Desorptionseigenschaften der Ölbinder im Rahmen dieser Arbeit in Zeitreihenversuchen bis zu 20 Tagen untersucht.

Zur Berechnung der Binderbelegung  $b$  wurde der Quotient aus Binderoberfläche und Wasseroberfläche gebildet, wobei beide Größen in  $\text{m}^2$  angegeben werden. Als Wert für die Binderoberfläche wurde dabei in vereinfachter Form lediglich einmal die Fläche  $a^2$  (siehe Abbildung 5) eingesetzt.<sup>[72]</sup>

Hinsichtlich der Temperatur wurde im Labor bei Raumtemperatur gearbeitet. Der Einfluss der Umgebungstemperatur wurde zu einem späteren Zeitpunkt in den Experimenten unter *in-situ*-Bedingungen (siehe Abschnitt 3.3) untersucht.

### **3.1.1 Untersuchungen zu den absorbierenden Eigenschaften**

Nimmt der Ölbinder Rohöl auf, adsorbiert das Öl an den Binderfasern. Da das Öl dabei den Binder jedoch nicht nur von außen benetzt, sondern auch in den Binder eindringt und an den innen liegenden Binderfasern adsorbiert, wird die Ölaufnahme im Folgenden als Absorption bezeichnet.

#### **Experiment mit einer Binderbelegung von $b = 0,4$**

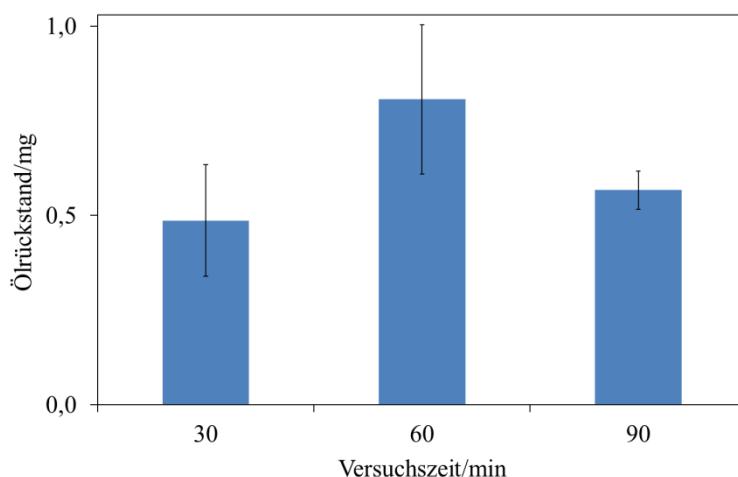
Im ersten Experiment zur Untersuchung der Absorptionsleistung der Ölbinder wurde zunächst jeweils mit einer Binderbelegung von  $b = 0,4$  und einer Ölmasse von 2 g ( $d_{\text{Öl}} = 0,3 \text{ mm}$ ) gearbeitet. Um die angegebene Binderbelegung zu erreichen, wurden die Ölbinder zunächst auf eine Kantenlänge von  $a = 25 \text{ mm}$  zugeschnitten. Von diesen zugeschnittenen Bindern wurden jeweils fünf Stück pro Versuchsgefäß verwendet. Die Versuchsgefäße wurden auf einer Schüttelplatte bewegt, sodass eine gleichmäßige Überspülung der Binder mit Wasser und Öl stattfand. Die Reinigungsleistung durch die Ölbinder wurde nach 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten (jeweils  $n = 3$ ) untersucht. Dazu wurde zum einen die in der Wasserphase verbliebene Ölmasse ermittelt (alle Proben). Zum anderen wurde das an der Becherglaswand adsorbierte Öl mit Lösungsmittel aufgenommen und analysiert (je ein Versuchsgefäß pro Versuchszeit). Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der gravimetrischen Messung diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen der *n*-Alkan- und PAK-Analysen.

Auf den in Abbildung 6 dargestellten Aufnahmen ist zu sehen, dass die Wasserphase optisch bereits 30 Minuten nach der Binderzugabe komplett vom Öl befreit war. Vereinzelte Ölspuren sowie einige Binderfasern adsorbierten an der Becherglaswand. Die Extrakte der Wasserphase waren farblos, während die Spülösungen der Bechergläser eine leicht gelblich-braune Verfärbung zeigten.



**Abbildung 6:** Versuchsgefäß mit Wasser und Rohöl vor (links), unmittelbar nach (Mitte) und 30 Minuten nach (rechts) der Binderzugabe. Die Binderbelegung betrug 0,4. Es wurden 2 g Öl eingesetzt, sodass sich ein Ölfilm der Dicke  $d_{\text{Öl}} = 0,3 \text{ mm}$  ergab.

Die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung der in der Wasserphase vorhandenen Ölmasse sind in Abbildung 7 dargestellt und bestätigten die optische Bewertung.



**Abbildung 7:** Darstellung des gravimetrisch bestimmten Ölrückstandes in mg in der Wasserphase 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten nach der Binderzugabe ( $n = 3$ ).

Im Rahmen der untersuchten Versuchszeiten (30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten) schwanken die in Abbildung 7 dargestellten Ergebnisse zwischen  $0,5 \text{ mg} \pm 0,15 \text{ mg}$  (30 Minuten) und  $0,8 \text{ mg} \pm 0,2 \text{ mg}$  Öl (60 Minuten). Die Schwankung der Ergebnisse liegt im Fehlerbereich der Messwerte. Mittels Signifikanzprüfung wurde getestet, ob sich die drei Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden. Dazu wurde die Homogenität der Varianzen zwischen den Werten und innerhalb der Werte mittels F-Test überprüft (siehe Abschnitt 5.5). Es konnte mit einer statistischen Sicherheit von 99 % gezeigt werden, dass sich die Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Demnach führte eine Verlängerung der Versuchslaufzeit von 30 Minuten auf 90 Minuten nicht zu einer Steigerung der Ölaufnahme, da diese anscheinend bereits nach 30 Minuten abgeschlossen war. Basierend auf diesem Ergebnis konnte der Mittelwert über die drei Versuchszeiten gebildet werden. Der mittlere Wert für den Ölrück-

stand in der Wasserphase beträgt somit  $0,6 \text{ mg} \pm 0,2 \text{ mg}$ . Das entspricht weniger als 0,05 % der ursprünglich zugegebenen Ölmasse.

Die an der Becherglaswand adsorbierte Ölmasse liegt zwischen 3 mg (90 Minuten) und 8 mg (60 Minuten) und beträgt im Mittel  $6 \text{ mg} \pm 3 \text{ mg}$ . Dieser mittlere Wert repräsentiert 0,3 % der ursprünglich eingesetzten Ölmasse von 2 g. Die Wandung der Probengefäße stellt eine Begrenzung dar, die in dieser Form unter Freilandbedingungen nicht existieren würde. Dadurch dass an dieser Begrenzung Öl adsorbiert, wirkt sie in diesem Laborexperiment in Bezug auf die eingesetzten Ölbinder als unnatürlicher Konkurrent. Die oben genannten Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass lediglich ein sehr geringer Teil der anfangs zugefügten Ölmasse an der Becherglaswand adsorbiert. Das heißt, dass die Binder in der Lage sind, den Großteil des Öls aufzunehmen, bevor es an der Glaswand adsorbieren kann. Da auch im Freiland das Auftreten von Adsorptionserscheinungen, zum Beispiel an Treibholz, nicht ausgeschlossen werden kann, stellt dieses Ergebnis eine wichtige Erkenntnis hinsichtlich des Verhaltens und der Eigenschaften der Binder dar.

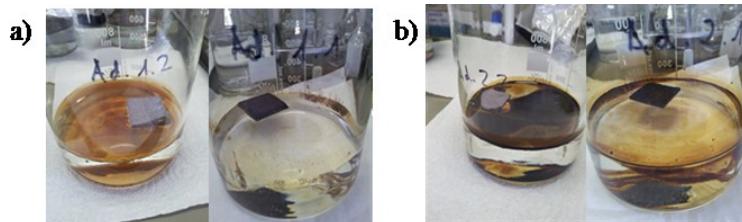
In keinem Ansatz der drei Versuchszeiten konnten in der Wasserphase *n*-Alkane nachgewiesen werden ( $x_{\text{NG}} = 700 \text{ ng}$  absolut). In den Spülösungen der Becherglaswände konnte eine summierte *n*-Alkanmasse von  $0,42 \text{ mg} \pm 0,18 \text{ mg}$  (0,5 %) quantifiziert werden.

Andere Ergebnisse lieferte die PAK-Analyse. In den Extrakten der Wasserphase konnte eine summierte PAK-Masse von  $25,7 \mu\text{g} \pm 2,7 \mu\text{g}$  quantifiziert werden. Dabei wurden basierend auf den Ergebnissen der gravimetrischen Untersuchungen die Messwerte aus den Proben der drei Versuchszeiten zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die angegebene mittlere PAK-Masse in der Wasserphase entspricht  $0,4 \% \pm 0,05 \%$ . In den Ölrückständen, die an der Wand der Probengefäße adsorbiert hatten, konnte etwa dieselbe PAK-Masse detektiert werden ( $20,9 \mu\text{g} \pm 10,2 \mu\text{g}$ ,  $0,35 \% \pm 0,17 \%$ ). Werden die quantifizierten PAK-Rückstände aus der Wasserphase und von der Becherglaswand, zeigt sich, dass lediglich 0,8 % der PAK nicht von den Bindern aufgenommen worden und im Probengefäß verblieben sind.

### **Experiment mit einer Binderbelegung von $b = 0,1$**

Im zweiten Experiment zur Untersuchung der Absorptionsleistung der Ölbinder wurde jeweils mit einer Binderbelegung von  $b = 0,1$  gearbeitet. Um die angegebene Binderbelegung zu erreichen, wurden die Ölbinder zunächst auf eine Kantenlänge von  $a = 28 \text{ mm}$  zugeschnitten. Von diesen Binderstücken wurde jeweils eins pro Versuchsgefäß verwendet. In zwei Ansätzen mit je zwei Parallelproben wurden jeweils 0,2 g beziehungsweise 2 g Öl zugefügt. Die eingesetzte Ölmasse führte in den verwendeten Probengefäßen zu einer Ölfimschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  beziehungsweise  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$ . Die Reinigungsleistung durch die Ölbinder wurde nach 60 Minuten bestimmt. Dazu wurde der insgesamt im Probengefäß verbliebene Ölrückstand analysiert. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der gravimetrischen Messung diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen der *n*-Alkan- und PAK-Analysen.

Auf den in Abbildung 8 dargestellten Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Wasseroberfläche bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  nach 60 Minuten nahezu ölfrei war. Bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  verblieb ein sichtbarer Ölrückstand auf der Wasseroberfläche und an der Becherglaswand.



**Abbildung 8:** Probengefäße mit Wasser und Rohöl direkt nach der Binderzugabe (jeweils links) und nach einer Stunde Versuchslaufzeit (jeweils rechts). Die Binderbelegung betrug 0,1. Es wurden 0,2 g (a) beziehungsweise 2 g Öl (b) eingesetzt, sodass sich ein Ölfilm der Dicke  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  (a) beziehungsweise  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  (b) ergab.

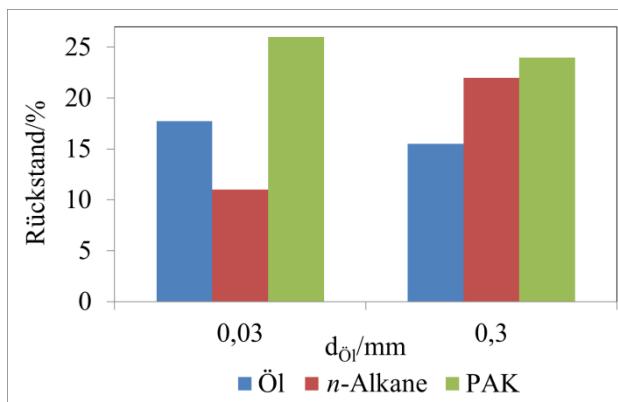
Die Ergebnisse der gravimetrischen Analyse bestätigten die optische Bewertung der Versuchsansätze. Leider konnten bei der Auswertung der Ergebnisse aufgrund von Fehlern bei der Probenaufarbeitung lediglich Einzelproben verwendet werden. Bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  verblieben 35,5 mg Öl im Probengefäß und wurden demnach nicht von den Bindern aufgenommen. Der bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  in der Wasserphase und an der Probengefäßwand verbliebene Ölrückstand betrug 310 mg. Bei einer zehnfachen Ölfilmschichtdicke konnte demnach nach der Ölaufnahme durch die Binder eine ebenfalls um den Faktor zehn größere Ölmasse im Versuchsgefäß nachgewiesen werden. Unabhängig von der vorliegenden Ölfilmschichtdicke verblieb bei einer Binderbelegung von  $b = 0,1$  ein Anteil von etwa 17 % der ursprünglich eingesetzten Ölmasse im Probengefäß (18 % bei  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$ , 16 % bei  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$ ). Dieses Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Reinigungsleistung der Binder beträgt demnach unter den gegebenen Bedingungen im Mittel 83 %.

Bei einer vorliegenden Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  verblieb 1 mg der untersuchten *n*-Alkanverbindungen im Probengefäß und wurde nicht von den Bindern aufgenommen. Das entspricht etwa 11 % (siehe Abbildung 9). Bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  konnten 19 mg (22 %, siehe Abbildung 9) der summierten *n*-Alkane in den Extrakten aus den Versuchsgefäßen nachgewiesen werden.

Bei einer vorliegenden Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  verblieben 0,15 mg der untersuchten PAK-Verbindungen im Probengefäß und wurden nicht von den Bindern aufgenommen. Das entspricht etwa 26 % (siehe Abbildung 9). Bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  konnten 1,38 mg (24 %, siehe Abbildung 9) der summierten PAK in den Extrakten aus den Versuchsgefäßen nachgewiesen werden.

In Abbildung 9 erfolgt die vergleichende Darstellung der prozentual im Probengefäß verbliebenen Rückstände an Öl, summierten *n*-Alkanen und summierten PAK. Der Ölrück-

stand wurde dabei mittels Gravimetrie bestimmt, die Analyse der *n*-Alkane und PAK erfolgte gaschromatografisch (siehe Abschnitt 5.3).



**Abbildung 9:** Prozentualer Rückstand an Öl, summierten *n*-Alkanen und summierten PAK im jeweiligen Probengefäß bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  und  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  ( $n = 1$ ). Der Ölrückstand wurde dabei mittels Gravimetrie bestimmt, die Analyse der *n*-Alkane und PAK erfolgte gaschromatografisch.

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die Absorptionseigenschaften der Ölbinder anscheinend sowohl bezogen auf das Öl als Gesamtmatrix als auch in Bezug auf die PAK unabhängig von der eingesetzten Ölmasse sind. Die im Probengefäß verbliebenen Rückstände an Öl und PAK sind jeweils vergleichbar. Die Differenz zwischen den Werten für die beiden Versuchsansätze beträgt jeweils lediglich zwei Prozentpunkte. Wird davon ausgegangen, dass die genannten Differenzen zufällig und nicht auf das Absorptionsverhalten der Binder zurückzuführen sind, kann für die Ölwerke ein Fehlerbereich von  $\pm 8\%$  und für die PAK-Werte ein Fehlerbereich von  $\pm 6\%$  berechnet werden. Diese Werte sind als Fehlerbereich durchaus realistisch. Die Differenz der prozentualen *n*-Alkanrückstände im Versuchsgefäß beträgt für die beiden Versuchsansätze 11 Prozentpunkte. Das würde einem Fehlerbereich von  $\pm 47\%$  entsprechen. Dieser Wert deutet darauf hin, dass die Differenz zwischen den in Abbildung 9 dargestellten prozentualen *n*-Alkanrückständen nicht zufällig ist, sondern die *n*-Alkanaufnahme durch die Ölbinder bei geringerer Ölfilmschichtdicke effektiver zu sein scheint. Da jedoch lediglich Einzelproben ausgewertet werden konnten, sind die dargestellten Ergebnisse nur in Maßen belastbar. Um die formulierte These hinsichtlich der ölfilmabhängigen *n*-Alkanaufnahme zu überprüfen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

## Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich der Experimente zur Charakterisierung des Absorptionsverhaltens der Ölbinder zeigt sehr deutlich, dass eine Reduzierung der Binderbelegung auf ein Viertel (von  $b = 0,4$  auf  $b = 0,1$ ) in einer deutlich geringeren Reinigungsleistung resultierte. Bei einer Binderbelegung von  $b = 0,4$  waren die Binder innerhalb von 30 Minuten in der Lage, 99 % des auf der Wasseroberfläche eingesetzten Öls aufzunehmen. Das entsprach einer Ölaufnahmekapazität von 0,6 g Öl/g Binder. Auch *n*-Alkane und ausgewählte PAK wurden in derselben Größenordnung von den Bindern aufgenommen und waren lediglich in Spuren im Versuchsgefäß nachweis-

bar. Eine Verlängerung der Verweilzeit der Binder im Probengefäß von 30 Minuten auf 90 Minuten führte zu keiner Steigerung der Aufnahmekapazität. Es ist davon auszugehen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen die maximale Reinigungsleistung der Binder erreicht wurde. Bei einer Binderbelegung von  $b = 0,1$  nahmen die Binder unabhängig von der untersuchten Ölfilmschichtdicke ( $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$ ,  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$ ) innerhalb von 60 Minuten etwa 83 % des eingesetzten Öls und 75 % der darin vorhandenen PAK auf. Es konnte eine Ölaufnahmekapazität von 0,2 g Öl/g Binder beziehungsweise von 2,2 g Öl/g Binder berechnet werden. Die Reinigungsleistung hinsichtlich der *n*-Alkane betrug 89 % bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  und 78 % bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$ . In Orientierungsexperimenten an der TU Dresden wurde bei einer Binderbelegung von  $b = 0,1$  eine Reinigungsleistung von 80 % bezogen auf die Gesamtmatrix Öl ermittelt.<sup>[72]</sup> Bei niedrigeren Binderbelegungen ( $b = 0,03$  und  $b = 0,06$ ) schwankten die Werte für die prozentuale Ölaufnahme je nach Ölfilmschichtdicke zwischen 35 % und 70 %.<sup>[72]</sup> Durch eine Erhöhung der Binderbelegung kann somit die Reinigungsleistung der Binder gesteigert werden, bis bei einer Belegung von  $b = 0,4$  der Maximalwert (unter den gegebenen Bedingungen) erreicht wird. Im Rahmen des Verbundprojektes BioBind gaben sowohl der Arbeitsbereich „Binderausbringung“ als auch die Komponente „Binderbergung“ eine maximal mögliche Binderzahl vor, die pro Überflug ausgebracht beziehungsweise pro Bergungsfahrt mit dem Netz eingeholt werden kann.<sup>[74,75]</sup> Um möglichst allen Anforderungen im Rahmen des Projektes gerecht zu werden, wurde eine Binderbelegung von  $b = 0,1$  festgelegt, die als zufriedenstellender Kompromiss angesehen wurde.<sup>[72]</sup>

Interessant bei der Betrachtung der Absorptionseigenschaften ist der Einfluss der Ölfilmschichtdicke auf die Ölaufnahmekapazität der Binder. Von den Projektpartnern der TU Dresden wurde mittels Binderzugabe in ein mit Öl gefülltes Versuchsgefäß eine maximale Ölaufnahmekapazität von rund 680 kg Öl/m<sup>3</sup> Binder ermittelt.<sup>[72]</sup> Das entspricht etwa 2,7 g Öl/g Binder. Im wässrigen System nahmen die Binder bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl},1} = 0,03 \text{ mm}$  lediglich 0,2 g Öl/g Binder auf. Bei einem Ölfilm der Dicke  $d_{\text{Öl},2} = 0,3 \text{ mm}$  war die Aufnahmekapazität mit 2,2 g Öl/g Binder etwa zehnmal so hoch. In beiden Versuchsanlässen betrug die Reinigungsleistung etwa 83 %, das heißt, es standen noch jeweils 17 % des zugegebenen Öls zur Aufnahme durch die Binder zur Verfügung. Bei der maximalen Ölaufnahmekapazität der Binder von der Wasseroberfläche handelt es sich demnach nicht um eine unabhängige Größe, sondern es besteht eine direkte Abhängigkeit zu der auf der Wasseroberfläche vorliegenden Ölfilmschichtdicke. Dabei konnte ein direkt proportionaler Zusammenhang beobachtet werden. Eine Reduzierung der Ölaufnahmekapazität durch eine zeitgleich stattfindende Wasseraufnahme bei geringeren Ölfilmschichtdicken kann ausgeschlossen werden, da bei der Binderproduktion ein Hydrophobierungsmittel auf die Fasern aufgebracht wird, das die Wasseraufnahme nahezu vollständig verhindert. Es ist davon auszugehen, dass auch im wässrigen System bei einer Ölfilmschichtdicke von  $d_{\text{Öl}} \approx 0,4 \text{ mm}$  die maximale Ölaufnahmekapazität von 2,7 g Öl/g Binder erreicht werden kann.

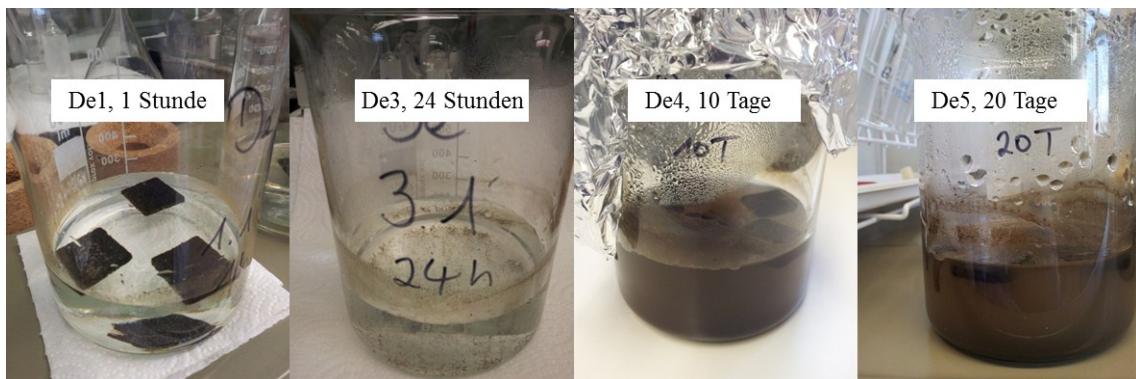
Um die Bindereigenschaften bewerten zu können, ist ein Vergleich mit bereits charakterisierten Sorbenzien sinnvoll. Kommerziell werden in der Regel synthetische Sorbenzien aus Polypropylen oder Polyurethan genutzt, da diese Materialien eine geringe Dichte, eine geringe Wasseraufnahme und eine hohe Stabilität gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen zeigen.<sup>[76,77]</sup> Die Ölaufnahmekapazität dieser Materialien liegt zwischen 5 g Öl/g Sorbens und 30 g Öl/g Sorbens.<sup>[76-80]</sup> Der Nachteil dieser Materialien ist ihr Belastungspotential für die Umwelt, wenn sie nicht vollständig aus dem System entfernt werden (können). Die prinzipielle Idee, natürliche Materialien zur Ölaufnahme in der marinen Umwelt einzusetzen, wurde bereits in den 1970-er Jahren formuliert.<sup>[80]</sup> Dabei lag die ermittelte Ölaufnahmekapazität von Baumwolle (in Form loser Fasern) mit 40 g Öl/g Faser über der von Polypropylen.<sup>[80]</sup> Im Laufe der Jahre kristallisierten sich zwei Gruppen von natürlichen Materialien als potentielle Ölsorbenzien heraus: anorganische mineralische (Zeolite, hydrophobe Silikat-Aerogele, Geopolymere, organophile Tone, Grafit) und organische pflanzliche Produkte (Seidenfasern, Torf, Moos, Kapok).<sup>[81]</sup> Während viele pflanzliche Sorptionsmaterialien weniger wettbewerbsfähige Ergebnisse hinsichtlich der Ölaufnahmekapazität liefern, gibt es durchaus auch ernsthafte Konkurrenten für die synthetischen Produkte.<sup>[78-80,82-84]</sup> Dabei sticht die hohe Ölaufnahmekapazität von Seidenfasern mit 80 g Öl/g Faser deutlich hervor.<sup>[82]</sup> Vergleichbare Werte konnten für Blähgraphit als Vertreter der mineralischen Sorptionsmaterialien ermittelt werden.<sup>[85]</sup> Während es sich bei Blähgraphit lediglich um das natürlich vorkommende Mineral und darin eingelagerte Schwefelsäure handelt, sind die synthetisierten CF<sub>3</sub>-funktionalisierten Silikat-Aerogele nur noch im Ursprung mineralischer Natur. Durch den Einbau funktionaler Gruppen erhöht sich die Ölaufnahmekapazität von < 0,1 g Öl/g Aerogel auf 14 g Öl/g Aerogel.<sup>[86]</sup> Würde bei der Berechnung der Ölaufnahmekapazität lediglich der funktionale Teil des Aerogels berücksichtigt werden, würde sich der Wert sogar auf bis zu 237 g Öl/g Aerogel erhöhen.<sup>[87]</sup>

Es wurde mehrfach deutlich, dass die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse beispielsweise aufgrund der unterschiedlichen Ölaufnahmebedingungen, Materialmodifikationen (zum Beispiel lose Fasern unterschiedlicher Länge, Matten, Bündel) und Variationen in der Angabe der Versuchsgrößen nur in Maßen gewährleistet ist. Die zitierten Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass die natürlichen, biologisch abbaubaren Materialien in ihrer Tauglichkeit als Ölsorbenzien den synthetischen Produkten keinesfalls untergeordnet sind, sondern zum Teil sogar effektivere Ölaufnahmeeigenschaften aufweisen. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Binder konnte in Abhängigkeit von der Ölfilmschichtdicke eine Ölaufnahmekapazität von bis zu 2,2 g Öl/g Binder im wässrigen System ermittelt werden. Dieser Wert stellt unter Berücksichtigung der Umweltverträglichkeit der entwickelten Ölbinder ein zufriedenstellendes Ergebnis dar.

### 3.1.2 Untersuchungen zu den desorbierenden Eigenschaften

Für das Experiment zur Untersuchung des Desorptionsverhaltens der Ölbinden wurden diese auf eine Kantenlänge von  $a = 28$  mm zugeschnitten. Diese Binderstücke wurden jeweils mit 1,2 g Öl versetzt, sodass die aufgenommene Ölmasse 1,5 g Öl/g Binder betrug. Das Desorptionsverhalten wurde nach 1 Stunde (De1), nach 15 Stunden (De2), nach 24 Stunden (De3), nach 10 Tagen (De4) und nach 20 Tagen (De5) untersucht. In jedem Versuchsansatz wurden drei Parallelproben geführt. In den Versuchsansätzen De1 bis De3 wurden jeweils drei ölgetränkte Binderstücke pro Versuchsgefäß eingesetzt. In den Ansätzen De4 und De5 wurde mit jeweils fünf ölgetränkten Binderstücken pro Versuchsgefäß gearbeitet. Die Probengefäße wurden während der Versuchslaufzeit auf einer Schüttelplatte mit 90 Bewegungen/min bewegt. Nach Beendigung der Versuchslaufzeit wurde sowohl die Wasserphase extrahiert (alle Proben) als auch das an der Becherglaswand adsorbierte Öl mit Lösungsmittel aufgenommen (ein Versuchsgefäß je Ansatz für die Ansätze De1 bis De3, alle Proben für De4 und De5). In den Ansätzen De1 bis De3 erfolgte die Analyse der Extrakte der Wasserphase und der Becherglaswand getrennt voneinander. In den Ansätzen De4 und De5 wurden die Extrakte der Wasserphase und der Becherglaswand vereint. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der gravimetrischen Messung diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen der *n*-Alkan- und PAK-Analysen.

In Abbildung 10 sind Aufnahmen von je einem Versuchsgefäß aus den Ansätzen De1 und De3 bis De5 jeweils am Ende der Versuchslaufzeit abgebildet.

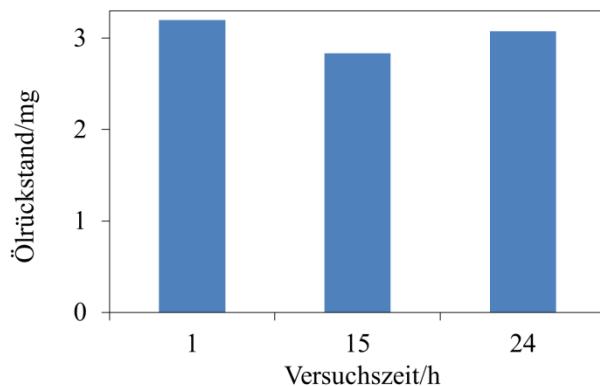


**Abbildung 10:** Desorptionsuntersuchungen mit ölbeladenen Bindern. Fotografische Aufnahmen der Versuchsgläser nach 1 Stunde (De1), 24 Stunden (De3), 10 Tagen (De4) und 20 Tagen (De5; von links nach rechts).

Eine optische Bewertung der in Abbildung 10 dargestellten Aufnahmen zeigt, dass in den ersten 24 Stunden wenig Öl desorbiert wurde. Die Wasseroberfläche war ölfrei, lediglich an der Becherglaswand befanden sich vereinzelte Ölspuren. Nach 10 Tagen zeigte die Wasserphase eine deutlich braune Verfärbung, die nach 20 Tagen noch dunkler erschien. Es ist zu vermuten, dass in den Probengefäßen durch die während der Versuchslaufzeit durchgeführten Schüttelbewegungen eine Wasser-Öl-Emulsion entstanden ist. Demnach müssten die Binder

Öl in die Wasserphase abgegeben haben. Nach der optischen Bewertung scheint der abgegebene Ölanteil nicht unermesslich zu sein.

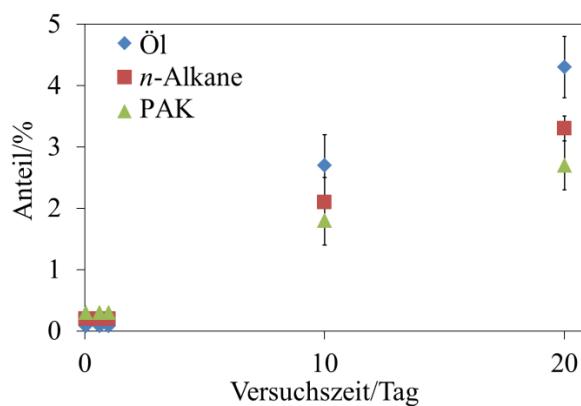
Innerhalb der ersten 24 Stunden lagen die gravimetrisch ermittelten Rückstandsmassen in den Extrakten der Wasserphase (De1-De3) im Bereich des Blindwertes (0,5 mg) und mussten demnach vernachlässigt werden. Im ersten Teil der Versuchsreihe (De1-De3) wurde das an den Versuchsgefäßwänden adsorbierte Öl mit Lösungsmittel aufgenommen und gesondert analysiert. Die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Darstellung des gravimetrisch bestimmten an der Versuchsgefäßwand adsorbierten Ölrückstandes in mg für die Versuchszeiten 1 h, 15 h und 24 h (n = 1).

Da die Schwankungen der in Abbildung 11 dargestellten Messwerte offenbar nicht von der Versuchsdauer abhängen, ist davon auszugehen, dass sie den Fehlerbereich des Versuchsanlasses widerspiegeln. Basierend auf dieser Annahme wurde der Mittelwert gebildet. Wird von einer zufälligen Streuung der Messwerte im Fehlerbereich ausgegangen, bedeutet das, dass die Desorption des Öls innerhalb von einer Stunde nach der Zugabe der ölgetränkten Binder in die Wasserphase erfolgte. Verbleiben die Binder weitere 23 Stunden im Wasser, wird anscheinend kein weiteres Öl desorbiert. Innerhalb von einer Stunde wurde demnach eine Ölmasse von  $2,7 \text{ mg} \pm 0,2 \text{ mg}$  von den Bindern desorbiert und von der Becherglaswand adsorbiert. Das entspricht  $0,08 \% \pm 0,01 \%$  der ursprünglich auf den Bindern eingebrachten Ölmasse von 3,6 g. Nach 10 Tagen betrug die an die Wasserphase und das Versuchsgefäß abgegebene Ölmasse  $161 \text{ mg} \pm 28 \text{ mg}$ . Das entspricht  $2,7 \% \pm 0,5 \%$ . Nach 20 Tagen hatte sich die desorbierte Ölmasse auf  $260 \text{ mg} \pm 27 \text{ mg}$  ( $4,3 \% \pm 0,5 \%$ ) erhöht.

Der prozentuale Anteil des desorbierten Öls beziehungsweise der desorbierten *n*-Alkane und PAK im Versuchsgefäß über den Verlauf des Experiments ist in Abbildung 12 dargestellt. Dabei wurden die Messwerte für die Ölmasse gravimetrisch, die Werte für die summierten *n*-Alkanverbindungen und die summierten PAK chromatografisch bestimmt.



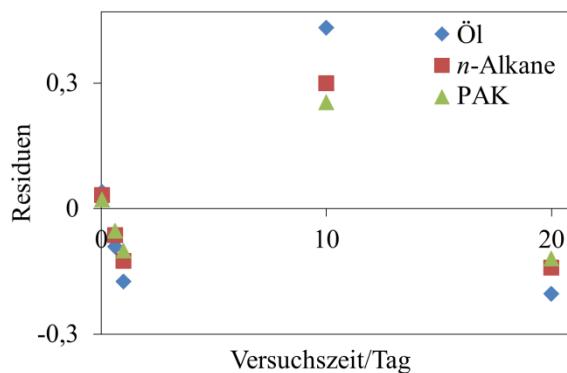
**Abbildung 12:** Prozentualer Anteil des desorbierten Öls und der desorbierten summierten *n*-Alkane und PAK in den Versuchsgefäßen über einen Versuchszeitraum von 20 Tagen ( $n = 3$ ). Die Messwerte für die Ölmasse wurden gravimetrisch, die Werte für die summierten *n*-Alkanverbindungen und die summierten PAK chromatografisch bestimmt.

Innerhalb der ersten 24 Stunden konnten keine *n*-Alkanverbindungen oberhalb der Nachweisgrenze in der Wasserphase der Probengefäße detektiert werden ( $x_{NG} = 1,3 \mu\text{g}$  absolut). In den Extrakten, in denen das an der Becherglaswand adsorbierte Öl aufgenommen wurde, wurde innerhalb der ersten 24 Stunden im Mittel eine summierte *n*-Alkanmasse von  $0,23 \text{ mg} \pm 0,09 \text{ mg}$  quantifiziert. Das entspricht  $0,2\% \pm 0,05\%$  (siehe Abbildung 12). Nach 10 Tagen betrug die desorbierte *n*-Alkanmasse, die im Versuchsgefäß nachgewiesen werden konnte,  $4,9 \text{ mg} \pm 0,9 \text{ mg}$ , nach 20 Tagen  $8,0 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$ . Das entspricht  $2,1\% \pm 0,4\%$  beziehungsweise  $3,3\% \pm 0,2\%$  (siehe Abbildung 12).

Innerhalb der ersten 24 Stunden konnten die untersuchten PAK-Verbindungen lediglich in der Wasserphase nachgewiesen werden ( $28,7 \mu\text{g} \pm 1,4 \mu\text{g}$ ). Die an der Versuchsgefäßwand adsorbierte PAK-Masse lag unterhalb der Nachweisgrenze ( $x_{NG} = 1,7 \mu\text{g}$  absolut). Nach 10 Tagen war die PAK-Masse im Probengefäß auf  $0,31 \text{ mg} \pm 0,06 \text{ mg}$ , nach 20 Tagen auf  $0,47 \text{ mg} \pm 0,06 \text{ mg}$  angestiegen. Das entspricht einem Anstieg von  $0,3\% \pm 0,01\%$  über  $1,8\% \pm 0,4\%$  bis zu  $2,7\% \pm 0,4\%$  (siehe Abbildung 12).

Aus den genannten und den in Abbildung 12 dargestellten Daten geht hervor, dass im Laufe des Versuchszeitraumes eine kontinuierliche Desorption des Öls sowie der darin enthaltenen *n*-Alkan- und PAK-Verbindungen stattgefunden hat. Der prozentuale Anteil der desorbierten *n*-Alkane und PAK liegt in einem vergleichbaren Bereich, die berechneten Werte samt Fehlerbalken überschneiden sich. Das Gleiche gilt innerhalb der ersten zehn Tage des Experiments auch für den prozentualen Anteil des desorbierten Öls. Erst am letzten Tag des Versuchszeitraumes liegt der berechnete Wert für den Ölanteil 1,3 Prozentpunkte über den Werten für *n*-Alkane und PAK. Dieser Kurvenverlauf lässt vermuten, dass *n*-Alkane und PAK nicht zu den Substanzklassen im Öl gehören, die bevorzugt von den Bindern desorbieren. Innerhalb der ersten 24 Stunden desorbierten sowohl das Öl als Gesamtmatrix als auch die *n*-Alkanverbindungen vermutlich direkt an die Gefäßwand. Die PAK-Verbindungen hingegen konnten in diesem Zeitraum nur in der Wasserphase nachgewiesen werden. Dieses Verhalten kann auf die vergleichsweise hohe Wasserlöslichkeit der PAK in Bezug auf die übrigen im Öl vorliegenden Verbindungen zurückgeführt werden.<sup>[65,88]</sup>

Es scheint naheliegend, dass zwischen dem Desorptionsverhalten der Binder hinsichtlich der Abgabe von Öl, *n*-Alkanen und PAK und der Versuchslaufzeit ein linearer Zusammenhang besteht. Das Bestimmtheitsmaß für eine lineare Anpassung beträgt für alle drei Datensätze 0,98. Mithilfe der Steigung und des Achsenabschnittes der linearen Trendlinie können nun die Residuen berechnet werden (siehe Abschnitt 5.5), deren Darstellung in Abbildung 13 erfolgt. Nach optischer Bewertung scheinen die Residuen zufällig um die x-Achse zu streuen. Diese zufällige Streuung ist auf eine sinnvoll gewählte Anpassung zurückzuführen.



**Abbildung 13:** Residualanalyse für die lineare Korrelation zwischen Öl-, *n*-Alkan- und PAK-Desorption und der Versuchslaufzeit.

Es liegt demnach eine Korrelation zwischen der Desorption des Öls beziehungsweise der Desorption der *n*-Alkane und der PAK und der Versuchslaufzeit vor. Diese Korrelation kann mit einer linearen Anpassung beschrieben werden.

### Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Nach einer 20-tägigen Verweildauer im wässrigen System gaben die mit 1,5 g Öl/g Binder beladenen Ölbinder bei konstanter mechanischer Belastung (Simulation von Freilandbedingungen) weniger als 5 % des Öls beziehungsweise der *n*-Alkane und PAK an die Wasserphase und/oder die Versuchsgefäßwand ab. Dabei konnte in dem genannten Versuchszeitraum hinsichtlich der zeitlichen Abhängigkeit der Desorption ein linearer Zusammenhang beobachtet werden.

Während es zahlreiche Studien zu Ölsorptionseigenschaften verschiedener Materialien gibt (siehe Abschnitt 3.1.1), wurde in keiner dieser Studien das entsprechende Desorptionsverhalten untersucht. Das gezielte Entfernen des Öls von den Sorbenzien, zum Beispiel mittels Auspressen zwischen zwei Rollen, war Teil weniger Untersuchungen.<sup>[78,80,85]</sup> Hierbei stand das Recycling der sorbierenden Materialien im Mittelpunkt und nicht die potentielle Schadstoffabgabe an die Umwelt bei einer längeren Verweildauer im wässrigen System.

### Fazit der Untersuchungen zum Ab- und Desorptionsverhalten der Ölbinder

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die absorbierenden und desorbierenden Eigenschaften der entwickelten Ölbinder im wässrigen System sowohl qualitativ als auch quan-

titativ zu charakterisieren. Anhand der generierten Daten ist es möglich, im Falle einer Öl-  
havarie ( $V_{\text{Öl}} \leq 50 \text{ t}$ ) die Bindermenge abzuschätzen, mit der eine Reinigungsleistung von 99 %  
erreicht werden kann. Verglichen mit synthetischen Sorbenzien ist die Ölaufnahmekapazität  
der Ölbinder etwa um den Faktor zwei bis zehn niedriger.<sup>[76-80]</sup> Diesem ökonomischen Nach-  
teil steht jedoch ein ökologischer Vorteil gegenüber. Basierend auf den natürlichen und bio-  
logisch abbaubaren Bestandteilen stellen die untersuchten Ölbinder keine zusätzliche Belastung  
für das marine Ökosystem dar. Im Vergleich mit anderen natürlichen Sorbenzien, die oft in  
Form von losen Fasern eingesetzt werden, ist die Bergung der Ölbinder vergleichsweise ein-  
fach durchführbar, sodass der Schadstoff Öl nicht nur lokal gebunden, sondern größtenteils  
aus dem Ökosystem entfernt werden kann.<sup>[16]</sup> Die Ergebnisse hinsichtlich des Desorptions-  
verhaltens der Binder zeigen deutlich, dass selbst bei einer Bergung bis zu 20 Tage nach dem  
Bindereinsatz eine nahezu vollständige Entfernung des Öls gewährleistet werden kann.

## 3.2 Charakterisierung ölabbauender Mikroorganismen

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, öltolerierende Mikroorganismen im Labormaßstab  
sowohl als Reinkulturen als auch in Form von definierten Gemeinschaften hinsichtlich ihrer  
ölabbauenden Eigenschaften qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Dabei wurde auch  
die zeitliche Abhängigkeit der Ölabbauleistung bestimmt. Darüber hinaus war es von beson-  
derem Interesse, den Einfluss der vorliegenden Ölkonzentration, der Art und Menge der  
Nährstoffversorgung sowie den Einfluss der einzelnen Kulturen aufeinander zu untersuchen.

Die Isolierung sowie eine erste Auswahl der Mikroorganismen wurden im Vorfeld im Rahmen des Projektes BioBind von den Projektpartnern der Universität Leipzig durchgeführt. Dazu wurden Wasserproben aus der südwestlichen Ostsee entnommen, aus denen über 100 öltolerierende Bakterien-, Cyanobakterien- und Algenkulturen isoliert wurden.<sup>[89]</sup> Nach der Isolation erfolgten erste Selektionsuntersuchungen, bei denen 19 alkanotrophe Bakterien-, 16 Grünalgen- und 7 Cyanobakterienstämme ausgewählt wurden, die sich robust gegenüber verschiedenen Ölen und Ölschadstoffen sowie temperatur- und salinitätstolerant zeigten.<sup>[89]</sup> Es erfolgte die Klassifizierung der isolierten Bakterienstämme nach Gattung und Art, deren Übersicht Tabelle 3 entnommen werden kann.<sup>[90]</sup>

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Inkubationsexperimente wurden von den Projektpartnern der Universität Leipzig geplant (Art des Mediums, verwendete Ölkonzentration, Auswahl der Mikroorganismen) und durchgeführt. Die Extraktion der Proben, die Aufarbeitung und Messung der Extrakte sowie die Auswertung der dargestellten Ergebnisse erfolgten im Rahmen dieser Arbeit am Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde.

**Tabelle 3:** Klassifizierung der isolierten Bakterienstämme unter Angabe von Gattung und Art.<sup>[90]</sup> Bei den mit \* gekennzeichneten Arten konnte keine eindeutige Zuordnung erfolgen.

Probennummer	Stamm	Art
1	OSB-24	<i>Rhodococcus erythreus</i>
2	OSB-26	<i>Rhodococcus erythreus</i>
3	OSB-27	<i>Rhodococcus erythreus</i>
4	OSB-46	<i>Rhodococcus erythreus</i>
5	OSB-48	<i>Rhodococcus erythreus</i> *
6	OSB-49	<i>Rhodococcus erythreus</i> *
7	OSB-78	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
8	OSB-80	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
9	OSB-81	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
10	OSB-118	<i>Rhodococcus fascians</i>
11	OSB-119	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>
12	OSB-124	<i>Rhodococcus fascians</i>
13	OSB-125	<i>Rhodococcus fascians</i>
14	OSB-127	<i>Rhodococcus fascians</i> *
15	OSB-128	<i>Rhodococcus fascians</i> *
16	OSB-137	<i>Rhodococcus fascians</i> *
17	OSB-138	<i>Rhodococcus fascians</i>
18	OSB-139	<i>Rhodococcus fascians</i>
19	OSB-158	<i>Rhodococcus fascians</i>

Bei den durchgeführten Experimenten war es von Interesse, die Ölabbaueffizienz der einzelnen Bakterienstämme beziehungsweise der ausgewählten Mikroorganismengemeinschaften zu bestimmen. Der Fokus der Analysen lag dabei auf der Quantifizierung des *n*-Alkan- und PAK-Abbaus (siehe Abschnitt 1.3). In allen Versuchsansätzen wurden Kontrollproben mitgeführt. In diesen Proben erfolgte keine Zugabe von Mikroorganismen. Die Proben, die direkt nach dem Versuchsstart extrahiert wurden („K-Start“), fungierten als Referenz. Die in diesen Proben gemessenen Analytenkonzentrationen wurden lediglich durch die Probenaufarbeitung beeinflusst. Da die Aufarbeitung aller Proben mit der gleichen Methode von derselben Person unter denselben Bedingungen erfolgte, wurden potentielle Verluste, die durch die Aufarbeitung entstehen könnten, durch den Bezug auf die K-Start-Proben ohne konkrete Bestimmung bereits berücksichtigt. Auch eventuelle Alterungsprozesse des Öls während der Lagerung stellten unter Bezugnahme der Referenzproben keine Fehlerquelle dar. Die übrigen Kontrollproben („Kontrolle“) wurden gemeinsam mit den Proben am Ende des Versuches extrahiert und spiegelten den Ölverlust durch Verdampfungseffekte oder andere, nicht vorhersehbare Verluste während der Inkubationszeit wider.

Neben der Ölabbauleistung der Mikroorganismen wurde zudem der Einfluss der Ölkonzentration als auch der Einfluss des Nährmediums auf den mikrobiellen Ölabbau untersucht, diskutiert.

tiert und in den wissenschaftlichen Hintergrund eingeordnet. Der Einfluss der zugegebenen Nährstoffart und -menge wurde abschließend mit konkretem Bezug auf einen Einsatz in der Ostsee diskutiert.

### 3.2.1 Einfluss der Ölkonzentration auf den mikrobiellen Ölabbau

Um den Einfluss der Ölkonzentration zu ermitteln, wurden 18 beziehungsweise 19 Bakterienstämme in Reinkulturen für zwei Wochen mit unterschiedlichen Ölanteilen inkubiert und hinsichtlich ihrer *n*-Alkan- und PAK-Abbaueffizienz untersucht. Im Folgenden wird der Versuchsansatz mit der eingesetzten Ölkonzentration von 5 g/L als „Versuchsansatz 1“ und der Ansatz, bei dem eine Ölkonzentration von 2 g/L verwendet wurde, als „Versuchsansatz 2“ bezeichnet. Im Versuchsansatz 1 wurde die Reinkultur Nr. 15 nicht untersucht. Die Experimente wurden in einem Medium durchgeführt, das größtenteils aus Ostseewasser bestand und mit Nährstoffen angereichert wurde (siehe Abschnitt 5.2.3). Als Stickstoffquelle wurde hierbei ein Ammoniumsalz verwendet. Die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt (je 0,002 mol/L).

#### *n*-Alkananalysen

Für Versuchsansatz 1 wurden die *n*-Alkane von *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> quantifiziert, für die Proben aus Versuchsansatz 2 erfolgte die Quantifizierung lediglich für *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>. Diese vier Verbindungen wurden ausgewählt, um den gesamten Bereich der Zielanalyten (*n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) stichprobenartig vereinfacht darzustellen.

Eine vergleichende Übersicht der detektierten *n*-Alkanmassen in den K-Start- und den Kontrollproben ist in Tabelle 4 gegeben, wobei zu Gunsten der Übersichtlichkeit lediglich die Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> aufgeführt wurden.

**Tabelle 4:** (Mittlere) Masse von je vier ausgewählten *n*-Alkanen in µg samt Standardabweichung s in µg der K-Start- und Kontrollproben beider Versuchsansätze.

c <sub>Öl</sub>	Probe	<i>n</i> -Alkanmasse in µg ± s in µg			
		<i>n</i> -C <sub>17</sub>	<i>n</i> -C <sub>21</sub>	<i>n</i> -C <sub>24</sub>	<i>n</i> -C <sub>31</sub>
5 g/L	K-Start (n = 1)	219,4	159	130,6	39,7
5 g/L	Kontrolle (n = 2)	232,5 ± 16,8	159,3 ± 4,9	122,2 ± 5,5	30,7 ± 2,3
2 g/L	K-Start (n = 3)	34 ± 1,5	24,2 ± 1,4	19,3 ± 1,5	4,1 ± 0,4
2 g/L	Kontrolle (n = 3)	36,2 ± 0,9	23,5 ± 0,1	18,6 ± 0,04	3,9 ± 0,1

Die quantifizierten *n*-Alkanmassen in den K-Start- und den Kontrollproben liegen für jeden der beiden Versuchsansätze jeweils in demselben Bereich. Das heißt, in den Kontrollproben sind für diese vier Verbindungen keine oder nur unwesentliche Verluste während der Inkubationsdauer, zum Beispiel durch Verdampfungseffekte, aufgetreten.

Ob die Reinkulturen in der Lage waren, die vorliegenden *n*-Alkane abzubauen, wird bei der vergleichenden Betrachtung der *n*-Alkanmassen in den Proben und den Kontrollen deutlich. In Tabelle 5 sind zum einen die mittleren summierten Massen der Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> aus den Kontrollproben und zum anderen die entsprechenden Minimal- und Maximalwerte aus den Proben für die Versuchsansätze 1 und 2 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Mittlere summierte Masse der Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> in µg für die Kontrollproben samt Standardabweichung s in µg für die Versuchsansätze 1 (n = 2) und 2 (n = 3) sowie jeweils die minimale und die maximale summierte *n*-Alkanmasse in µg in den Proben der beiden Versuchsansätze.

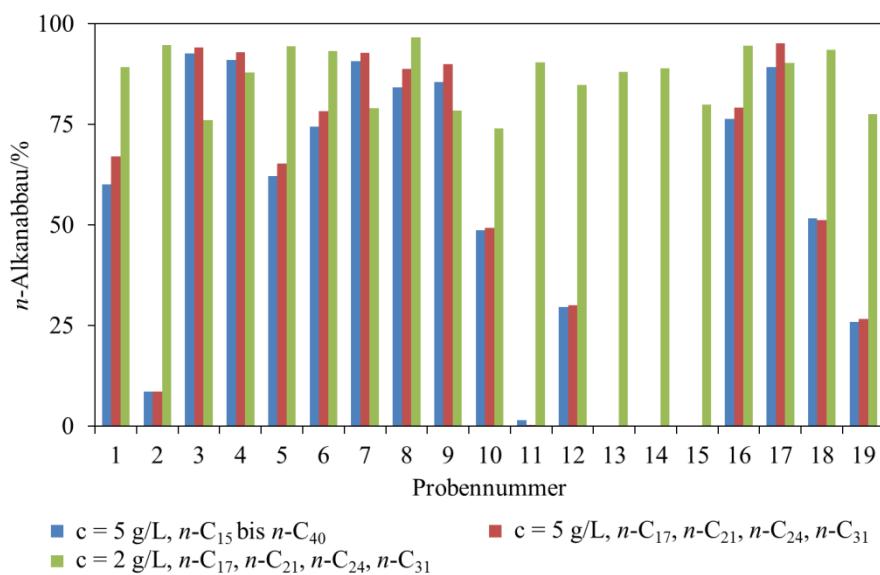
	Summierte Masse der Verbindungen <i>n</i> -C <sub>17</sub> , <i>n</i> -C <sub>21</sub> , <i>n</i> -C <sub>24</sub> und <i>n</i> -C <sub>31</sub> in µg	
	Versuchsansatz 1	Versuchsansatz 2
Kontrollprobe	544,7 ± 29,5	81,6 ± 4,7
Minimum	26,1	2,8
Maximum	581,1	21,2

Aus den in Tabelle 5 genannten Daten wird deutlich, dass die summierten vier *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>) für Versuchsansatz 1 einen Massenbereich von 26,1 µg (Probe Nr. 17, *Rhodococcus (Rh.) fascians*) bis 581,1 µg (Probe Nr. 13, *Rh. fascians*) umspannen. Der Minimalwert liegt somit um den Faktor 21 unterhalb der mittleren Summe in den Kontrollproben von 544,7 µg ± 29,5 µg, der Maximalwert liegt um den Faktor 0,9 oberhalb des Kontrollwertes. Neben der oben genannten Probe Nr. 13 konnten auch für die Proben Nr. 11 (*Rh. corynebacterioides*) und Nr. 14 (*Rh. fascians*) vergleichbare Werte der summierten *n*-Alkanmassen bezogen auf die Kontrollproben berechnet werden. In diesen drei Proben hat demnach kein mikrobieller *n*-Alkanabbau stattgefunden, während die restlichen Reinkulturen bei der vorliegenden Ölkonzentration in der Lage waren, die im Öl vorhandenen *n*-Alkane in unterschiedlichem Ausmaß abzubauen.

Im Versuchsansatz 2 beträgt das Minimum der summierten *n*-Alkanmasse 2,8 µg (Probe Nr. 8, *Rh. erythropolis*) und das Maximum 21,2 µg (Probe Nr. 10, *Rh. fascians*). Diese Werte liegen um den Faktor 25 beziehungsweise 4 unterhalb der mittleren Summe in den Kontrollproben von 81,6 µg ± 4,7 µg. Der Vergleich mit den Kontrollproben macht deutlich, dass in allen Reinkulturproben ein mikrobieller Abbau stattgefunden hat, da die höchste in den Proben berechnete *n*-Alkanmasse immer noch um den Faktor 4 geringer ist als die *n*-Alkanmasse in den Kontrollproben. Mittels t-Test (siehe Abschnitt 5.5) konnte mit einer statistischen Sicherheit von 99 % gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren *n*-Alkanmasse in den Kontrollproben und der höchsten in den Reinkulturproben quantifizierten *n*-Alkanmasse besteht.

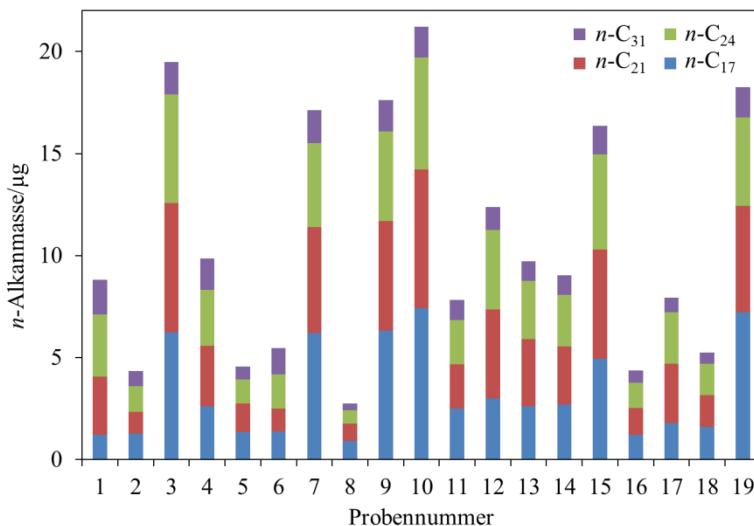
Um den prozentualen Abbau der *n*-Alkane in den Reinkulturproben zu berechnen, wurde für jeden der beiden Versuchsansätze die summierte *n*-Alkanmasse jeder Probe auf die mittlere summierte *n*-Alkanmasse der Kontrollproben bezogen. Eine vergleichende Darstellung des

prozentualen *n*-Alkanabbaus in beiden Versuchsansätzen erfolgt in Abbildung 14. Dabei ist neben den Werten für den Abbau, die für beide Versuchsansätze basierend auf den vier ausgewählten *n*-Alkanverbindungen berechnet wurden, auch der prozentuale Abbau in Versuchsansatz 1, basierend auf den gesamten detektierten *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>), dargestellt. Diese vergleichende Darstellung macht deutlich, dass sich die auf den gesamten *n*-Alkanverbindungen basierten Werte für den prozentualen *n*-Alkanabbau nicht wesentlich von den Werten unterscheiden, die auf der Basis der vier ausgewählten Verbindungen berechnet wurden. Die größte Differenz von 7 Prozentpunkten zeigt sich für Probe Nr. 1. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Wert keinen signifikanten Unterschied markiert, sondern im Fehlerbereich der Messwerte liegt.



**Abbildung 14:** Vergleichende Darstellung des prozentualen Abbaus der Verbindungen *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> im Versuchsansatz 1 sowie der Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> in beiden Versuchsansätzen für alle untersuchten Reinkulturproben. Im Versuchsansatz 1 wurde die Probe Nr. 15 nicht untersucht.

Des Weiteren geht aus Abbildung 14 hervor, dass der mikrobielle *n*-Alkanabbau für den Großteil der Proben in Versuchsansatz 2 weitaus effektiver war als in Versuchsansatz 1. Lediglich in fünf Proben lagen die Werte für den prozentualen Abbau in Versuchsansatz 2 unterhalb der Werte aus Versuchsansatz 1 (Probe 3 und 4 (*Rh. erythreus*), 7 und 9 (*Rh. erythropolis*) und 17 (*Rh. fascians*)). Am deutlichsten ist der Anstieg für die Proben Nr. 2 (*Rh. erythreus*), 11 (*Rh. corynebacterioides*), 13 und 14 (jeweils *Rh. fascians*) zu sehen. Hier beträgt der Anstieg nahezu 90 Prozentpunkte. Die Probe Nr. 15 wurde lediglich im Versuchsansatz 2 bearbeitet und kann daher bei dieser vergleichenden Betrachtung nicht berücksichtigt werden. Die absolute Verteilung der vier untersuchten *n*-Alkane in den Proben aus Versuchsansatz 2 ist für jede der 19 Reinkulturen in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Verteilung der vier untersuchten *n*-Alkane (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>) in µg in den 19 Reinkulturproben des Versuchsansatzes 2.

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass die jeweilige Summe der vier *n*-Alkane innerhalb der Proben des Versuchsansatzes 2 zwar unterschiedlich, das Verteilungsmuster hingegen sehr ähnlich ist. Während *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub> und *n*-C<sub>24</sub> jeweils etwa 30 % der Gesamtmasse ausmachen (siehe Tabelle 6), repräsentiert *n*-C<sub>31</sub> etwa 10 % der summierten Masse der vier ausgewählten *n*-Alkane. Das bedeutet, dass die Abbauleistung der einzelnen Bakterienstämme bezogen auf die Summe der *n*-Alkane unterschiedlich effektiv, das Abbauphasen hinsichtlich der einzelnen Verbindungen jedoch für alle 19 Stämme vergleichbar war.

Aus der vergleichenden Darstellung der mittleren prozentualen Verteilung der ausgewählten Verbindungen beider Versuchsansätze in Tabelle 6 wird deutlich, dass das Verteilungsmuster unbeeinflusst von der eingesetzten Ölkonzentration für beide Probensätze identisch ist. In Tabelle 6 ist zudem die mittlere prozentuale Verteilung der vier *n*-Alkane im verwendeten Rohöl aufgeführt.

**Tabelle 6:** Mittlere prozentuale Verteilung der vier ausgewählten *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>) in % samt Standardabweichung s in % für das eingesetzte Öl (n = 3) sowie die 18 beziehungsweise 19 Reinkulturproben der beiden Versuchsansätze 1 (n = 18) und 2 (n = 19).

c <sub>Öl</sub>	Mittlere prozentuale Verteilung in % ± s in %			
	<i>n</i> -C <sub>17</sub>	<i>n</i> -C <sub>21</sub>	<i>n</i> -C <sub>24</sub>	<i>n</i> -C <sub>31</sub>
reines Öl	38 ± 1	27 ± 1	27 ± 1	7 ± 1
5 g/L	34 ± 9	28 ± 4	27 ± 6	11 ± 6
2 g/L	29 ± 6	31 ± 4	28 ± 3	12 ± 4

Mittels t-Test (siehe Abschnitt 5.5) konnte mit einer statistischen Sicherheit von 99 % belegt werden, dass sich die in Tabelle 6 genannten Mittelwerte für die prozentuale Verteilung der Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> sowohl für beide Versuchsansätze als auch im Vergleich mit dem reinen Rohöl nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ergänzend dazu

wurde der t-Test auf den gesamten Datensatz des Versuchsansatzes 1 ( $n\text{-C}_{15}$  bis  $n\text{-C}_{40}$ ) angewendet, um zu prüfen, ob sich die Mittelwerte für die prozentuale Verteilung der übrigen  $n$ -Alkanverbindungen vor und nach dem Abbau durch die Bakterien unterscheiden. Auch hier konnte mit einer statistischen Sicherheit von 99 % gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten besteht. Bei einer eingesetzten Ölkonzentration von 5 g/L (Versuchsansatz 1) konnte demnach für alle untersuchten  $n$ -Alkanverbindungen ( $n\text{-C}_{15}$  bis  $n\text{-C}_{40}$ ) gezeigt werden, dass sich die mittlere prozentuale Zusammensetzung der  $n$ -Alkane im Rohöl und in den mit Bakterien behandelten Proben nicht signifikant unterscheidet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die mittlere prozentuale Zusammensetzung von  $n\text{-C}_{17}$ ,  $n\text{-C}_{21}$ ,  $n\text{-C}_{24}$  und  $n\text{-C}_{31}$  unabhängig von der eingesetzten Ölkonzentration vor und nach dem Abbau durch die Bakterienreinkulturen nicht signifikant unterscheidet. Die Abbaupräferenz der eingesetzten Bakterien hinsichtlich der Kettenlänge scheint demnach innerhalb der verwendeten Reinkulturen vergleichbar zu sein. Dabei ist eine verminderte Abbaueffizienz mit steigender Kettenlänge der  $n$ -Alkanverbindungen zu beobachten.

### PAK-Analysen

Die Ergebnisse der PAK-Messungen für die K-Start- und die Kontrollproben sind für Versuchsansatz 1 in Tabelle 7 und für Versuchsansatz 2 in Tabelle 8 aufgeführt. Von den Zielanalyten wurde lediglich eine Auswahl von sechs PAK-Verbindungen untersucht. Dabei wurden Naphthalin sowie dessen alkylierte Homologe als zweikernige und Fluoren und Phenanthren als dreikernige Verbindungen ausgewählt. Die Auswahl erfolgte basierend auf der hohen potentiellen mikrobiellen Abbaubarkeit dieser Verbindungen.<sup>[91,92]</sup>

**Tabelle 7:** Masse der PAK in ng in den K-Start- und den Kontrollproben sowie die PAK-Abnahme in den Kontrollen bezogen auf die K-Start-Proben in % samt Standardabweichung s in % für Versuchsansatz 1.

PAK	Masse in ng $\pm$ s in ng		Abnahme in % $\pm$ s in %
	K-Start	Kontrollen	
Naphthalin	9163	324 $\pm$ 52	97 $\pm$ 1
2-Methylnaphthalin	10047	835 $\pm$ 137	92 $\pm$ 1
1-Methylnaphthalin	9256	1055 $\pm$ 151	89 $\pm$ 2
1,7-Dimethylnaphthalin	9486	3438 $\pm$ 386	64 $\pm$ 4
Fluoren	1652	1189 $\pm$ 102	28 $\pm$ 6
Phenanthren	3959	3268 $\pm$ 251	18 $\pm$ 6

**Tabelle 8:** Masse der PAK in ng in den K-Start- und den Kontrollproben sowie die PAK-Abnahme in den Kontrollen bezogen auf die K-Start-Proben in % samt Standardabweichung s in % für Versuchsansatz 2.

PAK	Masse in ng $\pm$ s in ng					
	K-Start		Kontrollen		Abnahme in % $\pm$ s in %	
Naphthalin	4104	$\pm$	218	535	$\pm$	242
2-Methylnaphthalin	7069	$\pm$	181	153	$\pm$	25
1-Methylnaphthalin	6473	$\pm$	265	217	$\pm$	75
1,7-Dimethylnaphthalin	5006	$\pm$	55	1071	$\pm$	428
Fluoren	791	$\pm$	14	500	$\pm$	23
Phenanthren	1790	$\pm$	7	1627	$\pm$	104

Während bei den *n*-Alkanen die Werte für die K-Start- und die Kontrollproben nahezu identisch waren (siehe Tabelle 4), zeigt sich bei den in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführten Daten ein anderes Bild. Die PAK-Massen in den Kontrollproben sind für den Großteil der sechs untersuchten Verbindungen um ein Vielfaches kleiner als in den K-Start-Proben (Faktor 5 bis 30). Dieser Verlust ist lediglich auf Verflüchtigungseffekte zurückzuführen. Mit steigender Molekülgröße nimmt die Siedetemperatur sowohl bei den PAK als auch bei den *n*-Alkanen zu, während der Dampfdruck sinkt.<sup>[32,93]</sup> Es ist bekannt, dass die Flüchtigkeit der PAK mit steigender Molekülgröße und Länge der Alkylkette zunimmt.<sup>[94]</sup> Dieses Verhalten stellt vermutlich die Grundlage für die sinkende prozentuale Abnahme von Naphthalin über 2-Methylnaphthalin zu Fluoren und Phenanthren dar. Während Naphthalin und seine einfach methylierten Homologe nahezu vollständig verdampft sind, beträgt die Abnahme für Phenanthren lediglich 9 %. Auffällig ist dabei, dass diese Verflüchtigungseffekte in den Kontrollproben bei den *n*-Alkanen nicht zu beobachten waren. Ein Vergleich der Siedetemperaturen macht deutlich, dass die Werte für die sechs in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführten PAK in demselben Bereich liegen wie für die *n*-Alkanverbindungen mit einer Kettenlänge von C<sub>12</sub> bis C<sub>19</sub>.<sup>[93]</sup> Da *n*-Alkane mit einer Kettenlänge von C<sub>15</sub> bis C<sub>40</sub> untersucht wurden, traten bei dem Großteil der untersuchten Verbindungen unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Verflüchtigungseffekte auf. Bei der Betrachtung der *n*-Alkane wurde zudem ein Summenparameter ermittelt, sodass der Einfluss eventueller Verflüchtigungseffekte bei den kurzkettigen Verbindungen vermutlich so gering war, dass er keine deutlichen Auswirkungen auf die berechneten Daten hatte.

Innerhalb der 18 beziehungsweise 19 Proben, in denen der mikrobielle Ölabbau untersucht wurde, lag für keine der sechs PAK-Verbindungen die quantifizierte Masse unter dem jeweiligen Wert in den Kontrollproben. Somit hat offensichtlich kein mikrobieller PAK-Abbau stattgefunden.

## Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass der mikrobielle *n*-Alkanabbau nach zwei Wochen bei einer Ölkonzentration von  $c = 0,5$  g/L (Versuchsansatz 1) zwischen 0 % und 95 % und bei einer Ölkonzentration von  $c = 0,2$  g/L (Versuchsansatz 2) zwischen 74 % und 97 % lag. Dabei verändert sich die prozentuale Zusammensetzung der untersuchten *n*-Alkane bezogen auf die einzelne Substanz unabhängig von der vorliegenden Ölkonzentration durch die Abbauaktivitäten der 19 Bakterienreinkulturen nicht. Des Weiteren konnte herausgearbeitet werden, dass *n*-Alkanverbindungen kürzerer Kettenlänge von allen eingesetzten Bakterienstämmen bevorzugt gegenüber den langkettigen Verbindungen abgebaut werden.

Es konnte bislang kein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Bakterienart und der Abbauleistung beobachtet werden. Insgesamt war der prozentuale *n*-Alkanabbau bei niedrigerer Ölkonzentration (Versuchsansatz 2) höher. Dabei ist zu beachten, dass durch die Variation der Ölkonzentration zeitgleich eine Variation des Stickstoffanteils im Medium bezogen auf die eingesetzte Ölmasse erfolgte. Bezogen auf das Gewicht der im jeweiligen Ansatz zugefügten Ölmasse betrug der Stickstoffanteil in Versuchsansatz 1 0,6 % und in Versuchsansatz 2 1,5 %. Fayad und Overton konnten zeigen, dass der mikrobielle *n*-Alkanabbau nahezu unabhängig von der vorliegenden Ölkonzentration ist.<sup>[95]</sup> In den dort beschriebenen Experimenten wurden Ölkonzentrationen zwischen 5 g/L und 20 g/L eingesetzt.<sup>[95]</sup> Es ist daher davon auszugehen, dass die Erhöhung der Ölkonzentration von 2 g/L auf 5 g/L im Rahmen der hier beschriebenen Experimente ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss auf das Ausmaß des mikrobiellen *n*-Alkanabbaus hat. Vor allem eine Steigerung um zum Teil 90 Prozentpunkte bei den Reinkulturproben 2 (*Rh. erythreus*), 11 (*Rh. corynebacterioides*), 13 und 14 (jeweils *Rh. fascians*) ist vermutlich nicht auf die niedrigere Ölkonzentration in Versuchsansatz 2 zurückzuführen. Eine deutliche Steigerung des mikrobiellen *n*-Alkanabbaus konnte hingegen in zahlreichen Studien nach der Zugabe von Nährstoffen beobachtet werden.<sup>[91,95-97]</sup> Mit der Erhöhung der prozentualen Stickstoffmenge um den Faktor 2,5 in Versuchsansatz 2 konnte auch im vorliegenden Experiment eine Steigerung des mikrobiellen *n*-Alkanabbaus beobachtet werden. Entgegen der zuerst getroffenen Annahme ist die Steigerung des *n*-Alkanabbaus daher wahrscheinlich nicht direkt auf die niedrigere Ölkonzentration zurückzuführen, sondern vielmehr auf die dadurch bedingte Steigerung der prozentualen Stickstoffmenge bezogen auf die eingesetzte Ölmasse. Eventuell kam es in Versuchsansatz 1 durch das ölinduzierte Bakterienwachstum und den damit einhergehenden Ölabbau zu einer Stickstoffmangelsituation, die in einer Hemmung des *n*-Alkanabbaus resultierte.

Keine der 19 eingesetzten Bakterienreinkulturen war unter den gegebenen Versuchsbedingungen in der Lage, die sechs untersuchten PAK-Verbindungen abzubauen. Für den nicht stattgefundenen PAK-Abbau sind im Wesentlichen zwei Gründe denkbar. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass unter den ausgewählten Bakterien keine Spezies vorhanden ist, die in der Lage ist, PAK abzubauen. Aus der Literatur ist der PAK-Abbau durch *Rhodococcus*-Spezies (*Rh. erythropolis* sowie nicht näher klassifizierte Spezies) jedoch durchaus be-

kannt.<sup>[32,98]</sup> Zum anderen ist es denkbar, dass es unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einer Hemmung des PAK-Abbaus gekommen ist.

Während die in den Versuchsansätzen verwendeten Ammoniumsalze für viele Bakterien die bevorzugte Stickstoffquelle darstellen, konnte in verschiedenen Studien eine Hemmung des mikrobiellen Ölabbau beim Einsatz von Ammoniumsalzen beobachtet werden.<sup>[96,99,100]</sup> Wurde eine Menge Ammoniumsalze eingesetzt, die mit der im hier verwendeten Medium vergleichbar ist, wurde beim gleichzeitigen Wirken von alkanabbauenden Bakterien in den Probengefäßen eine deutliche Abnahme des pH-Wertes um zwei bis drei Punkte aus dem neutralen Bereich auf 4,4 bis 5 gemessen.<sup>[96,99]</sup> Die Produktion von verschiedenen Säuren im mikrobiellen Alkanabbauprozess ist bekannt, ebenso wie das akkumulierte Auftreten von Fettsäuren.<sup>[20]</sup> Während der mikrobielle Alkanabbau von der pH-Abnahme weitestgehend unbeeinflusst blieb, wurde der mikrobielle PAK-Abbau in den genannten Studien deutlich gehemmt.<sup>[96,99]</sup> Foght et al. untersuchten sowohl den Einfluss der Stickstoffquelle auf die Abbaueffizienz der eingesetzten Bakteriengemeinschaften als auch den gesonderten Einfluss auf alkan- und aromatenabbauende Bakterienspezies.<sup>[96]</sup> Werden lediglich aromatenabbauende Bakterien in ein Probengefäß mit Medium, Öl und einer Nährstofflösung bestehend aus Nitrat, Ammonium und Phosphat gegeben, sinkt der pH-Wert in geringerem Maße (um einen Punkt) und ein PAK-Abbau findet statt, der sich durch die Zugabe von Nährstoffen steigern lässt.<sup>[96]</sup> Es ist demnach weniger die Form der Stickstoffquelle allein, die eine Hemmung des PAK-Abbaus induziert, sondern vielmehr das gleichzeitige Wirken von alkanabbauenden Bakterien und die damit verbundene deutliche pH-Wert-Abnahme. Studien, in denen bei den mikrobiellen Ölabbauexperimenten ein Bakterienkonsortium und eine Nährstofflösung bestehend aus Nitrat, Ammonium und Phosphat eingesetzt wurden, bestätigten die Beobachtung, dass der Alkanabbau stattfand, während der PAK-Abbau nicht oder nur in geringem Maße festgestellt werden konnte.<sup>[91,95,97]</sup> In keiner der drei zitierten Studien wurde berichtet, dass der pH-Wert reguliert beziehungsweise kontrolliert wurde. Es kann daher spekuliert werden, dass auch hier der geringe PAK-Abbau auf die Zugabe von Ammoniumsalzen und die daraus bei gleichzeitiger Aktivität von alkanabbauenden Bakterien resultierende Senkung des pH-Wertes zurückzuführen ist.

In den oben beschriebenen Experimenten wurde ebenfalls Ammonium als Stickstoffquelle eingesetzt. Der pH-Wert in den Probengefäßen wurde nicht kontrolliert. Es konnte kein PAK-Abbau beobachtet werden. Die oben genannten Verweise auf die Literatur stellen einen plausiblen Interpretationsansatz für die Beobachtungen dar. Anhand der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen soll überprüft werden, ob die verwendeten Bakterienreinkulturen unter angepassten Versuchsbedingungen in der Lage sind, im Öl vorhandene PAK abzubauen, und inwiefern die eingesetzte Stickstoffquelle in den gegenwärtigen Experimenten hinsichtlich des PAK-Abbaus eine (hemmende) Rolle spielt.

### 3.2.2 Einfluss der Nährstoffzugabe auf den mikrobiellen Ölabbau

Um den Einfluss des Nährmediums und der darin vorliegenden Stickstoffquelle auf den mikrobiellen PAK-Abbau zu untersuchen, wurden drei ausgewählte Bakterienstämme (Probe Nr. 3 (*Rh. erythreus*), 10 und 17 (jeweils *Rh. fascians*)) auf einem Algenmedium über einen Zeitraum von 45 Tagen unter der Zugabe von 5 g/L Rohöl inkubiert. Das verwendete Algenmedium enthielt Nitrat als Stickstoffquelle. Bezogen auf das Gewicht der zugefügten Ölmasse betrug der Stickstoffanteil 0,36 %. Die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor wurden im Verhältnis 5:1 eingesetzt.

#### PAK-Analysen

Die PAK-Massen in den Reinkulturen wurden auf die quantifizierten PAK-Massen in der Kontrollprobe bezogen und die auf diesem Weg ermittelte prozentuale PAK-Abnahme in Tabelle 9 dargestellt. Es konnte für zwölf Verbindungen eine Abnahme nachgewiesen werden.

**Tabelle 9:** Prozentuale Abnahme der PAK-Massen bezogen auf die Kontrollprobe für drei ausgewählte bakterielle Reinkulturen.

PAK	Abnahme in %		
	Probe Nr. 3 ( <i>Rh. erythreus</i> )	Probe Nr. 10 ( <i>Rh. fascians</i> )	Probe Nr. 17 ( <i>Rh. fascians</i> )
Naphthalin	30	30	32
2-Methylnaphthalin	60	66	69
1-Methylnaphthalin	72	68	74
1,7-Dimethylnaphthalin	65	61	70
Acenaphthylen	74	69	76
Acenaphthen	28	0	8
Fluoren	57	39	57
Phenanthren	45	24	47
Fluoranthen	38	1	41
Pyren	47	27	46
1-Methylpyren	47	38	54
Chrysen	53	50	51

Aus dem in Tabelle 9 aufgeführten Datensatz geht hervor, dass in allen drei Reinkulturproben ein PAK-Abbau stattgefunden hat. Während die Abbauleistung der Reinkulturen in den Proben Nr. 3 (*Rh. erythreus*) und Nr. 17 (*Rh. fascians*) in etwa vergleichbar ist, ist die des Bakterienstammes in Probe Nr. 10 (*Rh. fascians*) etwas geringer. Die Abnahme der Abbaueffizienz der Bakterien mit steigender Molekülgröße der PAK-Verbindungen war zu erwarten und entspricht den Literaturdaten aus vergleichbaren Experimenten.<sup>[66,91,101]</sup> Auffällig ist der vergleichsweise niedrige Wert der Abnahme von 30 % für Naphthalin als kleinstes Molekül der

zwölf ausgewählten PAK-Verbindungen. Die geringste Abbauleistung wurde von allen drei Reinkulturproben für Acenaphthen, die höchste Abbauleistung für Acenaphthylen erreicht.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion**

Die dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die drei Reinkulturen in der Lage sind, eine Auswahl der im Öl vorhandenen PAK abzubauen. Die nachgewiesene Abbauleistung liegt für Probe Nr. 3 (*Rh. erythreus*) zwischen 28 % und 74 %, für die Probe Nr. 10 (*Rh. fascians*) zwischen 0 % und 69 % und für die Probe Nr. 17 (*Rh. fascians*) zwischen 8 % und 76 %. Die minimale Abbauleistung wurde jeweils für Acenaphthen, die maximale für Acenaphthylen erreicht.

Der nicht nachzuweisende PAK-Abbau im ersten Versuch ist demnach auf die Art der eingesetzten Stickstoffquelle zurückzuführen. Während im vorhergehenden Abschnitt die hemmende Wirkung der eingesetzten Ammoniumsalze auf den PAK-Abbau ausführlich diskutiert wurde, konnte hier gezeigt werden, dass der Einsatz von Nitrat als Stickstoffquelle einen PAK-Abbau ermöglicht. Die durch das eingesetzte Nitrat erreichte Stickstoffmenge von 0,36 % bezogen auf das Ölgewicht liegt deutlich unter der empfohlenen Mindestmenge von 1 %.<sup>[102]</sup> Es ist zu vermuten, dass der nachgewiesene PAK-Abbau der drei Bakterienreinkulturen durch eine Steigerung der zugegebenen Nitratmenge erhöht werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass der PAK-Abbau immer dann durch die Zugabe von Nährstoffen gesteigert wird, wenn Nitrat als Stickstoffquelle eingesetzt wird oder die Abwesenheit alkanabbauender Bakterien garantiert werden konnte.<sup>[96]</sup>

Auch der auffallend geringe Abbau von Naphthalin kann eventuell auf die eingesetzten Nährstoffe zurückgeführt werden. Smith et al. fanden beispielsweise heraus, dass das Verhältnis von Stickstoff und Phosphor den mikrobiellen Abbau von *n*-Hexadekan und Phenanthren in unterschiedlichem Maß beeinflusst.<sup>[103]</sup> Während für *n*-Hexadekan ein maximaler Abbau bei einem N:P-Verhältnis von 7:1 festgestellt werden konnte, wurden für den Phenanthrenabbau Maxima bei einem Verhältnis von 5:1 sowie 20:1 beobachtet.<sup>[103]</sup> In dem hier verwendeten Algenmedium lag ein N:P-Verhältnis von 5:1 vor. Es ist durchaus denkbar, dass dieses Verhältnis nicht den optimalen Bedingungen für den Naphthalinabbau entspricht. Darüber hinaus ist eine Hemmung des mikrobiellen Naphthalinabbaus durch die vorliegende Zusammensetzung an PAK denkbar.<sup>[32]</sup> In diesem Fall müsste auch in allen weiteren Untersuchungen ein eher geringer Naphthalinabbau zu beobachten sein.

Während die Verfügbarkeit von Nährstoffen sowie das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor auch beim Verlassen des Labormaßstabes eine einflussreiche Rolle hinsichtlich des mikrobiellen Ölabbaus spielt, ist der Einfluss der Stickstoffquelle auf den PAK-Abbau nur in begrenzten Probengefäßen von Bedeutung. Es ist zu erwarten, dass im Freiland die Verdunstungseffekte derart dominant sind, dass eine lokale pH-Wert-Absenkung durch das Wirken alkanabbauender Bakterien bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Ammoniumsalzen nicht zu beobachten sein wird. Im Folgenden soll der Nährstoffeinsatz unter Freilandbedingungen und

speziell in Bezug auf das System „BioBind“ vor dem wissenschaftlichen Hintergrund erörtert und diskutiert werden.

Kommt es in einem nährstoffarmen beziehungsweise nährstofflimitierten Medium zu einem Ölaustritt, verlagern sich die Verhältnisse von Kohlenstoff zu Stickstoff beziehungsweise von Kohlenstoff zu Phosphor auf die Seite des Kohlenstoffes. Der ansteigende Kohlenstoff- bei gleichbleibendem Nährstoffgehalt wirkt sich hemmend auf das mikrobielle Wachstum aus.<sup>[20]</sup> Der einsetzende mikrobielle Ölabbau kann innerhalb kurzer Zeit zu einer Nährstoffmangelsituation führen.<sup>[18,20]</sup> Dieser Nährstoffmangel wiederum limitiert die mikrobiellen Abbauprozesse.<sup>[21,104]</sup> Die Bereitstellung von Nährstoffen erscheint demnach zur Stimulation der Abbauprozesse empfehlenswert. Diesbezüglich variieren die Ergebnisse hinsichtlich der optimalen Nährstoffversorgung stark: die Literatur bietet dazu ein breites Spektrum von konkreten Dosierungsempfehlungen über den Ansatz, dass unterschiedliche Bakterienspezies unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen bevorzugen, bis zu der Aussage, dass die optimale Nährstoffkonzentration bislang nicht bekannt sei.<sup>[20,21,105]</sup> Auch scheint die alleinige Zugabe von Stickstoff beziehungsweise Phosphor wenig Wirkung zu zeigen.<sup>[104,106]</sup> Röling et al. kamen in umfangreichen Experimenten zu der Erkenntnis, dass die Zugabe von Stickstoff und Phosphor an sich hinsichtlich der Abbausteigerung wichtiger ist als die konkret zugegebene Menge.<sup>[107]</sup> Der Ansatz, Phosphor im Überschuss einzusetzen, sollte hinsichtlich einer Studie von LePetit und N'Guyen überprüft werden, in der eine Hemmung des Bakterienwachstums bei hoher Phosphorzugabe beobachtet werden konnte.<sup>[20,104]</sup> In einem 40-tägigen Experiment konnten Boufadel et al. zeigen, dass es unter den gegebenen Bedingungen hinsichtlich der Stickstoffzugabe einen Grenzwert gibt, bei dessen Überschreitung der mikrobielle Ölabbau lediglich zu Beginn des Experimentes schneller verläuft, über den gesamten Zeitraum des Experimentes jedoch nicht mehr Öl abgebaut wird.<sup>[108]</sup> Ein gleichbleibender mikrobieller Ölabbau bei gesteigerter Nährstoffzugabe konnte durch weitere Studien untermauert werden.<sup>[107,109]</sup> Weiterführend dazu wurde von Braddock et al. in einem Experiment mit variierendem Nährstoffgehalt die Reduzierung der abbauenden Mikroorganismenzahl bei höchstem Nährstoffgehalt beobachtet.<sup>[106]</sup> Hierbei wurde die größte Mikroorganismenpopulation nach der geringsten Nährstoffzugabe nachgewiesen. Neben der Zugabe von Stickstoff und Phosphor wird auch die Eisenzugabe als stimulierender Faktor diskutiert.<sup>[110]</sup> Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle auch eine Studie erwähnt werden, die belegt, dass die Nährstoffsituation keinen Einfluss auf das Maß des mikrobiellen Ölabbaus hat.<sup>[111]</sup> Kontroverse Ergebnisse wurden auch hinsichtlich der Gewichtung des Einflusses von Temperatur und Nährstoffversorgung publiziert.<sup>[112,113]</sup> Dabei konnte sowohl gezeigt werden, dass die Temperatur die mikrobielle Abbaueffektivität in stärkerem Maße beeinflusst als die Nährstoffzugabe, als auch andersherum.<sup>[112,113]</sup>

Trotz einiger paradox erscheinender Ergebnisse scheint die Zugabe von Stickstoff und Phosphor in überdachtem Maße sinnvoll, um den mikrobiellen Ölabbau anzuregen und zu unterstützen. Ein dabei mittlerweile übliches stöchiometrisches Verhältnis ist C:N:P = 100:5:1.<sup>[114]</sup> Bei der Verwendung von Nährstoffen im Labormaßstab müssen ganz andere, spezifische Kri-

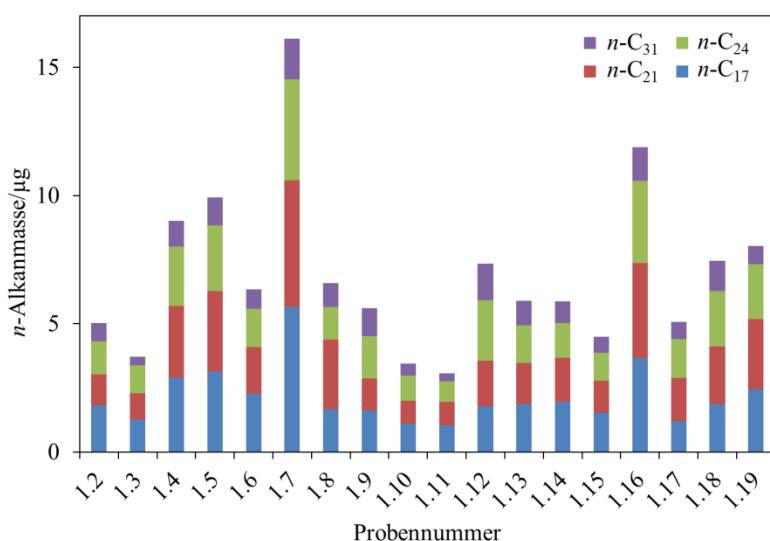
terien hinsichtlich der Nährstoffart und -menge berücksichtigt werden als beim Nährstoffeinsatz im Freiland. Hier ist in jedem Fall im Vorfeld eine fundierte Diskussion notwendig, um schwere Schädigungen der Umwelt zu vermeiden. Dabei sollte im Falle einer Ölhabarrie vor allem eine Schaden-Nutzen-Analyse einer pauschalen Bewertung vorgezogen werden. Die Modifikation, in der die Nährstoffe in das marine System eingebracht werden, kann verschiedenste Formen annehmen.<sup>[12,91]</sup> Als Ergänzung zum Einsatz von wasserlöslichen anorganischen Salzen wurde die Wirkung von „slow-release“-Düngern untersucht, bei denen die anorganischen Nährstoffe von hydrophoben Materialien, zum Beispiel Paraffin oder Pflanzenölen, ummantelt eingesetzt werden.<sup>[91,109]</sup> Eine Modifikation, bei der die Nährstoffe in der Lage sein sollten, bevorzugt direkt an der Öl-Wasser-Grenzschicht wirken zu können, ist die Form der oleophilen organischen Nährstoffe. Durch den Einsatz nach der Havarie der *Exxon Valdez* am Prinz-William-Sund wurde dabei vor allem die Substanz Inipol EAP 22 bekannt.<sup>[12,115]</sup> Einzelne Vertreter der oleophilen organischen Dünger wurden auf der Basis natürlicher Produkte, wie zum Beispiel Fischmehl, gefertigt.<sup>[116,117]</sup> Vor allem in offenen Gewässern, also zum Beispiel auf See, stellen die oleophilen Dungemittel eine attraktive Möglichkeit dar, das Auswaschen der wasserlöslichen, anorganischen Nährsalze zu umgehen.<sup>[118]</sup> Neben der Wirksamkeit der verschiedenen Modifikationen sollte vor allem ihre potentielle Toxizität im Fokus der Betrachtung stehen. So haben zum Beispiel hohe Ammoniumkonzentrationen, die als Stickstoffquelle in das marine System eingebracht werden, eine toxische Wirkung auf verschiedene, dort lebende Spezies.<sup>[12,119]</sup> Um die Eignung inklusive Toxizität der die Bioremediation unterstützenden Produkte zu überprüfen, stehen mehrere Standardmethoden zur Verfügung.<sup>[120-123]</sup> In jedem Fall ist darüber hinaus zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Randbedingungen den Einsatz unterschiedlicher Mittel fordern.<sup>[109]</sup> Dabei spielen zum Beispiel das Kompartiment, in dem das Öl abgebaut werden soll, die Temperatur oder mechanische Einflüsse, wie Wellengang oder Strömungsprozesse, eine wesentliche Rolle. Hinsichtlich der geeigneten Nährstoffeintragung zur Unterstützung und Förderung des mikrobiellen Ölabbau steht ausführliche Strategien und Empfehlungen zur Verfügung.<sup>[12]</sup> Die Bereitstellung beziehungsweise Eintragung von Nährstoffen zur Unterstützung des mikrobiellen Ölabbau im Falle eines Ölaustrittes in die marine Umwelt ist basierend auf den obigen Ausführungen vertretbar. Dabei ist die Berücksichtigung der jeweiligen Randbedingungen und Gegebenheiten von essentieller Bedeutung. Über die Art und Weise sowie das Maß der Nährstoffeintragung sollte jeweils individuell entschieden werden. Dabei sollte eine Orientierung an bestehenden Empfehlungen erfolgen, um negative Effekte, wie zum Beispiel die Eutrophierung des jeweiligen Gewässers, das Induzieren von Algenblüten oder eine erhöhte Sauerstoffzehrung bedingt durch zu hoch bemessene Nährstoffeintragungen, zu vermeiden.<sup>[118]</sup> Ergänzend dazu gibt der VPS Richtlinien vor, die den Einsatz von Nährstoffen an den deutschen Küsten vorgeben.<sup>[11]</sup>

### 3.2.3 Charakterisierung der Ölabbauleistung von Mikroorganismengemeinschaften

#### Selektionsversuch zur Ermittlung der Ölabbaueffizienz von Zweierkonsortien

In einem Selektionsversuch wurde die bakterielle Kultur Nr. 1 (*Rh. erythreus*) mit allen anderen 18 Reinkulturen kombiniert. Das Experiment wurde in OMB-Medium mit Ammonium als Stickstoffquelle (N:P 1:1) unter der Zugabe von 2 g/L Öl durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug zwei Wochen. Bezuglich der *n*-Alkane wurden vier Verbindungen beispielhaft herausgegriffen (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>), um den gesamten Bereich der Zielanalyten (*n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) stichprobenartig darzustellen.

Die absolute Verteilung der vier ausgewählten *n*-Alkanverbindungen ist für jedes der 18 Zweierkonsortien in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Absolute Verteilung der vier untersuchten *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>) in µg in den 18 Konsortienproben.

Aus den in Abbildung 16 dargestellten Daten kann die prozentuale Verteilung der vier *n*-Alkanverbindungen für jede Konsortienprobe berechnet werden. Verglichen mit den Daten aus Tabelle 6 wird deutlich, dass die prozentuale Verteilung von *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub> in den Konsortienproben der in den Reinkulturproben entspricht. Je 30 % entfallen auf die Verbindungen *n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub> und *n*-C<sub>24</sub> und etwa 10 % werden durch die Verbindung *n*-C<sub>31</sub> repräsentiert. Das heißt, dass auch in den Konsortienproben ein bevorzugter Abbau der kurzketigen *n*-Alkane stattgefunden hat.

Um die Einzelleistung der Bakterienreinkulturen mit der Abbauleistung im Konsortium zu vergleichen, erfolgt eine tabellarische Auflistung (siehe Tabelle 10). Die Pfeile in der letzten Spalte geben den Trend der Abbauleistung an, die durch die Kombination der Bakterienkulturen erzielt werden konnte (→ konstante Abbauleistung, ↑ gesteigerte Abbauleistung, ↓ reduzierte Abbauleistung). Ist die Summe der *n*-Alkanverbindungen in der Probe des Zweierkon-

sortiums deutlich niedriger als in den Proben der entsprechenden Reinkulturen, ist sowohl die Summe der *n*-Alkanverbindungen als auch die Probennummer fett gedruckt.

**Tabelle 10:** Summe der vier untersuchten *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>17</sub>, *n*-C<sub>21</sub>, *n*-C<sub>24</sub> und *n*-C<sub>31</sub>) in µg für die bakteriellen Reinkulturen und die Zweierkonsortien. Ist die Summe der *n*-Alkane in der Probe des Zweierkonsortiums deutlich niedriger als bei den einzelnen Reinkulturen, ist sowohl die Summe als auch die Probenbezeichnung fett gedruckt. → konstante Abbauleistung, ↑ gesteigerte Abbauleistung, ↓ reduzierte Abbauleistung.

Art	Reinkulturen		Zweierkonsortien		
	Probe	Summe <i>n</i> -Alkane in µg	Probe	Summe <i>n</i> -Alkane in µg	Tendenz der Abbauleistung
<i>Rh. erythreus</i>	1	8,8			
<i>Rh. erythreus</i>	2	4,3		5,0	1.2 →
<i>Rh. erythreus</i>	3	19,5		<b>3,7</b>	<b>1.3</b> ↑
<i>Rh. erythreus</i>	4	9,9		9,0	1.4 →
<i>Rh. erythreus</i>	5	4,5		9,9	1.5 ↓
<i>Rh. erythreus</i>	6	5,5		6,3	1.6 →
<i>Rh. erythropolis</i>	7	17,1		16,1	1.7 →
<i>Rh. erythropolis</i>	8	2,8		6,6	1.8 ↓
<i>Rh. erythropolis</i>	9	17,6		<b>5,6</b>	<b>1.9</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	10	21,2		<b>3,4</b>	<b>1.10</b> ↑
<i>Rh. corynebacterioides</i>	11	7,8		<b>3,1</b>	<b>1.11</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	12	12,4		<b>7,3</b>	<b>1.12</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	13	9,7		<b>5,9</b>	<b>1.13</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	14	9,0		<b>5,9</b>	<b>1.14</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	15	16,4		<b>4,5</b>	<b>1.15</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	16	4,4		11,9	1.16 ↓
<i>Rh. fascians</i>	17	7,9		<b>5,1</b>	<b>1.17</b> ↑
<i>Rh. fascians</i>	18	5,2		7,5	1.18 ↓
<i>Rh. fascians</i>	19	18,3		<b>8,0</b>	<b>1.19</b> ↑

Die Summe der untersuchten *n*-Alkane liegt in der Reinkulturprobe Nr. 1 mit 8,8 µg verglichen mit den anderen Reinkulturproben im mittleren Bereich. Bei der Kombination mit einer weiteren Bakterienkultur konnten die folgenden drei Varianten beobachtet werden: 1. die Abbauleistung sinkt (Zunahme der *n*-Alkansumme; 4 von 18 Proben), 2. die Abbauleistung bleibt im Wesentlichen konstant (konstante *n*-Alkansumme; 4 von 18 Proben), 3. die Abbauleistung steigt (Abnahme der *n*-Alkansumme; 10 von 18 Proben). In 10 der 18 Zweierkonsortienproben ist die *n*-Alkanmasse um mehr als Faktor 1,5 niedriger als bei einer der beiden kombinierten Reinkulturen alleine. In diesen Proben konnte demnach eine deutliche Abnahme der summierten *n*-Alkanmasse basierend auf gesteigerten Abbauprozessen durch die Kombination zweier Bakterienkulturen erreicht werden. Der prozentuale Abbau in diesen zehn Proben liegt zwischen 90 % und 96 %. Der prozentuale Abbau für alle untersuchten Zweierkon-

sortienproben sowie der prozentuale Abbau der einzelnen Reinkulturproben ist in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11:** Prozentualer *n*-Alkanabbau für die bakteriellen Zweikonsortienproben sowie der prozentuale *n*-Alkanabbau in den dazugehörigen Proben der Bakterienreinkulturen.

Art	Reinkulturen		Zweikonsortien	
	Probe	<i>n</i> -Alkanabbau in %	<i>n</i> -Alkanabbau in %	Probe
<i>Rh. erythreus</i>	1	89		
<i>Rh. erythreus</i>	2	95	94	1.2
<i>Rh. erythreus</i>	3	76	96	1.3
<i>Rh. erythreus</i>	4	88	89	1.4
<i>Rh. erythreus</i>	5	94	88	1.5
<i>Rh. erythreus</i>	6	93	92	1.6
<i>Rh. erythropolis</i>	7	79	80	1.7
<i>Rh. erythropolis</i>	8	97	92	1.8
<i>Rh. erythropolis</i>	9	78	93	1.9
<i>Rh. fascians</i>	10	74	96	1.10
<i>Rh. corynebacterioides</i>	11	90	96	1.11
<i>Rh. fascians</i>	12	85	91	1.12
<i>Rh. fascians</i>	13	88	93	1.13
<i>Rh. fascians</i>	14	89	93	1.14
<i>Rh. fascians</i>	15	80	95	1.15
<i>Rh. fascians</i>	16	95	85	1.16
<i>Rh. fascians</i>	17	90	94	1.17
<i>Rh. fascians</i>	18	94	91	1.18
<i>Rh. fascians</i>	19	78	90	1.19

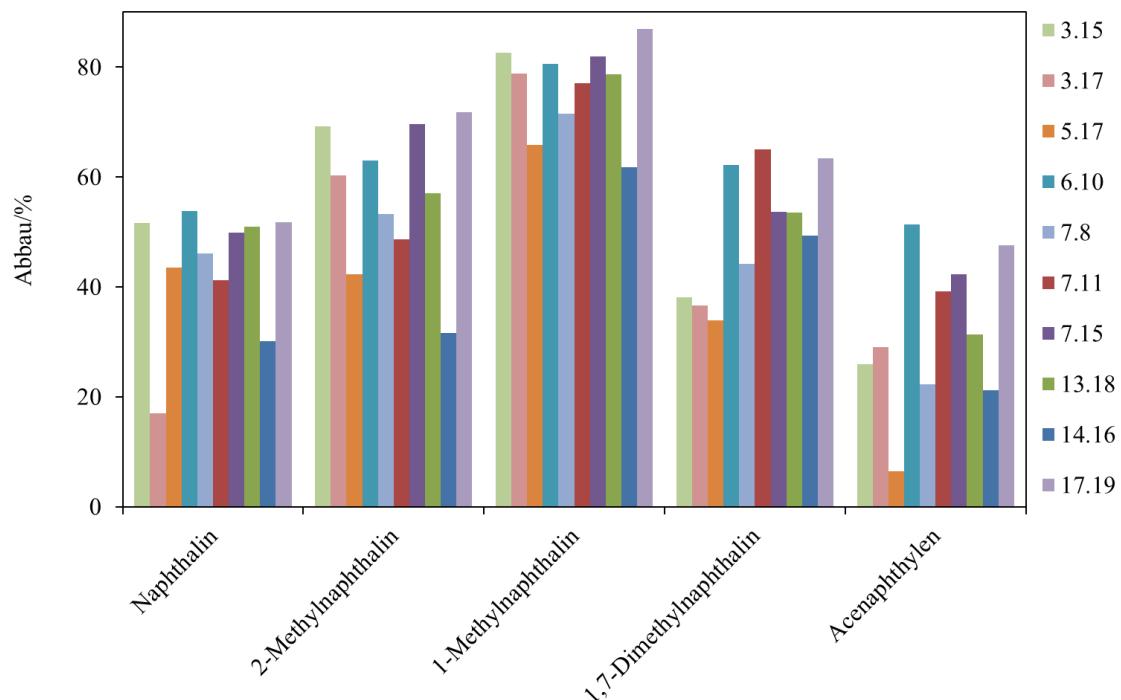
Der prozentuale mikrobielle *n*-Alkanabbau liegt für die Reinkulturproben zwischen 74 % (Probe Nr. 10, *Rh. fascians*) und 97 % (Probe Nr. 8, *Rh. erythropolis*). Für die 18 Konsortienproben konnte innerhalb von zwei Wochen ein *n*-Alkanabbau zwischen 80 % (Probe Nr. 1.7, *Rh. erythreus* und *Rh. erythropolis*) und 96 % (Probe Nr. 1.3, *Rh. erythreus*, 1.10, *Rh. erythreus* und *Rh. fascians*, und 1.11, *Rh. erythreus* und *Rh. corynebacterioides*) nachgewiesen werden. Dem in Tabelle 11 aufgelisteten Datensatz kann entnommen werden, dass bei Kombination zweier Bakterienreinkulturen weder die Tendenz noch das Ausmaß der Abbauleistung einem klar erkennbaren Muster folgen. So konnte zum Beispiel durch die Kombination von Kultur Nr. 1 (*Rh. erythreus*) mit mittlerer Abbauleistung (89 %) und Kultur Nr. 3 (*Rh. erythreus*) mit einer vergleichsweise geringen Abbauleistung (76 %) eine sehr gute Abbauleistung von 96 % erreicht werden. Umgekehrt führte die Kombination mit Kultur Nr. 16 (*Rh. fascians*), in der eine sehr gute Abbauleistung von 95 % berechnet werden konnte, zu einer Verminderung der Abbauleistung auf 85 %. Es konnten demnach keine eindeutigen synergetischen Effekte beobachtet werden.

In keiner der genannten 18 Zweierkonsortienproben konnte der mikrobielle Abbau von PAK-Verbindungen beobachtet werden. Dies entspricht den Beobachtungen in den Reinkulturproben und kann auf derselben Grundlage diskutiert werden (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Basierend auf Literaturergebnissen wird davon ausgegangen, dass der Einsatz von Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle bei gleichzeitigem Wirken von alkanabbauenden Bakterien zu einer Hemmung des PAK-Abbaus führte.<sup>[96,99]</sup>

### PAK-Analysen mit zehn ausgewählten Zweierkonsortien

Es wurden zehn weitere Zweierkonsortien aus den Bakterienreinkulturen zusammengestellt, bei denen von den Projektpartnern der Universität Leipzig basierend auf Vorversuchen ein positiver PAK-Abbau erwartet wurde. Diese Erwartung traf für alle zehn Zweierkonsortien zu. Dabei konnten jeweils für fünf PAK-Verbindungen Abbauerscheinungen nachgewiesen werden. Bei den übrigen untersuchten PAK wurde kein Abbau festgestellt.

In Bezug auf die Daten aus den Kontrollproben wurde aus den analysierten PAK-Massen der prozentuale PAK-Abbau in den zehn Konsortienproben berechnet und in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17:** Prozentualer Abbau der fünf detektierten PAK-Verbindungen, für die ein mikrobieller Abbau quantifiziert werden konnte, für zehn ausgewählte Zweierkonsortien.

Aus dem in Abbildung 17 dargestellten Datensatz geht hervor, dass in keiner der einzelnen Konsortienproben für alle fünf PAK-Verbindungen eine maximale oder minimale Abbauleistung quantifiziert werden konnte. Während zum Beispiel für die Probe 7.11 (*Rh. erythropolis*, *Rh. corynebacterioides*) mit 65 % der höchste Abbauwert für 1,7-Dimethylnaphthalin berechnet wurde, ist der dargestellte prozentuale Abbau von 2-Methylnaphthalin mit 49 % in dieser

Konsortiumprobe vergleichsweise niedrig. Insgesamt wurden in den Proben sehr unterschiedliche Werte für den PAK-Abbau quantifiziert. Das heißt, die Abbaueffizienz der Konsortien bezogen auf die einzelnen Verbindungen variiert.

In Tabelle 12 sind die Minima und Maxima des prozentualen Abbaus für die fünf PAK-Verbindungen mit der Angabe der zugehörigen Probenbezeichnung aufgeführt.

**Tabelle 12:** Minima und Maxima des prozentualen Abbaus der fünf PAK-Verbindungen, die bakteriell abgebaut wurden.

Substanz	Abbau in %		Abbau in %	
	Minimum	Probe	Maximum	Probe
Naphthalin	17	3.17	54	6.10
2-Methylnaphthalin	32	14.16	72	17.19
1-Methylnaphthalin	62	14.16	87	17.19
1,7-Dimethylnaphthalin	34	5.17	65	7.11
Acenaphthylen	6	5.17	51	6.10

Aus der Auflistung in Tabelle 12 geht hervor, dass die Werte für den prozentualen Abbau der einzelnen PAK-Verbindungen jeweils einen vergleichsweise großen Bereich umspannen (zwischen 25 und 45 Prozentpunkten). Der höchste Abbau konnte für 1-Methylnaphthalin beobachtet werden (87 %). Die niedrigsten Werte wurden für Acenaphthylen und Naphthalin berechnet (6 % beziehungsweise 17 %). Bei der Zuordnung der Minima und Maxima zu den entsprechenden Proben wird deutlich, dass die Minima und Maxima für die zwei Methylnaphthalinverbindungen jeweils demselben Bakterienkonsortium zugerechnet werden können. Diese Übereinstimmung findet sich nicht nur für die Bakterienkonsortien, deren Abbauleistung für diese Verbindungen minimal beziehungsweise maximal ist, sondern auch für die übrigen acht Konsortien. Eine Übersicht erfolgt in Tabelle 13.

**Tabelle 13:** Prozentualer Abbau von 2- und 1-Methylnaphthalin für zehn bakterielle Zweierkonsortien.

Probe	Abbau in %	
	2-Methylnaphthalin	1-Methylnaphthalin
14.16	32	62
5.17	42	66
7.11	49	72
7.8	53	77
13.18	57	79
3.17	60	79
6.10	63	81
3.15	69	82
7.15	70	83
17.19	72	87

Eine Staffelung der prozentualen Abbauleistung (in zunehmender Richtung) der zehn untersuchten Konsortien für 2- und 1-Methylnaphthalin liefert für beide Verbindungen dieselbe Reihenfolge der Probenbezeichnungen. Aus dem in Tabelle 13 aufgeführten Datensatz geht deutlich hervor, dass die Abbauleistung der jeweiligen Bakteriengemeinschaft für 1-Methylnaphthalin deutlich höher ist als für 2-Methylnaphthalin. Es besteht demnach eine Abbauselektivität hinsichtlich der beiden Regiosomere. Aus der Literatur ist eine mikrobielle Abbauselektivität bezüglich der Regiosomere von einfachmethyliertem Dibenzothiophen bekannt.<sup>[95]</sup> Die Selektivität des mikrobiellen PAK-Abbaus ist vermutlich auf die verbindungsspezifische Wirkungsweise der Enzyme zurückzuführen, die von den Bakterien produziert werden, um Sauerstoff in das aromatische Ringsystem der PAK einzubauen.<sup>[124]</sup>

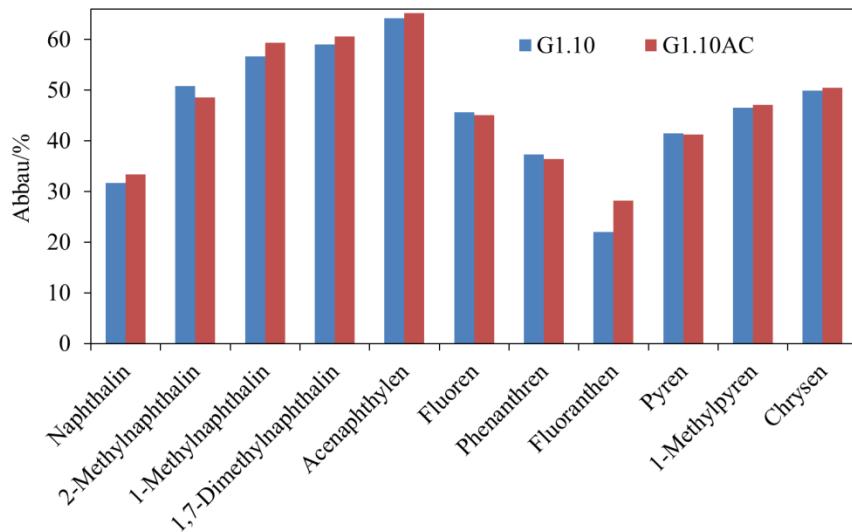
Basierend auf den Ausführungen in den vorhergehenden Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 kann davon ausgegangen werden, dass auch im gegenwärtigen Versuchsansatz die verwendete Stickstoffquelle sowie die Aktivität der alkanabbauenden Bakterien zu einer Hemmung des PAK-Abbaus geführt hat. Auf diese Hemmung kann eventuell der ausschließliche Abbau der Naphthalinverbindungen sowie Acenaphthylen zurückgeführt werden. Bei Naphthalin und Acenaphthylen handelt es sich um die PAK mit der kleinsten Molekülgröße. Daher gelten sie als die am leichtesten mikrobiell abzubauenden Verbindungen, da sich das Maß der Abbaubarkeit umgekehrt proportional zur Anzahl der Ringe im Molekül verhält.<sup>[91]</sup> Obwohl es sich bei Acenaphthylen und Acenaphthen um zwei Moleküle mit identischer Ringanordnung und somit identischer Größe handelt, konnte lediglich für Acenaphthylen ein mikrobieller Abbau beobachtet werden. Dieser ist vermutlich auf die gesteigerte Aromatizität von Acenaphthylen zurückzuführen.<sup>[18]</sup> Es kann spekuliert werden, dass in den Proben, in denen ein guter PAK-Abbau nachgewiesen werden konnte, ein vergleichsweise geringer *n*-Alkanabbau stattgefunden hat. Ein geringerer *n*-Alkanabbau hätte vermutlich eine geringere Absenkung des pH-Wertes zur Folge und würde demnach den PAK-Abbau weniger hemmen. Ein bevorzugter mikrobieller Abbau von aromatischen Verbindungen, insbesondere von Naphthalin, ist aus der Literatur durchaus bekannt.<sup>[95,97,125]</sup> Eventuell wurde durch die Kombination der Bakterienkulturen hinsichtlich des Abbauverhaltens eine Verschiebung der präferierten Substanzen induziert, die in den zuvor untersuchten Zweierkonsortien (Kombination der Probe Nr. 1 mit allen anderen 18 Reinkulturen) nicht stattgefunden hat.

### **PAK-Analysen mit einem mikrobiellen Konsortium**

Ein erster Versuch mit dem Dreierbakterienkonsortium „G1.10“ (Reinkultur Nr. 3 (*Rh. erythreus*) und Nr. 17 (*Rh. fascians*), im Folgenden bezeichnet als „G1“, und Nr. 10 (*Rh. fascians*)) sowie einer Kombination aus Bakterien, einer Alge (A) und einem Cyanobakterienstamm (C) wurde auf Algenmedium durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden im vorhergehenden Abschnitt beschrieben (5 g/L Rohöl, Nitrat als Stickstoffquelle, N:P 5:1, 45 Tage Inkubationsdauer). Es wurde lediglich eine Analyse der PAK durchgeführt.

Der prozentuale Abbau der einzelnen PAK-Verbindungen durch die Mikroorganismengemeinschaften bezogen auf die Kontrollprobe ist in Abbildung 18 dargestellt. In elf Verbin-

dungen konnte ein PAK-Abbau nachgewiesen werden. Da die prozentuale PAK-Abnahme in der Probe G1.10AC lediglich unwesentlich über oder unter den Werten für die reine Bakteriengemeinschaft liegt, hatte der Zusatz einer Alge und einer Cyanobakterienkultur zu der Dreierkonsortiengemeinschaft offensichtlich keinen Einfluss auf den in Abbildung 18 dargestellten mikrobiellen PAK-Abbau. Es handelt sich bei diesen Variationen vermutlich eher um eine Schwankung im Fehlerbereich als um einen interpretierbaren Unterschied hinsichtlich der Abbauleistung.

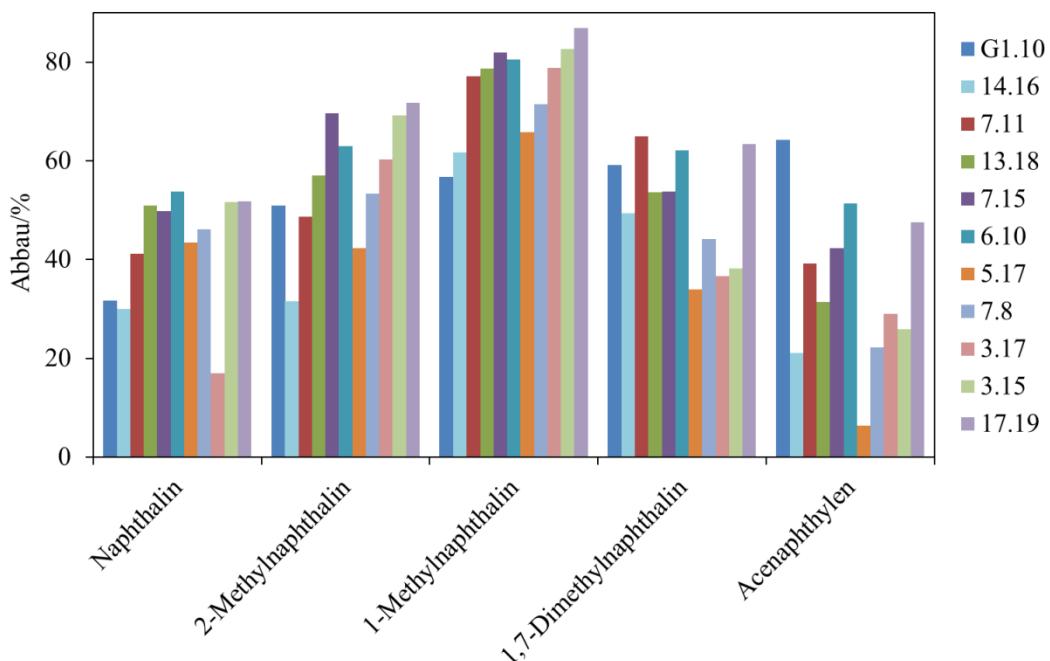


**Abbildung 18:** Vergleichende prozentuale PAK-Abnahme für eine Bakteriengemeinschaft bestehend aus drei Bakterienreinkulturen (G1.10) und die Kombination dieser Gemeinschaft mit einer Alge (A) und einem Cyanobakterium (C).

Zunächst soll ein Vergleich der in Abbildung 18 dargestellten Daten mit den einzelnen Reinkulturproben erfolgen, bei deren Inkubation ebenfalls das Algenmedium als Nährstoffquelle sowie eine identische Ölkonzentration eingesetzt wurde (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Verglichen mit der prozentualen PAK-Abnahme, die für diese drei einzelnen Reinkulturen berechnet werden konnte (vergleiche Tabelle 9), liegen die Werte für die durch das Dreierkonsortium erreichte prozentuale Abnahme in demselben Bereich oder niedriger. Für die Reinkulturen konnte der PAK-Abbau für zwölf Verbindungen nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Zahl der Bakterienstämme von eins auf drei in der Gemeinschaft führt demnach unter den gegebenen Bedingungen nicht zu einer Verbesserung der PAK-Abbaueffizienz.

Des Weiteren erfolgt ein Vergleich mit den in diesem Abschnitt bereits diskutierten Ergebnissen der Zweierkonsortienproben. Es wird darauf hingewiesen, dass bei diesen Proben Ammonium als Stickstoffquelle sowie eine geringere Ölkonzentration ( $c = 2 \text{ g/L}$ ) eingesetzt wurde. Es wurden 28 Proben untersucht, in denen jeweils zwei Bakterienreinkulturen kombiniert worden sind. Dabei konnte in zehn Proben ein PAK-Abbau nachgewiesen werden. Der Abbau beschränkte sich auf fünf Verbindungen (vergleiche Abbildung 17) und konnte somit für weniger Verbindungen beobachtet werden als bei dem Dreierkonsortium (Abbau von elf Verbindungen). Der prozentuale Abbau der fünf durch die Zweierkonsortien abgebauten Verbin-

dungen ist in Abbildung 19 vergleichend für das Dreierkonsortium G1.10 sowie für die Zweiergemeinschaften dargestellt.



**Abbildung 19:** Prozentualer Abbau von fünf PAK-Verbindungen in einem bakteriellen Dreierkonsortium (G1.10) und zehn Zweierkonsortienproben.

Aus Abbildung 19 geht hervor, dass lediglich für Acenaphthylen in der Probe des Dreierkonsortiums ein höherer Abbau nachgewiesen werden konnte als in allen zehn Proben der Zweiergemeinschaften. Der prozentuale Abbau liegt dabei zwischen 15 und 60 Prozentpunkten höher. Diese Abbausteigerung ist nicht eindeutig auf den Einsatz von einer Kombination aus drei Bakterienreinkulturen zurückzuführen, da der PAK-Abbau in den Proben der Zweiergemeinschaften wahrscheinlich durch die Verwendung von Ammoniumsalzen und den zeitgleich stattfindenden mikrobiellen *n*-Alkanabbau gehemmt wurde.<sup>[96,99]</sup> Für 1,7-Dimethylnaphthalin konnte in drei Proben der Zweiergemeinschaften ein geringfügig höherer Abbau als in der Probe des Dreierkonsortiums beobachtet werden. In den verbleibenden sieben Proben der Zweiergemeinschaften lag der prozentuale Abbau zwischen 6 und 26 Prozentpunkten unterhalb des Wertes, der für die Dreiergemeinschaft quantifiziert werden konnte. Für Naphthalin sowie 1- und 2-Methylnaphthalin liegt der Abbau bei nahezu allen Proben der Zweierkonsortien deutlich (bis zu 20 Prozentpunkte) oberhalb des Wertes aus der Probe der Dreiergemeinschaft. Lediglich die Minimalwerte für Naphthalin und 2-Methylnaphthalin unterschreiten den Vergleichswert, der von der Dreiergemeinschaft erzielt werden konnte deutlich. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 angesprochen wurde, könnte diese Differenz auf das unterschiedliche Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor, das in den Proben vorlag, zurückzuführen sein. Während das N:P-Verhältnis in den Zweiergemeinschaften bei 1:1 lag, betrug es in den Proben der Dreierkonsortien 5:1. Es kann spekuliert werden, dass ein N:P-Verhältnis von

1:1 speziell den Abbau von Naphthalinverbindungen sowie deren einfachmethylierten Homologen unterstützt.<sup>[102]</sup>

### **Untersuchungen mit weiteren Dreierbakteriengemeinschaften mit und ohne Algenzusatz**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden ergänzende Dreierkonsortien aus den Reinkulturproben gebildet. Die Basis der Gemeinschaften bestand aus den Reinkulturen Nr. 3 (*Rh. erythreus*) und Nr. 17 (*Rh. fascians*), im Folgenden als „G1“ bezeichnet, und wurde jeweils mit einem weiteren Bakterienstamm (Nr. 5 (*Rh. erythreus*), 7 (*Rh. erythropolis*), 10, 15 oder 19 (jeweils *Rh. fascians*)) kombiniert. Die Bakteriengemeinschaften wurden als solche und in Kombination mit einer Alge untersucht. Die Versuche wurden auf OMB-Medium (Ammonium als Stickstoffquelle, N:P 1:1) unter der Zugabe von 5 g/L Rohöl über einen Zeitraum von zwei Wochen durchgeführt. Für die Gemeinschaften G1.5 und G1.19 wurde eine Zeitreihenanalyse durchgeführt.

Bei der Untersuchung der *n*-Alkane wurden die Verbindungen *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>35</sub> betrachtet. Der *n*-Alkanabbau betrug in den Proben aller Bakteriengemeinschaften nach einer Versuchsdauer von zwei Wochen 100 %. In den Proben aus der Zeitreihenanalyse konnten lediglich am ersten Tag nach dem Versuchsbeginn *n*-Alkane quantifiziert werden. Für das Konsortium G1.5 konnte nach einem Tag Inkubationsdauer ein *n*-Alkanabbau von 7 % berechnet werden. Das Konsortium G1.19 hatte zu diesem Zeitpunkt bereits 19 % der *n*-Alkane abgebaut. Bereits am vierten Tag des Versuches konnten keine *n*-Alkane mehr in den Bakterienproben nachgewiesen werden.

Der *n*-Alkanabbau war bereits bei den Bakteriengemeinschaften bestehend aus zwei Stämmen durchaus zufriedenstellend, konnte jedoch durch die Kombination aus drei Bakterienkulturen nochmals gesteigert werden. Durch den vollständigen Abbau in allen Proben war es nicht möglich, den Einfluss des Algeneinsatzes auf die Abbauleistung zu bestimmen. Es wurde lediglich deutlich, dass der Algenzusatz den *n*-Alkanabbau nicht deutlich negativ beeinflusst.

Im Rahmen der Zeitreihenanalyse konnte für die Gemeinschaften G1.5 und G1.19 (jeweils *Rh. erythreus* und *Rh. fascians*) der Abbau von Naphthalin und dessen einfach alkylierten Homologen nachgewiesen werden, der in Abhängigkeit zur Inkubationszeit steht. Der prozentuale Abbau dieser drei Verbindungen ist für beide Zeitreihenanalysen in Abbildung 20 dargestellt. In den ersten sieben Tagen kann nahezu keine mikrobielle Abbauaktivität beobachtet werden. Die in Abbildung 20 dargestellten Werte für den prozentualen Abbau innerhalb der ersten sieben Tage des Versuches schwanken im Bereich bis zu maximal 7 %. Es ist davon auszugehen, dass diese Variationen im Fehlerbereich liegen und somit als zufällige Schwankungen betrachtet werden sollten. Am elften Tag des Versuchszeitraumes waren die PAK-Massen für beide Gemeinschaften deutlich niedriger als in den vorhergehenden Proben, sodass bezogen auf die Kontrollprobe ein höherer Abbau berechnet wurde. Im Gegensatz zu den geringen Schwankungen innerhalb der ersten sieben Versuchstage, zeichnet sich der Abbauwert für Tag 11 deutlich ab.

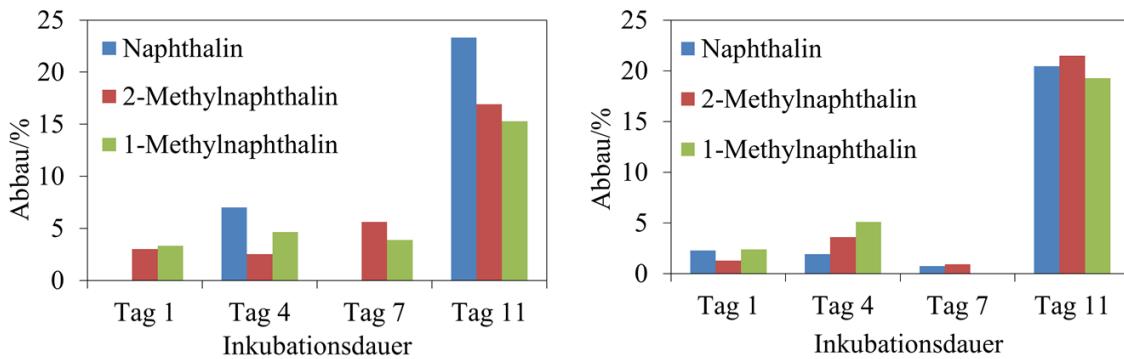


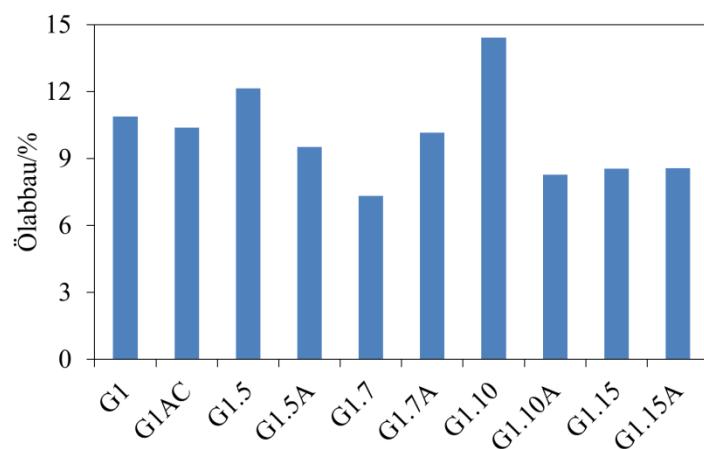
Abbildung 20: Prozentualer Abbau einzelner PAK-Verbindungen in % für G1.5 (links) und G1.19 (rechts) über einen Inkubationszeitraum von elf Tagen.

Mittels t-Test (siehe Abschnitt 5.5) konnte mit einer statistischen Sicherheit von 99 % (98 % für Naphthalin bei G1.5) belegt werden, dass sich der in Abbildung 20 dargestellte Wert für den Abbau an Tag 11 für alle drei dargestellten PAK-Verbindungen signifikant von den vorhergehenden Werten unterscheidet. Es wird deutlich, dass die Mikroorganismen eine Zeit der Initialisierung benötigen, bis der mikrobielle PAK-Abbau einsetzt. Diese in der Literatur als „lag time“ bezeichnete Zeitspanne umfasst in der Regel fünf bis sechs Tage und kann durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel die vorliegende Bakteriendichte, die Öltoleranz der vorhandenen Bakterien im Freiland, die Art und Menge der Nährstoffzugabe oder auch das Auftreten flüchtiger, toxischer Verbindungen, beeinflusst werden.<sup>[99,104,118,126,127]</sup>

Aufgrund des mehrfach angesprochenen Einflusses der Stickstoffquelle auf den mikrobiellen PAK-Abbau kann an dieser Stelle lediglich ein Vergleich mit den in Abschnitt 3.2.1 behandelten Reinkulturen sowie mit den zu Beginn dieses Abschnittes behandelten Zweierkonsortien erfolgen. Bei diesen Proben wurde ebenfalls OMB-Medium und somit Ammonium als Stickstoffquelle eingesetzt. Bei den Zweierkonsortien wurde jedoch mit einer geringeren Ölkonzentration (2 g/L) gearbeitet. Diese geringere Ölkonzentration bedingte eine prozentual höhere Menge an vorhandenem Stickstoff von 1,5 % bezogen auf die Masse des eingesetzten Öls. Im gegenwärtigen Versuchsanansatz beträgt die verfügbare Menge Stickstoff lediglich 0,6 %. Bei den Bakterienreinkulturen konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein PAK-Abbau nachgewiesen werden (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Bei den Zweierkonsortien konnte für einige Bakteriengemeinschaften (10 von 28) ein Abbau der vier Naphthalinverbindungen sowie von Acenaphthylen beobachtet werden (siehe Abbildung 19). In den verbleibenden 18 Zweierkonsortien fand kein PAK-Abbau statt. Für die Dreiergemeinschaften wurde bei drei Verbindungen ein Abbau quantifiziert, der für jede dieser drei Verbindungen weit unterhalb der Werte liegt, die für die Zweiergemeinschaften quantifiziert werden konnten (vergleiche Abbildung 19). Die Differenz liegt dabei ungefähr zwischen 10 und 65 Prozentpunkten. Die beobachtete Abbauleistung der Dreiergemeinschaften liegt demnach über der Leistung der Reinkulturen (dort konnte kein PAK-Abbau beobachtet werden), aber deutlich unter der Abbaueffizienz der Zweierkonsortien. Während die Kombination von zwei Bakterienreinkulturen zu einer Abbausteigerung führte, konnte bei der zusätzlichen Ergänzung um eine dritte Bakterienkultur eine Abnahme des prozentualen PAK-Abbaus nachgewiesen wer-

den. Eine durch diese Art der Co-Kultivierung induzierte Verschlechterung der Abbauleistung kann zum Beispiel auf die toxische Wirkung der Abbauprodukte der anderen vorliegenden Bakterienstämme oder eine direkte Wachstumshemmung zurückzuführen sein.<sup>[32,128]</sup> Diese Wachstumshemmung könnte zu einer Verlängerung der „lag time“ führen, sodass es zu einer Verzögerung des Anfangszeitpunktes des PAK-Abbaus kommt.<sup>[126]</sup> Es kann vermutet werden, dass bei einer längeren Inkubationszeit der PAK-Abbau durch die Dreierkonsortien weiter angestiegen wäre und eventuell Werte erreicht hätte, die mit denen aus den Zweierkonsortienproben vergleichbar gewesen wären. Um diese These stichhaltig zu überprüfen, müssten für die Bakteriengemeinschaften Zeitreihenanalysen durchgeführt werden, deren Inkubationsdauer (deutlich) über zwei Wochen liegt. Leider waren wir innerhalb dieses Themenkomplexes auf die Zuarbeit der Leipziger Kollegen angewiesen, sodass diesbezüglich keine vertiefenden Untersuchungen durchgeführt worden sind, da diese den Rahmen des Projektes BioBind deutlich überschritten hätten.

Um einen Eindruck davon zu bekommen, wie die Mikroorganismen mit der Gesamtmatrix Rohöl umgehen, wurden im Rahmen der Untersuchungen zu der Abbauleistung der Dreiergemeinschaft mit und ohne Zusatz weiterer Mikroorganismenspezies (Alge und Cyanobakterium) gravimetrische Analysen durchgeführt. So konnte der Masseverlust des Rohöls berechnet werden, der auf mikrobielle Abbauprozesse induzierten molekularen Veränderungen erfasst, sondern lediglich diejenigen, die zu der Produktion von flüchtigen Abbauprodukten oder H<sub>2</sub>O führen. Das beim vollständigen mikrobiellen Abbau entstehende CO<sub>2</sub> sowie flüchtige Zwischenprodukte, zum Beispiel kurzkettige Alkanverbindungen, verdampfen aus dem System und das entstehende H<sub>2</sub>O wird durch die Extraktion und anschließende Trocknung bei der Aufarbeitung der Proben nicht erfasst. Die vergleichende Darstellung für verschiedene Mikroorganismengemeinschaften erfolgt in Abbildung 21.

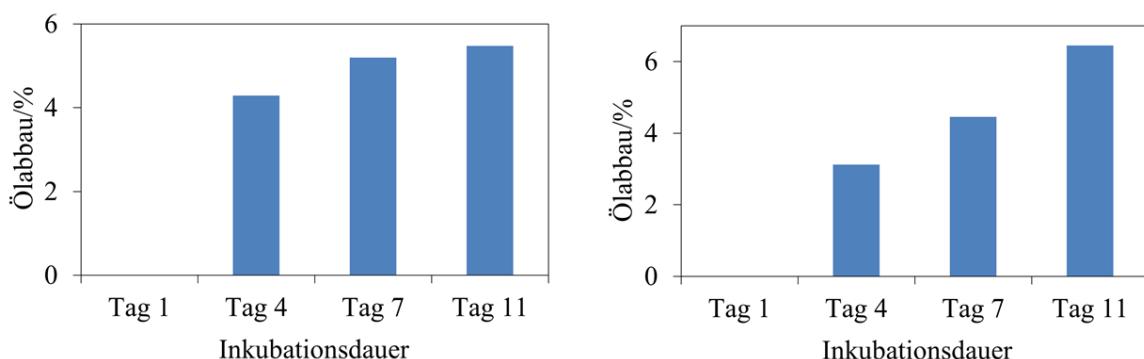


**Abbildung 21:** Prozentualer Ölabbau bezogen auf die Kontrollprobe basierend auf gravimetrischen Daten für verschiedene Mikroorganismengemeinschaften.

Der mikrobielle Ölabbau für die Zweiergemeinschaft G1 (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians*) beträgt rund 11 %. Setzt man der Gemeinschaft eine Alge und ein Cyanobakterium hinzu, ändert sich die Abbauleistung lediglich so geringfügig, dass kein eindeutig positiver oder negativer Einfluss durch die Erweiterung der Zweierbakteriengemeinschaft durch weitere Mikroorganismen festgestellt werden kann. Bei dem Vergleich der übrigen Dreierkonsortien mit und ohne Algenzusatz sind die Ergebnisse sehr wechselhaft. Für die Gemeinschaften G1.5 und G1.10 (jeweils *Rh. erythreus* und *Rh. fascians*) ist die Abbauleistung mit Algenzusatz geringer. Dabei sinkt die Abbaueffizienz für die Gemeinschaft G1.5 um etwa 20 %, während sie für die Gemeinschaft G1.10 um etwa 40 % abfällt. Für das Konsortium G1.7 (*Rh. erythreus*, *Rh. erythropolis*, *Rh. fascians*) erhöht sich die Abbauleistung etwa um ein Drittel von 7 % auf 10 %. Bei dem verbleibenden Konsortium G1.15 (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians*) zeigt der Algenzusatz gar keinen Einfluss auf den ermittelten Ölabbau. Der Zusatz weiterer Mikroorganismen (Algen und Cyanobakterien) wirkt sich demnach sehr unterschiedlich auf die Ölabbauleistung der Bakteriengemeinschaften aus. Lediglich bei der Kombination mit *Rh. erythropolis* in der Gemeinschaft G1.7 ist ein leistungssteigernder Effekt zu beobachten. Die leistungsmindernde Wirkung des Algenzusatzes könnte auf eine verstärkte Nährstofflimitierung durch den Einsatz der phototrophen Spezies zurückzuführen sein. In dem Fall wären Bakterien und die zugesetzte Alge Nährstoffkonkurrenten.

Ein Vergleich der Abbauleistung der Zweierbakteriengemeinschaft mit der Leistung der Dreierkonsortien zeigt, dass die Werte zu 50 % niedriger (G1.7 und G1.17) und zu 50 % höher (G1.5 und G1.10) sind als der Wert für die Gemeinschaft G1. Eine gesteigerte Abbauleistung durch die Ergänzung einer Zweiergemeinschaft durch eine dritte Bakterienkultur konnte demnach auch bei Betrachtung der Gesamtmatrix Öl nicht ohne Einschränkungen belegt werden. Auch hier liegt es nahe, dass das Zusammenwirken der einzelnen Bakterienstämme sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf das Abbauverhalten haben kann.

Um den Ölabbau bezogen auf die Inkubationsdauer diskutieren zu können, sind in Abbildung 22 die gravimetrisch ermittelten Ergebnisse der Zeitreihenanalyse für die Gemeinschaften G1.5 und G1.19 dargestellt.



**Abbildung 22:** Prozentualer Ölabbau bezogen auf die jeweiligen Kontrollprobe für G1.5 (links) und G1.19 (rechts) über einen Inkubationszeitraum von elf Tagen.

Für beide in Abbildung 22 dargestellten Datensätze wurde der Trendtest nach Neumann durchgeführt (siehe Abschnitt 5.5). Lediglich für den Datensatz der Gemeinschaft G1.19 konnte mit einer statistischen Sicherheit von 95 % belegt werden, dass der prozentuale Ölabbau bezogen auf die Kontrollprobe über den Inkubationszeitraum ansteigt. Da der Anstieg basierend auf den in Abbildung 22 dargestellten Daten nicht eindeutig als abgeschlossen betrachtet werden kann, ist es nicht auszuschließen, dass der mikrobielle Ölabbau nach elf Tagen lediglich durch das Ende des Versuches abgebrochen wurde. Somit ist der maximal mögliche Ölabbau durch die Mikroorganismen vermutlich noch gar nicht quantifiziert worden. Weitere Untersuchungen dazu fanden unter *in-situ*-Bedingungen (siehe Abschnitt 3.3) statt.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass der mikrobielle *n*-Alkanabbau durch die Kombination der Bakterienreinkulturen zu Zweiergemeinschaften in über 50 % der Proben innerhalb von einer zweiwöchigen Inkubationszeit gesteigert werden konnte. Dabei lag der prozentuale *n*-Alkanabbau zwischen 80 % für die Probe Nr. 1.7 (*Rh. erythreus*, *Rh. erythropolis*) und 96 % für die Proben Nr. 1.3 (*Rh. erythreus*), 1.10 (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians*) und 1.11 (*Rh. erythreus*, *Rh. corynebacterioides*). Eine vergleichende Betrachtung der prozentualen Abbauleistung von Reinkulturen und Zweiergemeinschaften zeigt, dass keine eindeutigen synergetischen Muster erkennbar sind. Eine Vorhersage der Abbauleistung der Gemeinschaft anhand der Abbauleistungen der Reinkulturen ist demnach nicht möglich. Des Weiteren konnte keine Abhängigkeit der Abbauleistung von der jeweils eingesetzten Bakterienart beobachtet werden. Die prozentuale Zusammensetzung der untersuchten *n*-Alkane verändert sich durch den Einsatz der bakteriellen Zweiergemeinschaften nicht. Des Weiteren konnte herausgearbeitet werden, dass *n*-Alkanverbindungen kürzerer Kettenlänge von allen eingesetzten Bakteriengemeinschaften bevorzugt gegenüber den langkettigen Verbindungen abgebaut werden.

Bei der Kombination zu Dreiergemeinschaften konnte für fünf Konsortien gezeigt werden, dass der *n*-Alkanabbau nach zwei Wochen bei 100 % lag. Anhand von Zeitreihenanalysen konnte nachgewiesen werden, dass der Abbau der *n*-Alkane nach einem Tag für die Gemeinschaft G1.5 7 % und für die Gemeinschaft G.19 19 % betrug. Bereits nach vier Tagen waren unter den gegebenen Versuchsbedingungen 100 % der untersuchten *n*-Alkane durch die beiden Gemeinschaften abgebaut worden.

Bezogen auf den *n*-Alkanabbau führt die Kombination von Bakterienreinkulturen zu Zweier- beziehungsweise Dreiergemeinschaften zu einer Steigerung der Abbauleistung.

Bei der Untersuchung der PAK-Abbauleistung durch bakterielle Zweiergemeinschaften unter der Verwendung von Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle konnte nach zwei Wochen in 10 von 18 Proben der Abbau von fünf PAK-Verbindungen nachgewiesen werden. Die Abbauleistung lag zwischen 6 % für Acenaphthylen und 87 % für 1-Methylnaphthalin. Im Rahmen der fünf abgebauten PAK lagen die Minima und Maxima der prozentualen Abbauleistung jeweils bei verschiedenen Konsortien, sodass keine klare Tendenz hinsichtlich einer abbau-starken Gemeinschaft zu erkennen war. Durch die Kombination von Bakterienreinkulturen zu

Zweiergemeinschaften kann zum Teil eine Steigerung der PAK-Abbauleistung erreicht werden.

Die bakterielle Dreiergemeinschaft aus den Proben Nr. 3 (*Rh. erythreus*), 10 und 17 (jeweils *Rh. fascians*) unter Zugabe von Nitratstickstoff zeigte nach einer Inkubationszeit von 45 Tagen einen PAK-Abbau bei elf Verbindungen, der zwischen 20 % für Fluoranthen und 60 % für Acenaphthylen lag. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte keine Steigerung der Abbauleistung durch die Erhöhung der Bakterienzahl von eins auf drei beobachtet werden.

Im Rahmen eines Zeitreihenexperimentes mit zwei bakteriellen Dreiergemeinschaften (G1.5 und G1.19, jeweils *Rh. erythreus* und *Rh. fascians*) konnte unter der Verwendung von Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle die PAK-Abbauleistung für drei Verbindungen bestimmt werden. Für die Gemeinschaft G1.5 lag sie nach elf Tagen Inkubationsdauer zwischen 15 % für 1-Methylnaphthalin und 23 % für Naphthalin, für die Gemeinschaft G1.19 zwischen 19 % für 1-Methylnaphthalin und 21 % für 2-Methylnaphthalin. Insgesamt war die Abbauleistung der beiden Dreiergemeinschaften deutlich niedriger als bei den untersuchten Zweiergemeinschaften. Es ist davon auszugehen, dass bei der Erhöhung der Bakterienzahl von zwei auf drei Effekte auftreten, die den PAK-Abbau hemmen.

Bezogen auf den Abbau der PAK kann die Steigerung der Abbauleistung durch die Kombination mehrerer Bakterienkulturen zu einem Konsortium nicht eindeutig belegt werden. Zum Teil konnte sogar eine hemmende Wirkung durch den Einsatz von Bakteriengemeinschaften beobachtet werden.

Anhand von gravimetrischen Untersuchungen wurde keine deutliche Verbesserung durch die Vergrößerung des bakteriellen Konsortiums von zwei auf drei Bakterienkulturen beobachtet. Der prozentuale Ölabbau für die Zweiergemeinschaft G1 (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians*) lag bei 11 %, während der Ölabbau für vier bakterielle Dreiergemeinschaften zwischen 7 % für G1.7 (*Rh. erythreus*, *Rh. erythropolis*, *Rh. fascians*) und 14 % für G1.10 (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians*) lag.

Ein eindeutig leistungssteigernder Effekt durch die Kombination einer Algen- und/oder Cyanobakterienkultur mit einer bakteriellen Gemeinschaft konnte in keiner Untersuchung bestätigt werden.

Während basierend auf den vorgestellten Ergebnissen davon auszugehen ist, dass der *n*-Alkanabbau unmittelbar nach der Ölzugabe einsetzt, konnte gezeigt werden, dass der mikrobielle PAK-Abbau unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach acht bis elf Tagen Inkubationsdauer beginnt.

Die im vorhergehenden Abschnitt formulierte Hypothese bezüglich des hemmenden Einflusses des N:P-Verhältnisses auf den Abbau von Naphthalin wird durch die vergleichsweise niedrigen Werte für den prozentualen Naphthalinabbau in den durchgeföhrten Experimenten mit entsprechendem N:P-Verhältnis (5:1) bestätigt. Es wird vermutet, dass die Zugabe von

Stickstoff und Phosphor im Verhältnis 1:1 hingegen den Abbau von Naphthalin und dessen alkylierten Homologen begünstigt.

Die Werte für den prozentualen Abbau von 1-Methylnaphthalin lagen bei allen zehn untersuchten Zweierkonsortien zwischen 13 Prozentpunkten und 30 Prozentpunkten höher als die entsprechenden Werte für den Abbau von 2-Methylnaphthalin. Es konnte demnach für die Regioisomere eine mikrobielle Abbauselektivität nachgewiesen werden.

### **Fazit der Untersuchungen zum mikrobiellen Ölabbau**

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, aus der Ostsee isolierte Mikroorganismen sowohl als Reinkulturen als auch in Form von zusammengestellten Gemeinschaften hinsichtlich ihrer ölabbauenden Eigenschaften qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Neben der Bereitschaft der untersuchten Mikroorganismen Öl in einem wässrigen System abzubauen, wurde anhand der generierten Ergebnisse deutlich, dass die Zahl und das Ausmaß der Einflussfaktoren groß sind und deren präzise Bestimmung zum Teil sehr komplex ist. Basierend auf den durchgeführten Untersuchungen erfolgte durch die Projektpartner der Universität Leipzig die Zusammenstellung des finalen Mikroorganismenkonsortiums aus Reinkultur Nr. 3 (*Rh. erythreus*), 10 (*Rh. fascians*) und 17 (*Rh. fascians*) sowie einem Algenstamm.

Auch wenn die oben genannte Komplexität der Einflussfaktoren durch den Transfer ins Freiland erweitert wird, bieten die erzielten Ergebnisse eine solide Grundlage, auf der der Einsatz der isolierten Mikroorganismen zur Unterstützung des mikrobiellen Ölabbau unter Realbedingungen vertreten werden kann. Dabei erscheint die maßvolle Zugabe von Stickstoff und Phosphor zur Unterstützung der Abbauaktivitäten sinnvoll. Im konkreten Fall können die entwickelten Ölbinder eine interessante Möglichkeit bieten, um die einzubringenden Nährstoffe zu fixieren. Dabei ist zu überlegen, ob die Nährstoffe den Mikroorganismen lediglich auf den Bindern zur Verfügung stehen sollen oder ob ein gezielter Nährstoffeintrag in das umliegende System erwünscht ist, um auch dort den mikrobiellen Ölabbau anzuregen und zu unterstützen. Da es bislang wenige Studien gibt, die die Effektivität von Bioremediation auf offener See belegen, ist der gezielte Einsatz von Nährstoffen auf den Bindern erstrebenswert.<sup>[118]</sup> Wird durch die Fixierung auf den Bindern eine Abgabe der Nährstoffe in das umliegende marine System vermieden, würden negative Folgeerscheinungen des Nährstoffeintrages in den Hintergrund treten.

## **3.3 Ölaufnahme der Binder und mikrobieller Ölabbau unter *in-situ*-Bedingungen**

Ziel dieser Experimente war es, den kombinierten Einsatz von Ölbndern und Mikroorganismen unter *in-situ*-Bedingungen zu untersuchen, wobei sowohl das Verhalten der Einzelkomponenten als auch deren gegenseitige Beeinflussung im Fokus stand.

Bezogen auf die Ölbinder wurde die Ölaufnahme und -abgabe unter freilandähnlichen Bedingungen in Meerwasser und bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Dabei war sowohl die in der Wasserphase verbleibende Ölmasse als auch das von den Bindern gebundene Öl von Interesse. Die Kombination von Mikroorganismen und Ölbndern erfolgte mittels verschiedener Verfahren, deren Eignung und Auswirkungen auf die Bindereigenschaften ebenfalls untersucht wurden.

Hinsichtlich des ausgewählten Mikroorganismenkonsortiums lag der Fokus auf der Quantifizierung der Ölabbauleistung (Öl als Gesamtmatrix sowie *n*-Alkane und PAK) in einem freilandähnlichen Milieu und deren Beeinflussung durch die Temperatur und die vorliegende Nährstoffsituation. Auch die potentiell ölabbauende Aktivität der bereits im Ostseewasser vorhandenen Mikroorganismengemeinschaft sowie deren Wirkung auf das zugegebene Konsortium wurde untersucht. Zudem wurde überprüft, ob der mikrobielle Ölabbau lediglich in der Wasserphase oder auch auf den Ölbndern stattfindet.

Der Fokus der durchgeführten Sauerstoff-, Phosphat- und Ammoniummessungen lag nicht darauf, Rückschlüsse auf mikrobielle Ölabbauprozesse zu ziehen. Stattdessen erfolgte die Überwachung der genannten Parameter, um zu jedem Zeitpunkt des Experiments vergleichbare Bedingungen für den mikrobiellen Ölabbau gewährleisten zu können. Dieses Vorgehen verringert die Zahl der unbekannten Faktoren, die den mikrobiellen Ölabbau beeinflussen und eventuell stören können.

Da ein Öleintrag in die Ostsee zu Untersuchungszwecken nicht bewilligt wurde, konnten die weiterführenden Untersuchungen zur Ölaufnahme durch die Binder und zum mikrobiellen Ölabbau nicht direkt im Freiland durchgeführt werden. Alternativ dazu wurden Experimente unter freilandähnlichen Bedingungen entwickelt, die in sogenannten Mesokosmen durchgeführt wurden. Die Versuchsbedingungen in diesen Mesokosmen lagen im Mittelfeld zwischen Labor- und Freilandbedingungen und konnten zu jedem Zeitpunkt lediglich einen Kompromiss darstellen, der die Freilandbedingungen niemals vollständig repräsentiert. Diese Art der Versuchsbedingungen wird hier durch den Begriff *in-situ* beschrieben. Als Mesokosmen wurden Polyethylentanks (rückstandsfrei, V = 1 m<sup>3</sup>) bezeichnet, die in ihrem Design auf die Anforderungen, zum Beispiel die Möglichkeit einer kontaminationsfreien Beprobung des Wasserkörpers, angepasst wurden.

Es wurden drei Mesokosmenexperimente mit insgesamt 16 verschiedenen Tankansätzen durchgeführt. In den folgenden Abschnitten erfolgt lediglich die Darstellung der Ergebnisse, die für die Behandlung der jeweiligen Fragestellung zielführend ist. Demnach wird nicht in jedem Abschnitt auf alle 16 Tankansätze eingegangen.

### **3.3.1 Versuchsaufbau**

Die Versuchsbedingungen in den Mesokosmen wurden so gewählt, dass die *in-situ*-Bedingungen zum einen weitestgehend den Freilandbedingungen entsprachen und zum ande-

ren jegliche notwendige beziehungsweise unvermeidliche Abweichung von den Freilandbedingungen das System im Mesokosmos und somit die zu generierenden Ergebnisse möglichst wenig beeinflusste. Eine detaillierte Beschreibung ist in 5.2.4 zu finden.

Basierend auf Zustandsberichten aus der Ostsee wurden die Konzentrationen von Phosphat- und Ammoniumionen auf  $1 \mu\text{mol/L}$  beziehungsweise  $10 \mu\text{mol/L}$  eingestellt.<sup>[129]</sup> Den Mikroorganismen wurde demnach eine für die Ostsee realistische, im Vergleich mit anderen Experimenten dieser Art deutlich niedrigere Nährstoffmenge zur Verfügung gestellt.<sup>[130]</sup> Die in den Mesokosmen eingesetzte Stickstoffmenge lag um den Faktor 200 niedriger als in dem von Suni et al. durchgeführten Experiment.<sup>[130]</sup> Stickstoff wurde in Form eines Ammoniumsalzes zugeführt. Aufgrund der Größe der Mesokosmen und den dadurch bedingten Verdünnungseffekt ist kein hemmender Einfluss auf den PAK-Abbau durch die Art der Stickstoffquelle beim gleichzeitigen Wirken verschiedener ölabbauender Mikroorganismen zu erwarten (vergleiche Abschnitt 3.2).

In jedem der drei Experimente wurde in dem Tank, der lediglich mit Meerwasser gefüllt wurde, die Temperatur über den gesamten Versuchszeitraum aufgezeichnet. Die detaillierten Temperatur Daten sind in Abschnitt 5.6.2 dargestellt.

In der folgenden Tabelle 14 ist die Tankübersicht des ersten Mesokosmenexperimentes dargestellt. Die Laufzeit des Experimentes betrug 30 Tage. Die mittlere Temperatur in den Tanks lag bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Größe  $t_E$  bezeichnet die Eintauchzeit der Binder in die Mikroorganismensuspension im Rahmen der verschiedenen Auftragungsverfahren (siehe Abschnitt 5.2.4).

**Tabelle 14:** Tankübersicht des ersten Mesokosmenexperimentes ( $t_E$  bezeichnet die Eintauchzeit der Binder in die Mikroorganismensuspension).

	Tank 1	Tank 2	Tank 3	Tank 4	Tank 5	Tank 6	Tank 7
	x	x	x	x	x	x	x
Meerwasser	x	x	x	x	x	x	x
Rohöl		x	x	x		x	x
Mikroorganismen (Suspension)			x				
Mikroorganismen ( $t_E = 24 \text{ h}$ )							x
Mikroorganismen ( $t_E = 2 \text{ s}$ )				x			
Ölbinder				x	x	x	x

Tank 1, 2 und 5 wurden als Referenz-/Bezugstanks geführt. In Tank 3 wurde die Ölabbauleistung der Mikroorganismengemeinschaft bei einem direkten Eintrag in die Wasserphase untersucht. Die Ergebnisse aus Tank 6 dienten als Grundlage zur Bestimmung der Ölaufnahmekapazität.

pazität der Ölbinder. Am komplexesten sind die Zusammenstellung in Tank 4 und 7, da diesen Mesokosmen sowohl Rohöl als auch Ölbinder und Mikroorganismen (auf die Ölbinder aufgetragen) zugefügt wurden. In diesen Tanks wurde die Ölaufnahmekapazität der Binder in Zusammenhang mit der Ölabbauleistung der Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Auftragungsverfahrens der Organismen auf die Binder ermittelt.

In der folgenden Tabelle 15 ist die Tankübersicht des zweiten Mesokosmenexperimentes dargestellt. Die Laufzeit betrug vier Tage. Die mittlere Temperatur in den Tanks lag bei 13 °C.

**Tabelle 15:** Tankübersicht des zweiten Mesokosmenexperimentes ( $t_E$  bezeichnet die Eintauchzeit der Binder in die Mikroorganismensuspension).

	Tank 8	Tank 9	Tank 10	Tank 11
Meerwasser	x	x	x	x
Rohöl		x	x	x
Ölbinder			x	x
Mikroorganismen ( $t_E = 1$ s)				x

Tank 8 und 9 dienten als Referenz-/Bezugstanks. In Tank 10 wurde die Ölaufnahmekapazität der Ölbinder bei niedrigeren Temperaturen untersucht. In Tank 11 wurden Binder eingesetzt, bei denen eine modifizierte Auftragungsmethode der Mikroorganismen angewendet wurde. Es wurde die Ölaufnahmekapazität der behandelten Binder verglichen mit den unbehandelten Bindern ermittelt.

In der folgenden Tabelle 16 ist die Tankübersicht des dritten Mesokosmenexperimentes dargestellt. Das Experiment wurde in einem Zeitraum von 30 Tagen durchgeführt. Die mittlere Temperatur in den Tanks betrug 9 °C.

**Tabelle 16:** Tankübersicht des dritten Mesokosmenexperimentes ( $t_E$  bezeichnet die Eintauchzeit der Binder in die Mikroorganismensuspension).

	Tank 12	Tank 13	Tank 14	Tank 15	Tank 16
Meerwasser	x	x	x	x	x
Rohöl		x	x	x	x
Ölbinder			x	x	x
Mikroorganismen ( $t_E = 24$ h)				x	x
Mikroorganismen ( $t_E = 1$ s)					x

Die Tanks 12 und 13 dienten als Referenz-/Bezugstanks. In Tank 14 wurde die Ölaufnahmekapazität der unbehandelten Binder in einem dritten Temperaturbereich untersucht. In Tank 15 und 16 wurden mit Mikroorganismen versetzte Binder eingesetzt, um den mikrobiellen Ölabbau auf den Bindern zu ermitteln.

Bei der Probennahme für die Ölanalytik wurden lediglich Einzelproben entnommen. Aufgrund des Umfanges der jeweiligen Mesokosmenexperimente war weder eine wiederholte Probennahme der einzelnen Tanks noch eine Parallelführung der jeweiligen Versuchsansätze realisierbar. Dadurch war die statistische Auswertung der Daten limitiert. Ausreißer und Unregelmäßigkeiten konnten im Rahmen des zeitlichen Beprobungsverlaufes des ersten und dritten Experimentes identifiziert werden. Durch die vorhergehenden Laborversuche (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2) existieren sowohl für die Ölaufnahmekapazität der Ölbinden als auch für die Ölabbauleistung der Mikroorganismen Erwartungswerte, die eine kritische Bewertung und Interpretation der erhobenen Daten ermöglichen.

Die Datensätze, die in den folgenden Abschnitten präsentiert und diskutiert werden, sind mit einer statistischen Sicherheit von 99,9 % normalverteilt (David-Test, siehe Abschnitt 5.5).

### **3.3.2 Untersuchungen zu der Sauerstoff- und Nährstoffsituation**

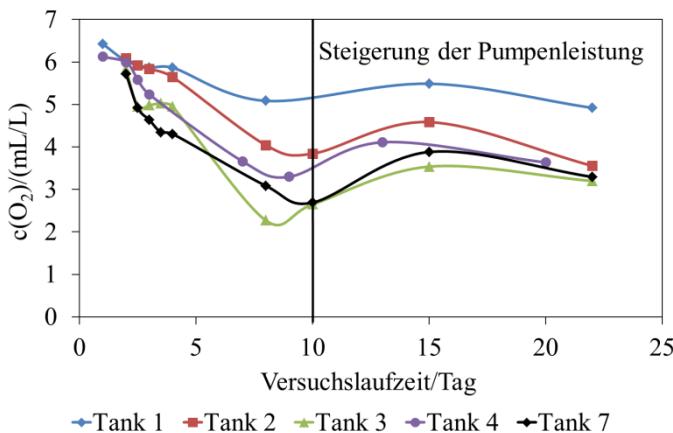
Die Messung der Nährstoffe erfolgte lediglich im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes. Die Nährstoffsituation wird im Folgenden für alle Tanks diskutiert, in denen der mikrobielle Ölabbau untersucht wurde (Tank 3, 4 und 7) beziehungsweise die als Referenzproben für die genannten Untersuchungen eingesetzt wurden (Tank 1 und 2).

Die Konzentrationen der gemessenen Parameter im verwendeten Meerwasser betragen 6,4 mL/L Sauerstoff, 0,14  $\mu$ mol/L Phosphat und 1,25  $\mu$ mol/L Ammonium. Diese Konzentrationen entsprechen den dokumentierten Werten zu dieser Jahreszeit und führen zu einem natürlichen N:P-Verhältnis von 21:1.<sup>[129]</sup> Nach der Nährstoffzugabe betragen die Konzentrationen für Phosphat und Ammonium 1,14  $\mu$ mol/L beziehungsweise 10,9  $\mu$ mol/L. Das in den Mesokosmen vorliegende Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor betrug demnach 23:1.

Ziel der hier beschriebenen Messungen war es, die anfänglich gewählte und eingestellte Nährstoffkonzentration durch gezielte Nährstoffzugaben über den Experimentzeitraum nahezu konstant halten zu können, um die Hemmung des mikrobiellen Ölabbaus durch eine auftretende Nährstofflimitierung auszuschließen.

#### **Untersuchung der Sauerstoffkonzentration**

In Abbildung 23 ist der Verlauf der Sauerstoffkonzentration im ersten Mesokosmenexperiment dargestellt.



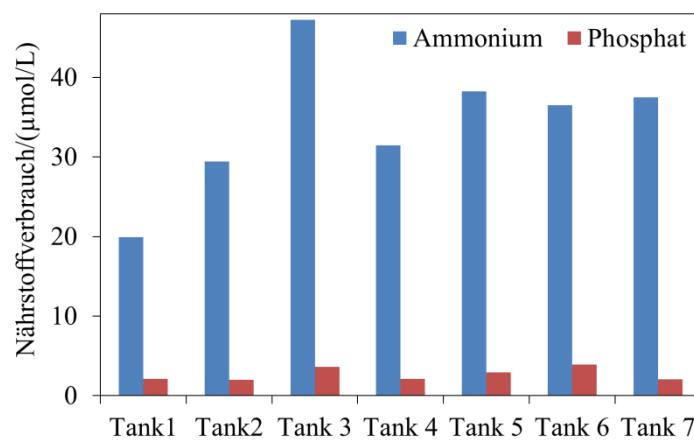
**Abbildung 23:** Sauerstoffkonzentration in mL/L Meerwasser in den Tanks 1, 2, 3, 4 und 7 des ersten Mesokosmenexperimentes; zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die Messwerte verbunden.

Aus dem in Abbildung 23 dargestellten Datensatz geht hervor, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der ersten zehn Tage des Experimentes in allen Tanks abnahm. Tank 1 (Meerwasser) dient in der weiteren Betrachtung als Referenztank. Dem vorliegenden Ostseewasser wurden in diesem Tank lediglich Ammonium- und Phosphatsalze zugesetzt; es wird als unbeeinflusst angesehen. Die Sauerstoffabnahme um 15 % von 6 mL/L auf 5 mL/L in Tank 1 ist demnach ausschließlich auf die natürlich vorkommende mikrobielle Aktivität zurückzuführen. In Tank 2 (Meerwasser, Öl) sank die Sauerstoffkonzentration um rund 35 % von 6 mL/L auf 4 mL/L. In den Tanks 3 (Öl, Mikroorganismen), 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) nahm die Sauerstoffkonzentration um etwa 50 % ab. Die erhöhte Sauerstoffabnahme in den drei letztgenannten Tanks ist auf eine höhere mikrobielle Aktivität zurückzuführen, die sich aus der Zugabe des Bakterienkonsortiums in freier Form als Suspension beziehungsweise in gebundener Form auf den Bindern ergibt.<sup>[18]</sup> Es ist davon auszugehen, dass die mikrobielle Aktivität Ölabbauprozesse umfasst und somit die Sauerstoffabnahme als Hinweis auf den mikrobiellen Ölabbau gesehen werden kann.<sup>[131]</sup> Die gesteigerte Sauerstoffabnahme in Tank 2 gegenüber der in Tank 1 deutet darauf hin, dass durch die Ölzugabe ein vermehrtes Bakterienwachstum induziert wurde.<sup>[12,91]</sup> Auch hier sind mikrobielle Ölabbauprozesse durch das natürlich vorkommende Konsortium nicht auszuschließen.

Bei einer fortgesetzten Abnahme der Sauerstoffkonzentration in den Mesokosmen hätte ein Wechsel der vorliegenden Bedingungen vom oxischen in den anoxischen Bereich stattgefunden. Als Grenzwert wurde dabei eine Sauerstoffkonzentration von 2 mL/L betrachtet. Es ist davon auszugehen, dass die Versorgung mit Sauerstoff im Freiland in der oberen Wasserschicht konstant gewährleistet ist. Um diese Freilandbedingungen weitestgehend in den Mesokosmos zu übertragen, erfolgte am zehnten Tag des Experimentes die Regulierung der Pumpenaktivität. Daraufhin stieg die Sauerstoffkonzentration in allen Tanks zunächst an und sank bis zur letzten Messung an Versuchstag 22 auf einen Bereich zwischen 3 mL/L und 4 mL/L beziehungsweise 5 mL/L in Tank 1 ab.

### Untersuchung der Phosphat- und Ammoniumkonzentration

Um eine sich an den natürlichen Randbedingungen orientierende, ausreichende Nährstoffversorgung während der Experimentlaufzeit zu gewährleisten, wurden die Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen überwacht und gegebenenfalls ergänzt. In Tank 1 war eine zusätzliche Nährstoffgabe erst nach mehr als zwei Wochen nach Experimentbeginn notwendig. Zu diesem Zeitpunkt konnte in Tank 1 kein Phosphat mehr nachgewiesen werden. In allen anderen Tanks erfolgte die erste Phosphatzugabe nach acht Tagen und wurde im weiteren Verlauf wöchentlich wiederholt. Die Phosphatkonzentrationen waren zu dem Zeitpunkt vor der Nährstoffzugabe auf einen Wert unter  $0,3 \mu\text{mol/L}$  gesunken. Während in den übrigen Tanks die Ammoniumkonzentration zunächst auf dem durch die anfängliche Nährstoffzugabe eingestellten Wert stagnierte, konnte in den ersten drei Tagen in den Tanks 3 und 7 ein Anstieg beobachtet werden. Dabei stieg die Ammoniumkonzentration in Tank 3 um etwa 40 % an. In Tank 7 erfolgte eine Steigerung der Konzentration um etwa 25 %. Es kann vermutet werden, dass dieser Anstieg der Ammoniumkonzentration auf einen Abbau des Phytoplanktons zurückzuführen ist.<sup>[132]</sup> Im weiteren Experimentverlauf nahm die Ammoniumkonzentration so weit ab, dass auch hier in allen Tanks eine Nährstoffgabe nötig war. Die Zugabe von Ammoniumsalzen erfolgte zum selben Zeitpunkt und im selben Rhythmus wie die Ergänzung durch Phosphatverbindungen. Die Ammoniumkonzentration war zu dem Zeitpunkt vor der Nährstoffzugabe auf einen Wert unterhalb von  $0,5 \mu\text{mol/L}$  gesunken. Der Nährstoffverbrauch über die gesamte Experimentlaufzeit ist für alle Tanks in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24:** Ammonium- und Phosphatverbrauch in  $\mu\text{mol/L}$  über die gesamte Experimentlaufzeit für alle sieben Tanks.

Der in Abbildung 23 dargestellte Verbrauch von Phosphat und Ammonium durch mikrobielle Aktivität kann nicht ausschließlich als Hinweis auf Ölabbauprozesse verstanden werden, da auch in Tank 1 eine Abnahme der Nährstoffkonzentration zu verzeichnen war. Um einen potentiellen Unterschied zwischen der mikrobiellen Aktivität in Tank 1 verglichen mit der in den übrigen Tanks zu überprüfen, wurde mittels t-Test (siehe Abschnitt 5.5) untersucht, ob sich das Ausmaß des Verbrauches von Phosphat beziehungsweise von Ammonium in Tank 1 signifikant von dem mittleren Verbrauch in den übrigen Tanks unterscheidet. Während für

den Phosphatverbrauch kein signifikanter Unterschied innerhalb der Tanks ermittelt werden konnte, unterscheidet sich der Ammoniumverbrauch in Tank 1 mit einer statistischen Sicherheit von 99 % signifikant von dem mittleren Verbrauch in den übrigen Tanks. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Stickstoff beim mikrobiellen Ölabbau eine zentralere Rolle spielt als Phosphor, wobei beide Elemente zum Erreichen optimaler Abbaubedingungen vorliegen sollten.<sup>[104,106]</sup>

### **Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse**

Durch die vermehrte Sauerstoffabnahme um etwa 50 % innerhalb der ersten zehn Versuchstage in den Tanks, denen Mikroorganismen zugesetzt wurden (Tank 3, 4 und 7), konnten Rückschlüsse auf die mikrobielle Aktivität sowie damit verbundene Ölabbauprozesse gezogen werden. Auch in Tank 2 (Meerwasser, Öl) lag die Sauerstoffabnahme mit 35 % (von 6 mL/L auf 4 mL/L) höher als in dem Referenztank 1 (15 %, von 6 mL/L auf 5 mL/L). Basierend auf dieser Beobachtung wird davon ausgegangen, dass in Tank 2 durch den Öleintrag ein vermehrtes Bakterienwachstum induziert wurde, das grundsätzlich einen mikrobiellen Ölabbau zur Folge haben kann. Anhand der durchgeführten Untersuchungen war es möglich, eine ausreichende Sauerstoffversorgung über den gesamten Versuchszeitraum zu gewährleisten.

Durch die Messungen und kontrollierten Zugaben von Ammonium- und Phosphatsalzen konnte der jeweilige Verbrauch über den Versuchszeitraum quantifiziert werden. Der Ammoniumverbrauch lag zwischen 20 µmol/L in Tank 1 und 47 µmol/L in Tank 3. Der Phosphatverbrauch betrug 2 µmol/L in den Tanks 1, 2, 4 und 7 und 4 µmol/L in den Tanks 3 und 6. Der Ammoniumverbrauch war in den übrigen Tanks signifikant höher als in Tank 1. Es sind keine weiteren Studien bekannt, in denen die von den Mikroorganismen verbrauchte Nährstoffmenge bestimmt wurde. Jedoch wird eine solche Untersuchung empfohlen, wenn der Einsatz von Düngern zur Unterstützung mikrobieller Ölabbauprozesse im Freiland diskutiert wird.<sup>[12]</sup> Die hier erzielten Ergebnisse stellen demnach eine fundierte Grundlage dar, auf der die Verwendung von Nährstoffen im Freiland zur Unterstützung der mikrobiellen Ölabbauaktivität nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ diskutiert werden kann.

### **3.3.3 Untersuchungen zur Ölaufnahme durch die Binder**

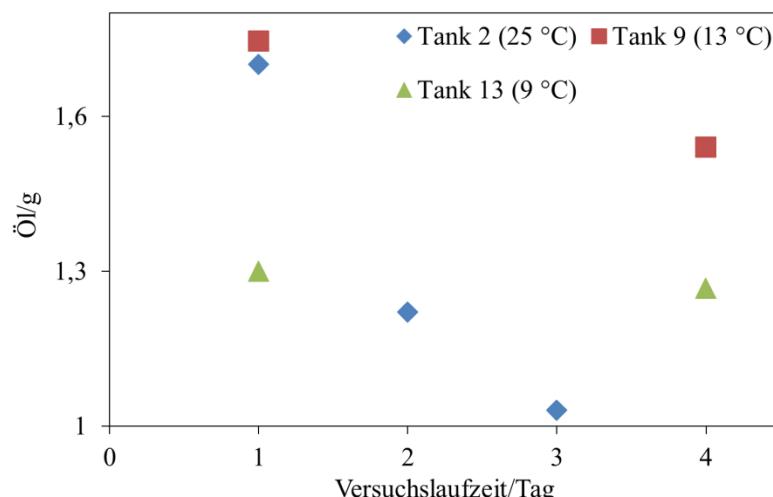
Um die Ölaufnahme der Binder im Rahmen der Mesokosmenexperimente umfassend diskutieren zu können, werden im Folgenden sowohl Proben des Wasserkörpers als auch die eingesetzten Binder betrachtet. Gemäß der tabellarischen Darstellung in Tabelle 14 bis Tabelle 16 umfasst das erste Experiment die Tanks 1 bis 7, das zweite Experiment die Tanks 8 bis 11 und das dritte Experiment umfasst die Tanks 12 bis 16.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse werden auch die Tanks miteinbezogen, die zur Ermittlung von Blind- und Referenzwerten herangezogen wurden. Daher erfolgt zunächst eine vergleichende Betrachtung der Tanks 1 (Meerwasser) und 5 (Binder), um die eventuelle Ver-

fälschung der gravimetrischen Messwerte durch organisches Material in der Wasserphase, das von den Bindern desorbiert wurde, zu überprüfen. In der Wasserprobe aus Tank 1 wurde ein Rückstand von  $1,1 \text{ mg} \pm 0,4 \text{ mg}$  quantifiziert. Dieser Rückstand besteht aus organischem Material, Partikeln und Schwebstoffen, die sich in dem verwendeten und lediglich grob gefilterten Ostseewasser (siehe Abschnitt 5.2.4) befanden. In der Wasserprobe aus Tank 5, in den zusätzlich 32 Binder eingebracht worden sind, konnte eine Rückstandsmasse von  $1,2 \text{ mg} \pm 0,4 \text{ mg}$  ermittelt werden. Durch den Eintrag der Binder erhöhte sich demnach die vorliegende Rückstandsmasse nicht. Das heißt, die Binder desorbieren keine organischen Verbindungen oder Partikel, die die gravimetrische Ölbestimmung aus der Wasserphase beeinflussen. Im Folgenden wurde der in Tank 5 als Blindwert ermittelte Rückstand von den Messergebnissen hinsichtlich der Ölmasse im Wasserkörper abgezogen.

### Verhalten des Öls in der Wasserphase

Um zunächst das Verhalten des Öls im Mesokosmos beurteilen zu können, wurden für alle drei Mesokosmenexperimente die Ergebnisse aus den jeweiligen Tanks verglichen, in denen neben dem Meerwasser lediglich eine Zugabe von Öl erfolgte. In Abbildung 25 ist die Ölmasse in den Wasserproben innerhalb der ersten vier Tage des jeweiligen Mesokosmenexperimentes vergleichend für die Tanks 2, 9 und 13 dargestellt. Die erste Probennahme erfolgte in allen drei Tanks zwei Stunden nach der Ölzugabe. Die weiteren Proben wurden jeweils im Abstand von 24 Stunden entnommen.



**Abbildung 25:** Darstellung der Ölmasse in g in den Tanks 2, 9 und 13 in den ersten vier Tagen des jeweiligen Mesokosmenexperimentes.

Aus Abbildung 25 geht hervor, dass in allen Tanks eine Abnahme der Ölmasse in den Wasserproben beobachtet werden kann. Diese Ölabbnahme ist in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedlich stark ausgeprägt. Während in Tank 2 (25 °C) in den ersten drei Tagen die Ölmasse um rund 40 % abnimmt, beträgt die Abnahme in Tank 9 (13 °C) in diesem Zeitraum lediglich 13 %. In Tank 13 (9 °C) ist die Ölabbnahme mit 2 % nahezu vernachlässigbar gering.

Die Messungen in Tank 2 und 13 wurden über die Anfangsphase des Experimentes hinaus bis zu den Versuchstagen 21 beziehungsweise 30 fortgeführt und bestätigen den in Abbildung 25 zu erkennenden Trend. In Tank 2 beträgt die Ölabnahme nach 21 Tagen bereits rund 60 %, während in Tank 13 nach 30 Tagen lediglich eine Ölabnahme von 8 % quantifiziert werden konnte. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den jeweiligen Ausgangswert, der in der ersten Probe des jeweiligen Tanks ermittelt wurde.

Die quantifizierte Ölabnahme lässt sich auf Verdampfungsprozesse und/oder Adsorptionsscheinungen an der Behälterwand sowie an der Pumpe inklusive Kabel zurückführen. Allein durch Verdunstungseffekte ist in der Regel in den ersten zwei Tagen nach einem Ölaustritt eine Abnahme um 30 % zu erwarten.<sup>[133]</sup> Die mit sinkender Temperatur zurückgehende Ölabnahme legt nahe, dass die Verdampfungseffekte den stärksten Einfluss haben, da sie bei höheren Temperaturen stärker ausfallen als bei niedrigeren.<sup>[134,135]</sup> Der erste Messwert in Tank 13 liegt in Abbildung 25 etwa 25 % unterhalb der Messwerte aus den Tanks 2 und 9. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass bei der vorliegenden Temperatur in Tank 13 zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Verdampfung stattgefunden hat, die diese Differenz erklären könnte. Vielmehr ist bekannt, dass das Öl mit sinkender Temperatur seine Viskositätseigenschaften verändert. Die Viskosität steigt mit sinkender Temperatur.<sup>[18,19,134]</sup> Empirische Beobachtungen im Umgang mit Ölen verschiedener Viskosität zeigten, dass es mit steigender Viskosität verstärkt zu Adsorptionseffekten kommt. Diese Annahme wurde bereits in mehreren Studien belegt.<sup>[78,80]</sup> Choi formulierte bei steigender Viskosität eine Abnahme der Öladsorption innerhalb der untersuchten kapillarartigen Fasern bei gleichzeitiger Zunahme der ÖladSORPTION an der Faseroberfläche.<sup>[78]</sup> Somit verhält sich das Penetrationsverhalten in eine Kapillare anti-proportional, das Bestreben des Anhaftens an eine Oberfläche proportional zu der vorliegenden Viskosität des Öls. Es ist also zu vermuten, dass im dritten Mesokosmenexperiment die Adsorptionseffekte an der Tankwand und dem Pumpenkabel verstärkt aufgetreten sind. Ergänzend dazu ist von einer Verhaltensänderung des Öls während der Probennahme auszugehen. Auf der Grundlage der oben zitierten Studien scheint es plausibel, dass bei niedrigerer Temperatur und somit steigender Viskosität weniger Öl mithilfe des Probennahmerohres aufgenommen worden ist. Diese Annahme würde die Differenz der Ausgangswerte in Tank 2 und 13 vom ersten Versuchstag in Abbildung 25 erklären.

Um nun die Vergleichbarkeit der Ausgangswerte in Tank 2 und 9 sowie deren Differenz zu dem Wert aus Tank 13 einzuordnen, ist ergänzend ein detaillierter Blick in die Temperaturdaten der einzelnen Mesokosmenexperimente notwendig (siehe Abschnitt 5.6.2). Bei den in Abbildung 25 angegebenen Temperaturen handelt es sich um die jeweiligen durchschnittlichen Temperaturen über den gesamten Versuchszeitraum. Die Temperatur am ersten Versuchstag betrug im ersten Experiment 20,8 °C, im zweiten Experiment 14,8 °C und im dritten Experiment 5,6 °C. Die Temperaturen am ersten Versuchstag der ersten beiden Experimente unterscheiden sich demnach um 6 °C. Die Temperatur am ersten Versuchstag des dritten Experimentes liegt rund 15 °C unterhalb der des ersten und rund 9 °C unter der des zweiten Experimentes. Insgesamt unterscheiden sich die Temperaturen am ersten Versuchstag deutlich

von der mittleren Durchschnittstemperatur des jeweiligen Experiments. Es wird deutlich, dass sich die ersten beiden Experimente hinsichtlich der Ausgangstemperatur nicht so stark voneinander unterscheiden, wie es basierend auf den Angaben zur mittleren Versuchstemperatur erwartet werden konnte. Die Vergleichbarkeit der quantifizierten Ölmassen am ersten Versuchstag beider Experimente ist vor diesem Hintergrund einzuordnen. Im dritten Experiment war die Temperatur am ersten Versuchstag deutlich niedriger, sodass hier die oben erläuterten Auswirkungen zu den veränderten Ad- und Absorptionseigenschaften basierend auf der temperaturbeeinflussten Viskosität zum Tragen kommen. Die in Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse fungieren in der weiteren Diskussion als Bezugswerte für die Berechnung der Ölabbnahme in Abhängigkeit von der Binderzugabe.

### Untersuchung der Ölabbnahme im Wasserkörper nach dem Bindereinsatz

Nachdem das Verhalten des „unbeeinflussten“ Öls diskutiert wurde, soll im Folgenden der Einfluss der Binderzugabe betrachtet werden. Dazu erfolgt in Abbildung 26 die vergleichende Darstellung der prozentualen Ölabbnahme im Wasserkörper nach der Binderzugabe in den Tanks 6, 10 und 14. Die Berechnung der prozentualen Ölabbnahme erfolgte dabei jeweils in Bezug auf die zum jeweiligen Probennahmezeitpunkt gemessenen Referenzwerte aus den Tanks 2, 9 und 13. Durch diese Bildung von Referenzwerten ist es möglich, die „natürlich“ auftretende Ölabbnahme, die in Abbildung 25 dargestellt wurde, zu berücksichtigen. Es erfolgte demnach eine Korrektur der Werte aus den Tanks mit Binderzugabe um die Werte aus den Tanks ohne Binderzugabe. Die erste Probennahme erfolgte in allen Tanks eine Stunde nach der Binderzugabe, wobei die Binder eine Stunde nach dem Öleintrag in die Tanks eingebracht wurden.

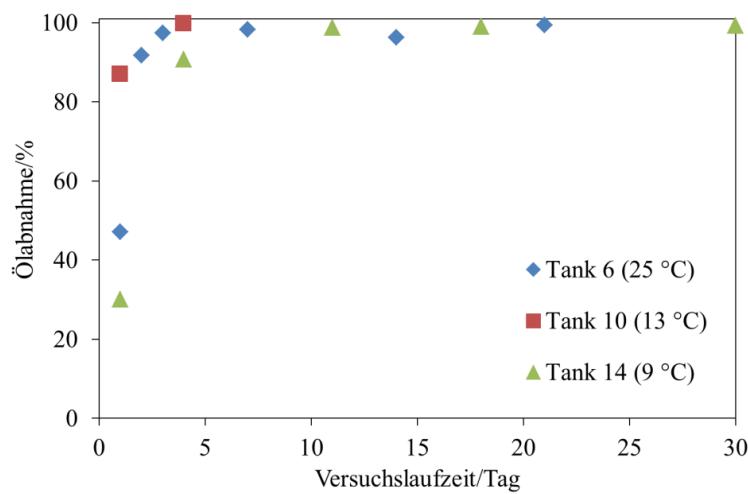


Abbildung 26: Ölabbnahme in % in den Tanks 6, 10 und 14 über den gesamten jeweiligen Versuchszeitraum der drei Mesokosmenexperimente.

Aus der vergleichenden Betrachtung von Abbildung 25 und Abbildung 26 geht hervor, dass die prozentuale Ölabbnahme in den in Abbildung 26 dargestellten Tanks in einem deutlichen Zusammenhang mit der durchgeföhrten Binderzugabe steht. Die Ölabbnahme ist in allen Tanks

bereits am vierten Tag der Versuchslaufzeit größer als 90 %. Nach einem Versuchszeitraum von einer Woche schwanken die Werte für die Ölabbnahme im Wesentlichen zwischen 98 % und 99 %. Besonders auffällig an den ersten Messwerten in Abbildung 26 ist die Diskrepanz zwischen dem Wert aus Tank 10 verglichen mit den Werten aus Tank 6 und Tank 14. Die gravimetrischen Analysen der Wasserprobe aus Tank 10 zeigen bereits eine Stunde nach der Binderzugabe eine Ölabbnahme im Wasserkörper von über 85 %. In Tank 6 liegt der entsprechende Wert bei 47 % und in der Probe aus Tank 14 bei 30 %. Unter Verwendung der detaillierten, taggenauen Temperaturdaten (siehe Abschnitt 5.6.2) lässt ein Vergleich der Tanks 6 und 10 vermuten, dass die Aufnahmebedingungen bei 15 °C (Tank 10, erster Versuchstag) eine schnellere Ölauflösung ermöglichen als die Bedingungen und damit verbundenen Öl-eigenschaften bei einer Temperatur von 21 °C (Tank 6, erster Versuchstag). Nach einer Versuchsdauer von vier Tagen hat sich die Ölauflösung in beiden Experimenten angeglichen.

Aus den Laboruntersuchungen ist bekannt, dass die Ölauflösungskapazität der Binder direkt proportional zu der vorliegenden Ölfilmschichtdicke ist. Die auf der Wasseroberfläche verfügbare Ölmasse sollte in den Tanks 6 und 10 gemäß den Daten aus den Referenztanks 2 und 9 (vergleiche Abbildung 25) vor der Binderzugabe etwa gleich groß gewesen sein, sodass eine Beeinflussung der Ölauflösungskapazität durch die vorliegende Ölfilmschichtdicke ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren kann der Einfluss der unterschiedlich großen Ölmasse in den Wasserproben aus den Referenztanks (Nr. 2, 9 und 13), die in Abbildung 25 dargestellt wurde und die jeweils als Bezugsgröße zur Berechnung der Ölabbnahme diente, ausgeschlossen werden. In allen Tanks eines jeweiligen Experimentes herrschten identische Bedingungen. Der Einfluss der Temperatur auf die Viskosität des Öls und auf damit verbundene Ad- und Absorptionseigenschaften, die zu einer geringeren Ölmasse in der Wasserprobe führen können, wirken sich demnach auf alle Tanks des Experimentes gleichermaßen aus. Die Verwendung von relativen Größen, wie der prozentualen Ölabbnahme, berücksichtigt diese eventuell auftretenden Unterschiede im jeweiligen Experiment und gewährleistet die Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Experimenten.

Für die Diskussion der Ölauflösungsgeschwindigkeit über den ersten Messpunkt hinaus sollen lediglich die Daten aus den Tanks 6 und 14 herangezogen werden. Die Datenlage aus Tank 10 ist mit zwei Messpunkten für eine stichhaltige Diskussion der Geschwindigkeit zu gering. Die in Abbildung 26 dargestellten Kurven der Ölabbnahme in Abhängigkeit der Zeit zeigen, dass die Ölabbnahme in Tank 6 (25 °C) schneller verlief als in Tank 14 (9 °C). Während der Maximalwert der Ölabbnahme in Tank 6 bereits in der Probe vom dritten Versuchstag gemessen wurde, wurde das Maximum der Ölabbnahme in Tank 14 erst um den siebten Versuchstag erreicht. Die unterschiedlichen Ölauflösungsgeschwindigkeiten sind demnach auf den Einfluss der Temperatur zurückzuführen. Bei niedrigeren Temperaturen ist die Ölauflösungsgeschwindigkeit geringer als bei höheren Temperaturen. Es erscheint plausibel, dass eine durch die Temperatur bedingte Veränderung der Viskosität des Öls das Aufnahmeverhalten der Binder beeinflusst. Da die Ölauflösung der Binder nicht nur auf Adsorptionsprozesse an den äußeren Binderfasern zurückzuführen ist, sondern auch auf das Eindringen des Öls in das Binderinne-

re, wird angenommen, dass dieses Eindringen mit steigender Viskosität erschwert und dadurch verlangsamt wird.<sup>[78]</sup> Im Gegensatz dazu wird das Anhaften des Öls an den äußeren Binderfasern mit steigender Viskosität erleichtert.<sup>[78]</sup> In Verbindung mit den in Abbildung 26 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass das Eindringen des Öls in die Binder beim Ölaufnahmeprozess den geschwindigkeitsbestimmenden Vorgang darstellt. Ist das Öl basierend auf seinen physikalischen Eigenschaften in der Lage, in das Binderinnere einzudringen, kann eine schnellere Ölaufnahme erfolgen, als wenn das Öl zunächst lediglich an den äußeren Binderfasern adsorbiert.

Basierend auf den Daten aus allen drei Tanks kann diskutiert werden, ob die Ölaufnahme zwar bei 25 °C schneller erfolgt als bei 9 °C, jedoch ihr Maximum bei 13 °C hat. Um diesen Interpretationsansatz zu stützen und zu überprüfen, wären weitere Experimente zur umfassenden Datenerhebung nötig. Im Rahmen solch vertiefender Untersuchungen würde sich der Ansatz von Mehrfachbestimmungen empfehlen. Dadurch könnte der Fehler der erhobenen Daten bestimmt und berücksichtigt werden. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die oben formulierten Erklärungen lediglich als Deutungsansätze verstanden werden. Eine Überinterpretation der Daten soll vermieden werden.

Bei der Betrachtung der Ölaufnahme durch die Binder über einen Versuchszeitraum von 21 (Tank 6) beziehungsweise 30 Tagen (Tank 14) konnte gezeigt werden, dass eine messbare Öldesorption, das heißt ein erneuter Anstieg der im Wasser vorliegenden Ölmasse, nicht festgestellt werden konnte. Die dahingehenden Ergebnisse aus den Laboruntersuchungen (siehe Abschnitt 3.1.2) konnten demnach unter *in-situ*-Bedingungen bestätigt werden. Die Binder sind in der Lage einmal gebundenes Öl ohne Desorptionserscheinungen über einen etwa einmonatigen Zeitraum gebunden zu halten. Des Weiteren soll darauf hingewiesen werden, dass der im Ostseewasser vorliegende Salzgehalt das Ölaufnahmeverhalten der Binder nicht negativ beeinflusst.

### **Bestimmung der Ölaufnahmekapazität der Binder mittels Extraktion und Gravimetrie**

Nach der Auswertung und Diskussion der Proben aus dem Wasserkörper sollen im Folgenden die Untersuchungsergebnisse der Binderextraktion herangezogen werden. Bei der Bestimmung der Ölaufnahmekapazität der Binder wurden lediglich die Daten der gravimetrischen Analyse verwendet. Die Eigenschaften der Ölbinder hinsichtlich der *n*-Alkan- und PAK-Aufnahme und -Abgabe wurden ausführlich in Abschnitt 3.1 beschrieben und diskutiert.

Die Angaben zu der gebundenen Ölmasse pro Binder und der Ölaufnahmekapazität sowie die extrapolierten Werte für die Gesamtzahl der Binder und die prozentual gebundene Ölmenge sind für alle drei Mesokosmenexperimente in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17:** Angaben zu der von einem Binder gebundenen Ölmasse ( $n = 3$ ) in g mit Standardabweichung  $s$  in g, zu der Ölaufnahmekapazität in g Öl/g Binder, zu der von der auf die Gesamtzahl der Binder ( $n = 32$ ) extrapolierten gebundenen Ölmasse in g, zu der prozentual auf die anfänglich zugegebene Ölmasse bezogene gebundene Ölmasse in % sowie zu dem Tag der Binderentnahme. In Tank 14 erfolgte die Entnahme von Einzelbindern an drei Tagen des Experimentes. Bei den Angaben zur gebundenen Ölmasse in Tank 14 handelt es sich um den Mittelwert über die drei Entnahmetage.

	Tank 6	Tank 10	Tank 14
Ölmasse für 1 Binder in g	$4,0 \pm 0,17$	$4,1 \pm 0,03$	$3,6 \pm 0,2$
Ölaufnahmekapazität in g Öl/g Binder	1,6	1,6	1,4
Ölmasse für 32 Binder in g	128	130	115
Ölmenge in %	70	71	62
Tag der Binderentnahme	30	4	11, 18, 30

Im ersten Mesokosmenexperiment erfolgte die Binderentnahme am Ende der Versuchslaufzeit nach 30 Tagen. Das Experiment wurde bei einer mittleren Temperatur von 25 °C durchgeführt. Gemäß der in Tabelle 17 aufgeführten Daten enthielten die Binder aus Tank 6 (Öl, Binder) nach 30 Tagen Versuchslaufzeit eine Ölmasse von  $4,0 \text{ g} \pm 0,17 \text{ g}$  pro Binder. Die Ölaufnahmekapazität betrug 1,6 g Öl/g Binder. Extrapoliert man den Wert für die gebundene Ölmasse pro Binder auf die Gesamtmenge der zugegebenen Binder ( $n = 32$ ), führt das zu einer gebundenen Ölmasse von 128 g. Bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Ölmasse sind demnach 70 % des Öls durch die Binder gebunden worden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Aussage nicht gleichbedeutend damit ist, dass 30 % des Öls im System verblieben sind. Basierend auf den oben diskutierten Ergebnissen aus der Analyse der Wasserproben ist davon auszugehen, dass in den Tanks neben der Ölaufnahme durch die Binder vor allem Verdampfungsprozesse zu einer Entfernung des Öls aus der wässrigen und damit für die Binder zugänglichen Phase geführt haben. Verdampfung und Ölaufnahme durch die Binder können demnach als konkurrierende Abläufe verstanden werden. Je schneller die eingesetzten Binder das vorhandene Öl aufnehmen, desto weniger kann von der Wasseroberfläche verdampfen. Basierend auf den bereits diskutierten Experimenten kann die Desorption des Öls in die Wasserphase zwar vernachlässigt werden, jedoch ist eine Verdampfung des gebundenen Öls nicht auszuschließen. Auch dieser Pfad stellt demnach einen nicht exakt zu quantifizierenden Verlustweg des Öls aus dem Mesokosmensystem dar. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die von den Bindern aufgenommene Ölmenge unmittelbar nach der abgeschlossenen Ölaufnahme deutlich höher war und im Versuchsverlauf durch Verdampfungsprozesse reduziert wurde.

Im zweiten Mesokosmenexperiment erfolgte die Binderentnahme bereits nach vier Tagen, da die Ölaufnahme basierend auf Untersuchungsergebnissen anderer Projektpartner zu diesem Zeitpunkt als abgeschlossen angesehen wurde (es wurde keine weitere Gewichtszunahme der Binder durch eine Wasser-/Ölaufnahme mehr festgestellt). Das Experiment wurde bei einer mittleren Temperatur von 13 °C durchgeführt. Die aus Tank 10 entnommenen Binder enthielten durchschnittlich  $4,1 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$  Öl. Extrapoliert auf die insgesamt eingesetzte Bindermenge ergibt sich damit eine bindergebundene Ölmasse von 130 g, das entspricht rund 71 % des

anfangs zugegebenen Öls. Die Ölaufnahmekapazität betrug 1,6 g Öl/g Binder. Eine Übersicht der genannten Daten erfolgte in Tabelle 17.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Ölaufnahme durch die Binder sind demnach in den ersten beiden Mesokosmenexperimenten nahezu identisch, obwohl die Bedingungen zum Teil variieren (Versuchszeitraum beziehungsweise Binderentnahmzeitpunkt und Temperatur). Aus den in Abbildung 26 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass die Ölabbnahme im ersten Mesokosmenexperiment nach drei Tagen Versuchslaufzeit nicht mehr wesentlich zugenommen hat. Für eine vergleichende Annahme wurden im zweiten Mesokosmenexperiment zu wenigen Datenpunkten erhoben, jedoch ist der Wert der Ölabbnahme am vierten Tag des Experiments mit 99,8 % vergleichbar mit den Werten des ersten Experimentes. Eine Steigerung der Ölabbnahme im Wasserkörper und demnach eine zunehmende Ölaufnahme durch die Binder war nahezu nicht möglich. In beiden Experimenten war die Ölaufnahme durch die Binder demnach zum jeweiligen Zeitpunkt der Binderentnahme, Tag 30 beziehungsweise Tag 4, abgeschlossen. Eine temperaturbedingte Variation der Ölaufnahmgeschwindigkeit spielt daher hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse keine Rolle. Das Zusammenspiel aus unterschiedlichem Probenentnahmzeitpunkt und Temperatur könnte lediglich dazu führen, dass von den Bindern aus Tank 6 (25 °C, 30 Tage) mehr aufgenommenes Öl verdampft ist als von den Bindern in Tank 10 (13 °C, 4 Tage). Es scheint vertretbar, von einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich der Ölaufnahme durch die Binder im Rahmen der ersten beiden Mesokosmenexperimente zu sprechen. Die eingesetzten Binder haben in beiden Experimenten unabhängig von der vorliegenden Temperatur während der Ölaufnahme etwa 70 % der anfänglich zugegebenen Ölmasse gebunden.

Im dritten Mesokosmenexperiment erfolgte die Binderentnahme an den Versuchstagen 11, 18 und 30. Das Experiment wurde bei einer mittleren Temperatur von 9 °C durchgeführt. Auf die vorherrschende Temperatur ist es vermutlich zurückzuführen, dass nahezu keine Verdampfungseffekte bezogen auf das eingesetzte Rohöl ermittelt werden konnten (vergleiche Abbildung 25). Es ist daher davon auszugehen, dass auch das von den Bindern aufgenommene Öl nahezu keinen Verdampfungsprozessen unterlag. Diese Annahme wird durch die vorliegenden Messwerte der Binderextraktionen bestätigt. Die Ölmassen, die im dritten Mesokosmenexperiment für den jeweiligen Entnahmetag auf den Bindern bestimmt wurden, schwankten in einem (Fehler-)Bereich von 4 % (siehe Tabelle 19). Es ist keine Ölabbnahme zwischen dem ersten und letzten Entnahmetag (Tag 11 und Tag 30) zu beobachten. Durchschnittlich enthielten die aus Tank 14 entnommenen Binder  $3,6 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$  Öl. Extrapoliert auf die insgesamt eingesetzte Bindermenge ergibt sich damit eine bindergebundene Ölmasse von 115 g, das entspricht rund 62 % des anfangs zugegebenen Öls (siehe Tabelle 17). Die Ölaufnahmekapazität betrug 1,4 g Öl/g Binder.

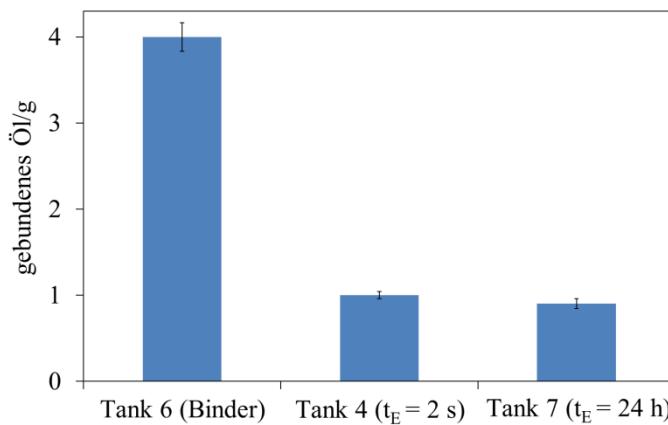
Die im dritten Mesokosmenexperiment gebundene Ölmasse ist demnach um etwa 10 Prozentpunkte geringer als in den ersten beiden Experimenten, wobei die in der Wasserphase nachgewiesene Ölmasse in derselben Größenordnung liegt wie in den Tanks der ersten beiden Experimenten (vergleiche Abbildung 26). Die sich mit der Temperatur verändernden

Viskositätseigenschaften des Öls führen nicht nur zu einer verlangsamten Ölaufnahmgeschwindigkeit, sondern auch zu einer verminderten Ölaufnahmekapazität der Binder.<sup>[85]</sup> Gemäß der Ausführungen bezogen auf Abbildung 25 ist bei niedrigeren Temperaturen mit abnehmenden Verdampfungs- und Absorptionserscheinungen sowie einem steigenden Adsorptionsbestreben zu rechnen. Während im ersten Mesokosmenexperiment die Verdampfung den konkurrierenden Prozess zur Ölaufnahme darstellte, handelt es sich basierend auf dem Temperaturunterschied im dritten Mesokosmenexperiment vermutlich eher um die Adsorption an Binderfasern und der Behälterwand beziehungsweise an der Pumpe, die als Konkurrenzprozess berücksichtigt werden sollte. Interessant sind diese unterschiedlichen Konkurrenzprozesse auch für den Einsatz im Freiland. Während die Verdampfung auf See durch den Wellengang vermutlich noch begünstigt wird, finden Adsorptionsprozesse im Freiland ausschließlich an Treibgut, Partikeln oder ähnlichem statt.<sup>[135]</sup> Es ist demnach möglich, dass die durch die Binder aufnehmbare Ölmasse im Freiland bei niedrigeren Temperaturen höher ist als bei höheren Temperaturen.

### **Einfluss des Auftragungsverfahrens der Mikroorganismen auf die Bindereigenschaften**

Neben der Ölaufnahmekapazität der Binder war auch die Erprobung der unterschiedlichen Auftragungsverfahren in Bezug auf die Aufbringung der Mikroorganismen auf die Binder ein wesentlicher Untersuchungsgegenstand der Mesokosmenexperimente. Die Binder wurden je nach Auftragungsverfahren für wenige Sekunden oder mehrere Stunden in eine Mikroorganismensuspension mit definiertem Bakterientiter eingetaucht und gegebenenfalls im Anschluss getrocknet. Eine ausführliche Beschreibung der Auftragungsverfahren erfolgt in Abschnitt 5.2.4. Im ersten Mesokosmenexperiment wurden in den Tanks 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) mit Mikroorganismen versehene Binder eingesetzt. Die Binderentnahme erfolgte nach 30 Tagen ( $n = 3$ ). Nach der Extraktion der Binder wurde mittels gravimetrischer Analyse die von den Bindern aufgenommene Ölmasse ermittelt.

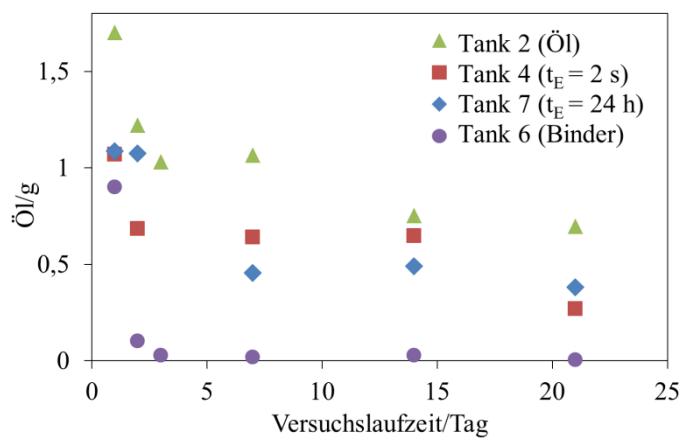
Die gravimetrische Bestimmung der Ölmasse ergab für die Binder aus Tank 4 einen Wert von  $1,0 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$ . Wird dieser Wert auf die insgesamt eingesetzte Bindermenge von 32 Stück extrapoliert, ergibt sich eine Ölmasse von 32 g. Das entspricht etwa 17 % des anfangs eingesetzten Öls. Die Ölaufnahmekapazität beträgt  $0,4 \text{ g Öl/g Binder}$ . Für die Binder aus Tank 7 konnte eine durchschnittlich aufgenommene Ölmasse von  $0,9 \text{ g} \pm 0,06 \text{ g}$  pro Binder ermittelt werden. Nach Extrapolation wurde in diesem Tank eine Ölmasse von 29 g durch die Binder aufgenommen. Das entspricht etwa 16 % des anfänglich zugefügten Öls. Hier beträgt die Ölaufnahmekapazität ebenfalls  $0,4 \text{ g Öl/g Binder}$ . Eine vergleichende Darstellung der gebundenen Ölmasse pro Binder erfolgt in Abbildung 27. Dabei wurden die Ergebnisse aus Tank 4 und 7 für einen umfassenderen Vergleich um das Ergebnis aus Tank 6 (Öl, Binder) ergänzt.



**Abbildung 27:** Vergleichende Darstellung der gebundenen Ölmasse pro Binder in g (n = 3) in den Tanks 6 (Öl, Binder), 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) aus dem ersten Mesokosmenexperiment.

Aus Abbildung 27 geht hervor, dass die mit Mikroorganismen behandelten Binder aus den Tanks 4 und 7 das Öl schlechter aufnehmen als die unbehandelten Binder in Tank 6. Die Ölausnahme ist dabei ungefähr um den Faktor 4 geringer. Durch die parallel von den Projekt-partnern der TU Dresden durchgeführte Wiegung der Binder wurde für alle drei Bindermodifikationen (unbehandelt,  $t_E = 2$  s,  $t_E = 24$  h) etwa eine Stunde nach dem Bindereinsatz eine deutliche und vergleichbare Gewichtszunahme registriert.<sup>[136]</sup> Diese Gewichtszunahme ist auf eine Öl/Wasseraufnahme der Binder zurückzuführen.<sup>[136]</sup> Anhand der durchgeführten Binderextraktionen ist es möglich, lediglich die von den Bindern aufgenommene Ölmasse zu ermitteln. Aus diesen Extraktionsergebnissen geht hervor, dass die beobachtete Gewichtszunahme lediglich bei den unbehandelten Bindern auf die Ölausnahme zurückzuführen ist. Bei den mit Mikroorganismen versetzten Bindern erfolgte hingegen wahrscheinlich die Aufnahme von einem größeren Wasservolumen und lediglich einem geringeren Ölvolume. Durch die bevorzugte Wasseraufnahme steht in den Bindern weniger Volumen für die Ölausnahme zur Verfügung, sodass die Ölausnahmekapazität deutlich herabgesetzt wird (von 1,6 g Öl/g Binder auf 0,4 g Öl/g Binder). Die gesteigerte Bereitschaft zur Wasseraufnahme kann unter anderem basierend auf unveröffentlichten Ergebnissen der Projektpartner der TU Dresden auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Bereits während des jeweiligen Auftragungsverfahrens zur Aufbringung der Mikroorganismen werden die Binder mit einer wässrigen Lösung behandelt und nehmen zumindest ein geringes Wasservolumen auf.<sup>[136]</sup> Diese Wasseraufnahme im Vorfeld begünstigt die hydrophilen Eigenschaften der Binder und führt so zu einer deutlich gesteigerten Wasseraufnahme beim Einbringen der Binder in das Wasser-Öl-System.<sup>[136]</sup> Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass ölabbauende Mikroorganismen in der Lage sind, überflächenaktive Substanzen zu produzieren.<sup>[101,137,138]</sup> Bei diesen Substanzen handelt es sich um Verbindungen mit tensidähnlichen Eigenschaften. Haften solche Verbindungen auf der Binderoberfläche, sind sie vermutlich in der Lage, die hydrophoben Eigenschaften der Binder zu reduzieren und so eine gesteigerte Wasseraufnahme zu begünstigen.

Darüber hinaus ist es denkbar, dass auch in den Tanks 4 und 7 eine mit der in Tank 6 vergleichbare Ölaufnahme stattgefunden hat, der sich im folgenden Versuchszeitraum ein erfolgreicher Ölabbau durch die auf den Bindern befindlichen Mikroorganismen angeschlossen hat. Auch dieser Vorgang würde sowohl die Gewichtszunahme der Binder am Anfang des Experimentes als auch die geringe extrahierbare Ölmasse auf den an Tag 30 entnommenen Bindern erklären. Um diesen Ansatz zu überprüfen, sollen die Ergebnisse der Wasserproben aus den Tanks 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) näher betrachtet werden (siehe Abbildung 28). Um die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Aussage einordnen zu können, erfolgt dazu in Abbildung 28 die ergänzende Darstellung der Ölmasse in den Wasserproben aus den Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 6 (Öl, Binder).



**Abbildung 28:** Verlauf der detektierten Ölmasse in g über den gesamten Versuchszeitraum in den Wasserproben aus den Tanks 2 (Meerwasser, Öl), 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s), 6 (Öl, Binder) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes.

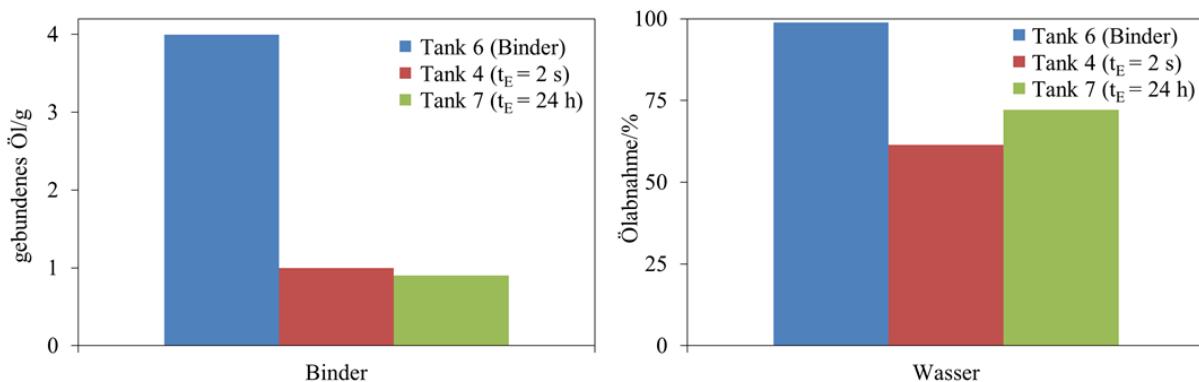
Die erste in Abbildung 28 dargestellte Probenentnahme erfolgte eine Stunde nach der Binderzugabe. Hier liegen die Werte für die detektierte Ölmasse in allen drei Tanks, denen Binder zugesetzt wurden, deutlich tiefer als in Tank 2 (Meerwasser, Öl). Während der Wert für die Ölmasse in Tank 6 etwa halb so hoch ist wie in Tank 2, liegt er in den Tanks 4 und 7 etwa um den Faktor 1,6 niedriger. Das heißt, direkt nach der Zugabe haben alle Binder zunächst nahezu unbeeinflusst von der durchgeführten Vorbehandlung das vorliegende Öl aufgenommen. Ein unterschiedliches Verhalten wird erst am zweiten Versuchstag deutlich. Während die Ölmasse in Tank 6 hier bereits einen Wert nahe null anstrebt (0,1 g), liegen die Werte für die Tanks 4 und 7 deutlich darüber. Dieses Bild bleibt bis zum Ende des Experimentes bestehen. Die Binder aus Tank 4, die lediglich kurz mit der Mikroorganismenlösung in Kontakt gekommen sind, nehmen das vorhandene Öl innerhalb der ersten zwei Versuchstage gleichbleibend auf. Die Ölaufnahme erfolgt dabei langsamer als bei den unbehandelten Bindern. Die im Tank 4 vorhandene Ölmasse pendelt sich ab dem zweiten Versuchstag auf einem Niveau von 0,6 g Öl ein. Das entspricht einer Ölabbnahme von etwa 60 % (bezogen auf den Referenzwert aus Tank 2). Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Ölabbnahme in Tank 2 etwa 30 %. Das bedeutet, dass die Ölabbnahme in Tank 4 tatsächlich auf das Wirken der zugesetzten Binder zurückzu-

führen ist. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine intensive Mikroorganismenaktivität zu erwarten ist (siehe Abschnitt 3.3.4), ist davon auszugehen, dass die Differenz bezüglich der vorliegenden Ölmasse in den Tanks 2 und 4 durch die Ölaufnahme der Binder verursacht wird. Eine weitere Veränderung im Kurvenverlauf für Tank 4 ergibt sich in der dritten Woche des Experimentes: Der Wert der detektierten Ölmasse sinkt von 0,6 g auf etwa 0,3 g. Basierend auf den obigen Ausführungen zur Herabsetzung der hydrophoben Eigenschaften der Binder durch den Einsatz von Mikroorganismen und die darauf zurückzuführende Beobachtung, dass zu diesem Zeitpunkt keiner der Binder mehr an der Oberfläche schwamm, ist eine erneut einsetzende Ölaufnahme durch die Binder eher unwahrscheinlich. Es erscheint jedoch plausibel, dass die auf die Binder aufgebrachten Mikroorganismen in die Wasserphase migriert sind. Auch in der Wasserphase sind die Mikroorganismen nach einer gewissen Initialisierungszeit in der Lage, das vorliegende Öl erfolgreich abzubauen (siehe Abschnitt 3.3.4). Die Ölabbnahme, die nach dreiwöchiger Versuchslaufzeit in der Wasserphase in Tank 4 beobachtet werden konnte, ist demnach vermutlich auf mikrobielle Abbauprozesse der ursprünglich auf die Binder aufgebrachten Mikroorganismen zurückzuführen.

Einen unterschiedlichen Kurvenverlauf zeigen die Analysenwerte aus Tank 7. Hier verläuft die Ölaufnahme durch die Binder deutlich langsamer. Während die Ölaufnahme in Tank 4 am zweiten Versuchstag abgeschlossen war, dauert die Ölaufnahme in Tank 7 offenbar bis zum siebten Versuchstag an. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Analysenwert für die Ölmasse im Wasserkörper etwa 0,5 g. Dieser Wert bleibt bis zur nächsten Probennahme an Versuchstag 14 konstant und entspricht einer Ölabbnahme von rund 70 % (bezogen auf den Referenzwert aus Tank 2). Die Ölaufnahme erfolgt demnach langsamer als in Tank 4, jedoch in vergleichbarem Umfang. Da die Binder bei dem mehrstündigen Auftragungsverfahren deutlich länger mit der wässrigen Mikroorganismenlösung in Kontakt gekommen sind, haben sie während der Eintauchzeit vermutlich sowohl mehr Wasser als auch mehr Mikroorganismen aufgenommen. Beides führt gemäß der obigen Ausführungen dazu, dass die hydrophoben Eigenschaften der Binder stärker herabgesetzt, die Wasseraufnahme durch die Binder erleichtert und die Ölaufnahme erschwert werden. Die verlangsamte Ölaufnahme der in Tank 7 eingesetzten Binder ist demnach auf das durchgeführte Auftragungsverfahren zurückzuführen. Ein vermeintlich beginnender mikrobieller Ölabbau in der Wasserphase kann eventuell in der letzten Probe des Experimentes aus Tank 7 beobachtet werden (Abnahme der Ölmasse von 0,5 g auf 0,4 g).

Die Ölaufnahme der mit Mikroorganismen behandelten Binder unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer hinsichtlich der Ölaufnahmegeschwindigkeit. Die Binder, die über einen Zeitraum von 24 Stunden mit der Mikroorganismensuspension behandelt wurden, nehmen das Öl deutlich langsamer auf als die Binder, die lediglich wenige Sekunden in die Mikroorganismensuspension eingetaucht wurden. Eine abschließend vergleichende Darstellung der von den Bindern am Ende des Versuchszeitraumes gebundenen Ölmasse und der prozentualen Ölabbnahme im Wasserkörper (bezogen auf den Referenztank 2)

am Ende des Ölaufnahmeprozesses nach zwei Wochen Versuchslaufzeit erfolgt in Abbildung 29.



**Abbildung 29:** Vergleichende Darstellung der von den Bindern am Ende des Versuchzeitraumes gebundenen Ölmasse in g (links) und der prozentualen Ölabnahme im Wasserkörper nach zwei Wochen Versuchslaufzeit für die Tanks 6 (Öl, Binder), 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h).

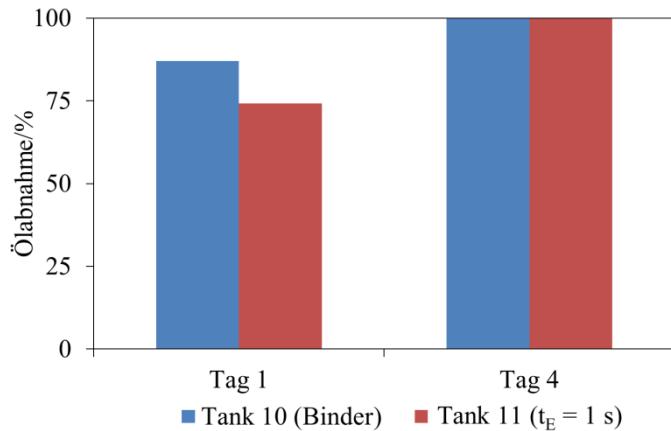
Aus den in Abbildung 29 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass die Ölaufnahmefähigkeit der behandelten Binder unabhängig von dem durchgeföhrten Auftragungsverfahren vergleichbar ist. Jedoch ist sie verglichen mit der ermittelten Ölaufnahme der un behandelten Binder um den Faktor 4 niedriger. Im Wasserkörper hingegen liegt die prozentuale Öl abnahme nach zwei Wochen Versuchslaufzeit in den Tanks 4 und 7 lediglich um den Faktor 1,5 niedriger als in Tank 6 (un behandelte Binder). Es wurde gezeigt, dass die Ölaufnahme durch die Binder in allen Tanks zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen war. Basierend auf den Ergebnissen aus den Wasserproben ist zu vermuten, dass die von den behandelten Bindern aufgenommene Ölmasse unmittelbar am Ende des Ölaufnahmeprozesses (nach zwei Wochen Versuchszeit) deutlich höher war als die nach 30 Tagen Versuchslaufzeit bestimmte Ölmasse. Es ist davon auszugehen, dass auf den behandelten Bindern zwischen der abgeschlossenen Ölaufnahme und dem Ende der Versuchszeit mikrobielle Abbauprozesse stattgefunden haben, durch die die auf den Bindern quantifizierbare Ölmasse reduziert wurde. Die Ölaufnahme der behandelten Binder ist demnach zwar geringer als die der un behandelten, aber nicht in dem Maß, wie es nach der Binderextraktion vermutet werden konnte.

### Untersuchung des modifizierten Auftragungsverfahrens

Basierend auf den Ergebnissen aus dem ersten Mesokosmenexperiment wurde für das zweite Experiment das angewendete Auftragungsverfahren zur Aufbringung der Mikroorganismen auf die Binder modifiziert. Dabei war das Ziel, einen Kompromiss zu finden, bei dem zwar Mikroorganismen auf die Binder aufgebracht, jedoch die hydrophoben Eigenschaften der Binder möglichst wenig herabgesetzt werden. Dazu wurde sowohl die Eintauchzeit verkürzt als auch der Bakterientiter der Mikroorganismenlösung reduziert (siehe Abschnitt 5.2.4).

In Abbildung 30 ist die prozentuale Öl abnahme in den Wasserproben aus den Tanks 10 (Öl, Binder) und 11 (Öl, Binder,  $t_E = 1$  s) im Rahmen des zweiten Mesokosmenexperimentes

dargestellt. Die prozentuale Ölabnahme wurde für jeden Probennahmezeitpunkt in Bezug auf den jeweiligen Referenzwert aus Tank 9 (Meerwasser, Öl) berechnet. Die Probennahme erfolgte eine Stunde nach der Binderzugabe sowie zum Abschluss des Experimentes am vierten Versuchstag.



**Abbildung 30:** Darstellung der Ölabnahme in % in den Tanks 10 (Öl, Binder) und 11 (Öl, Binder,  $t_E = 1$  s) eine Stunde nach der Binderzugabe sowie an Tag 4 des zweiten Mesokosmenexperimentes.

Aus dem in Abbildung 30 dargestellten Datensatz geht hervor, dass die Ölabnahme eine Stunde nach der Binderzugabe in der Wasserprobe aus Tank 10 (87 %) um 13 Prozentpunkte höher ist als in Tank 11 (74 %). Am vierten Versuchstag hat der Wert für die Ölabnahme in beiden Tanks nahezu den Wert 100 % erreicht (99,8 % in Tank 10 beziehungsweise 99,9 % in Tank 11). In beiden Tanks ist der verbleibende Ölanteil im Wasserkörper demnach vernachlässigbar gering. Basierend auf den obigen Ausführungen zu Abbildung 25 kann davon ausgängen werden, dass sich die quantifizierte Ölabnahme auf das Wirken der eingesetzten Binder zurückführen lässt. Die Ölaufnahme der behandelten Binder ist gemäß der Darstellung in Abbildung 30 etwas langsamer als die der unbehandelten Binder. Bereits am vierten Tag des Experimentes sind die erzielten Ergebnisse der eingesetzten Bindermodifikationen jedoch vergleichbar. Das veränderte Auftragungsverfahren scheint also den Kompromiss zwischen der Mikroorganismenaufbringung und der Bewahrung der hydrophoben Bindereigenschaften zu erfüllen.

Für die unbehandelten Binder, die in Tank 10 eingesetzt wurden, konnte eine prozentuale Ölaufnahme von 71 % berechnet werden. Die Ölaufnahmekapazität lag bei 1,6 g Öl/g Binder. Eine detaillierte Aufführung der Daten der aus Tank 10 entnommenen und extrahierten Binder erfolgte im Rahmen der oben erläuterten Untersuchungen zur Ölaufnahmefähigkeit der Binder (vergleiche Tabelle 17). Für die behandelten Binder aus Tank 11 konnte eine durchschnittlich aufgenommene Ölmasse von  $4,9 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$  Öl pro Binder ermittelt werden. Extrapoliert auf die Gesamtzahl der Binder ergibt das eine insgesamt aufgenommene Ölmasse von 155 g. Das entspricht etwa 84 % des anfänglich eingesetzten Rohöls. Die Ölaufnahmekapazität beträgt somit 2 g Öl/g Binder. Die Binder wurden nach vier Tagen Versuchs-

laufzeit entnommen und extrahiert. In diesem Zeitraum ist kein nennenswerter mikrobieller Ölabbau auf den Bindern zu erwarten. Eine vermeintliche Steigerung der Ölaufnahmefähigkeit um 13 Prozentpunkte durch die Behandlung mit Mikroorganismenlösung ( $t_E = 1$  s) erscheint unwahrscheinlich und konnte im Rahmen weiterführender Untersuchungen im dritten Mesokosmenexperiment nicht belegt werden (siehe Abschnitt 3.3.4., Tabelle 19).

### **Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion**

In der Wasserphase der Mesokosmen war unabhängig von der Umgebungstemperatur (9 °C bis 25 °C) vier Tage nach der Binderzugabe weniger als 10 % des eingesetzten Öls nachweisbar. Nach einer Woche schwankte dieser Wert zwischen 1 % und 2 %. Innerhalb der ersten sieben Versuchstage verlief die Ölaufnahme bei 9 °C langsamer als bei 25 °C. Die Ölaufnahmekapazität der Binder betrug bei 25 °C 1,6 g Öl/g Binder ( $t = 30$  Tage), bei 13 °C ebenfalls 1,6 g Öl/g Binder ( $t = 4$  Tage) und bei 9 °C 1,4 g Öl/g Binder ( $t = 30$  Tage). Es wurde herausgearbeitet, dass sowohl die Ölaufnahmefähigkeit als auch die Ölaufnahmekapazität der Binder durch die steigende Viskosität des Öls bei abnehmender Temperatur reduziert werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Reduzierung im Wesentlichen auf das erschwerete Eindringen des Öls in das Binderinnere zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Binder weder bindereigene Substanzen noch gebundenes Öl über einen Versuchszeitraum von einem Monat desorbierten. Der vorliegende Salzgehalt in den Mesokosmen beeinflusste das bekannte Ad- und Desorptionsverhalten der Binder nicht.

Während die Desorptionseigenschaften der Binder unter Labor- und *in-situ*-Bedingungen vergleichbar sind, zeigten die Binder in den Mesokosmen ein zum Teil verändertes Absorptionsverhalten. Die Ölaufnahmefähigkeit unter *in-situ*-Bedingungen war deutlich langsamer als unter Laborbedingungen. Während die Ölaufnahme im Mesokosmos nach etwa vier Tagen abgeschlossen war, betrug diese Zeitspanne im Labor 30 Minuten. Diese Abnahme der Ölaufnahmefähigkeit ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Bewegung der Binder im Mesokosmos weitaus geringer war als im Labormaßstab. Zudem fand keine Überspülung der Binder mit der Öl-/Wasserphase statt.

Die Ölaufnahmekapazität der mit Mikroorganismen behandelten Binder betrug bei einer Eintauchzeit von 24 Stunden und bei  $t_E = 2$  s jeweils 0,4 g Öl/g Binder ( $t = 30$  Tage). Es konnte gezeigt werden, dass die Auftragung der Mikroorganismen als wässrige Suspension die hydrophoben Eigenschaften der Binder reduzierte. Dadurch erhöhte sich die Wasseraufnahme durch die Binder, während die Ölaufnahmefähigkeit abnahm. Gleichzeitig verlangsamte sich die Ölaufnahmefähigkeit. Diese Effekte nahmen mit steigender Eintauchzeit und steigender Mikroorganismenzahl auf den Bindern zu.

Durch eine Reduzierung der Bakterienzahl in der Eintauchsuspension sowie durch die Verkürzung der Eintauchzeit auf  $t_E = 1$  s konnte die Ölaufnahmekapazität auf 2 g Öl/g Binder ( $t = 4$  Tage) erhöht werden und lag somit im Bereich der unbehandelten Binder. In der Was-

serphase konnten eine Stunde nach der Binderzugabe bei den unbehandelten Bindern noch 13 %, bei den behandelten Bindern noch 26 % des Öls nachgewiesen werden. Nach vier Tagen konnten in beiden Tanks lediglich Ölspuren (0,2 % beziehungsweise 0,1 %) quantifiziert werden. Die Ölausnahme der behandelten Binder erfolgte demnach geringfügig langsamer, war aber nach vier Tagen genauso effizient wie bei den unbehandelten Bindern.

Darüber hinaus ist zum einen zu vermuten, dass auf den behandelten Ölbindern ein mikrobieller Ölabbau stattgefunden hat. Zum anderen konnte herausgearbeitet werden, dass die Mikroorganismen wahrscheinlich in der Lage sind, von den behandelten Bindern in die Wasserphase zu migrieren und das dort vorhandene Öl abzubauen.

Nach aktuellem Kenntnisstand wurde lediglich von Suni et al. ein ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem ebenfalls Mesokosmen vergleichbarer Größe eingesetzt wurden.<sup>[130]</sup> Als ölbindendes Material wurden dabei Baumwollfasern als natürliches Bindemittel sowie ein synthetisches Sorbens auf Polypropylenbasis eingesetzt.<sup>[130]</sup> Da bereits in Abschnitt 3.1.1 eine ausführliche Diskussion der verschiedenen Bindemittel erfolgte, soll an dieser Stelle auf einen dahingehenden Vergleich der Experimente verzichtet werden. Bezuglich der Kombination von Ölbindemitteln und ölabbauenden Mikroorganismen sind keine weiteren Studien bekannt.

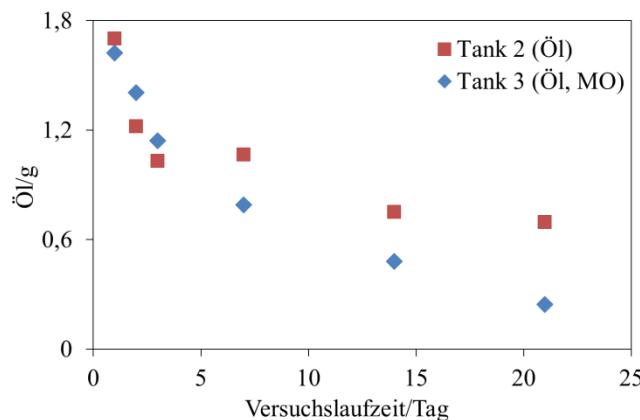
### **3.3.4 Ölabbau durch Mikroorganismen in Meerwasser**

Um den Ölabbau durch das eingesetzte Mikroorganismenkonsortium umfassend zu bewerten und zu diskutieren, wurden verschiedene Proben betrachtet. Das verwendete Konsortium wurde in zwei verschiedenen Formen eingesetzt (als Suspension und aufgetragen auf die Binder) und in zwei verschiedenen Kompartimenten (Wasserphase und Binder) mittels verschiedener Analysentechniken hinsichtlich seiner Ölabbaufähigkeit untersucht. Im ersten Mesokosmenexperiment erfolgte in Tank 3 der direkte Einsatz der Mikroorganismen in der Wasserphase. In allen weiteren und darauffolgenden Ansätzen wurden die Organismen zunächst auf die Binder aufgetragen und dann in dieser Form in das Mesokosmensystem eingebracht. Dabei wurde zwischen drei Auftragungsverfahren unterschieden, die hinsichtlich der Länge der Eintauchzeit (Zeit, in der sich die Binder in der Mikroorganismensuspension befinden) und der aufgebrachten Bakterienzahl variierten (siehe Abschnitt 5.2.4). Das Maß des Ölabbaus wurde sowohl in der Wasserphase als auch auf den Bindern direkt gravimetrisch und mittels Gaschromatografie untersucht. Dabei wurden verschiedene Proben (Wasserproben und Binder) zur Ermittlung von Referenzwerten verwendet.

#### **Gravimetrische Untersuchung des mikrobiellen Ölabbaus in der Wasserphase**

Zunächst soll eine vergleichende Betrachtung von Tank 2 (Meerwasser, Öl) und Tank 3 (Öl, Mikroorganismen) durchgeführt werden. Dazu ist die in den entnommenen Wasserproben ermittelte Ölmasse der entsprechenden Tanks über den gesamten Versuchszeitraum in Abbildung 31 dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung des Kurvenverlaufes für Tank 2 erfolgte

bereits im Rahmen der Ausführungen zu Abbildung 25 in Abschnitt 3.3.3 und soll an dieser Stelle nicht wiederholt werden. Auf die erneute Darstellung des Datensatzes konnte jedoch in Hinblick auf die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse aus Tank 3 nicht verzichtet werden. In beiden Tanks fanden Prozesse wie Verdampfungs- oder Adsorptionseffekte, zum Beispiel an der Behälterwand, statt. Idealerweise kann davon ausgegangen werden, dass das Ausmaß dieser Effekte in beiden Tanks nahezu identisch war, da beide Tanks identischen Bedingungen ausgesetzt waren.



**Abbildung 31:** Darstellung der Ölmasse in g im Wasserkörper der Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen) im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes. Die Abkürzung „MO“ steht für Mikroorganismen.

Aus der Darstellung in Abbildung 31 geht hervor, dass die Abnahme der Ölmasse innerhalb der ersten drei Versuchstage in beiden Tanks vergleichbar war. Es ist zu beachten, dass jeweils lediglich Einzelbestimmungen durchgeführt wurden. Eine gewisse Schwankung der Werte kann demnach dem Fehlerbereich zugeschrieben werden und soll an dieser Stelle nicht weiter interpretiert werden. Doch auch vor diesem Hintergrund ist ab dem siebten Versuchstag eine unterschiedliche Entwicklung der beiden in Abbildung 31 dargestellten Kurven zu erkennen. Während die Datenpunkte aus Tank 2 einen Grenzwert anzustreben scheinen, nimmt die Ölmasse in Tank 3 bis zum letzten Versuchstag weiterhin ab. Während die Ölmasse in Tank 2 über den gesamten Versuchszeitraum um rund 60 % bezogen auf den Wert der ersten Probe abnimmt, wird in Tank 3 eine Abnahme von rund 85 % erreicht. Diese Differenz ist auf den Einsatz der Mikroorganismenkultur zurückzuführen. Die Aktivität der zugefügten Bakteriengemeinschaft ist gemäß Abbildung 31 etwa ab dem siebten Versuchstag zu beobachten und nimmt im weiteren Experimentverlauf sichtlich zu. Das ausgewählte Mikroorganismenkonsortium benötigt demnach eine etwa einwöchige Initialisierungszeit („lag time“), vermutlich um sich zu vermehren.<sup>[104,118]</sup> Nach dieser Zeitspanne ist es in der Lage, das im Meerwasser vorhandene Rohöl lediglich unter Bereitstellung ostseetypischer Ammonium- und Phosphatkonzentrationen nachweisbar abzubauen.

### ***n*-Alkananalysen zum mikrobiellen Ölabbau in der Wasserphase**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *n*-Alkananalysen im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes vorgestellt und diskutiert. Es werden die Ergebnisse der Analyse der *n*-Alkane *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> sowie der isoprenoiden Verbindungen Pristan und Phytan präsentiert und diskutiert.

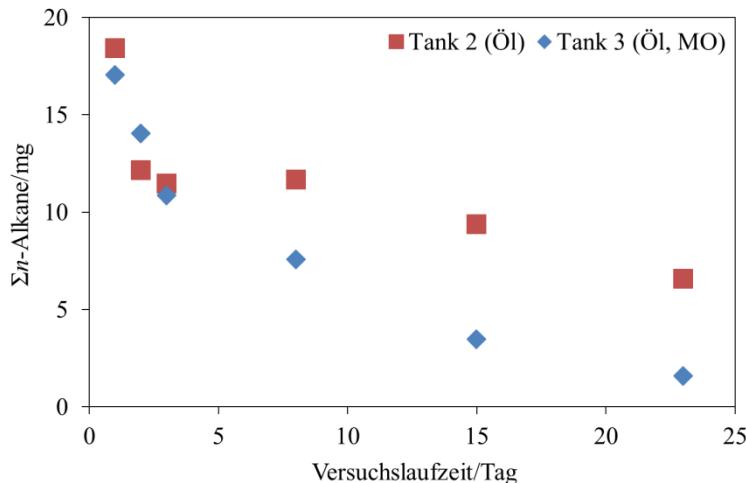
In den Tanks 1 (Meerwasser) und 5 (Binder) des ersten Mesokosmenexperimentes konnten keine *n*-Alkanverbindungen quantifiziert werden. Das heißt zum einen, dass im Meerwasser keine als Blindwert nachzuweisende Hintergrundkonzentration vorlag. Zum anderen wird deutlich, dass die eingesetzten Binder keine der untersuchten *n*-Alkanverbindungen in nachweisbarer Konzentration an die Wasserphase abgegeben haben.

Für die Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen) des ersten Mesokosmenexperimentes erfolgt zunächst in Abbildung 32 eine vergleichende Betrachtung der summierten *n*-Alkanverbindungen. Dabei wird die Summe der quantifizierten Massen der Verbindungen *n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> dargestellt. Die *n*-Alkanverbindungen mit einer kürzeren Kettenlänge (*n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>24</sub>) konnten für alle Versuchstage lediglich unregelmäßig vereinzelt und im Bereich der Nachweisgrenze ( $x_{NG} = 1 \mu\text{g}$ ) detektiert werden. Wahrscheinlich unterlagen diese Verbindungen starken Verdampfungseffekten und waren bereits nach wenigen Tagen vollständig aus der Wasserphase des Mesokosmensystems in die Luftphase übergegangen. Es ist bekannt, dass im Falle eines Ölaustrittes in die Wasserphase die Konzentrationen der *n*-Alkane stark durch Verdampfungseffekte beeinflusst werden, da diese Verbindungen eine schlechte Löslichkeit im Wasser aufweisen.<sup>[139,140]</sup> Malmquist et al. beobachteten in einem achttägigen Experiment das Verdampfen der *n*-Alkane *n*-C<sub>17</sub> bis *n*-C<sub>21</sub> sowie der Verbindungen Pristan und Phytan.<sup>[139]</sup> Dieses Ergebnis entspricht der hier beschriebenen Beobachtung und verdeutlicht, dass die Verwendung von Pristan und Phytan als Biomarker zum Nachweis des mikrobiellen Ölabbau in den durchgeführten Mesokosmenexperimenten nicht geeignet war. Die Interpretationen hinsichtlich des mikrobiellen Ölabbau in den Mesokosmen werden sich daher auf die vergleichende Betrachtung von und in Bezug auf Kontrollproben stützen. *n*-Alkane mit einer Kettenlänge größer C<sub>22</sub> scheinen unter den gegebenen Versuchsbedingungen wenig und unabhängig ihrer Kettenlänge durch Verdampfungseffekte beeinflusst zu werden.<sup>[94,141]</sup>

Die in Abbildung 32 dargestellte Abnahme der summierten *n*-Alkanverbindungen in den Wasserproben aus den Tanks 2 und 3 ähnelt sich im groben Verlauf. Beide Kurven beschreiben eine fortlaufende Abwärtsbewegung über den gesamten Versuchszeitraum. Diese deutliche Abnahme der summierten *n*-Alkanverbindungen konnte für beide Tanks mittels Trendtest nach Neumann (siehe Abschnitt 5.5) mit einer statistischen Sicherheit von 99 % als Trendbewegung bestätigt werden. Der detaillierte Verlauf der Kurven unterscheidet sich jedoch.

In Tank 2 erfolgte bereits in den ersten beiden Versuchstagen eine Abnahme der *n*-Alkane um 37 % von 18 mg auf 12 mg. Danach stagnierte der Wert über den achten Versuchstag hinaus und bildete ein temporäres Plateau. Nach zwei Wochen der Versuchslaufzeit ist erneut eine

Abnahme der summierten *n*-Alkanmassen in Tank 2 zu erkennen, die sich in der dritten Woche des Experimentes weiter fortsetzte. Zu diesem Zeitpunkt waren in der Wasserprobe aus Tank 2 noch 7 mg *n*-Alkane (*n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) quantifizierbar. Das entspricht 36 % der am ersten Versuchstag detektierten Masse.



**Abbildung 32:** Summierte Masse der *n*-Alkane *n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> in mg in den Wasserproben der Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen) im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes. Die Abkürzung „MO“ steht für Mikroorganismen.

Es kann vermutet werden, dass die für Tank 2 in Abbildung 32 dargestellte Abnahme der *n*-Alkane innerhalb der ersten Versuchstage lediglich auf Verdampfungsprozesse zurückzuführen ist. Diese Prozesse waren nach drei Tagen im Wesentlichen abgeschlossen, sodass sich der Wert für die summierten *n*-Alkanverbindungen auf einem zeitweilig stabilen Niveau befand. Nach etwa zwei Wochen Versuchslaufzeit schien ein neuer Prozess zu beginnen, der eine wiederholte *n*-Alkanabnahme zur Folge hatte. Prinzipiell könnte zu diesem Zeitpunkt erneut die Verdampfung eine Rolle spielen. Aus den Daten der Temperaturaufzeichnungen aus Tank 1 geht keine Steigerung der Temperatur in diesem Zeitraum hervor (siehe Abschnitt 5.6.2). Es ist jedoch zu bedenken, dass die Pumpenleistung an Tag 10 des Versuchszeitraumes gesteigert wurde (vergleiche Abschnitt 3.3.2, Abbildung 23). Es erscheint unwahrscheinlich, dass eine minimale Steigerung der Pumpenaktivität eine solch langanhaltende erneute Verdampfung der *n*-Alkanverbindungen auslöst. Es ist eher zu vermuten, dass die beobachtete Abnahme der *n*-Alkanverbindungen zwischen der ersten und zweiten Versuchswoche auf Abbauaktivitäten der im Ostseewasser natürlich vorkommenden Mikroorganismen zurückzuführen ist. Das Wachstum der ölabbauenden Spezies wird durch den Öleintrag stimuliert.<sup>[12,91]</sup> Nach einer gewissen Zeit des Wachstums liegt eine ausreichend große Bakterienzahl vor, sodass Abbauprozesse in den Messergebnissen deutlich werden. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Sauerstoff- und Nährstoffmessungen untermauert, die in Abschnitt 3.3.2 diskutiert wurden. Sowohl der Sauerstoff- als auch der Ammoniumverbrauch sind jeweils in Tank 3 am höchsten. Diese Beobachtung lässt auf eine hohe mikrobielle Aktivität schließen, die wiederum auf das zugesetzte Mikroorganismenkonsortium zurückzuführen ist.<sup>[12,91,104,106]</sup>

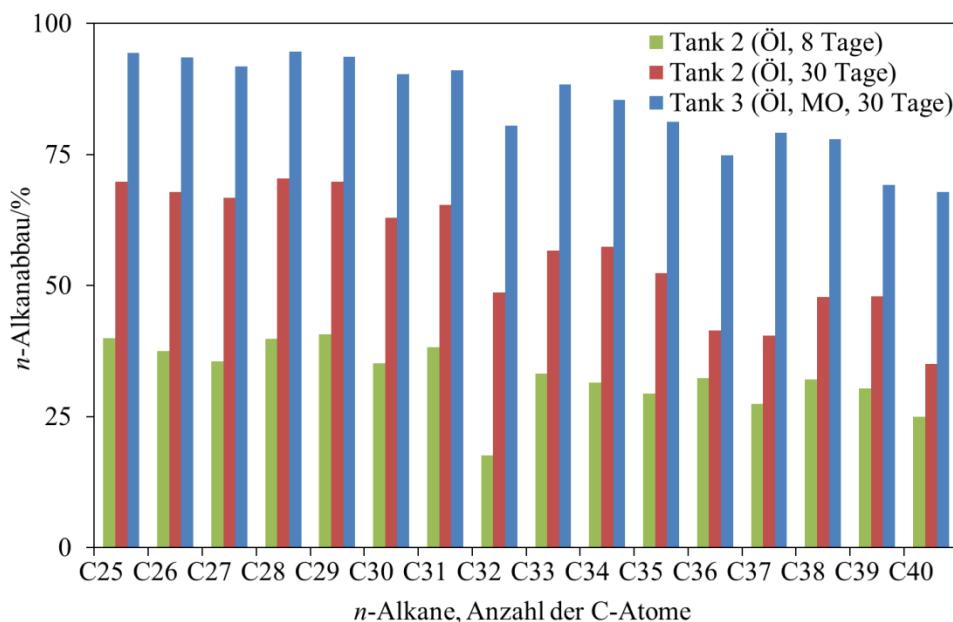
Der Sauerstoff- und der Ammoniumverbrauch in Tank 2 ist geringer als in Tank 3, jedoch jeweils höher als in Tank 1, in dem sich lediglich Meerwasser befand und der als „unbeeinflusst“ angesehen wird. Es ist demnach auch in Tank 2 eine erhöhte mikrobielle Aktivität der natürlich im Ostseewasser vorkommenden Mikroorganismengemeinschaft zu beobachten.

Auch in Tank 3 beschreibt die Kurve innerhalb der ersten drei Versuchstage einen steilen Abfall. Jedoch nahm die summierte *n*-Alkanmasse auch im weiteren Versuchszeitraum wenn auch gemäßiger so doch gleichbleibend ab. Am Ende des Versuchszeitraumes lagen noch 2 mg *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) vor. Das entspricht 9 % der am ersten Versuchstag detektierten Masse. Die Kurven für beide Tanks liegen demnach in den ersten drei Tagen übereinander, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die beeinflussenden Prozesse in dieser Zeit für beide Tanks identisch waren. Verdampfungsprozesse traten unmittelbar nach dem Öl eintrag auf und sollten in beiden Tanks in vergleichbarem Ausmaß stattgefunden haben. Nach einer Woche Versuchslaufzeit bis zum Ende des Versuchszeitraumes verlaufen die Kurven nahezu parallel, wobei die Werte für Tank 3 zwischen 4 mg und 6 mg niedriger sind als in Tank 2. Auch hier kann vermutet werden, dass die ablaufenden Prozesse identisch, jedoch in Tank 3 stärker ausgeprägt waren. Diese Vermutung stützt die oben formulierte These, dass auch in Tank 2 mikrobielle Ölabbauprozesse stattgefunden haben. Zudem ist es wahrscheinlich, dass es in Tank 3 zu einer Überlagerung von Verdampfungs- und Abbauprozessen kam, da die *n*-Alkanabnahme an keinem Punkt des Kurvenverlaufes stagniert. In Tank 3 wurde zu Beginn des Experiments das ausgewählte ölabbauende Mikroorganismenkonsortium zugesetzt. Es ist denkbar, dass dieses Konsortium in der Lage ist, die vorhandenen *n*-Alkane effektiver abzubauen als die natürlich im Ostseewasser vorkommende Gemeinschaft. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es zu Überlagerungen oder sogar synergetischen Effekten durch die Kombination aus dem zugesetzten Konsortium und der natürlich vorkommenden Gemeinschaft kam. Auch in diesem Fall wäre eine gesteigerte Abnahme der *n*-Alkanverbindungen in Tank 3 gegenüber den Prozessen in Tank 2 eine logische Konsequenz.

Nachdem die Masse der *n*-Alkanverbindungen als Summe dargestellt und diskutiert wurde, erfolgt in Abbildung 33 eine detaillierte Darstellung der Einzelverbindungen für Tank 2 und 3. Dazu wurde jeweils die prozentuale Abnahme der Masse jeder einzelnen Verbindung bezogen auf die erste gemessene Probe am ersten Versuchstag berechnet und aufgetragen.

Nach acht Tagen lag der *n*-Alkanabbau in Tank 2 zwischen 18 % (*n*-C<sub>32</sub>) und 41 % (*n*-C<sub>29</sub>). Der Abbau schwankt innerhalb der in Abbildung 33 dargestellten Verbindungen, folgt jedoch keiner deutlichen Trendbewegung. Der Trendtest nach Neumann (siehe Abschnitt 5.5) liefert auf einem Signifikanzniveaus von 99,9 % ein negatives Ergebnis. Einen anderen Verlauf zeigen die Kurven mit den Werten, die für das Ende der Versuchslaufzeit berechnet wurden. Hier ähnelt sich der Verlauf der in Abbildung 33 dargestellten Säulen für Tank 2 und 3. Für Tank 2 ist eine deutliche Verringerung der Abnahme mit steigender Kettenlänge der *n*-Alkanverbindung zu erkennen. Der Wert für die Verbindung *n*-C<sub>25</sub> beträgt 70 %, während

der Abbau für  $n\text{-C}_{40}$  bei 35 % liegt. Für Tank 3 beträgt der prozentuale Abbau der Verbindungen von  $n\text{-C}_{25}$  bis  $n\text{-C}_{31}$  jeweils über 90 %. Ab der Verbindung  $n\text{-C}_{32}$  nimmt der Wert für den prozentualen Alkanabbau ab, bis er für die Verbindung  $n\text{-C}_{40}$  einen Wert von 68 % erreicht hat.



**Abbildung 33:** Prozentualer  $n$ -Alkanabbau bezogen auf die jeweils erste gemessene Probe in den Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen (MO)) für die  $n$ -Alkane von  $n\text{-C}_{25}$  bis  $n\text{-C}_{40}$  im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes. Für Tank 2 wird der prozentuale  $n$ -Alkanabbau nach 8 Tagen sowie am Ende des Versuchszeitraumes nach 30 Tagen dargestellt. Für Tank 3 erfolgt lediglich die Darstellung am Ende des Versuchszeitraumes.

In mehreren Studien konnte belegt werden, dass die mikrobielle Abbaubarkeit der  $n$ -Alkane mit steigender Kettenlänge abnimmt.<sup>[18,91,142]</sup> Setti et al. unterscheiden bei den  $n$ -Alkanverbindungen höherer Kettenlänge zwischen zwei Gruppen, wobei die erste von den Verbindungen mit einer Kohlenstoffatomzahl von C<sub>17</sub> bis C<sub>28</sub> und die zweite von den Verbindungen mit einer Kettenlänge größer C<sub>28</sub> repräsentiert wird.<sup>[142]</sup> Während die erste Gruppe von Verbindungen bei dem Einsatz einer *Pseudomonas*-Spezies ein konstantes Abbaumuster zeigt, hängt der Abbau der zweiten Verbindungsgruppe von der Kettenlänge der Moleküle ab und sinkt mit steigender Kohlenstoffatomzahl.<sup>[142]</sup> Basierend auf dem in Abbildung 33 dargestellten Datensatz ist davon auszugehen, dass die in den Tanks 2 und 3 vorliegenden Mikroorganismen (natürlich vorkommende Gemeinschaft und zugesetztes Konsortium) ein ähnliches Verhaltensmuster zeigen. Der Vergleich der beiden Datensätze aus Tank 2 zeigt, dass innerhalb der ersten Versuchwoche andere Prozesse für die  $n$ -Alkanabnahme verantwortlich waren als in der verbleibenden Versuchslaufzeit. Somit kann die in Zusammenhang mit Abbildung 32 formulierte These bestätigt werden. Die gleichförmige Abnahme der  $n$ -Alkanverbindungen unabhängig von der Kettenlänge macht deutlich, dass der quantifizierte  $n$ -Alkanverlust innerhalb der ersten Woche des Versuchszeitraumes auf Verdampfungseffekten basiert. Die erneute kettenlängenabhängige  $n$ -Alkanabnahme am Ende des Versuchszeitraumes ist demnach auf

mikrobielle Abbauprozesse durch die natürlich im Ostseewasser vorkommende Bakteriengemeinschaft zurückzuführen. Es ist somit möglich, die Ursache der *n*-Alkanabnahme anhand der Abnahmemuster zuzuordnen.

### PAK-Analysen zum mikrobiellen Ölabbau in der Wasserphase

Von den Zielanalyten der PAK konnte in den Tanks 1 (Meerwasser) und 5 (Binder) lediglich Naphthalin detektiert werden. Die Naphthalinmasse in Tank 1 betrug  $8 \mu\text{g} \pm 3 \mu\text{g}$ , in Tank 5 lag der Messwert bei  $11 \mu\text{g} \pm 5 \mu\text{g}$ . Die Mittelwerte wurden auf der Grundlage aller Proben ermittelt, die im Versuchszeitraum aus dem jeweiligen Tank entnommen und analysiert wurden sind. Die mittlere Naphthalinmasse aus Tank 1 wurde in den folgenden Berechnungen zur Blindwertkorrektur verwendet. Der oben angegebene Wert aus Tank 5 wurde nicht blindwertkorrigiert. Da er in derselben Größenordnung wie der Blindwert liegt, heißt das, dass die eingesetzten Binder keine Verbindung der untersuchten PAK desorbiert und an die Wasserphase abgegeben haben.

Es erfolgt der Vergleich der ermittelten PAK-Messwerte aus den Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen). In den Wasserproben aus diesen Tanks konnten von den 24 untersuchten PAK 13 Verbindungen nachgewiesen werden. Für alle nachgewiesenen Verbindungen ist die prozentuale Abnahme innerhalb der ersten drei Versuchstage in beiden Tanks in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18:** Prozentuale PAK-Abnahme der 13 detektierten Verbindungen innerhalb der ersten drei Versuchstage des ersten Mesokosmenexperimentes bezogen auf die erste Probennahme in den Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen (MO)).

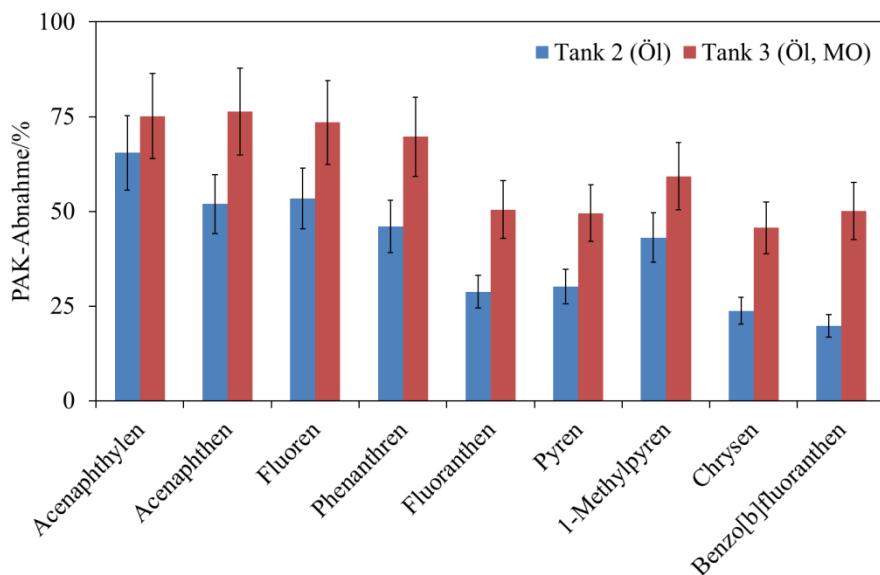
Verbindung	PAK-Abnahme in %	
	Tank 2 (Öl)	Tank 3 (Öl, MO)
Naphthalin	85	82
2-Methylnaphthalin	47	42
1-Methylnaphthalin	39	41
1,7-Dimethylnaphthalin	38	33
Acenaphthylen	42	40
Acenaphthen	41	37
Fluoren	39	31
Phenanthren	35	29
Fluoranthren	35	24
Pyren	38	28
1-Methylpyren	35	39
Chrysene	27	23
Benzo[b]fluoranthren	32	22

Aus Tabelle 18 geht hervor, dass die quantifizierten Werte für die prozentuale PAK-Abnahme innerhalb der ersten drei Versuchstage in beiden Tanks in einer ähnlichen Größenordnung liegen und sich um maximal 11 Prozentpunkte unterscheiden (Fluoranthen). Basierend auf der Probennahmetechnik ist ein Fehlerbereich von  $\pm 15\%$  bezogen auf den jeweiligen Messwert durchaus realistisch. Die Differenzen zwischen den in Tabelle 18 aufgeführten Werten liegen innerhalb dieses Fehlerbereiches. Die Werte für Tank 3 sind mit zwei Ausnahmen (1-Methylnaphthalin und 1-Methylpyren) kleiner als die Werte für Tank 2. Auch diesem Sachverhalt soll keine weitere Gewichtung beigemessen werden, da er vermutlich auf eine durch die Probennahmetechnik bedingte Schwankung der entnommenen Ölmasse zurückzuführen ist. Für beide Datensätze konnte mittels statistischer Berechnungen (Trendtest nach Neumann, siehe Abschnitt 5.5) auf einem Signifikanzniveau von 99 % gezeigt werden, dass die Abnahme mit steigender Molekülgröße signifikant zurückgeht.

Die prozentuale Abnahme der einzelnen PAK bewegt sich in derselben Größenordnung wie die prozentuale Abnahme der Gesamtmatrix Öl, die in Abbildung 31 dargestellt wurde. In den Tanks 2 und 3 liefen innerhalb der ersten drei Versuchstage ähnliche Prozesse ab, sodass sowohl die Höhe der Abnahmerate als auch das Abnahmemuster der detektierten Verbindungen vergleichbar ist. Basierend auf der vergleichbaren PAK-Abnahme in beiden Tanks ist davon auszugehen, dass die prozentuale Abnahme innerhalb der ersten drei Versuchstage ausschließlich auf Verdampfungseffekte zurückzuführen ist. Ein mikrobieller Olabbau durch die natürlich im Ostseewasser vorkommende Bakteriengemeinschaft ist in diesem Zeitraum nicht zu erwarten.<sup>[118,127]</sup> Der deutlich höhere Verlust von Naphthalin (82 % beziehungsweise 85 %) basiert vermutlich auf der erhöhten Flüchtigkeit dieser Verbindung verglichen mit den übrigen Zielanalyten. Der vollständige Verlust von Naphthalin, der bereits nach wenigen Versuchstagen auftreten kann, ist dabei nicht untypisch.<sup>[143,144]</sup> Der umgekehrt proportionale Zusammenhang von Massenabnahme und Molekülgröße kann ebenfalls auf Verdampfungsscheinungen zurückgeführt werden.<sup>[94,141]</sup>

Eine Veränderung der prozentualen PAK-Abnahme in den Tanks 2 und 3 ist nach einer Woche Versuchslaufzeit zu beobachten. Naphthalin ist zu diesem Zeitpunkt in keinem der beiden Tanks mehr nachweisbar. Die prozentuale Abnahme der einfachmethylierten Homologe liegt in beiden Tanks jeweils über 90 %. Der prozentuale Verlust des zweifachmethylierten Homologs beträgt 77 % in Tank 2 beziehungsweise 79 % in Tank 3. Die Abnahme dieser vier Verbindungen ist demnach in beiden Tanks nach wie vor vergleichbar, allerdings ist nun eine deutliche Abhängigkeit der Abnahmerate von dem Maß der Methylierung zu erkennen. Je höher die Zahl der Methylketten ist, desto niedriger ist die Abnahme der jeweiligen Verbindung. Diese Abhängigkeit wurde in verschiedenen Studien bei gezielten Untersuchungen zum Verdampfungsverhalten von PAK in Rohöl beobachtet.<sup>[94,141]</sup> Die diesbezüglich vergleichbaren Werte in den Tanks 2 und 3 lassen auch hier darauf schließen, dass die die PAK-Abnahme bedingten Prozesse in beiden Tanks ebenfalls vergleichbar sind. Es ist davon auszugehen, dass die Verdampfung den dominierenden Faktor repräsentiert.

Ein anderes Bild liefert die Betrachtung der Ergebnisse für die übrigen neun Verbindungen, deren prozentualer Verlust in Abbildung 34 dargestellt ist.



**Abbildung 34:** Prozentuale Abnahme der PAK-Massen innerhalb der ersten sieben Versuchstage bezogen auf die jeweils erste gemessene Probe in den Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen (MO)) im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes. Die Fehlerbalken wurden basierend auf einer Abschätzung des Fehlerbereiches eingetragen und umfassen jeweils  $\pm 15\%$  des jeweiligen Messwertes.

Während die prozentuale Abnahme der Massen der in Abbildung 34 dargestellten PAK-Verbindungen innerhalb der ersten drei Versuchstage in den Proben aus Tank 2 und 3 vergleichbar war (vergleiche Tabelle 18), ist nun ein Unterschied zu erkennen, der, mit Ausnahme von 1-Methylpyren, mit steigender Molekülgröße immer deutlicher wird. Die PAK-Abnahme in Tank 3 ist deutlich höher als die in Tank 2. Die Differenzen zwischen den Werten der beiden diskutierten Tanks, die in Tabelle 18 aufgeführt sind, wurden auf den vermutlich ausgeprägten Fehlerbereich der Messwerte zurückgeführt. Dabei wurde von einem Fehlerbereich von  $\pm 15\%$  bezogen auf den jeweiligen Messwert ausgegangen. Dieser hypothetische Fehlerbereich wurde ebenfalls auf den in Abbildung 34 dargestellten Datensatz angewendet. Mit Ausnahme von Acenaphthylen liegt auch unter Berücksichtigung dieses Fehlerbereiches ein Unterschied zwischen den Abnahmewerten in den Tanks 2 und 3 vor. Da beide Tanks ansonsten identischen Randbedingungen ausgesetzt waren, kann davon ausgegangen werden, dass die am siebten Versuchstag detektierte verstärkte PAK-Abnahme in Tank 3 auf die Aktivität des zugesetzten mikrobiellen Konsortiums zurückzuführen ist. Sowohl die Flüchtigkeit der PAK als auch ihre Abbaubarkeit durch mikrobielle Aktivität nimmt mit steigender Molekülgröße ab.<sup>[91,94,141]</sup> Da jedoch die Verdampfung mit dem Öl eintrag beginnt, während dem mikrobiellen Ölabbau eine gewisse Initialisierungszeit vorausgeht, ist es wahrscheinlich, dass bei Naphthalin und seinen Homologen sowie eventuell bei Acenaphthylen die Verdampfungseffekte über die Verluste durch den mikrobiellen Abbau dominieren. Je geringer das Bestreben der Verbindung ist, zu verdampfen, desto deutlicher ist der Einfluss

des zugesetzten Mikroorganismenkonsortiums in Tank 3 zu erkennen (siehe Abbildung 34). Verdampfung und mikrobieller Abbau können für die genannten Verbindungen innerhalb der ersten sieben Versuchstage als Konkurrenzprozesse betrachtet werden.

Prinzipiell kommt noch ein weiterer Interpretationsansatz für die unterschiedlichen Abnahmeraten in den Tanks 2 und 3 in Frage. Es ist durchaus möglich, dass es in Tank 2 nach einer Woche Versuchslaufzeit durch die natürlich im Ostseewasser vorkommende Mikroorganismengemeinschaft zu Ölabbaprozessen kam. Während das Wachstum dieser mikrobiellen Gemeinschaft erst durch den Öleintrag stimuliert wurde, wurde das System in Tank 3 bereits zu Versuchsbeginn gezielt mit einer hohen Konzentration eines nachweislich ölabbauenden Mikroorganismenkonsortiums versetzt.<sup>[12,91]</sup> Basierend auf der zu erwartenden geringeren Zahl ölabbauender Bakterien in Tank 2, ist davon auszugehen, dass Abbauprozesse langsamer und somit in dem untersuchten Zeitrahmen auch in geringerem Ausmaß verlaufen als in Tank 3.

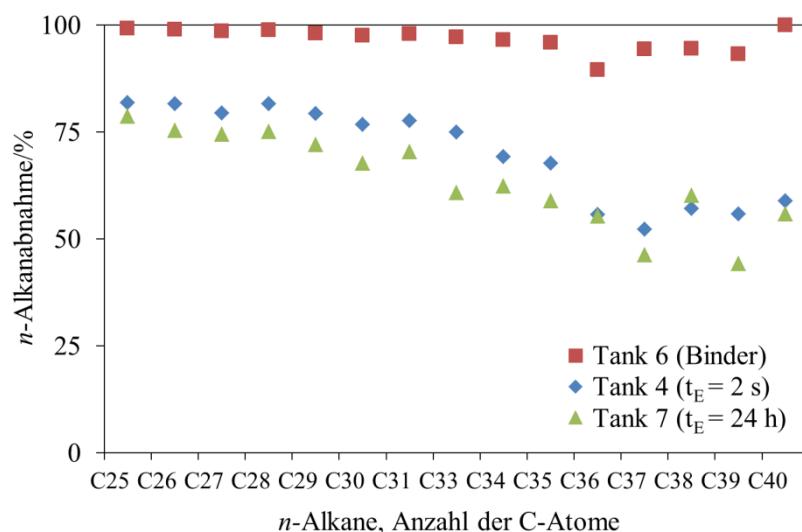
Auf der Grundlage des vorliegenden Datensatzes kann nicht eindeutig belegt werden, worauf die PAK-Abnahme in Tank 2 zurückzuführen ist. Es kann jedoch gezeigt werden, dass nach einer Woche Versuchslaufzeit, die PAK-Abnahme in Tank 2 und 3 unterschiedlich ausgeprägt ist. Dabei ist die gesteigerte PAK-Abnahme in Tank 3 auf die Aktivität des zugesetzten Mikroorganismenkonsortiums zurückzuführen.

Am Ende der Versuchslaufzeit ist in Tank 3 keine PAK-Verbindung mehr nachweisbar. In Tank 2 konnten lediglich Massen für fünf vier- beziehungsweise fünfkernige Verbindungen detektiert werden. Die kleineren Verbindungen waren auch hier nicht mehr nachweisbar. Die Verluste für Fluoranthen, Pyren, 1-Methylpyren, Chrysen und Benzo[b]fluoranthen liegen zwischen 49 % und 56 %. Der vollständige Verlust der acht „kleinen“ Verbindungen (zwei- und dreikernige Verbindungen) ist entweder auf eine vollständige Verdampfung zurückzuführen oder auf eine Überlagerung aus Verdampfung und mikrobieller Abbauaktivität durch die natürlich vorliegende Gemeinschaft (Tank 2) beziehungsweise das zugesetzte Mikroorganismenkonsortium (Tank 3). Die vollständige Abnahme der „großen“ Verbindungen (vier- und fünfkernige Verbindungen) in Tank 3 wird aufgrund der mikrobiellen Abbauprozesse durch das zugesetzte Konsortium beobachtet. Unabhängig davon ob die PAK-Abnahme durch Verdampfungs- und Abbauprozesse induziert wurde, ist kein deutlicher Unterschied des Abnahmemusters bekannt.<sup>[91,94,141]</sup> Beide Prozesse finden umgekehrt proportional zur Molekülgröße der PAK statt.<sup>[91,94]</sup> Ob eine bevorzugte Abnahme der methylierten Homologe mit steigendem Maß der Methylierung stattfindet, wird sowohl in Bezug auf Verdampfungsprozesse als auch hinsichtlich der bakteriellen Abbaubarkeit unterschiedlich beobachtet.<sup>[91,94,141,145]</sup> Es ist demnach nicht möglich, die ermittelten PAK-Abnahmen anhand des Abnahmemusters der 13 detektierten Verbindungen auf Verdampfungs- oder mikrobielle Abbauprozesse zurückzuführen. Lediglich durch den Vergleich der Abnahmeraten in den Tanks 2 und 3 können die höheren Werte in Tank 3 der gesteigerten mikrobiellen Aktivität durch das zugesetzte Konsortium zugeordnet werden.

### ***n*-Alkan- und PAK-Analysen zur Migration der Mikroorganismen**

In Abbildung 28 des vorhergehenden Abschnitts wurde anhand der im Wasserkörper detektierten Ölmasse vermutet, dass die auf die Binder aufgebrachten Mikroorganismen in der Lage sind, in die Wasserphase zu migrieren und das dort vorhandene Öl abzubauen. Um diese These zu überprüfen, wurde in Abbildung 35 die prozentuale Abnahme der *n*-Alkane *n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> in der Wasserphase für die Tanks 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s), 6 (Öl, Binder) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) über den gesamten Versuchszeitraum von 30 Tagen bezogen auf die erste Probe dargestellt. Da die Zuordnung des Peaks für die Verbindung *n*-C<sub>32</sub> in diesem Datensatz aufgrund von Überlagerungen im Chromatogramm nicht eindeutig vorgenommen werden konnte, erfolgt die Darstellung in Abbildung 35 ohne diese Verbindung.

Die Datenpunkte für die Proben aus Tank 6 verlaufen zunächst auf einem konstanten Niveau. Schwankungen treten bei den Verbindungen auf, die eine Kohlenstoffzahl größer C<sub>35</sub> aufweisen. Die Werte für die *n*-Alkanabnahme in den Tanks 4 und 7, in denen mit Mikroorganismen behandelte Binder eingesetzt wurden, zeigen einen anderen Verlauf. Hier sinken die Datenpunkte mit steigender Kettenlänge der untersuchten *n*-Alkanverbindungen um rund 35 Prozentpunkte. Mittels statistischer Testverfahren (Trendtest nach Neumann, siehe Abschnitt 5.5) wurde diese optische Einschätzung überprüft. Auf einem statistischen Niveau von 99,9 % konnte belegt werden, dass es sich bei dem Verlauf der Datenpunkte aus Tank 6 nicht um eine Trendbewegung handelt, während die Werte für die prozentuale Alkanabnahme in den Tanks 4 und 7 einem Trend folgen.



**Abbildung 35:** Prozentuale *n*-Alkanabnahme am Ende der Versuchslaufzeit (Tag 30) bezogen auf die jeweils erste gemessene Probe in der Wasserphase der Tanks 4 (Öl, Binder,  $t_E = 2$  s), 6 (Öl, Binder) und 7 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) für die *n*-Alkane *n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> (ohne *n*-C<sub>32</sub>) im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes.

Gemäß der Darstellung in Abbildung 35 erreicht die Abnahme der *n*-Alkane in Tank 6 am Ende des Versuchszeitraumes nahezu 100 %. Die im anfänglich zugegebenen Öl vorhandenen *n*-Alkanverbindungen wurden mit der Gesamtmatrix Öl von den unbehandelten Bindern aufgenommen und so unabhängig ihrer Kettenläng aus dem Wasserkörper von Tank 6 entfernt.

Ein dem Ölabbau durch die natürlich im Ostseewasser vorkommende mikrobielle Gemeinschaft vorausgehendes Wachstum der Mikroorganismen, wurde vermutlich aufgrund der zu geringen in der Wasserphase verbliebenen Ölmengen nicht induziert. Daher werden in Tank 6 keine Abnahmemuster der *n*-Alkane beobachtet, die auf eine erhöhte mikrobielle Aktivität zurückzuführen sind.

In den Tanks 4 und 7 erfolgte die Ölabnahme deutlich langsamer und weniger effektiv. Dieses Verhalten der mit Mikroorganismen behandelten Binder im ersten Mesokosmenexperiment wurde im vorhergehenden Abschnitt im Rahmen der Ausführungen zu Abbildung 27 und Abbildung 28 umfassend diskutiert. Die Abhängigkeit der prozentualen *n*-Alkanabnahme von der Kettenlänge der Verbindungen, die am Ende des Versuchszeitraumes beobachtet werden kann, unterstützt die Vermutung, dass in der Wasserphase der Tanks 4 und 7 ein mikrobieller Ölabbau stattgefunden hat.<sup>[18]</sup> Diese mikrobiellen Abbauprozesse können sowohl auf das natürlich vorkommende Mikroorganismenkonsortium im eingesetzten Ostseewasser zurückzuführen sein als auch auf das mit den Bindern eingesetzte Mikroorganismenkonsortium. Es ist zum einen denkbar, dass dazu eine Migration der Mikroorganismen von den Bindern in die Wasserphase erfolgte. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der mikrobielle Abbau der in der Wasserphase vorhandenen *n*-Alkanverbindungen an der Grenzfläche zwischen den Bindern und dem im Wasser befindlichen Ölfilm stattgefunden hat. Ein Vergleich mit der *n*-Alkanabnahme in Tank 2, die in Abbildung 33 dargestellt und eindeutig auf mikrobielle Abbauaktivitäten durch die natürlich vorkommende Gemeinschaft zurückgeführt wurde, zeigt, dass die Werte für die Abnahme der *n*-Alkane in Tank 4 und 7 zwar höher, jedoch in derselben Größenordnung liegen wie in Tank 2. In Tank 2 setzte der mikrobielle Ölabbau zwischen der ersten und der zweiten Versuchswoche ein, in Tank 4 und 7 jeweils nach zwei Wochen Versuchslaufzeit (vergleiche Abbildung 28). Obwohl der mikrobielle Abbau des Öls in Tank 4 und 7 später begann, ist die prozentuale *n*-Alkanabnahme vergleichbar mit den Werten aus Tank 2. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass in Tank 4 und 7 ein kombinierter Ölabbau durch die natürlich vorkommende Mikroorganismengemeinschaft und das auf den Bindern zugesetzte Konsortium stattgefunden hat. Die auf die Binder aufgebrachten Mikroorganismen sind demnach in der Lage, die in der Wasserphase verbliebenen *n*-Alkane abzubauen.

Auf eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der PAK-Analysen für die Tanks 4, 6 und 7 soll an dieser Stelle verzichtet werden. In Tank 6 (Öl, Binder) konnte bereits am dritten Versuchstag keine der Zielverbindungen mehr nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese vollständige Abnahme auf die Aufnahme durch die Binder sowie Verdampfungseffekte zurückzuführen ist. Somit ist eine vergleichende Darstellung mit den Ergebnissen aus den Tanks 4 und 7, in denen die mit Mikroorganismen behandelten Binder eingesetzt wurden, nur bedingt möglich. Die PAK-Abnahme in den Tanks 4 und 7 wird sowohl durch die Ölaufnahme der Binder als auch durch Verdampfungs- und eventuell stattfin-

dende mikrobielle Ölabbaprozesse beeinflusst. Eine klare Zuordnung ist dabei aus oben genannten Gründen nicht möglich (vergleiche Diskussion zu Abbildung 34).

### Untersuchungen zum mikrobiellen Ölabbau auf den Bindern

Im dritten Mesokosmenexperiment wurde der mikrobielle Ölabbau auf den Ölbindern durch die im Vorfeld mittels Auftragungsverfahren aufgebrachten Mikroorganismen untersucht. Dazu wurden in Tank 15 nochmals Binder eingebracht, bei denen das lange Auftragungsverfahren mit einer Eintauchzeit von 24 h angewendet worden ist. In Tank 16 wurden Binder untersucht, auf die die Mikroorganismen nach dem kurzen, modifizierten Auftragungsverfahren ( $t_E = 1$  s) aufgebracht worden sind. Eine detaillierte Beschreibung der Auftragungsverfahren befindet sich in Abschnitt 5.2.4. Die Binderentnahme erfolgte nicht nur zum Abschluss des Experimentes (Tag 30), sondern ebenfalls an den Versuchstagen 11 und 18. Es ist davon auszugehen, dass die Ölaufnahme zum Zeitpunkt der ersten Binderentnahme in allen drei Tanks abgeschlossen war (siehe Abschnitt 3.3.3).

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der gravimetrischen Analyse für die Binder aus den Tanks 15 (Öl, Binder  $t_E = 24$  h) und 16 (Öl, Binder  $t_E = 1$  s) verglichen mit den Daten für Tank 14 (Öl, Binder) aufgeführt. Die aufgeführten Daten zeigen, dass die Messwerte für Tank 14 schwanken, sodass keine Zu- oder Abnahme der Ölmasse von der ersten zur letzten Probennahme zu erkennen ist. Der Mittelwert beträgt  $3,6 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ . Der Fehlerbereich innerhalb der drei ermittelten Werte für Tank 14 umfasst demnach  $\pm 4\%$ . Dieser Wert für den Fehler wird in der folgenden Diskussion auch für die Tanks 15 und 16 angenommen. Der Fehlerbereich umfasst neben Schwankungen hinsichtlich der individuellen Ölaufnahme durch die einzelnen Binder auch eventuelle Verdampfungserscheinungen.

**Tabelle 19:** Ölmasse in g, die mittels gravimetrischer Analyse für jeweils einen Binder aus den Tanks 14 (Öl, Binder), 15 (Öl, Binder,  $t_E = 24$  h) und 16 (Öl, Binder,  $t_E = 1$  s) ermittelt werden konnte. Die Binderentnahme erfolgte an den Versuchstagen 11, 18 und 30 des dritten Mesokosmenexperimentes.

Versuchstag	Öl in g pro Binder ( $n = 1$ )		
	Tank 14 (unbehandelt)	Tank 15 ( $t_E = 24$ h)	Tank 16 ( $t_E = 1$ s)
11	3,7	3,4	3,5
18	3,4	2,7	3,4
30	3,6	2,5	3,1

Die in Tabelle 19 aufgeführten Messwerte für Tank 15 zeigen eine deutliche Abnahme der Ölmasse auf den Bindern von 3,4 g bei der ersten auf 2,5 g bei der letzten Probennahme. Das entspricht einer prozentualen Ölabbnahme um 28 % bezogen auf den Ausgangswert an Versuchstag 11. Dieser Wert liegt außerhalb des ermittelten Fehlerbereiches und ist somit auf die Aktivität der auf den Bindern aufgebrachten Mikroorganismen zurückzuführen. Die in Tank 15 eingesetzten Binder wurden mittels des langen Auftragungsverfahrens ( $t_E = 24$  h) mit Mikroorganismen versetzt. Auch in Tank 16 ist eine Ölabbnahme auf den Bindern zu beobachten,

allerdings umfasst diese lediglich einen Bereich von 0,4 g. Das entspricht einer prozentualen Abnahme von 10 %. Auch dieser Wert liegt außerhalb des Fehlerbereiches. Es ist demnach davon auszugehen, dass auch nach der kurzen, modifizierten Behandlung der Binder mit dem Mikroorganismenkonsortium ( $t_E = 1$  s) ein mikrobieller Ölabbau auf den Bindern stattgefunden hat. Jedoch ist dieser vom Umfang her deutlich geringer als bei den Bindern, auf denen die Mikroorganismengemeinschaft mittels mehrstündigem Verfahren aufgebracht wurde.

Ein Vergleich mit den Daten aus Tank 11 (Öl, Binder,  $t_E = 1$  s) im zweiten Mesokosmenexperiment zeigt, dass die Ölaufnahme pro Binder dort nach vier Tagen um 1,4 g höher war als die berechnete Ölmasse auf den Bindern in Tank 16 nach elf Tagen. Basierend auf den vorhergehenden Labor- und Mesokosmenexperimenten (siehe Abschnitt 3.2 sowie aktueller Abschnitt) konnte gezeigt werden, dass der mikrobielle Ölabbau durch das eingesetzte Konsortium frühestens nach einer Woche begann. Da der Startzeitpunkt des mikrobiellen Ölabbau auf den Bindern nicht ermittelt wurde, besteht die Möglichkeit, dass bereits vor der ersten Binderentnahme am elften Versuchstag Abbauprozesse auf den Bindern in Tank 16 stattgefunden haben, sodass ein Teil des Öls durch die Mikroorganismen abgebaut und bei der durchgeführten Berechnung nicht erfasst wurde. Darüber hinaus muss die unterschiedliche Temperatur des zweiten und dritten Mesokosmenexperimentes berücksichtigt werden, die in Tank 16 zu einer verminderten Ölaufnahmekapazität der Binder führte. Die Differenz hinsichtlich der aufgenommenen Ölmasse in Tank 11 (2. Mesokosmenexperiment) und Tank 16 (3. Mesokosmenexperiment) ist demnach sowohl auf eine temperaturbedingte verminderte Ölaufnahmekapazität als auch auf mikrobielle Ölabbauprozesse zurückzuführen.

Eine vergleichende Betrachtung der Daten aus Tank 15 mit den Daten aus Tank 7 (1. Mesokosmenexperiment) zeigt, dass der mikrobielle Ölabbau auf den Bindern mit abnehmender Temperatur langsamer verläuft. Diese Abhängigkeit ist aus der Literatur bekannt.<sup>[20,91,118]</sup> In beiden Tanks wurden Binder eingesetzt, die über 24 Stunden mit der Mikroorganismensuspension behandelt wurden. Nach 30 Tagen konnten auf den Bindern aus Tank 7 1,6 g Öl weniger quantifiziert werden als auf den Bindern aus Tank 15 (vergleiche Abschnitt 3.3.3, Abbildung 27). Das erste Mesokosmenexperiment wurde bei durchschnittlich 25 °C durchgeführt, während bei dem dritten Experiment durchschnittlich 9 °C herrschten. Auf diesen Temperaturunterschied ist die Differenz bezüglich der gemessenen Ölmasse auf den Bindern im ersten und dritten Mesokosmenexperiment zurückzuführen.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Durch die vergleichende Betrachtung der Tanks 2 (Meerwasser, Öl) und 3 (Öl, Mikroorganismen) konnten zunächst sowohl die ölabbauenden Eigenschaften des eingesetzten Mikroorganismenkonsortiums als auch die Reaktion der natürlich im Ostseewasser vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaft bestimmt werden.

Nach 30 Tagen Versuchszeit waren bei einer mittleren Temperatur von 25 °C in Tank 2 noch 40 % des Öls in der Wasserphase nachweisbar, während in Tank 3 noch 15 % detektiert wurden. Es konnte demnach gezeigt werden, dass das zugefügte Mikroorganismenkonsortium

nach einer Initialisierungszeit von einer Woche und bei einer für die Ostsee typischen Nährstoffversorgung in der Lage ist, das vorhandene Öl abzubauen.

Im Rahmen der *n*-Alkananalysen konnte herausgearbeitet werden, dass die Verwendung von Pristan und Phytan als Biomarker aufgrund von Verdampfungseffekten bei den gegebenen Versuchsbedingungen nicht geeignet waren. Die summierten *n*-Alkane (*n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) waren nach 30 Tagen im Wasserkörper von Tank 2 zu 36 % nachweisbar, in Tank 3 konnten 9 % der summierten Verbindungen detektiert werden. Anhand des Verlaufes der *n*-Alkanabnahme in Tank 3 ist zu vermuten, dass der *n*-Alkanabbau durch das zugefügte Mikroorganismenkonsortium bereits drei Tage nach der Ölzugabe einsetzte. Bei der detaillierten Betrachtung der *n*-Alkane (*n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) lag die Abnahme in Tank 2 nach acht Tagen zwischen 18 % für *n*-C<sub>32</sub> und 41 % für *n*-C<sub>29</sub> und zeigte bezüglich der Kettenlänge keinen Trend. Nach 30 Tagen konnte sowohl in Tank 2 als auch in Tank 3 eine solche Trendbewegung nachgewiesen werden. Die Abnahme lag in Tank 2 zwischen 35 % für *n*-C<sub>40</sub> und 70 % für *n*-C<sub>25</sub> und in Tank 3 zwischen 68 % für *n*-C<sub>40</sub> und über 90 % für *n*-C<sub>25</sub>. Basierend auf diesem unterschiedlichen Abnahmemuster der *n*-Alkane in Tank 2 konnte gezeigt werden, dass zunächst Verdampfungseffekte aufgetreten sind, denen Abbauprozessen durch die natürlich im Ostseewasser vorkommende Mikroorganismengemeinschaft folgten. Diese Abbauprozesse setzten nach etwa zwei Wochen Versuchslaufzeit ein.

Die PAK-Abnahme im Wasserkörper der Tanks 2 und 3 konnte für 13 Verbindungen nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten drei Tage war die prozentuale Abnahme in beiden Tanks vergleichbar (Tank 2: zwischen 27 % für Chrysen und 85 % für Naphthalin, Tank 3: zwischen 22 % für Chrysen und 82 % für Naphthalin) und auf Verdampfungseffekte zurückzuführen. Nach einer Woche waren Naphthalin und dessen methylierte Homologe lediglich in Spuren nachweisbar. Die Abnahme der übrigen Verbindungen lag in Tank 2 zwischen 20 % für Benzo(b)fluoranthen und 65 % für Acenaphthylen und in Tank 3 zwischen 46 % für Chrysen und 76 % für Acenaphthen. Zu diesem Zeitpunkt hat der PAK-Abbau durch das zugesetzte mikrobielle Konsortium in Tank 3 begonnen. Nach 30 Tagen lagen in Tank 2 lediglich die vier- und fünfkernigen Verbindungen vor, deren prozentuale Abnahme zwischen 49 % für Benzo(b)fluoranthen und 56 % für Fluoranthen lagen. In der Wasserphase von Tank 3 konnten keine PAK mehr nachgewiesen werden.

Es wurde gezeigt, dass der Abbau der *n*-Alkane durch das zugegebene Mikroorganismenkonsortium eher einsetzt als der PAK-Abbau, jedoch entgegen der Laborergebnisse weniger effektiv verläuft. Die natürlich im Ostseewasser vorkommende mikrobielle Gemeinschaft beginnt etwa zwei Wochen nach dem Ölereignis, die *n*-Alkane abzubauen. Ein PAK-Abbau kann vermutet, jedoch nicht eindeutig belegt werden.

Nach 30 Tagen lag die Abnahme der *n*-Alkane im Wasserkörper von Tank 6 (Binder) zwischen 89 % für *n*-C<sub>36</sub> und 100 % für *n*-C<sub>40</sub>. Die *n*-Alkanaufnahme durch die Binder erfolgte unabhängig von der Kettenlänge. In den Tanks, in denen die mit Mikroorganismen behandelten Binder eingesetzt wurden, lag die *n*-Alkanabnahme zwischen 52 % für *n*-C<sub>37</sub> und 82 %

für  $n\text{-C}_{25}$  ( $t_E = 2$  s) beziehungsweise zwischen 44 % für  $n\text{-C}_{39}$  und 79 % für  $n\text{-C}_{25}$  ( $t_E = 24$  h). Die  $n$ -Alkanabnahme nahm mit steigender Kettenlänge der Verbindungen ab und ist demnach auf mikrobielle Abbauprozesse in der Wasserphase zurückzuführen. In einem Vergleich mit den Daten aus Tank 2 (Meerwasser, Öl) konnte gezeigt werden, dass die auf die Binder aufgebrachten Mikroorganismen in der Lage sind, in der Wasserphase vorliegendes Öl abzubauen.

Der mikrobielle Ölabbau auf den mit Mikroorganismen behandelten Bindern ist umso effektiver, je mehr Mikroorganismen im Auftragungsverfahren auf den Binder aufgebracht wurden. Über einen Zeitraum von 20 Tagen nahm die Ölmasse pro Binder, der mittels 24-stündigem Auftragungsverfahren mit Mikroorganismen versetzt wurde, von 3,4 g auf 2,5 g ab. Bei einer Eintauchzeit von 1 Sekunde in eine Suspension mit geringerer Bakterienzahl im Rahmen des Auftragungsverfahrens betrug die Ölabbnahme im genannten Zeitraum pro Binder lediglich 0,4 g. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der auf den Bindern stattfindende mikrobielle Ölabbau bei wärmeren Temperaturen deutlich effektiver verläuft als bei Temperaturen unterhalb von 10 °C.

### **Fazit der Experimente unter *in-situ*-Bedingungen**

Ziel der durchgeführten Experimente war es, sowohl die Ölbinden als auch die ölabbauenden Mikroorganismen einzeln und in Kombination bezüglich ihrer Eigenschaften unter *in-situ*-Bedingungen qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Die generierten Ergebnisse ermöglichen die fundierte Planung eines Einsatzes der Ölbinden und/oder des ölabbauenden Mikroorganismenkonsortiums zur aussichtsreichen Bekämpfung einer Ölavarie. Die auszubringende Bindermenge kann dabei unter Berücksichtigung des Einflusses durch die vorliegende Temperatur und die gemäß VPS zu erwartende Ölfilmschichtdicke kalkuliert werden. Dabei gilt es darüber hinaus, einen sinnvollen Kompromiss zu finden, bei dem sowohl Ausbringung als auch Bergung der Bindermenge realisierbar sind und gleichzeitig eine zufriedenstellende Reinigungsleistung zu erwarten ist. Die natürlich stattfindenden Ölabbauprozesse in der Ostsee können durch die Ausbringung des charakterisierten Mikroorganismenkonsortiums als Suspension oder in direkter Kombination mit den Ölbinden unterstützt und beschleunigt werden. Anhand der erzielten Ergebnisse ist es möglich, eine fundierte Abschätzung der Nährstoffmenge durchzuführen, die benötigt wird, um einer Nährstofflimitierung bedingt durch das induzierte Bakterienwachstum und die mikrobiellen Ölabbauprozesse entgegenzuwirken, ohne das Ökosystem Ostsee zusätzlich zu belasten. Bei einem kombinierten Einsatz von Ölbinden und Mikroorganismen sollte die Auftragung des Mikroorganismenkonsortiums idealer Weise direkt bei der Binderproduktion erfolgen, da Variationen bestimmter Parameter des Auftragungsverfahrens, zum Beispiel der Eintauchzeit und der Bakterienzahl in der Eintauchsuspension, einen deutlichen Einfluss auf die Reinigungsleistung der Ölbinden haben.

## 4 Zusammenfassung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes BioBind („Luftgestützte Beseitigung von Verunreinigungen durch Öl mit biogenen Bindern“) durchgeführt. Ziel des Projektes war es, durch die Kombination verschiedener Komponenten ein System zu entwickeln, das bestehende Lücken im Bereich der marinen Ölbekämpfung schließt. Dabei lag der Fokus sowohl auf der umweltschonenden und kostengünstigen Bekämpfung kleiner Öleinträge ( $V_{\text{Öl}} \leq 50 \text{ t}$ ) als auch auf dem potentiellen Einsatz des Systems in küstennahen Flachwassergebieten und ökologisch sensiblen Regionen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen neuartige, biologisch abbaubare Ölbinder auf Holzbasis sowohl qualitativ als auch quantitativ hinsichtlich ihres Ölaufnahmeh- und -abgabeverhaltens im wässrigen System zu charakterisieren. Zum anderen wurde die Ölabbauleistung von aus der Ostsee isolierten, öltolerierenden Mikroorganismen bestimmt. Die klassifizierten Bakterienarten wurden dabei als Reinkulturen und in Form von definierten Gemeinschaften untersucht. Das abschließende Ziel war der einzelne und kombinierte Einsatz von Ölbndern und einer ausgewählten Mikroorganismengemeinschaft unter *in-situ*-Bedingungen sowie die Charakterisierung der durch diese Kombination bedingten Vorgänge. Des Weiteren wurde unter *in-situ*-Bedingungen überprüft, ob und wie das mikrobielle Ökosystem der Ostsee auf einen Öleintrag reagiert. Bei allen Untersuchungen wurde zum einen das Öl als Gesamtmatrix betrachtet, zum anderen wurden zwei klassische Schadstoffgruppen der Ölanalytik, *n*-Alkane und PAK, quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Binder bei entsprechender Dosierung in der Lage sind, 99 % einer ausgebrachten Ölmenge aus dem wässrigen System aufzunehmen. Die eingesetzte Ölmenge orientierte sich dabei an den Vorgaben des VPS für kleine Ölavarien ( $V \leq 50 \text{ t}$ ). Die Reinigungsleistung liegt für das Öl als Ganzes und die darin enthaltenen *n*-Alkane und PAK in derselben Größenordnung. Während die Reinigungsleistung der Binder von ihrer Dosierung abhängt, steht die Ölaufnahmekapazität in Abhängigkeit zur Temperatur und der vorliegenden Ölfilmschichtdicke. Bei sinkender Temperatur steigt die Viskosität des Öls, sodass zwar die Adsorption an den außenliegenden Binderphasen erleichtert, jedoch das Eindringen in das Binderinnere erschwert wird. Dadurch sinkt sowohl die Ölaufnahmegergeschwindigkeit als auch die -kapazität. Die Ölaufnahmekapazität ist außerdem direkt proportional zu der Ölfilmschichtdicke. Bei einem Wert von  $d_{\text{Öl}} = 0,3 \text{ mm}$  konnte eine Ölaufnahmekapazität von 2,2 g Öl/g Binder ermittelt werden. Die maximale Ölaufnahmekapazität von 2,7 g Öl/g Binder wird demnach bei einer Ölfilmschichtdicke von etwa 0,4 mm erreicht. Die Ölaufnahmegergeschwindigkeit ist nicht nur direkt proportional zur Temperatur, sondern außerdem abhängig von der Binderbewegung in der Wasserphase. Findet eine Überspülung der Binder mit der Öl-/Wasserphase statt, ist die Ölaufnahme nach 30 Minuten abgeschlossen. Werden die Binder hingegen lediglich leicht auf der Wasseroberfläche bewegt, verlängert sich dieser Prozess je nach Temperatur auf einen Zeitraum von vier bis sieben Tagen. Da die

Ölausnahme exponentiell verläuft, konnte unter *in-situ*-Bedingungen gezeigt werden, dass der untersuchte Wasserkörper durch einen Bindereinsatz innerhalb von vier Tagen unabhängig von der Temperatur von 90 % des ausgebrachten Öls befreit werden konnte.

Nach einer Verweildauer von 20 Tagen im wässrigen System unter konstanter mechanischer Belastung desorbierten weniger als 5 % der aufgenommenen Ölmasse inklusive *n*-Alkane und PAK von den Bindern. Bei einer leichten Binderbewegung konnte auch nach einer Verweildauer von 30 Tagen weder eine Desorption von Binderbestandteilen noch eine Ölabbgabe der ölbefeuerten Binder in die Wasserphase nachgewiesen werden.

Anhand der durchgeföhrten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle 19 untersuchten Bakterienstämme unabhängig von den eingesetzten Ölkonzentrationen in der Lage waren, die im Öl vorhandenen *n*-Alkane (*n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) abzubauen. Dabei fand ein bevorzugter Abbau der kurzkettigen Verbindungen statt. Der Abbau der *n*-Alkane kann durch die Zugabe von Nährstoffen sowie durch die Kombination der Mikroorganismen zu Zweier- beziehungsweise Dreiergemeinschaften gesteigert werden. Für ausgewählte Gemeinschaften (bestehend aus *Rh. erythreus* und *Rh. fascians*) konnte unter Laborbedingungen bereits nach vier Tagen ein vollständiger Abbau der *n*-Alkane nachgewiesen werden. Es konnte in keinem Experiment ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Abbauleistung und einer Bakterienart herausgearbeitet werden. Auch eindeutige synergetische Effekte, die eine Voraussage der Abbauleistung des Konsortiums anhand der Abbauleistungen der Reinkulturen ermöglichen, wurden nicht beobachtet. Die Ergänzung der bakteriellen Gemeinschaft durch eine Algen- beziehungsweise Cyanobakterienkultur zeigte keine leistungssteigernden Effekte.

Im Rahmen der Laborexperimente konnte herausgearbeitet werden, dass die Verwendung von Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle bei gleichzeitigem Wirken von alkanabbauenden Mikroorganismen zu einer Hemmung des mikrobiellen PAK-Abbaus führt. Diese Hemmung ist wahrscheinlich auf eine Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen.<sup>[96,99]</sup> Eine Steigerung der Abbauleistung durch die Kombination mehrerer Bakterienkulturen zu einem Konsortium konnte weder anhand der PAK-Analysen noch in Bezug auf die Gesamtmatrix Öl eindeutig belegt werden. Zum Teil wurde eine hemmende Wirkung durch den Einsatz von Bakteriengemeinschaften beobachtet. Unter *in-situ*-Bedingungen verlief der PAK-Abbau durch das ausgewählte Mikroorganismenkonsortium (*Rh. erythreus*, *Rh. fascians* sowie ein Algenstamm) effektiver als der Abbau der *n*-Alkane. Nach 30 Tagen konnten noch 9 % der *n*-Alkanverbindungen, jedoch keine PAK mehr im Wasserkörper nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die sogenannten „lag time“ (Zeit, bis der mikrobielle Abbau einsetzt) für den Abbau der *n*-Alkane mit etwa drei Tagen kürzer ist als für den PAK-Abbau, bei dem sie etwa sieben Tage beträgt. Der mikrobielle Ölabbau fand unter *in-situ*-Bedingungen im Meerwasser statt, wobei den Mikroorganismen lediglich ostseetypische Nährstoffmengen (N und P) zur Verfügung standen, deren Verbrauch quantifiziert wurde. Neben der Art und Menge der Nährstoffversorgung beeinflusst auch das N:P-Verhältnis die mikrobielle Abbauleistung.

Anhand der Untersuchungen unter *in-situ*-Bedingungen konnte herausgearbeitet werden, dass die Auftragung der Mikroorganismen auf die Ölbinder für einen kombinierten Einsatz beider Komponenten unter definierten Bedingungen stattfinden sollte. Sowohl die Bakterienzahl in der Eintauchlösung als auch die Eintauchzeit haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Ölausnahmleistung der Binder. Die genannten Parameter wurden so bestimmt (Bakterientiter  $4 \cdot 10^7$  kbE/mL,  $t_E = 1$  s), dass die Reinigungsleistung der behandelten Binder der der unbehandelten entsprach. Die aufgebrachten Mikroorganismen sind zum einen in der Lage, in die Wasserphase zu migrieren und das dort verbliebene Öl abzubauen. Zum anderen findet zusätzlich ein mikrobieller Ölabbau auf den Bindern statt, der bei wärmeren Temperaturen ( $T = 25$  °C) effektiver verläuft als bei Temperaturen unter 10 °C.

Unter *in-situ*-Bedingungen konnte darüber hinaus belegt werden, dass die Aktivität der natürlich im Ostseewasser vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaft durch einen Öleintrag gesteigert wird. Anhand unterschiedlicher Abnahmemuster der *n*-Alkane konnte gezeigt werden, dass die natürliche Gemeinschaft etwa zwei Wochen nach dem Öleintrag mit dem Abbau der *n*-Alkanverbindungen (*n*-C<sub>25</sub> bis *n*-C<sub>40</sub>) beginnt. Dabei werden bevorzugt die Verbindungen mit kürzerer Kettenlänge abgebaut. Ein PAK-Abbau konnte vermutet, jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die generierten Ergebnisse bilden zum einen eine belastbare Grundlage für eine Einsatzempfehlung der Ölbinder und/oder des ölabbauenden Mikroorganismenkonsortiums zur Bekämpfung einer Ölavarie und zum anderen ermöglichen sie eine fundierte Einsatzplanung unter Berücksichtigung wesentlicher Parameter wie Temperatur oder das ausgetretene Ölvolument. Die Ölausnahmekapazität der Ölbinder ist verglichen mit synthetischen Sorbenzien um den Faktor zwei bis zehn geringer, jedoch kann im Falle eines Öleintrages ( $V_{Öl} \leq 50$  t) mit einer realisierbaren Bindermenge eine Reinigungsleistung von 99 % erzielt werden, ohne dass eine zusätzliche Belastung für das marine Ökosystem entsteht.<sup>[76-80]</sup> Durch ihre feste Form ermöglichen die Binder eine praktikable Bergung (seeseitig oder landseitig), die basierend auf der mindestens 30-tägigen Ölbindefähigkeit auch erst mehrere Tage nach der Binderausbringung erfolgen kann. Das Öl wird demnach nicht nur gebunden und an einer weiteren Ausbreitung gehindert, sondern wird größtenteils aus dem marinen Ökosystem entfernt. Der Einsatz eines indigenen, ölabbauenden Mikroorganismenkonsortiums nach einer Ölavarie unterstützt und beschleunigt die natürlich auftretenden mikrobiellen Ölabbauprozesse in der Ostsee. Eine fundierte Abschätzung der Nährstoffmenge, die unter Berücksichtigung der ostseetypischen Konzentrationen und der tatsächlich für den mikrobiellen Ölabbau benötigten Menge erfolgen kann, sowie die Fixierung der Nährstoffe auf den Bindern ermöglicht eine Unterstützung der mikrobiellen Ölabbauprozesse bei gleichzeitiger Minimierung der negativen Folgeerscheinungen eines Nährstoffeintrages.

## 5 Anhang

### 5.1 Verwendete Chemikalien

Alle bei der Aufarbeitung der Proben verwendeten Chemikalien werden inklusive Reinheitsgrad und Hersteller in den folgenden Tabellen 20 bis 23 aufgeführt.

**Tabelle 20:** Übersicht der bei der Aufarbeitung der Proben verwendeten Chemikalien mit Angaben zum Reinheitsgrad und Hersteller.

Chemikalie	Reinheit in %	Hersteller	Anmerkung
Dichlormethan Picograde, zur Rückstandsanalyse	≥ 99,5	LGC Standards	stabilisiert mit Amylen
<i>n</i> -Hexan Picograde, zur Rückstandsanalyse	≥ 99	LGC Standards	
<i>n</i> -Heptan Picograde, zur Rückstandsanalyse	≥ 97	LGC Standards	
Toluol SupraSolv®, für die Gaschromatografie	keine Angabe	Merck	
Aceton Picograde, zur Rückstandsanalyse	≥ 99	LGC Standards	
Natriumsulfat wasserfrei zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	≥ 99	Merck	
Kieselgel 60 reinst, für die Säulenchromatografie	keine Angabe	Merck	0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM)
Aluminiumoxid 90 aktiv neutral (Aktivitätsstufe I), für die Säulenchromatografie	keine Angabe	Merck	0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM)

**Tabelle 21:** Übersicht der verwendeten Standardlösungen zur PAK-Analyse mit Angaben zum Reinheitsgrad und Hersteller. a: PAH-Mix 9, c = 10 mg/L, in Cyclohexan; b: je c = 10 mg/L, in Cyclohexan; c: PAH-Mix 6, c = 10 mg/L, in Cyclohexan; d: PAH-Mix 9 deuterated, c = 10 mg/L, in Cyclohexan; e: c = 10 mg/L, in Cyclohexan.

Substanz	Reinheit in %	Hersteller
Naphthalin <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer
Acenaphthylen <sup>a</sup>	97	Dr. Ehrenstorfer
Acenaphthlen <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer
Fluoren <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer
Phenanthren <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer

Fortsetzung Tabelle 21.

Substanz	Reinheit in %	Hersteller
Anthracen <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer
Fluoranthen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Pyren <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Benz(a)anthracen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Chrysen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Benz(b)fluoranthen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Benz(k)fluoranthen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Benz(a)pyren <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Indeno(1,2,3-c,d)pyren <sup>a</sup>	99,5	Dr. Ehrenstorfer
Dibenzo(a,h)anthracen <sup>a</sup>	99	Dr. Ehrenstorfer
Benz(g,h,i)perylene <sup>a</sup>	99,3	Dr. Ehrenstorfer
1-Methylnaphthalin <sup>b</sup>	98	LGC Standards
2-Methylnaphthalin <sup>b</sup>	98	LGC Standards
1,7-Dimethylnaphthalin <sup>c</sup>	99	LGC Standards
9-Methylanthracen <sup>c</sup>	98	LGC Standards
9,10-Dimethylanthracen <sup>c</sup>	99	LGC Standards
1-Methylpyren <sup>c</sup>	99	LGC Standards
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen <sup>c</sup>	98	LGC Standards
5-Methylchrysen <sup>c</sup>	95	LGC Standards
d <sub>8</sub> -Naphthalin <sup>d</sup>	98,6	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>6</sub> -Acenaphthylen <sup>d</sup>	98,5	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>8</sub> -Acenaphthen <sup>d</sup>	98,2	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>8</sub> -Fluoren <sup>d</sup>	97,6	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>10</sub> -Phenanthren <sup>d</sup>	98,4	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>10</sub> -Anthracen <sup>d</sup>	97,8	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>10</sub> -Fluoranthen <sup>d</sup>	98,5	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>10</sub> -Pyren <sup>d</sup>	97,9	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Benz(a)anthracen <sup>d</sup>	98,2	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Chrysen <sup>d</sup>	98,1	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Benz(b)fluoranthen <sup>d</sup>	97,6	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Benz(k)fluoranthen <sup>d</sup>	97,7	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Benz(a)pyren <sup>d</sup>	97,2	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Indeno(1,2,3-c,d)pyren <sup>d</sup>	97	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>14</sub> -Dibenzo(a,h)anthracen <sup>d</sup>	98,4	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>12</sub> -Benz(g,h,i)perylene <sup>d</sup>	98,5	Dr. Ehrenstorfer
d <sub>10</sub> -1-Methylnaphthalin <sup>e</sup>	98	LGC Standards

**Tabelle 22:** Übersicht der verwendeten Standardlösungen zur *n*-Alkananalyse mit Angaben zum Reinheitsgrad und Hersteller. a: TRPH Standard New Jersey, in Dichlormethan/Kohlenstoffdisulfid (9:1); b: Feststoff.

Substanz	Konzentration in mg/L	Hersteller
	± Vertrauensbereich in mg/L	
<i>n</i> -C <sub>15</sub> <sup>a</sup>	201,0 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>16</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>17</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
Pristan <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>18</sub> <sup>a</sup>	201,0 ± 1,0	LGC Standards
Phytan <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>19</sub> <sup>a</sup>	200,2 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>20</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>21</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>22</sub> <sup>a</sup>	200,4 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>23</sub> <sup>a</sup>	200,2 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>24</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>25</sub> <sup>a</sup>	200,1 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>26</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>27</sub> <sup>a</sup>	200,4 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>28</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>29</sub> <sup>a</sup>	200,2 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>30</sub> <sup>a</sup>	200,4 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>31</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>32</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>33</sub> <sup>a</sup>	200,2 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>34</sub> <sup>a</sup>	200,4 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>35</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>36</sub> <sup>a</sup>	200,4 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>37</sub> <sup>a</sup>	200,2 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>38</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>39</sub> <sup>a</sup>	200,8 ± 1,0	LGC Standards
<i>n</i> -C <sub>40</sub> <sup>a</sup>	200,6 ± 1,0	LGC Standards
5- $\alpha$ -Androstan <sup>b</sup>	Reinheit: 99,7 %	Sigma Aldrich

**Tabelle 23:** Übersicht der verwendeten Substanzen zur Nährstoffanalyse.

Substanz	Reinheit in %	Hersteller
Phenol zur Analyse ACS, Reag. Ph. Eur.	≥ 99,5	Merck
Nitroprussid-Natrium-Dihydrat [Dinatriumpentacyanonitrosylferrat(III)-Dihydrat] zur Analyse ACS, Reag. Ph. Eur.	99,1	Merck
Trichlorisocyanursäure zur Synthese tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	100,2 99,0-101,0	Merck Merck
Natriumhydroxid Plätzchen zur Analyse (max. 0,0002 % Kalium) EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	99	Merck
Ammoniumchlorid zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	99,0-100,5	Merck
Schwefelsäure (95-97 %) zur Analyse EMSURE® ISO	95,0-97,0	Merck
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, zur Analyse ACS, ISO, Reag. Ph. Eur	≥ 99	Merck
Kaliumantimon(III)-oxidtartrat-Hemihydrat reinst L(+)-Ascorbinsäure Anal aR NORMAPUR	≥ 99 99,0-100,5	Merck VWR-BDH PROLABO
Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei (prim. Kaliumphosphat) Suprapur	≥ 99,5	Merck
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat zur Analyse ACS	99,0-101,0	Merck
Kaliumiodid zur Analyse EMSURE® ISO, Reag. Ph. Eur.	≥ 99,5	Merck
Stärke löslich zur Analyse ISO	keine Angabe	Merck
Kaliumiodat zur Analyse CS, ISO, Reag. Ph. Eur.	99,7-100,4	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	99,5-101,0	Merck

## 5.2 Probennahme und -aufbereitung

Informationen zum allgemeinen Schema der Probenaufarbeitung sowie zur Reinigung der Extrakte über dem Doppelsäulensystem befinden sich in Abschnitt 2.2.

### 5.2.1 Standardlösungen

Die Bezeichnung, Zusammensetzung und Konzentration der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Standardlösungen sind in den folgenden Tabellen 24 bis 26 aufgeführt.

Für die Herstellung der internen Standardlösung wurde zunächst eine Lösung von 5- $\alpha$ -Androstan angesetzt. Dafür wurden 28,5 mg 5- $\alpha$ -Androstan in 10 mL *n*-Heptan gelöst („Andro1“). Von dieser Stammlösung Andro1 wurde ein Aliquot von 250  $\mu$ L entnommen und mit *n*-Heptan auf ein Volumen von 5 mL aufgefüllt, sodass eine Konzentration von  $c = 142,65$  mg/L erreicht wurde („Andro2“). Die interne Standardlösung enthält alle als interne Standards verwendeten Substanzen und wird im Folgenden als „IS gesamt“ bezeichnet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 24 aufgeführt.

**Tabelle 24:** Zusammensetzung der internen Standardlösung IS gesamt; die Angabe der Konzentration bezieht sich auf die Konzentration der jeweiligen Substanz in der internen Standardlösung IS gesamt.

Chemikalie	V in $\mu$ L	c (IS gesamt) in mg/L
Andro2	200	2,85
PAH-Mix 9 deuterated	1000	1
d <sub>10</sub> -1-Methylnaphthalin	1000	1
<i>n</i> -Heptan	7800	

Die zur Quantifizierung verwendete Standardlösung wird im Folgenden als „IntEx“ bezeichnet. Diese Lösung enthält sowohl die Zielanalyten als auch die massenmarkierten Substanzen beziehungsweise die als interne Standards verwendeten Verbindungen. Für die Herstellung der IntEx-Lösung wurde zunächst eine Stammlösung angesetzt, die lediglich die polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe enthielt („PAK1“). Die Zusammensetzung dieser Stammlösung PAK1 ist in Tabelle 25 aufgelistet.

**Tabelle 25:** Zusammensetzung der PAK-Stammlösung PAK 1; die Angabe der Konzentration bezieht sich auf die Konzentration der jeweiligen Substanz in der Stammlösung PAK1.

Chemikalie	V in $\mu\text{L}$	c (PAK1) in mg/L
PAH-Mix 9 deuterated	500	1
$\text{d}_{10}$ -1-Methylnaphthalin	500	1
PAH-Mix 9	500	1
PAH-Mix 6	500	1
1-Methylnaphthalin	500	1
2-Methylnaphthalin	500	1
<i>n</i> -Heptan	2000	

Die Zusammensetzung der Standardlösung IntEx ist in Tabelle 26 aufgeführt.

**Tabelle 26:** Zusammensetzung der Standardlösung IntEx; die Angabe der Konzentration bezieht sich auf die Konzentration der jeweiligen Substanz in der Standardlösung IntEx.

Chemikalie	V in $\mu\text{L}$	c (IntEx) in mg/L
Andro2	350	5
TRPH Standard New Jersey	250	5
PAK1	500	0,05
<i>n</i> -Heptan	8900	

## 5.2.2 Ölbinden

Die folgenden Informationen beziehen sich auf den Abschnitt 3.1. Im Rahmen der durchgeführten *n*-Alkan- und PAK-Analysen wurde jeweils ein Summenparameter bestimmt. Bei den Ergebnissen der *n*-Alkanmessungen wurden dazu die Massen der *n*-Alkane *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>38</sub> sowie die isoprenoiden Verbindungen Pristan und Phytan summiert. Die *n*-Alkane mit der Kettenlänge *n*-C<sub>39</sub> und *n*-C<sub>40</sub> konnten nicht in allen Proben sicher nachgewiesen werden. Daraus wurden diese beiden Verbindungen in dem Summenparameter nicht berücksichtigt.

Zur Erstellung des PAK-Summenparameters wurde die Masse von dreizehn nachgewiesenen Verbindungen summiert (Naphthalin, 2-Methylnaphthalin, 1-Methylnaphthalin, 1,7-Dimethylnaphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Fluoranthren, Pyren, 1-Methylpyren, 7,12-Dimethylbenzo(α)anthracen, Chrysene).

### Absorption

Für die Absorptionsversuche mit einer Binderbelegung von  $b = 0,4$  (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden die Ölbinden (OELB 8) auf eine Kantenlänge von 25 mm x 25 mm zugeschnitten. In ein Becherglas (V = 800 mL) wurden 230 mL deionisiertes Wasser und 2 g Rohöl gegeben. Es wurden jeweils Triplikate angesetzt. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde in einer zusätzlichen Probe auf die Rohölzugabe verzichtet. Nach der Befüllung der Bechergläser

wurden diese mit Aluminiumfolie abgedeckt und 30 Minuten stehen gelassen, damit sich ein Gleichgewicht zwischen der Öl- und der Wasserphase einstellen konnte. Nach dieser Zeit wurden fünf Binderstück mit einer Pinzette vorsichtig auf die Wasseroberfläche beziehungsweise den Ölfilm gelegt. Die Bechergläser wurden erneut abgedeckt und 30 Minuten, 60 Minuten beziehungsweise 90 Minuten bei 90 Bewegungen/Minute geschüttelt. Die Versuchsdauer für den Blindwert betrug 90 Minuten. Nach dem Schütteln wurden die Binder entfernt und die wässrige Phase in einen Scheidetrichter überführt und mit 500  $\mu\text{L}$  der internen Standardlösung IS gesamt versetzt. Die Extraktion der wässrigen Phase wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Hexan durchgeführt. Von den getrockneten und eingeengten Extrakten ( $V = 1 \text{ mL}$ ) wurden 500  $\mu\text{L}$  in ein Probengläschen bekannter Masse überführt und offen in den Abzug gestellt. Für die gravimetrische Bestimmung erfolgte das Wiegen bis zur Massekonstanz. Je 400  $\mu\text{L}$  der getrockneten Extrakte wurden über einem Doppelsäulensystem gereinigt. Von dem eingeengten Eluat wurden für die *n*-Alkanmessung 500  $\mu\text{L}$  entnommen und auf 100  $\mu\text{L}$  eingeengt. Für die PAK-Messung wurden dem eingeengten Eluat 100  $\mu\text{L}$  entnommen und mit 700  $\mu\text{L}$  *n*-Heptan verdünnt.

Um auch das an der Becherglaswand anhaftende Öl zu erfassen, wurde pro Versuchsdauer je ein Becherglas zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Hexan gespült. Die Spülösungen wurden vereint, getrocknet und eingeengt. 800  $\mu\text{L}$  wurden für die gravimetrische Analyse verwendet und 100  $\mu\text{L}$  gemeinsam mit 400  $\mu\text{L}$  der internen Standardlösung IS gesamt auf die Doppelsäule gegeben. Nach der Reinigung wurde mit dem Eluat genauso vorgegangen wie für die Extrakte der Wasserphase beschrieben.

Für die Absorptionsuntersuchungen mit einer Binderbelegung von  $b = 0,1$  (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden die Ölbinder (OELB 8) auf eine Kantenlänge von 28 mm x 28 mm zugeschnitten. In ein Becherglas ( $V = 800 \text{ mL}$ ) wurden 230 mL deionisiertes Wasser und 0,2 g beziehungsweise 2 g Rohöl gegeben. Für jede Masse wurden Duplikate angesetzt. Als Blindwert wurde zusätzliche eine Probe ohne Zugabe von Rohöl mitgeführt. Nach der Befüllung der Bechergläser wurden diese mit Aluminiumfolie abgedeckt und 30 Minuten stehen gelassen, damit sich ein Gleichgewicht zwischen der Öl- und der Wasserphase einstellen konnte. Nach dieser Zeit wurde jeweils ein Binderstück mit einer Pinzette vorsichtig auf die Wasseroberfläche beziehungsweise den Ölfilm gelegt. Die Bechergläser wurden erneut abgedeckt und 60 Minuten bei 90 Bewegungen/Minute geschüttelt. Nach dem Schütteln wurden die Binder entfernt und die wässrige Phase in einen Scheidetrichter überführt. Um auch das an der Becherglaswand anhaftende Öl zu erfassen, wurden die Bechergläser jeweils mit dem Extraktionsmittel gespült, bevor dieses in den Scheidetrichter gegeben wurde und die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte. Die Extraktion wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Hexan durchgeführt. Die Extrakte wurden getrocknet, jedoch nicht eingeengt. 1500  $\mu\text{L}$  wurden für die gravimetrische Analyse verwendet. Beim Einsatz von 0,2 g Rohöl wurden 300  $\mu\text{L}$  des Extraktes gemeinsam mit 400  $\mu\text{L}$  der internen Standardlösung IS gesamt auf die Doppelsäule gegeben. Beim Einsatz von 2 g Rohöl wurden an dieser

Stelle 75  $\mu$ L des Extraktes mit 400  $\mu$ L der internen Standardlösung IS gesamt gereinigt. Die Eluate wurden genauso behandelt wie im vorhergehenden Experiment (Absorptionsuntersuchungen mit  $b = 0,4$ ) beschrieben.

### Desorption

Für die Desorptionsuntersuchungen (siehe Abschnitt 3.1.2) wurden die zugeschnittenen Öl-binder (OELB 8, 28 mm x 28 mm) jeweils mit 1,2 g Rohöl versetzt. Es wurden fünf verschiedene Versuchsansätze (De1-De5) geführt. Für die Ansätze De1 bis De3 wurden je 230 mL deionisiertes Wasser und drei ölgetränkte Binderstücke in ein Becherglas ( $V = 800$  mL) gegeben. Für die Ansätze De4 und De5 wurden die Bechergläser jeweils mit 230 mL deionisiertem Wasser und fünf ölgetränkten Binderstücken befüllt. Für die Ansätze De3 bis De5 wurden Proben zur Blindwertbestimmung mitgeführt, bei denen mit ölfreien Binderstücken gearbeitet wurde. Die Bechergläser wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und mit 90 Bewegungen/Minute unter Ausschluss von direkter Sonneneinstrahlung bei konstanter Raumtemperatur geschüttelt. Die Versuchsansätze wurden zu unterschiedlichen Zeiten abgebrochen:  $t_1 = 1$  h,  $t_2 = 15$  h,  $t_3 = 24$  h,  $t_4 = 10$  d,  $t_5 = 20$  d. Für jede Versuchslaufzeit wurden Triplikate angesetzt. Nach der jeweiligen Versuchslaufzeit wurden die Binder mit einer Pinzette entfernt und die wässrige Phase in einen Scheidetrichter überführt. Um auch das an der Becherglaswand anhaftende Öl zu erfassen, wurden die Bechergläser der Versuchsansätze De4 und De5 jeweils mit dem Extraktionsmittel gespült, bevor dieses in den Scheidetrichter gegeben wurde und die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte. Die Extraktion der wässrigen Phase wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Hexan durchgeführt. Die Extrakte wurden getrocknet, jedoch nicht eingeengt. 1500  $\mu$ L wurden für die gravimetrische Analyse verwendet. Für die weiteren Ölanalysen wurden 400  $\mu$ L des Extraktes mit 400  $\mu$ L der internen Standardlösung IS gesamt gereinigt. Von dem eingeengten Eluat ( $V = 1$  mL) wurden für die PAK-Messung 50  $\mu$ L entnommen und mit *n*-Heptan auf 800  $\mu$ L verdünnt. Für die *n*-Alkanmessung wurden 800  $\mu$ L Eluat auf 400  $\mu$ L eingeengt. Um auch in den Ansätzen De1 bis De3 das an der Becherglaswand anhaftende Öl zu erfassen, wurde je ein Becherglas zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Hexan gespült. Mit den Spülösungen wurde ebenso verfahren wie für die Extrakte der Wasserphase beschrieben.

### 5.2.3 Mikroorganismen

Die folgenden Informationen beziehen sich auf den Abschnitt 3.2. Bei den Ölabbauversuchen mit Mikroorganismen wurde eng mit den Projektpartnern von der Universität Leipzig zusammen gearbeitet. Die Mikroorganismenisolierung wurde nach der Probennahme von den Biologen aus Leipzig durchgeführt. In Leipzig wurden auch alle im Folgenden behandelten Proben angesetzt und extrahiert.<sup>[146]</sup> Die weitere Aufarbeitung der Proben (Trocknung, Reinigung, Vorbereitung auf die Messung) sowie die Messung wurde am Leibniz-Institut für Warnemünde durchgeführt.

Bei den Ölabbauversuchen wurde von den Projektpartnern aus Leipzig mit zwei verschiedenen Medien gearbeitet, deren Grundlage filtriertes Ostseewasser (Porengröße 0,2 µm) darstellte. Zum einen wurde ein OMB-Medium (Nährboden für ölabbauende Meeresbakterien) verwendet. Dieses Medium setzte sich aus 750 mL Ostseewasser, 250 mL destilliertem Wasser, 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zusammen.<sup>[147]</sup> Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt. Als zweites Medium wurde ein nährstoff- und spurenelementreiches Algenmedium folgender Zusammensetzung verwendet: 750 ml Ostseewasser, 250 ml destilliertes Wasser, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,15 g CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 16,9 µg MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 13 µg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 µg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 µg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10 µg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 µg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 13,8 µg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O und 18,6 µg Na<sub>2</sub>-EDTA.<sup>[148]</sup> Die Inkubationen fanden grundsätzlich in der Dunkelheit statt, um lichtinduzierte Abbauprozesse ausschließen zu können. Die Versuchsgefäße wurden während der Inkubationszeit auf einem Orbital-schüttler mit 170 Bewegungen/Minute geschüttelt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt.

### Einfluss der Ölkonzentration

Die folgenden Informationen beziehen sich auf den Abschnitt 3.2.1. Die einzelnen Bakterienstämme (19 Reinkulturen) wurden für drei Tage auf festem OMB-Medium mit Pyruvat kultiviert. In den Versuchsgefäßen wurde mit einer Suspension des OMB-Mediums gearbeitet. 4,8 mL dieser Suspension wurden mit 200 µL Bakteriensuspension und 25 µL Rohöl (c = 5 g/L) beziehungsweise 10 µL Rohöl (c = 2 g/L) versetzt. Das Rohölaliquot wurde auf der Waage hinzugegeben und die genaue Masse bestimmt und notiert. Die Probengefäße wurden mit einem Wattestopfen verschlossen und zwei Wochen inkubiert. Im Rahmen des Versuchsansatzes mit der höheren Ölkonzentration (c = 5 g/L) wurden drei Kontrollproben angesetzt, denen keine Mikroorganismen zugesetzt wurden, wobei eine dieser Proben direkt nach dem Versuchsstart extrahiert wurde. Die Extraktion erfolgte einmal mit 5 mL n-Hexan. Im Rahmen des Versuchsansatzes mit der niedrigeren Ölkonzentration (c = 2 g/L) wurden sechs Kontrollproben angesetzt, denen keine Mikroorganismen zugesetzt wurden, wobei drei dieser Proben direkt nach dem Versuchsstart extrahiert wurden. Die Extraktion erfolgte zweimal mit je 5 mL Dichlormethan. Von den getrockneten Extrakten beider Versuchsansätze wurden für jede Probe 400 µL gemeinsam mit 150 µL der internen Standardlösung IS gesamt auf das Doppelsäulensystem gegeben und gereinigt. Von dem eingeengten Eluat (V = 1 mL) wurden für die n-Alkanmessung 800 µL des Extraktes auf 50 µL eingeengt. Für die PAK-Messung wurden 100 µL mit n-Heptan auf 250 µL verdünnt.

### Einfluss der Nährstoffzugabe

Um den Einfluss des Nährmediums zu ermitteln (siehe Abschnitt 3.2.2), wurden drei Reinkulturen (Probe Nr. 3, 10 und 17) unter Verwendung von je 5 mL des Algenmediums sowie 25 µL Rohöl (c = 5 g/L) über einen Zeitraum von 45 Tagen inkubiert. Das Rohölaliquot wurde auf der Waage hinzugegeben und die genaue Masse bestimmt und notiert. Die Probengefä-

ße wurden während der Inkubationsdauer mit einem Wattestopfen verschlossen. Neben den Proben wurden zwei Kontrollproben angesetzt, von denen eine direkt nach dem Versuchsstart extrahiert wurde. Die Extraktion wurde einmal mit 10 mL *n*-Hexan durchgeführt. Von dem getrockneten Extrakt wurden 400 µL gemeinsam mit 400 µL der internen Standardlösung IS gesamt auf das Doppelsäulensystem gegeben und gereinigt. Von dem eingeengten Eluat (V = 1 mL) wurden 100 µL mit 700 µL *n*-Heptan für die PAK-Messung verdünnt.

### **Mikroorganismengemeinschaften**

Für die Experimente mit den Zweierkonsortien (siehe Abschnitt 3.2.3) wurden die einzelnen Bakterienstämme (19 Reinkulturen) für drei Tage auf festem OMB-Medium mit Pyruvat kultiviert. In den Versuchsgefäßen wurde mit einer Suspension des OMB-Mediums gearbeitet. 4,8 mL dieser Suspension wurden mit 200 µL Bakteriensuspension (je 100 µL/Reinkultur) und 10 µL Rohöl (c = 2 g/L) versetzt. Das Rohölaliquot wurde auf der Waage hinzugegeben und die genaue Masse bestimmt und notiert. Die Probengefäße wurden mit einem Wattestopfen verschlossen und zwei Wochen inkubiert. Es wurden sechs Kontrollproben angesetzt, denen keine Mikroorganismen zugesetzt wurden, wobei drei dieser Proben direkt nach dem Versuchsstart extrahiert wurden. Die Extraktion erfolgte zweimal mit je 5 mL Dichlormethan. Von den getrockneten Extrakten wurden 400 µL gemeinsam mit 150 µL der internen Standardlösung IS gesamt auf das Doppelsäulensystem gegeben und gereinigt. Von dem eingeengten Eluat (V = 1 mL) wurden für die *n*-Alkanmessung 800 µL des Extraktes auf 50 µL eingeengt. Für die PAK-Messung wurden 100 µL mit *n*-Heptan auf 250 µL verdünnt.

Für die Experimente mit den Dreierkonsortien beziehungsweise den Mikroorganismenkonsortien unter Zusatz von Cyanobakterien und Algen (siehe Abschnitt 3.2.3) wurden die Mikroorganismengemeinschaften in ein Versuchsgefäß mit 25 mL OMB-Medium und 125 µL Rohöl (c = 5 g/L) gegeben. Die Rohölzugabe erfolgte auf der Waage, die genaue Masse wurde notiert. Die Inkubationszeit betrug zwei Wochen. Es wurden zwei Kontrollproben angesetzt, von denen eine direkt nach dem Versuchsbeginn extrahiert wurde. Für zwei ausgewählte Mikroorganismengemeinschaften wurde eine Zeitreihenanalyse durchgeführt. Dafür wurden acht Proben mit Mikroorganismen und fünf Kontrollproben angesetzt. Eine Kontrollprobe wurde zu Beginn des Versuches extrahiert. Die Extraktion von je zwei Mikroorganismenproben und einer Kontrollprobe erfolgte an den Tagen 1, 4, 7 und 11 nach Versuchsbeginn. Die Extraktion wurde mit 50 mL Dichlormethan durchgeführt. Von dem getrockneten Extrakt wurden 400 µL mit ebenfalls 400 µL der internen Standardlösung IS gesamt auf das Doppelsäulensystem gegeben und gereinigt. Von dem eingeengten Eluat wurden für die *n*-Alkanmessung 500 µL entnommen und auf 100 µL eingeengt. Für die PAK-Messung wurden 100 µL entnommen und mit 700 µL *n*-Heptan verdünnt. Für die gravimetrische Analyse wurden 25 mL in ein Probengläschen bekannter Masse überführt, das offen unter dem Abzug gelagert wurde, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Danach erfolgte das Wiegen an der Feinwaage bis zur Massekonstanz.

### 5.2.4 Experimente unter *in-situ*-Bedingungen

Für die Mesokosmenexperimente (siehe Abschnitt 3.3) wurden rückstandsfreie Polyethylen-tanks verwendet. Zwei der Tanks sind in Abbildung 36 zu sehen. Die Tanks hatten eine Höhe und einen Durchmesser von etwa 1 m. Daraus ergibt sich eine Fläche von  $F = 0,72 \text{ m}^2$ . Die Tanks waren mit lichtdurchlässigen Deckeln verschließbar. Etwa 10 cm oberhalb des Tankbodens war ein Ventil mit Silikonschlauch zur Wasserentnahme angebracht.



Abbildung 36: Foto zweier Mesokosmentanks an Deck des FS *Elisabeth Mann Borgese*.

### Versuchsbedingungen und Voruntersuchungen

Um eine minimale Durchmischung der Wassersäule zu gewährleisten, wurden kleine, filterlose Tauchpumpen (18 V) an ihrer Kabelverbindung über den Rand in die Tanks gehängt. Mittels Zeitschaltuhr wurde der Intervallbetrieb geregelt, da die Pumpen für den Dauerbetrieb über mehrere Wochen nicht geeignet waren. Um die Vergleichbarkeit der Tanks zu bewahren, wurden die Pumpen zentral geregelt, sodass sich Effekte, die sich aus der Variation der Pumpenleistung ergeben, auf alle Tanks auswirken. Der Auslass der Pumpen wurde schräg Richtung Wasseroberfläche gerichtet, sodass das Wasser an der Stelle, an der der gepumpte Wasserstrahl auftraf, minimal konvex gewölbt war. Von der Wölbung breiteten sich kreisförmig leichte Wellen aus (siehe Abbildung 37).



Abbildung 37: Geöffneter Mesokosmos mit Meerwasser gefüllt (links); Wasseroberfläche im Mesokosmos bei eingeschalteter Pumpe (rechts).

Um die Notwendigkeit einer Behandlung der Tankwände zur Vermeidung von Adsorptionseffekten zu überprüfen, erfolgte die optische Bewertung der Öladsorption über einen Zeitraum von fünf Tagen. Dazu wurden 200 mL Rohöl in einen mit Wasser gefüllten Tank gegeben. Das genannte Ölvolume ergibt nach der Ausbreitung einen Ölfilm mit einer Schichtdicke

von  $d_{\text{Öl}} = 0,3 \text{ mm}$ . Es konnten über den Beobachtungszeitraum keine übermäßigen Adsorptionseffekte an der Tankwand oder der Pumpe beobachtet werden. Daher wurde auf eine Behandlung der Tankwände, zum Beispiel mit Teflonspray, verzichtet, um den Eintrag zusätzlicher Fremdstoffe in den Mesokosmos zu vermeiden.

Die schwarze Farbe der Tanks trägt dazu bei, dass es während der Experimentlaufzeit bei intensiver Sonneneinstrahlung zu einer Erwärmung des Wasserkörpers kommt. Um das Aufheizen der Tanks weitestgehend zu vermeiden, wurden die Tanks von außen mit Isolierfolie beklebt. Von einer Regulierung der Temperatur in den Tanks wurde abgesehen.

Um den Blindwert der verwendeten Tanks zu ermitteln, wurde ein Tank mit Meerwasser von der Mole in Warnemünde gefüllt. Unmittelbar danach erfolgte die erste Probennahme. Weitere Probennahmen erfolgten an den Tagen 2, 5, 7 und 9 nach dem Versuchsbeginn. Dazu wurde jeweils im Vorfeld mit einem Metallrührer der Wasserkörper durchmischt. Für die Probennahme wurde ein Becherglas zunächst mit dem im Tank befindlichen Meerwasser gespült. Nach dem Spülen wurde eine Wasserprobe entnommen. Ein Volumen von 230 mL wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan und einmal mit 10 mL *n*-Heptan extrahiert. Die Extrakte wurden vereint, getrocknet und filtriert. Nach dem Einengen auf 500  $\mu\text{L}$  wurde das Extrakt mit 25  $\mu\text{L}$  der internen Standardlösung IS gesamt versetzt und auf PAK und *n*-Alkane untersucht. Dabei wurde nichts detektiert, das die geplanten Messungen (Detektion von *n*-Alkanen und PAK, gravimetrische Analyse des Ölrückstandes) stören oder verfälschen würde.

Des Weiteren wurde mittels Blindwertbestimmung überprüft, in welchem Umfang bei der Binderextraktion, Bestandteile aus den Bindern selbst herausgelöst werden. Dafür wurden drei Binder zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Danach erfolgte die Zerkleinerung der Binder mit einem Spatel sowie eine erneute, dreimalige Extraktion mit je 50 mL Dichlormethan. Die Extrakte wurden jeweils über eine Glasnutsche mit ausgeglühtem Glasfaserfilter (1,6  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Die Extrakte wurden vereint und getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte eine erneute Filtration. Nach dem Einengen auf ein Volumen von 50 mL wurde ein Aliquot von 45 mL in ein gereinigtes Probengefäß bekannten Gewichtes überführt, die verbleibenden 5 mL dienten als Rückstellprobe. Es wurde eine gravimetrische Bestimmung der Ölmasse durchgeführt. Dabei wurde in den Extrakten ein Rückstand von  $29,5 \text{ mg} \pm 1,7 \text{ mg}$  ermittelt. Dieser Rückstand setzt sich vermutlich aus den organischen Extraktstoffen des Holzes, wie zum Beispiel Fetten, Wachsen oder Harzen, zusammen.<sup>[149]</sup>

## Versuchsdurchführung

Die Tanks wurden bis zu einer Füllstandshöhe von 40 cm mit Meerwasser aus der Mecklenburger Bucht (Experiment 1) beziehungsweise von der Mole in Warnemünde (Experimente 2 und 3) gefüllt; das entspricht einem Volumen von 290 L. Das Meerwasser wurde im Vorfeld filtriert, wobei die Porengröße des Filters 63  $\mu\text{m}$  betrug. So konnte die natürliche Zusammensetzung aus Mikroben und Plankton bewahrt und Partikel und grobe Verunreinigungen konnten zurückgehalten werden. Die Salinität betrug jeweils 10. Um eine minimale Durchmischung des Wasserkörpers zu gewährleisten, wurden Pumpen (18 V) in die Tanks gehängt,

die in Intervallschaltung betrieben wurde. Die Regelung erfolgte zentral und wurde gegebenenfalls so angepasst, dass zu jedem Zeitpunkt der Experimente eine ausreichende Sauerstoffversorgung bei oxischen Bedingungen ( $c > 2 \text{ mL/L}$ ) gewährleistet werden konnte. Unmittelbar nach der Befüllung mit Meerwasser erfolgte die Zugabe der Nährstoffe ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  und  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), sodass für Ammonium eine Konzentration von  $10 \mu\text{mol/L}$  und für Phosphat eine Konzentration von  $1 \mu\text{mol/L}$  vorlag. Um die jeweilige Konzentration über den Versuchszeitraum zu bewahren, erfolgte bei Bedarf erneut die Zugabe der genannten Nährstoffe. Mit den Nährstoffen wurde in Tank 3 500 mL einer Mikroorganismensuspension mit einem Bakterientiter von  $7 \cdot 10^8 \text{ kbE/mL}$  (koloniebildende Einheiten/mL) gegeben.<sup>[146]</sup> Bei den verwendeten Mikroorganismen handelte es sich im ersten Mesokosmenexperiment um ein Dreierbakterienkonsortium, im zweiten Mesokosmenexperiment wurde die Bakteriengemeinschaft um zwei phototrophe Organismen, eine Alge und ein Cyanobakterium, ergänzt.<sup>[146]</sup> Nach einer Stunde erfolgte die Rohölzugabe. Um einen Ölfilm von 0,3 mm zu erzeugen, wurden 184 g Rohöl (Russian Export Blended) in die entsprechenden Tanks (siehe Tabelle 14-Tabelle 16) gegeben. Die Ölmasse wurde im Vorfeld in Teflongefäße eingewogen, aus denen eine nahezu quantitative Überführung in die Tanks möglich war. Nach einer weiteren Stunde wurden die Ölbinder hinzugefügt. Dabei erfolgte die Zugabe von 32 Ölbindern pro Tank, um eine Binderbelegung von  $b = 0,11$  zu erreichen. Bei einzelnen Tanks (siehe Tabelle 14-Tabelle 16) wurden Binder eingesetzt, auf die im Vorfeld Mikroorganismen aufgebracht worden waren. Dazu wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet.<sup>[146]</sup> Im ersten Mesokosmenexperiment wurde ein Teil der Binder, unmittelbar bevor sie in die Tanks gegeben wurden, für 2 Sekunden in eine Mikroorganismensuspension getaucht ( $7 \cdot 10^8 \text{ kbE/mL}$ ,  $t_E = 2 \text{ s}$ ). Die Eintauchzeit wurde ab dem zweiten Mesokosmenexperiment auf 1 Sekunde verkürzt. Außerdem wurde der Bakterientiter der Eintauchsuspension auf  $4 \cdot 10^7 \text{ kbE/mL}$  reduziert. Bei der zweiten Auftragungsmethode wurden die Binder für 24 Stunden in eine Mikroorganismensuspension getaucht und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Die Anzahl der aufgebrachten Bakterien betrug durchschnittlich  $1,6 \cdot 10^9 \text{ kbE/g Binder}$ . Die Auftragung der Mikroorganismen wurde von den Projektpartnern der Universität Leipzig durchgeführt.

Pro Experiment erfolgte jeweils in dem Tank, der lediglich mit Meerwasser befüllt wurde, die Aufzeichnung der Temperatur.

Das erste Experiment wurde Anfang Juli 2013 an Bord der FS *Elisabeth Mann Borgese* begonnen. Nach drei Tagen wurden die Mesokosmen an Land gebracht und das Experiment auf dem Gelände der Universität Rostock zu Ende geführt. Insgesamt betrug die Laufzeit des Experimentes 30 Tage.

Das zweite Experiment wurde im September 2013 auf dem Gelände der Universität Rostock durchgeführt. Die Laufzeit betrug vier Tage.

Das dritte Experiment wurde im Februar 2014 auf dem Gelände der Universität Rostock in einem Zeitraum von 30 Tagen durchgeführt.

## **Nährstoffbestimmung**

Die folgenden Informationen beziehen sich auf den Abschnitt 3.3.2. Um die Nährstoff- und die Sauerstoffkonzentration im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes zu überwachen, erfolgte die erste Probennahme direkt nach der Befüllung der Tanks. Die zweite Probennahme wurde nach der Zugabe der Nährstoffe (siehe „Versuchsdurchführung“) durchgeführt. Innerhalb der ersten drei Tage wurden alle zwölf Stunden Wasserproben zur Nährstoff- und Sauerstoffbestimmung entnommen. Im weiteren Verlauf des Experimentes erfolgte die Probennahme wöchentlich. Dazu wurden etwa 600 mL Wasser aus einem Ventil mit Silikonschlauch unmittelbar über dem Tankboden entnommen. Die Wasserproben wurden unfiltriert verwendet, für die weitere Bearbeitung geteilt, mit den für die jeweilige Messung benötigten Reagenzien versetzt und analysiert. Für die Probennahme zur Sauerstoffbestimmung wurde der Silikonschlauch bis auf den Boden der Probengefäße (bekanntes Volumen) geführt. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde solange Wasser in das Probengefäß gefüllt, bis sich der Inhalt etwa dreimal erneuert hatte. Der Schlauch wurde bei fließendem Wasser langsam aus dem Probengefäß gezogen.<sup>[150]</sup>

Die Aufarbeitung der Proben für die Sauerstoffbestimmung wurde wie folgt durchgeführt.<sup>[150]</sup> Zur Fixierung des Sauerstoffes wurden die Proben direkt nach dem Abfüllen mit je 0,5 mL Mangan-Reagenz (400 g Manganchlorid in 1 L deionisiertem Wasser) und alkalischer Iodidlösung (500 g Natriumhydroxid und 300 g Kaliumiodid werden getrennt in deionisiertem Wasser zu je 500 mL gelöst und anschließend vermischt) versetzt und nach dem Verschließen des Probengefäßes 1 Minute geschüttelt. Die fixierten Proben wurden im Dunkeln aufbewahrt und nach 1-12 wurde die Bestimmung fortgesetzt. Die Probe wurde mit 0,5 mL 50 %-iger Schwefelsäure versetzt und bis zum Auflösen des Niederschlages bei geschlossenem Probengefäß umgeschwenkt. Die angesäuerte Probe wurde quantitativ in das Titriergefäß überführt.

Die Aufarbeitung der Proben für die Ammoniumbestimmung wurde wie folgt durchgeführt.<sup>[150]</sup> 35 mL der unfiltrierten Wasserprobe wurden mit 1 mL Phenolreagenz (8,75 g Phenol und 100 mg Nitroprussidnatrium in 250 mL deionisiertem Wasser) versetzt und vermischt. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von 1 mL Trion (0,625 g Trichlorisocyanursäure in 250 mL alkalischem Citratpuffer (280 g Natriumcitrat und 22 g Natriumhydroxid in 800 mL deionisiertem Wasser)). Die Probe wurde kräftig geschüttelt und mindestens sechs Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurde ein Blindwert bestimmt, bei dem anstelle der Wasserprobe deionisiertes Wasser eingesetzt wurde. Dieser Blindwert wurde von allen Messwerten abgezogen.

Die Aufarbeitung der Proben für die Phosphatbestimmung wurde wie folgt durchgeführt.<sup>[150]</sup> 50 mL der unfiltrierten Wasserprobe wurden mit 1 mL Mischreagenz versetzt. Für das Mischreagenz wurden 250 mL Molybdate reagenz und 710 mL kalte 50 %-ige Schwefelsäure unter Umschwenken vermischt und anschließend mit 40 mL Antimonreagenz versetzt.

Für das Molybdatreagenz wurden 100 g Ammoniummolybdat zu 1 L Lösung in deionisiertem Wasser gelöst. Für das Antimonreagenz wurden 2,7 g Antimonkaliumtartrat in 200 mL einer 50 %-igen Schwefelsäure gelöst. Nach dem kurzen Umschwenken der Probe wurde der Trübungblindwert gemessen. Nach dem Messen wurde die Probe quantitativ in das Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 mL Askorbinsäurelösung (8 g Askorbinsäure in 100 mL deionisiertem Wasser) versetzt. Nach einer Stunde wurde der Messwert ermittelt. Analog zur Ammoniumbestimmung wurde ein Blindwert mitgeführt und berücksichtigt.

## Ölanalytik

Die folgenden Informationen beziehen sich auf die Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4. Um die Ölmasse in der Wassersäule der Mesokosmen zu bestimmen, erfolgte die erste Probennahme grundsätzlich zwei Stunden nach der Rohölzugabe beziehungsweise eine Stunde nach der Binderzugabe (siehe „Versuchsdurchführung“). Im Rahmen des ersten Mesokosmenexperimentes erfolgte die weitere Probennahme innerhalb der ersten drei Tage alle 24 Stunden. Weitere Proben wurden an Tag 7, 14 und 21 des Experimentes entnommen. Im zweiten Mesokosmenexperiment stellte die zweite Probennahme am vierten Tag des Experimentes zugleich die abschließende dar. Im dritten Mesokosmenexperiment wurden nach der ersten Probennahme zusätzlich an Tag 4, 11, 18 und 30 des Experimentes Wasserproben entnommen. Die Probennahme erfolgte mithilfe eines Teflonrohres ( $\delta = 4$  cm), das am unteren Ende mit einem Stahlstopfen verschlossen werden konnte, in den eine Stahlstange geschraubt war. Für die Beprobung der Wassersäule wurde die Stahlstange samt Stopfen in den jeweiligen Tank getaucht, bis der Stopfen den Grund berührte. Der Teflonzylinder wurde dann über die Stahlstange senkrecht durch die Wassersäule geführt, auf den Stahlstopfen gedrückt und somit verschlossen. Das obere Ende des Teflonrohres konnte mithilfe eines Teflonstopfens verschlossen werden, sodass die Proben unter Ausschluss von Kontaminationen ins Labor überführt werden konnte. Für jeden Tank wurde ein separates Probennahmegerät verwendet, um Kreuzkontaminationen zu verhindern. Im Labor wurden die Wasserproben so schnell wie möglich in einen Scheidetrichter überführt. Das Probenvolumen variierte zwischen 360 mL und 380 mL. Das exakte Volumen wurde notiert und bei den finalen Berechnungen berücksichtigt. Sowohl der Teflonzylinder als auch die Stahlstange wurden mit dem Extraktionsmittel gespült, um anhaftendes Öl vollständig in den Scheidetrichter zu überführen. Die Extraktion der Wasserproben wurde zweimal mit je 20 mL Dichlormethan und einmal mit 20 mL *n*-Hexan durchgeführt. Nach dem Trocknen wurden die Extrakte auf 6 mL eingeengt. Für die Gravimetrie wurden davon 4 mL entnommen. Für die gaschromatografischen Untersuchungen wurden 20  $\mu$ L des jeweiligen Extraktes gereinigt. Vor der Reinigung wurden mit dem Extrakt 400  $\mu$ L der internen Standardlösung IS gesamt auf das Doppelsäulensystem gegeben.

Neben der Beprobung der Wassersäule erfolgte auch eine Beprobung der eingesetzten Ölbinder. Dabei wurden in den ersten beiden Mesokosmenexperimenten jeweils drei Binder pro Tank und Entnahmepunkt entnommen, im dritten Experiment erfolgte lediglich die Entnahme eines Binders pro Tank. Im ersten Mesokosmenexperiment erfolgte die Binderent-

nahme 30 Tage nach Experimentbeginn. Im zweiten Mesokosmenexperiment wurden die Binder an Tag 4 des Experimentes entnommen. Im dritten Mesokosmenexperiment wurde die Binderentnahme an Tag 11, 18 und 30 des Experimentes durchgeführt. Nach der Entnahme wurden die Binder für maximal eine Woche bei 5 °C in rückstandsfreien Plastikboxen gelagert. Für die Aufarbeitung wurden die Binder zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Danach erfolgte die Zerkleinerung der Binder mit einem Spatel sowie eine erneute, dreimalige Extraktion mit je 50 mL Dichlormethan. Die Extrakte wurden jeweils über eine Glasnutsche mit ausgeglühtem Glasfaserfilter (1,6 µm) filtriert. Die Extrakte wurden vereinigt und getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte eine erneute Filtration. Nach dem Einengen auf ein Volumen von 50 mL wurde ein Aliquot von 45 mL in ein gereinigtes Probengefäß bekannten Gewichtes überführt, die verbleibenden 5 mL dienten als Rückstellprobe. Es wurde lediglich eine gravimetrische Bestimmung der Ölmasse durchgeführt.

## 5.3 Messmethode

### 5.3.1 Öl als Gesamtmatrix (Gravimetrie)

Um das Öl als Gesamtmatrix zu quantifizieren, wurde die Gravimetrie als nicht-spezifisches Verfahren angewendet. Dazu wurde ein definiertes Aliquot der getrockneten Extrakte im Abzug gelagert, bis die Konstanz der Probenmasse erreicht war. Die Bestimmung der Masse erfolgte an einer kalibrierten Feinwaage. Um Kontaminationen durch Anhaftungen an der Probenglaswand zu vermeiden, wurde mit Handschuhen gearbeitet.

### 5.3.2 *n*-Alkane (GC-FID)

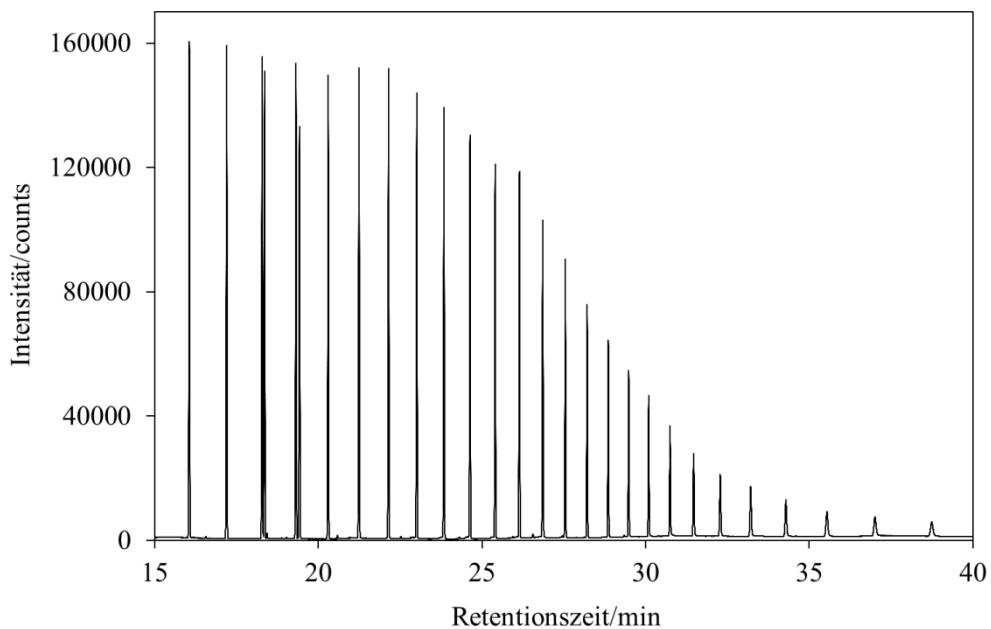
Die *n*-Alkananalyse erfolgte an einem GC-FID (Thermo Scientific, Trace GC Ultra). Es wurde eine Säule von 30 m Länge mit einem Durchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm eingesetzt (DB-5MS, Agilent). Das Temperaturprogramm startete bei 40 °C. Diese Temperatur wurde für zwei Minuten gehalten. Es folgte ein Temperaturanstieg von 8 °C/min, bis eine Temperatur von 320 °C erreicht worden war. Dieser Wert wurde für 15 Minuten konstant gehalten. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Der Gasfluss war konstant und betrug 1 ml/min. Mittels Split/Splitlos-Injektion wurde ein Probevolumen von 1 µL injiziert. Die Temperatur des Injektors betrug 250 °C. Die Erfassungszeit umfasste 52 min. Der FID wurde bei einer Temperatur von 325 °C betrieben.

In Tabelle 27 und Tabelle 28 sind die Retentionszeiten der im Rahmen der *n*-Alkananalyse gemessenen Verbindungen mit Angabe der Standardabweichung (n = 24) aufgelistet. Neben den *n*-Alkanen *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> wurden die isoprenoiden Biomarker Pristan und Phytan sowie das Androgen 5- $\alpha$ -Androstan gemessen. In Abbildung 38 ist ein Chromatogramm der 29 un-

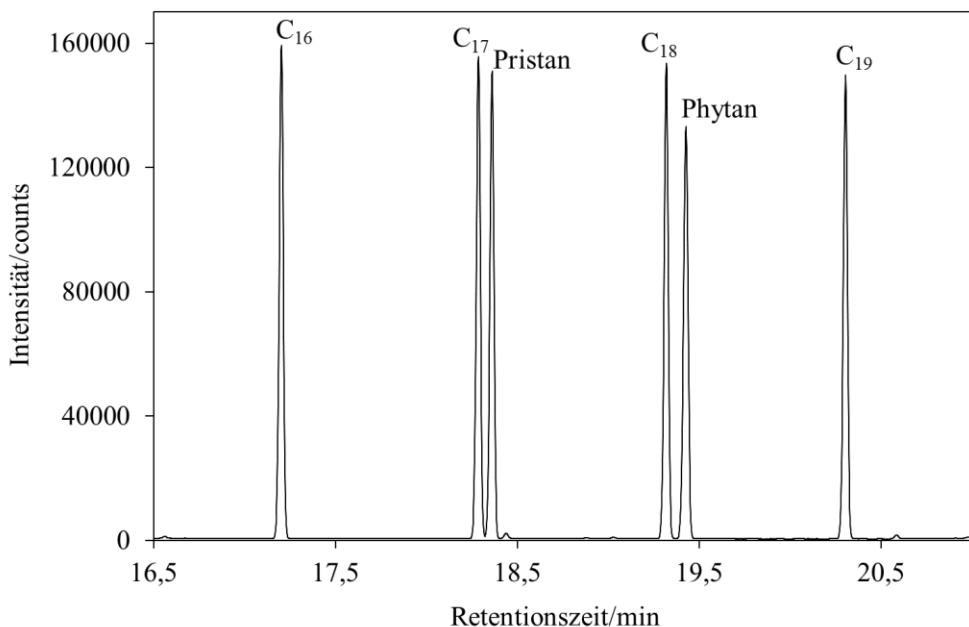
tersuchten Verbindungen dargestellt. In Abbildung 39 erfolgt die detaillierte Darstellung, der *n*-Alkane *n*-C<sub>16</sub> bis *n*-C<sub>19</sub> sowie der Biomarker Pristan und Phytan.

**Tabelle 27, Tabelle 28:** Retentionszeiten der im Rahmen der *n*-Alkananalyse gemessenen Verbindungen in Minuten  $\pm$  Standardabweichung s in Minuten (n = 24).

Verbindung	Retentionszeit in min $\pm$ s in min	Verbindung	Retentionszeit in min $\pm$ s in min
<i>n</i> -C <sub>15</sub>	16,06 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	26,86 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>16</sub>	17,20 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>28</sub>	27,55 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>17</sub>	18,28 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>29</sub>	28,22 $\pm$ 0,01
Pristan	18,36 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>30</sub>	28,86 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>18</sub>	19,32 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>31</sub>	29,49 $\pm$ 0,01
Phytan	19,43 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>32</sub>	30,10 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>19</sub>	20,30 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	30,75 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>20</sub>	21,25 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>34</sub>	31,48 $\pm$ 0,01
5- $\alpha$ -Androstan	21,68 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>35</sub>	32,29 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>21</sub>	22,15 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>36</sub>	33,22 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>22</sub>	23,01 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>37</sub>	34,29 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>23</sub>	23,84 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>38</sub>	35,55 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>24</sub>	24,64 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>39</sub>	37,02 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>25</sub>	25,41 $\pm$ 0,01	<i>n</i> -C <sub>40</sub>	38,75 $\pm$ 0,01
<i>n</i> -C <sub>26</sub>	26,15 $\pm$ 0,01		



**Abbildung 38:** Chromatogramm der im Rahmen der *n*-Alkananalyse gemessenen 29 Verbindungen (GC-FID).



**Abbildung 39:** Detaillierte Darstellung der *n*-Alkane *n*-C<sub>16</sub> bis *n*-C<sub>19</sub> sowie der Biomarker Pristan und Phytan im Chromatogramm (GC-FID).

### 5.3.3 PAK (GC/MS)

Die Messung der PAK erfolgte an einem GC/MS-System (Thermo Trace GC, Thermo Auto mass III MS). Es wurde bei 70 eV im positiven Ionenmodus gearbeitet. Die Chromatografie wurde mit einer 60 m langen Kapillarsäule mit einem Durchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm durchgeführt (DB-5MS, Agilent). Die Ofentemperatur startete bei 50 °C. Diese Temperatur wurde für dreieinhalf Minuten gehalten. Es folgte zunächst ein Temperaturanstieg von 12 °C/min, bis eine Temperatur von 190 °C erreicht worden war. Darauffolgend stieg die Temperatur mit einer Rate von 5 °C/min bis auf 300 °C. Dieser Wert wurde für 25 Minuten konstant gehalten. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Der Gasfluss betrug 1,5 ml/min. Mittels temperaturprogrammierter Verdampfung (PTV) und Split-Injektion wurde ein Probenvolumen von 2 µL injiziert. Bei der Detektion mittels MS wurde die ausgewählte Ionenaufzeichnungsfunktion (SIM-Modus) angewendet. In Tabelle 29 sind die Hauptmassen der nativen und massenmarkierten PAK-Verbindungen sowie deren Retentionszeiten aufgeführt.

**Tabelle 29:** Hauptmassen und Retentionszeiten der im Rahmen der PAK-Analyse gemessenen Verbindungen in Minuten (GC/MS).

Verbindung	Hauptmasse	Retentionszeit in min
d <sub>8</sub> -Naphthalin	136	14,15
Naphthalin	128	14,2
2-Methylnaphthalin	142	15,59

Fortsetzung Tabelle 29.

Verbindung	Hauptmasse	Retentionszeit in min
d <sub>10</sub> -1-Methylnaphthalin	152	15,73
1-Methylnaphthalin	142	15,8
1,7-Dimethylnaphthalin	156	17,13
d <sub>6</sub> -Acenaphthylen	158	17,6
Acenaphthylen	152	17,64
d <sub>8</sub> -Acenaphthen	162	17,98
Acenaphthen	154	18,06
d <sub>8</sub> -Fluoren	174	19,36
Fluoren	166	19,45
d <sub>10</sub> -Phenanthren	188	22,42
Phenanthren	178	22,5
d <sub>10</sub> -Anthracen	188	22,62
Anthracen	178	22,69
9-Methylanthracen	192	25,41
9,10-Dimethylanthracen	206	28,31
d <sub>10</sub> -Fluoranthen	212	27,13
Fluoranthen	202	27,21
d <sub>10</sub> -Pyren	212	28,11
Pyren	202	28,2
1-Methylpyren	216	30,77
d <sub>12</sub> -Benz(a)anthracen	240	33,71
Benz(a)anthracen	228	33,82
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen	256	38,88
d <sub>12</sub> -Chrysen	240	33,86
Chrysen	228	33,99
5-Methylchrysen	242	36,08
d <sub>12</sub> -Benz(b)fluoranthen	264	38,76
Benz(b)fluoranthen	252	38,89
d <sub>12</sub> -Benz(k)fluoranthen	264	38,91
Benz(k)fluoranthen	252	39,03
d <sub>12</sub> -Benz(a)pyren	264	40,42
Benz(a)pyren	252	40,56
d <sub>12</sub> -Indeno(1,2,3-c,d)pyren	288	47,54
Indeno(1,2,3-c,d)pyren	276	47,73
d <sub>14</sub> -Dibenzo(a,h)anthracen	292	47,72
Dibenzo(a,h)anthracen	278	47,98
d <sub>12</sub> -Benz(g,h,i)perylen	288	49,54
Benz(g,h,i)perylen	276	49,78

### 5.3.4 Nährstoffe (Titration und Fotometrie)

Die gelöste Sauerstoffkonzentration wurde unter Anwendung des Winkler Verfahrens quantifiziert.<sup>[150,151]</sup> Die Quantifizierung erfolgte über eine Redoxtitration mit Stärkeindikator. Die angesäuerte Probe wurde mit 0,02 N Thiosulfatlösung titriert, bis die bräunlich-gelbe Farbe nahezu verschwunden war. Dann wurden 3-5 Tropfen Stärkelösung (1 g lösliche Stärke in 100 mL deionisiertem Wasser) zugesetzt und bis zur Entfärbung des entstandenen blauen Iod-Stärke-Komplexes titriert.

Die Titerbestimmung der Thiosulfatlösung erfolgte vor jeder Messreihe. Dazu wurden 10 mL einer 0,02 N Kaliumiodatlösung mit 35 mL deionisiertem Wasser und 1 mL Schwefelsäure (50 %) vermischt. Danach wurden 10 mL einer 5 %-igen Kaliumiodidlösung zugegeben und das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Unmittelbar darauf wurden zunächst 9 mL der 0,02 N Thiosulfatlösung und dann 3-5 Tropfen der Stärkelösung dazugegeben. Dann erfolgte die Titration bis zum Farbumschlag von blau nach farblos.

Die in den Wasserproben vorliegenden Ammoniumionen wurde gemäß der Berthelot Reaktion als Indophenolblau fotometrisch nachgewiesen und quantifiziert.<sup>[150,152]</sup> Dabei wird ein Summenparameter aus Ammoniumionen und Ammoniak bestimmt. Der Messwert wurde bei 630 nm gegen deionisiertes Wasser mit einer 5 cm-Küvette gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve erstellt (Stammlösung aus Ammoniumchlorid).

Die gelösten Phosphationen wurde ebenfalls fotometrisch nachgewiesen und quantifiziert, indem sie zu Molybdänblau umgesetzt wurden.<sup>[150,153]</sup> Dabei werden sowohl die anorganischen Phosphationen (Orthophosphat) erfasst als auch geringe Mengen labil gebundener Phosphorsäureester. Sowohl der Trübungsblindwert als auch der finale Messwert wurden bei 885 nm gegen deionisiertes Wasser in einer 5 cm-Küvette gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe einer Eichkurve (Stammlösung aus Kaliumdihydrogenphosphat).

## 5.4 Qualitätssicherung

### 5.4.1 Wiederfindungsraten

Um die Qualität einer Methode zu beurteilen, können die Wiederfindungsraten ermittelt werden. Dazu wird eine analytfreie Probe mit Matrix zu Beginn der Aufarbeitung mit einer Standardlösung bekannter Konzentration dotiert. Die Wiederfindungsraten können dann zum einen nach Gleichung 1 aus dem Verhältnis der gemessenen Konzentration und der bekannten zugesetzten Konzentration berechnet werden.<sup>[69]</sup> Zum anderen kann für die Berechnung das Verhältnis aus dem Messsignal der dotierten Probe und dem Signal einer unmittelbar vor der

Messung mit dem gleichen Gehalt dotierten Referenzlösungen gebildet werden (siehe Gleichung 2).<sup>[69]</sup>

$$WFR = \frac{c_{\text{gemessen}}}{c_{\text{dotiert}}} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 1}$$

$$WFR = \frac{M_{\text{Probe}}}{M_{\text{Referenz}}} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 2}$$

Um die potentiellen Verluste bei der Probenaufarbeitung einer Rohölprobe abschätzen zu können, wurden die Wiederfindungsraten der internen Standardsubstanzen bestimmt. Aufgrund der hohen Analytenkonzentrationen in dem verwendeten Rohöl, wurde nach der Extraktion lediglich ein so kleines Aliquot weiterverwendet, dass die Standardzugabe erst nach der Extraktion erfolgen konnte (siehe Abschnitt 5.2). Die nach Gleichung 2 berechneten Wiederfindungsraten liegen in Tabelle 30 vor.

**Tabelle 30:** Wiederfindungsraten in % mit Standardabweichung s in % der internen Standardsubstanzen.

Verbindung	Wiederfindungsrate in % $\pm$ s in %
d <sub>8</sub> -Naphthalin	101 $\pm$ 8
d <sub>10</sub> -1-Methylnaphthalin	109 $\pm$ 7
d <sub>6</sub> -Acenaphthylen	104 $\pm$ 6
d <sub>8</sub> -Acenaphthen	100 $\pm$ 5
d <sub>8</sub> -Fluoren	105 $\pm$ 4
d <sub>10</sub> -Phenanthren	108 $\pm$ 1
d <sub>10</sub> -Anthracen	110 $\pm$ 1
d <sub>10</sub> -Fluoranthen	103 $\pm$ 1
d <sub>10</sub> -Pyren	118 $\pm$ 1
d <sub>12</sub> -Benz(a)anthracen	89 $\pm$ 1
d <sub>12</sub> -Chrysen	101 $\pm$ 2
d <sub>12</sub> -Benz(b)fluoranthen	104 $\pm$ 2
d <sub>12</sub> -Benz(k)fluoranthen	101 $\pm$ 2
d <sub>12</sub> -Benz(a)pyren	99 $\pm$ 2
d <sub>12</sub> -Indeno(1,2,3-c,d)pyren	97 $\pm$ 2
d <sub>14</sub> -Dibenzo(a,h)anthracen	96 $\pm$ 2
d <sub>12</sub> -Benz(g,h,i)perylen	107 $\pm$ 3
5- $\alpha$ -Androstan	92 $\pm$ 5

Die in Tabelle 30 aufgeführten Wiederfindungsraten liegen mit Ausnahme von Pyren für alle untersuchten Verbindungen im Bereich von 100 %  $\pm$  10 %. Für Pyren liegt die Wiederfin-

dungsrate bei 118 %. Die berechneten Werte zeigen, dass weder bei der Reinigung der Probe über dem Doppelsäulensystem noch beim Einengen am Rotationsverdampfer wesentliche Verluste der zu analysierenden Verbindungen auftreten.

### 5.4.2 Linearität

Um die im Rahmen der jeweiligen Messung erhaltenen Signale (Peakflächen) in Konzentrationen beziehungsweise absolute Massen umzurechnen, bedarf es einer Kalibrierung. Welches Regressionsmodell dabei am besten geeignet ist, kann statistisch überprüft werden. Um die Gültigkeit des linearen Regressionsmodells zu sichern, wurde der Anpassungstest nach Mandel durchgeführt. Bei diesem Testverfahren wird sowohl die Reststandardabweichung für das lineare als auch für das quadratische Anpassungsmodell berechnet. Es wird die Differenz der Varianzen gebildet und diese durch die Reststandardabweichung des quadratischen Regressionsmodells dividiert (siehe Gleichung 3).

$$PW = \frac{DS^2}{S_{y,x,2}^2} = \frac{(n_c - 2) \cdot s_{y,x,1}^2 - (n_c - 3) \cdot s_{y,x,2}^2}{S_{y,x,2}^2} \quad \text{Gl. 3}$$

Der Tabellenwert entspricht dabei den Werten der F-Tabelle. Ist der Prüfwert kleiner als oder genauso groß wie der Tabellenwert, gilt die Linearität als gesichert.<sup>[157]</sup>

#### ***n*-Alkane**

Um zu überprüfen, in welchem Bereich Messsignal und Analytenkonzentration bei dem eingesetzten Gerät in einem linearen Zusammenhang stehen, wurde ein 10-Punkt-Kalibrierung von 0,1 mg/L bis 50 mg/L angesetzt und gemessen. Auf jedem Kalibrierniveau wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. In der Kalibrierlösung waren die *n*-Alkane *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> sowie die Biomarkersubstanzen Pristan und Phytan enthalten. Des Weiteren wurde jedem Kalibrierstandard die Verbindung 5- $\alpha$ -Androstan in konstanter Konzentration hinzugefügt. Für alle Verbindungen sind die Messdaten im linearen Bereich normalverteilt (siehe Gleichung 10). Für die Residuen konnte kein Trend nachgewiesen werden (siehe Gleichung 21). Mittels Mandel-Test (siehe Gleichung 3) konnte die Eignung des linearen Regressionsmodells für die *n*-Alkane *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>25</sub> sowie für Pristan und Phytan im Konzentrationsbereich von 0,1 mg/L bis 10 mg/L nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildeten dabei die Verbindungen *n*-C<sub>20</sub> bis *n*-C<sub>23</sub>. Hier beschränkte sich die statistisch abgesicherte Linearität jeweils auf den Bereich von 0,1 mg/L bis 5 mg/L oder von 1 mg/L bis 10 mg/L. Bei den Verbindungen *n*-C<sub>26</sub> bis *n*-C<sub>40</sub> umfasst der lineare Bereich eine Konzentrationsspanne von 0,1 mg/L bis 50 mg/L. Bezüglich der Flächen und Konzentrationen wurden die jeweiligen Quotienten aus der *n*-Alkanverbindung und 5- $\alpha$ -Androstan gebildet.

Das Messgerät misst im angegebenen Bereich mit einer statistischen Sicherheit von 99 % linear. Die im Folgenden analysierten Proben wurden daher nach Möglichkeit auf ein Konzentrationsniveau innerhalb des statistisch geprüften Bereiches eingestellt.

## PAK

Um den linearen Bereich der PAK-Messung zu ermitteln, wurde eine 10-Punkt-Kalibrierung von 1 µg/L bis 500 µg/L angesetzt und gemessen. Auf jedem Kalibrierniveau wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. In der Kalibrierlösung waren die 16 von der U.S. EPA benannten PAK sowie 8 alkylierte PAK enthalten. Des Weiteren wurden jedem Kalibrierstandard die deuterierten Homologe der 16 von der U.S. EPA benannten PAK sowie  $d_{10}$ -1-Methylnaphthalin in konstanter Konzentration hinzugefügt. Für alle Verbindungen sind die Messdaten im linearen Bereich normalverteilt (siehe Gleichung 10). Für die Residuen konnte kein Trend nachgewiesen werden (siehe Gleichung 21). Mittels Mandel-Test (siehe Gleichung 3) konnte die Eignung des linearen Regressionsmodells in einem definierten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Dabei wurden bezüglich der Flächen und Konzentrationen die Quotienten der Daten für native und massenmarkierte Substanzen gebildet. Eine Auflistung des linearen Bereiches für die nativen PAK-Verbindungen erfolgt in Tabelle 31.

**Tabelle 31:** Auflistung des linearen Bereiches der PAK-Messung in µg/L für die 24 untersuchten Verbindungen.

Verbindung	Linearer Bereich in µg/L
Naphthalin	1 - 500
2-Methylnaphthalin	1 - 500
1-Methylnaphthalin	1 - 200
1,7-Dimethylnaphthalin	1 - 200
Acenaphthylene	1 - 200
Acenaphthene	1 - 200
Fluoren	1 - 200
Phenanthren	1 - 200
Anthracen	1 - 200
9-Methylanthracen	1 - 200
9,10-Dimethylanthracen	1 - 200
Fluoranthene	1 - 200
Pyren	1 - 200
1-Methylpyren	1 - 200
Benz(a)anthracen	1 - 200
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen	1 - 200
Chrysen	1 - 200
5-Methylchrysen	1 - 500
Benz(b)fluoranthene	1 - 200
Benz(k)fluoranthene	1 - 200
Benz(a)pyren	1 - 500
Indeno(1,2,3-c,d)pyren	1 - 500
Dibenzo(a,h)anthracen	1 - 500
Benz(g,h,i)perylene	1 - 500

Das Messgerät misst mit einer statistischen Sicherheit von 99 % im angegebenen Bereich linear. Die im Folgenden analysierten Proben wurden daher nach Möglichkeit auf ein Konzentrationsniveau innerhalb des statistisch geprüften Bereiches eingestellt.

### 5.4.3 Quantifizierung

Ist der Zusammenhang zwischen Messsignal und Analytenkonzentration linear, wird die Analytenkonzentration in der Probe mithilfe der Geradengleichung berechnet (siehe Gleichung 4).<sup>[69]</sup>

$$x = \frac{y - \alpha}{\beta} \quad \text{Gl. 4}$$

Eine Alternative stellt die Verwendung von massenmarkierten, internen Standards dar. In diesem Fall wird sowohl der Kalibrierung in Lösungsmittel als auch der zu untersuchenden Probe dasselbe Volumen der internen Standardlösung zugesetzt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wird dann der Quotient aus der Fläche der nativen Substanz und der Fläche des massenmarkierten Standards gegen den Quotienten aus der Konzentration der nativen Substanz und der Konzentration des massenmarkierten Standards aufgetragen. Die Kalibriergeradengleichung, die daraus folgend für die Berechnung der Analytenkonzentration in der Probe verwendet wird, ist in Gleichung 5 angegeben.

$$x_{Subs} = \frac{\frac{y_{Subs}}{y_{IS}} - \alpha}{\beta} \cdot x_{IS} \quad \text{Gl. 5}$$

Durch die Verwendung von internen Standards werden zum Beispiel Verluste bei der Aufarbeitung oder Volumenfehler bei der Injektion der Probe in das Messgerät korrigiert.<sup>[157]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden interne Standards verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels 1-Punkt-Kalibrierung. Eine Kalibrierung über den gesamten linearen Konzentrationsbereich erfolgte in regelmäßigen Abständen, um die Voraussetzungen für die Vertretbarkeit der 1-Punkt-Kalibrierung zu überprüfen. Innerhalb einer Kalibrierung kann für jedes gemessene Konzentrationsniveau das Verhältnis von Messsignal (y-Wert) und Konzentration (x-Wert) berechnet werden. Dieses Verhältnis beschreibt die Steigung  $\beta$  in diesem Kalibrierpunkt. Ist das Verhältnis von y- und x-Wert für die Zahl der Kalibrierpunkte ähnlich, können Regressionsparameter für eine lineare Anpassung berechnet werden. Dabei werden die Regressionsparameter in der Regel so gewählt, dass die Fehlerquadratsumme der Residuen möglichst gering ist. Das bedeutet wiederum, dass die Abweichung der einzelnen Kalibrierpunkte von der Regressionsgeraden möglichst gering ist. Mithilfe der Regressionsparameter ist es nun möglich, mit einem gemessenen Informationswert (y-Wert) die zugehörige Konzentration (x-Wert) näherungsweise innerhalb des linearen Messbereiches zu berechnen (siehe Gleichung 4 und 5). Je näher die Kalibrierpunkte an der Regressionsgeraden liegen, das heißt, je schmäler die Vertrauensbänder der Regression sind, desto richtiger ist die Berechnung der Konzentration. Eine 1-Punkt-Kalibrierung ist demnach dann gewährleistet, wenn sowohl die zur Quantifizierung verwendeten Standardsubstanzen als auch die in der Probe vorliegenden Analyten bezüglich der Konzentration innerhalb des linearen Bereiches liegen und wenn die Vertrauensbänder der Kalibrierung zur Bestimmung des linearen Bereiches möglichst schmal sind.

Zu Beginn sowie am Ende einer jeden Messserie wurden je zwei Standards IntEx gemessen, in der sowohl die nativen als auch die massenmarkierten Verbindungen in Lösungsmittel vorlagen. Im Verlauf der Messserie erfolgte jeweils nach sechs Proben die erneute Messung von zwei Standardproben (IntEx). Die Standards enthielten alle untersuchten Sub-

stanzen sowie die verwendeten massenmarkierten, internen Standardsubstanzen in definierter Konzentration. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, dass sie innerhalb des linearen Bereiches der Messmethode lag. Mithilfe der Daten aus den Messungen der Standardlösungen IntEx wurde der Regressionsparameter  $\beta$  berechnet. Dabei wurden die Mittelwerte der Flächen für native und massenmarkierte Substanzen über die gesamte Messserie verwendet (siehe Gleichung 6).

$$\beta_{Kal} = \frac{\frac{\overline{M}_{Std,Subs}}{\overline{M}_{Std,IS}}}{\frac{c_{Std,Subs}}{c_{Std,IS}}} \quad \text{Gl. 6}$$

Der Regressionsparameter  $\alpha$ , der Achsenabschnitt, wird näherungsweise gleich null gesetzt. Es ist davon auszugehen, dass bei einer Konzentration von null lediglich das Hintergrundrauschen gemessen wird. Dieses Hintergrundrauschen bildet im Chromatogramm die Basislinie. Da die Integration der Peaks lediglich bis auf die Basislinie erfolgt, kann der Achsenabschnitt im Rahmen der Quantifizierung vernachlässigt werden. Die Berechnung der Analytenkonzentration erfolgte demnach gemäß Gleichung 7.

$$x_{Subs} = \frac{y_{IS}}{\beta_{Kal}} \cdot x_{IS} = \frac{y_{IS}}{\left( \frac{\overline{M}_{Std,Subs}}{\overline{M}_{Std,IS}} \cdot \frac{c_{Std,Subs}}{c_{Std,IS}} \right)} \cdot x_{IS} \quad \text{Gl. 7}$$

#### 5.4.4 Interne Standards

Um die Richtigkeit der Korrektur mithilfe von internen Standards gewährleisten zu können, muss überprüft werden, inwieweit sich native und massenmarkierte Substanzen gleich verhalten. Dazu wird das Verhältnis aus der Wiederfindungsrate der zu untersuchenden Substanz und der Wiederfindungsrate des zur Korrektur eingesetzten internen Standards gebildet (siehe Gleichung 8). Der so ermittelte Quotient kann als relative Wiederfindungsrate bezeichnet werden.

$$WFR_{rel} = \frac{WFR_{Subs}}{WFR_{IS}} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 8}$$

Idealerweise sollte die relative Wiederfindungsrate bei 100 % liegen.

Bei der Auswahl der Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit als interne Standardverbindungen genutzt wurden, erfolgte eine Orientierung an Literaturangaben.<sup>[154-156]</sup> Im Rahmen der *n*-Alkananalyse wurde die Verbindung 5- $\alpha$ -Androstan als interner Standard verwendet. Im Chromatogramm zeigte diese Verbindung keine Überlagerung mit einem der Zielanalyten. Der zugehörige Peak konnte basisliniengrenzt dargestellt werden.

Für die Quantifizierung der PAK wurde eine Standardlösung eingesetzt, in der die deuterierten Homologe der 16 von der U.S. EPA benannten Verbindungen vorlagen. Die Quantifizierung der alkylierten Verbindungen erfolgte mithilfe der zugehörigen nicht-alkylierten, deuterierten Standardsubstanz. Lediglich für die alkylierten Naphthalinverbindungen wurde  $d_{10}$ -1-Methylnaphthalin verwendet. Durch die Anwendung des SIM-Modus war eine eindeutige, störfreie Messung der nativen und massenmarkierten Verbindungen problemlos möglich. Um Verluste, die durch die einzelnen Schritte der Aufarbeitungsmethode hervorgerufen werden, mithilfe der internen Standards berücksichtigen zu können, sollte die Zugabe der Standardlösung möglichst unmittelbar nach der Probennahme erfolgen. Aufgrund der hohen Analytenkonzentrationen im Öl war in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten jeweils eine starke Verdünnung der Proben notwendig, sodass die Standardzugabe erst vor dem Reinigungsschritt erfolgte.

Die relativen Wiederfindungsraten wurden für die Extraktion aus drei verschiedenen Medien (Leitungswasser, Ostseewasser, Nährmedium) und für die Elution von dem Doppelsäulensystem (Reinigungsschritt) bestimmt. Für die Extraktion wurden 100 mL des jeweiligen Mediums mit 250  $\mu$ L Standardlösung versetzt und zweimal mit je 10 mL *n*-Heptan-Toluol-Gemisch (9:1) extrahiert (siehe Abschnitt 5.2). Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Die Elution erfolgte gemäß Abschnitt 2.2. Alle Proben wurden am Rotationsverdampfer auf ein Endvolumen von  $V = 500 \mu$ L eingeengt. Es wurden jeweils drei Parallelproben angesetzt und aufgearbeitet. Die Messung erfolgte wie in Abschnitt 5.3 beschrieben.

### ***n*-Alkane**

In Tabelle 32 sind die relativen Wiederfindungsraten der *n*-Alkane *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>39</sub> sowie Pristan und Phytan mit Standardabweichung angegeben. Aufgrund von Störungen im Chromatogramm konnten die Daten für die Verbindung *n*-C<sub>40</sub> nicht ausgewertet werden. Im Rahmen des Elutionsexperimentes konnten lediglich die Daten für die Verbindungen *n*-C<sub>15</sub> bis *n*-C<sub>35</sub> verwendet werden.

**Tabelle 32:** Relative Wiederfindungsraten in % mit Standardabweichung s in % (n = 3) der n-Alkane n-C<sub>15</sub> bis n-C<sub>39</sub> sowie von Pristan und Phytan. Als interne Standardsubstanz wurde 5- $\alpha$ -Androstan verwendet. Im Rahmen des Elutionsexperimentes konnten lediglich die Daten der Verbindungen n-C<sub>15</sub> bis n-C<sub>35</sub> verwendet werden.

Verbindung	WFR <sub>rel</sub> in % $\pm$ s in %			
	Leitungswasser	Ostsee-wasser	Nähr-medium	Elution
n-C <sub>15</sub>	83 $\pm$ 11	83 $\pm$ 7	87 $\pm$ 0,3	77 $\pm$ 11
n-C <sub>16</sub>	91 $\pm$ 8	89 $\pm$ 4	93 $\pm$ 1	84 $\pm$ 6
n-C <sub>17</sub>	81 $\pm$ 2	80 $\pm$ 1	80 $\pm$ 0,03	77 $\pm$ 1
Pristan	83 $\pm$ 3	81 $\pm$ 2	81 $\pm$ 0,1	75 $\pm$ 1
n-C <sub>18</sub>	91 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	90 $\pm$ 0,2	87 $\pm$ 1
Phytan	98 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	96 $\pm$ 0,3	91 $\pm$ 1
n-C <sub>19</sub>	84 $\pm$ 2	83 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1	77 $\pm$ 2
n-C <sub>20</sub>	85 $\pm$ 4	84 $\pm$ 1	85 $\pm$ 0,4	78 $\pm$ 1
n-C <sub>21</sub>	94 $\pm$ 3	93 $\pm$ 0,2	94 $\pm$ 0,3	76 $\pm$ 1
n-C <sub>22</sub>	91 $\pm$ 6	82 $\pm$ 2	80 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2
n-C <sub>23</sub>	84 $\pm$ 4	82 $\pm$ 1	81 $\pm$ 1	80 $\pm$ 1
n-C <sub>24</sub>	84 $\pm$ 4	82 $\pm$ 1	82 $\pm$ 0,2	78 $\pm$ 1
n-C <sub>25</sub>	103 $\pm$ 4	93 $\pm$ 0,3	102 $\pm$ 0,3	98 $\pm$ 1
n-C <sub>26</sub>	84 $\pm$ 3	83 $\pm$ 0,4	83 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1
n-C <sub>27</sub>	85 $\pm$ 1	79 $\pm$ 2	86 $\pm$ 1	80 $\pm$ 1
n-C <sub>28</sub>	83 $\pm$ 2	81 $\pm$ 2	82 $\pm$ 1	83 $\pm$ 2
n-C <sub>29</sub>	86 $\pm$ 3	84 $\pm$ 2	84 $\pm$ 1	85 $\pm$ 2
n-C <sub>30</sub>	88 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2	88 $\pm$ 1	90 $\pm$ 3
n-C <sub>31</sub>	93 $\pm$ 2	89 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	94 $\pm$ 4
n-C <sub>32</sub>	94 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	94 $\pm$ 1	100 $\pm$ 6
n-C <sub>33</sub>	103 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	105 $\pm$ 7
n-C <sub>34</sub>	101 $\pm$ 2	94 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	110 $\pm$ 7
n-C <sub>35</sub>	107 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	103 $\pm$ 3	110 $\pm$ 6
n-C <sub>36</sub>	101 $\pm$ 3	95 $\pm$ 4	95 $\pm$ 2	
n-C <sub>37</sub>	101 $\pm$ 5	95 $\pm$ 3	94 $\pm$ 2	
n-C <sub>38</sub>	93 $\pm$ 5	87 $\pm$ 3	88 $\pm$ 2	
n-C <sub>39</sub>	101 $\pm$ 6	90 $\pm$ 4	89 $\pm$ 2	

Anhand der in Tabelle 32 aufgeführten Daten wird deutlich, dass die Verwendung von einer Substanz für die Korrektur von 28 Verbindungen lediglich einen Kompromiss darstellen kann. Bei den meisten Verbindungen führt die Verwendung von 5- $\alpha$ -Androstan als internem Standard zu einer Unterschätzung der vorliegenden Konzentration (WFR<sub>rel</sub> < 100 %). Es wird ebenfalls deutlich, dass sich die relativen Wiederfindungsraten in den drei verwendeten Medien nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Das Verhalten der n-Alkanverbindungen so-

wie Pristan und Phytan im Vergleich zu 5- $\alpha$ -Androstan wird demnach nicht deutlich durch die verwendeten Medien beeinflusst. Die Werte für die relativen Wiederfindungsraten in den vier dargestellten Versuchsreihen liegen zwischen 75 % und 110 %. Diese berechneten Werte werden als tolerierbar angesehen und können bei der Auswertung der Versuchsdaten berücksichtigt werden.

## PAK

In Tabelle 33 sind die relativen Wiederfindungsraten mit Standardabweichung für die analysierten PAK-Verbindungen aufgeführt.

**Tabelle 33:** Relative Wiederfindungsraten in % mit Standardabweichung s in % (n = 3) der 24 untersuchten PAK-Verbindungen.

Verbindung	WFR <sub>rel</sub> in % $\pm$ s in %			
	Leitungswasser	Ostsee-wasser	Nähr-medium	Elution
Naphthalin	97 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	99 $\pm$ 4	96 $\pm$ 3
2-Methylnaphthalin	94 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1	99 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2
1-Methylnaphthalin	95 $\pm$ 5	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2
1,7-Dimethylnaphthalin	109 $\pm$ 7	110 $\pm$ 8	104 $\pm$ 1	107 $\pm$ 4
Acenaphthylen	94 $\pm$ 4	97 $\pm$ 1	102 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3
Acenaphthen	92 $\pm$ 3	97 $\pm$ 0,4	96 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3
Fluoren	98 $\pm$ 0,2	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 0,3	93 $\pm$ 1
Phenanthren	90 $\pm$ 2	89 $\pm$ 0,4	91 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1
Anthracen	99 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1	96 $\pm$ 0,3	97 $\pm$ 1
9-Methylanthracen	94 $\pm$ 6	95 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	99 $\pm$ 4
9,10-Dimethylanthracen	127 $\pm$ 2	129 $\pm$ 11	105 $\pm$ 4	97 $\pm$ 1
Fluoranthen	98 $\pm$ 1	101 $\pm$ 0,1	101 $\pm$ 2	97 $\pm$ 0,4
Pyren	101 $\pm$ 3	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2
1-Methylpyren	144 $\pm$ 8	152 $\pm$ 3	144 $\pm$ 2	130 $\pm$ 7
Benz(a)anthracen	94 $\pm$ 5	97 $\pm$ 0,4	100 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen	126 $\pm$ 10	137 $\pm$ 6	115 $\pm$ 2	108 $\pm$ 8
Chrysene	98 $\pm$ 5	102 $\pm$ 1	102 $\pm$ 2	104 $\pm$ 1
5-Methylchrysene	101 $\pm$ 3	93 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2	100 $\pm$ 1
Benz(b)fluoranthen	87 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	89 $\pm$ 1	92 $\pm$ 2
Benz(k)fluoranthen	89 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	92 $\pm$ 2	93 $\pm$ 1
Benz(a)pyren	135 $\pm$ 4	136 $\pm$ 0,3	136 $\pm$ 3	120 $\pm$ 6
Indeno(1,2,3-c,d)pyren	104 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2	101 $\pm$ 4	93 $\pm$ 2
Dibenzo(a,h)anthracen	95 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	95 $\pm$ 2
Benz(g,h,i)perylene	104 $\pm$ 3	104 $\pm$ 1	102 $\pm$ 1	96 $\pm$ 2

Ein Großteil der in Tabelle 33 aufgelisteten relativen Wiederfindungsraten liegen im Bereich von  $100\% \pm 10\%$ . Eine deutliche Abweichung von diesem Bereich tritt bei den Verbindungen 9,10-Dimethylanthracen, 1-Methylpyren, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen und Benz(a)pyren auf. Für die 16 von der U.S. EPA benannten PAK wurde jeweils das deuterierte Homolog als interne Standardsubstanz verwendet. Die in Tabelle 33 vorliegenden Daten zeigen deutlich, dass das Verhalten von nativer und der entsprechenden massenmarkierten Substanz während der Aufarbeitung und Messung sehr ähnlich ist. Eine Ausnahme stellt dabei die Verbindung Benz(a)pyren dar. Für die alkylierten PAK-Verbindungen wurde jeweils die nicht-alkylierte, massenmarkierte PAK-Verbindung als interne Standardsubstanz verwendet. Lediglich für die Naphthalinverbindungen wurde  $d_{10}$ -1-Methylnaphthalin zur Korrektur verwendet. Das unterschiedliche Verhalten der alkylierten PAK im Vergleich zu den nicht-alkylierten Verbindungen zeigt sich durch die hohen relativen Wiederfindungsraten der Verbindungen 9,10-Dimethylanthracen, 1-Methylpyren und 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen. Hier würde die Korrektur mittels interner Standards bei der Berechnung der Konzentration zu einer Überschätzung führen, die bei der Auswertung der Versuchsdaten berücksichtigt werden muss.

#### **5.4.5 Blindwerte**

Um das Auftreten von falsch-positiven Messungen bedingt durch Hintergrundkontaminationen zu vermeiden, wurden in allen durchgeführten Versuchsansätzen die Blindwerte erfasst. Blindwerte können zum Beispiel durch Rückstände auf den verwendeten Materialien, Verunreinigungen in den verwendeten Chemikalien, Verschleppungen oder Eintragungen über die Laborluft auftreten. Um die Blindwerte zu quantifizieren, wurde in jedem Versuchsansatz (mindestens) eine Probe ohne die Zugabe von Öl angesetzt. Bei den Nährstoffmessungen wurde in den Blindwertproben deionisiertes Wasser anstelle von Ostseewasser eingesetzt. Die Blindwertproben wurden ansonsten bezüglich weiterer Chemikalienzugaben genauso behandelt wie die übrigen Proben. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte parallel. Lagen die Blindwerte in einem Versuchsansatz oberhalb der Nachweigrenze, wurden sie bei den Berechnungen der übrigen Messwerte des Ansatzes berücksichtigt (Blindwertkorrektur).

#### **5.4.6 Nachweigrenze**

Nachweis- und Bestimmungsgrenze stellen Grenzwerte dar, die den unteren Arbeitsbereich statistisch absichern. Entspricht die Analytenkonzentration einer Probe der Nachweigrenze, so wird die Konzentration in 50 % der Messungen dem Blindwert zugeordnet.<sup>[69]</sup> Während es sich bei der Nachweigrenze um eine qualitative Größe handelt, stellt die Bestimmungsgrenze eine quantitative Größe dar. Sie entspricht der minimalen Analytenkonzentration einer Probe, die mit einer definierten Präzision sicher quantifiziert werden kann.<sup>[70]</sup>

In der Chromatografie ist die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis üblich. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wird dabei ein Signal-Rausch-Verhältnis von drei und für die Bestimmungsgrenze von neun empfohlen.<sup>[157]</sup> Den linearen Zusammenhang zwischen Messsignal und Messgröße voraussetzend bildet das Signal-Rausch-Verhältnis einer Probe mit bekannter Konzentration die Grundlage der Berechnung (siehe Gleichung 9).<sup>[158]</sup>

$$x_{NG} = \frac{3 \cdot x}{(S/N)_x} \quad \text{Gl. 9}$$

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für jede Messung individuell mit der jeweiligen Gerätesoftware berechnet und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt.

## 5.5 Datenvorbehandlung und statistische Grundlagen

Alle verwendeten Datensätze wurden zunächst mit dem David-Test auf Normalverteilung geprüft. Dazu wurde das Verhältnis von Spannweite und Standardabweichung gebildet (siehe Gleichung 10). Dieses Verhältnis stellte den Prüfwert dar. Die Tabellenwerte bilden die obere und untere Schranke des Zulässigkeitsbereiches. Liegt der Prüfwert zwischen diesen Schranken, ist die Normalverteilung des Datensatzes statistisch abgesichert.<sup>[69]</sup>

$$PW = \frac{(x_{\min} - x_{\max})}{s} \quad \text{Gl. 10}$$

Bei Bedarf wurde der verwendete Datensatz auf Ausreißer geprüft. Dazu wurde der Grubbs-Test angewendet. Ausreißerverdächtig sind prinzipiell das Minimum und das Maximum eines Datensatzes. Um den Prüfwert zu ermitteln, wurde der Betrag der Differenz aus ausreißerverdächtigem Wert und Mittelwert gebildet und durch die Standardabweichung dividiert (siehe Gleichung 11).

$$PW = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \quad \text{Gl. 11}$$

Ist der Prüfwert größer als der Tabellenwert, gilt der verdächtige Wert statistisch gesichert als Ausreißer.<sup>[69]</sup>

Im Rahmen der Datenauswertung wurden verschiedene statistische Testverfahren angewendet, die im Folgenden mit der verwendeten Formel sowie entsprechenden Literaturverweisen aufgeführt werden sollen.

Um den signifikanten Unterschied zweier Mittelwerte zu prüfen, wurde der t-Test angewendet (siehe Gleichung 12). Voraussetzung für den t-Test ist die Homogenität der Varianzen.

$$PW = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{Gl. 12}$$

Die Mittelwerte unterscheiden sich signifikant, wenn der Prüfwert größer ist als der Tabellenwert.<sup>[159]</sup>

Sollten mehr als zwei Mittelwerte auf ihren signifikanten Unterschied getestet werden, wurde die Homogenität der Varianzen zwischen den Werten (zw) und innerhalb der Werte (in) mittels F-Test überprüft (siehe Gleichung 13 bis Gleichung 18).

$$PW = \frac{s_{zw.}^2}{s_{in.}^2} = \frac{f_{zw.}}{\frac{Q_{zw.}}{f_{in.}}} \quad \text{mit} \quad f_{zw.} = m - 1 \quad \text{und} \quad f_{in.} = n - m \quad \text{Gl. 13-Gl. 15}$$

$$Q_{in.} = \sum (s_j^2 \cdot f_j) \quad \text{mit} \quad f_j = n_j - 1 \quad \text{Gl. 16, Gl. 17}$$

$$Q_{zw.} = \sum_{i=1}^m \frac{(\sum x_{ji})^2}{n_j} - \frac{(\sum \sum x_{ji})^2}{n} \quad \text{Gl. 18}$$

Mittels Residualanalyse konnte die Eignung einer Anpassung im Rahmen einer Korrelation überprüft werden. Die Residuen wurden aus der Differenz des Messwertes (Informationswert) und des aus der Gleichung der gewählten Anpassung berechneten Wertes berechnet (siehe Gleichung 19).<sup>[69]</sup>

$$diff_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Gl. 19}$$

Der t-Test wurde ebenfalls verwendet, um den signifikanten Unterschied eines Mittelwertes ( $n \geq 3$ ) gegenüber einem anderen Wert ( $n = 1$ ) zu überprüfen. Dazu wurde der Betrag der Differenz beider Werte durch die Standardabweichung dividiert und mit der Wurzel der Zahl der Messwerte multipliziert (siehe Gleichung 20).

$$PW = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \cdot \sqrt{n} \quad \text{Gl. 20}$$

Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert, ist die Richtigkeit des Analysenwertes statistisch gesichert.<sup>[159]</sup>

Um einen Datensatz ( $n \geq 4$ ) hinsichtlich eines Trends zu untersuchen, wurde der Neumann-Test angewendet. Dazu wurde das Verhältnis aus sukzessiver Differenzstreuung und Varianz gebildet (siehe Gleichung 21).

$$PW = \frac{D^2}{s^2} = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (x_i - x_{i+1})^2}{(n-1) \cdot s^2} \quad \text{Gl. 21}$$

Es liegt mit statistischer Sicherheit ein Trend vor, wenn der Prüfwert kleiner ist als der Tabellenwert.<sup>[69]</sup>

## 5.6 Zusätzliche Informationen

### 5.6.1 Charakterisierung des verwendeten Öls

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente durchgeführt, bei denen Rohöl eingesetzt wurde (Handelsname: ROHÖL REB 1). Es wurden drei Ölproben gemäß der Angaben in Abschnitt 5.2 aufgearbeitet und hinsichtlich der *n*-Alkan- und PAK-Zusammensetzung analysiert. Dazu wurden 100 mL deionisiertes Wasser mit 100 µL Öl versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 10 min erfolgte die Extraktion mit einem Gemisch aus *n*-Heptan und Toluol (9:1). Die Extraktion wurde zweimal mit je 10 mL Extraktionsmittel durchgeführt. Die Extrakte wurden vereint und über Natriumsulfat getrocknet. Von dem getrockneten Extrakt wurden 100 µL mit 400 µL interner Standardlösung IS gesamt auf die konditionierte Doppelsäule gegeben und gereinigt. Das gereinigte Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf 1 mL eingeengt. Für die *n*-Alkananalyse wurden 500 µL des Extraktes nochmals eingeengt, bis ein Zielvolumen von 100 µL erreicht war. Für die PAK-Analyse wurden 100 µL mit 700 µL *n*-Heptan in ein Messvial überführt. In den folgenden Tabellen 34 und 35 sind die Konzentrationen der *n*-Alkane und PAK in ng Substanz/µL Öl mit Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 34, Tabelle 35:** Konzentration der analysierten *n*-Alkane sowie Pristan und Phytan im verwendeten Rohöl in ng *n*-Alkan/µL Öl mit Standardabweichung s in ng/µL (n = 3).

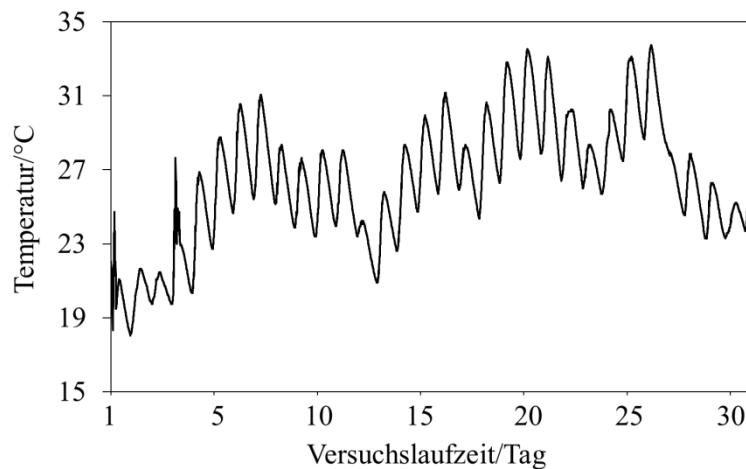
Verbindung	c in ng <i>n</i> -Alkan/µL Öl ± s in ng/µL	Verbindung	c in ng <i>n</i> -Alkan/µL Öl ± s in ng/µL
<i>n</i> -C <sub>15</sub>	4132 ± 590	<i>n</i> -C <sub>27</sub>	861 ± 66
<i>n</i> -C <sub>16</sub>	3610 ± 413	<i>n</i> -C <sub>28</sub>	722 ± 69
<i>n</i> -C <sub>17</sub>	2890 ± 328	<i>n</i> -C <sub>29</sub>	752 ± 73
Pristan	1730 ± 226	<i>n</i> -C <sub>30</sub>	545 ± 58
<i>n</i> -C <sub>18</sub>	3327 ± 293	<i>n</i> -C <sub>31</sub>	488 ± 46
Phytan	2671 ± 213	<i>n</i> -C <sub>32</sub>	299 ± 36
<i>n</i> -C <sub>19</sub>	2343 ± 269	<i>n</i> -C <sub>33</sub>	251 ± 27
<i>n</i> -C <sub>20</sub>	2736 ± 346	<i>n</i> -C <sub>34</sub>	221 ± 17
<i>n</i> -C <sub>21</sub>	2308 ± 272	<i>n</i> -C <sub>35</sub>	241 ± 30
<i>n</i> -C <sub>22</sub>	2006 ± 224	<i>n</i> -C <sub>36</sub>	158 ± 21
<i>n</i> -C <sub>23</sub>	1807 ± 224	<i>n</i> -C <sub>37</sub>	123 ± 18
<i>n</i> -C <sub>24</sub>	1651 ± 205	<i>n</i> -C <sub>38</sub>	114 ± 5
<i>n</i> -C <sub>25</sub>	2612 ± 252	<i>n</i> -C <sub>39</sub>	108 ± 1
<i>n</i> -C <sub>26</sub>	1289 ± 126		

**Tabelle 36:** Konzentration der analysierten PAK-Verbindungen im verwendeten Rohöl in ng PAK/µL Öl mit Standardabweichung s in ng/µL (n = 3).

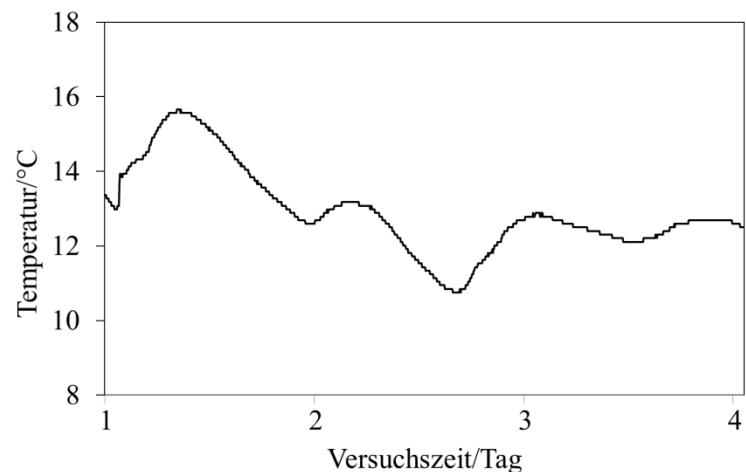
Verbindung	Konzentration in ng PAK/µL Öl ± s in ng/µL
Naphthalin	322 ± 20
2-Methylnaphthalin	605 ± 48
1-Methylnaphthalin	586 ± 51
1,7-Dimethylnaphthalin	391 ± 28
Acenaphthylen	13 ± 0,3
Acenaphthen	13 ± 1
Fluoren	52 ± 5
Phenanthren	128 ± 11
Fluoranthen	6 ± 0,4
Pyren	10 ± 1
1-Methylpyren	7 ± 1
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen	97 ± 1
Chrysene	10 ± 1
Benz(b)fluoranthen	9 ± 0,01

## 5.6.2 Temperaturdaten der Mesokosmenexperimente

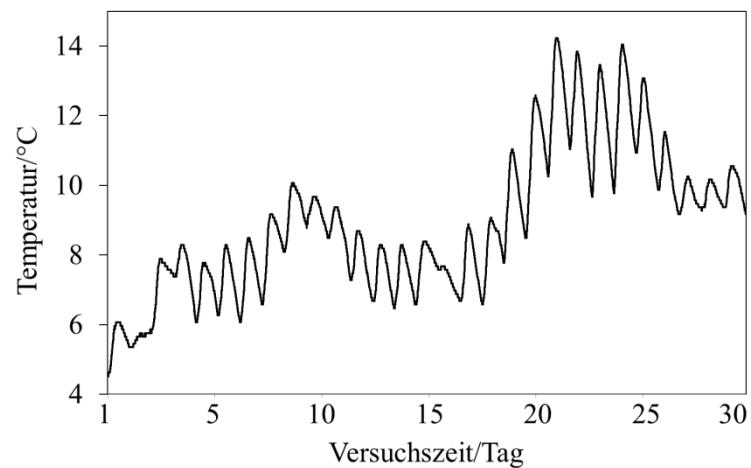
In den folgenden Abbildungen 40 bis 42 sind die detaillierten Temperaturdaten der drei Mesokosmenexperimente dargestellt. Die automatische Messung erfolgte alle 5 Minuten und wurde jeweils in dem Tank aufgezeichnet, der lediglich mit Meerwasser gefüllt wurde.



**Abbildung 40:** Detailliertes Temperaturprofil des ersten Mesokosmenexperimentes. Die Messung erfolgte alle 5 Minuten in Tank 1.



**Abbildung 41:** Detailliertes Temperaturprofil des zweiten Mesokosmenexperimentes. Die Messung erfolgte alle 5 Minuten in Tank 8.



**Abbildung 42:** Detailliertes Temperaturprofil des dritten Mesokosmenexperimentes. Die Messung erfolgte alle 5 Minuten in Tank 12.

## **6    Selbstständigkeitserklärung**

**(Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock)**

Ich versichere an Eides statt die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Rottendorf, den 09. Juni 2016

Janne Hähnel

## 7 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> G. Nausch, D. Nehring, *Baltic Sea Environment Proceedings* **1996**, 64B, 80-85.
- <sup>2</sup> HELCOM, *Annual report on shipping accidents in the Baltic Sea in 2013* **2014**.
- <sup>3</sup> HELCOM, *Baltic Sea maritime and response map service*
- <sup>4</sup> HELCOM, *Baltic Sea Environment Proceedings* **2010**, 123.
- <sup>5</sup> [http://www.brisk.helcom.fi/risk\\_analysis/spills/](http://www.brisk.helcom.fi/risk_analysis/spills/) (letzter Aufruf 09.06.2016)
- <sup>6</sup> C. Parkhomenko, A. Korzhonok, *Results and recommendations from HELCOMs BRISK and BRISK-RU projects* **2013**.
- <sup>7</sup> HELCOM, *HELCOM Annual report on discharges observed during aerial surveillance in the Baltic Sea, 2014* **2015**.
- <sup>8</sup> Y. Samiullah, *Oil and Petrochemical Pollution* **1985**, 2, 235-264.
- <sup>9</sup> P. F. Kingston, *Spill Science and Technology Bulletin* **2002**, 7, 53-61.
- <sup>10</sup> J. Whitfield, *Nature* **2003**, 422, 464-466.
- <sup>11</sup> Vorsorgeplan Schadstoffunfallbekämpfung, *VPS Bekämpfungshandbuch*, [http://www.vpsserver1.de/vpsweb/vps\\_buch/vps\\_bekaempfungshandbuch\\_web\\_2009/default.htm#!word\\_dokumente/\\_startseite.htm](http://www.vpsserver1.de/vpsweb/vps_buch/vps_bekaempfungshandbuch_web_2009/default.htm#!word_dokumente/_startseite.htm) (letzter Aufruf 09.06.2016)
- <sup>12</sup> X. Zhu, A. D. Venosa, M. T. Suidan, K. Lee, *US Environmental Protection Agency* **2001**.
- <sup>13</sup> H. Küster, *Die Ostsee: eine Natur- und Kulturgeschichte*, 1. Auflage, Verlag C.H.Beck, München, **2002**.
- <sup>14</sup> H. Liedtke, J. Marcinek (Hrsg.), *Physische Geographie Deutschlands*, 2. Auflage, Perthes, Gotha, **1995**.
- <sup>15</sup> U. Zahn (Leitung), *Diercke Weltatlas; Küstenformen*, 1. Auflage, Westermann, Braunschweig, **1988**.

- <sup>16</sup> M. Siewert, M. Powilleit, F. Saathoff, *International Oil Spill Conference Proceedings 2014*, Savannah, Georgia, USA, 2014, 1431-1440.
- <sup>17</sup> HELCOM, *Environmental sensitivity to oil spills*, BRISK
- <sup>18</sup> J. G. Leahy, R. R. Colwell, *Microbiological reviews* **1990**, *54*, 305-315.
- <sup>19</sup> S.-Z. Yang, H.-J. Jin, Z. Wei, R.-X. He, Y.-J. Ji, X.-M. Li, S.-P. Yu, *Pedosphere* **2009**, *19*, 371-381.
- <sup>20</sup> R. M. Atlas, *Microbiological reviews* **1981**, *45*, 180-209.
- <sup>21</sup> I. M. Head, D. M. Jones, W. F. M. Röling, *Nature Reviews Microbiology* **2006**, *4*, 173-182.
- <sup>22</sup> K. Poremba, W. Gunkel, S. Lang, F. Wagner, *Biologie in unserer Zeit* **1989**, *19*, 145-148.
- <sup>23</sup> O. G. Brakstad, I. Nonstad, L.-G. Faksness, P. J. Brandvik, *Microbial Ecology* **2008**, *55*, 540-552.
- <sup>24</sup> J. P. Del'Arco, F. P. d. Franca, *International Biodegradation and Biodegradation* **1999**, *44*, 87-92.
- <sup>25</sup> B. R. Edwards, C. M. Reddy, R. Camilli, C. A. Carmichael, K. Longnecker, B. A. S. van Mooy, *Environmental Research Letters* **2011**, *6*, 1-9.
- <sup>26</sup> N. Sorkhoh, R. Al-Hasan, S. Radwan, T. Höpner, *Nature* **1993**, 359.
- <sup>27</sup> K. S. M. Rahman, J. Thahira-Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, I. M. Banat, *Biore-source Technology* **2002**, *85*, 257-261.
- <sup>28</sup> K. K. Kadali, K. L. Simons, P. J. Sheppard, A. S. Ball, *Water, Air, and Soil Pollution* **2012**, *223*, 4283-4295.
- <sup>29</sup> P. J. Chapman, M. Shelton, M. Grifoll, S. Selifonov, *Environmental Health Perspectives* **1995**, *103*, 79-83.

- <sup>30</sup> J. P. Salanitro, P. B. Dorn, M. H. Huesemann, K. O. Moore, I. A. Rhodes, L. M. R. Jackson, T. E. Vipond, M. M. Western, H. L. Wisniewski, *Environmental Science and Technology* **1997**, *31*, 1769-1776.
- <sup>31</sup> J. G. Speight, *The chemistry and technology of Petroleum*, Fourth Edition ed., Taylor and Francis Group, LLC, **2007**.
- <sup>32</sup> A. K. Haritash, C. P. Kaushik, *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *169*, 1-15.
- <sup>33</sup> B. K. Gogoi, R. L. Bezbaruah, *Progress in Industrial Microbiology* **2002**, *36*, 427-456.
- <sup>34</sup> A. L. Juhasz, R. Naidu, *International Biodegradation and Biodegradation* **2000**, *45*, 57-88.
- <sup>35</sup> E. Pelletier, D. Delille, B. Delille, *Marine Environmental Research* **2004**, *57*, 311-327.
- <sup>36</sup> HELCOM, *HELCOM guide to alien species and ballast water management in the Baltic Sea* **2014**, 1-40.
- <sup>37</sup> A. G. Marshall, R. P. Rodgers, *Accounts for Chemical Research* **2004**, *37*, 53-59.
- <sup>38</sup> S. K. Panda, J. T. Andersson, W. Schrader, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1329-1339.
- <sup>39</sup> B. N. Barman, V. L. Cebolla, L. Membrado, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2000**, *30*, 75-120.
- <sup>40</sup> Z. Wang, M. Fingas, *Journal of Chromatography A* **1997**, *774*, 51-78.
- <sup>41</sup> K. A. Burns, *Marine Pollution Bulletin* **1993**, *26*, 68-72.
- <sup>42</sup> L. R. Snyder, B. E. Buell, *Analytical Chemistry* **1968**, *40*, 1295-1302.
- <sup>43</sup> L. W. Corbett, *Analytical Chemistry* **1969**, *41*, 576-579.
- <sup>44</sup> D. W. Later, B. W. Wilson, *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 2979-2984.
- <sup>45</sup> N. Aske, H. Kallevik, J. Sjöblom, *Energy and Fuels* **2001**, *15*, 1304-1312.

- <sup>46</sup> E. Lundanes, T. Greibokk, *Journal of High Resolution Chromatography* **1994**, *17*, 197-202.
- <sup>47</sup> J. Blomberg, P. J. Schoenmakers, U. A. T. Brinkman, *Journal of Chromatography A* **2002**, *972*, 137-173.
- <sup>48</sup> W. Y. Shiu, M. Bobra, A. M. Bobra, A. Maijanen, L. Suntio, D. Mackay, *Oil and Chemical Pollution* **1990**, *7*, 57-84.
- <sup>49</sup> J. M. Levy, *Journal of High Resolution Chromatography* **1994**, *17*, 212-216.
- <sup>50</sup> S. Wang, G. Guo, Z. Yan, G. Lu, Q. Wang, F. Li, *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 368-374.
- <sup>51</sup> D. J. Heath, C. A. Lewis, S. J. Rowland, *Organic Geochemistry* **1997**, *26*, 769-785.
- <sup>52</sup> J. H. Christensen, A. B. Hansen, J. Mortensen, O. Andersen, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 2210-2217.
- <sup>53</sup> W. E. Rudzinski, K. Zhou, X. Luo, *Energy and Fuels* **2004**, *18*, 16-21.
- <sup>54</sup> S. L. Silva, A. M. S. Silva, J. C. Ribeiro, F. G. Martins, F. A. D. Silva, C. M. Silva, *Analytica Chimica Acta* **2011**, *707*, 18-37.
- <sup>55</sup> R. Geissler, M. R. Saraji-Bozorgzad, T. Gröger, A. Fendt, T. Streibel, M. Sklorz, B. M. Krooss, K. Fuhrer, M. Gonin, E. Kaisersberger, T. Denner, R. Zimmermann, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 6038-6048.
- <sup>56</sup> G. T. Ventura, B. Rahuraman, R. K. Nelson, O. C. Mullins, C. M. Reddy, *Organic Geochemistry* **2010**, *41*, 1026-1035.
- <sup>57</sup> P. D. Boehm, G. S. Douglas, W. A. Burns, P. J. Mankiewicz, D. S. Page, A. E. Bence, *Marine Pollution Bulletin* **1997**, *34*, 599-613.
- <sup>58</sup> Z. Wang, M. F. Fingas, *Marine Pollution Bulletin* **2003**, *47*, 423-452.
- <sup>59</sup> C. A. Hughey, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, K. Qian, W. K. Robbins, *Organic Geochemistry* **2002**, *33*, 743-759.

- <sup>60</sup> T. Sauer, P. Boehm, *International Oil Spill Conference Proceedings 1991*, USA, Washington DC, 1991, 363-369.
- <sup>61</sup> C. D. Johnston, T. P. Bastow, N. L. Innes, *European Journal of Soil Biology* **2007**, *43*, 328-334.
- <sup>62</sup> L. Keith, W. Telliard, *Environmental Science and Technology* **1979**, *13*, 416-423.
- <sup>63</sup> D. M. Di Toro, J. a. McGrath, W. A. Stubblefield, *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 24-36.
- <sup>64</sup> J. M. Neff, S. Ostazeski, W. Gardiner, I. Stejskal, *Environmental Toxicology and Chemistry* **2000**, *19*, 1809-1821.
- <sup>65</sup> T. Saeed, M. Al-Mutairi, L. N. Ali, T. Al-Obaid, M. U. Beg, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **1998**, *72*, 275-287.
- <sup>66</sup> C. E. Cerniglia, *Biodegradation* **1992**, *3*, 351-369.
- <sup>67</sup> S.-H. Cho, K.-H. Oh, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2012**, *89*, 680-685.
- <sup>68</sup> T. K. Dutta, S. Harayama, *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, 1500-1505.
- <sup>69</sup> Kromidas, *Validierung in der Analytik*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- <sup>70</sup> K. Danzer, C. Fischbacher, H. Hobert, K.-U. Jagemann, *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin, **2001**.
- <sup>71</sup> Sicherheitsdatenblatt gemäß EG-Verordnung 1907/2006, Handelsname: ROHÖL REB 1
- <sup>72</sup> H. Unbehaun, T. Hieronymus, S. Tech, A. Wagenfuehr, *International Oil Spill Conference Proceedings 2014*, Savannah, Georgia, USA, 2014, 1474-1484.
- <sup>73</sup> Umweltbundesamt (Hrsg.), *Lagerung und Transport wassergefährdender Stoffe (LTwS)* **1999**, Nr. 27
- <sup>74</sup> B. Diezemann, unveröffentlichte Ergebnisse, *interne Projektkommunikation*

- <sup>75</sup> C. Semlow, unveröffentlichte Ergebnisse, *interne Projektkommunikation*
- <sup>76</sup> C. Teas, S. Kalligeros, F. Zanikos, S. Stournas, E. Lois, G. Anastopoulos, *Desalination* **2001**, *140*, 259-264.
- <sup>77</sup> Q. F. Wei, R. R. Mather, A. F. Fotheringham, R. D. Yang, *Marine Pollution Bulletin* **2003**, *46*, 780-783.
- <sup>78</sup> H.-M. Choi, *Environmental Science and Technology* **1992**, *26*, 772-776.
- <sup>79</sup> S. Suni, A.-L. Kosunen, M. Hautala, A. Pasila, M. Romantschuk, *Marine Pollution Bulletin* **2004**, *49*, 916-921.
- <sup>80</sup> R. F. Johnson, T. G. Manjrekar, J. E. Halligan, *Environmental Science and Technology* **1973**, *7*, 439-443.
- <sup>81</sup> M. O. Adebajo, R. L. Frost, J. T. Kloprogge, O. Carmody, S. Kokot, *Journal of Porous Materials* **2003**, *10*, 159-170.
- <sup>82</sup> K. Hori, M. E. Flavier, S. Kuga, T. B. T. Lam, K. Iiyama, *Journal of Wood Science* **2000**, *46*, 401-404.
- <sup>83</sup> S. A. Sayed, A. M. Zayed, *Desalination* **2006**, *194*, 90-100.
- <sup>84</sup> T. R. Annunciado, T. H. D. Sydenstricker, S. C. Amico, *Marine Pollution Bulletin* **2005**, *50*, 1340-1346.
- <sup>85</sup> M. Toyoda, M. Inagaki, *Spill Science and Technology Bulletin* **2003**, *8*, 467-474.
- <sup>86</sup> J. G. Reynolds, P. R. Coronado, L. W. Hrubesh, *Energy Sources* **2001**, *23*, 831-843.
- <sup>87</sup> J. G. Reynolds, P. R. Coronado, L. W. Hrubesh, *Journal of Non-Crystalline Solids* **2001**, *292*, 127-137.
- <sup>88</sup> R. Siron, J.-F. Rontani, G. Giusti, *Toxicological and Environmental Chemistry* **1987**, *15*, 223-229.

- <sup>89</sup> E. Safonova, S. Koenig, *International Oil Spill Conference Proceedings 2014*, Georgia, Savannah, USA, 2014, Poster No. 300185.
- <sup>90</sup> M. Labrenz, S. Koenig, unveröffentlichte Ergebnisse, *private Kommunikation*.
- <sup>91</sup> R. C. Prince, *Critical Reviews in Microbiology* **1993**, *19*, 217-242.
- <sup>92</sup> Z. Wang, M. Fingas, S. Blenkinsopp, G. Sergy, M. Landriault, L. Sigouin, J. Foght, K. Semple, D. W. S. Westlake, *Journal of Chromatography A* **1998**, *809*, 89-107.
- <sup>93</sup> L. Eastcott, W. Y. Shiu, D. Mackay, *Oil and Chemical Pollution* **1988**, *4*, 191-216.
- <sup>94</sup> Z. Wang, M. Fingas, *Journal of Microcolumn Separations* **1995**, *7*, 617-639.
- <sup>95</sup> N. M. Fayad, E. Overton, *Marine Pollution Bulletin* **1995**, *30*, 239-246.
- <sup>96</sup> J. Foght, K. Semple, C. Gauthier, D. W. S. Westlake, S. Blekinsopp, G. Sergy, Z. Wang, M. Fingas, *Environmental Technology* **1999**, *20*, 839-849.
- <sup>97</sup> P. M. Fedorak, D. W. S. Westlake, *Canadian Journal of Microbiology* **1981**, *27*, 432-443.
- <sup>98</sup> L. Huang, T. Ma, D. Li, F.-l. Liang, R.-L. Liu, G.-q. Li, *Marine Pollution Bulletin* **2008**, *56*, 1714-1718.
- <sup>99</sup> M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, J. M. Martinko, D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson, Boston, **2014**.
- <sup>100</sup> B. A. Wrenn, J. R. Haines, A. D. Venosa, M. Kadkhodayan, M. T. Suidan, *Journal of Industrial Microbiology* **1994**, *13*, 279-286.
- <sup>101</sup> E. Rambeloarisoa, J. F. Rontani, G. Giusti, Z. Duvnjak, J. C. Bertrand, *Marine Biology* **1984**, *83*, 69-81.
- <sup>102</sup> I. M. Head, R. P. J. Swannell, *Environmental Biotechnology* **1999**, *10*, 234-239.
- <sup>103</sup> V. H. Smith, D. W. Graham, D. D. Cleland, *Environmental Science and Technology* **1998**, *32*, 3386-3395.

- <sup>104</sup> R. M. Atlas, R. Bartha, *Biotechnology and Bioengineering* **1972**, *14*, 309-318.
- <sup>105</sup> M. A. Zahed, H. A. Aziz, M. H. Isa, L. Mohajeri, S. Mohajeri, *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 9455-9460.
- <sup>106</sup> J. F. Braddock, M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth, K. A. McCarthy, *Environmental Science and Technology* **1997**, *31*, 2078-2084.
- <sup>107</sup> W. F. M. Roeling, M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R. J. P. Swannell, I. M. Head, *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 5537-5548.
- <sup>108</sup> M. C. Boufadel, P. Reeser, M. T. Suidan, B. A. Wrenn, J. Cheng, X. Du, T. L. Huang, A. D. Venosa, *Environmental Technology* **1999**, *20*, 191-199.
- <sup>109</sup> K. Lee, G. H. Tremblay, E. M. Levy, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1993**, Tampa, Florida, USA, 1993, 449-454.
- <sup>110</sup> J. T. Dibble, R. Bartha, *Applied and Environmental Microbiology* **1976**, *31*, 544-550.
- <sup>111</sup> P. J. Kinney, D. K. Button, D. M. Schell, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1969**, Washington D.C., USA, 1969, 333-340.
- <sup>112</sup> D. M. Karl, *Microbial Ecology* **1992**, *24*, 77-89.
- <sup>113</sup> D. Delille, E. Pelletier, A. Rodriguez-Blanco, J.-F. Ghiglione, *Polar Biology* **2009**, *32*, 1521-1528.
- <sup>114</sup> M. Nikolopoulou, N. Pasadakis, N. Kalogerakis, *Desalination* **2007**, *211*, 286-295.
- <sup>115</sup> A. Ladousse, B. Tramier, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1991**, San Diego, California, USA, 1991, 577-581.
- <sup>116</sup> K. Lee, G. H. Tremblay, S. E. Cobanli, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1995**, Long Beach, California, USA, 1995, 107-113.
- <sup>117</sup> E. Rosenberg, R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube, E. Adler, E. Z. Ron, *Biodegradation* **1992**, *3*, 337-350.

- <sup>118</sup> R. P. J. Swannell, K. Lee, M. McDonagh, *Microbiological reviews* **1996**, *60*, 342-365.
- <sup>119</sup> P. H. Pritchard, C. F. Costa, *Environmental Science and Technology* **1991**, *25*, 372-379.
- <sup>120</sup> S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang, M. F. Fingas, J. Foght, D. W. S. Westlake, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1995**, Long Beach, California, USA, 1995, 91-96.
- <sup>121</sup> J. E. Lepo, C. R. Cripe, *US Environmental Protection Agency* **1998**, *EPA/600/S-97/008*.
- <sup>122</sup> J. E. Lepo, C. R. Cripe, *US Environmental Protection Agency* **1998**, *EPA/600/S-97/007*.
- <sup>123</sup> J. R. Haines, A. D. Venosa, E. L. Holder, K. M. Miller, *International Oil Spill Conference Proceedings* **1999**, Seattle, Washington, USA, 1999, 1065-1070.
- <sup>124</sup> S. C. Wilson, K. C. Jones, *Environmental Pollution* **1993**, *81*, 229-249.
- <sup>125</sup> J. J. Cooney, S. A. Silver, E. A. Beck, *Microbial Ecology* **1985**, *11*, 127-137.
- <sup>126</sup> W. R. Cullen, X.-F. Li, K. J. Reimer, *The Science of the Total Environment* **1994**, *156*, 27-37.
- <sup>127</sup> R. M. Atlas, *Marine Pollution Bulletin* **1995**, *31*, 178-182.
- <sup>128</sup> E. Safonova, S. Koenig, *Schlussbericht des Projektes BioBind 2014*
- <sup>129</sup> G. Nausch, R. Feistel, L. Umlauf, V. Mohrholz, K. Nagel, H. Siegel, *Marine Science Report* **2011**, *86*, 84-97.
- <sup>130</sup> S. Suni, K. Koskinen, S. Kauppi, E. Hannula, T. Ryynänen, A. Aalto, J. Jääneimo, J. Ikävalko, M. Romantschuk, *Ambio: A Journal of the human environment* **2007**, *36*, 173-179.
- <sup>131</sup> C. Gertler, G. Gerdts, K. N. Timmis, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, *Journal of Applied Microbiology* **2009**, *107*, 590-605.
- <sup>132</sup> Y. Collos, C. Descolas-Gros, M. Fontugne, A. Mortain-Bertrand, M. J. Chrétiennot-Dinet, M. G. Frika, *Marine Biology* **1992**, *112*, 491-496.

- <sup>133</sup> D. Mackay, C. D. McAuliffe, *Oil and Chemical Pollution* **1988**, *5*, 1-20.
- <sup>134</sup> P. W. Atkins, J. d. Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2006**.
- <sup>135</sup> C. van Bernem, T. Lübbe, *Öl im Meer, Vol. 1. Auflage*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, **1997**.
- <sup>136</sup> H. Un behaun, T. Hieronymus, S. Tech, A. Wagenführ, *Schlussbericht des Projektes Bio-Bind* **2014**
- <sup>137</sup> I. M. Banat, *Bioresource Technology* **1995**, *51*, 1-12.
- <sup>138</sup> G. Georgiou, S.-C. Lin, M. M. Sharma, *Nature Biotechnology* **1992**, *10*, 60-65.
- <sup>139</sup> L. M. V. Malmquist, R. R. Olsen, A. B. Hansen, O. Andersen, J. H. Christensen, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1164*, 262-270.
- <sup>140</sup> M. Coates, D. W. Connell, D. M. Barron, *Environmental Science and Technology* **1985**, *19*, 628-632.
- <sup>141</sup> S. Ezra, S. Feinstein, I. Pelly, D. Bauman, I. Miloslavsky, *Organic Geochemistry* **2000**, *31*, 1733-1741.
- <sup>142</sup> L. Setti, G. Lanzarini, P. G. Pifferi, G. Spagna, *Chemosphere* **1993**, *26*, 1151-1157.
- <sup>143</sup> Z. Wang, M. Fingas, D. S. Page, *Journal of Chromatography A* **1999**, *843*, 369-411.
- <sup>144</sup> R. Siron, E. Pelletier, C. Brochu, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1995**, *28*, 406-416.
- <sup>145</sup> T. C. Sauer, J. Michel, M. O. Hayes, D. V. Aurand, *Environmental International* **1998**, *24*, 43-60.
- <sup>146</sup> E. Safanova, S. Koenig, unveröffentlichte Ergebnisse, *private Kommunikation*.
- <sup>147</sup> W. Gunkel, *Helgoland Marine Research* **1967**, *16*, 336-348.

- <sup>148</sup> B. V. Gromov, N. N. Titova, *Catalogue of Microalgal Cultures in the Collection of USSR Moscow* **1983**, 3-27.
- <sup>149</sup> E. Gruber, *Grundlagen der Zellstofftechnologie*, Vorlesungsskript, 2011, <http://www.gruberscript.net/>
- <sup>150</sup> K. Grasshoff, K. Kremling, M. Ehrhardt (Hrsg.), *Methods of Seawater Analysis*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- <sup>151</sup> J. H. Carpenter, *Limnology and Oceanography* **1965**, *10*, 135-140.
- <sup>152</sup> P. L. Searle, *Analyst* **1984**, *109*, 549-568.
- <sup>153</sup> D. L. Johnson, M. E. Q. Pilson, *Analytica Chimica Acta* **1972**, *58*, 289-299.
- <sup>154</sup> Z. Wang, M. Fingas, K. Li, *Journal of Chromatographic Science* **1994**, *32*, 361-366.
- <sup>155</sup> M. A. Mills, T. J. McDonald, J. S. Bonner, M. A. Simon, R. L. Autenrieth, *Chemosphere* **1999**, *39*, 2563-2582.
- <sup>156</sup> P. Sun, M. Bao, G. Li, X. Wang, Y. Zhao, Q. Zhou, L. Cao, *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 830-836.
- <sup>157</sup> W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- <sup>158</sup> N. Theobald, W. Gerwinski, C. Caliebe, M. Haarich, *Forschungsbericht 202 22 213*, Umweltbundesamt, **2007**.
- <sup>159</sup> J. W. Einax, H. W. Zwanziger, S. Geiss, *Chemometrics in Environmental Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.