



Technische Universität München  
Fakultät für Chemie  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Lehrstuhl für Analytische Chemie

# **Raman-Mikrospektroskopie zur Analyse von organischen Bodensubstanzen und Mikroplastik**

**Alexandra Christina Wiesheu**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner  
2. Univ.-Prof. Dr. Martin Elsner

Die Dissertation wurde am 27.04.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.06.2017 angenommen.



*„Ask the right questions and nature  
will open the doors to her secrets.”*

- Sir Chandrasekhara Raman





# Vorwort

*Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von September 2013 bis April 2017 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC), Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München (TUM) unter Leitung von o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner angefertigt. Die Arbeit wurde finanziell von der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) der TUM, dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.*

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Nießner für die freundliche Aufnahme am Institut und die Möglichkeit meine Arbeit über zwei interessante Themen durchführen zu können. Weiterhin bin ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und der Unterstützung durch konstruktive Kritik dankbar.

Meiner Mentorin Dr. Natalia P. Ivleva möchte ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die hervorragenden Betreuung und die vielen fachlichen Diskussionen danken. Sie hatte stets bei Problemen und Fragestellungen ein offenes Ohr und unterstützte mich mit konstruktiven Lösungsvorschlägen und ihrer langjährigen fachlichen Erfahrung.

Bei meinen Projektpartnern Lydia Paetsch, PD Dr. Carsten Müller und Prof. Dr. Ingrid Koegel-Knabner (Lehrstuhl für Bodenkunde, Technische Universität München) bedanke ich mich für die gute Kooperation, die Bereitstellung der fraktionierten Bodenproben sowie der Aufnahme der NMR-Spektren. Insbesondere möchte ich Dr. Carsten Müller für die Durchführung und Auswertung der NanoSIMS-Analysen danken. Ramona Brejcha und PD Dr. Martin Elsner (Institut für Grundwasserökologie, Helmholtz Zentrum München) gebührt mein Dank für die Bestimmungen von Isotopenkonzentrationen mittels IRMS.

Dr. Janina Domogalla-Urbansky, Tobias Geiger, Hermann Fehrling und Dr. Julia Schwaiger (Bayerisches Landesamt für Umwelt) danke ich für die Durchführung des Expositions- und Feldversuches sowie der Bereitstellung der entsprechenden Muschelproben. Weiterhin möchte ich mich für fachliche Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen bedanken. Bei Florian Rager bedanke ich mich für seine engagierte Mitarbeit im Rahmen seiner Bachelorarbeit. Teile seiner Arbeit finden auch in dem Kapitel zur MP-Analytik von limnischen Organismen Anwendung.

Dr. Hannes Imhof und Prof. Dr. Christian Laforsch (Lehrstuhl für Tierökologie I, Universität Bayreuth) danke ich für die Probennahme und -aufbereitung der Sedimentproben des Gardasees. Zusätzlich bedanke ich mich für die Bereitstellung der mit PVC-gefütterten *Daphnia magna*. Dr. Johannes Schmid danke ich für die

Vorbereitung der MP-Partikel sowie der Schraubdeckelproben für die ICP-MS-Analytik.

Bei PD Dr. Christoph Haisch möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche im Allgemeinen und im Besonderen im Rahmen der Anti-Stokes-Fluoreszenz danken. PD Dr. Thomas Baumann danke ich für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen zur MP-Analyse in Getränken. Christine Sternkopf gebührt mein Dank für die schnelle und zuverlässige Analyse und Auswertung der ICP-MS-Messungen.

Philipp Anger danke ich für die intensive Unterstützung dieser Dissertation im Rahmen seiner Bachelorarbeit, seines Forschungspraktikums und seiner Masterarbeit sowie in der Zeit als wissenschaftliche Hilfskraft. Ein Teil seiner Ergebnisse ist in den Kapiteln zur MP-Analytik von limnischen Gewässern und Organismen sowie im Kapitel zur Kontamination von Bier dargestellt. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die vielen hilfreichen Diskussionen und die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinen Kollegen Patrick Kubryk, Dr. Michaela Eß, Bettina Kiwull, Ruben Weiß und Carolin Hartmann aus der Raman- bzw. Aerosolgruppe danke ich für die vielseitigen Diskussionen, die großartige Arbeitsatmosphäre sowie die vielen schönen Augenblicke. Patrick Kubryk gilt hier besonders mein Dank für die Hilfe bei der Synthese der AgNP, der Unterstützung bei RM, SIRM und SERS sowie den vielen hilfreichen Diskussionen. Dr. Michaela Eß möchte ich im Besonderen für die Erzeugung der GfG-Ruße, der Hilfe bei der Hochtemperatur-RM sowie den vielen Diskussionen zu der RM-Analyse von Rußen und Kohlen danken. Allen weiteren Kollegen am IWC danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern Christina und Johann Wiesheu danke ich dafür, dass sie mich stets unterstützt haben und mir so das Studium und die Promotion ermöglichten. Bei meinem Partner Alexander möchte ich mich für den stetigen Rückhalt, das entgegengebrachte Verständnis und die vielen aufbauenden Worte bedanken.

# Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht:

H. K. Imhof, C. Laforsch, A. C. Wiesheu, J. Schmid, P. M. Anger, R. Niessner, N. P. Ivleva, Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes, *Water Research* **2016**, 98, 64–74.

A. C. Wiesheu, P. M. Anger, T. Baumann, R. Niessner, N. P. Ivleva, Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages, *Analytical Methods* **2016**, 8, 5722–5725.

N. P. Ivleva, A. C. Wiesheu, R. Niessner, Microplastic in Aquatic Ecosystems, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 7, 1720–1739.

# Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Anwendung und Optimierung der Raman-Mikrospektroskopie (RM) für die Analyse unterschiedlicher Umweltproben.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) weiterentwickelt und erstmals auf organische Bodensubstanzen angewandt, um diese mit einer hohen räumlichen Auflösung zu analysieren. Es wurden unterschiedliche Methoden der Fluoreszenzverringering auf ihre Eignung für die SIRM untersucht, um die für organische Bodensubstanzen typische Autofluoreszenz zu minimieren. Dazu wurden Huminsäuren mit bekanntem Gehalt an  $^{13}\text{C}$  (zwischen 1.1% und 99%) synthetisiert. Anwendung fanden hierbei unter anderem die Analyse bei verschiedenen Wellenlängen, die Oberflächen-verstärkte Raman-Streuung (SERS) mit 50 $\times$ - und 10 $\times$ -Objektiven, eine Analyse im Anti-Stokes-Bereich und SIRM bei erhöhten Temperaturen. Durch die Degradation der Fluorophore bei hoher Laserleistung konnten reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse zum Isotopengehalt gewonnen werden. Des Weiteren lieferte die Analyse unterschiedlicher Bodenfraktionen mittels RM Informationen zur strukturellen Ordnung von organischem Bodenmaterial.

Der zweite Teil der Arbeit behandelte das Vorkommen von Mikroplastik (MP, Größenbereich 1  $\mu\text{m}$  – 5 mm) in unterschiedlichen Matrices. Am Fallbeispiel des Gardasees (Italien) konnte die MP-Belastung eines Binnengewässers umfangreich beschrieben werden. Hierbei zeigte sich, dass, zusätzlich zu Mikroplastik, Pigmentpartikel eine weitere, bisher übersehene, Kontaminationsquelle von limnischen Gewässern darstellen. Mittels RM war es zusätzlich erstmals möglich eine dreidimensionale Analyse der MP-Verteilung im Darm von Großen Wasserflöhen (*Daphnia magna*) durchzuführen. Außerdem wurde die RM-Analytik von MP in Muscheln weiterentwickelt und optimiert. Es zeigte sich eine Aufnahme von MP durch Organismen, welche aus Labor- und Freiversuchen stammten. Bisher berichtete Beobachtungen, dass die Aufnahme mit abnehmender Größe der Partikel zunimmt, konnten bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem erstmals die Aufnahme von MP durch Muscheln im Effluent einer Kläranlage nachgewiesen. In einer weiteren Studie zur Bestimmung des Gehaltes an synthetischen Fasern in Bier zeigte sich die Bedeutung von geeigneten Kontrollproben sowie Identifikationsmethoden. Die beschriebene Kontamination von Bier mit synthetischen Fasern konnte nicht bestätigt werden. Es liegt nahe, dass bisherige Ergebnisse auf Kontaminationen bei der Probennahme und -aufbereitung beruhen.

# Abstract

The present work focused on the application and optimization of Raman microspectroscopy (RM) for the analysis of different environmental samples.

The first part reports on the further development of Stable-isotope Raman Microspectroscopy (SIRM) and its first application on soil organic matter in order to enable an analysis with a high spatial resolution. The samples exhibited a typical autofluorescence pattern, which hampered the analysis by means of SIRM. Several methods for the reduction and prevention of fluorescence have been tested. For this purpose artificial humic acids with known  $^{13}\text{C}$ -content (between 1.1% and 99%) were synthesized. The tested methods included, amongst others, the analysis with different excitation wavelengths, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), the addition of silver nanoparticles including an evaluation under smaller magnification, an analysis in the Anti-Stokes region and SIRM with increased temperatures. Best results were obtained with a high laser power, which allowed a degradation of the fluorophores. Moreover, an evaluation of different soil samples stemming from physical fractionation confirmed the suitability of RM for the determination of structural order in soil organic matter.

The second part of this work discusses on the analysis of microplastic (MP, size range 1  $\mu\text{m}$  – 5 mm) in different environmental matrices. A comprehensive case study at Lake Garda, Italy, was performed on the contamination of a limnic ecosystem with MP. In addition to MP new contaminants of limnic ecosystems could be identified, namely pigmented particles. RM could also be implemented for the first *in situ* 3D-analysis of the distribution of MP in the guts of *Daphnia magna*. Furthermore the RM evaluation of MP in bivalves was improved and optimized. Studies on MP exposure of bivalves in both lab and environmental conditions showed an uptake and confirmed the trend that the uptake increases with decreasing sizes of MP. These results moreover included the first reports on the uptake of MP by bivalves which were exposed to the effluent of a wastewater treatment plant. Another study on the synthetic fiber content of beer samples could not confirm former reports on contaminations. The results underlined the importance of appropriate control samples as well as suitable analysis methods under clean atmosphere. The findings suggested that former results are biased by contaminations taking place during the sampling.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1	Raman-Spektroskopie . . . . .	4
2.1.1	Raman-Effekt . . . . .	4
2.1.2	Raman-Spektroskopie (RS) . . . . .	8
2.1.3	Raman-Mikrospektroskopie (RM) . . . . .	9
2.1.4	RM von Kohlenstoffverbindungen . . . . .	11
2.1.5	RM und Fluoreszenz . . . . .	16
2.1.6	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) . . . . .	17
2.1.7	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) . . . . .	19
2.2	Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens . . . . .	28
2.2.1	Aufbau des Bodens . . . . .	28
2.2.2	Organische Bodensubstanz (SOM) . . . . .	30
2.2.3	Wasserrückhaltefähigkeit . . . . .	31
2.2.4	Analytische Methoden zur Charakterisierung von SOM . . . . .	34
2.2.5	RS- und RM-Analysen von SOM . . . . .	36
2.3	Mikroplastik . . . . .	38
2.3.1	Entstehung und Definition . . . . .	38
2.3.2	Analytische Methoden . . . . .	39
2.3.3	Vorkommen . . . . .	51
2.3.4	Bioabbaubare und kompostierbare Polymere . . . . .	54
2.3.5	Biologische Konsequenzen . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>57</b>
3.1	Raman-Mikrospektroskopie . . . . .	57
3.2	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie . . . . .	59
3.2.1	<sup>13</sup> C-markierte Kohle aus Pyrolyse . . . . .	59
3.2.2	Synthese künstlicher Huminsäuren . . . . .	60
3.2.3	SIRM-Analyse . . . . .	61
3.2.4	Spektrenbearbeitung . . . . .	63
3.2.5	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) . . . . .	65
3.2.6	Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS) . . . . .	66
3.3	Fraktionierung von Bodenproben . . . . .	67
3.3.1	Probennahme . . . . .	67
3.3.2	Physikalische Fraktionierung . . . . .	67
3.3.3	Kernresonanzspektroskopie mit Kreuzpolarisation im magischen Winkel (CPMAS-NMR) . . . . .	68

3.3.4	RM-Analyse von Bodenproben . . . . .	68
3.4	Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern . . . . .	69
3.4.1	Probennahme . . . . .	69
3.4.2	Dichteseparation . . . . .	70
3.4.3	RM-Analyse von MP aus limnischen Gewässern . . . . .	71
3.4.4	Schwermetallanalytik . . . . .	73
3.4.5	Größenbestimmung . . . . .	75
3.4.6	Vermeidung von Kontaminationen . . . . .	75
3.4.7	3D-Raman-Imaging von MP in Wasserorganismen . . . . .	75
3.5	Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen . . . . .	77
3.5.1	Optimierung des Aufschlusses . . . . .	77
3.5.2	Expositionsversuch . . . . .	79
3.5.3	Feldversuch . . . . .	79
3.5.4	RM-Analyse von MP in Biota . . . . .	80
3.6	Bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe . . . . .	81
3.7	Analyse von Mikroplastik aus Getränken . . . . .	82
3.7.1	Probenvorbereitung . . . . .	82
3.7.2	RM-Analyse von MP in Getränken . . . . .	83
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie von SOM . . . . .	84
4.1.1	<sup>13</sup> C-markierte Kohle aus Pyrolyse . . . . .	84
4.1.2	SIRM der Edukte . . . . .	86
4.1.3	Synthese künstlicher Huminsäuren . . . . .	87
4.1.4	Analyse bei unterschiedlichen Wellenlängen . . . . .	89
4.1.5	SERS . . . . .	91
4.1.6	SERS bei geringerer Vergrößerung . . . . .	92
4.1.7	Anti-Stokes-Fluoreszenz . . . . .	93
4.1.8	Temperaturabhängige RM . . . . .	96
4.1.9	Prägraphitisierung . . . . .	99
4.1.10	Validierung der Kalibrierung mittels IRMS . . . . .	100
4.1.11	Kombination mit NanoSIMS . . . . .	101
4.1.12	Zusammenfassung der SIRM von SOM . . . . .	105
4.2	RM-Analyse von fraktionierten Bodenproben . . . . .	107
4.2.1	RM-Analyse der Bodenproben . . . . .	107
4.2.2	Kombination von RM und NMR . . . . .	109
4.2.3	Zusammenfassung der Analyse von fraktionierten Bodenproben	110
4.3	Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern . . . . .	111
4.3.1	Identifikation . . . . .	111
4.3.2	Größenverteilung . . . . .	113
4.3.3	Identifizierte Polymer- und Pigmentsorten . . . . .	116
4.3.4	Belastung mit Schwermetallen . . . . .	118

4.3.5	3D-Raman-Imaging in Wasserorganismen . . . . .	121
4.3.6	Zusammenfassung der MP-Analytik aus limnischen Gewässern	124
4.4	Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen . . . . .	125
4.4.1	Vorversuche . . . . .	125
4.4.2	Blindproben . . . . .	129
4.4.3	Expositionsversuch . . . . .	130
4.4.4	Feldversuch . . . . .	134
4.4.5	Zusammenfassung der MP-Analytik aus limnischen Organismen	136
4.5	Bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe . . . . .	137
4.5.1	Polymersorten . . . . .	137
4.5.2	Pigmentbestandteile . . . . .	139
4.5.3	Schwermetallanalytik . . . . .	140
4.5.4	Zusammenfassung der Analytik von bioabbaubaren, kompos- tierbaren und recycelten Kunststoffen . . . . .	142
4.6	Analyse von Mikroplastik aus Bier . . . . .	143
4.6.1	Synthetische Fasern . . . . .	143
4.6.2	Zusammenfassung der MP-Analytik in Bier . . . . .	146
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>147</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>173</b>
<b>B</b>	<b>Geräte und Materialien</b>	<b>175</b>
B.1	Chemikalien . . . . .	175
B.2	Versuchsorganismen . . . . .	175
B.3	Material . . . . .	176
B.4	Instrumente . . . . .	176
B.5	Software . . . . .	177
<b>C</b>	<b>Symbol- und Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>178</b>



# 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Nach Angaben der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (*engl.*: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) litten 2015 weltweit etwa 795 Millionen Menschen an Hunger, während etwa 1 Milliarde in extremer Armut lebten.[1] Der größte Anteil dieser Menschen ist in ländlichen Gebieten ansässig und daher auf die Erträge aus Landwirtschaft als Ernährungs- und Einkommensgrundlage angewiesen. Gegenwärtige Programme zur Bekämpfung des Welthungers setzen an diesem Punkt an. Durch Investitionen in den Ackerbau und eine Ausbildung der Bevölkerung können Grundlagen für ein nachhaltiges ökonomisches Wachstum gesetzt werden, welches in geringeren Hunger- und Armutsraten resultieren soll. Dürren stellen in vielen Gebieten eine Gefahr für die Versorgung der Bevölkerung dar. Der aus den Dürren resultierende Verlust an landwirtschaftlicher Produktivität führt nicht nur zu Problemen im ökonomischen Bereich, auch soziale Faktoren sind betroffen. So wurde unter anderem ein direkter Einfluss auf die Armutsraten und die Gesundheit beobachtet. Verschiedene Klimaprognosemodelle sagen voraus, dass auf Grund des Klimawandels in den nächsten 40 Jahren vor allem in ariden und teilarden Gebieten ein enormer Anstieg der Schwere und Intensität der Dürren zu erwarten ist, da in diesen Niederschlag in geringerer Häufigkeit mit stärkerer Intensität auftreten wird.[2]

In Hinblick auf die Wahrung der landwirtschaftlichen Produktivität im Zusammenhang mit der Hungerbekämpfung ist es daher von besonderer Bedeutung, die Böden zu modifizieren, so dass sie das Regenwasser besser aufnehmen und während Trockenperioden an die Pflanzen abgeben können. Im Rahmen des Projektes „Securing Agricultural Productivity by Increasing the Soil Water Holding Capacity (SOWAT)“ der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) der Technischen Universität München (TUM) sollte in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bodenkunde (TUM) untersucht werden, wie sich die Wasserrückhaltefähigkeit der Böden durch Zugabe von Holzkohle verändert. Dazu sollte zunächst die Raman-Mikrospektroskopie(RM)-Analyse mit Stabilisotopen kombiniert und optimiert werden. Zusätzlich war eine RM-Analyse von unterschiedlichen physikalischen Fraktionen der organischen Bodensubstanzen geplant. Ziel des Projektes war es, Aussagen über die an der Erhöhung der Wasserrückhaltefähigkeit beteiligten Mechanismen zu treffen und damit eine konstante landwirtschaftliche Produktivität, auch während Dürren, gewährleisten zu können.

Der Zugang zu sauberem Trinkwasser stellt einen weiteren Grundpfeiler für die Bekämpfung von Hunger und Armut dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*engl.*: World Health Organisation, WHO) war dieser Zugang 2014 für mehr als 700 Millionen Menschen nicht vorhanden. Mehr als die Hälfte davon wohnte

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

in den Sub-Sahara-Gebieten. Zusätzlich waren bei etwa einem Drittel der Weltbevölkerung keine hygienischen Sanitärverhältnisse vorhanden, etwa eine Milliarde Menschen trugen ihr Abwasser ohne weitere Aufarbeitung in die Umwelt ein.[3]

Die Vollversammlung der Vereinten Nationen erkannte am 28. Juni 2010 das Recht auf Zugang zu sauberem Trinkwasser als Menschenrecht an, da dieses Recht eine notwendige Grundlage für weitere Menschenrechte wie das Recht auf Leben, Ernährung und medizinische Versorgung darstellt.[4] Zusätzlich zu Investitionen in den Bau von Wasserleitungen, Kanalisationen und Kläranlagen ist ein ständiges Monitoring der Wasserqualität notwendig, um ein sicheres Lebensmittel zu erhalten. So sind beispielsweise in der deutschen Trinkwasserverordnung 49 Grenzwerte für chemische, physikalische und mikrobiologische Parameter genannt, die ständig überwacht werden müssen.[5]

Vor kurzem trat vor allem in den Industrienationen eine neue Kontaminationsquelle in den Fokus des öffentlichen Interesses: Mikroplastik (MP), welches als Kunststofffragmente kleiner als 5 mm definiert ist. MP kann entweder direkt für die Verwendung z.B. in Kosmetika produziert werden (primäres MP) oder durch die Zersetzung von größeren Kunststoffabfällen entstehen (sekundäres MP). Obwohl in der Bevölkerung ein großes Gefährdungspotential durch MP wahrgenommen wird, fehlen bisher verlässliche Studien zum Vorkommen, der Aufnahme und den für Mensch und Tier resultierenden Auswirkungen. Diese sind jedoch notwendig, um sinnvolle Monitoringprogramme, Grenzwerte und weiterführende Gesetzgebungen zu verwirklichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Vorkommen von MP und die Aufnahme in Organismen näher untersucht werden. Da sich die meisten Studien auf marine Systeme beschränken, standen hier Binnengewässer im Fokus. Zunächst sollte im Rahmen des Projekts der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) "Kunststoffpartikel in limnischen Ökosystemen: Vorkommen und Einfluss auf aquatische Organismen" in Kooperation mit der Universität Bayreuth (Prof. Dr. Christian Laforsch, Dr. Hannes Imhof) das MP-Vorkommen im Gardasee (Italien) umfassend mittels RM untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte hierbei auf MP-Partikel kleiner als 50 µm gelegt werden, da diese besonders gefährlich für Wasserorganismen sein können. Weiterhin sollte die Eignung des RM-Imaging zur *in situ*-Analyse von MP in Großen Wasserflöhen (*Daphnia magna*) untersucht werden.

In dem Forschungsvorhaben „Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen von Mikroplastik in Muscheln“ zusammen mit dem Bayerischen Landesamt für Umwelt (LfU) unter Schirmherrschaft des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) sollte die Aufnahme von MP durch Süßwassermuscheln untersucht werden. Dazu sollte zunächst ein geeigneter Aufschluss des Muschelgewebes entwickelt und die Raman-Analytik optimiert werden. Im Anschluss war die

Analyse von Muscheln, welche MP ausgesetzt waren, geplant. Weiterhin sollten auch Muscheln, welche Umweltbedingungen ausgesetzt waren, untersucht werden.

Um Aussagen über mögliche Kunststoffalternativen, welche zur MP-Vermeidung beitragen können, zu treffen, sollten zusätzlich bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe auf ihre Polymerzusammensetzung, die vorhandenen Pigmente sowie den Schwermetallanteil überprüft werden. Weiterhin sollte Bier auf seinen Gehalt an synthetischen Fasern mit besonderem Fokus auf eine verlässliche, reproduzierbare Probenvorbereitung sowie repräsentativen Kontrollen, untersucht werden.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen helfen, die Risiken der MP-Kontaminationen für Mensch und Tier besser einschätzen zu können. Die Aussagen zum Vorkommen, der Aufnahme und den Risiken von MP können in Kombination mit weiteren umfangreichen Studien helfen, einen wissenschaftlich fundierten Beitrag für zukünftige Gesetzgebungen zu liefern.

# 2. Theoretische Grundlagen

## 2.1. Raman-Spektroskopie

### 2.1.1. Raman-Effekt

Trifft ein Photon auf ein Molekül oder einen Festkörper, so ergeben sich grundsätzlich drei Möglichkeiten:[6]

- Der größte Anteil des Lichts durchdringt die Probe oder wird reflektiert.
- Ein geringer Teil der Photonen (ca.  $10^{-4} - 10^{-3}$  bezogen auf das eingestrahlte Licht) wird ohne Änderung der Energie in alle Richtungen gestreut. Dies wird als elastische, Mie- oder Rayleigh-Streuung bezeichnet.
- Ein noch kleinerer Anteil (ca.  $10^{-8} - 10^{-6}$  bezogen auf das eingestrahlte Licht) wird unter Energieübertrag zwischen Probe und Photonen gestreut (sogenannte inelastische Streuung, vgl. Abbildung 2.1). Dabei kann das gestreute Photon entweder Schwingungsenergie von der Probe aufnehmen (Anti-Stokes-Streuung) oder Energie an die Probe abgeben (Stokes-Streuung).

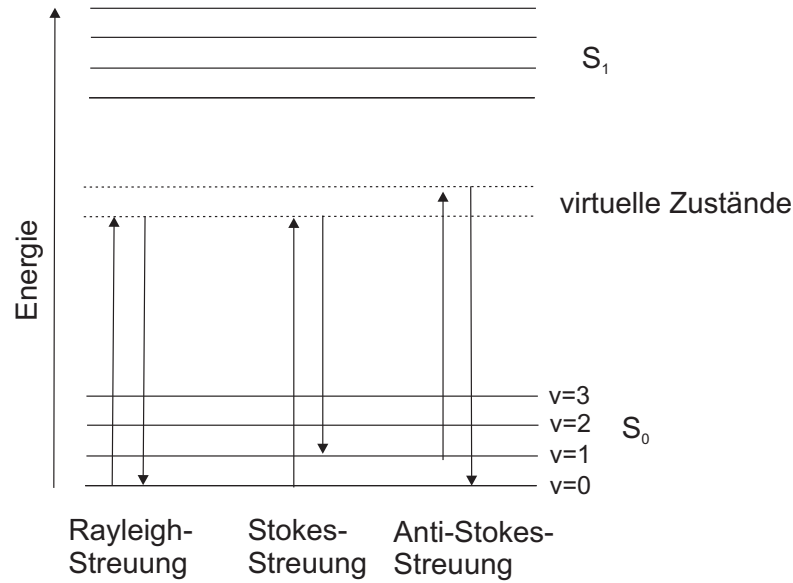
Der Raman-Effekt umfasst sämtliches inelastisch gestreute Licht, also die Stokes- und die Anti-Stokes-Streuung. Er wurde 1923 vom österreichischen Physiker Adolph Smekal erstmals theoretisch vorhergesagt[7] und konnte 1928 vom indischen Physiker Chandrasekhara Raman experimentell nachgewiesen werden.[8] Raman entdeckte, dass Flüssigkeiten, wenn sie von einer Lichtquelle durchschienen werden, zusätzlich zur normalen energiegelichen Streuung (Rayleigh-Streuung) und Fluoreszenz eine oder mehrere weitere Wellenlängen emittieren. Dies konnte er folgerichtig den theoretischen Beschreibungen von Smekal zuordnen.

Nach der klassischen Mechanik kann der Raman-Effekt folgendermaßen erklärt werden.[9–11] Das durch das Licht erzeugte elektrische Feld  $E$  ist eine elektromagnetische Welle in Abhängigkeit der Zeit  $t$

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) . \tag{2.1}$$

Hierin sind  $E_0$  die maximale Schwingungsamplitude des elektrischen Feldes und  $\nu_0$  die Frequenz des Lichts. Wird nun beispielsweise ein zweiatomiges Molekül von diesem Licht bestrahlt, so wird es nach

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \tag{2.2}$$



**Abb. 2.1.:** Schematische Übersicht der unterschiedlichen Streuungsarten.

mit der Polarisationskonstante  $\alpha$  polarisiert. Das Molekül wird hierbei in eine Schwingung mit der Auslenkung  $q$  mit der maximalen Schwingungsamplitude  $q_0$  und der Frequenz  $\nu_m$  versetzt.

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t) \quad (2.3)$$

Für kleine Auslenkungen kann  $\alpha$  in einer Taylorreihe genähert werden.  $\alpha_0$  entspricht dabei der Polarisierbarkeit in der Gleichgewichtslage.

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 + \dots \quad (2.4)$$

Kombiniert man diese Gleichung mit 2.2 und 2.3, so ergibt sich:

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_m t) \\ &= \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{\text{Rayleigh-Streuung}} + \\ &\quad + \underbrace{\frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 E_0 \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_m)t]}_{\text{Stokes-Streuung}} + \underbrace{\frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 E_0 \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_m)t]}_{\text{Anti-Stokes-Streuung}} \quad (2.5) \end{aligned}$$

Der erste Term in dieser Gleichung beschreibt nach der klassischen Mechanik einen oszillierenden Dipol, der Licht mit der Anregungsfrequenz  $\nu_0$  ausstrahlt. Dies entspricht der Rayleigh-Streuung. Die beiden weiteren Terme beschreiben die Stokes- bzw. Anti-Stokes-Streuung, bei denen Licht mit niedriger bzw. höherer Frequenz

## 2. Theoretische Grundlagen

emittiert wird.[9] Schwingungen zeigen eine Stokes- bzw. Anti-Stokes-Streuung, falls gilt

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0. \quad (2.6)$$

Dies ist der Fall, wenn sich die Polarisierbarkeit  $\alpha$  mit der Auslenkung  $q$  der Schwingung ändert. Ein Molekül wird als Raman-aktiv bezeichnet, wenn mindestens eine Normalschwingung Raman-aktiv ist. Die Frequenz der Stokes- und Anti-Stokes-Streuung unterscheidet sich dabei stets um einen festen Betrag  $\nu_m$  von der Frequenz des einstrahlenden Lichts. Dieser Betrag wird nur von den Schwingungszuständen des Moleküls beeinflusst und ist damit unabhängig von der Energie des einstrahlenden Lichts. Im Gegensatz zur Infrarot(IR)-Spektroskopie (wo nur das Licht im IR-Bereich absorbiert werden kann) kann also Licht unterschiedlichster Energien (im UV-, sichtbaren und IR-Bereich) gestreut werden. Aus historischen Gründen wird meist der Energieunterschied in Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben. Wellenzahlen sind als reziproke Wellenlängen definiert und damit proportional zur Energie

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} = \frac{E}{hc} \quad [\text{cm}^{-1}]. \quad (2.7)$$

Zur Veranschaulichung wird in Energiediagrammen oft die Raman-Streuung als Absorption und anschließend erfolgende Emission dargestellt (vgl. Abbildung 2.1). Dies stellt jedoch nur eine grobe Näherung dar. Der Streuprozess unterscheidet sich deutlich von einem Absorptionsprozess.[11] Zum einen resultiert die zusätzliche Energie nicht in der Anregung von Elektronen in einen höheren Energiezustand, sondern aus einer quantenmechanischen Überlagerung aller beteiligten Zustände. Dies hat zur Folge, dass die Raman-Streuung im Gegensatz zur Absorption bei allen Wellenlängen erfolgen kann. Weiterhin ist die Lebensdauer des angeregten Elektrons im Vergleich zur Absorption sehr gering; die Freisetzung der Energie erfolgt nahezu unmittelbar. Der Dipol des wechselwirkenden Lichts ist im Vergleich zum Molekül deutlich größer (sichtbares Licht: 400 - 700 nm, Molekül: ca. 0.5 nm), daher kommt es zu einer Polarisierung und Anregung der Elektronen, es bildet sich ein instabiler „Licht-Molekül-Komplex“ mit einer sehr geringen Lebensdauer. In diesem ist die Geometrie der Elektronen stark verzerrt, die Lage der Kerne bleibt jedoch unverändert, da für diese nicht genügend Zeit vorhanden ist, auf die äußeren Einflüsse zu reagieren. Da keine stabilen elektronischen Zustände vorhanden sind, welche dieser gestörten Anordnung entsprechen, wird der „Licht-Molekül-Komplex“ auch oftmals als virtueller Zustand bezeichnet.

Betrachtet man ein Molekül, welches aus  $N$  Atomen besteht, so besitzt jedes einzelne Atom drei translatorische Freiheitsgrade. Da die Freiheitsgrade bei der Bildung eines Moleküls erhalten bleiben, muss das gesamte Molekül  $3N$  Freiheitsgrade

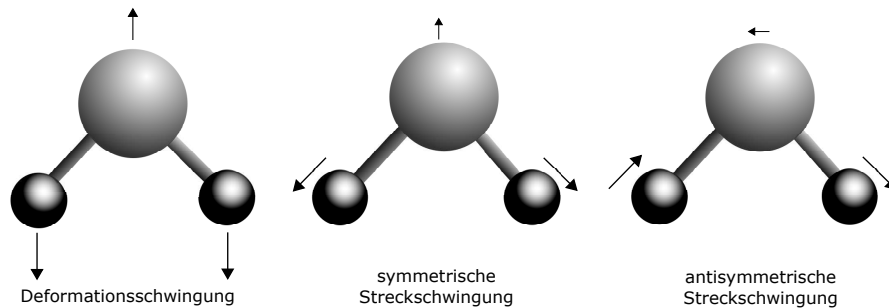


Abb. 2.2.: Normalschwingungen des Wassers.

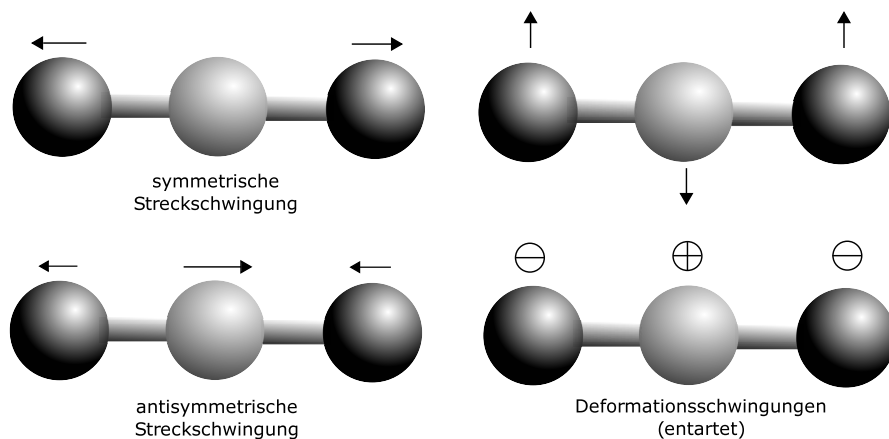


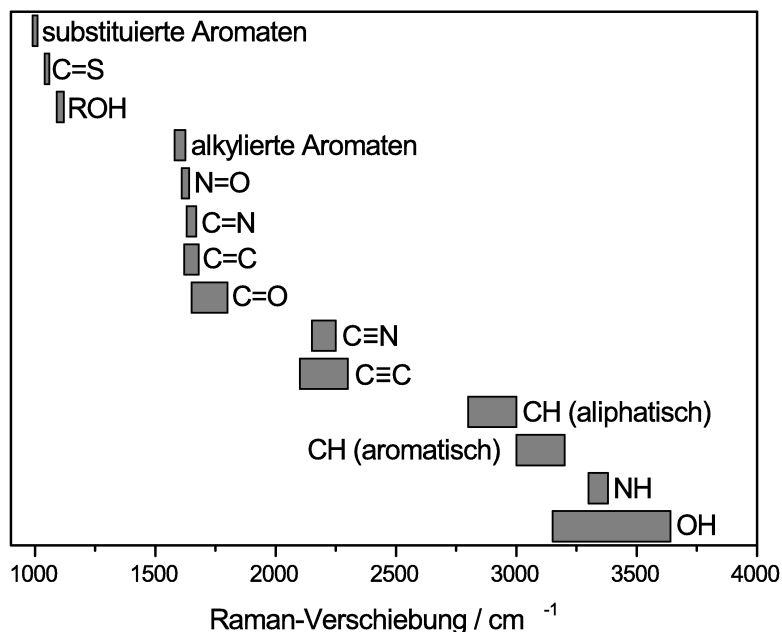
Abb. 2.3.: Normalschwingungen des Kohlenstoffdioxids.

aufweisen. Diese setzen sich aus drei Translationsfreiheitsgraden und (bei nicht linearen Molekülen) drei Rotationsfreiheitsgraden zusammen. Lineare Moleküle hingegen besitzen nur zwei Rotationsfreiheitsgrade, da die Rotation um die Achse nicht beobachtet werden kann. Somit ergeben sich für lineare Moleküle  $3N-5$  und für nicht lineare Moleküle  $3N-6$  Schwingungsfreiheitsgrade.[10, 11] Bei mehratomigen Molekülen werden die Schwingungsfreiheitsgrade im Allgemeinen als zueinander orthogonale Normalschwingungen dargestellt. Betrachtet man beispielsweise Wasser und Kohlenstoffdioxid, so ergeben sich 3 bzw. 4 Normalschwingungen, welche in den Abbildungen 2.2 und 2.3 zu sehen sind. Bei  $\text{CO}_2$  benötigt die Anregung der beiden Deformationsschwingungen die gleiche Energie, es existiert nur eine Bande im Raman-Spektrum. Solche energiegelichen Schwingungen werden als entartet bezeichnet.

Die Normalschwingungen kleinerer Moleküle lassen sich üblicherweise in unterschiedliche Schwingungsarten unterteilen. Diese sind:[11]

- Valenzschwingungen oder Streckschwingungen: Schwingungen in der Bindungsachse; bei mehratomigen Molekülen ( $N \geq 3$ ) existieren symmetrische und antisymmetrische Streckschwingungen.

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.4.:** Schematische Übersicht der Raman-Verschiebungen der häufigsten Schwingungen in organischen Molekülen nach [12].

- Deformationsschwingungen: Schwingungen unter Änderung des Bindungswinkels. Es lassen sich zwei Arten unterscheiden:
  - Beugeschwingungen: innerhalb der Bindungsebene;
  - Kipp- und Drehschwingungen: aus der Bindungsebene heraus.

Bei größeren Molekülen hingegen lassen sich die Normalschwingungen oftmals nicht mehr durch empirische Überlegungen bestimmen, hier müssen theoretische Berechnungen, beispielsweise über die Dichtefunktionaltheorie (DFT), durchgeführt werden. Diese sind jedoch sehr zeitaufwändig und können in der Praxis nicht für alle untersuchten Moleküle angewandt werden. Man betrachtet daher für Interpretationen oftmals die einzelnen funktionellen Gruppen der Moleküle und die typischen Frequenzbereiche, bei denen sie auftreten.[10, 11] In Abbildung 2.4 sind die Schwingungen der am häufigsten in organischen Molekülen auftretenden funktionellen Gruppen dargestellt.

### 2.1.2. Raman-Spektroskopie (RS)

Nach der Entdeckung des Raman-Effekts wurde dieser in vielfacher Weise untersucht und bestätigt.[8, 13] Dennoch blieben die Studien theoretischer Natur und die Zahl der Anwendungen gering. Eine große Herausforderung war zu dieser Zeit die schwache Intensität der Lichtquellen und die damit verbundene extrem lange



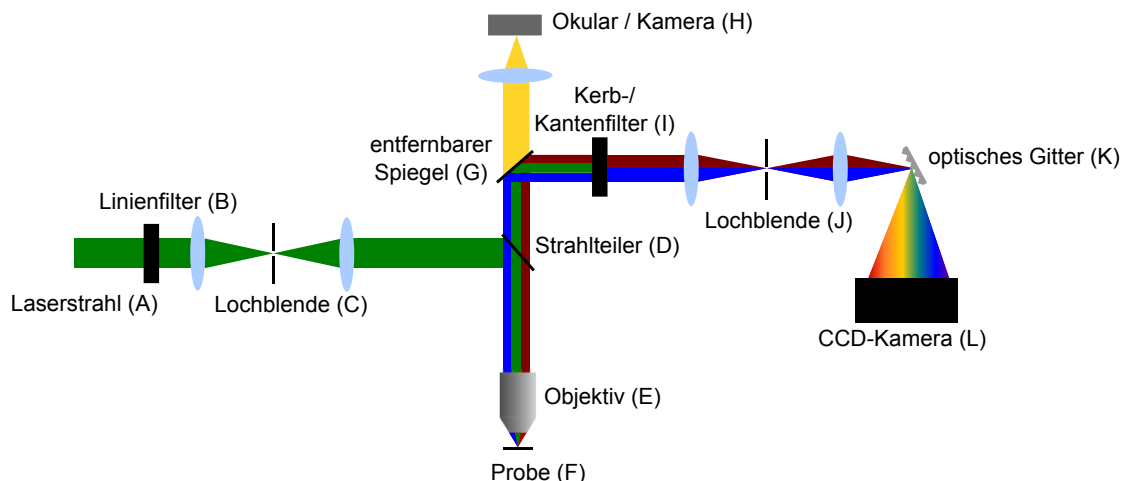
Analysezeit, weshalb die Raman-Spektroskopie (RS) eine geringfügige Rolle in der Analytik spielte. Dies änderte sich mit der Erfindung des ersten Lasers 1962, welcher als ideale Lichtquelle für die Raman-Spektroskopie genutzt werden konnte.[14] Die RS zählt wie die IR-Spektroskopie zu den Schwingungsspektroskopiearten. Durch die für Moleküle, Salze und Feststoffe spezifischen Schwingungen können zahlreiche Informationen über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Stoffe gewonnen werden. Dabei können sowohl feste, flüssige als auch gasförmige Proben kontaktlos und zerstörungsfrei untersucht werden. Beide Spektroskopiearten liefern sogenannte Fingerabdruckspektren (*engl.* fingerprint spectra), welche eine eindeutige Identifizierung der Proben über Vergleichsspektren erlauben. Die IR-Spektroskopie ist dabei weiter verbreitet. In den letzten Jahren findet jedoch die RS auf Grund ihrer Vorteile in zahlreichen Bereichen Anwendung. So lassen sich im Gegensatz zur IR-Spektroskopie wässrige Proben direkt ohne Probenvorbereitung untersuchen, da Wasser nur ein sehr schwacher Raman-Streuer ist. Auch die Verwendung von Glas- oder Quarzküvetten und -trägern stellt für die RS kein Problem dar.[15]

Die Raman-Spektroskopie wird in zahlreichen Anwendungen in unterschiedlichsten Bereichen genutzt.[11] So ist die simultane Identifizierung von Salzen, Mineralien und Materialien (z.B. Si-Wafer) vor allem in der Halbleiterindustrie von Vorteil. In der Archäologie und Kunstgeschichte wird RS verwendet, um über die Identifizierung von Farben und Pigmenten das Alter von Fundstücken zu bestimmen und so zwischen Original und Fälschung unterscheiden zu können. Die Möglichkeit der *in situ* Analyse von wasserhaltigen Proben eröffnet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für biologische und pharmazeutische Proben. RS wird außerdem in der Forensik verwendet, um Proben zerstörungsfrei und kontaktlos untersuchen zu können.

### 2.1.3. Raman-Mikrospektroskopie (RM)

Da für die Raman-Streuung auch Wellenlängen im sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Strahlung verwendet werden können, ist die Kopplung von RS mit einem optischen Mikroskop möglich (sogenannte Raman-Mikrospektroskopie, RM). Ein erster Prototyp wurde nach vorhergehenden Berechnungen von Delhaye und Dhamelincourt um 1975 entwickelt.[16] Obwohl so eine räumlich hochaufgelöste Analyse von Proben in der Theorie möglich wurde, konnte die RM lange Zeit auf Grund der geringen Intensität des Raman-Signals und der fehlenden Sensitivität der damaligen Detektorsysteme nur für wenige Umweltproben angewandt werden. Erst ca. 20 Jahre nach den ersten Raman-Mikroskopen konnte das aus der Fluoreszenz-Spektroskopie bekannte Prinzip der konfokalen Mikroskopie übertragen werden.[17] Die Ursache hierfür war die stark fokussierte Laserstrahlung, welche größtenteils elastisch gestreut wird und auf den Detektor trifft (Rayleigh-Streuung). Um die viel geringere inelastische Streuung zu detektieren, mussten daher Bandenfilter eingesetzt werden, welche erst zu Beginn der 90iger Jahre weit genug entwickelt

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.5.:** Schematischer Aufbau eines (konfokalen) Raman-Mikroskops.

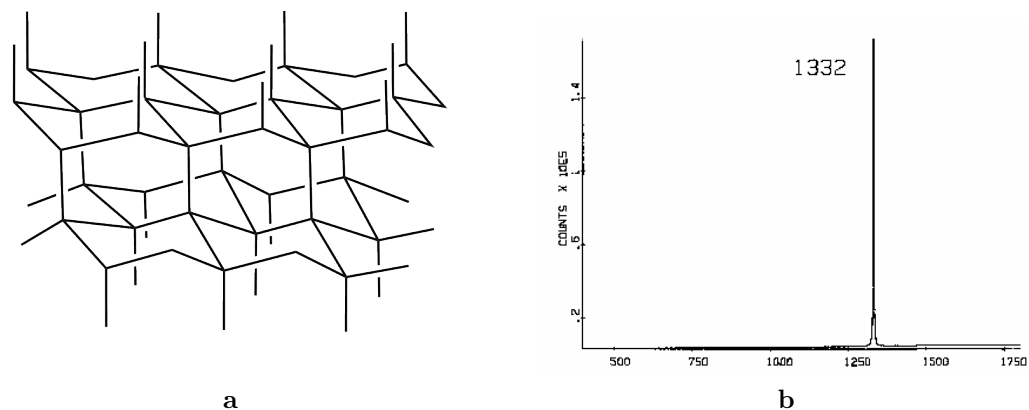
waren.[6] Konfokale Raman-Mikroskope ermöglichen, zusätzlich zur verbesserten lateralen Auflösung und Kontrast, eine hohe axiale Auflösung, welche auch eine tiefenaufgelöste RM erlaubt.

Die laterale Auflösung der RM ist wie bei der optischen Mikroskopie durch die Lichtbeugung begrenzt. Die theoretisch maximale Auflösung  $d$  wird dabei durch das Abbe-Limit wiedergegeben. Dieses lässt sich aus der Wellenlänge  $\lambda$  und der Numerischen Apertur NA des Objektivs berechnen.[18]

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.8)$$

Für eine Wellenlänge von 532 nm und einer Numerischen Apertur von 0.75 liegt beispielsweise die Beugungsgrenze bei 354 nm. In der Praxis liegt die Auflösung etwas unter 1  $\mu\text{m}$ . [6]

Abbildung 2.5 zeigt den typischen Aufbau eines konfokalen Raman-Mikroskops.[6, 10, 11] Der Laser (A) durchstrahlt zunächst einen Linienfilter (B), der nur Licht der gewünschten Wellenlänge passieren lässt und die restliche Strahlung wie beispielsweise Sekundäremissionen und Untergrundstrahlung herausfiltert. Über einen Strahlteiler (D) und ein Objektiv (E) wird das Laserlicht auf die Probe (F) fokussiert. Durch einen entfernbaren Spiegel (G) kann die Probe auch mittels Okular oder Kamera (H) optisch betrachtet werden. Das elastisch und inelastisch gestreute Licht passiert dann das Objektiv in umgekehrter Richtung und wird entweder auf einen Kerb- oder einen Kantenfilter (I) gelenkt. Der Kerbfilter (*engl.*: notch filter) filtert die eingestrahlte Wellenlänge des Lasers aus und lässt sowohl längere als auch kürzere Wellenlängen passieren. Das bedeutet, die elastisch gestreute Rayleigh-Strahlung (hier grün) wird abgefangen, während sowohl Stokes- als auch Anti-Stokes-Strahlung (hier rot und blau) analysiert werden können. Ein Kantenfilter (*engl.*: edge filter) hingegen lässt nur längere Wellenlängen als die eingestreurte



**Abb. 2.6.:** (a) Kubische Diamantstruktur; (b) Raman-Spektrum von Diamant. Modifiziert nach [19].

Strahlung passieren und filtert somit sowohl die Anti-Stokes- als auch die Rayleigh-Streuung heraus. Da Kantenfilter im Gegensatz zu Kerbfilter sehr effizient sind und eine deutlich längere Lebenszeit besitzen, werden diese heutzutage fast ausschließlich verwendet. Kerbfilter sind nur noch in speziellen Anwendungsfällen von Bedeutung. Die Strahlung wird anschließend über ein Beugungsgitter (K), welches die Strahlung nach Wellenlängen aufspaltet, auf einen Multikanal-detektor (L) gelenkt. Hier kommen vor allem CCD (*engl.*: charge-coupled device)-Kameras zur Anwendung, welche die wellenlängenaufgelöste Strahlung detektieren, in ein elektronisches Signal umwandeln und an einen Computer zur Auswertung weitergeben. Bei dem hier gezeigten konfokalen Aufbau befinden sich zusätzlich zwei Lochblenden (C und J) im Strahlengang, die eine axiale Tiefenschärfe bewirken.

#### 2.1.4. RM von Kohlenstoffverbindungen

RM ist eine geeignete Methode um die Struktur von geordneten, kristallinen und amorphen Kohlenstoffverbindungen zu untersuchen. Als Grenzfälle sollen zunächst die Raman-Spektren von Diamant, Graphit und Graphen betrachtet werden, bevor näher auf die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen Kohle, Ruß und Huminsäuren eingegangen wird.

##### Diamant

Diamant ist eine kubische Modifikation des Kohlenstoffs, bei der alle Atome tetraedrisch mit vier Nachbarn eine Bindung eingehen (siehe Abbildung 2.6a). Die Kohlenstoffatome sind vollständig  $sp^3$ -hybridisiert, was zusammen mit der Symmetrie die große Härte des Diamanten in Vergleich zu anderen Materialien erklärt. Auf Grund der hohen Symmetrie besitzen alle Bindungen im Diamant die gleiche

## 2. Theoretische Grundlagen

Orientierung und Stärke, daher kann nur eine einzelne Anregungsfrequenz der Gitterschwingungen (sogenannte Phononen) beobachtet werden. Diese entspricht der  $T_{2g}$ -Symmetrie und ist dreifach entartet. Im Raman-Spektrum findet sich folglich eine scharfe Bande bei  $1332\text{ cm}^{-1}$  (vgl. Abbildung 2.6b).[19]

### Graphit

Graphit besteht aus einzelnen übereinander angeordneten Kohlenstoffschichten (vgl. Graphen). Diese Schichten setzen sich aus annelierten Sechsringen zusammen, in denen alle Kohlenstoffatome  $sp^2$ -hybridisiert sind. Die Schichtstruktur besitzt ein AB-Muster (vgl. Abbildung 2.7). Die Atome der Schicht B befinden sich dabei in den Mittelpunkten der Sechsringe der Schicht A und über jedem zweiten Atom der Schicht A.[20] Die Schichten sind lediglich über Van-der-Waals- und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen aneinander gebunden, wodurch sich die Spaltbarkeit und Verschiebbarkeit der Schichten zueinander erklären lässt. Graphit besitzt im Vergleich zu Diamant eine deutlich verringerte Symmetrie. Die Einheitszelle ist der Flächengruppe  $PG_3/mmc$  ( $= D_{6h}^4$ ) zuzuordnen. Die irreduzible Zerlegung der zugehörigen Punktgruppe  $D_{6h}$  liefert erlaubte Schwingungen folgender Symmetrie[21–23]

$$2B_{2g} + 2E_{2g} + A_{2u} + E_{1u} . \quad (2.9)$$

Von diesen Schwingungen sind die beiden  $E_{2g}$ -Schwingungen Raman-aktiv, die  $A_{2u}$ - und die  $E_{1u}$ -Schwingung IR-aktiv und die beiden  $B_{2g}$ -Schwingungen optisch inaktiv (vgl. Abbildung 2.8). Die beiden Raman-aktiven Schwingungen sind nach theoretischen Berechnungen bei  $47$  und  $1582\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen.[23] Tatsächlich zeigt das Raman-Spektrum von hochreinem Graphit (hochgeordneter pyrolytischer Graphit, *engl.*: highly ordered pyrolytic graphite, HOPG) einen Peak um  $1580\text{ cm}^{-1}$ , welcher meist als G-Bande (graphitische Bande) bezeichnet wird. (Gängige Kerb- und Kantenfilter schneiden bis ca.  $50\text{ cm}^{-1}$  ab, daher lässt sich der Peak bei  $47\text{ cm}^{-1}$  normalerweise nicht erkennen).

Alle weiteren graphitischen Materialien zeigen zusätzlich zur G-Bande noch ein weiteres Signal bei ca.  $1350\text{ cm}^{-1}$ , welches sich aus den vorausgegangenen Überlegungen nicht ableiten lässt. Die Intensität dieses Signals nimmt (für Graphit) mit höherem Anteil an ungeordnetem Kohlenstoff und abnehmender Kristallitgröße zu. Durch kleine Fehlstellen und die Grenzflächen der Graphitkristallite ist eine weitere Schwingung erlaubt. Diese ist der  $A_{1g}$ -Symmetrie zuzuordnen und wird als D-Bande (Defekt-Bande) bezeichnet.[21] Eine Besonderheit der D-Bande ist, dass sie auf Grund der Doppelphononenresonanz dispersiv ist, d.h. die Position und Intensität ändert sich mit der Anregungswellenlänge.[22]

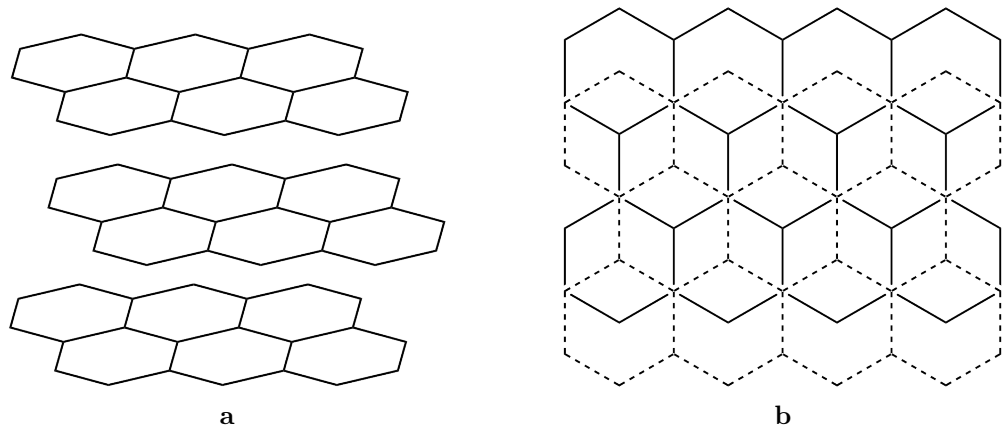


Abb. 2.7.: (a) Struktur des Graphits, (b) Lage der Schichten im Graphit.

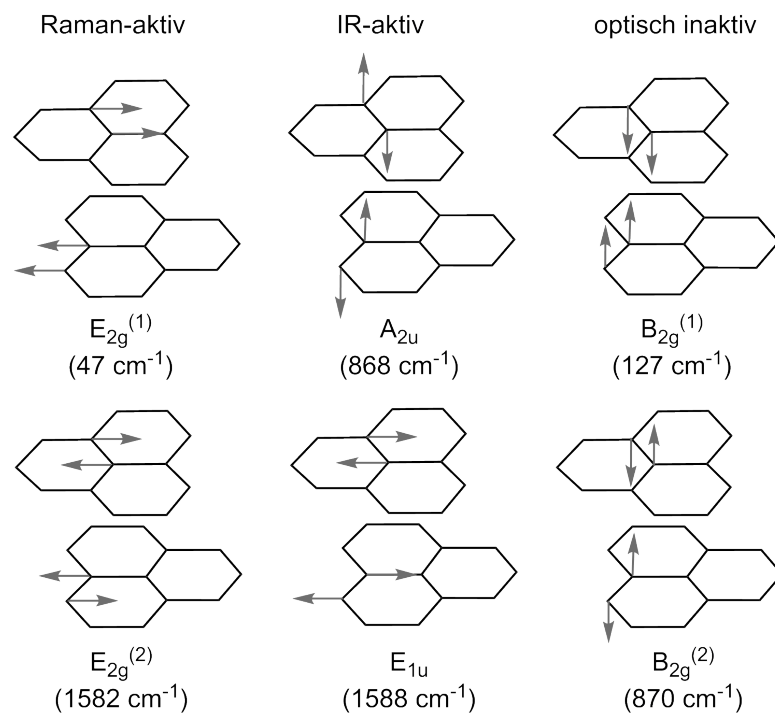
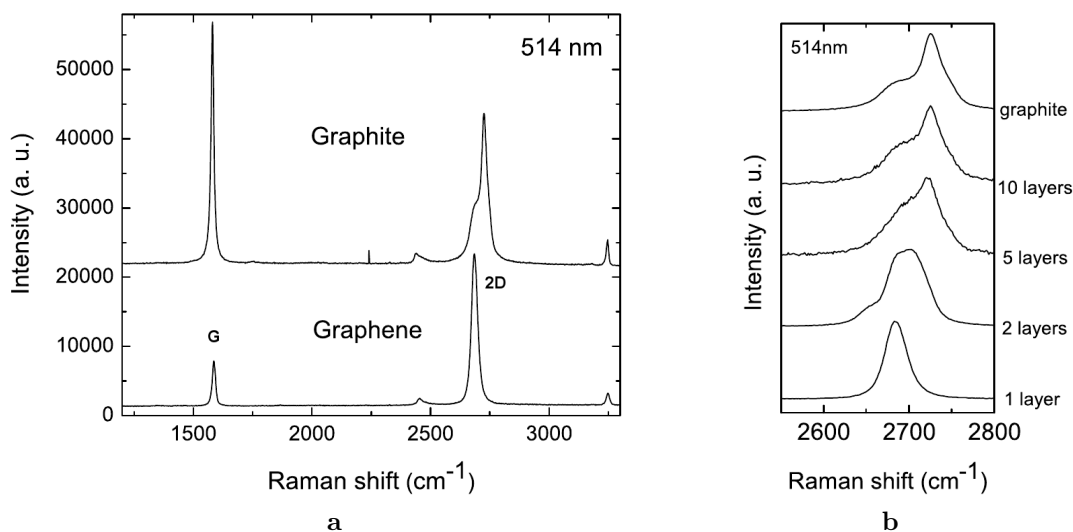


Abb. 2.8.: Erlaubte Schwingungen im Graphitgitter mit zugehörigen Frequenzen in  $\text{cm}^{-1}$ . Nach [23].

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.9.:** (a) Vergleich der Raman-Spektren von Graphen und HOPG (im Bild als Graphite bezeichnet); (b) Dispersion der 2D-Bande in Abhängigkeit der Schichtanzahl. Modifiziert nach [25].

### Graphen

Die einzelnen wabenförmigen Schichten von Graphit werden als Graphen bezeichnet (vgl. Abbildung 2.7a). Lange Zeit wurde Graphen nur in theoretischen Überlegungen verwendet, bis 2004 erstmals die Synthese von isoliertem Graphen gelang.[24] Bereits kurz darauf wurde die RM zur Analytik von Graphenschichten verwendet.[25] Da die RM sowohl Aussagen zu atomaren wie auch elektronischen Eigenschaften liefert, erfreute sie sich innerhalb kürzester Zeit großer Beliebtheit bei der Untersuchung von Graphen.[26, 27] Abbildung 2.9a zeigt den Vergleich zwischen HOPG und einschichtigem Graphen (SLG, *engl.*: single layer graphene). Die zuvor beschriebene G-Bande tritt auch in Graphenspektren auf. Sie ist um einige Wellenzahlen ( $2\text{--}5\text{ cm}^{-1}$ ) blauverschoben, was durch chemische Dotierungseffekte erklärt werden kann.[25] Eine weitere Bande lässt sich bei ca.  $2700\text{ cm}^{-1}$  erkennen, welche bei Graphen deutlich intensiver ausgeprägt ist als im Graphit. Sie ist der erste Oberton (zweite Harmonische) der  $A_{1g}$ -Schwingung. Im Gegensatz zum Grundton (vgl. D-Bande bei Defekten im Graphit) ist die Schwingung des ersten Obertons auch bei hoch geordneten Strukturen erlaubt, da die Impulserhaltung durch den Zweiphotonenprozess sichergestellt ist.[26, 27] Da die 2D-Bande folglich auch in HOPG auftritt, wird sie historisch bedingt auch als G'-Bande bezeichnet. In Graphen ist die 2D-Bande deutlich stärker ausgeprägt als in Graphit, was durch eine Dreiphononenresonanz in SLG erklärt werden kann.[27] Die 2D-Bande verändert sich deutlich mit zunehmender Schichtdicke von Graphen, was deren Bestimmung mittels RM ermöglicht (vgl. Abbildung 2.9b).

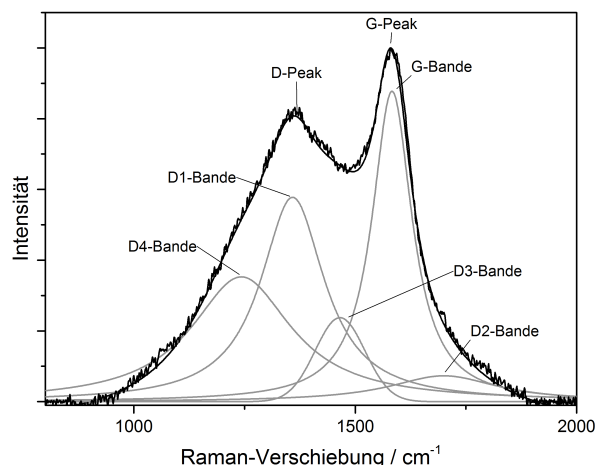
**Tab. 2.1.:** Raman-Banden (erster Ordnung, 514 nm Anregungswellenlänge) von Ruß, ungeordnetem Graphit und hochgeordnetem Graphit (HOPG) (Bandenintensitäten: vs=sehr stark, s=stark, m=mittel, w=schwach); modifiziert nach [28].

Bande	Raman-Verschiebung (cm <sup>-1</sup> )			Ursache der Schwingung
	Ruß	Ungeordneter Graphit	HOPG	
G	1580 (s)	1580 (s)	1580 (s)	Ideales Graphitgitter mit $E_{2g}$ -Symmetrie
D1	1350 (vs)	1350 (m)		Ungeordnetes Graphitgitter (Grenzflächen, Fehlstellen) mit $A_{1g}$ -Symmetrie
D2	1620 (s)	1620 (w)		Ungeordnetes Graphitgitter (Schichten an der Oberfläche)
D3	1500 (m)			amorpher Kohlenstoff
D4	1200 (w)			Ungeordnetes Graphitgitter (Grenzflächen, Fehlstellen) mit $A_{1g}$ -Symmetrie, Polyene und ionische Verunreinigungen

### Ungeordnete und amorphe Kohlenstoffverbindungen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Kohlenstoffverbindungen wie Ruß, Kohle und Huminsäuren handelt es sich größtenteils um ungeordnete und amorphe Substanzen. Die zugehörigen Raman-Spektren lassen sich jedoch generell als Spektren von stark gestörten und ungeordneten Graphitschichten nähern. Die in Raman-Spektren sichtbaren D- und G-Peaks entstehen durch eine Überlagerung von insgesamt 5 Banden, welche als D1-, D2-, D3- und D4- und G-Banden bezeichnet werden.[21, 23, 28–32] In dieser Arbeit werden zum besseren Verständnis die im Spektrum sichtbaren Signale als Peaks bezeichnet, während die aus dem Fit erhaltenen Signale Banden genannt werden. Aus einer Überlagerung von G- und D2-Bande resultiert der G-Peak, während der D-Peak aus der Kombination der D1-Bande mit der D4-Bande besteht. Die D3-Bande wird durch amorphen Kohlenstoff hervorgerufen und liegt im Bereich zwischen D- und G-Peak. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über alle beteiligten Banden und deren Interpretation. Nach Sadezky et al.[28] ist für eine optimale Beschreibung der Spektren eine Regressionsanalyse mit fünf Lorentz- (G, D1, D2, D4) und einer Gauß-förmigen (D3) Banden geeignet. Diese ist in Abbildung 2.10 anhand eines Spektrums von Holzkohle gezeigt.

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.10.:** Fünfbandenfit des Raman-Spektrums einer Holzkohle.

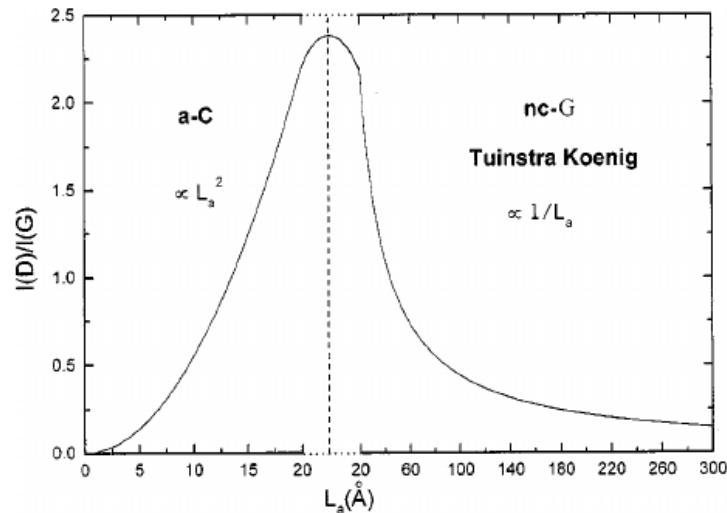
Aus dem Verhältnis der Intensitäten von D- und G-Peak ( $I(D)/I(G)$ ) können Aussagen über die strukturelle Ordnung getroffen werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Intensitäten in ungeordneten und amorphen Strukturen anders verhalten als im Graphit (vgl. Abbildung 2.11). Bei graphitischen Strukturen nimmt die Intensität des D-Peaks bei gleichbleibender Wellenlänge mit abnehmender Clustergröße der Kristallite  $L_a$  zu, da sie vor allem durch aromatische Ringe hervorgerufen wird. Eine weitere Zunahme der Unordnung führt zu immer kleineren und gestörten Clustern, bis diese sich öffnen und nicht mehr vorhanden sind. Die Intensität der G-Bande und damit des G-Peaks hängt jedoch von der Anzahl an  $sp^2$ -hybridisierten Atomen ab und ändert sich ebenfalls mit zunehmender Unordnung, was zu einer Umkehr der Relation bei ungeordneten Strukturen führt. Das Intensitätsverhältnis hängt für kleine Clustergrößen von der Wahrscheinlichkeit ab Sechsringe zu finden, welche mit steigender Ordnung zunimmt.[22] Zusammenfassend lässt sich festhalten:

- Für graphitähnliche Strukturen mit  $L_a \gg 2$  nm nimmt  $I(D)/I(G)$  mit abnehmender Clustergröße zu.
- Für amorphe Strukturen mit  $L_a \ll 2$  nm nimmt  $I(D)/I(G)$  mit abnehmender Clustergröße ab.

### 2.1.5. RM und Fluoreszenz

Eine Wechselwirkung, welche die RM-Analyse von Umweltproben erschwert, ist die Fluoreszenz. Durch das eingestrahelte Laserlicht kann nicht nur die Raman-Streuung, sondern auch Fluoreszenz hervorgerufen werden. Da letztere im Vergleich deutlich höhere Wirkungsgrade besitzt (Fluoreszenz:  $10^{-16}$   $\text{cm}^2/\text{Molekül}$ , Raman-Streuung  $10^{-31} - 10^{-29}$   $\text{cm}^2/\text{Molekül}$ [33]), können die Raman-Signale von einem





**Abb. 2.11.:** Intensitätsverhältnis von D- zu G-Peak ( $I(D)/I(G)$ ) bei unterschiedlichen Clustergrößen  $L_a$ . Aus [22].

breiten Fluoreszenzuntergrund überlagert werden. Da die meisten Umweltproben Fluorophore besitzen, ist die Vermeidung oder Verminderung der Fluoreszenz von großer Bedeutung. Dies kann beispielsweise durch die Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie erfolgen.

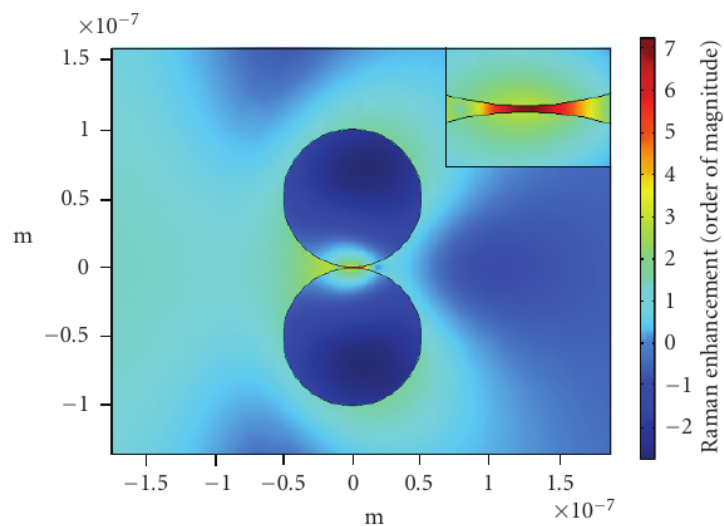
### 2.1.6. Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, liegt ein großer Nachteil der Raman-Spektroskopie in der geringen Nachweisstärke. In der Praxis sind die Raman-Signale oft von einem Fluoreszenzhintergrund überlagert. Daher wurde bereits früh nach einer Methode gesucht, die Raman-Banden zu verstärken und/oder die Fluoreszenz zu verringern. Eine Möglichkeit hierzu ist die Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS, von *engl.*: surface-enhanced Raman Scattering).

Der SERS-Effekt wurde 1974 entdeckt, als Fleischmann et al.[34] eine deutliche Verstärkung der Raman-Signale von Pyridin, das an elektrochemisch aufgerauten Silberelektroden adsorbiert war, beobachteten. Sie schrieben diese Beobachtung zunächst der erhöhten Oberfläche zu. In den darauf folgenden Jahren konnte der Effekt jedoch durch eine Kombination aus elektromagnetischer Verstärkung (EME, von *engl.*: electromagnetic enhancement) mittels Oberflächenplasmonen und chemischer Verstärkung (CE, von *engl.*: chemical enhancement) mittels Ladungstransfereffekten zwischen Analyt und nanostrukturiertem Metall erklärt werden.[35–38]. Besonders Silber und Gold zeigen eine hohe Verstärkung und werden daher als Kolloide, angeraute Platten oder Elektrodenstäbe als SERS-Substrate verwendet.

## Elektromagnetische Verstärkung (EME)

Die EME wird durch die sogenannte Oberflächenplasmonenresonanz hervorgerufen.[37, 38] Strahlt Licht passender Wellenlänge auf ein Metallobjekt (z.B. Nanopartikel) ein, so kommt es zu einer Kopplung der elektromagnetischen Welle des Lichtes mit der Ladungsträgerdichte im Metall. Die hierbei entstehenden Veränderungen der Ladungsdichte werden als Plasmonen bezeichnet. Interagiert das einstrahlende Licht mit der Elektronendichte an der Oberfläche, so spricht man von Oberflächenplasmonen. An einer glatten Oberfläche bilden sich nur parallel zur Oberfläche liegende Plasmonen. Eine Verstärkung tritt jedoch nur auf, wenn die Plasmonen senkrecht zu Oberfläche schwingen. Dies wird durch die Verwendung von rauen Oberflächen und agglomerierten Nanopartikeln erreicht.[11] Abbildung 2.12 zeigt beispielhaft die EME an zwei sich berührenden Silbernanopartikeln.

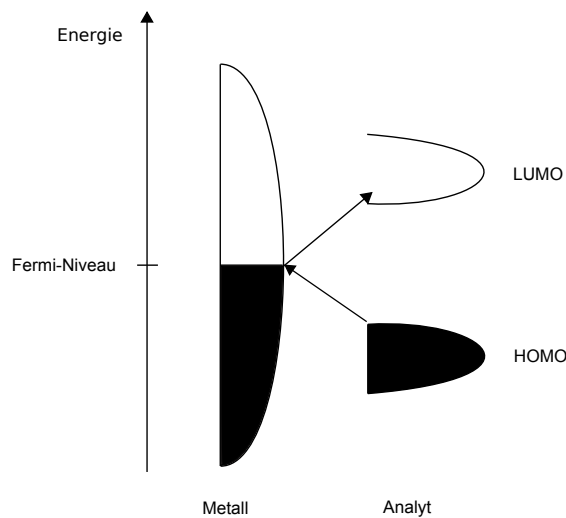


**Abb. 2.12.:** Modellierte EME-SERS-Verstärkungen zwischen zweier Silbernanopartikel mit einem Radius von 50 nm und einem Abstand von 1 nm bei einer Laseranregungswellenlänge von 514 nm. Aus [39].

Die Verstärkung hängt neben der Rauigkeit sehr stark von der Größe der Oberfläche der Metallstrukturen ab. Diese müssen typischerweise deutlich kleiner als die Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes sein, da ansonsten anstatt der dipolaren Plasmonen ineffiziente multipolare Plasmonen höherer Ordnung angeregt werden. Auch zu kleine Metalloberflächenstrukturen führen zu einem Verlust der Verstärkung. Sind diese deutlich kleiner als die adsorbierten Moleküle, kommt es zu Streueffekten an der Oberfläche, die die Ausbildung von Plasmonen verhindern. Der ideale Größenbereich der Metallstrukturen liegt daher bei 10–100 nm.[37]

### Chemische Verstärkung (CE)

Bei manchen Molekülen kann zusätzlich eine chemische Verstärkung (CE) beobachtet werden. Bei der Adsorption der Moleküle an die Metalloberfläche wird das höchste besetzte Orbital des Moleküls (HOMO, *engl.*: highest occupied molecular orbital) mit dem Leitungsband des Metalls interagieren, falls Fermi-Level und HOMO ähnliche Energien besitzen (vgl. Abbildung 2.13). Es kommt zu einer resonanten Verbreiterung vom HOMO und LUMO (niedrigstes nicht besetztes Molekülorbital, *engl.*: lowest unoccupied molecular orbital) und Ladungsübertragungen (*engl.*: charge-transfer) zwischen Metall und Analyt, welche die Polarisierbarkeit des Analyten erhöhen. Dies resultiert wiederum in einer verstärkten Raman-Streuung. Im Gegensatz zu der EME tritt CE nicht bei allen Molekülen auf und führt zu einer geringeren Verstärkung (bis zu  $10^2$ ). [11, 40]

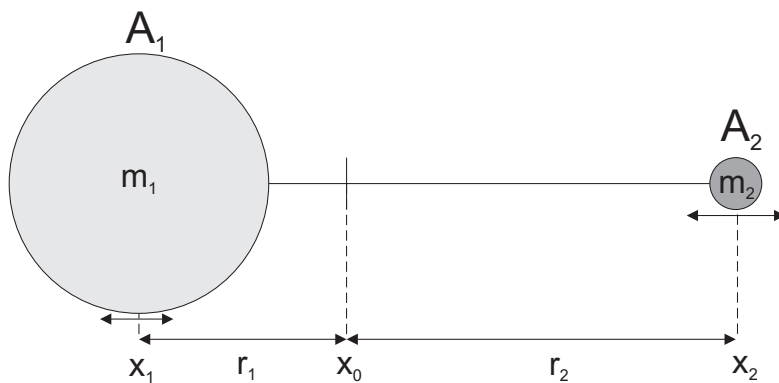


**Abb. 2.13.:** Energieniveau eines an einer Metalloberfläche adsorbierten Moleküls. HOMO und LUMO werden resonant verbreitert. Die Pfeile symbolisieren mögliche Ladungsübertragungen zwischen Metall und Molekül.

### 2.1.7. Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM)

Um den Einfluss von Stabilisotopen auf Raman-Spektren zu verstehen, ist es hilfreich zunächst die Schwingung eines zweiatomigen Moleküls zu betrachten. Hierbei sind die Schwingungszustände  $\nu$  dieses Moleküls von Bedeutung. Diese können zunächst vereinfacht mit dem Federmodell der klassischen Mechanik erklärt werden. [9–11] Ein zweiatomiges Molekül besteht aus zwei Atomen, welche durch eine chemische Bindung miteinander verbunden sind. Die beiden Atome können als Punktmassen genähert werden, die Bindung entspricht einer Feder. Abbildung 2.14 gibt einen Überblick über die verwendeten Bezeichnungen.

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.14.:** Schwingung eines diatomaren Moleküls in der klassischen Mechanik.

$m_1$  und  $m_2$  sind die Massen,  $x_1$  und  $x_2$  die Positionen der beiden Atome  $A_1$  und  $A_2$ ,  $r_1$  und  $r_2$  stellen den Abstand der Atome zum Schwerpunkt des Moleküls  $x_0$  dar. Durch die Näherung der Bindung als Feder kann das Hook'sche Gesetz

$$F = -k(x_1 + x_2) \quad (2.10)$$

angewandt werden. Darin sind  $F$  die Rückstellkraft und  $k$  die Kraftkonstante. Nach Kombination mit dem zweiten Newton'schen Gesetz

$$F = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} \quad (2.11)$$

und Lösen der sich ergebenden Differentialgleichung erhält man für die Auslenkung  $q$  folgenden Zusammenhang

$$q = q_0 \sin \left( \sqrt{\frac{k}{\mu}} t \right) = q_0 \sin(\omega_0 t) = q_0 \sin(2\pi\nu_0 t) . \quad (2.12)$$

$\omega_0$  wird als Eigenkreisfrequenz des Systems bezeichnet, während  $\nu_0$  die Resonanzschwingungsfrequenz wiedergibt. Es gilt

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.13)$$

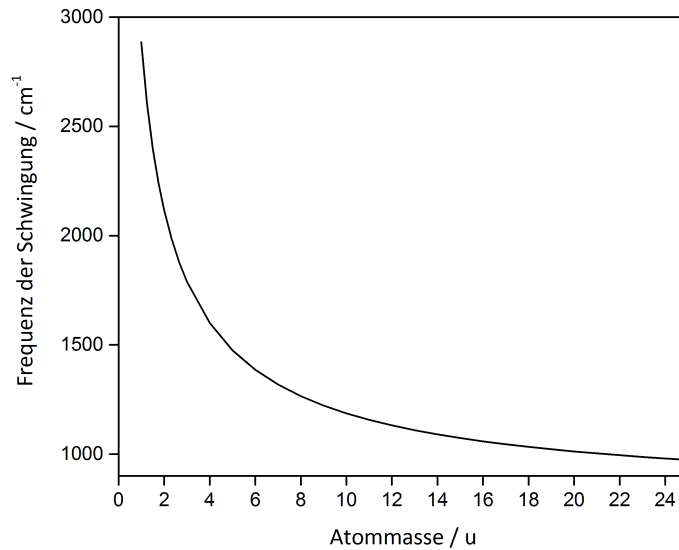
bzw. in Wellenzahlen

$$\tilde{\nu}_0 = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} , \quad (2.14)$$

worin die reduzierte Masse  $\mu$  als

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.15)$$

definiert ist. Unter der Annahme, dass die Bindungskonstante bei unterschiedlichen



**Abb. 2.15.:** Theoretisch berechneter Zusammenhang zwischen Atommasse eines Bindungspartners (zweiter Bindungspartner:  $^{12}\text{C}$ ) und Schwingungsfrequenz bei gleichbleibender Bindungskonstante (hier:  $k = 453 \text{ N/m}$  als typische Bindungskonstante für die CC-Bindung in Ethan[41]).

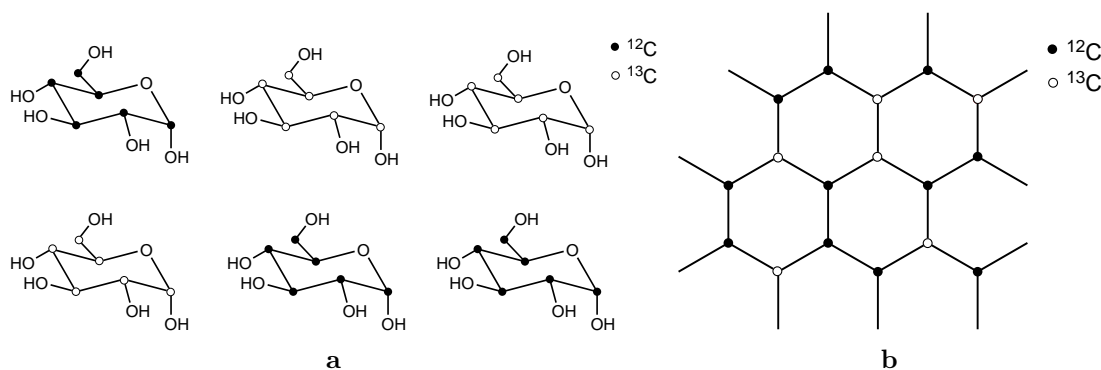
Isotopen konstant bleibt, wird die Schwingungsfrequenz nur von der veränderten reduzierten Masse beeinflusst. Wird in einem Molekül ein Atom mit einem schweren Isotop ausgetauscht (z.B.  $^{12}\text{C}$  mit  $^{13}\text{C}$ ), so ergibt sich eine größere reduzierte Masse, welche zu geringeren Schwingungsfrequenzen führt. Da sich im sichtbaren elektromagnetischen Bereich die rote Strahlung bei niedrigeren Schwingungsfrequenzen (d.h. bei höheren Wellenlängen) befindet, wird dies als Rotverschiebung bezeichnet. Entsprechend bezeichnet eine Blauverschiebung die Verlagerung der Schwingung zu höheren Frequenzen (niedrigeren Wellenlängen). Abbildung 2.15 zeigt den theoretisch berechneten Zusammenhang zwischen Atommasse und Schwingungsfrequenz bei gleichbleibender Bindungskonstante (hier:  $k = 453 \text{ N/m}$ , typische Bindungskonstante der CC-Bindung in Ethan[41]).

Da in dieser Arbeit ausschließlich  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  als Isotope verwendet werden, sollen diese nun näher behandelt werden. Nach Fan et al.[42] gilt für alle Schwingungen der Zusammenhang

$$\tilde{\nu}_{13} = \tilde{\nu}_{12} \sqrt{\frac{m_{12}}{m_{13}}} \approx 0.9608 \tilde{\nu}_{12} , \quad (2.16)$$

wenn der Einfluss des Isotopenaustausches auf die Bindungskonstante vernachlässigt werden kann. Die Indices beziehen sich auf die Masse des Isotops; beispielsweise bezeichnet  $\tilde{\nu}_{13}$  die Frequenz der Schwingung eines Moleküls mit  $^{13}\text{C}$ -Isotop. So ergibt sich aus Gleichung 2.16 für den G-Peak von kohlenstoffhaltigen  $^{12}\text{C}$ -

## 2. Theoretische Grundlagen



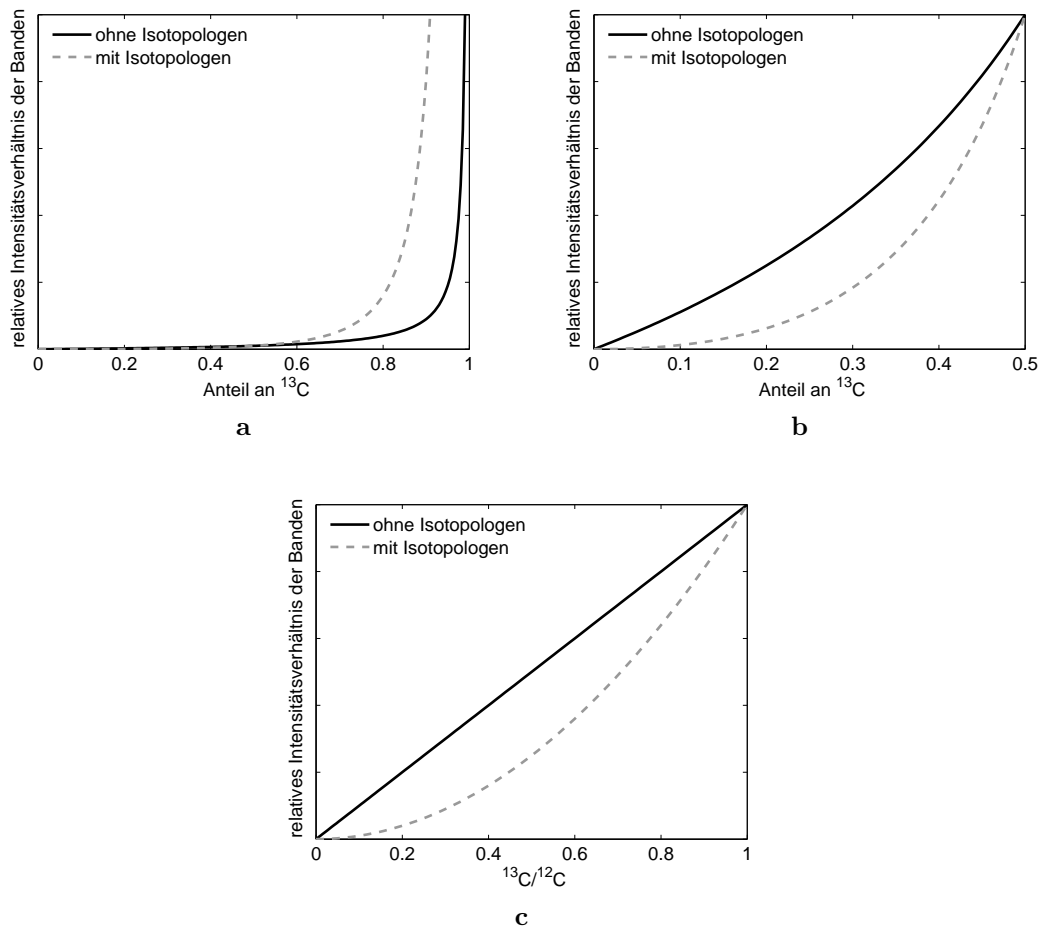
**Abb. 2.16.:** (a) Intermolekulare Isotopenmischung am Beispiel von Glucose; (b) Intramolekulare Isotopenmischung in einer Graphenschicht des Graphits.

Verbindungen bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  eine Rotverschiebung zu  $1518\text{ cm}^{-1}$  bei vollständigem  $^{13}\text{C}$ -Isotopenaustausch aller Kohlenstoffatome.

Für Mischungen der Isotope gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen können sich die Substanzen in der Isotopenzusammensetzung ganzer Moleküle unterscheiden, was im Folgenden als intermolekulare Isotopenmischung bezeichnet wird. Zum anderen können auch Mischungen der Isotope in einem Molekül auftreten, was als intramolekulare Isotopenmischung definiert werden soll. Abbildung 2.17 zeigt Beispiele für beide Arten der Isotopenmischung.

Bei einer intermolekularen Isotopenmischung kommt es zu einer Kombination der Spektren der Isotopenreinsubstanzen. Dabei kann das Verhältnis der Intensität der korrespondierenden Banden genutzt werden, um Aussagen über den Isotopengehalt in der Probe zu treffen.[43, 44] Intramolekulare Isotopenmischungen bestehen hingegen zumeist aus einer Überlagerung der Banden unterschiedlicher Isotopomere. Dies führt bei einem hohen Anteil verschiedener Isotopomere zu einer kontinuierlichen Verschiebung der Bande mit zunehmenden  $^{13}\text{C}$ -Gehalt. Eine Aufspaltung der Banden findet dann nicht mehr statt.

Welche Art der Mischung vorliegt, hängt von einer Vielzahl an Faktoren ab. Besonders bei Substanzen, die (mikro)biologisch synthetisiert werden, spielt der Stoffwechsel eine wichtige Rolle. So konnten Li et al.[45] zeigen, dass es bei der Biosynthese von Phenylalanin und Thymin wesentliche Unterschiede gibt. Sie kultivierten *E.coli* mit unterschiedlichen Mischungen aus  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Glucose und verfütterten diese an Fadenwürmer, die dann mittels RM analysiert wurden. Für Phenylalanin ergab sich je nach Ausgangszusammensetzung eine Überlagerung von insgesamt vier Banden unterschiedlicher Isotopologen, da auf Grund des Stoffwechselprozesses keine weiteren Isotopologe synthetisiert werden. Bei der Synthese von Thymin hingegen sind zahlreiche Stoffwechselprozesse beteiligt, wodurch es zu einer Überlagerung aller 32 möglichen Isotopologen kommt. Da die Auflösung moderner Raman-Mikroskope (bis ca.  $1\text{ cm}^{-1}$ ) nicht ausreicht, um die einzelnen



**Abb. 2.17.:** Theoretisches Intensitätsverhältnis der  $^{13}\text{C}$ - zu  $^{12}\text{C}$ -Bande in Abhängigkeit des Anteils an  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}/C_{\text{ges}}$ ) (a, b) bzw. des Verhältnisses von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (c) anhand einer intermolekularen Isotopenmischung (durchgezogene Linie) und einer intramolekularen Isotopenmischung mit 4 Isotopologen (gestrichelte Linie).

Banden zu unterscheiden, kann nur eine breite Bande beobachtet werden, welche mit zunehmenden  $^{13}\text{C}$ -Gehalt rotverschoben wird.

Der Zusammenhang zwischen Intensitätsverhältnis bzw. Rotverschiebung und  $^{13}\text{C}$ -Gehalt wird davon beeinflusst, um welche Isotopenmischung es sich handelt und gegen welche Größe aufgetragen wird. Bei intermolekularen Isotopenmischungen wird zumeist gegen das Intensitätsverhältnis der korrespondierenden Signale des  $^{13}\text{C}$ - zum  $^{12}\text{C}$ -Molekül aufgetragen.[43, 44, 46] Es besteht ein exponentieller Zusammenhang zum Anteil an  $^{13}\text{C}$  am Gesamtkohlenstoff ( $^{13}\text{C}/C_{\text{ges}}$ ) bzw. ein linearer Zusammenhang zum Verhältnis der Isotopenanzahl von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (vgl. theoretische Berechnungen in Abbildung 2.17). Auch bei intramolekularen Mischungen mit aufgelösten Isotopomerenbanden werden die gleichen Größen gegeneinander aufgetragen. Hier kommt es durch die Bildung der Isotopologen zu einer Beeinflussung

## 2. Theoretische Grundlagen

des Intensitätsverhältnisses. Abbildung 2.17 zeigt das theoretisch berechnete Intensitätsverhältnis für ein Molekül mit vier Isotopologen (gestrichelte Linie). Da jedoch in (mikro)biologischen Systemen eine Vielzahl an Stoffwechselwegen und -produkten bei der Synthese beteiligt sind, kann es zu Isotopeneffekten kommen, wodurch sich der reale und theoretisch berechnete Zusammenhang deutlich unterscheiden können. So fanden beispielsweise Huang et al. einen linearen Zusammenhang zwischen  $^{13}\text{C}$ -Anteil und Intensitätsverhältnis bei der Analyse dreier Bakterienarten, obwohl in den Spektren eine deutliche Isotopologenaufspaltung zu erkennen ist.[46]

Bei intramolekularen Isotopenmischungen, die aus einer Kombination von zahlreichen Isotopologen entstehen und keine Bandenaufspaltung mehr besitzen, ist eine Auftragung des Intensitätsverhältnisses nicht möglich. Hier kann jedoch die Position des Maximums der entsprechenden Bande gegen den Isotopengehalt aufgetragen werden. Da die Häufigkeit der einzelnen Isotopologen mit verändertem Isotopenanteil ( $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ) variiert, kommt es zu einer Verschiebung der Position der Überlagerungsbande. Nach Gleichung (2.16) kann der Endpunkt bei einer vollständigen  $^{13}\text{C}$ -Markierung berechnet werden. Für eine Mischung aus  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  ergibt sich für die Verschiebung  $\tilde{\nu}$  unter der Annahme, dass die Atome willkürlich verteilt sind und die Bindungskonstante sich durch den Isotopenaustausch nicht ändert[42, 45]

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{12} \sqrt{\frac{m_{12}}{n_{12}m_{12} + n_{13}m_{13}}} . \quad (2.17)$$

Hierin sind  $n_{12}$  und  $n_{13}$  die Anteile an  $^{12}\text{C}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -Atomen. Unter Verwendung der Beziehung  $n_{12} + n_{13} = 1$  und Umstellen erhält man

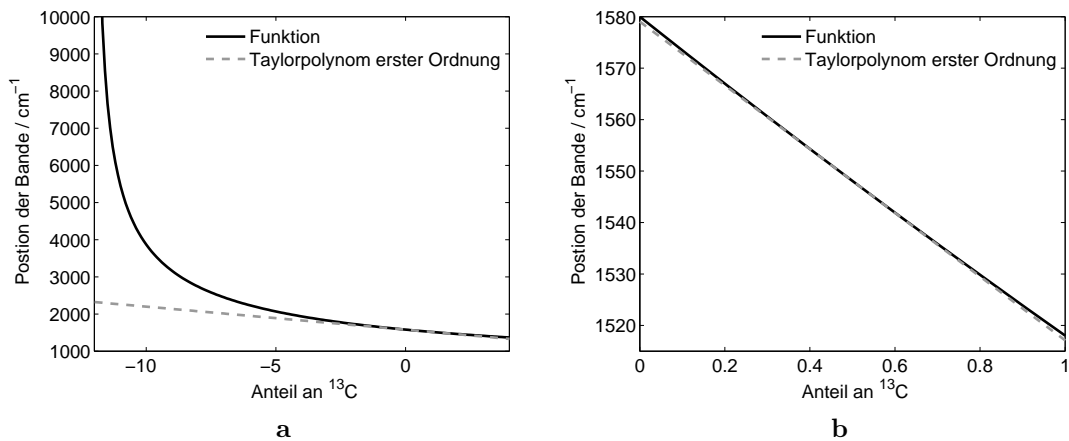
$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{12} \sqrt{\frac{m_{12}}{m_{12} - n_{13}m_{12} + n_{13}m_{13}}} . \quad (2.18)$$

Nach Einsetzen der atomaren Massen für  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  ergibt sich folgende Beziehung:

$$\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{12} \sqrt{\frac{12}{12 + n_{13}}} . \quad (2.19)$$

Die Abhängigkeit der Verschiebung vom  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Anteil wird folglich durch eine Wurzelfunktion beschrieben. In Abbildung 2.18a ist diese Funktion über einen größeren Abszissenbereich am Beispiel des G-Peaks einer Kohlenstoffverbindung bei  $1580 \text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Praktisch relevant ist der Bereich von 0 bis 1. Dieser ist weit genug von der Singularität entfernt, so dass mittels Taylorpolynom erster Ordnung eine ausreichend genaue lineare Näherung erzielt werden kann. Das Taylorpolynom





**Abb. 2.18.:** Abhängigkeit der Rotverschiebung der G-Bande vom Anteil an  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  über einen weiten Bereich (a) und über den relevanten Bereich von  $[0,1]$  (b); Näherung der Funktion mit Taylorreihe erster Ordnung.

erster Ordnung um die Entwicklungsstelle  $a$  ist als

$$T_1 f(x; a) := f(a) + \frac{df(a)}{dx} * (x - a) \quad (2.20)$$

definiert. Für Gleichung 2.19 ergibt sich nach Einsetzen

$$T_1 \tilde{\nu}(n_{13}, a) = \tilde{\nu}_{12} \sqrt{\frac{12}{12+a}} - \tilde{\nu}_{12} \sqrt{3} (12+a)^{-\frac{3}{2}} (x-a) . \quad (2.21)$$

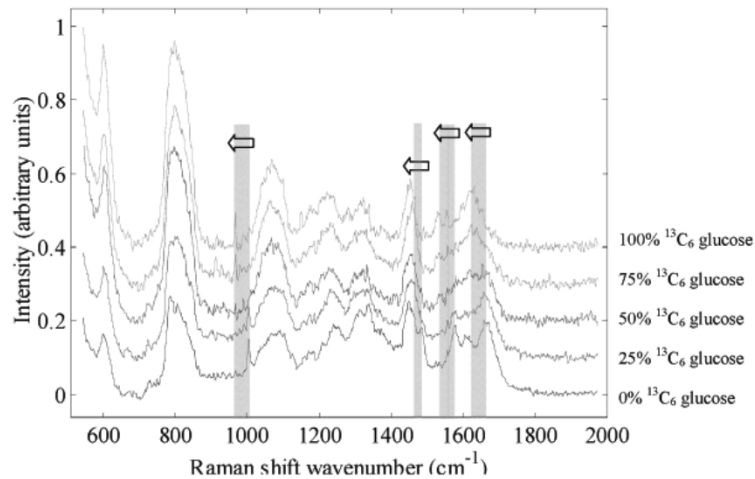
Als Entwicklungspunkt kann 0.5 gewählt werden (vgl. Abbildung 2.18). Für den relevanten Bereich von  $[0,1]$  zeigt die Linearisierung eine sehr gute Übereinstimmung. Es kann also in erster Näherung von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden, welcher bereits in einer Vielzahl an Studien verwendet wurde.[47–49]

Die Raman-Mikrospektroskopie in Kombination mit Stabilisotopen wurde in den letzten Jahren vor allem in zwei Bereichen angewandt. Zum einen wurden die Stabilisotope als Marker bei (mikro)biologischen Stoffwechselfersuchen eingesetzt, zum anderen fanden sie eine breite Anwendung bei der Untersuchung von Graphen.[50]

### Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie an Mikroorganismen

Die Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) wurde erstmals von Huang et al. 2004 an Mikroorganismen angewandt.[43] Die Arbeitsgruppe kultivierte *Pseudomonas fluorescens* in Medien mit unterschiedlichem  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Verhältnis der Kohlenstoffquelle (Glucose). Sie fanden eine starke Rotverschiebung der  $^{13}\text{C}$ -markierten Protein- und Nukleinsäurebanden, welche den größten Teil der Biomasse ausmachten (vgl. Abbildung 2.19). Dieselbe Gruppe untersuchte in weiteren Studien

## 2. Theoretische Grundlagen

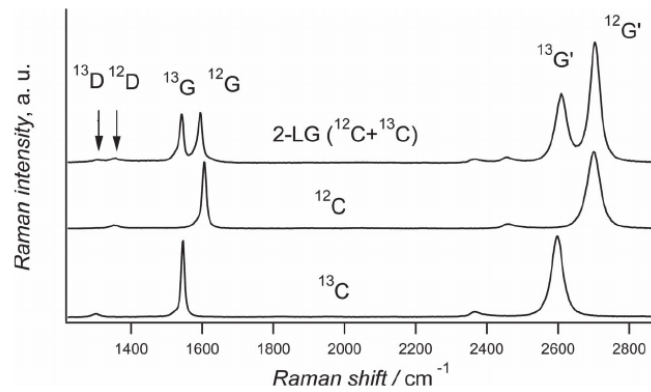


**Abb. 2.19.:** Rotverschiebung der Raman-Banden bei *P. fluorescens* in Abhängigkeit der  $^{13}\text{C}$ -Konzentration im Medium.[43]

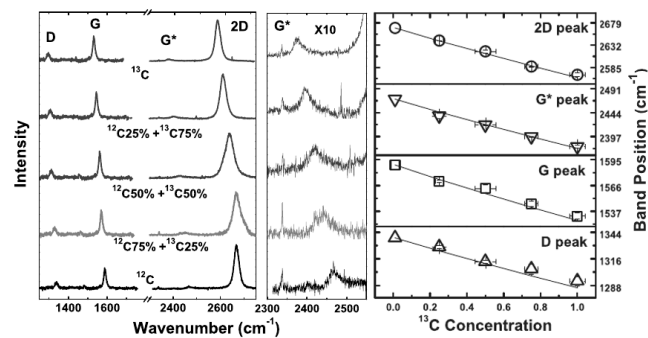
den Zusammenhang zwischen Rotverschiebung und  $^{13}\text{C}$ -Anteil genauer.[46, 47] Sie konnten die bereits erwähnten Zusammenhänge zwischen Intensitätsverhältnis bzw. Rotverschiebung von Raman-Signalen und  $^{13}\text{C}$ -Gehalt erstmals experimentell in Bakterien bestätigen. Seither wurde SIRM in einigen Studien an Mikroorganismen angewandt. [51–53] Kürzlich wurde SIRM mit Resonanz-Raman-Mikrospektroskopie (Resonanz-SIRM)[44, 52] und SERS (SERS-SIRM)[44] kombiniert, wodurch die Analyse von Mikroorganismen deutlich beschleunigt und vereinfacht wurde. Da bei SERS-SIRM die Phenylalaninbande nur in geringem Maße auftritt, muss die Verschiebung anhand einer neuen Bande betrachtet werden. Als geeignet hat sich die Bande um  $730\text{ cm}^{-1}$ , welche von Adenin stammt, erwiesen.[54]

### SIRM an Graphen und Kohlenstoffnanoröhren

SIRM eignet sich hervorragend um grundlegende physikalische, elektrochemische und elektronische Eigenschaften von Graphen zu untersuchen. Zunächst wurden isotopenreine  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -SLG(von engl.: *single layer graphene*)-Schichten miteinander kombiniert (vgl. Abbildung 2.20a).[50, 55] In den SIRM-Spektren lassen sich die einzelnen Schichten eindeutig erkennen. Das Graphen aus beiden Schichten (2-LG, von engl.: *layer graphene*) zeigt erwartungsgemäß die Kombination beider Spektren. Die Strukturen geben Einblick in den Einfluss des Substrats und der Umgebung auf Graphen.[50] So wurde beispielsweise die elektronische Struktur des Graphens unter elektrochemischer Aufladung anhand einer dreischichtigen Sandwichstruktur untersucht.[56] Kalbac et al.[57] konnten mittels der Sandwichstrukturen den unterschiedlichen Temperatureinfluss auf die einzelnen Graphenschichten eines 2-LG zeigen. Zusätzlich zu den isotopenreinen Schichten wurden auch Isotopengemische in einer Schicht untersucht. Zhang et al.[49] konnten einen



a



b

**Abb. 2.20.:** (a) SIRM-Spektren von isotypenreinen  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -SLG-Schichten (unten) und der Kombination beider Schichten (oben). Aus [55]; (b) SIRM-Spektren in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Gehalts in der Probe (links) und linearer Zusammenhang zwischen Rotverschiebung und  $^{13}\text{C}$ -Gehalt für alle Banden. Modifiziert nach [48].

annähernd linearen Zusammenhang zwischen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt in der Probe und der Rotverschiebung des G- und 2D-Peaks beobachten. Diese Ergebnisse wurden kurz darauf für alle Graphenbanden (inkl. 2D- und D-Peak) von Carvalho et al.[48] bestätigt (vgl. Abbildung 2.20b).

Zusätzlich zu Graphen wurden auch ein- und mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (SWNT, *engl.* single wall carbon nanotube; MWNT, *engl.* multi wall carbon nanotube), welche theoretisch durch Aufrollen von Graphen entstehen, mittels SIRM untersucht. Liu et al.[58] führten mit Stabilisotopen Studien zum Wachstum von MWNT durch. In ihrer Veröffentlichung konnten sie zeigen, dass das Wachstum von MWNT direkt vom Katalysator ausgeht und es zu keiner zusätzlichen Abscheidung von Schichten außer- oder innerhalb der Nanoröhren kommt. Rümmeli et al.[59] verwendeten SIRM in der Analyse von markierten SWNTs. Sie bestätigten die Rotverschiebung des G-Peaks in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses. SWNT mit unterschiedlichen  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnissen wurden weiterhin genutzt, um lebende Zellen zu markieren und mittels Raman-Imaging zu unterscheiden.[60] Obwohl SIRM

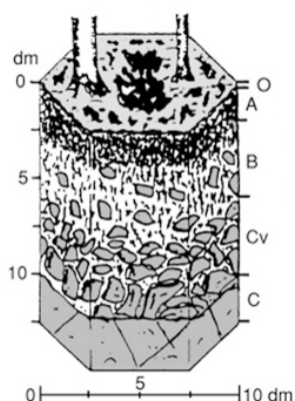
## 2. Theoretische Grundlagen

in der Analyse von Mikroorganismen, Graphen und Kohlenstoffnanoröhren eine zunehmende Bedeutung spielt, wurden bisher keine SIRM-Studien zur Untersuchung von ungeordneten und amorphen Kohlenstoffverbindungen durchgeführt.

## 2.2. Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens

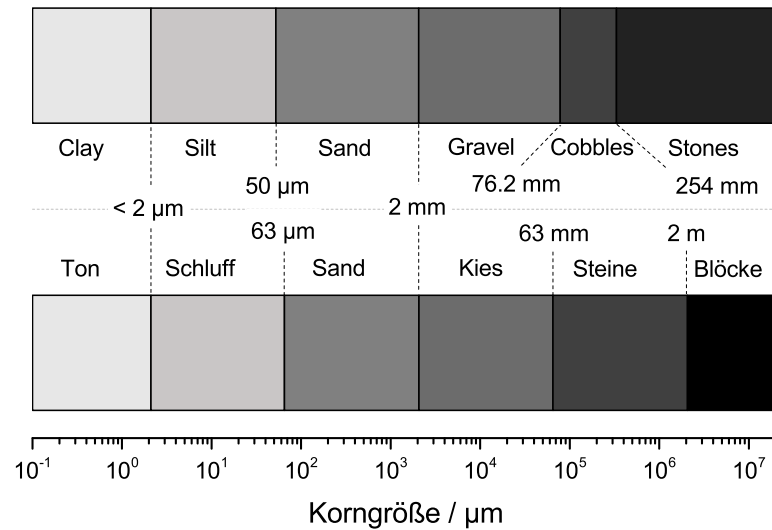
### 2.2.1. Aufbau des Bodens

Als Boden werden die obersten Bereiche der Erdkruste bezeichnet, welche in der Bodenkunde meist einige Dezimeter umfassen. Böden besitzen eine komplexe Zusammensetzung und stellen die Grundlage des pflanzlichen als auch des tierischen Lebens dar. Pflanzen können im Boden wurzeln und im Rahmen der Photosynthese unter Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus Kohlenstoffdioxid Biomasse und Sauerstoff herstellen und dienen dann wiederum anderen Lebewesen als Nahrungsgrundlage. Durch das Absterben der Pflanzen bzw. aus Ausscheidungen von Tieren werden über Zersetzungs- und Transformationsmechanismen die enthaltenen Nährstoffe im Boden erneut in den Stoffkreislauf übertragen. Die Böden liefern somit einen wichtigen Beitrag im Kreislauf der  $\text{CO}_2$ -Freisetzung und -Fixierung.[61]



**Abb. 2.21.:** Schematischer Aufbau des Bodenprofils mit typischen Tiefenangaben (links) und O-, A-, B-, Cv- und C-Horizont (rechts). Modifiziert nach [61].

Böden bestehen aus einer Mischung von Mineralstoffen unterschiedlichster Arten und Größen sowie organischen Substanzen, welche als Humus bezeichnet werden. Diese beiden Stoffklassen bilden zusammen ein Hohlräumssystem mit Poren, das Bodengefüge. In diesem wird die Bodenlösung, eine Lösung unterschiedlichster Stoffe in Wasser gespeichert. Der Aufbau des Bodens lässt sich dabei generell in unterschiedliche Schichten, den Horizonten, unterteilen. Abbildung 2.21 zeigt den schematischen Aufbau eines Bodenprofils. Die oberste Schicht setzt sich aus den organischen Lagen, welche einen Anteil an organischen Stoffen (OM, *engl.:*



**Abb. 2.22.:** Korngrößenfraktionen und deren Bezeichnung nach amerikanischer (oben) und deutscher (unten) Skala. Daten entnommen aus [61].

organic matter) von mindestens 30 Gew.-% besitzen, zusammen. Diese bestehen aus dem Torf-Horizont (H, *engl.*: histic), welcher mindestens seit 30 Tagen nass ist, dem Streuhorizont (L, *engl.*: litter) mit über 90% unzersetztem Ausgangssubstrat und/oder dem organischen Horizont (O, *engl.*: organic). Darunter befinden sich humusreiche Mineralschichten, die A-Horizonte. Die organischen Lagen und die A-Horizonte bilden zusammen den Oberboden. In den darunterliegenden B-Horizonten ist nur noch wenig OM vorhanden. Hauptsächlich findet hier die Mineralumwandlung statt. Den Abschluss bilden die C-Horizonte, welche aus lockerem und festem Stein bestehen.[61]

Die Einteilung der Bodenbestandteile auf Grund ihrer Größe erfolgt dabei in festgelegten Skalen. Die Korngrößenfraktionen werden über den Äquivalentdurchmesser, der z.B. über den Maschenabstand in Sieben festgelegt ist, eingeteilt. Die dabei verwendeten Skalen und Bezeichnungen unterscheiden sich stark im deutschsprachigen und amerikanischen Raum (vgl. Abbildung 2.22). In der deutschen Skala sind die einzelnen Fraktionen im logarithmischen Maßstab äquidistant, woraus sich Grenzen bei 2 µm, 63 µm, 2 mm, 63 mm und 2 m ergeben. Die amerikanische Skala verwendet hingegen willkürlich festgelegte Grenzen (2 µm, 50 µm, 2 mm, 76.2 mm und 254 mm) durch die sich unterschiedlich große Bereiche ergeben. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird, falls nicht anders angegeben, die deutsche Skala verwendet.

### 2.2.2. Organische Bodensubstanz (SOM)

Die organische Bodensubstanz oder Humus (SOM, von *engl.*: soil organic matter), welche sich aus wenig umgewandelten Streustoffen und stark umgewandelten Huminstoffen (HSt), zusammensetzt, umfasst nur einen geringen Prozentsatz des Bodens und befindet sich hauptsächlich im Oberboden. Dennoch spielt sie eine entscheidende Rolle im Kohlenstoffkreislauf. Der in der Photosynthese gebundene Kohlenstoff aus  $\text{CO}_2$  wird in den Boden transportiert und nach Umwandlungsprozessen dort über mehrere Jahrzehnte gespeichert, bevor er wieder durch Mineralisierungsprozesse als  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird. Schätzungen besagen, dass ca. 80% des terrestrischen organischen Kohlenstoffs in Böden gespeichert sind, während die Vegetation nur für die restlichen 20% aufkommt. Der SOM-Gehalt einzelner Böden variiert stark und hängt vor allem von Klima, Vegetation, Grundwasserstand, Durchwurzelungstiefe, Bodenart und Jahreszeit ab.[61] Trotz des relativ geringen Anteils der SOM am Boden, werden viele Eigenschaften des Bodens durch den Gehalt an Huminstoffen bestimmt.[61–63] Durch die hohe Kationenaustauschkapazität der Huminstoffe besitzen die Böden ein gutes Absorptionsvermögen gegenüber wichtiger Nährstoffe, die oftmals als Kationen vorliegen. Auch organische und anorganische Schadstoffe können durch die Huminstoffe gebunden werden, wodurch deren Bioverfügbarkeit verringert wird. Es kommt zu einer Verhinderung schädlicher Wirkungen auf Organismen und einen verzögerten Eintritt in tiefere Bodenschichten bzw. in das Grundwasser. Dieses Verhalten kann vor allem für Schwermetalle beobachtet werden. Eine weitere wichtige Funktion der SOM ist die Ausbildung eines stabilen Bodengefüges. Durch die Bildung von Mikro- und Makroaggregaten kommt es zur Auflockerung und Porenbildung in den Böden. Dies spielt auch eine wichtige Rolle für die Wasserrückhaltefähigkeit von Böden (vgl. Kapitel 2.2.3). Durch die höhere Wärmekapazität der Huminstoffe kann zusätzlich die Wärmeeinstrahlung im Frühjahr besser genutzt werden, wodurch die Vegetationszeiten verlängert werden können.

Die Umwandlung des organischen Materials in Huminstoffe wird als Zersetzung bzw. Humifizierung bezeichnet. Unter Mineralisierung hingegen versteht man den vollständigen Abbau zu anorganischen Stoffen (hauptsächlich  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ ). Während des Abbaus und der Humifizierung des organischen Materials finden eine Vielzahl an Prozessen statt.[61–65] Die organischen Ausgangssubstanzen bestehen zum einen aus Pflanzenresten (Primärressourcen) wie abgestorbenen Blättern, Zweigen, Nadeln und Wurzeln, zum anderen aus toten Bodentieren und Mikroorganismen (Sekundärressourcen). In agrarwirtschaftlich genutzten Böden kommen zusätzlich noch Düngungs- und Abfallbeseitigungsprodukte wie Gülle, Kompost und Klärschlamm hinzu. Das organische Material aus Pflanzen setzt sich zu großen Teilen aus Cellulose und Proteinen (Blätter, Zweige, Feinwurzeln) bzw. Cellulose, Hemicellulose und Lignin (verholztes Gewebe) zusammen. Die mikrobiellen Reste bestehen

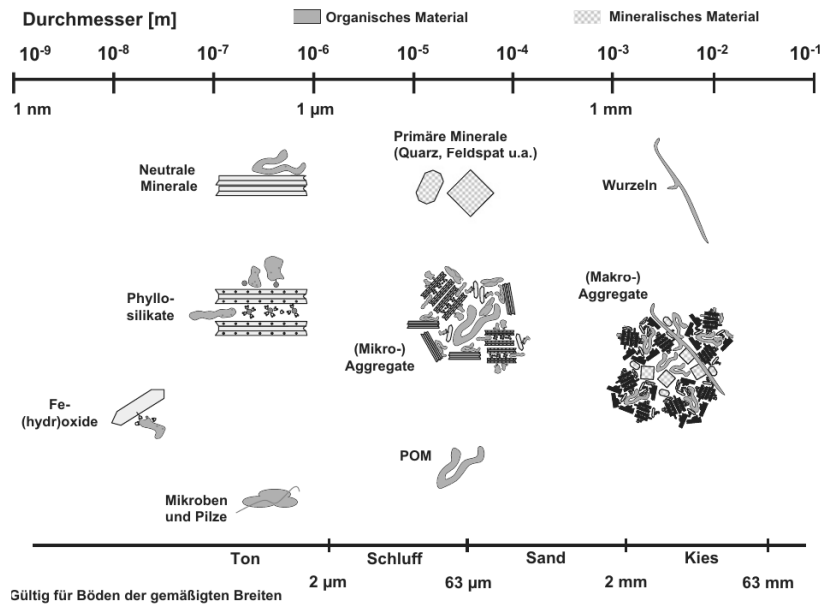
aus Peptidoglykanen, Lipiden und Liposacchariden (Bakterien) bzw. Proteinen, Chitin, Cellulose und Polysacchariden (Pilze). Diese Stoffe besitzen eine variierende Stabilität im Boden. Zuerst werden Zucker, Stärke und Proteine zersetzt, darauf folgt Cellulose, während Lignin, Wachse und Harze eine hohe Langzeitstabilität besitzen. Der erste Prozess, der hierbei abläuft, ist die Seneszenz. Hier werden die Stoffe durch Enzyme von den Organismen in verwertbare Stoffe umgewandelt. Es findet vor allem die Hydrolyse von Stärke und Proteinen statt. In den darauf folgenden Prozessen werden weitere Substanzen von den Mikroorganismen zersetzt. Dabei sammeln sich einige schwer abbaubare Substanzen im Boden an. Diese sind vor allem Substanzen mit hohem Aromatengehalt wie Lignin und Pilzmelanine, welche nicht als direkte Kohlenstoffquelle für Organismen dienen können. Sie werden zusammen mit anderen Abbauprodukten von den Mikroorganismen in Huminstoffe überführt. Durch die Bindung der Huminstoffe mit feinkörnigen Mineralen der Schluff- und Tonfraktion werden diese gegenüber eines weiteren Abbaus stabilisiert. Diese organomineralischen Verbindungen werden dabei je nach Beschaffenheit von Huminstoff und Mineral sowie des pH-Wertes durch Kationenaustausch, elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Weiterhin kann auch eine Komplexbildung mit Metallkationen stattfinden.

Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung ist die Trennung der abbaubaren Stoffe von den abbauenden Enzymen. Dies kann durch eine Aggregatausbildung erfolgen. Die nur teilweise abgebauten Pflanzenreste können im Inneren der Aggregate eingeschlossen und so dem weiteren Abbau entzogen werden. Die Aggregatbildung ist dabei ein komplexer Vorgang, der auf vielen Ebenen stattfindet.[61, 64, 65] Mikroaggregate bilden sich aus Zusammenschlüssen von Tonmineralien mit einer Größe von 20 µm und organischem Material (v.a. Polysacchariden) und besitzen eine Größe von 20 – 250 µm. Mikroaggregate sind sehr stabile Zusammenschlüsse und können mehrere Jahrzehnte im Boden verbleiben. Durch Interaktion mit Wurzeln, Pilzhypnen oder anderen Pflanzenteilen können sich aus den Mikroaggregaten Makroaggregate mit einer Größe von >250 µm bilden. Da die organische Substanz hier leichter angegriffen werden kann, sind Makroaggregate nur wenige Jahre stabil, bevor sie wieder in die Mikroaggregate zerfallen. Abbildung 2.23 zeigt ein Schema der Größenverteilung der Aggregate und Minerale im Boden.

### 2.2.3. Wasserrückhaltefähigkeit

Einige zur Beschreibung der Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens wichtige Größen sind die Feldkapazität (FC, von *engl.*: field capacity), der Permanente Welkepunkt (PWP, von *engl.*: permanent wilting point) und die Nutzbare Wasserkapazität (AWC von *engl.*: available water capacity). Die Feldkapazität bezeichnet die Wassermenge, die ein Boden nach einem Regenfall mehrere Tage gegen die Schwerkraft halten

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.23.:** Schema der Assoziation organischer Substanzen in Böden gemäßiger Breiten. Aus [61].

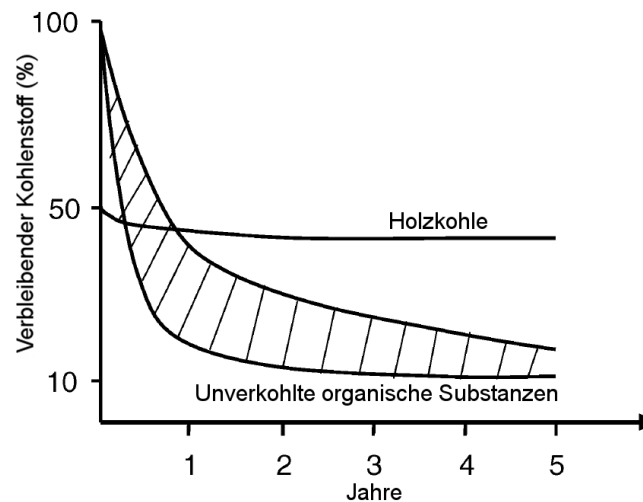
kann. Der Permanente Welkepunkt ist die Wassermenge im Boden, bei der nur noch Poren mit einem Durchmesser  $<0.2\ \mu\text{m}$  mit Wasser gefüllt sind. Die Saugspannung der meisten Pflanzen reicht dann nicht mehr aus, um dem Boden Wasser zu entziehen. Sie verwelken irreversibel. Die Differenz zwischen FC und PWP wird als Nutzbare Wasserkapazität bezeichnet. Sie ist eine geeignete Größe, um die Wasserrückhaltefähigkeit verschiedener Böden anzugeben. In der Praxis werden sowohl FC, als auch PWP, mit dem  $pF$ -Wert beschrieben. Dieser ist als dekadischer Logarithmus des Betrags der Bodenwasserspannung  $\psi_m$  in Hektopascal definiert.

$$pF = \log |\psi_m [hPa]| \quad (2.22)$$

Der  $pF$ -Wert der FC kann je nach Bodenbeschaffenheit von 1.5 – 2.5 variieren. Der PWP liegt bei einem  $pF$ -Wert von 4.2.[61, 66]

Obwohl es eine Vielzahl an Studien zum Zusammenhang zwischen AWC und SOM-Gehalt gibt, variieren die Ergebnisse stark. Dies liegt vor allem an den unterschiedlichen verwendeten Methoden zur Bestimmung von FC, AWC, SOM und PWP sowie der fehlenden Standardisierung. Generell lässt sich ein positiver Zusammenhang zwischen AWC und SOM vor allem bei mittel- und grobkörnigen Böden beobachten. Bei geringen  $pF$ -Werten, wie sie z.B. an der FC herrschen, sorgt eine Erhöhung der SOM für eine erhöhte Aggregatstabilität, wodurch sich mehrere kleine Poren ausbilden. Bei hohen  $pF$ -Werten wie am PWP sind diese Poren zum größten Teil entleert und mit Luft gefüllt. Der Wassergehalt des Bodens hängt in diesem Fall hauptsächlich von der Partikeloberfläche und der Benetzungsdicke des Wassers ab. Durch Erhöhung des SOM-Gehalts steigt die Aggregatstabilität





**Abb. 2.24.:** Verbleibender Kohlenstoffanteil im Boden bei Holzkohle und unverkohnten organischen Substanzen in Abhängigkeit der Zeit. Übersetzt aus [70].

stärker als die Oberfläche. Daher wird mit zunehmenden SOM-Gehalt die FC stärker erhöht als der PWP, wodurch auch die AWC ansteigt.[67, 68]

Bei feinen, tonhaltigen Böden ist der Zusammenhang hingegen deutlich abgeschwächt. Mit zunehmendem Tongehalt wird eine immer größere Menge an SOM benötigt, um eine gleichbleibende Aggregatausbildung zu gewährleisten, da sich Tonpartikel in Abwesenheit von SOM sehr gut in Wasser dispergieren lassen. In stark erodierten Böden ist daher der Tonanteil von stärke- rer Bedeutung für die AWC als die SOM.[67, 69]

Der Zersetzungsgrad des organischen Materials vor der Zugabe spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle für die Steigerung der AWC. Leicht abbaubare Stoffe, wie beispielsweise Gründünger, führen zu einem schnellen Anstieg der mikrobiellen Population. Da sich diese nach Verbrauch des organischen Materials jedoch schnell zersetzen, sind sämtliche Einflüsse auf die Bodenstruktur nur von zeitlich begrenzter Wirkung. Wird bereits zersetztes Material auf den Boden ausgebracht, so wird das organische Material vor allem im Humus gespeichert, wodurch langfristige Effekte auf den Boden zu erwarten sind. So ergeben Schätzungen, dass auch 100 Jahre nach Zufuhr von Holzkohle noch über 40% des gesamten Kohlenstoffs im Boden enthalten sind, während der Kohlenstoff aus unverkohnten organischen Substanzen sehr schnell wieder freigesetzt wird (siehe Abbildung 2.24).[68, 70] Das Ausbringen von Holzkohle auf verschiedene Böden zeigt im Allgemeinen eine deutliche Verbesserung der Ernte, jedoch variieren die einzelnen Studien hinsichtlich der gewählten und untersuchten Parameter stark und die Ergebnisse weichen voneinander ab.[71]

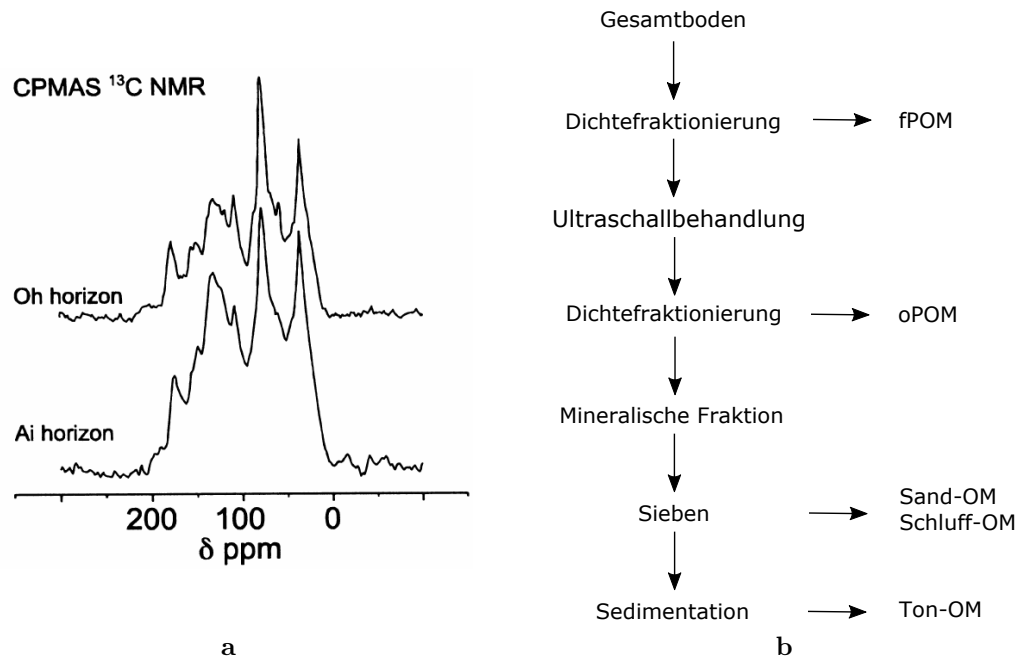
**Tab. 2.2.:** Einteilung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren nach funktionellen Gruppen in Abhängigkeit der chemischen Verschiebung. Nach [73].

Funktionelle Gruppen	Chemische Verschiebung	Substanzen
Alkyl	0 – 50 ppm	$\text{CH}_2$ , und $\text{CH}_3$ in aliphatischen Alkanen, Fettsäuren, Wachsen
O-Alkyl	50 – 110 ppm	Methoxylgruppen in Lignin, Alkylamingruppen, Kohlenhydrate, Cellulose
Aromaten	110 – 160 ppm	Phenyl- und Phenolgruppen
Carbonyle	160 – 200 ppm	Carbonyl- und Carboxylgruppen, Amide, Ester

### 2.2.4. Analytische Methoden zur Charakterisierung von SOM

Die Feststoff- $^{13}\text{C}$ -Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie ist eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Charakterisierung der Struktur und Zusammensetzung von SOM. Um in Feststoffen bei einer natürlichen Abundanz von  $^{13}\text{C}$  aussagekräftige Spektren zu erhalten, wird zumeist die CPMAS (*engl.*: cross polarization magic angle spinning, übersetzt in etwa: Kreuzpolarisation mit Rotation im magischem Winkel)-NMR-Spektroskopie verwendet. Ein weiterer Vorteil zu anderen NMR-Techniken ist, dass hier eine Charakterisierung der SOM ohne vorherige Extraktion aus dem Boden, welche oft unvollständig ist, ermöglicht wird.[72] Zur Interpretation werden die Spektren in vier ppm-Bereiche mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen aufgeteilt, welche den Anteil der entsprechenden funktionellen Gruppen wiedergeben.[73] Die einzelnen Bereiche sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie von unterschiedlichen Gesamtbodenproben variieren nur geringfügig in der Zusammensetzung der einzelnen spektralen Bereiche. Sie setzen sich zusammen aus 45% O-Alkyl-C, 25% Alkyl-C, 20% aromatischem C und 10% Carbonyl-C.[73, 74] Dies kann dadurch erklärt werden, dass hauptsächlich Oberböden untersucht werden, bei denen große Mengen an Pflanzenresten mit relativ konstanter Zusammensetzung die Spektren dominieren.[74]. Abbildung 2.25a zeigt beispielhaft typische CPMAS-NMR-Spektren zweier Böden. Die Anwendung physikalischer Fraktionierungsmethoden zur Abtrennung der einzelnen Fraktionen, die unterschiedliche Stadien der Zersetzung mit variierenden Umsatzzeiten wiedergeben, ermöglicht deren Analyse mittels CPMAS-NMR. Dadurch können Informationen über die SOM-Eigenschaften und deren Zusammensetzung gewonnen werden. Es gibt eine Vielzahl an Methoden zur physikalischen Fraktionierung, eine davon ist in Abbildung 2.25b schematisch dargestellt. Folgende Fraktionen werden erhalten:[74–76]

**fPOM** Partikuläres organischen Material (POM), welches ungebunden im Boden vorliegt (*engl.*: free POM)



**Abb. 2.25.:** (a)  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-NMR-Spektren des O-Horizonts eines Waldbodens und des A-Horizonts eines Minenbodens; modifiziert nach [74]; (b) Schema einer physikalischen Fraktionierung nach [74, 76].

**oPOM** POM, welches gebunden in organomineralischen Komplexen vorliegt (*engl.*: occluded POM).

**Mineralfraktion** Mineralische Fraktion des Bodens, nachdem sämtliches POM entfernt wurde.

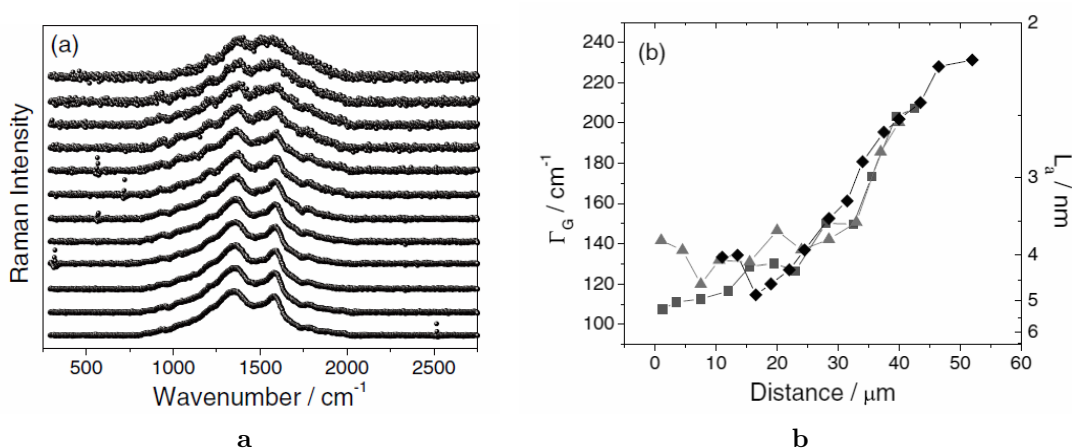
Eine weitere relativ neue Methode in der Bodenkunde, welche zunächst vor allem in den Materialwissenschaften, der Geologie und Biologie angewandt wurde, ist Nano-SIMS (Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie, von *engl.*: Nano-sized secondary ion mass spectrometry). Zur Analyse werden Primärionen (meist  $\text{O}^-$  oder  $\text{Cs}^+$ ) im Hochvakuum auf die Probe fokussiert. Sie dringen etwa 1 bis 10 nm in die Probe ein und schlagen dabei Atome und einfache Molekülbruchstücke heraus. Ein geringer Anteil davon ist geladen (sog. Sekundärionen) und kann zur Massenanalyse über eine Ionenoptik in ein Massenspektrometer gelenkt werden. Durch Verwendung einer speziellen konfokalen Ionenlinse können theoretisch laterale Auflösungen von 150 nm ( $\text{O}^-$ ) bzw. 50 nm ( $\text{Cs}^+$ ) erreicht werden. Da die meisten Elemente in der Praxis jedoch eine sehr schlechte Ionenausbeute besitzen, ist bei einer ausreichenden Sensitivität mit einer Auflösung von ca. 200 nm zu rechnen. Die Wahl der Primärionen bestimmt die Sekundärionen, die analysiert werden können. Durch den Aufbau der Ionenlinse können nur Sekundärionen mit entgegengesetzter Ladung zu den Primärionen extrahiert werden. Die am häufigsten untersuchten Ionen sind  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  und  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$  (für  $\text{Cs}^+$ ) bzw.  $^{23}\text{Na}^+$ ,  $^{28}\text{Si}^+$  und  $^{39}\text{K}^+$  (für

## 2. Theoretische Grundlagen

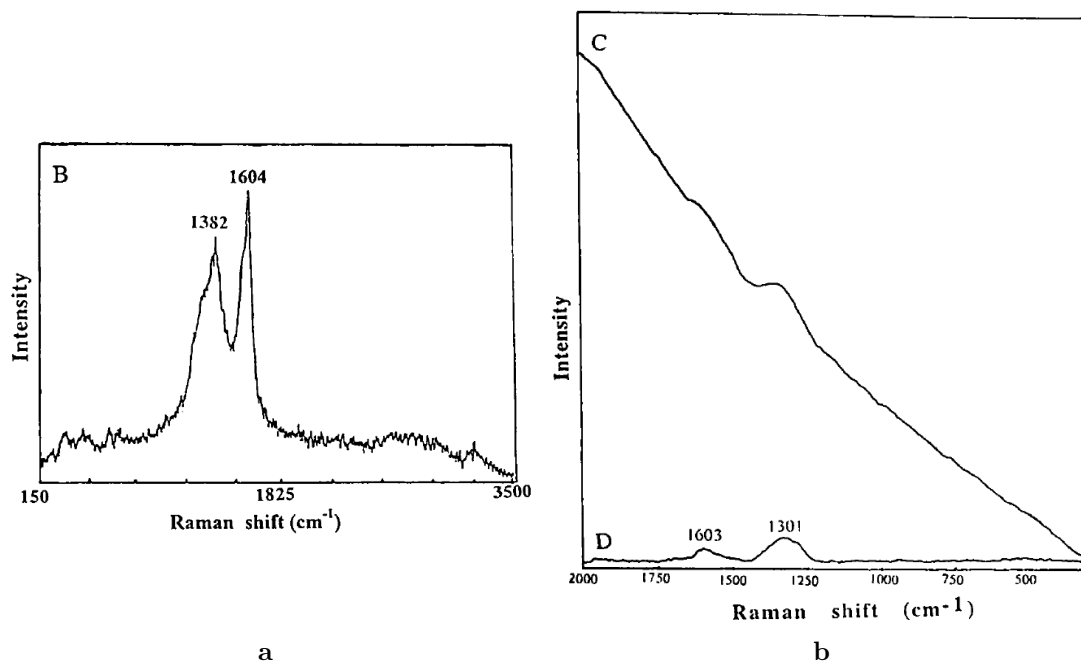
O<sup>-</sup>). [77–79] Um Proben mittels NanoSIMS analysieren zu können, müssen diese relativ flach (je nach Probe maximal 2 – 30 µm Unterschied), stabil im Hochvakuum und leitend sein. Da die meisten Bodenproben keine ausreichende Leitfähigkeit besitzen, werden sie zur Analyse mit Gold bedampft.

### 2.2.5. RS- und RM-Analysen von SOM

Die Grundlagen zu RS, RM und SERS finden sich in Kapitel 2.1. Die Raman-Spektroskopie (RS) und -Mikrospektroskopie (RM), vor allem auch in Kombination mit der Oberflächen-verstärkten Raman-Streuung (SERS) wurden bisher in einigen Studien zur Analyse von Holzkohle oder SOM angewandt. Yamauchi und Kurimoto [81] untersuchten mittels Fourier-transformierter RS bei verschiedenen Maximaltemperaturen pyrolysierte Kohle aus Zedernholz und -wurzeln. Sie konnten einen eindeutigen Zusammenhang verschiedener Raman-Parameter ( $I(D)/I(G)$ -Verhältnis, Verschiebung des D-Peaks, Mittelwertsbreiten der D/G-Peaks) und der Temperatur feststellen. Ribeiro-Soares et al. [80] analysierten mittels RM verschiedene kohlehaltige Verbindungen aus der Terra preta de indio (*aus dem Portugiesischen: schwarze Erde der Indianer*), ein im Amazonasbecken vorkommender Boden mit einem hohen Anteil an anthropogen erzeugter Holz- und Pflanzenkohle (70% höher als bei benachbarten Böden). Die Autoren konnten zeigen, dass bei den Kohlenstoffverbindungen aus den Böden das  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Verhältnis sowie die Kristallitgröße  $L_a$  im Grenzbereich zwischen nanographitischem und amorphen Kohlenstoff liegen. Sie schlossen daraus, dass dieser Bereich den besten Kompromiss zwischen Stabilität und Reaktivität darstellt. Eine Unterscheidung der aus dem Boden stammenden



**Abb. 2.26.:** (a) Raman-Spektren an unterschiedlichen Positionen eines isolierten, aufgeschnittenen Kohlestücks aus der Terra preta de indio vom Kern (unten) bis zur Oberfläche (oben); (b) Halbwertsbreite des G-Peaks ( $\Gamma_G$ ) bzw. Kristallitgröße ( $L_a$ ) in Abhängigkeit zum Abstand vom Partikelkern für drei verschiedene Messungen. Aus [80].



**Abb. 2.27.:** (a) SERS-Spektrum einer Huminsäure; (b) FT-RS-Spektrum der gleichen Huminsäure (C) mit Basislinienkorrektur (D). Aus [85].

Kohlestücke von im Labor frisch erzeugter Kohle ist ebenfalls möglich. Bildgebende Verfahren mittels Raman-Mapping zeigten, dass die Oberfläche eines Kohlestückes deutlich ungeordneter und reaktiver als der Kern ist (vgl. Abbildung 2.26). Francioso et. al untersuchten mittels FT-RS Boden, dem über 22 Jahre verschiedene organische Substanzen zugegeben wurden. In einer Probe mit Rindermistzugabe zeigten die Raman-Spektren im Vergleich zur Kontrollprobe eine deutlich komplexere Zusammensetzung der SOM.[82] In zwei relativ neuen Studien wurde unter anderem RS zur Bestimmung des SOM-Gehalts in verschiedenen Böden verwendet. Da die Spektren jedoch von einer starken Fluoreszenz überlagert werden, ist die von den Autoren verwendete Basislinienkorrektur fraglich und die Ergebnisse und Interpretationen anzweifelbar.[83, 84]

Auch für die Untersuchung von Huminstoffen wie Huminsäuren (HS) und Fulvinsäuren (FA, von *engl.*: fulvic acids) wurde RS angewandt. Auf Grund der starken Fluoreszenz von HS, finden sich vor allem Studien, bei denen FT-Raman-Spektrometer angewandt wurden, um einen hohen Untergrund zu vermeiden.[85, 86] Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von HS stellt SERS dar. So wurden HS getrocknet und mit Silberelektroden, Silberinseln[87] bzw. Silberkolloiden in Lösung erfolgreich analysiert.[88, 89] In Abbildung 2.27 sind ein typisches FT-RS- und SERS-Spektrum einer HA dargestellt. Allerdings wurde hier nicht weiter auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eingegangen, welche jedoch eine große Herausforderung bei SERS-Analysen darstellt.

## 2. Theoretische Grundlagen

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Wasserrückhaltefähigkeit der Böden durch Zugabe von Holzkohle verändert. Dazu sollte zunächst die Raman-Mikrospektroskopie mit Stabilisotopen kombiniert und optimiert werden. Zusätzlich war eine RM-Analyse von unterschiedlichen physikalischen Fraktionen der organischen Bodensubstanzen geplant.

### 2.3. Mikroplastik

#### 2.3.1. Entstehung und Definition

Kunststoff (umgangssprachlich auch Plastik) bezeichnet einen „vollsynthetisch oder durch Umwandlung von Naturprodukten hergestellte[n] Werkstoff, der in vielen verschiedenen Arten und für die verschiedensten Zwecke gebraucht wird“.[90] Generell werden darunter hochmolekulare organische Verbindungen verstanden, die durch die Polymerisierung von Monomeren erzeugt werden. Durch ihre hervorragenden Eigenschaften wie hohe Beständigkeit, Formbarkeit und Vielfältigkeit bei geringen Kosten haben Kunststoffe sich seit Mitte des letzten Jahrhunderts als gängige Werkstoffe in den verschiedensten Bereichen wie z.B. der Medizintechnik, der Elektro-, Auto- und Sportindustrie etabliert. Dies resultierte in einer gesteigerten weltweiten Produktion bis auf zuletzt 311 Mt in 2014.[91] Der größte Anteil der Kunststoffproduktion setzt sich aus sieben Sorten zusammen: Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS), Polyurethan (PU), Polyamid (PA) und Polyester (PES), wie Polyethylenterephthalat (PET) oder Polycarbonat (PC) werden am häufigsten verwendet.[92] Von der Gesamtmenge der erzeugten Kunststoffe werden nur 69.2% nach der Benutzung wiederverwendet (davon 29.7% durch Recycling und 39.5% in der Energieerzeugung), während die restlichen 30.8% oftmals achtlos entsorgt werden.[91] Dieser Teil der Kunststoffe kann dann in die Umwelt eingetragen werden und sich auf Grund seiner Langlebigkeit sowohl in Meeren [92–95] als auch in Flüssen und Seen [96, 97] ansammeln.

Aus dem Kunststoffmüll können durch mechanische und (mikro)biologische Beanspruchung, vor allem durch UV-Strahlung, kleine Plastikfragmente entstehen. Diese werden im Allgemeinen als „Mikroplastik (MP)“ bezeichnet. Obwohl MP in den letzten Jahren durch eine Vielzahl an Studien in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen öffentlichen Interesses trat, fehlt eine allgemein gültige Definition. Zumeist wird eine Obergrenze der Partikelgröße von 5 mm verwendet, in den unterschiedlichsten Studien fanden aber auch 10 mm[98], 2 mm[99], und 1 mm[100] Anwendung. Die untere Grenze weist noch stärkere Variationen auf. Sie hängt von der verwendeten Probennahme, Probenaufbereitung und analytischen Methode ab. Die unterschiedlichen Grenzen schränken die Vergleichbarkeit der Studien ein (vgl. Kapitel 2.3.3).

Es kann zwischen primärem und sekundärem MP unterschieden werden. Primäres MP bezeichnet Partikel, welche direkt von der Industrie als Inhaltsstoffe eingesetzt werden. Sie finden beispielsweise in Kosmetik- oder Reinigungsprodukten Anwendung. Auch Plastikpellets, welche als Rohstoffe für die Herstellung vieler Produkte verwendet werden, werden dem primären MP zugerechnet. Unter sekundärem MP versteht man hingegen Partikel, welche durch Zersetzung größerer Plastikfragmente entstehen. Ob Textilfasern, welche in großer Zahl beim Waschen (>1900 Fasern pro Waschgang[100]) freigesetzt werden, dem primären oder sekundärem MP zugeordnet werden sollen, ist umstritten. Die meisten Studien bezeichnen jedoch Fasern als sekundäres MP.[96, 101, 102]

### 2.3.2. Analytische Methoden

#### Probennahme und Probenaufbereitung

Um MP identifizieren und quantifizieren zu können, müssen Probennahme und -aufbereitung mit anschließender qualitativer und quantitativer Analyse durchgeführt werden. Die Auswahl einer geeigneten Methode zur Probennahme hängt dabei stark von der Matrix ab. Im Allgemeinen kann zwischen selektiver, direkter, und volumenreduzierter Analyse unterschieden werden.[101] Unter selektiver Probennahme versteht man das Aussortieren von genauer zu untersuchenden Partikeln. Dies setzt eine Probe mit einer hohen Konzentration an MP sowie große, einfach von der Matrix unterscheidbare Partikel voraus. Die direkte Probennahme bezeichnet die Untersuchung der Partikel in der Matrix ohne weitere Probenabtrennung, welche vor allem bei Sedimentproben verwendet werden kann. Wird das Volumen der Probe beispielsweise durch Sieben oder Filtrieren verringert, so handelt es sich um eine volumenreduzierende Probennahme, welche sowohl für Wasser- als auch Sedimentproben angewandt werden kann. Häufig wird die selektive Methode mit optischer Identifizierung kombiniert, während direkte und volumenreduzierte Probennahmen weitere Probenaufbereitung benötigen, bevor eine Identifizierung durchgeführt werden kann.

In den letzten Jahren haben sich zwei Methoden zur Probennahme von MP in aquatischen Systemen etabliert. Zum einen kann die Beprobung des Sediments erfolgen, zum anderen werden Proben direkt aus Gewässern entnommen. Da es bei der Sedimentbeprobung keine standardisierten Verfahren gibt, variieren die einzelnen Parameter stark. Beispielsweise werden unterschiedliche Uferzonen zur Probennahme verwendet. Diese reichen von der supralitoral (Spritzwasserzone, über Hochwasser) über die eulitorale (Brandungszone, Gezeitenzone, auf Höhe der Wellen) bis zur sublitoralen Zone (unter Niedrigwasser). Auch die Tiefe der Probennahme (0 bis 32 cm), Anzahl der untersuchten Orte (1 bis 300), benutzten Materialien (Pinzetten, Löffel, Bohrer und Spatel) und die Gesamtmasse der Probe

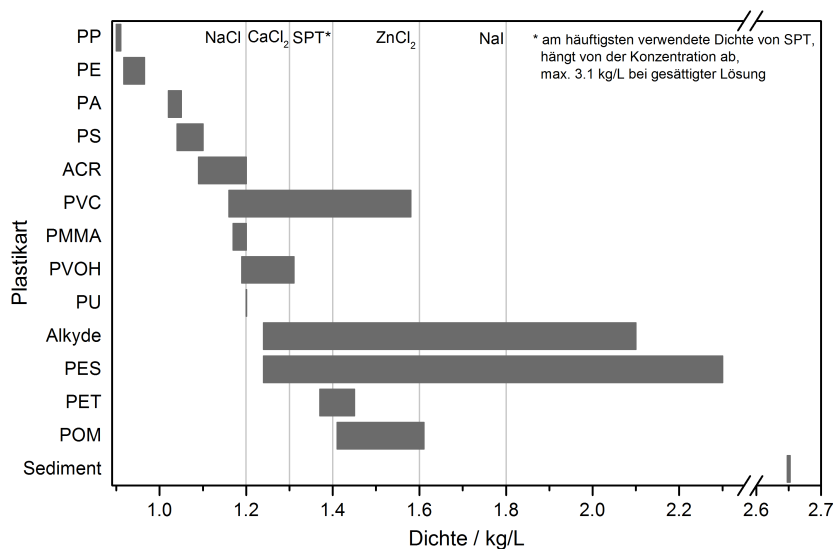
## 2. Theoretische Grundlagen

(0.15 bis 10 kg) variieren stark.[101] Die meisten Studien wählen eine einzelne Sedimentschicht (<5 cm).[103, 104] Manche Studien kombinieren die einzelnen Proben um Durchschnittsergebnisse zu erhalten,[105, 106] während andere diese getrennt untersuchen.[103, 107, 108] Die 2013 von der MSFD (*engl.*: Marine Strategy Framework Directive)-Untergruppe der Europäischen Kommission veröffentlichte Leitlinie zum Monitoring von Abfällen in Europäischen Meeren ist ein erster Versuch der Harmonisierung der unterschiedlichen Methoden im marinen Bereich.[109] Sie empfiehlt eine Probennahmentiefe von 5 m mit einem Minimum von 5 Replikaten, die mindestens 5 m voneinander entfernt sein müssen. Partikel kleiner als 1 mm sollten mittels Sieben abgetrennt werden, für größere kann ein Metalllöffel für ein Gesamtprobenvolumen von 250 mL verwendet werden.

Bei der direkten Probennahme kann MP sowohl von der Gewässeroberfläche als auch aus der Wassersäule entnommen werden. Am häufigsten werden Gewässer mit Netzen beprobt. Dabei finden eine Vielzahl an unterschiedlichen Netzen wie beispielsweise Mantarochen- oder Neuston-Schleppnetze sowie Planktonnetze Anwendung.[101] Die Probennahme mittels Netzen ermöglicht eine schnelle Beprobung hoher Volumina, allerdings stellt hier die Maschenweite der Netze den limitierenden Faktor dar. Da eine zu geringe Maschenweite zu einer schnellen Verstopfung des Netzes führen würde, werden im Allgemeinen Maschenweiten von 0.30 bis 0.39 mm (teilweise bis zu 0.50 mm) verwendet (Empfehlung der MSFD-Leitlinie: 0.333 mm). Dadurch werden jedoch alle kleineren Partikel der Probennahme entzogen. Daher ist die direkte Probennahme in Gewässern nur begrenzt geeignet, um Aussagen über den MP-Gehalt zu treffen und sollte mit anderen Probennahmemethoden kombiniert werden.[101]

Insbesondere bei der Probennahme des Sediments muss eine Abtrennung der MP-Partikel von der Matrix durchgeführt werden. Dies erfolgt im Allgemeinen mittels Dichtefraktionierung. Dazu wird die Probe in einer Flüssigkeit bekannter Dichte durch Schütteln, Rühren und/oder Begasen suspendiert. Nach einer Ruhezeit schwimmen die MP-Partikel auf Grund ihrer geringeren Dichte (0.90 – 2.30 g/cm<sup>3</sup> [101]) auf der Oberfläche, während sich Sedimentbestandteile wie Sand und Steine (Dichte ca. 2.65 g/cm<sup>3</sup> [101]) am Boden absetzen. Zusammen mit dem Überstand können die MP-Partikel von den restlichen Sedimentpartikeln abgetrennt werden. Als Separationsflüssigkeit finden meist (gesättigte) Salzlösungen Anwendung. Abbildung 2.28 gibt einen Überblick über die Dichte der einzelnen Salzlösungen und die damit abtrennbaren Plastiksorten. Am häufigsten wird eine gesättigte NaCl-Lösung mit einer Dichte von 1.2 kg/L verwendet, da sie sehr kostengünstig, ungiftig und leicht erhältlich ist.[100, 107, 110, 111] Die Dichte dieser Lösung ist jedoch nicht ausreichend, um einige der schwereren Polymerarten wie Polyvinylchlorid (PVC) oder Polyoxymethylen (POM), welchen eine hohe Umweltgefährdung zugeschrieben wird,[112, 113] abzutrennen. Auch eine Lösung aus Natriumpolywolframat ( $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , SPT von *engl.* sodium





**Abb. 2.28.:** Dichte der gängigsten Plastiksarten (Polypropylen (PP), Polyethylen (PE), Polyamid (PA), Polystyrol (PS), Acrylat (ACR), Polyvinylchlorid (PVC), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyvinylalkohol (PVOH), Polyurethan (PU), Alkyde, Polyester (PES), Polyethylenterephthalat (PET) und Polyoxymethylen (POM)) sowie der gesättigten Salzlösungen (Natriumchlorid (NaCl), Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ ) und Natriumiodid (NaI)) und einer (nicht gesättigten) Lösung von Natriumpolywolframat (SPT, von *engl.* sodium polytungstate). Aus [116].

polytungstate) kann verwendet werden. Die Dichte hängt hierbei stark von der Salzkonzentration an SPT ab. In der Literatur findet man häufig eine Konzentration mit einer Dichte von 1.4 kg/L,[104–106] wodurch PVC oder POM nicht abgetrennt werden können. Durch Erhöhung der Konzentration an SPT können Dichten bis 3.1 kg/L für die gesättigte Lösung erreicht werden. Allerdings ist dies wegen der hohen Kosten und der guten Löslichkeit von SPT nicht wirtschaftlich. Zu den weiteren verwendeten Salzlösungen zählen gesättigte  $\text{CaCl}_2$ - und NaI-Lösungen mit Dichten von 1.3 kg/L[102] bzw. 1.8 kg/L[114]. Auch eine gesättigte  $\text{ZnCl}_2$ -Lösung mit einer Dichte von 1.6 kg/L kann angewandt werden.[103, 113, 115] Aus ökonomischen und praktischen Gründen ist die Verwendung einer gesättigten  $\text{ZnCl}_2$ -Lösung zu empfehlen, jedoch sollte die Lösung wieder aufgearbeitet werden um eine Umweltbelastung auf Grund der Toxizität zu minimieren. In der MSFD-Leitlinie wird dennoch die Verwendung von NaCl-Lösungen empfohlen,[109] obwohl dadurch viele Polymersorten der Analytik entzogen werden.

Zur Durchführung der Extraktion existieren eine Vielzahl an Methoden. Diese reichen vom klassischen Aufbau (einfaches Rühren)[111, 117] bis zur Kombination aus Fluidisierung und Flotation.[114, 118] Die Wiederfindungsrate hängt hierbei stark von der verwendeten Methode ab. Fries et al.[117] berichteten eine Wiederfindungsrate von 80 – 100% anhand der Partikelzahl beim klassischen Aufbau

## 2. Theoretische Grundlagen

unter Verwendung gesättigter NaCl-Lösung. Es wurde jedoch von anderen Gruppen gezeigt, dass vor allem bei Partikeln kleiner als 1 mm nur ein geringer Anteil (ca. 40 Gew.-% mit ZnCl<sub>2</sub>-Lösung) abgetrennt werden kann.[113] Für die Kombination aus Fluidisierung und Flotation werden Wiederfindungsraten von 68 – 99% der Partikelzahl je nach Plastiksorte angegeben.[114] Die Verwendung von ZnCl<sub>2</sub> in dem eigens zur MP-Analytik entwickelten „Munich Plastic Sediment Separator (MPSS)“ liefert Wiederfindungsraten von 96 – 100% (N/N) bei Partikeln größer 1 mm sowie 96% (m/m) bei Partikeln kleiner 1 mm.[113] Bei anderen Separationsmethoden müssen zusätzliche zeit- und kostenintensive Separationsschritte durchgeführt werden, um eine gute Abtrennung kleinerer Partikel zu erreichen.[100, 114, 118] Da die Wiederfindungsrate kleiner Partikel oftmals in Massenprozent angegeben wird, ist davon auszugehen, dass vor allem die Anzahl sehr kleiner Partikel, welche kaum zur Massenbilanz beitragen, unterschätzt werden kann.

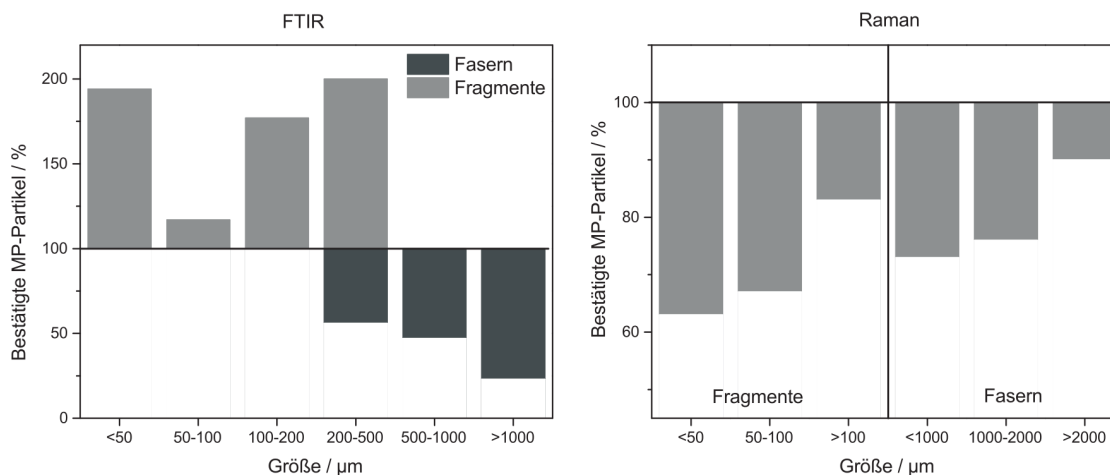
In den meisten Studien werden größere MP-Partikel (>500 µm) direkt mit einer Pinzette aussortiert, während kleinere Partikel auf einem Filter gesammelt und untersucht werden. Um eine Identifizierung zu gewährleisten, muss die organische Matrix entfernt werden. Hierzu werden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: Die chemische und die enzymatische Aufreinigung. Bei der chemischen Aufreinigung werden die Proben mit verschiedenen Oxidationsmitteln behandelt. Hauptsächlich werden hierfür 30%ige Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösungen[114, 119] oder Mischungen aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)[103, 115] verwendet. In weiteren Studien wurde auch entionisiertes Wasser und/oder Natriumlaurylsulfat in einem Ultraschallbad angewandt.[104, 120, 121] Von der Verwendung eines Ultraschallbades sollte jedoch abgesehen werden, da durch die Behandlung aus spröden Partikeln kleinere MP-Bruchstücke entstehen können.[122] Die enzymatische Aufreinigung besteht aus der aufeinander folgenden Behandlung mit einer Kombination unterschiedlicher Enzyme wie Lipasen, Amylasen, Proteinasen, Chitinasen und Cellulasen. Da jedes Enzym genau festgelegte Reaktionsbedingungen benötigt, ist die enzymatische Aufarbeitung im Allgemeinen sehr zeitaufwändig.[122–124]

### **Qualitative und quantitative Analyse**

Nach der Abtrennung und Aufreinigung des MPs erfolgt eine qualitative und quantitative Analyse. Es sollte gewährleistet werden, dass synthetische Polymere von anderen natürlichen Substanzen unterschieden werden können. Die erste Methode, die hierfür angewandt wurde, ist die optische Identifizierung, bei der die Partikel mit dem bloßen Auge (falls sie groß genug sind) oder unter einem optischen Mikroskop nachgewiesen werden. Obwohl diese Methode in einer Vielzahl von Studien angewandt wird, sind die Ergebnisse keinesfalls belastbar und können vom Laborpersonal abhängen. Dekiff et al.[125] konnten zeigen, dass drei unterschiedliche Personen in der gleichen Probe 1 bis 4 MP-Partikel feststellten. Selbst für sehr gut ausgebildetes

Personal ist es sehr schwierig, MP von anderen (an)organischen Materialien wie Quarz, Pflanzenteilen, Tierüberresten oder Cellulose zuverlässig zu unterscheiden. Diese Aussage wurde von einigen Studien bestätigt, welche die optische Identifizierung mit weiteren Methoden wie Infrarot(IR)- oder Raman-Spektroskopie sowie energiedispersiver Röntgenspektroskopie (*engl.*: energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX) kombinierten. Eriksen et al.[126] konnten in ihrer Studie der Großen Seen in den USA mittels EDX-Analyse zeigen, dass 20% aller Partikel kleiner 1 mm, welche zuvor optisch MP zugeordnet wurden, aus Aluminiumsilikaten bestanden. Andere Veröffentlichungen berichten von Fehlerquoten bis zu 70%.[101] Eine Studie von Remy et al.[127] an Makrofauna in Seegräsern unterstreicht die Notwendigkeit zusätzlicher Identifizierungsmethoden. Die Autoren konnten mittels RM zeigen, dass 100% der zuvor optisch als MP identifizierten Fasern aus Cellulose bestanden. Song et al.[128] führten an Proben der Meeresoberfläche sowie an Sedimentproben einen umfangreichen Vergleich der Identifizierung mittels Mikro-FTIR (Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie, gekoppelt mit einem Mikroskop) und optischer Identifizierung durch. Sie zeigten, dass bei optischer Identifizierung die Anzahl an fragmentierten MP-Partikeln deutlich unterschätzt und die Anzahl an Fasern deutlich überschätzt wird. Bei den Fragmenten tragen vor allem kleine Partikel (<50 µm) zur Fehlerrate bei, während bei Fasern vor allem die längeren (>1000 µm) fälschlicherweise als MP gezählt wurden. Die Arbeitsgruppe von Nielsen[120, 121] führte umfangreiche Studien zum Vergleich von optischer Identifizierung und RM an Meeresoberflächeproben des Atlantiks durch. Die Partikel wurden zunächst nach ihren morphologischen Eigenschaften aussortiert und anschließend mit RM untersucht. Insgesamt wurden 68% aller aussortierten Partikel (N = 1279) spektroskopisch als MP identifiziert, die Erfolgsrate hängt jedoch stark von der Größe der Partikel ab. Kleine Partikel (<50 µm) wurden nur zu 63% richtig aussortiert, während bei den größeren Partikeln (>100 µm) die Rate bei 83% lag. Bei der Analyse von Fasern fand sich ein ähnlicher Trend mit insgesamt 75% richtig zugeordneter Proben. In Abbildung 2.29 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Publikationen betonen, wie wichtig eine zusätzliche Identifizierung neben optischem Sortieren insbesondere für kleinere Partikel ist. Obwohl schon länger von der optischen Identifizierung von Partikeln kleiner 1 mm abgeraten wird, da eine hohe Fehlerrate zu erwarten ist,[101] verwenden diese viele aktuelle Studien, wodurch die erhaltenen Ergebnisse stark angezweifelt werden müssen. Auch bei der Identifizierung von Fasern müssen zusätzlich zur optischen Identifizierung weitere Methoden angewandt werden, da eine Unterscheidung zwischen MP- und Cellulosefasern optisch nur sehr begrenzt möglich ist. Obwohl bekannt ist, dass vor allem gefärbte Cellulosefasern durchaus Umweltprobleme hervorrufen können,[127] werden sie auf Grund der natürlichen Herkunft nicht zu MP gezählt. Eine Studie berichtet von der Verwendung von Rose Bengal (4,5,6,7-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein), das natürliche organische Fasern wie Cellulose, nicht aber MP, einfärben soll. Die nicht gefärbten Fasern werden als MP bezeichnet.[129] Bei der ausschließlichen Verwendung der

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.29.:** Vergleich der nach optischer Identifizierung mittels Mikro-FTIR (links) und RM (rechts) bestätigten MP-Partikel. 100% gibt die Anzahl an optisch identifizierten Partikeln an. Die Balken zeigen, welcher Anteil davon mittels der spektroskopischen Methode identifiziert wurde. (Da in B nur bereits optisch identifizierte Partikel untersucht wurden, sind hier nur negative Ergebnisse möglich, während in A sowohl eine Unter- als auch Überbestimmung möglich ist). Abbildung aus [116] mit Daten aus [121, 128].

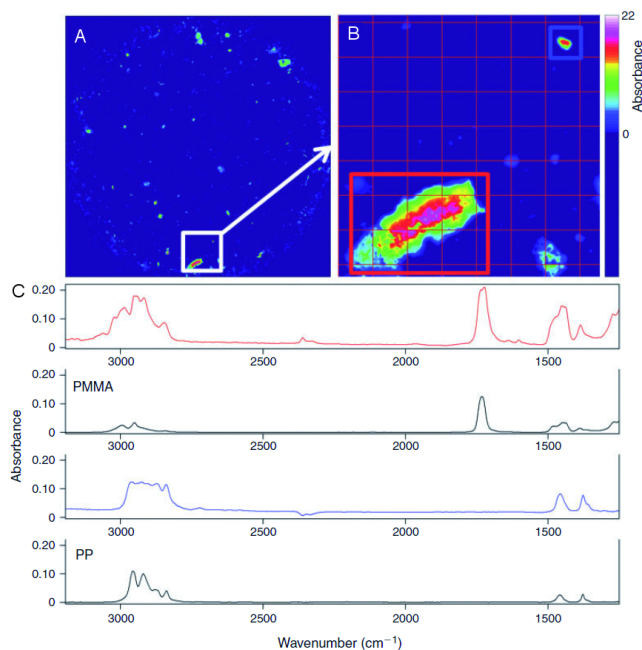
optischen Identifizierungsmethode fehlen zusätzliche Informationen über die Zusammensetzung des MPs. Dies erlaubt nur wenige Rückschlüsse auf die Quellen und Umweltrisiken der Proben, da die Toxizität stark von der Plastiksorte und deren Additive wie Pigmente und Weichmacher abhängt.

Zwei spektroskopische Verfahren haben sich in den letzten Jahren zur Analyse von MP etabliert: Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) und die Raman-Spektroskopie sowie ihre jeweilige Kombination mit einem Mikroskop (Mikro-FTIR und RM). Seit kurzem werden auch thermoanalytische Verfahren angewandt. Obwohl die IR-Spektroskopie seit 1978 für die Analyse von Umweltproben eingesetzt wird,[130] wurde sie bald durch die Entwicklung von FTIR-Geräten abgelöst. Diese finden heute nahezu ausschließlich Anwendung.[101] FTIR ermöglicht im Gegensatz zur zeitaufwändigeren dispersiven Methode, bei der die Wellenlängen einzeln aufgenommen werden, die simultane Erfassung aller Wellenlängen, welche dann mittels Fourier-Transformation in Spektren umgewandelt werden.

Die FTIR-Spektroskopie kann in der Transmissions-, Reflexions- oder abgeschwächten Totalreflexions(*engl.*: attenuated total reflection, ATR)-modus durchgeführt werden. Für MP-Partikel, welche groß genug sind, um sie mit Pinzetten überführen zu können, eignet sich die ATR-FTIR-Spektroskopie am besten, da sie eine schnelle, kostengünstige und genaue Analyse ermöglicht. Die Probe wird hierfür auf einen ATR-Kristall transportiert und anschließend mit einem evaneszierenden Feld bestrahlt. Da die Partikel direkt auf dem Kristall platziert werden müssen, ist

die Analyse von MP kleiner als ca. 500  $\mu\text{m}$  nur bedingt möglich.[123] Für kleinere Partikel gibt es die Möglichkeit der Kopplung des FTIR-Spektrometers mit einem Mikroskop, was als Mikro-FTIR bezeichnet wird. Die Mikro-FTIR-Spektroskopie kann je nach Instrumentierung ebenfalls in allen drei Moden durchgeführt werden. Da die Präparierung einzelner kleiner Partikel nicht praktikabel ist, werden die Proben auf Filtern untersucht. Bei Anwendung des Transmissionsmodus durchstrahlt das Licht die Probe und wird anschließend detektiert. Daher müssen Probe und Filter dünn genug sein, so dass sie optisch transparent sind. Die Analyse von gefärbten oder dunklen Partikeln ist nur bedingt möglich. Des Weiteren sollten die verwendeten Filter keine starke Absorption im IR-Bereich zeigen, weshalb viele gängigen Filter nicht verwendet werden können. IR-transparent sind beispielsweise Aluminiumoxid- oder eigens hergestellte Siliziumfilter.[122, 131] Die genannten Nachteile können mit der Anwendung des Reflexionsmodus vermieden werden, allerdings wird hier das Signal oftmals wegen durch die Probenmorphologie gestreuten Lichtes gestört. Daher ist dieser Modus für die Analyse von unebenen Proben nur bedingt geeignet. Eine Möglichkeit, unebene Proben dennoch zu messen, stellt die mikro-ATR-FTIR-Spektroskopie dar. Im Gegensatz zur normalen ATR-FTIR-Spektroskopie können hier die Proben direkt auf dem Filter analysiert werden,[132] allerdings ist die Instrumentierung sehr teuer und die Messungen zeit- und arbeitsaufwändig, da auf jedes einzelne Partikel fokussiert werden muss.[101] Zusätzlich kann der ATR-Kristall beschädigt werden, falls auf hartes anorganisches Material, welches fälschlicherweise optisch als MP identifiziert wurde, fokussiert wird. In den letzten Jahren wurden Versuche unternommen, die zeitaufwändige Einzelpunktanalyse von MP zu automatisieren.[133] Bildgebende FTIR-Verfahren wurden nur in einer geringen Anzahl an Studien durchgeführt, da sie ebenfalls sehr zeitaufwändig sind.[123, 132, 133] In diesen konnten daher nur geringe Teile des Filters analysiert werden (z.B. nur  $5 \times 10^{-7}\%$  [132] bzw. 5.6% der Filtergesamtfläche[133]). Kürzlich wurde die bildgebende FTIR-Spektroskopie durch die Anwendung von FPA(*engl.*: focal plane array)-Detektoren verbessert.[119, 122] Bei dieser Detektionsmethode ist eine Vielzahl an Detektoren zweidimensional angeordnet, wodurch die gleichzeitige Messung von mehreren tausend Spektren innerhalb einer Fläche möglich wird.[134] Trotz der Verbesserungen ist die Analyse ganzer Filter immer noch sehr zeitaufwändig (10.75 h für einen Filter mit 11 mm Durchmesser[123]) und für Routineanalysen nicht geeignet. Die momentane Vorgehensweise besteht darin, den Filter zunächst oberflächlich abzuscannen. Falls dabei Signale in mindestens einem von drei Markerbereichen auftreten, wird die Stelle anschließend nochmals genauer untersucht.[119, 123] Da diese Markerbereiche Schwingungen umfassen, die bei fast allen organischen Substanzen auftreten (z.B. CH-Streckschwingungen: 2980 – 2780  $\text{cm}^{-1}$ , CH-Deformationsschwingungen: 1480 – 1400  $\text{cm}^{-1}$  und CO-Streckschwingungen: 1760 – 670  $\text{cm}^{-1}$ ), kann die Analyse von Proben mit einem hohen Anteil an Organik in der Matrix erschwert werden.[123] Abbildung 2.30 zeigt ein Beispiel für die FTIR-basierte chemische Bildgebung von MP-Partikeln.

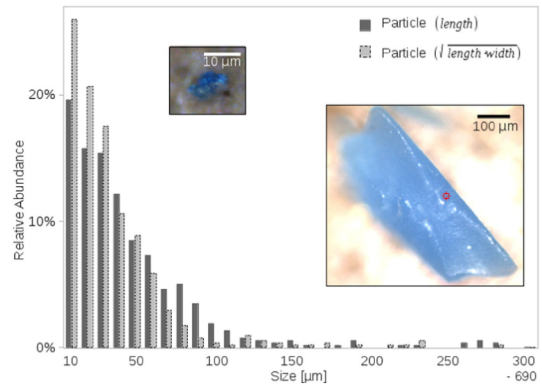
## 2. Theoretische Grundlagen



**Abb. 2.30.:** FPA-basierte Mikro-FTIR-Abbildung der Bandenregion 1480 bis 1400  $\text{cm}^{-1}$  einer MP-Probe aus Sediment. A) Überblick über die gesamte Probe, B) Vergrößerung des weißen Quadrates aus A mit PMMA (rotes Quadrat)- und PP (blaues Quadrat)-Partikeln, C) zugehörige Spektren mit Referenzspektren. Abbildung aus [123].

Die FTIR-Spektroskopie ermöglicht eine zuverlässige und genaue Analyse zahlreicher Polymere in einem weiten Größenbereich. Die Auflösung ist hierbei durch das Diffraktionslimit beschränkt (theoretische Auflösung maximal 1.7  $\mu\text{m}$  bei 4000  $\text{cm}^{-1}$  bis 13  $\mu\text{m}$  bei 500  $\text{cm}^{-1}$ ), [135] was die Analyse kleiner MP-Partikel verhindert. Die tatsächliche minimale Auflösung liegt deutlich höher. Löder et al. konnten an sauberen kommerziell erhältlichen Partikeln zeigen, dass abhängig von der Plastiksorte Partikel bis 20  $\mu\text{m}$  untersucht werden können. [123] Die Evaluation realer Proben ist auf Grund des Einflusses der Matrix sowie Alterungseffekten jedoch deutlich erschwert. Käßler et al. konnten zeigen, dass MP im Größenbereich von 11 – 20  $\mu\text{m}$  (eine genaue Größenangabe fand nicht statt) identifiziert werden kann. Allerdings konnten sie nur einen geringen Teil der Polymere (ca. 58% im Vergleich zu RM) richtig zuordnen. [136]

Eine weitere zur Identifizierung von MP geeignete Methode ist die Raman-Spektroskopie bzw. -Mikrospektroskopie. Die Grundlagen von RS und RM sind in Kapitel 2.1 näher beschrieben. RM wurde in einer Reihe von Studien zum Vorkommen von MP in marinen [95, 120, 137], als auch limnischen [103] Ökosystemen angewandt. Zumeist wurden jedoch nur große Partikel oder eine kleine Stichprobe aller Partikel mittels RM untersucht. Zusätzlich zu den Forschungsergebnissen, welche Teil dieser Arbeit sind, wurde bisher eine weitere Publikation veröffentlicht,



**Abb. 2.31.:** Relative Mikroplastikgrößenverteilung im europäischen und subtropischen Atlantik. Die dunkelgrauen Säulen stellen die Partikellänge dar, während die hellgrauen Säulen das geometrische Mittel aus Länge und Breite wiedergeben. Aus [120].

in der systematisch das Vorkommen von sehr kleinem MP ( $<50 \mu\text{m}$ ) untersucht wurde (vgl. Abbildung 2.31). Die Vorteile der RM liegen in der hohen räumlichen Auflösung von  $1 \mu\text{m}$  und der Unempfindlichkeit gegenüber Wasser. Wie auch die FTIR-Spektroskopie kann die RM als bildgebendes Verfahren verwendet werden, welches jedoch sehr zeitaufwändig ist, falls eine hohe Auflösung eingesetzt wird. Die automatisierte Analyse der Filter ist in Entwicklung, jedoch nicht so weit fortgeschritten wie bei der Mikro-FTIR-Spektroskopie. Die Analyse von MP-Proben kann durch die Durchführung einer Größenfraktionierung vereinfacht werden. Große MP-Partikel ( $>500 \mu\text{m}$ ), welche mit einer Pinzette transportiert werden können, können direkt mittels RM untersucht werden. Die kleineren MP-Partikel werden auf einem Filter analysiert. Da die Evaluierung des ganzen Filters sehr zeit- und kostenaufwändig ist, wird allgemein nur ein Teilbereich des Filters untersucht. Über statistische Berechnungen kann der MP-Gehalt des ganzen Filters genähert werden.[120, 121].

RM ermöglicht die chemische Identifizierung von MP-Partikeln und -Fasern mit einer räumlichen Auflösung von bis zu  $1 \mu\text{m}$  über den ganzen Größenbereich von  $1 \mu\text{m}$  bis  $5 \text{mm}$ . Sie stellt bisher die einzige Methode dar, mit der kleine MP-Partikel (ca.  $1 - 20 \mu\text{m}$ ) erfolgreich identifiziert werden können. Von diesen Partikeln wird vermutet, dass sie das größte Gefährdungspotential für Organismen haben (vgl. Kapitel 2.3.5). Einer der größten Nachteile der RM liegt in der Interferenz mit Fluoreszenz aus (mikro)biologischen, organischen und anorganischen Verunreinigungen, welche die Identifizierung des MPs erschweren kann. Daher ist ein zusätzlicher Reinigungsschritt vor Durchführen der RM-Analyse ratsam. Auch sollten die Messparameter optimiert werden, um Fluoreszenz zu vermeiden (z.B. Photobleichen, Laserwellenlänge, Laserleistung, Messzeit, Vergrößerung des Objektivs, konfokaler Modus).

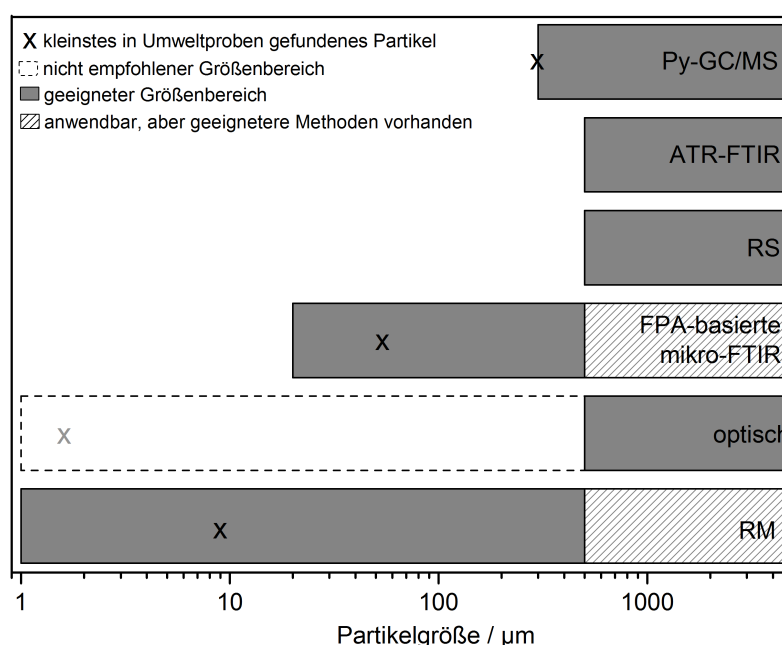
## 2. Theoretische Grundlagen

Die thermoanalytischen Methoden beschreiben eine weitere Methodengruppe, welche zur Identifizierung von MP angewandt werden können. 2001 wurden von Fabbri bei Studien in der Lagune von Ravenna eine Kombination aus Pyrolyse-Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (Py-GC/MS) verwendet.[138] Die Arbeitsgruppe von Fries optimierte diese Methode in weiteren Studien an Umweltproben.[114, 117] Ein einzelnes MP-Partikel wird in eine Röhre übertragen und erhitzt. Die freigesetzten Gase werden an einem kalten Injektionssystem gesammelt und anschließend thermisch wieder desorbiert. Die einzelnen Bestandteile werden mit einer GC-Säule aufgetrennt und mittels Quadrupol-MS analysiert. Durch einen Vergleich der Spektren der Pyrolyseprodukte mit einer Datenbank können Rückschlüsse auf gängige Polymertypen gezogen werden. Zusätzlich zur zuverlässigen Identifizierung von MP können auch Aussagen über organische Plastikadditive (OPAs), welche toxisch sein können, getroffen werden, was bei den anderen Analysemethoden nicht möglich ist.[117] Die Py-GC/MS eignet sich jedoch nicht für Routineanalysen, da alle Partikel einzeln analysiert werden müssen, wodurch sehr zeitintensive Messungen entstehen. Außerdem ist nur die Analyse großer Partikel, welche mittels Pinzetten in das Pyrolyserohr überführt werden können, möglich. Dekiff et al.[125] schätzten die minimal benötigte Größe der Partikel auf 100 µm. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Handhabung von Partikeln kleiner als ca. 500 µm äußerst schwierig ist. Diese Methode ist außerdem für die Analyse ganzer Umweltproben ungeeignet, da starke Matrixeffekte zu erwarten sind und sie sehr empfindlich auf Verunreinigungen reagiert, wodurch zeitaufwändige Reinigungsschritte notwendig werden.

Dümichen et al.[139, 140] stellten eine weitere thermoanalytische Methode vor, welche die Analyse ganzer Proben ohne großer Probenvorbereitung oder vorheriger Abtrennung der Partikel erlaubt. Die Methode, welche eine Kombination aus Thermogravimetrischer Analyse (TGA) gekoppelt an eine Festphasenextraktion (SPE, von *engl.*: solid-phase extraction) und Thermische-Desorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TDS-GC/MS) ist, bezeichneten sie als Thermoextraktion und -desorption, gekoppelt mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TED-GC/MS). Die Probe wird in einen TGA-Tiegel platziert und erhitzt. Die entstehenden Produkte werden an einem Extraktionssubstrat (Stäbe mit Polydimethylsiloxanbeschichtung), adsorbiert um anschließend thermisch in das GC/MS desorbiert zu werden. Unter Anwendung dieser Methode war es möglich, den Gehalt an PE in verschiedenen Umweltmatrices (Boden, Muschelgewebe und suspendierte Feststoffe) zu bestimmen. Da die TED-GC/MS aber als neue Methode ständiger Weiterentwicklung unterliegt, ist mit einigen Fortschritten in diesem Bereich zu rechnen. Die momentane Nachweisgrenze liegt bei ca. 1 Gew.-% (für PE),[140] 0.5 Gew.-% (für PP) und 0.1 Gew.-% (für PS),[116] daher können weitere Anreicherungs-schritte sinnvoll werden.



Beide thermoanalytischen Methoden unterscheiden sich bereits in ihren Grundlagen stark von den spektroskopischen Methoden. FTIR- und Raman-Spektroskopie sind zerstörungsfreie Methoden, welche eine Identifizierung der Probe durch die Anregung charakteristischer funktioneller Gruppen oder Strukturelementen erlauben. Py-GC/MS und TED-GC/MS analysieren die Zersetzungsprodukte nach Aufheizen der Probe. Während Mikro-FTIR und RM bereits mit einem optischen Mikroskop gekoppelt sind und daher zusätzlich optische Informationen über die Partikelgröße und -anzahl liefern können, erlaubt vor allem die TED-GC/MS nur Rückschlüsse auf die Gesamtmassenfraktion aller beteiligten Partikel eines Polymers. Ein großes Partikel kann die gleichen Ergebnisse hervorrufen wie eine hohe Anzahl kleiner Partikeln, daher ist eine vorherige Größenfraktionierung sinnvoll.



**Abb. 2.32.:** Überblick über die MP-Größen, welche mit den unterschiedlichen Methoden identifiziert werden können. Die kleinsten gefundenen Partikel in Umweltproben sind mit einem Kreuz markiert. Anmerkung: RM und Mikro-FTIR können auch für Größen über 500 µm verwendet werden, aber die Anwendung besonders von ATR-FTIR ist sinnvoller. Die optische Identifizierung wird für alle Größen verwendet, sollte jedoch keinesfalls für Partikel <500 µm erfolgen. Abbildung aus [116].

Aber nicht nur die thermoanalytischen Methoden unterliegen ständiger Entwicklung, auch Mikro-FTIR und RM werden verbessert und optimiert. Eine vielversprechende Neuerung für RM ist die EM-CCD (*engl.*: electron multiplying charge-coupled device)-Kamera, welche eine bis zu 20fach schnellere Aufnahme der Spektren ermöglicht. Dadurch können die Messzeiten für ganze Filter deutlich reduziert werden. Es wird sich herausstellen, welche Analyseverfahren am besten für Routineanalysen und Kontrollen geeignet ist. FTIR ermöglicht die Identifizierung von MP

## 2. Theoretische Grundlagen

mit bereits automatisierten Analysen, ohne starke Interferenzen von Fluoreszenz aus Verunreinigungen. Die maximale Auflösung von 20  $\mu\text{m}$  verhindert jedoch die Identifizierung sehr kleiner MP-Partikel, welche als besonders umweltgefährdend angenommen werden. Weiterhin muss darauf geachtet werden, die Proben gründlich zu trocknen, da bereits Spuren von Wasser starke IR-Absorption zeigen. Die Vorteile der RM liegen in der Identifizierung aller Partikel bis ca. 1  $\mu\text{m}$ . Da Wasser nur geringe Raman-Banden zeigt, können auch wasserhaltige, (mikro)biologische Proben auf ihren MP-Gehalt analysiert werden. Einen Nachteil stellen allerdings der Fluoreszenzhintergrund aus Verunreinigungen und die noch nicht vollständig entwickelte automatische Analyse dar. Die thermoanalytischen Methoden ermöglichen die Identifizierung von MP und Additiven. Da die Nachweisgrenzen relativ hoch liegen, können momentan ohne Anreicherung nur Proben mit hohem Gehalt an MP analysiert werden. Weiterhin wird das Ergebnis in Massenprozent erhalten, wodurch im Gegensatz zu den spektroskopischen Methoden ohne weiteres keine Aussagen zur Partikelanzahl und -größe getroffen werden können. Abbildung 2.32 gibt einen Überblick über die möglichen Größenbereiche der unterschiedlichen Analysemethoden sowie die kleinsten bisher identifizierten Partikel.

### **Probennahme und Identifizierung bei biologischen Proben**

Je nach untersuchtem Organismus und Design des Experiments werden unterschiedliche Methoden verwendet. Da in Laborstudien die Größe und Sorte des verfütterten MPs bekannt ist, ist eine Identifizierung deutlich einfacher. Oftmals wird der Verdauungstrakt der Versuchstieres unter einem Mikroskop seziiert und alle Partikel mit unnatürlicher Form und Farbe werden als MP gezählt,[141, 142] was auch der Empfehlung der MSFD-Leitlinie entspricht.[109] Auf Grund der vielseitigen Zusammensetzung des potentiellen MPs ist hier eine anschließende spektroskopische Identifizierung unumgänglich, welche in den meisten Studien jedoch nicht durchgeführt wurde. Vor der Identifizierung muss das MP abgetrennt werden. Für große Partikel ( $>500 \mu\text{m}$ ) kann eine Pinzette verwendet werden, bei kleineren Partikeln sind zusätzliche Separationsmethoden notwendig.

Bei der Analyse von nicht transparenten Organismen (wie Muscheln oder Fische) kann ein Gewebeaufschluss sinnvoll sein. Claesens et al.[118] zeigten hierfür, dass die Kombination aus 12-stündigem Einweichen in Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) und anschließendem fünfständigen Erhitzen unter Rückfluss als Aufschluss für Muschelgewebe geeignet ist. Collard et al.[143] schlugen für den Aufschluss von Fischgewebe eine Vorbehandlung in Natriumhypochlorit-Lösung ( $\text{NaClO}$ ) und anschließendem Waschen in einer Mischung aus  $\text{NaClO}$  und  $\text{HNO}_3$  sowie Ultraschallbehandlung in Methanol ( $\text{MeOH}$ ) vor.

### 2.3.3. Vorkommen

#### MP in marinen Ökosystemen

Obwohl erste Berichte, welche sich mit dem Vorkommen von kleinen Plastikpartikeln und -fasern in Meeren beschäftigten, bereits in den frühen 70iger Jahren veröffentlicht wurden,[144–146] spielte dieses Thema in den folgenden Jahrzehnten für die Forschung nur eine untergeordnete Rolle. Es beschäftigten sich nur wenige Studien mit dem Vorkommen von kleinen Plastikpartikeln in marinen Systemen.[130, 147–151]. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts berichteten mehrere Studien von überraschend hohen MP-Konzentrationen im nordpazifischen Wirbel[152] (334,271 Fragmente/km<sup>2</sup>, Netz mit 330 µm Maschenweite, optische Identifizierung) und in Küstengebieten im südlichen Kalifornien[152, 153] (10 Fragmente/m<sup>2</sup> vor einem Sturm bzw. 60 Fragmente/m<sup>2</sup> nach dem Sturm, 300 µm Neustonnetz, optische Identifizierung). In Folge dessen fanden zahlreiche Untersuchungen statt.

Die meisten Publikationen beschäftigen sich mit dem MP-Vorkommen im (Nord)Atlantik. Bereits 1972 fanden Carpenter et al. 3,500 Pellets/km<sup>2</sup> (Netz mit 330 µm Maschenweite, optische Identifizierung) bzw. 0.275 PE-Pellets/km<sup>2</sup> (Netz mit 335 µm Maschenweite, Identifizierung mit IR).[144, 145] Neuere Studien bestätigen diese Ergebnisse. Law et al. konnten in einer umfassenden Analyse der Kunststoffanreicherung über 22 Jahre (1986 – 2008) in 62% aller 64,000 untersuchten Netzproben Kunststoffe finden (Maschenweite: 330 µm). Die Gesamtanzahl liegt zwischen 10,000 und 100,000 Fragmenten/km<sup>2</sup> und hängt stark von der untersuchten Region sowie den Konvergenzströmen an der Oberfläche ab.[154] Kukulka et al. fanden mehr als 50,000 Fragmente/km<sup>2</sup> bei geringen Windstärken (Maschenweite: 335 µm, optische Identifizierung).[155]

Zusätzlich zum Pazifik wurde MP in den letzten Jahren in den anderen Weltmeeren und an den Küsten aller fünf Kontinente gefunden.[92, 100, 101] Auch in abgelegenen Orten wie dem Arktischen und Südlichen Ozean, sowie in der Tiefsee, konnte MP nachgewiesen werden.[100, 156, 157]

#### MP in Süßwasser-Ökosystemen

Trotz des zunehmenden Interesses und des Wissens über die Kontamination der Meere mit MP, wurde das Vorkommen in limnischen („Binnenwasser“-)Ökosystemen lange übersehen. Erst 10 Jahre nach dem gestiegenen Interesse an MP in marinen Systemen, wurde 2011 erstmals von Zbyszewski und Corcoran eine Studie zum Vorkommen von kleinen Plastikpartikeln im Huronsee, Kanada, veröffentlicht.[108] Die Autoren konnten zeigen, dass die Konzentration stark vom beprobten Ort abhängt. Die maximale Anzahl an Partikeln lag dabei bei 408 Fragmenten/m<sup>2</sup>,

## 2. Theoretische Grundlagen

der Mittelwert betrug 37.8 Fragmente/ $\text{m}^2$  (Sedimentproben, optische Identifizierung mit Mikro-FTIR an 45 Partikeln). Seitdem wurde MP auch in weiteren Seen wie dem Genfersee[158] (48,146 Fragmenten/ $\text{km}^2$ , Mantanetz mit 300  $\mu\text{m}$ , optische Identifizierung) und dem Gardasee[103] (maximal  $1,108 \pm 983$  Fragmente, Sedimentproben, Dichtefraktionierung mit  $\text{ZnCl}_2$ , RM-Identifizierung aller untersuchten Partikel) nachgewiesen. Eine weitere umfangreiche Studie von Faure et al. fand in 6 Schweizer Seen durchschnittlich 1,300 Partikel/ $\text{m}^2$  pro See für Sedimentproben (optische Identifizierung, ATR-FTIR für MP >1 mm) bzw. durchschnittlich 91,000/ $\text{km}^2$  bei Beprobung der Wasseroberflächen (Mantanetz: 333  $\mu\text{m}$ , optische Identifizierung, ATR-FTIR für MP >1  $\mu\text{m}$ ).[159] MP wurde weiterhin in den Großen Seen in den USA nachgewiesen, wo Eriksen et al.[126] durchschnittlich 43,000 Fragmente/ $\text{km}^2$  pro See fanden. Stromabwärts zweier großer Städte wurden Werte bis 466,000 Fragmente/ $\text{km}^2$  festgestellt (Maschenweite: 333  $\mu\text{m}$ , Dichtefraktionierung mit NaCl-Lösung, optische Identifizierung). Durch zusätzliche Energiedispersive Röntgenspektroskopie(EDS)-Analysen konnten die Autoren zeigen, dass 20% aller Partikel <1 mm, welche optisch als MP identifiziert wurden, tatsächlich anorganischen Ursprungs waren. Auch in entlegenen Seen wie dem Chöwsgöl Nuur in der Mongolei wurden durchschnittlich 20,264 Partikel/ $\text{km}^2$  gefunden (Maschenweite: 333  $\mu\text{m}$ , optische Identifizierung).[160]

Zusätzlich wurde MP in verschiedenen Flüssen in Europa,[161, 162] sowie Nord-[163–165] und Südamerika[166] nachgewiesen. Die Donau enthielt bis zu 141 Partikel/ $\text{m}^3$ , mit einer durchschnittlichen Anzahl von 0.93 Partikel/ $\text{m}^3$  (Treibnetz mit Maschenweite 500  $\mu\text{m}$ , Dichtefraktionierung mit Wasser, optische Identifikation).[161] Klein et al. fanden 228 bis 3,763 Partikel/kg im Rhein und 786 bis 1,368 Partikel/kg im Main (Sedimentproben, Dichtefraktionierung mit NaCl-Lösung, optische Identifizierung, ATR-FTIR für Partikel >630  $\mu\text{m}$ ).[162] Yonkos et al. untersuchten vier Flüsse in der Chesapeake Bay-Flussmündung in den USA und fanden stark variierende Konzentrationen an MP (<1.0 bis 560 g/ $\text{km}^2$ , Maschenweite 330  $\mu\text{m}$ , optische Identifizierung, 10 Partikel mit RM).[164] Faure et al. wiesen mittlere Konzentrationen von 0.1 bis 64 Partikel/ $\text{m}^3$  (Mantanetz: 300  $\mu\text{m}$ , ATR-FTIR für Partikel >1 mm) in fünf Schweizer Flüssen nach.[159]

### Vergleichbarkeit der Studien

Da die Ergebnisse der Studien zum Vorkommen von MP stark von Probennahme, -aufbereitung und -identifikation abhängen und eine Vielzahl an Einheiten zur Angabe der Konzentration Anwendung findet,[92, 95, 97, 101, 167] ist es nahezu unmöglich die Ergebnisse zu vergleichen. Um eine aussagekräftige Interpretation gewährleisten zu können, müssen stets der verwendete Größenbereich und die Identifizierungsmethode zusätzlich zum bloßen Zahlenwert angegeben werden (vgl. auch Kapitel 2.3.3). Auf Grund der fehlenden einheitlichen Definition von MP wurden

zahlreiche Obergrenzen der Partikelgröße formuliert. Diese reichen von 10 mm[98] über 6 mm[168] und 2 mm[99] bis zu 1 mm.[110, 118] Noch größere Uneinigkeit herrscht bei der Untergrenze. Diese hängt zumeist von der Probennahmemethode ab.[101] Bei gesiebten Sedimentproben liegt die untere Grenze zwischen 0.5 und 2 mm. Bei Filtration des Gewässers hängt das Limit von der Maschenweite des Netzes ab; gängigerweise werden 333  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Maschenweite kann aber von 53  $\mu\text{m}$  bis 3 mm reichen. Die Grenze bei einer direkten Probennahme wird durch die Größeneffizienz der verwendeten Filter bestimmt und liegt bei 1.6 bis 2  $\mu\text{m}$ .

Aus analytischer Sicht wäre es sinnvoll, alle Plastikpartikel, welche im Mikrometerbereich, d.h. 1 bis 1000  $\mu\text{m}$ , liegen, als MP zu definieren. Eine obere Grenze von 5 mm ist jedoch mittlerweile weitgehend etabliert und sollte daher aus Gründen der Vergleichbarkeit beibehalten werden. Für die untere Grenze müssen noch klare Richtlinien festgelegt werden. Verschiedene Studien verwendeten 500  $\mu\text{m}$ ,[161] 330 – 333  $\mu\text{m}$ ,[152, 155, 160] 20  $\mu\text{m}$ ,[109] 10  $\mu\text{m}$ [120] und 1  $\mu\text{m}$ [101, 103, 115] als untere Grenze. Da speziell sehr kleine MP-Partikel (<10  $\mu\text{m}$ ) im Verdacht stehen, negative Auswirkungen auf Biota hervorzurufen (vgl. Kapitel 2.3.5) und zusätzlich die Adsorption von Schadstoffen mit abnehmender Größe auf Grund des steigenden Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses zunimmt, sollten diese Partikel in die Studien miteinbezogen werden. Da geeignete Analysemethoden für Partikel im Nanometerbereich fehlen, wurde das Vorkommen in aquatischen Systemen bisher nicht untersucht. Es wird jedoch ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an (sowohl primären als auch sekundären) Plastik-Nanopartikeln und deren Umwelteinfluss angenommen.[169, 170]

Auch die unterschiedlichen Identifizierungsmethoden resultieren in Ergebnissen, die oftmals nicht vergleichbar sind. Zumeist werden entweder die optische Identifizierung oder spektroskopische Methoden (RM und FTIR) verwendet. Obwohl die optische Identifizierung eine Vielzahl an Fehlerquellen birgt (vgl. Kapitel 2.3.2), wird sie weiterhin oftmals eingesetzt, um höhere Kosten zu vermeiden. Die Verlässlichkeit der Ergebnisse, welche mit dieser Methode erhalten wurden, ist jedoch sehr gering. Vor allem bei der Analyse von Fasern unterscheidet sich die Methode stark. Manche Gruppen geben die Länge und den Durchmesser der Fasern als Größe an, während andere ausschließlich den Durchmesser verwenden.[101] Letzteres resultiert in stark irreführenden Größenangaben.

### 2.3.4. Bioabbaubare und kompostierbare Polymere

In den letzten Jahren gewannen sogenannte Biokunststoffe als Alternative zu konventionellen Kunststoffen an Bedeutung. Sie werden oftmals als Möglichkeit angesehen, Kunststoffmüll und daraus folgend auch den MP-Eintrag in die Umwelt zu verringern. Der Ausdruck „Biokunststoff“ umfasst dabei Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften.[171] Zum einen werden darunter Stoffe verstanden, die aus nachwachsenden Rohstoffen erzeugt wurden. Dies beinhaltet klassische Polymere wie beispielsweise PE, PP, PS oder PET. Der zweite Aspekt von Biopolymeren umfasst bioabbaubare oder kompostierbare Substanzen, welche nach ihrer Verwendung organisch verwertet werden können. In diesem Zusammenhang ist es wichtig bioabbaubar und kompostierbar genauer zu definieren.[171] Bioabbaubarkeit bezeichnet die Eigenschaft eines Stoffes, durch Zersetzung von Lebewesen bis zur Mineralisierung abgebaut werden zu können. Da die Definition der Bioabbaubarkeit keine zeitliche Begrenzung enthält, stellt sie eine inhärente Eigenschaft eines jeweiligen Stoffes dar. In Deutschland wird die Bioabbaubarkeit eines Stoffes über den Standard ISO 14855 festgelegt.[172] Die Definition der Kompostierbarkeit bezeichnet hingegen die Fähigkeit eines Stoffes, in einer definierten Zeit unter genau festgelegten und kontrollierten Kompostierbedingungen zersetzt zu werden. Die für eine Zertifizierung als kompostierbar notwendigen Anforderungen sind in den Standards EN 13432 und EN 14995 genauer festgelegt.[173, 174] Sie umfassen die Bestimmung und Bewertung der Biodegradation, Desintegration und Ökotoxizität. Bisher wurde die Umweltbelastung von bioabbaubaren und kompostierbaren Polymeren nur in geringem Maße untersucht. Es wird jedoch angenommen, dass sie als MP-Quelle dienen können, falls sie in aquatische Systeme gelangen.[95, 107, 175]

### 2.3.5. Biologische Konsequenzen

Durch das steigende Interesse an MP in aquatischen Systemen beschäftigten sich auch mehrere Gruppen mit den Konsequenzen der MP-Aufnahme durch unterschiedliche Organismen. Zunächst waren die Studien auf im Meer ansässige Wirbellose beschränkt, später wurden auch Wirbeltiere untersucht. Thompson et al.[107] setzten dem Futter von Kiemenringelwürmern verschiedenes MP mit Größen von 20  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$  zu. Die optische Auswertung der Wurmhäufen zeigte eine Aufnahme. Bei den gleichen Organismen wurden außerdem nach Exposition mit PS-Partikeln (mit Durchmessern 400 – 1300  $\mu\text{m}$ ) eine optische Analyse des Darms durchgeführt.[176] Eine weitere sehr gut untersuchte Organismenklasse sind Muscheln (*Bivalvia*). Browne et al.[177] konnten an diesen Organismen beispielsweise die Aufnahme fluoreszenzmarkierter PS-Partikel (3.0  $\mu\text{m}$  und 9.6  $\mu\text{m}$  Durchmesser) zeigen. Die Partikel wurden nach der Aufnahme auch in die Hämolymphe

(Körperflüssigkeit) transloziert. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Anzahl an Partikeln in der Hämolymphe 12 Tage nach der Aufnahme maximal ist und die Partikelgröße einen großen Einfluss auf die Verlagerung hat. Eine andere Studie beschäftigte sich mit dem MP-Vorkommen in Muscheln, welche für den menschlichen Verzehr gezüchtet wurden.[178] Hierfür wurden einige Muscheln direkt aufgeschlossen, während andere drei Tage in sauberem Wasser gehalten wurden, um einen Austausch des Darminhalts zu gewährleisten. Einige nach dem Aufschluss gefundene Partikel wurden mittels RM identifiziert. Ohne Darmreinigung wurden  $0.36 \pm 0.07$  Partikel/g bzw.  $0.47 \pm 0.16$  Partikel/g je nach untersuchter Muschelunterart gefunden. Die Werte nach der Reinigung waren deutlich geringer ( $0.24 \pm 0.07$  bzw.  $0.35 \pm 0.005$  Partikel/g). Da nach der Reinigung vor allem kleine Partikel ( $<25 \mu\text{m}$ ) vorhanden waren, schlussfolgerten die Autoren, dass obwohl Muscheln auch größere Partikel aufnehmen können, ausschließlich kleinere in das Gewebe transloziert werden können. Andere Studien untersuchten Seegurken,[98] Hummer,[141] Tintenfische,[179] Krebstiere,[180] Zooplankton[127, 181] und Strandflöhe.[182] Bei den Wirbeltieren wurden vor allem Fische[142, 143, 183] und Seevögel[184–186], aber auch Wale[176, 187] und Robben[188, 189] untersucht. Boerger et al. fanden in 35% aller untersuchten Fischdärme Plastik. Die meisten Partikel waren hierbei jedoch größer als 5 mm und daher kein MP. Zusätzlich wurde ausschließlich eine optische Identifizierung verwendet, wodurch die Ergebnisse für kleinere Partikel nicht verlässlich sind.[176] Ramos et al. berichteten, dass in 13.4% der untersuchten Fische blaue Fasern vorhanden waren, welche sie als Polyamidfasern beschrieben. Es wurde jedoch keine aussagekräftige Identifizierung zur Unterscheidung von Polyamid und Cellulose durchgeführt.[183] Collard et al. führten erstmals eine Abtrennung von MP aus Fischmägen mit anschließend durchgeführter spektroskopischer Identifizierung durch. Sie konnten mittels RM zeigen, dass es sich nur bei 11 von 35 Partikeln und Fasern, welche zuvor optisch aussortiert wurden, tatsächlich um MP handelte. Die restlichen Partikel und Fasern bestanden hauptsächlich aus Cellulose.[143]

Die MP-Partikel können sich in Organismen nach der Aufnahme anreichern, wo sie direkte physikalische Schäden wie innere Abschürfungen, Verstopfungen und Wunden hervorrufen können, welche in einer Schwächung, Hungern und Tod resultieren können.[93, 96, 190, 191] Zusätzlich beinhalten gängige Plastiksarten eine Vielzahl an Additiven wie Weichmachern, Stabilisatoren, Pigmenten, Füllmitteln und Antiflammmitteln, welche oftmals toxisch, kanzerogen oder endokrin wirksam sind.[112] Diese Stoffe können aus den Kunststoffen ausgewaschen werden und sich in der Umwelt anreichern. Auf Grund des hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses und der besonderen Oberflächenbeschaffenheit des MPs können sich zusätzlich auch Schadstoffe aus der Umwelt an den Partikeln anreichern, wie bereits für Schwermetalle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) gezeigt

## 2. Theoretische Grundlagen

wurde.[192–196] Rochman et al. konnten nachweisen, dass angereicherte Schadstoffe vom MP auf Organismen übergehen können.[197] Sie zeigten, dass die Werte für PAHs, PCBs und Polybromierte Diphenyle (PBDEs) in den Organismen deutlich erhöht sind, falls diese MP marinen Ursprungs ausgesetzt wurden. Andere Studien vermuten jedoch einen vernachlässigbar geringen Einfluss von MP auf die Schadstoffkonzentration in den Organismen.[198, 199]

Es wurde weiterhin gezeigt, dass sich auch potentiell pathogene Mikroorganismen an der MP-Oberfläche anreichern konnten. Zettler et al.[200] fanden einen Biofilm auf MP-Partikeln aus dem Nord-Pazifik, welcher sich deutlich von der Artengemeinschaft im Meer unterschied. Einige Mikroorganismen im Biofilm wurden als potentiell pathogen eingestuft.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Vorkommen von MP und die Aufnahme in Organismen näher untersucht werden. Da sich die meisten Studien auf marine Systeme beschränken, sollten hier Binnengewässer im Fokus stehen. So wurde das MP-Vorkommen anhand des Gardasees in Italien mit besonderem Fokus auf Partikel  $<50 \mu\text{m}$  bestimmt. Zusätzlich sollte die Aufnahme von MP durch Süßwassermuscheln überprüft werden. Dazu sollte zunächst ein geeigneter Aufschluss des Muschelgewebes entwickelt und die Raman-Analytik optimiert werden. Im Anschluss war die Analyse von Organismen, welche MP ausgesetzt waren, geplant. Weiterhin sollten auch Muscheln aus realen Umweltbedingungen untersucht werden. Auch die Evaluierung von MP in Bier war geplant.



# 3. Experimenteller Teil

## 3.1. Raman-Mikrospektroskopie

Die im Rahmen dieser Arbeit diskutierten Raman-Analysen wurden an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt: dem Horiba LabRAM HR und dem RENISHAW 2000. Der theoretische Aufbau eines Raman-Mikroskops ist in Kapitel 2.1.3 genauer beschrieben. Im Folgenden soll auf die gerätspezifischen Eigenschaften eingegangen werden.

In das verwendete LabRAM HR Raman Microscope System („LabRam“, Horiba Jobin Yvon, Japan, siehe Abbildung 3.1a) können drei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen  $\lambda_0$  durch entsprechende Spiegel eingekoppelt werden. Es stehen ein frequenzverdoppelter Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) mit  $\lambda_0 = 532$  nm und einer Ausgangsleistung von  $P_0 = 80$  mW, ein Helium-Neon-Laser (He-Ne-Laser) mit  $\lambda_0 = 633$  nm und  $P_0 = 40$  mW und ein Diodenlaser mit  $\lambda_0 = 785$  nm und einer Ausgangsleistung von  $P_0 = 360$  mW zur Verfügung. Der jeweilige Laserstrahl wird an mehreren Spiegeln reflektiert und passiert einen Bandpassfilter, welcher entsprechend der Wellenlänge gewählt wird. Es gelangt jeweils nur ein geringer Anteil der Ausgangsleistung  $P_0$  zu der Probe ( $P_p(532 \text{ nm}) = 16.4$  mW,  $P_p(633 \text{ nm}) = 12.6$  mW,  $P_p(785 \text{ nm}) = 66$  mW, jeweils mit  $10\times$ -Objektiv). Im Falle empfindlicher Proben kann die Laserleistung durch die Wahl eines geeigneten optischen Dichtefilters weiter reduziert werden. Im System sind insgesamt sechs Filter (Abschwächung auf 50%, 25%, 10%, 1%, 0.1% und 0.01% der ursprünglichen Laserleistung) verbaut, die durch die Software ausgewählt werden können. Nach Reflexion an weiteren Spiegeln sowie an entsprechenden Kanten- bzw. Kerbfilter wird der Laserstrahl durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Es stehen insgesamt sieben Objektive (Olympus, Deutschland) mit verschiedenen

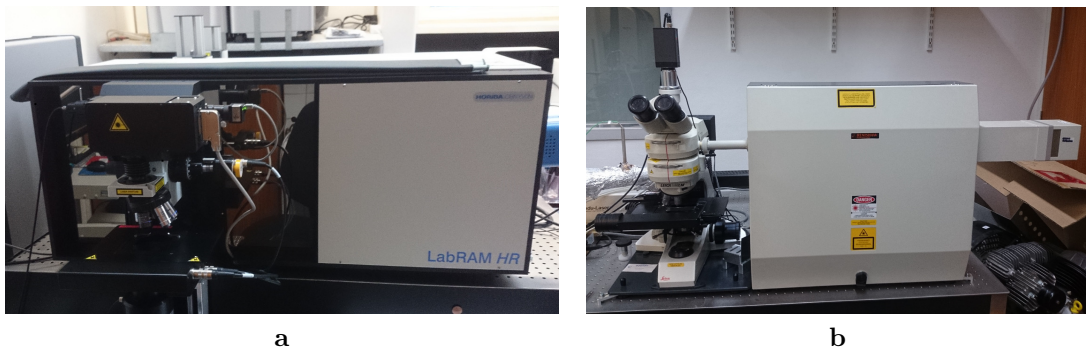


Abb. 3.1.: (a) Horiba LabRam HR; (b) RENISHAW 2000.

### 3. Experimenteller Teil

Vergrößerungen zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die Objektive mit 4 $\times$ -, 10 $\times$ -, 50 $\times$ - und 100 $\times$ -Vergrößerung sowie ein 50 $\times$ -Objektiv mit langem Arbeitsabstand (50 $\times$ -LWD, von *engl.*: long working distance) verwendet. Die entsprechenden numerischen Aperturen betragen  $NA_{4\times} = 0.1$ ,  $NA_{10\times} = 0.25$ ,  $NA_{50\times} = 0.75$ ,  $NA_{100\times} = 0.9$  und  $NA_{50\times\text{LWD}} = 0.50$ . Das von der Probe gestreute Signal wird anschließend in einer 180 $^\circ$ -Rückstreugeometrie gesammelt und trifft erneut auf den Kanten- bzw. Kerbfilter. Es sind für alle Anregungswellenlängen (532 nm, 633 nm und 785 nm) Kantenfilter vorhanden. Zusätzlich kann bei der Anregungswellenlänge von 633 nm ein Kerbfilter verwendet werden, falls die Anti-Stokes-Streuung von Interesse ist. Über weitere optische Elemente wird das gestreute Licht schließlich in das Spektrometer geleitet, wo es durch ein optisches Gitter in die einzelnen Wellenlängen aufgeteilt wird. Die Strichdichte des optischen Gitters und die Länge des Strahlengangs im Spektrometer (800 mm) bestimmen hierbei die spektrale Auflösung des Raman-Mikroskops. Es kann zwischen Gittern mit Strichdichten von 300, 600 und 1800 Linien/mm gewählt werden. Dabei muss beachtet werden, dass durch die Wahl höherer Strichdichten neben der Auflösung auch die Messzeit deutlich erhöht wird. In dieser Arbeit wurde daher ausschließlich das Gitter mit 600 Linien/mm gewählt, da es die beste Kombination aus Messzeit und Auflösung darstellt. Das nach Wellenlängen aufgespaltene Licht trifft auf eine Peltier-gekühlte CCD-Kamera (*engl.*: charge-coupled device, übersetzt etwa ladungsgekoppeltes Bauteil) mit 1024 $\times$ 256 Pixeln, die die einzelnen Intensitäten detektiert und die Daten an einen Computer mit entsprechender Software (LabSpec 5 bzw. LabSpec 6, Horiba Jobin Yvon, Japan) weiterleitet. Das System besitzt zusätzlich eine Duoscan-Einheit, welche in den Strahl eingekoppelt werden kann und mittels zweier Spiegel den Laserfokus gleichmäßig über einen zuvor festgelegten Bereich lenkt. Dadurch ist zusätzlich zur normalen Punktmessung eine Mittelung über größere Bereiche möglich. Die Kalibrierung des LabRAM-Systems erfolgte auf die nullte spektrale Ordnung des Gitters, welche der Spiegelreflexion entspricht sowie auf die charakteristische Phononenbande erster Ordnung eines Siliziumwafers bei 520.7 cm $^{-1}$ . Sie wurde täglich vor der Verwendung des Systems, sowie in regelmäßigen zeitlichen Abständen zwischen den Analysen, durchgeführt.

Das RENISHAW 2000-System („Renishaw“, Renishaw, Großbritannien) kann mit einem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda_0 = 514$  nm und  $P_0 = 25$  mW), einem He-Ne-Laser ( $\lambda_0 = 633$  nm und  $P_0 = 40$  mW) und einem Diodenlaser ( $\lambda_0 = 785$  nm und  $P_0 = 40$  mW) verwendet werden. Die Laserstrahlen werden durch einen Bandpassfilter über Spiegel am Kantenfilter reflektiert und durch das optische Mikroskop (Leica, Deutschland) auf die Probe fokussiert. Dabei stehen Objektive mit 5 $\times$ -, 20 $\times$ -, 50 $\times$ - und 100 $\times$ -Vergrößerung mit numerischen Aperturen von  $NA_{5\times} = 0.12$ ,  $NA_{20\times} = 0.4$ ,  $NA_{50\times} = 0.75$  und  $NA_{100\times} = 0.9$  zur Verfügung. Das gestreute Licht passiert das Mikroskop und trifft auf den Kantenfilter, der die Anti-Stokes- und Rayleigh-Streuungen herausfiltert. Durch einen verstellbaren Spalt

gelangt das Licht in das Spektrometer, wo es durch ein Gitter mit einer Strichdichte von 1800 Linien/mm dispergiert und mittels einer CCD-Kamera mit  $578 \times 385$  Pixeln detektiert wird. Die Daten werden an einen Computer übertragen und mit der Software WiRE (Renishaw, Großbritannien, basierend auf GRAMS 32, Thermo Galactic, USA) aufgenommen und gespeichert. Die Kalibrierung des Renishaw-Systems erfolgte auf die Phononbande erster Ordnung von Si ( $520 \text{ cm}^{-1}$ ).

## 3.2. Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie

Im Rahmen des Projektes „Securing agricultural productivity by improving the soil water holding capacity (SOWAT)“ der International Graduate School of Science and Engineering (IGGSE) der Technischen Universität München sollten in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bodenkunde, TUM (LfB) die Einflüsse von verkohltem Material auf die Wasserrückhaltefähigkeit genauer untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie (SIRM) für organische Bodensubstanzen wie z.B. Huminsäuren entwickelt und optimiert werden. Weiterhin sollte die SIRM mittels Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (IRMS) (in Kooperation mit dem Institut für Grundwasserökologie, Helmholtz-Zentrum München (IGOE)) validiert und mit Nano-Sekundärionen-Massenspektrometer (NanoSIMS) verglichen werden.

### 3.2.1. $^{13}\text{C}$ -markierte Kohle aus Pyrolyse

Im Rahmen einer Kooperation mit Cornelia Rumpel vom Laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Frankreich, wurde eine  $^{13}\text{C}$ -markierte Holzkohle bereitgestellt. Diese wurde durch Pyrolyse von zuvor mit  $^{13}\text{CO}_2$  gezüchtetem Knäuelgras (*Dactylis*) erzeugt. Der genaue Isotopengehalt ist Gegenstand von laufenden Untersuchungen der Projektpartner.

Zum Vergleich wurden eine weitere Holzkohle und zwei Ruße untersucht. Die Holzkohle wurde durch Pyrolyse von Fichtenästen für 10 min bei  $500^\circ\text{C}$  hergestellt. Als Ruße wurden Graphitfunkenruß (GfG-Ruß) und kommerziell erhältlicher Hochleitfähigkeitsruß Printex XE2 (Degussa, Deutschland) gewählt. Der GfG-Ruß stellt ein Referenzmaterial für Ruße mit vergleichbar geringer struktureller Ordnung dar. Er wurde mittels eines Graphitfunkengenerators (GFG 1000, Palas GmbH, Deutschland; Graphitelektroden mit Durchmesser 6 mm,  $>99.9994\%$  Kohlenstoff, Alfa Aesar, USA) bei einem Argonvordruck von 1.4 bar und einer Funkenentladungsfrequenz von 300 Hz hergestellt und auf einem Quarzfaserfilter (Tissuquartz Pallflex, Pall Life Sciences, USA) gesammelt. Der XE2-Ruß wurde als Beispiel für einen Ruß mit hoher struktureller Ordnung gewählt.

### 3. Experimenteller Teil

Die RM-Analyse erfolgte mit dem LabRam-System. Dabei kamen der He-Ne-Laser, der optische Dichtefilter von 1% (Laserleistung an Probe: 126  $\mu$ W), das 50 $\times$ -Objektiv und eine Aufnahmezeit von 250 s zur Anwendung (vgl. Kapitel 3.1). Es wurden einige Milligramm der Holzkohle bzw. des XE2-Rußes auf einen Objektträger (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) platziert und untersucht. Die Analyse des GfG-Rußes erfolgte direkt auf dem Quarzfilter.

#### 3.2.2. Synthese künstlicher Huminsäuren

**Tab. 3.1.:** Bei der Synthese von Stabilisotopen-markierten künstlichen Huminsäuren verwendete Bezeichnungen, Mengen an Edukten sowie der theoretische Anteil an  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  ( $\text{C}_{\text{ges}}$  = Gesamtmenge an Kohlenstoff) in den Produkten.

Bezeichnung	$^{13}\text{C}$ - Glucose in g	$^{12}\text{C}$ - Glucose in g	$^{13}\text{C}$ - Harnstoff in g	$^{12}\text{C}$ - Harnstoff in g	Theoret. Anteil an $^{13}\text{C}$
HS1	0.000	5.000	0.000	0.094	0.010
HS2.5	0.012	0.488	0.002	0.091	0.025
HS5	0.022	0.477	0.005	0.089	0.057
HS10	0.048	0.464	0.009	0.081	0.107
HS15	0.062	0.438	0.075	0.429	0.143
HS25	0.121	0.387	0.023	0.068	0.255
HS35	0.168	0.332	0.031	0.062	0.350
HS50	0.242	0.258	0.045	0.045	0.500
HS75	0.369	0.131	0.069	0.024	0.750
HS99	0.500	0.000	0.090	0.000	0.990

Weiterhin wurde unmarkierte (natürliche Abundanz, 1.1%  $^{13}\text{C}$ -Gehalt) künstliche Huminsäure (HS1) nach der Vorschrift von Kumada [201], welche von Hayakawa und Nonomura [202] erweitert wurde, synthetisiert. Dazu wurden 0.500 g Glucose-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , natürliche Isotopenabundanz, Merck KGaA, Deutschland) und 0.094 g Harnstoff ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ , natürliche Isotopenabundanz, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) mit 5 mL einer 1:1 (V/V)-Mischung aus rauchender Salzsäure (37%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) und Wasser (Milli-Q, Millipore, Merck KGaA, Deutschland) versetzt. Die Lösung wurde 5 h unter Rückfluss bei ca. 100°C gerührt. Die nun braun gefärbte Lösung wurde mit 5 mL Wasser verdünnt und der erhaltene Niederschlag mittels Zentrifugation (Centrifuge Universal 320R, 1700g, 15 min) abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen mit 10 mL 0.05 M HCl-Lösung wurde der Niederschlag in 5 mL 2%iger NaOH-Lösung

(hergestellt aus NaOH-Pellets, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) gelöst und in eine gereinigte Petrischale (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) überführt. Die Probe wurde 2 Tage in einem mit Orangegel (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gefüllten Exsikkator an Luft getrocknet und anschließend bei 7°C unter Lichtausschluss bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die Synthese der  $^{13}\text{C}$ -markierten HS erfolgte analog, indem das Verhältnis von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{12}\text{C}$ -Glucose bzw. Harnstoff entsprechend angepasst wurde. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Bezeichnungen, Mengen an Edukten sowie der theoretische Anteil an  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  der markierten künstlichen Huminsäuren dargestellt. HS1 wurde dabei in vierfacher Wiederholung synthetisiert, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Alle weiteren HS wurden aus Kostengründen einfach synthetisiert.

#### 3.2.3. SIRM-Analyse

Zunächst sollte eine Analysemethode für SIRM entwickelt werden, die eindeutige, reproduzierbare Spektren der HS liefert. Dabei sollte vor allem nach einer Methode gesucht werden, die den überlagernden Fluoreszenzuntergrund in den Spektren minimiert. Verwendet wurde bei allen Analysen das LabRam-System (vgl. Kapitel 3.1). Es wurden dazu jeweils einige Milligramm der Probe auf einen Objektträger (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gegeben. Die Analysen erfolgten in 10-facher Wiederholung.

#### Analyse bei unterschiedlichen Wellenlängen

Zunächst wurden die Proben unter Verwendung aller verfügbarer Laser (frequenzverdoppelter Nd:YAG- (532 nm), He-Ne-Laser (633 nm) sowie Dioden-Laser (785 nm)) und 50×-Objektiv untersucht. Dabei wurden geeignete optische Dichtefilter (10% bzw. 1%) verwendet, um eine Degradation der Probe zu vermeiden. Die Probe wurde vor der SIRM-Analyse zunächst für 600 s mit dem Laserlicht bestrahlt, um eine Photodegeneration der Fluorophore in der Probe zu erreichen (sogenanntes „Bleaching“). Die Messzeit betrug je nach Laser und Probe 10 – 1000 s. Es wurden die Proben HS1, HS10, HS25, HS50 sowie HS99 untersucht.

#### SERS

Die Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) wurde ebenfalls auf ihre Eignung zur Fluoreszenzvermeidung hin untersucht. Die benötigten Kolloide wurden nach der Methode von Leopold und Lendl[203], welche von Knauer et al.[204] optimiert wurde, hergestellt. Dafür wurden 17 mg (0.1 mmol)  $\text{AgNO}_3$  (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) in 10 mL Milli-Q-Wasser (Milli-Q,

### 3. Experimenteller Teil

Millipore, Merck KGaA, Deutschland) gelöst. Zusätzlich wurden 50 mL Reduktionsmittel aus 6.8 mg (0.8 mmol) Hydroxylammoniumchlorid ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und 1.65 mL 0.1 M NaOH-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) in MilliQ-Wasser hergestellt. 9 mL des Reduktionsmittels wurden in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) vorgelegt und mit 1 mL der  $\text{AgNO}_3$  versetzt. Um eine Mischung zu gewährleisten, wurde das Zentrifugenröhrchen einmal invertiert. Die erhaltende Kolloidsuspension wurde anschließend bei 4°C unter Lichtausschluss bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Analyse wurden 5 mg der jeweiligen HS in 900  $\mu\text{L}$  MilliQ-Wasser und 100  $\mu\text{L}$  2%iger NaOH-Lösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gelöst. 50  $\mu\text{L}$  der HS-Lösung wurden mit 50  $\mu\text{L}$  der AgNP-Suspension vermischt. 10  $\mu\text{L}$  der so erhaltenen Lösung wurden auf einem Si-Wafer platziert und an Luft getrocknet. Die Raman-Analyse erfolgte mittels des He-Ne-Lasers (633 nm) unter Verwendung eines optischen Dichtefilters (1% bzw. 10%), einer Messzeit von 100 – 500 s und einem spektralen Bereich von 800 – 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Je nach Methode erfolgte die Analyse mit 50 $\times$ - bzw. 10 $\times$ -Objektiv.

#### **Anti-Stokes-Fluoreszenz**

In einem ersten Versuch wurde die Evaluation der Anti-Stokes-Fluoreszenz an drei Proben durchgeführt, welche ein genau definiertes Raman-Signal sowie einen Fluoreszenzuntergrund zeigten. Bei vielversprechenden Ergebnissen kann die Anti-Stokes-Fluoreszenz dann auch auf HS angewandt werden. Verwendet wurden Acetylsalicylsäure (ASS, pharmazeutische Reinheit), ein Polypropylenautoklavierbeutel (PP, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) und ein Müllbeutel aus Polystyrol, der mit Pigment Grün 7 eingefärbt ist (PS, „Swirl Öko“, Melitta Europe GmbH, Deutschland). Die Anti-Stokes(AS)-Analyse erfolgte mit dem Horiba-System mittels He-Ne-Laser (633 nm) unter Verwendung des Kerbfilters und eines Objektivs mit 50 $\times$ -Auflösung. Die Spektren wurden im Bereich von -2000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  bei einer Analysezeit von 200 s und 10% optischer Dichte aufgenommen.

Zusätzlich wurde die PS-Probe bei allen verfügbaren Anregungswellenlängen (532 nm, 633 nm, 785 nm mit Kantenfilter, 633 nm mit Kerbfilter) bei 50 $\times$ -Vergrößerung, 10% optischer Dichte und einer Messzeit von 200 s untersucht. Der spektrale Bereich betrug 50 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Kantenfilter) bzw. -2000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Kerbfilter). Eine weitere Untersuchung der PS-Probe erfolgte mit He-Ne-Laser und Kerbfilter bei unterschiedlichen Laserleistungen (1%, 10%, 25%, 50%, 100% optische Dichte). Dazu wurden ebenfalls das 50 $\times$ -Objektiv und ein spektraler Bereich von -2000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  verwendet. Um Photobleachingeffekte zu vermeiden, wurde darauf geachtet die Probe mit aufsteigender Laserleistung zu untersuchen.

Zusätzlich wurde die DuoScan-Einheit in einem Bereich von  $20 \times 20 \mu\text{m}$  verwendet, um den Laserstrahl und damit die Laserleistung auf eine größere Fläche zu verteilen.

#### Temperaturabhängige RM

Um eine temperaturabhängige Abnahme der Fluoreszenz zu untersuchen, wurden Raman-Spektren von HS1 bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Dazu wurde ein beheizbarer Objektisch (LinkamTHMS600, Linkam Scientific Instruments Ltd., UK) auf dem Mikroskopiertisch des LabRam-Systems befestigt. Der beheizbare Objektisch besteht aus einem Metallgehäuse, in dem sich ein Silberblock befindet, der mit einer elektrischen Heizung und einem Thermoelement verbunden ist. Nach Einbringen der Probe zwischen zwei Quarzgläsern kann die Temperatur über ein externes Kontrollelement gesteuert werden. Über das  $50\times$ -LWD-Objektiv wird der Laserstrahl des Raman-Systems auf die Probe im beheizbaren Objektisch fokussiert. Die Probe wurde zunächst auf eine Ausgangstemperatur von 298 K temperiert und anschließend bei einer Heizrate von 6 K/min auf 873 K erhitzt. Dabei wurden konsekutiv Spektren mit 100 s Analysezeit aufgenommen, so dass ein Spektrum über einen Bereich von 10 K mittelt. Es wurden eine Anregungswellenlänge von 532 nm und 1% optische Dichte verwendet.

#### Prägraphitisierung

Weiterhin wurde eine Prägraphitisierung der Proben mit hohen Laserleistungen untersucht. Dazu wurden die Proben auf einen Objektträger platziert und unter Verwendung des frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasers (532 nm, ohne optischen Dichtefilter) sowie des  $50\times$ -Objektiv analysiert. Die hohe Laserleistung (12.6 mW) führte zu einem Zersetzen der Fluorophore. Über die erhaltenen Spektren kann die Isotopenzusammensetzung der HS bestimmt werden. Die SIRM-Analyse erfolgte dabei mit einer spektralen Breite von 800 bis  $2000 \text{ cm}^{-1}$  und einer Aufnahmezeit von 10 s. Untersucht wurden drei Replikate von HS1 sowie alle anderen synthetisierten Proben (siehe Tabelle 3.1).

#### 3.2.4. Spektrenbearbeitung

Grundsätzlich durchliefen die Spektren (mit Ausnahme der Anti-Stokes-Spektren) zunächst eine lineare Basislinienkorrektur und eine Normierung auf den G-Peak. Dazu wurde mithilfe der Software Matlab (R2014b, The MathWorks Inc., USA) eine Gerade an alle Punkte zwischen  $800 - 850 \text{ cm}^{-1}$  sowie  $1900 - 2000 \text{ cm}^{-1}$  angepasst und vom Spektrum subtrahiert. Für Spektren mit hohem Fluoreszenzuntergrund wurde zusätzlich vor der Basislinienkorrektur mithilfe der gerätspezifischen Software

### 3. Experimenteller Teil

(LabSpec 5 bzw. LabSpec 6, Horiba, Japan) eine Korrektur durchgeführt, um unerwünschte Interferenzeffekte der CCD-Kamera (sogenanntes *Ethalonging*) zu entfernen. Anschließend wurde ein Fünfbandenfit nach der Methode von Sadezky et al.[28] (vgl. Kapitel 2.1.4) im Rahmen einer Regressionsanalyse mithilfe der Software Matlab durchgeführt. Hierfür wurden Lorentz-Kurven für die D1-, D2-, D4- und G-Banden und eine Gaußkurve für die D3-Bande verwendet. Aus den erhaltenen Fits wurde die Position des Maximums des G-Peaks bestimmt. Anschließend wurden die Werte der Einzelmessungen ( $m = 10$ ) gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Die gemittelten Werte der G-Peak-Verschiebung wurden gegen das  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnis aufgetragen und eine lineare Regression mithilfe der Software Origin 9.0 (OriginLab Cooperation, USA) durchgeführt. Die Nachweisgrenze (NG) wurde dabei nach der von DIN 32645 festgelegten Kalibriergeradenmethode durchgeführt.[205] Die NG ist definiert als

$$x_{\text{NG}} = \frac{s_{y,x}}{b} \cdot t_{f,a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} . \quad (3.1)$$

Hierbei entspricht  $n$  der Anzahl an Kalibrierpunkten und  $m$  der Anzahl an Wiederholungsmessungen an einem Kalibrierpunkt.  $b$  ist die Steigung der Kalibriergeraden,  $t_{f,a}$  das Quantil der Student-t-Verteilung bei  $f$  Freiheitsgraden und einem Signifikanzniveau von  $\alpha$  und  $\bar{x}$  das arithmetische Mittel der Werte aller Kalibrierproben.  $s_{y,x}$  bezeichnet die Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung. Sie ist definiert als

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}} , \quad (3.2)$$

während die Summe der Abweichungsquadrate von  $x$   $Q_x$  mit

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_i) , \quad (3.3)$$

mit den Gehaltsgrößen  $x_i$  berechnet werden kann. Die Verfahrensstandardabweichung  $s_0$ , welche ein Maß für die Präzision und Empfindlichkeit der Kalibrierung darstellt, ergibt sich aus dem Quotienten der Reststandardabweichung  $s_{y,x}$  und der Steigung  $b$

$$s_0 = \frac{s_{y,x}}{b} . \quad (3.4)$$

Die Bestimmungsgrenze (BG) der Kalibrierung gibt die kleinste Konzentration an, bei der eine Quantifizierung mit festgelegter Präzision (normalerweise 95%)



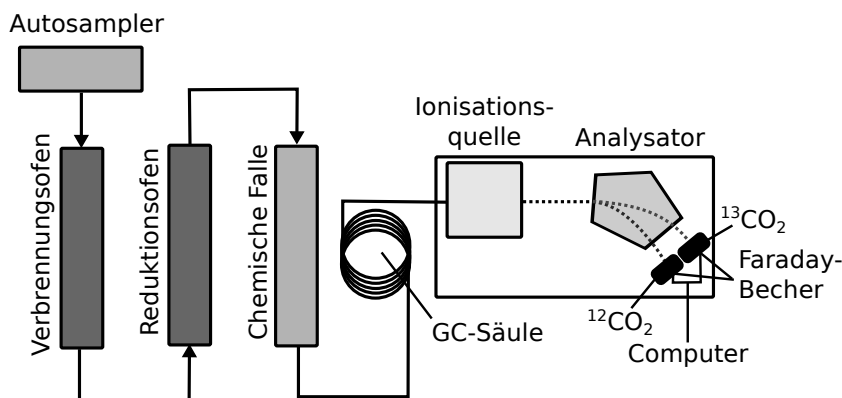


Abb. 3.2.: Schematischer Aufbau eines EA-IRMS. Nach [206].

erfolgen kann. Sie ist definiert als

$$x_{BG} = k \cdot s_0 \cdot t_{f,a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(kx_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}}. \quad (3.5)$$

$k$  ist dabei eine frei wählbare Variable, die die Präzision angibt. Sie wird im Allgemeinen auf 3 festgesetzt.

### 3.2.5. Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)

Zur Bestimmung des Isotopengehalts der Proben mit einem unabhängigen Verfahren wurde die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS, von *engl.* isotope ratio mass spectrometry) angewandt. Die Analyse wurde von Ramona Brejcha und Dr. Martin Elsner am Institut für Grundwasserökologie, Helmholtz-Zentrum München (IGOE), durchgeführt. Ein IRMS-Spektrometer ist aus fünf grundlegenden Bestandteilen aufgebaut: einem System zu Probeneinführung, einer Ionisationsquelle, einem Magnetsektoranalysator, einem Faraday-Becher zur Detektion und einem Computer zur Datenauswertung (vgl. Abbildung 3.2).[206] Die am häufigsten verwendeten Systeme zur Probeneinführung sind der Elementanalysator (EA), der die Isotopenanalyse der Gesamtprobe ermöglicht, sowie eine an das MS gekoppelte Gaschromatographie (GC), wodurch eine chromatographische Auftrennung der Probe erreicht wird. Somit können zusätzliche Informationen über die Probenzusammensetzung gewonnen werden. Auch Flüssigchromatographiesysteme (LC, von *engl.*: liquid chromatography) werden in den letzten Jahren vermehrt verwendet, spielen zur Zeit jedoch eine untergeordnete Rolle.[206, 207] In dieser Arbeit wird die EA-IRMS verwendet, bei der die Probe direkt in eine Zinn- oder Silberkapsel gegeben und anschließend in einen Verbrennungsofen transportiert wird, in dem der Gesamtkohlenstoff der Probenbestandteile zu  $\text{CO}_2$  oxidiert wird. Um störende Nebenprodukte wie Stickoxide zu entfernen, wird ein Reduktionsofen verwendet. Der Analyt durchläuft im Anschluss eine chemische Falle, die Wasser entfernt und

### 3. Experimenteller Teil

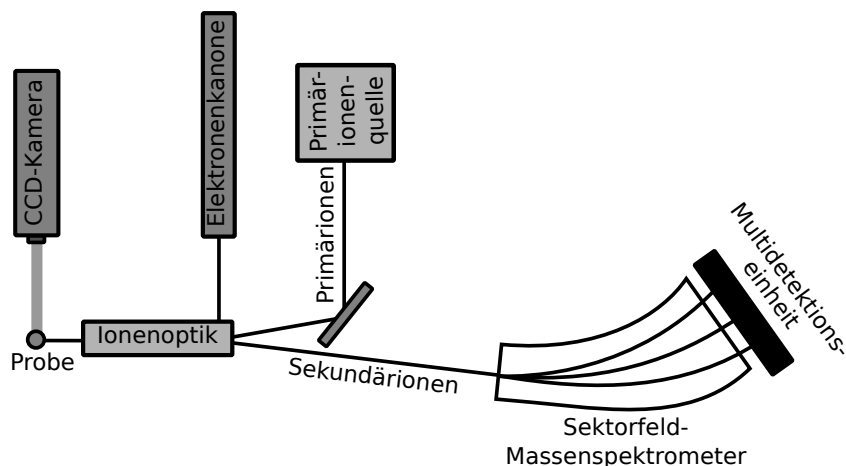


Abb. 3.3.: Vereinfachter schematischer Aufbau eines NanoSIMS. Nach [209].

eine GC-Säule, welche das  $\text{CO}_2$  von dem bei der Reduktion entstandenen Stickstoff trennt, bevor es in das Massenspektrometer eingeleitet wird. Das MS trennt die Pyrolyseprodukte des Analyten nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) auf.[206]

#### 3.2.6. Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS)

Die Funktionsweise der Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS) ist in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Ein stark vereinfachter schematischer Aufbau des verwendeten NanoSIMS-Systems ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Sämtliche NanoSIMS-Analysen wurden von Dr. Carsten Müller am Lehrstuhl für Bodenkunde, Technische Universität München, durchgeführt. Dazu wurde am Cameca NanoSIMS 50 L (Cameca, Frankreich) ein  $\text{Cs}^+$ -Primärionenstrahl mit 16 keV Aufprallenergie auf die Probe fokussiert. Die Ionen  $^{12}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^-$ ,  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_2^-$ ,  $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^-$ ,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  und  $^{35}\text{Cl}^-$  wurden mittels Sekundärelektronenvervielfacher in einer Fläche von  $10 \times 10 \mu\text{m}$  mit einer Auflösung  $256 \times 256$  Pixeln detektiert. Insgesamt wurden 40 Schichten mit einer Verweilzeit von 1 ms pro Pixel analysiert. Nach Korrektur der Daten um die Totzeit von 1 ns wurden alle Schichten zueinander unter Verwendung des Look@NanoSIMS-Tools[208] für Matlab (R2014b, The Mathworks Inc., USA) ausgerichtet und akkumuliert. Mit Hilfe des interaktiven ROI-Werkzeugs des Look@NanoSIMS-Tools wurden die Isotopenverhältnisse der einzelnen Stellen berechnet.

### 3.3. Fraktionierung von Bodenproben

Die physikalische Fraktionierung und NMR-spektroskopische Analyse der Bodenproben wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bodenkunde, Technische Universität München (LfB) von Lydia Paetsch durchgeführt.

#### 3.3.1. Probennahme

Die Proben stammten aus dem Langzeit-Feldversuch „SOERE ACCB“ des INRA (National Institute of Agricultural Research) in Lusignan, Frankreich. Im Mai 2012 wurde auf 4 der insgesamt 8 Flächen durch Pyrolyse von Mais (40 min bei 1200°C) gewonnene Holzkohle in einer Konzentration von 3 kg/m<sup>2</sup> bis zu einer Tiefe von 10 cm eingebracht. Die weiteren 4 Flächen dienten als Referenzen. Im Oktober 2012 wurde an diesen Flächen sowohl eine gestörte, als auch eine ungestörte (mit Erhalt der Aggregate) Probennahme durchgeführt. Die ungestörte Probennahme erfolgte mit Stechringen. Bei der gestörten Probennahme wurden innerhalb einer Fläche die oberen 10 cm des Bodens mit einer Schaufel entnommen und zu einer repräsentativen Mischprobe zusammengefasst. Die Proben wurden für die Fraktionierung getrocknet. Weiterhin wurden aus der gestörten Probe Holzkohlestücke („BC verwittert“) mit einem Spatel entnommen, mit deionisiertem Wasser gereinigt und getrocknet. Zum Vergleich wurden die feuchten Holzkohlestückchen vor der Zugabe zum Boden („BC nass“) sowie getrocknet („BC trocken“) untersucht.

#### 3.3.2. Physikalische Fraktionierung

Die physikalische Fraktionierung erfolgte nach einer publizierten Methode.[210–212] Eine theoretische Beschreibung der Fraktionierung findet sich in Kapitel 2.2.4. Es wurden jeweils 20 g der Bodenprobe zu 250 mL Natriumpolywolframat (SPT, TC Tungsten compounds, Deutschland)-Lösung mit einer Dichte von 1.8 g/L hinzugefügt und über Nacht behandelt. Nach der Entfernung von eventuell vorhandenen Wurzeln wurde das aufschwimmende fPOM (freies partikuläres organisches Material, vgl. Kapitel 2.2.4) mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch Sieben in fPOM<sub>g</sub> (groß, >20 µm) und fPOM<sub>k</sub> (klein, <20 µm) aufgeteilt. Da nur eine sehr geringe Menge an fPOM<sub>k</sub> erhalten wurde, wurde es bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Die restliche Probe wurde mittels Ultraschallbehandlung (Bandelin, Sonopuls HD220, Deutschland) dispergiert, um okkludiertes POM zu erhalten. Anschließend wurde nach Zentrifugation das schwimmende Material abgesaugt, um die oPOM-Fraktion zu erhalten, welche ebenfalls in oPOM<sub>g</sub> (>20 µm) und oPOM<sub>k</sub> (<20 µm) unterteilt wurde. Um die SPT-Lösung zu entfernen, wurden die Fraktionen mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die restliche Probenfraktion

### 3. Experimenteller Teil

wurde in mehreren Schritten gereinigt und durch Sieben bzw. Säulentrennung in Sand ( $>63 \mu\text{m}$ ), groben Schluff ( $20 \mu\text{m} - 63 \mu\text{m}$ ), mittleren Schluff ( $6.3 \mu\text{m} - 20 \mu\text{m}$ ) und kombinierten feinen Schluff und Ton (SuT,  $<6.3 \mu\text{m}$ ) unterteilt.

#### 3.3.3. Kernresonanzspektroskopie mit Kreuzpolarisation im magischen Winkel (CPMAS-NMR)

Für alle Proben wurden  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-NMR-Spektren am LfB aufgenommen (vgl. Kapitel 2.2.4). Dazu wurden die Proben in einem Bruker Avance III 200 Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Deutschland) mit 50.32 MHz und einer Rotationsgeschwindigkeit von 5 kHz gemessen. Die Kontaktzeit betrug 1 ms und die Verzögerung 1 s. Abhängig von der Probe wurden 2.000 – 250.000 Spektren akkumuliert und integriert. Die Bereiche der chemischen Verschiebung von 0 – 45 ppm, 45 – 110 ppm, 110 – 160 ppm und 160 – 220 ppm wurden Alkyl-C, O-N-Alkyl-C, Aryl-C bzw. Carbonyl-C zugeordnet.

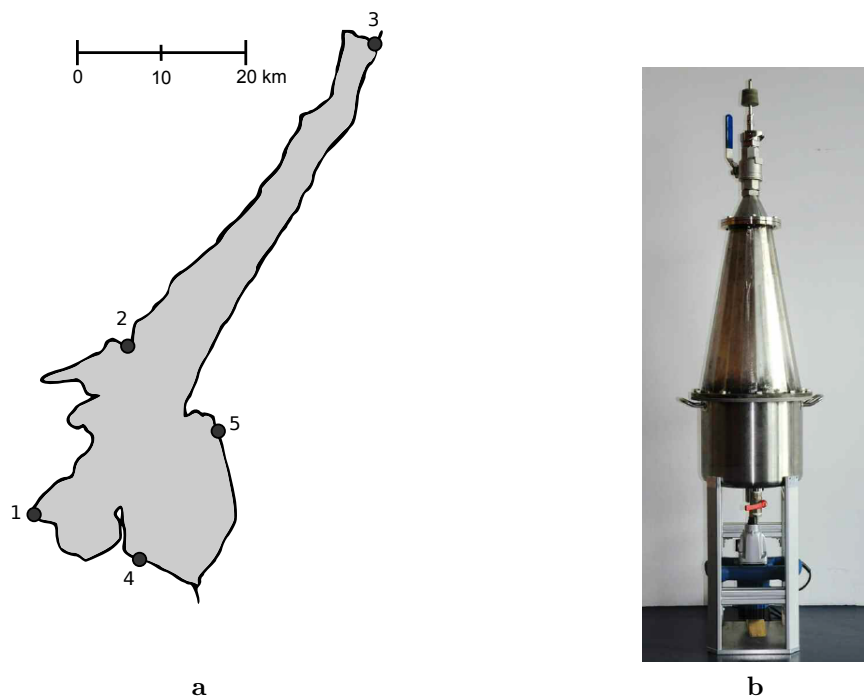
#### 3.3.4. RM-Analyse von Bodenproben

Die Raman-mikrospektroskopische Analyse wurde mit dem LabRAM-System mit He-Ne-Laser (633 nm), optischen Dichtefilter von 1% und 50 $\times$ -Objektiv durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1). Bei jeder Probe wurden fünf verschiedene Stellen für jeweils 100 s analysiert. Die erhaltenen Spektren unterliefen eine Basislinienkorrektur und wurden normiert (siehe Kapitel 3.2.4). Anschließend wurde aus den Einzelspektren ein Mittelwertspektrum für jede Fraktion gebildet. Das I(D)/I(G)-Verhältnis wurde aus den Quotienten der Maxima von D- und G-Peak bestimmt. Analysiert wurden die drei Kohlesorten („BC verwittert“, „BC trocken“, „BC nass“), sowie die Fraktionen oPOM<sub>g</sub> (großes okkludiertes partikuläres organisches Material), oPOM<sub>k</sub> (kleines oPOM) und SuT (Schluff und Ton) der Proben- bzw. Referenzfläche in zweifacher Replikation. Die restlichen Fraktionen wurden auf Grund der geringen Menge keiner Analyse unterzogen.

### 3.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern

Im Rahmen des Projektes „Kunststoffpartikel in limnischen Ökosystemen: Vorkommen und Einfluss auf aquatische Organismen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (NI 261/29-1) sollte die Mikroplastikbelastung von limnischen Gewässern am Fallbeispiel des Gardasees in Italien untersucht werden. Weiterhin sollte eine Methode entwickelt werden, um die Aufnahme von MP durch limnische Organismen am Beispiel des Süßwasserflussfloh (*Daphnia magna*) zu untersuchen. Die Probennahme und -separation wurde am Lehrstuhl für Tierökologie I der Universität Bayreuth (Dr. Hannes Imhof und Prof. Dr. Christian Laforsch) durchgeführt.

#### 3.4.1. Probennahme



**Abb. 3.4.:** (a) Beprobte Strandabschnitte am Gardasee, Italien; (b) Fotografische Aufnahme des MPSS. Aus [113].

Die Sedimentproben wurden an Stränden des Gardasees, einem subalpinen See in Oberitalien, entnommen. Durch den Tourismus ist der Gardasee für die Umgebung von großer ökonomischer Bedeutung. Weiterhin ist der Gardasee eine wichtige Quelle für die Trinkwasserversorgung in Italien. Sein Wasser wird sowohl für den häuslichen, als auch landwirtschaftlichen und industriellen Gebrauch entnommen.[213] Es wurden insgesamt fünf unterschiedliche Strände, die über das Gebiet des Gardasees

### 3. Experimenteller Teil

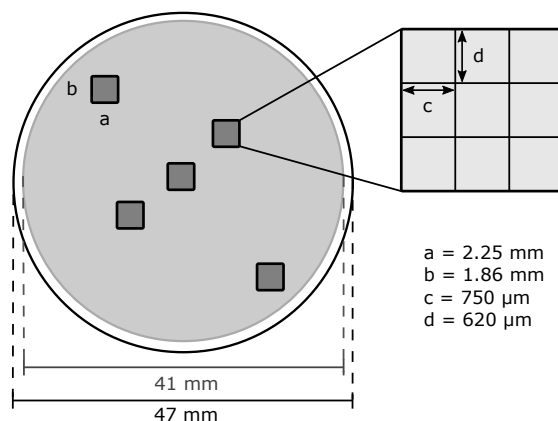
verteilt liegen, beprobt (vgl. Abbildung 3.4a). Dazu wurden an jeder Probennahmestelle 3 Replikate in der litoralen Zone auf verschiedenen Höhen (Spritzwasserzone, Treibgutlinie und Hochwasserlinie) entnommen. Die Probennahme erfolgte in einer 20 m langen Transekte, aus der im Abstand von 2 m Sedimentprobenkerne mit einem Durchmesser von 10 cm und einer Tiefe von 5 cm entnommen wurden. Insgesamt wurden so pro Probennahmestelle 4 – 6 L Sediment gewonnen.

#### 3.4.2. Dichteseparation

Die Abtrennung der Mikroplastik- und Pigmentpartikel erfolgte mittels des im Rahmen des Projektes entwickelten „Munich Plastic Sediment Separator“ (MPSS, vgl. Abbildung 3.4b). Eine genaue Beschreibung des Aufbaus und der Vorgehensweise zur Partikelseparation findet sich in Imhof et. al.;[113] hier soll nur kurz auf die an der Universität Bayreuth durchgeführten Schritte eingegangen werden.

Der MPSS wurde zunächst mit einer gesättigten Lösung von  $\text{ZnCl}_2$  (technische Reinheit, Th. Geyer, Deutschland) mit einer Dichte von 1.6 – 1.7 kg/L gefüllt. Nach der Zugabe des Sediments (2 – 6 L) wurden größere Partikel ( $>1$  mm), welche bereits auf der Lösung schwammen, aussortiert, mit  $\text{ZnCl}_2$ -Lösung gespült, um eventuell anhaftende kleinere Partikel in den MPSS zurückzuführen, und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Das Sediment wurde anschließend 3 h gerührt und 12 h behandelt, um eine vollständige Abtrennung zu gewährleisten. Bei einem geringem Anteil an organischem Material aus beispielsweise Algen, Blättern oder Biofilm wurde der obere Anteil der Suspension direkt auf Quarzfaserfilter (98% Retentionseffizienz bei 2.2  $\mu\text{m}$ , Whatman QM-A, GE Healthcare Europe, Deutschland) abgetrennt und mit einer verdünnten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (30%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) behandelt. Bei einem höheren Anteil an organischem Material wurden zunächst alle Partikel  $>500$   $\mu\text{m}$  mit Hilfe einer Pinzette aussortiert und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Diese Partikel werden als L-MPP (*engl.*: large microplastic particles, 500  $\mu\text{m}$  – 5 mm) bezeichnet. Die restliche Sedimentprobe wurde mit langsamer Geschwindigkeit (1500 rpm) zentrifugiert, um das Absetzen von schwer fällbaren Stoffen, wie beispielsweise Tonminerale zu gewährleisten. Nach Entsorgung überschüssiger  $\text{ZnCl}_2$ -Lösung mit einer Spritze, wurde der Überstand tröpfchenweise mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt, um organische Rückstände zu oxidieren. Die so erhaltene Suspension wurde für eine Woche gerührt und anschließend über einen Quarzfaserfilter (98% Retentionseffizienz bei 2.2  $\mu\text{m}$ , Whatman QM-A, GE Healthcare Europe, Deutschland) filtriert. Die Partikel wurden entsprechend ihrer Größe in S-MPP (*engl.*: small microplastic particles, 50  $\mu\text{m}$  – 500  $\mu\text{m}$ ) bzw. VS-MPP (*engl.*: very small microplastic particles, 1  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ ) eingeteilt.

### 3.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern



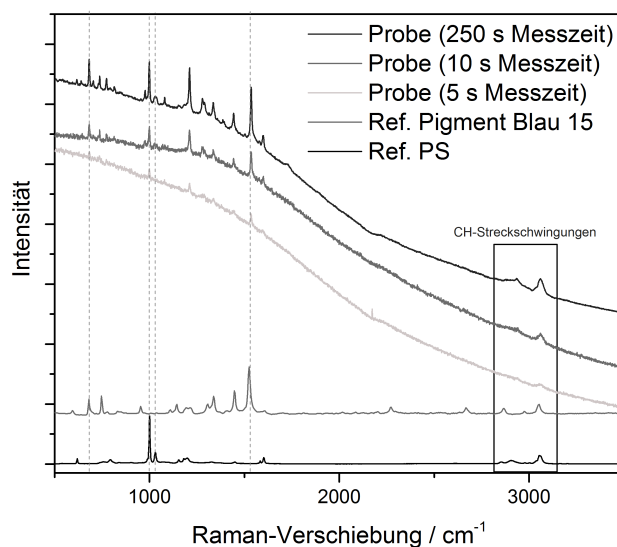
**Abb. 3.5.:** Messschema für die Analyse von S-MPP und VS-MPP. Auf dem Filter wurden 5 Bereiche gleicher Größe (dunkelgrau) untersucht, die in jeweils 9 Unterbereiche unterteilt wurden.

#### 3.4.3. RM-Analyse von MP aus limnischen Gewässern

Die Raman-mikrospektroskopische Analyse der Mikroplastik- und Mikropigmentpartikel erfolgte mit den in Kapitel 3.1 genauer beschriebenen Geräten und Parametern. Hier soll daher nur kurz auf die Wahl der für diese Proben speziellen Einstellungen eingegangen werden. Die nach der Dichteseparation mit einer Pinzette aussortierten L-MPP wurden direkt analysiert. Hierbei fanden sowohl das Horiba LabRam HR („LabRam“)- als auch das RENISHAW 2000 („Renishaw“)-System Anwendung. Bei beiden Systemen wurde ein He-Ne-Laser mit einer Ausgangswellenlänge von 633 nm und ein 50 $\times$ -Objektiv verwendet. Die Spektren wurden von 50 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  (LabRam) bzw. 200 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Renishaw) aufgezeichnet. Die Wahl zusätzlicher optischer Dichtefilter erfolgte in Abhängigkeit der Probenstabilität und der Intensität des Fluoreszenzhintergrundes. Die Aufnahmezeit variierte je nach Probe von 10 bis 200 s.

Die S-MPP und VS-MPP (Partikel  $<500 \mu\text{m}$ ) hingegen wurden auf dem Quarzfaserfilter untersucht. Da die Analyse des vollständigen Filters sehr zeitaufwändig ist, wurden 5 statistisch relevante Bereiche genauer betrachtet (vgl. Abbildung 3.5). Diese Bereiche liegen gleichmäßig über den Filter verteilt, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten und besitzen eine Größe von  $1.25 \times 1.86 \text{ mm}$ . Eine weitere Unterteilung der jeweiligen Bereiche enthält 9 Unterbereiche mit einer Größe von jeweils  $620 \times 750 \mu\text{m}$  (vgl. Abbildung 3.5). Insgesamt ergibt sich somit eine untersuchte Fläche von  $20.93 \text{ mm}^2$  bei einer effektiven Filterfläche (mit Rückstand bedeckter Filter, in Abbildung 3.5 grau eingezeichnet) von  $1320.25 \text{ mm}^2$ . Für Partikel  $<500 \mu\text{m}$  wurden folglich 1.6% oder ca. 1/60 der effektiven Filterfläche untersucht. Falls nötig, wurde mithilfe der Software LabSpec eine Basislinienkorrektur durchgeführt und das Spektrum mit einer Literaturdatenbank (SpecID, Thermo Scientific, USA) oder Referenzspektren von Plastikmaterialien abgeglichen.

### 3. Experimenteller Teil



**Abb. 3.6.:** Protokoll für die simultane Identifikation von Kunststoffen und Pigment am Beispiel eines mit Pigment Blau 15 gefärbten PS-Partikels. Gezeigt sind Spektren mit unterschiedlichen Analysezeiten (5 s, 10 s und 250 s) sowie die zugehörigen Referenzen (Ref.) von Pigment Blau 15 und PS.

Um eine möglichst belastbare simultane Detektion von Kunststoffen und Pigmenten zu gewährleisten, wurde folgendes Protokoll angewandt, falls ein Partikel zunächst ausschließlich Pigmentbanden zeigte (vgl. Abbildung 3.6). Ein Spektrum der Probe wurde für mindestens 100 s aufgenommen. Unter den verwendeten optimierten Bedingungen (633 nm Anregungswellenlänge, volle Laserleistung, 50 $\times$ -Vergrößerung) zeigten Polymerpartikel im Bereich von 2800 – 3100 cm<sup>-1</sup> zusätzlich CH-Streckschwingungen, wie aus den Ergebnissen der Analyse vielzähliger Umweltprouben gefolgert werden konnte. Die meisten Pigmente besaßen in diesem Bereich keine oder nur geringfügige Banden. Daher wurde die Probe, falls im Bereich der CH-Streckschwingungen Banden auftraten, mit längeren Aufnahmezeiten (bis zu 500 s) untersucht. Unter diesen Bedingungen sind die Polymerbanden ebenfalls deutlich sichtbar. Als Beispiel hierzu ist in Abbildung 3.6 die Analyse eines PS-Partikels mit Pigment Blau 15 gezeigt. Nach 5 s Analysezeit sind einige durch das Pigment verursachte Banden und eine kleine Bande im CH-Streckschwingungsbereich erkennbar. Die 10s-Spektren zeigen ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, PS kann jedoch nicht eindeutig detektiert werden. Nach 250 s Analysezeit zeigen sich weitere PS-Banden und das Partikel kann eindeutig als PS mit Pigment Blau 15 identifiziert werden.



### 3.4.4. Schwermetallanalytik

Zur Bestimmung des Schwermetallgehaltes von Mikroplastik- und Mikropigmentpartikeln wurde eine Analyse mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS, von *engl.*: inductively coupled plasma mass spectrometry), welche routinemäßig bei der Elementbestimmung Einsatz findet, durchgeführt.

**Tab. 3.2.:** Mittels ICP-MS untersuchte Partikel aus dem Gardasee, mit zugehöriger Polymer- und Pigmentsorte (PG7 = Pigment Grün 7, PB15 = Pigment Blau 15, PW6 = Pigment Weiß 6, n.i. = nicht identifiziert) und Größe in mm.

Probe	Polymer	Pigment	Größe / mm
P1	PE	PG7	3.01
P2	PP	PG7	14.11
P3	n.i.	PG7	3.11
P4	n.i.	PB15	2.31
P5	PS	PW6	1.92
P6	PE	PG7	24.38
P7	PE	PG7	16.49
P8	PE	PG7	15.95
P9	PE	PG7	15.50
P10	PE	n.i.	13.65
P11	PP	n.i.	6.22

Die Erzeugung des induktiv gekoppelten Plasmas erfolgt in einer Quelle, die aus drei konzentrischen Quarzröhren besteht. Am Rohrende befinden sich eine wassergekühlte Induktionsspule, welche mit einer Hochfrequenzquelle verbunden ist, sowie eine Tesla-Spule zur Funkenzündung des Plasmas. Durch das innere Rohr wird das in Argongas dispergierte Probenaaerosol zur Induktionsspule geleitet. In der mittleren Röhre befindet sich ein tangentialer Argon-Hilfsstrom, der zur Bildung des Plasmas sowie zur Fokussierung der Probe benötigt wird, während durch das äußere Rohr ebenfalls ein Argonstrom zur Kühlung geleitet wird. Nach der Initialzündung entsteht aus den Argonatomen ein Plasma mit Temperaturen von 5000 – 12500 K, wodurch die im Probenaaerosol befindliche Substanzen atomisiert und ionisiert werden.[15, 214] Durch die Kopplung mit einem Massenspektrometer werden die Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) separiert und anschließend detektiert. Die ICP-MS zeichnet sich vor allem durch einen hohen dynamischen Konzentrationsbereich über mehrere Größenordnungen, den geringen Nachweisgrenzen im unteren ppb-Bereich (für einige Element bis zu

### 3. Experimenteller Teil

**Tab. 3.3.:** Mittels ICP-MS untersuchte Schraubdeckel, mit zugehöriger Polymer- und Pigmentsorte (PG7 = Pigment Grün 7, DG = Dipersedes Grün, PB15 = Pigment Blau 15, PB29 = Pigment Blau 29, PR170 = Pigment Rot 170, n.i. = nicht identifiziert).

Probe	Polymer	Pigment
S1	PE	PG7
S2	PP	PG7
S3	PP	PB29
S4	PE	PR170
S5	PE	PG7
S6	PE	DG
S7	PP	PB15/PB29
S8	PE	PB29
S9	PP	n.i.
S10	PE	n.i.

0.001 ppb) und einer simultanen Multielementanalyse von bis zu 90% der Elemente des Periodensystems aus.[15, 214]

Es wurden insgesamt 11 der im Gardasee gefundenen Plastik- und Pigmentpartikel mittels ICP-MS untersucht. Dabei handelt es sich um 2 Pigmentpartikel, 7 gefärbte Plastikpartikel und 2 Plastikpartikel ohne erkennbare Pigmentbanden im Raman-Spektrum. Zusätzlich wurden 10 im Einzelhandel kommerziell erhältliche gefärbte Schraubdeckel von Wasserflaschen untersucht, um einen Vergleich der Schwermetalllast von gefärbtem Plastik aus der Umwelt mit frischen unbehandelten Proben zu ermöglichen. Die Tabellen 3.2 und 3.3 geben einen Überblick über die untersuchten Partikel, deren Größe und den mittels RM zuvor bestimmten Plastik- und Pigmentsorten. Die Proben wurden einzeln mit einem Quadrupol-ICP-MS (Elan 6100, Perkin Elmer, USA) untersucht. Dazu wurden 150 – 200 mg der jeweiligen Probe in einer Mischung aus 2 mL Wasserstoffperoxid (30%, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland), 5 mL Salpetersäure (65%, suprapur, Merck KGaA, Deutschland) und 5 mL Schwefelsäure (95%, suprapur, Merck KGaA, Deutschland) mittels Mikrowellendruckaufschluss (MARSXpress, CEM, Deutschland) gelöst. Die Reproduzierbarkeit der Analyse der Schraubdeckel wurde anhand von 5 Proben (S1 – S5) mit je zwei Replikaten überprüft. Wegen der geringen Größe und Masse konnten die Partikel aus dem Gardasee nur einfach analysiert werden. Die erhaltenen Werte wurden mit Blindwerten des Säureaufschlusses korrigiert.

### 3.4.5. Größenbestimmung

Die Größe der aussortierten Partikel ( $>500\ \mu\text{m}$ ) wurde nach der RM-Identifizierung bestimmt. Dazu wurde mittels einer Kamera oder eines digitalen Bildbearbeitungssystems (Leica MS5 mit Altra 20 Kamera, Olympus, Deutschland) und zugehöriger Software (ImageJ, Bethesda, USA) ein Bild der Partikel aufgenommen. Partikel, die direkt auf dem Filter analysiert wurden, wurden mit dem optischen Mikroskop des Raman-Systems abgebildet und in der Software LabSpec 5 bzw. LabSpec 6 (Horiba Yobin Yvon, Japan) vermessen. Bei allen fragmentierten Partikeln wurde dabei die Größe als längste räumliche Ausdehnung angegeben. Fasern wurden durch Angabe von Durchmesser und Länge charakterisiert.

### 3.4.6. Vermeidung von Kontaminationen

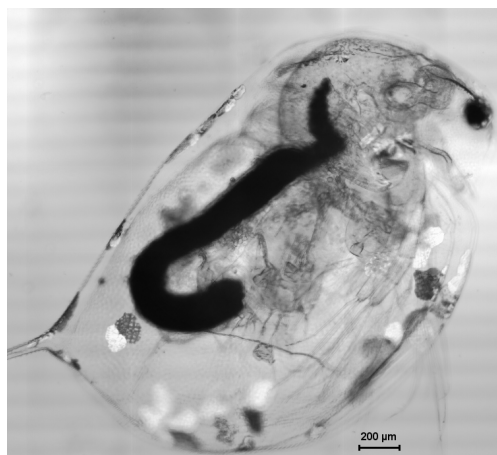
Um Kontaminationen mit synthetischen Fasern zu vermeiden, wurde auf das Tragen von Kleidung aus 100% Baumwolle geachtet. Vor der Wiederverwendung der  $\text{ZnCl}_2$ -Lösung wurde diese in einem Zweistufenprozess gereinigt. Zunächst erfolgte die Filtration über Kerzenfilter aus rostfreiem Stahl ( $20\ \mu\text{m}$ , 10 in, MTS Filtertechnik, Deutschland) und anschließend über Kerzenfilter mit  $1\text{-}\mu\text{m}$ -Porengröße (TAX, MTS Filtertechnik, Deutschland). Alle anderen Flüssigkeiten wurden durch Filtration über  $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -Filterpapier gereinigt. Die Proben wurden stets mit Petrischalen aus Glas oder Aluminiumfolie bedeckt, um Kontaminationen aus der Luft zu vermeiden.

### 3.4.7. 3D-Raman-Imaging von MP in Wasserorganismen

Es sollte weiterhin eine Methode entwickelt und optimiert werden, um MP *in situ* in limnischen Organismen mittels RM nachzuweisen. Die hierzu nötigen biologischen Proben wurden an der Uni Bayreuth hergestellt. Große Wasserflöhe (*Daphnia magna*) wurden dazu mit einer Mischung aus Algen und PVC-Partikeln (1:1 m/m) gefüttert. Die Tiere wurden zur Präparation aus dem Lagerungsgefäß entnommen bevor sich die Geschlechtsdrüsen (sogenannte Gonaden) ausbilden konnten, da sich diese um den Darm von *D. magna* legen und dadurch die Analyse des MPs erschweren würden. Die Tiere wurden anschließend mit  $\text{CO}_2$  betäubt und in Formalinlösung eingelegt. In dieser Lösung kann die Probe über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Zur Präparation wurden die *D. magna* aus der Formalinlösung entnommen und zweimal mit Saccharose-Lösung (6.8% (m/m), Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) gewaschen. Auf einem Objektträger wurden drei Lochverstärker übereinander geklebt. Jeweils ein *D. magna* wurde in die entstandene Mulde gegeben und die überschüssige Saccharoselösung mit einer Pasteurpipette (Carl Roth GmbH & Co.

### 3. Experimenteller Teil



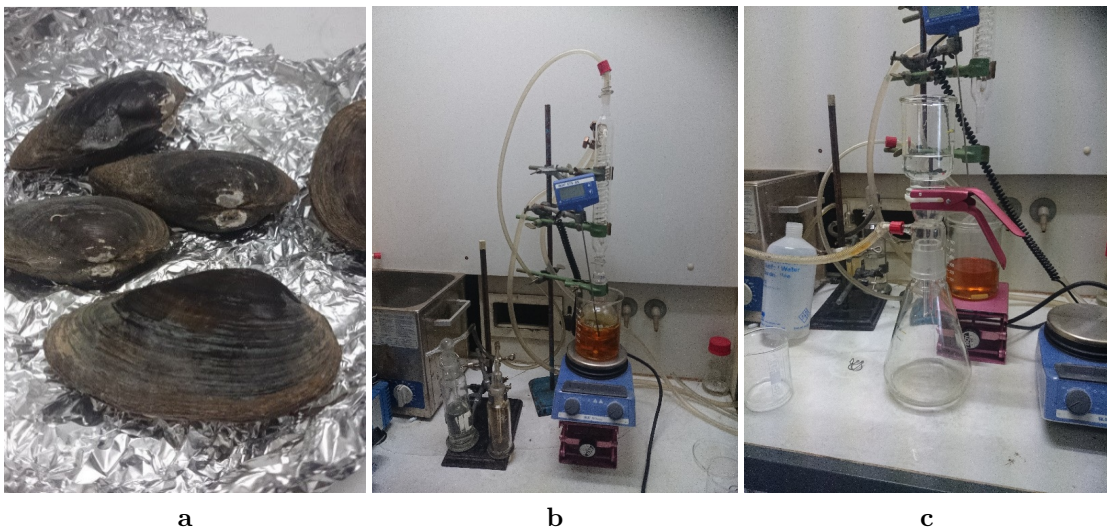
**Abb. 3.7.:** Mikroskopische Aufnahme von *D. magna* mit 4×-Vergrößerung; der Darm ist deutlich erkennbar.

KG, Deutschland) entfernt. Zur Fixierung wurde ein Tropfen des Einbettmediums Vectashield (Vecta Laboratories, USA) hinzugegeben. Nach Ausrichtung der Probe mit einer Pinzette wurde diese mit einem Deckglas (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) bedeckt, welches mit transparentem Nagellack (Maybelline, USA) am Objektträger festgeklebt wurde. Die RM-Analysen wurden mit dem LabRAM-System mit frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Laser (532 nm), 25% optischem Dichtefilter und 50×-LWD-Objektiv durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1). Die Messzeit variierte dabei abhängig von der Probe und Vorgehensweise von 100 s (Einzelmessung) bis 6 h 30 min (Map). Da eine optische Fokussierung des Darms von *D. magna* bei hohen Vergrößerungen nur sehr schwer möglich ist, wurde die folgende Vorgehensweise gewählt. Zunächst wurde optisch auf den Panzer über dem Darm fokussiert und dann schrittweise der Arbeitsabstand zwischen Probe (vgl. Abbildung 3.7) und Objektiv verringert, um ein Tiefenprofil zu erhalten. Es wurde der Abstand gewählt, bei dem die Carotinoidsignale bei  $1005\text{ cm}^{-1}$ ,  $1156\text{ cm}^{-1}$  und  $1519\text{ cm}^{-1}$  maximal waren.[215] Da bekannt ist, dass *D. magna* Carotinoide aus der Nahrung vor allem im Darm anreichern kann[216] und Carotinoide auf Grund von Resonanz-Effekten besonders intensive Raman-Banden zeigen,[215] konnten diese als Marker für die Darmregion verwendet werden. (Bei maximaler Carotinoidsignalintensität kann davon ausgegangen werden, dass der Fokus des Raman-Mikroskop im Darmbereich liegt.) Anschließend wurde optisch nach verdächtigen sphärischen Strukturen gesucht, wobei darauf geachtet wurde, dass der zuvor ermittelte optimale Arbeitsabstand beibehalten wurde. Um diese Strukturen herum wurden Spektren in zwei verschiedenen Profilen, einem Tiefenprofil und einem oktaederförmigen Profil, aufgenommen. Von Punkten, die PVC-Signale im Raman-Spektrum zeigten wurden anschließend zweidimensionale bzw. dreidimensionale Maps aufgenommen. Zusätzlich wurden sowohl Punkte außerhalb des Darms sowie *D. magna* einer Gruppe, die ohne Plastikzugabe gezüchtet wurden, als Kontrolle untersucht.

## 3.5. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens „Nachweis von Mikroplastik in Muscheln mittels Raman-Mikrospektroskopie“ sollte in Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Umwelt (LfU) die MP-Belastung und deren Folgen für limnische Organismen am Beispiel von einheimischen Muscheln (*Unio sp.*) wie der Malermuschel (*Unio pictorium*) und der Großen Flussmuschel (*Unio tumidus*, vgl. Abbildung 3.8a) untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, inwiefern sich die RM zur Detektion von MP aus Muschelgewebe eignet. Die Bereitstellung der finanziellen Mittel erfolgte durch das Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz.

### 3.5.1. Optimierung des Aufschlusses



**Abb. 3.8.:** (a) *Unio sp.*; (b) Aufbau des Aufschlusses und (c) anschließender Filtration.

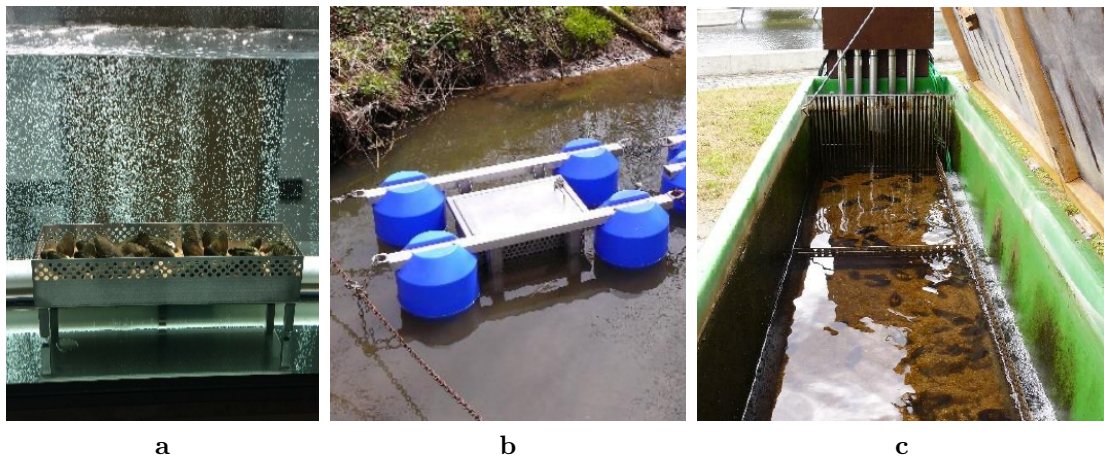
Zunächst wurde der in der Literatur verwendete Säureaufschluss mit  $\text{HNO}_3$  [118, 178] überprüft und optimiert. Dies erfolgte zunächst am IWC, weitere Aufschlüsse wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit am LfU durchgeführt.[217] Um vorhandenes Atemwasser im Weichkörper zu halten, wurden die tiefgekühlten Versuchstiere nur soweit aufgetaut, dass das Öffnen der Schale mit einem Spatel möglich war. Der Weichkörper der Muschel wurde daraufhin, um Kontaminationen zu vermeiden, in einem ausgeschalteten Abzug mit einem Spatel aus der Schale entnommen, gewogen, mittels Skalpell zerteilt und in einen Rundkolben gegeben. Nach Einschalten des Abzuges und Zugabe von 100 mL  $\text{HNO}_3$  (65%, Carl Roth GmbH & Co. KG,

### 3. Experimenteller Teil

Deutschland) wurde der Aufschluss über Nacht bei Zimmertemperatur vollendet. Anschließend wurde der Kolben unter Rückfluss für 2 h auf ca. 100°C erhitzt und die rotbraune Lösung mit ca. 80°C warmen Wasser (Millipore Milli-Q Plus 185, Merck KGaA, Deutschland) im Verhältnis 1:10 (V/V, relativ zu der zuvor verwendeten Menge an HNO<sub>3</sub>, vgl. Abbildung 3.8b) verdünnt. Die erhaltene Lösung wurde in einer Filtrationsanlage (Sartorius AG, Deutschland) mithilfe einer Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Deutschland) filtriert (vgl. Abbildung 3.8c). Eventuelle Rückstände im Kolben wurden sorgfältig durch mehrfaches Nachspülen mit Wasser auf den Filter übertragen.

Da sich die in Kapitel 3.4.3 verwendeten Quarzfaserfilter insbesondere für kleine Partikel auf Grund ihrer Tiefenfilterwirkung nur bedingt eigneten, wurde nach alternativen Filtermaterialien gesucht. Es wurden Nitrocellulosefilter (0.45 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Sartorius AG, Deutschland), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Filter (0.2 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Anodisk, GE Healthcare, USA) und Polycarbonat(PC)-Filter (0.4 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Millipore, Merck KGaA, Deutschland) auf ihre Eignung als Proben-träger für Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen getestet. In späteren Analysen wurden dann ausschließlich PC-Filter verwendet. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Filter in eine Petrischale gegeben und in einem Exsikkator (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) über Orangegel (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) gelagert. Bei späteren Aufschlüssen wurden die Filter vor der Lagerung mit Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) gewaschen, um störende Fettsäurerückstände (u.a. Palmitinsäure) zu beseitigen.

Weiterhin wurde der Säureaufschluss auf seine Eignung bezüglich verschiedener Kunststoffsorten untersucht. Dazu wurden am LfU Stücke verschiedener Alltagsgegenstände (Überraschungsei, PP; Einkaufstüte, PE; Rohrleitung, PVC; Küchenschwamm, PUR; Joghurtbecher, PS; Getränkeflasche, PET; Nylonstrümpfe, PA) zerkleinert und zu Beginn des Aufschlusses der Lösung zugegeben. Es wurden vor und nach dem Aufschluss mikroskopische Bilder der Partikel aufgenommen, um eventuelle optische Veränderungen durch den Aufschluss beurteilen zu können. Weiterhin wurden die Partikel nach dem Aufschluss mittels RM auf dem Filter identifiziert.



**Abb. 3.9.:** (a) Aquarium mit Muscheln im Rahmen des Expositionsversuches; (b) Schwimmkäfig am Standort D; (c) Expositionsrinne am Standort B (Fotos b und c mit freundlicher Genehmigung des Bayerischen Landesamts für Umwelt).

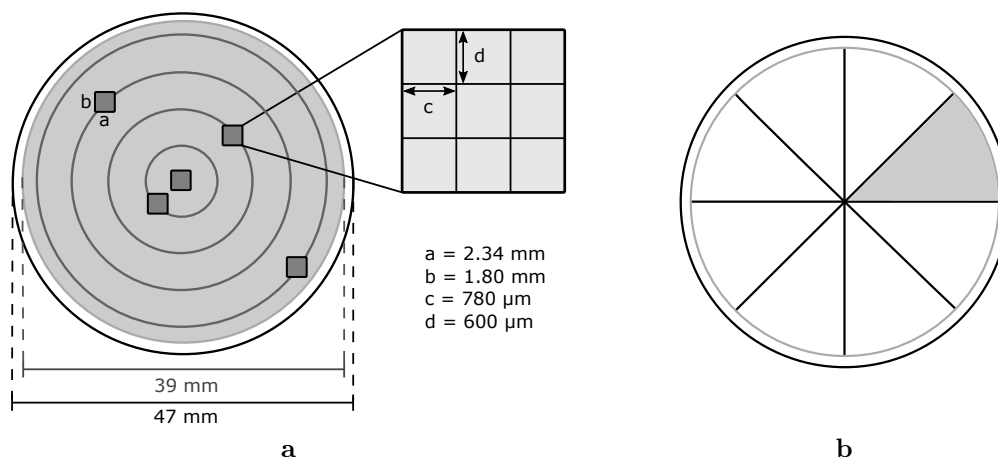
### 3.5.2. Expositionsversuch

Im Rahmen einer Versuchsreihe wurden am LfU Muscheln der Gattung *Unio tumidus* in Aquarien (vgl. Abbildung 3.9a) unter anderem einer PVC-Konzentration (1:1 (m/m) Mischung aus Partikeln  $<100\ \mu\text{m}$  und  $<17\ \mu\text{m}$ , Goodfellow GmbH, Deutschland) von  $50\ \mu\text{g/L}$  ausgesetzt. Nach vierwöchiger Expositionszeit wurde ein Teil der Muscheln entnommen, die Aquarien sorgfältig gereinigt und die restlichen Muscheln weitere 4 Wochen kunststofffrei gehältert. Alle Muscheln wurden bis zum Aufschluss und der weiteren Analyse eingefroren. Der Aufschluss wurde am LfU, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich wurden Blindproben der Laborluft sowie der verwendeten Chemikalien analysiert.

### 3.5.3. Feldversuch

Ein Feldversuch diente dazu, die MP-Belastung von limnischen Organismen unter realen Bedingungen festzustellen. Die Projektplanung, Probennahme und -vorbereitung oblag dabei dem LfU. Es wurden Muscheln (*Unio tumidus*) auf dem Gelände einer mittelfränkischen Kläranlage (Standort B) ausgebracht. Weiterhin wurde eine Kontrollgruppe in einem Aufzuchtteich des LfU Wielenbach (D) gehältert. Am Standort D fand die Exposition in eigens angefertigten Schwimmvorrichtungen mit eingesetzten Muschelkäfigen statt (vgl. Abbildung 3.9b). In der Kläranlage war eine Exposition in Schwimmkäfigen aus technischen Gründen nicht möglich. Daher wurde hier eine Expositionsrinne (vgl. Abbildung 3.9c) verwendet. In dieser wurden die Muscheln eingesetzt und mit dem gereinigten

### 3. Experimenteller Teil



**Abb. 3.10.:** (a) Messschema für Teilanalyse I (Partikel  $<50\ \mu\text{m}$ ); (b) Messschema für Teilanalysen II und III (Partikel  $>50\ \mu\text{m}$  auf Filter sowie in Petrischale).

Abwasser aus einem Kanalschacht der Kläranlage umspült. Eine Pumpe sorgte für die notwendige Sauerstoffversorgung der Muscheln. Die Standorte A und C sind Gegenstand nachfolgender Projekte. An allen Standorten wurde 28 Tage bzw. 6 Monate nach Einbringen ein Teil der Muscheln entnommen und (nach der Anleitung in Kapitel 3.5.1) aufgearbeitet.

#### 3.5.4. RM-Analyse von MP in Biota

Die Evaluation der Filter erfolgte in drei Teilanalysen. Es wurde eine Unterteilung auf dem Filter in Partikel  $<50\ \mu\text{m}$  (Teilanalyse I) und  $>50\ \mu\text{m}$  (Teilanalyse II) durchgeführt. Weiterhin wurden die Partikel  $>50\ \mu\text{m}$ , welche beim Transport vom Filter gefallen waren und lose in der Petrischale lagen, analysiert (Teilanalyse III). Das Messschema in Teilanalyse I ist ähnlich zu dem in Kapitel 3.4.3 verwendeten Schema. Auf Grund der bei der Analyse der Gardaseeproben gesammelten Erfahrungen wurde das Schema etwas verändert (vgl. Abbildung 3.10a). Die 5 Messbereiche wurden in äquidistanten konzentrischen Kreisen über den Filter verteilt, wodurch eine repräsentativere Darstellung der durch die Filtration teilweise inhomogenen Verteilung der Partikel auf dem Filter erreicht werden kann. Die Messbereiche wurden ebenfalls in 9 Unterbereiche eingeteilt, die jeweils eine Größe von  $780 \times 600\ \mu\text{m}$  besaßen. Insgesamt wurde eine Fläche von  $21.06\ \text{mm}^2$  analysiert, was einem Anteil von 1.8% der effektiven Gesamtfilterfläche entspricht. Für den Standort B des Feldversuchs wurde die Analyse zweimal durchgeführt, somit ergab sich ein untersuchter Anteil von 3.6%. Die von Kapitel 3.4.3 abweichenden Werte ( $20.93\ \text{mm}^2$ , 1.6% der Fläche) ergeben sich durch die unterschiedlichen effektiven Filterflächen. In den Teilanalysen II und III wurde jeweils 1/8 der effektiven



Filterfläche bzw. der Petrischale in einem Kreissektor mit einem Winkel von  $45^\circ$  analysiert (vgl. Abbildung 3.10b).

Die Filter wurden auf einem Glasträger befestigt, auf dem eine Markierung aufgetragen wurde, um eine Wiederfindung der Partikel zu ermöglichen. Vor Beginn der Analyse bzw. an jedem Messtag wurde das Raman-Mikroskop auf diese Markierung fokussiert und der optische Tisch auf  $x = 0$  und  $y = 0$  kalibriert. Zur Analyse wurde das LabRam-System mit He-Ne- bzw. frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Laser sowie  $10\times$ -,  $50\times$ - und  $50\times$ -LWD-Objektive verwendet (vgl. Kapitel 3.1). Die Laserintensität wurde durch den optischen Dichtefilter mit 25% verringert. Als spektrale Breite wurde  $50 - 3750 \text{ cm}^{-1}$  (Feldversuch) bzw.  $50 - 2200 \text{ cm}^{-1}$ , wenn ausschließlich die Identifikation von PVC von Interesse war (Expositionsversuch), gewählt. Die Messzeit betrug je nach Probe 10 s bis 500 s.

## 3.6. Bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe

Verschiedene Alltagsgegenstände (Kunststofftüten und Verpackungsmaterial) aus bioabbaubaren, kompostierbaren und recycelten Kunststoffen wurden untersucht, um ihre Zusammensetzung sowie die daraus resultierenden Einflüsse auf die Umwelt besser einschätzen zu können. Die Proben, welche sich nach Herstellerangaben in kompostierbares, bioabbaubares und recyceltes Plastik einteilen lassen, wurden im Einzelhandel erworben. Tabelle 3.4 zeigt die Proben und deren im weiteren Verlauf verwendete Bezeichnung. Alle Proben wurden mittels RM analysiert. Dazu wurde das LabRAM-System mit He-Ne-Laser,  $50\times$ -Vergrößerung und voller Laserleistung verwendet (vgl. Kapitel 3.1). Die Spektren wurden im Bereich von  $50 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  für 10 – 100 s aufgenommen. Bei mehrfarbigen Proben wurde darauf geachtet, dass alle Farben gesondert analysiert wurden, um die Identifikation aller Pigmente zu gewährleisten.

Zusätzlich sollte der Schwermetallgehalt einer Teilmenge der Proben (K1, K3, B3 und R1) mittels ICP-MS untersucht werden. Bei den mehrfarbigen Proben K1 und K3 wurden jeweils gleichfarbige Bereiche untersucht ( $K1_{\text{grün}}$ ,  $K1_{\text{weiß}}$  bzw.  $K3_{\text{schwarz}}$ ,  $K3_{\text{weiß}}$ ,  $K3_{\text{rot}}$ ) um den Einfluss der Pigmente zu analysieren. Die Proben wurden mit einer Schere zerteilt, gewogen und durchliefen den in Kapitel 3.4.4 beschriebenen Druckaufschluss mit anschließender ICP-MS-Analyse.

### 3. Experimenteller Teil

**Tab. 3.4.:** Bezeichnung, Herkunft und Art der bioabbaubaren, kompostierbaren und recycelten Kunststoffproben.

Bezeichnung	Herkunft	Art
K1	Bio-Müllbeutel, Obi Group Holding SE & Co. KGaA, Deutschland	kompostierbar
K2	Bio-Müllbeutel, Farilla, Deutschland	
K3	Tragetasche, Fressnapf Tiernahrungs GmbH Zürich, Schweiz	
B1	Joghurtbecher, Danone, Frankreich	bioabbaubar
B2	Kätzentoilettenbeutel Karlie, Deutschland	
B3	Verpackungsmaterial, Flo-Pak Green, Deutschland	
R1	Öko-Müllbeutel, Swirl, Deutschland	recycelt
R2	Tragetasche Aldi Süd, Deutschland	
R3	Tragetasche dm, Deutschland	

## 3.7. Analyse von Mikroplastik aus Getränken

### 3.7.1. Probenvorbereitung

Es wurden drei 0.33-L-Flaschen Bier („Pils“, Warsteiner Brauerei, Deutschland) im Einzelhandel erworben. Sämtliche Glasgeräte wurden vor der Verwendung mit 10%iger Salpetersäure (V/V, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) und Reinstwasser (Milli-Q, Merck KGaA, Deutschland) sorgfältig gespült. Die Filtrationsanlage (Sartorius AG, Deutschland) wurde unmittelbar nach der Reinigung in eine Laminar Flow-Box (Reinraum Klasse 5 nach ISO 14644-1, Spectec, Deutschland) überführt und dort gelagert. Die Öffnungen aller gereinigten Glasgeräte wurden zusätzlich mit gereinigten Petrischalen bedeckt, um mögliche Kontaminationen aus der Luft zu vermeiden. Vor der eigentlichen Analyse wurde die Filtrationsanlage dreimal mit Bier gewaschen, um eventuell an der Glaswand adsorbierte Fasern zu entfernen. Anschließend wurde die Probe über einen Nitrocellulosefilter (0.45 µm Porengröße, Sartorius AG, Deutschland) filtriert. Um repräsentative Blindproben zu erhalten, wurde das Filtrat einer weiteren Filtration über einen zweiten Filter unterzogen. Zur Kontrolle der Laborluft wurden angefeuchtete Filter in, sowie neben der Laminar-Flow-Box ausgebracht (Probenbezeichnung: Filter Flow-Box bzw. Filter Luft). Zusätzlich wurde ein frisch aus der Verpackung entnommener Filter (Filter trocken) untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass ausschließlich Kleidung aus 100% Baumwolle getragen wurde, um Artefakte durch Kleidung zu minimieren.

### 3.7.2. RM-Analyse von MP in Getränken

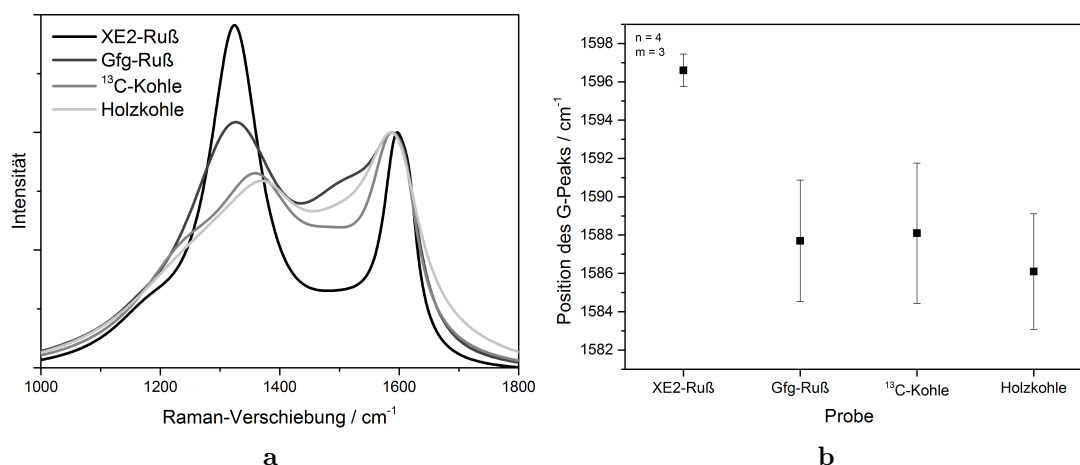
Alle auf den Filtern befindlichen Fasern wurden mittels RM analysiert. Dazu wurde das LabRam-System mit frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Laser, optischem Dichtefilter mit 10% bzw. 25% und das 50×-LWD-Objektiv verwendet (vgl. Kapitel 3.1). Die Spektren wurden im Bereich von 50 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  für eine Zeit von 10 – 100 s aufgenommen. Jedes Spektrum wurde anschließend mit einer kommerziell zugänglichen Datenbank (SpecID, Thermo Fisher Scientific, USA) abgeglichen.

# 4. Ergebnisse und Diskussion

## 4.1. Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie von SOM

### 4.1.1. $^{13}\text{C}$ -markierte Kohle aus Pyrolyse

In einem ersten Versuch sollte  $^{13}\text{C}$ -markierte Kohle aus Pyrolyse von Knäuelgras mittels SIRM untersucht werden. Da der Anteil an  $^{13}\text{C}$  in der markierten Holzkohlenprobe nicht bekannt war, sollte zunächst festgestellt werden, inwiefern sich die Position des G-Peaks in den Raman-Spektren der markierten Holzkohle im Vergleich zu unmarkierten  $^{12}\text{C}$ -Substanzen verändert. Da keine Holzkohle mit natürlicher Isotopenabundanz, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen hergestellt wurde, vorhanden war, wurden die Messungen mit anderen kohlenstoffhaltigen Substanzen durchgeführt. Als Beispiele wurden eine durch Pyrolyse von Fichtennadeln gewonnene Holzkohle sowie zwei unterschiedliche Ruße (Graphitfunkenruß (GfG-Ruß) sowie XE2-Ruß) verwendet. Bei den Versuchsbedingungen mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm, 1%-Dichtefilter und 50 $\times$ -Objektiv zeigen alle Proben Raman-Signale. Es lässt sich feststellen, dass die beiden Holzkohlen einen deutlich ausgeprägteren Fluoreszenzuntergrund im Vergleich zu den beiden Rußen besitzen. Dieser kann durch einem größeren Anteil an organischen Verbindungen erklärt werden. In Abbildung 4.1a sind die Mittelwertspektren ( $m = 3$ ) der Proben

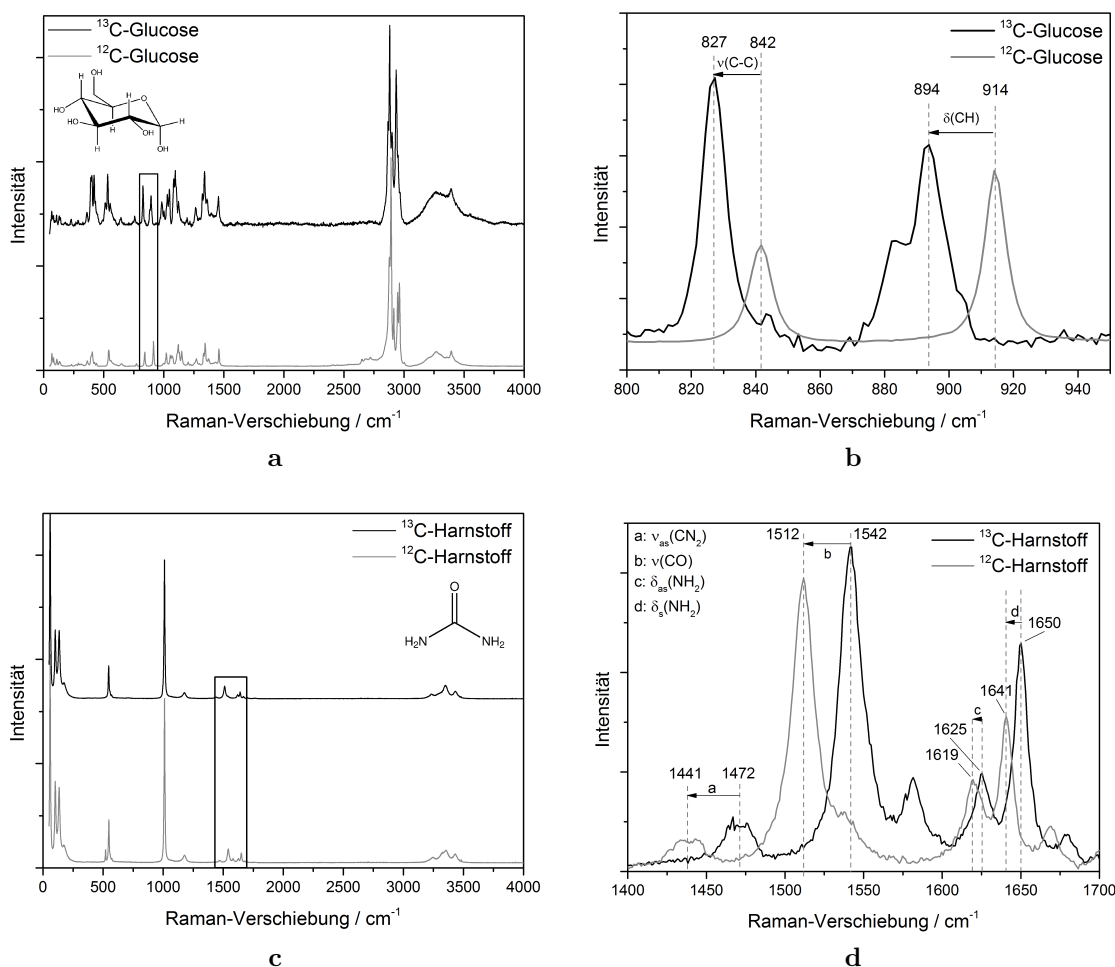


**Abb. 4.1.:** (a) Raman-Mittelwertspektren ( $m = 3$ ) nach Fünfbandenfit der markierten  $^{13}\text{C}$ -Holzkohle sowie von XE2-Ruß, Graphitfunken(GfG)-Ruß und Holzkohle aus Fichtennadeln; (b) Position des G-Peaks der einzelnen Substanzen ( $n = 4$ ,  $m = 3$ ).

nach Basislinienkorrektur und Fünfbandenfit (vgl. Kapitel 3.2.4) dargestellt. Die beiden Holzkohleproben zeigen nur geringe Unterschiede in den Spektren. Sowohl die Position des G-Peaks, als auch das relative Intensitätsverhältnis von D- zu G-Peak ( $I(D)/I(G)$ ), liegen bei ähnlichen Werten, was für eine vergleichbare strukturelle Ordnung in beiden Proben spricht. Die stärksten Unterschiede lassen sich in der Intensität des Bereiches zwischen den beiden Peaks (ca. 1400 – 1570  $\text{cm}^{-1}$ ) feststellen. Die dort vorhandene D3-Bande gibt den Anteil an amorphem Kohlenstoff wieder,[28] welcher durch die unterschiedlichen Produktionsbedingungen variiert. Die beiden Ruße zeigen dabei sowohl zueinander, als auch im Vergleich zu den Holzkohleproben, deutlich größere Unterschiede. Der XE2-Ruß besitzt das größte relative Intensitätsverhältnis von D- und G-Peak, darauf folgt der GfG-Ruß vor den Holzkohleproben. Da bei allen Proben von einer Clustergröße unter 2 nm ausgegangen werden kann, besitzt somit der XE2-Ruß die größte strukturelle Ordnung aller Proben. Der GfG-Ruß ist ebenfalls geordneter als beide Holzkohleproben.

Es zeigt sich, dass der GfG-Ruß und die beiden Holzkohleproben in etwa ähnliche G-Peak-Positionen besitzen. Die G-Peak-Position des XE2-Rußes liegt hingegen bei deutlich höheren Wellenzahlen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass der G-Peak aus einer Überlagerung der G- und D2-Bande entsteht (vgl. Kapitel 2.1.4). Durch die große strukturelle Ordnung im XE2-Ruß besitzt dessen Raman-Spektrum eine besonders intensive D2-Bande und es kommt folglich zu einer Verschiebung des G-Peaks. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.1b die Positionen der G-Peaks inklusive der Standardabweichungen für die einzelnen Proben aufgetragen. Zwischen den G-Peak-Positionen der  $^{13}\text{C}$ -markierten Holzkohle und der Holzkohle mit natürlicher Abundanz lassen sich keine statistisch relevanten Unterschiede erkennen. Tatsächlich liegt der Mittelwert der G-Peak-Position der  $^{13}\text{C}$ -markierten Holzkohle bei geringfügig höheren Wellenzahlen als der Mittelwert der G-Peak-Position der Holzkohle mit natürlicher Abundanz. Aus theoretischen Überlegungen (vgl. Kapitel 2.1.7) ist jedoch bei Verwendung von schwereren Isotopen eine Verschiebung in Richtung niedriger Wellenzahlen zu erwarten. Zusätzlich sind die Abweichungen der Positionen innerhalb der Proben mit natürlicher Abundanz (XE2-Ruß, GfG-Ruß und Holzkohle) deutlich höher als die Unterschiede zwischen der  $^{13}\text{C}$ -markierten Holzkohle und den  $^{12}\text{C}$ -Proben. Die verwendete  $^{13}\text{C}$ -Holzkohle enthält folglich nur geringe Mengen an  $^{13}\text{C}$ . Für belastbare Aussagen ist es zusätzlich nötig, Vergleiche mit Holzkohle natürlicher Abundanz, welche bei gleichen Versuchsbedingungen hergestellt wurde, durchzuführen. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Verschiebung der G-Peak-Position ausschließlich durch Isotopeneffekte und nicht durch den Einfluss unterschiedlicher struktureller Ordnungen in den Proben hervorgerufen werden. Daher werden im nächsten Schritt künstliche Huminsäuren verschiedener Isotopenzusammensetzung synthetisiert und auf ihre Eignung als Modellsubstanz für die SIRM überprüft.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.2.:** (a) Raman-Spektren von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Glucose mit Strukturformel (in Form von  $\beta$ -D-Glucopyranose); (b) Vergrößerter Bereich von  $800 - 950 \text{ cm}^{-1}$  mit Bandenverschiebung; (c) Raman-Spektren von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Harnstoff mit Strukturformel; (d) Vergrößerter Bereich von  $1400 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  mit Bandenverschiebung ( $\nu$ : Streckschwingung,  $\delta$ : Deformationschwingung, as = asymmetrisch, s = symmetrisch). Zuordnung nach [218, 219].

### 4.1.2. SIRM der Edukte

Um die Anwendbarkeit der Stabilisotopen-RM (SIRM) mit den vorhandenen Instrumenten zu überprüfen, wurden zunächst die Edukte untersucht, welche bei der Synthese der künstlichen Huminsäuren verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um Glucose und Harnstoff mit 99%  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Anteil bzw. mit natürlicher Abundanz (ca. 1.1 %  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ), welche zur Vereinfachung im weiteren Verlauf als  $^{13}\text{C}$ - und  $^{12}\text{C}$ -Glucose bzw.  $^{13}\text{C}$ - und  $^{12}\text{C}$ -Harnstoff bezeichnet werden. Die einzelnen Raman-Spektren inklusive der Vergrößerung einzelner spektraler Bereiche sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

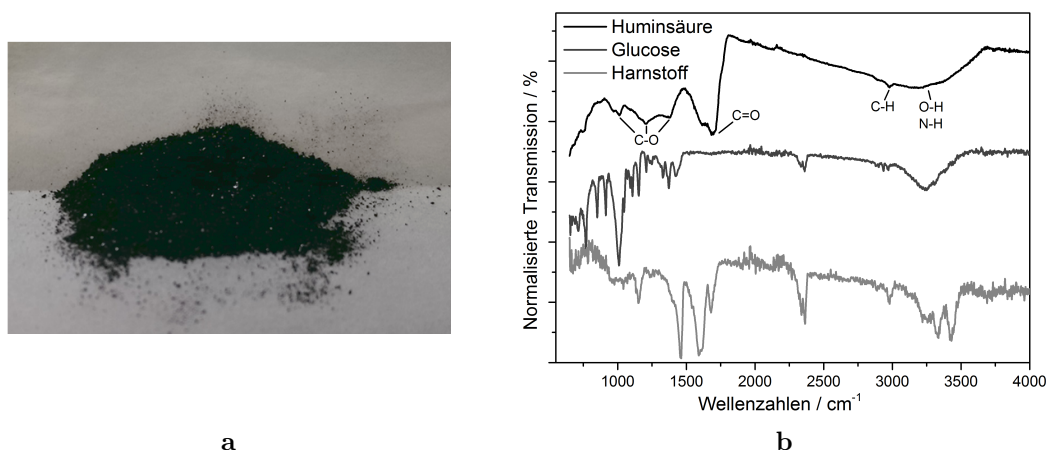
Im Spektrum der  $^{13}\text{C}$ -Glucose sind die meisten Signale im Vergleich zur  $^{12}\text{C}$ -Glucose rotverschoben. Die Intensität der Verschiebung variiert jedoch abhängig von den jeweiligen Signalen. Je stärker der Kohlenstoff an der Schwingung beteiligt ist, desto intensiver ist die Verschiebung. Dies zeigt sich vor allem im Bereich von  $800 - 950 \text{ cm}^{-1}$  (vgl. Abbildung 4.2b), in dem die C-C-Streckschwingungen ( $\nu(\text{C-C})$ ) und die C-H-Deformationsschwingungen ( $\delta(\text{C-H})$ ) liegen.[218] Die Rotverschiebung beträgt insgesamt  $15 \text{ cm}^{-1}$  für die  $\nu(\text{C-C})$ -Schwingung (von  $842 \text{ cm}^{-1}$  auf  $827 \text{ cm}^{-1}$ ) und  $20 \text{ cm}^{-1}$  für die  $\delta(\text{C-H})$ -Schwingung (von  $914 \text{ cm}^{-1}$  auf  $894 \text{ cm}^{-1}$ ). In den Raman-Spektren von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Harnstoff können ähnliche Verläufe beobachtet werden. Als Beispiel soll der spektrale Bereich von  $1400 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1700 \text{ cm}^{-1}$  genauer betrachtet werden (vgl. Abbildung 4.2d). Besonders hohe Verschiebungen sind hier ebenfalls vorhanden, falls der Kohlenstoff direkt an der Schwingung beteiligt ist, wie beispielsweise bei der asymmetrischen Streckschwingung von  $\text{CN}_2$  ( $\nu_{as}(\text{CN}_2)$ ) und der C-O-Streckschwingung ( $\delta(\text{CO})$ ,[219]). Dort beträgt die Verschiebung  $31 \text{ cm}^{-1}$  (von  $1472 \text{ cm}^{-1}$  auf  $1441 \text{ cm}^{-1}$ ) bzw.  $30 \text{ cm}^{-1}$  (von  $1542 \text{ cm}^{-1}$  auf  $1512 \text{ cm}^{-1}$ ). Ist das Kohlenstoffatom nicht direkt an der Schwingung beteiligt, so können geringere Verschiebungen beobachtet werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein Isotopenaustausch die reduzierte Masse der Schwingung nur geringfügig ändert. So zeigen beispielsweise die asymmetrische sowie symmetrische Deformationsschwingungen von  $\text{NH}_2$  ( $\delta_{as}(\text{NH}_2)$  bzw.  $\delta_s(\text{NH}_2)$ [219]) eine Änderung um  $6 \text{ cm}^{-1}$  (von  $1625 \text{ cm}^{-1}$  auf  $1619 \text{ cm}^{-1}$ ) bzw.  $9 \text{ cm}^{-1}$  (von  $1650 \text{ cm}^{-1}$  auf  $1641 \text{ cm}^{-1}$ ).

Eine Verschiebung der Signale durch den Einsatz von Stabilisotopen konnte für beide Edukte nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass das Raman-Mikroskop sowie die Messparameter dazu geeignet sind, SIRM-Analysen durchzuführen. Als nächster Schritt sollen nun künstliche Huminsäuren (HS) mit unterschiedlichen Isotopenverhältnissen synthetisiert und als Testsubstanzen für organisches Material im Boden untersucht werden.

#### 4.1.3. Synthese künstlicher Huminsäuren

Um eine Modellsubstanz mit unterschiedlichen Isotopenverhältnissen synthetisieren zu können, ist eine Reaktion notwendig, für die die Edukte sowohl in natürlicher Abundanz, als auch mit nahezu vollständiger  $^{13}\text{C}$ -Markierung kommerziell erhältlich sind. Als geeignet stellte sich die von Kumada[201] vorgeschlagene und von Hayakawa und Nonomura [202] modifizierte Reaktion von Glucose und Harnstoff in Salzsäure dar, deren Edukte mit 99%  $^{13}\text{C}$ -Anteil relativ preiswert erhältlich sind. Der Reaktionsansatz konnte erfolgreich vom beschriebenen Einsatz (10 g) auf 0.5 g Glucose reduziert werden. Die RM-Analyse von vier Einzelsynthesen zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit der G-Peak-Position im Raman-Spektrum.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

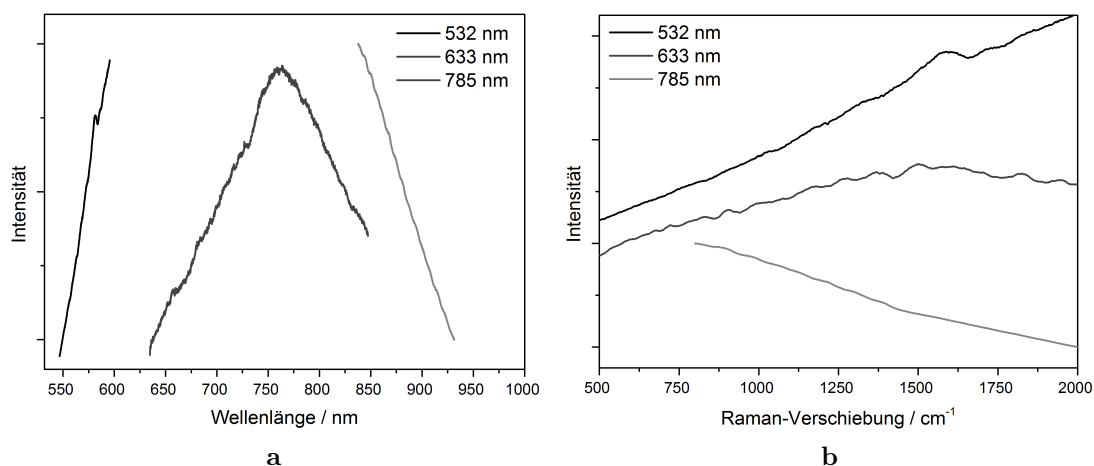


**Abb. 4.3.:** (a) Fotografische Aufnahme der HS1; (b) ATR-FTIR-Spektren der Edukte Glucose und Harnstoff sowie des Produkts HS1 mit Zuordnung der Signale nach [220].

In Abbildung 4.3a ist eine fotografische Aufnahme der Huminsäure in Form eines schwarzen Pulvers zu sehen, während Abbildung 4.3b die ATR-FTIR-Spektren der Edukte und des Produkts mit natürlicher Abundanz (HS1) zeigt. Das Spektrum von HS1 beinhaltet Signale, welche sich stark von den Signalen von Glucose und Harnstoff unterscheiden. Besonders deutlich zu erkennen sind die C-O-Schwingungen bei ca.  $1000\text{ cm}^{-1}$  bis  $1500\text{ cm}^{-1}$  sowie die  $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung ( $1688\text{ cm}^{-1}$ ), die  $\nu(\text{C}-\text{H})$ -Schwingung ( $2980\text{ cm}^{-1}$ ) und die  $\nu(\text{O}-\text{H})$ - bzw.  $\nu(\text{N}-\text{H})$ -Schwingungen ( $3180\text{ cm}^{-1}$ ). Auffällig ist zudem, dass die Signale der HS1 eine deutlich höhere Halbwertsbreite besitzen als diejenige der Edukte. Daraus lässt sich eine sehr heterogene Struktur des Produktes ableiten. Da sich die Signalpositionen der HS1 deutlich von denen der Edukte unterscheidet, kann auf Reaktionen der funktionellen Gruppen der Edukte gefolgert werden. Die HS besitzt eine hohe strukturelle Variabilität mit ähnlichen funktionellen Gruppen, wie sie auch in natürlichen Huminstoffen vorkommen.[220] Sie ist somit als Modellsubstanz geeignet, um die Anwendbarkeit der SIRM auf organisches Bodenmaterial (SOM) zu untersuchen.

Huminstoffe besitzen im Allgemeinen eine hohe Autofluoreszenz, die zu einem erhöhten Hintergrund der RM-Spektren führt, welcher eine Identifikation und Evaluation der Spektren erschweren bzw. verhindern kann. Die künstlichen Huminsäuren zeigen auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu den natürlichen Huminstoffen ein vergleichbares Verhalten. Daher wurde anhand dieser HS die Anwendbarkeit unterschiedlicher Analysemethoden für die SIRM untersucht, welche in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

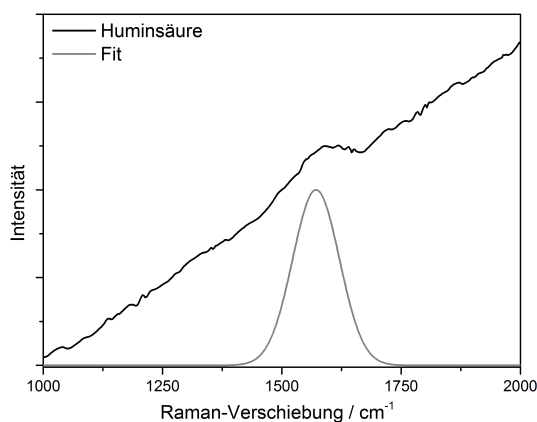




**Abb. 4.4.:** Raman-Spektren von HS1 bei unterschiedlichen Wellenlängen (532 nm, 633 nm, 785 nm) in Abhängigkeit der Wellenlängen (a) und der Raman-Verschiebung (b).

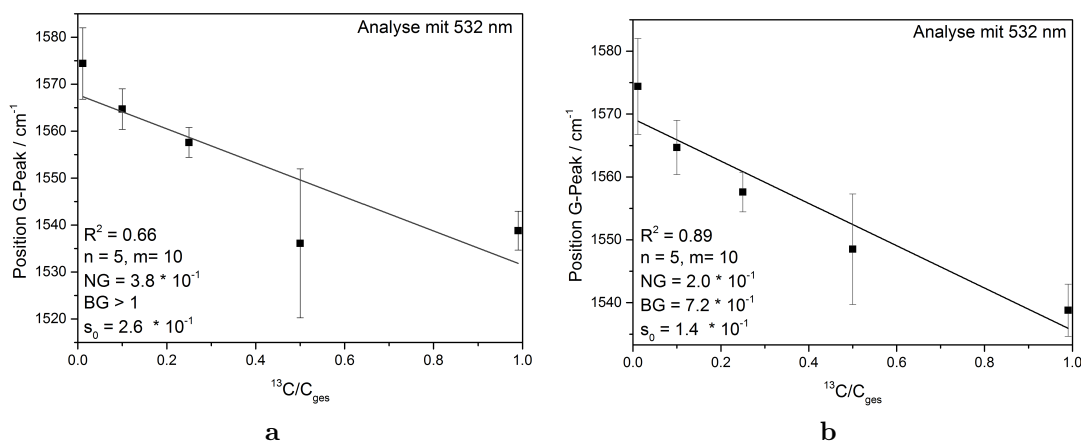
#### 4.1.4. Analyse bei unterschiedlichen Wellenlängen

Abbildung 4.4a zeigt die Ergebnisse der Raman-Analyse bei den Anregungswellenlängen 532 nm, 633 nm und 785 nm am Beispiel der HS1 aufgetragen gegen die absolute Wellenlänge in nm. Das absolute Maximum der Fluoreszenzemission (welche sich in Form eines starken Hintergrundsignals erkennen lässt) beträgt hierbei unabhängig von der Anregungswellenlänge ca. 760 nm. Die Raman-Signale hingegen treten relativ zur eingestrahlteten Energie auf, wodurch sich die absolute Energie bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ändert. Durch die Wahl einer geeigneten Wellenlänge kann es daher möglich sein, den Fluoreszenzuntergrund zu minimieren. In den Spektren mit 633-nm- und 785-nm-Anregungswellenlänge lassen sich keine Raman-Signale erkennen, lediglich das 532-nm-Spektrum besitzt ein schwaches Signal bei ca.  $1590\text{ cm}^{-1}$ , welches den G-Peak darstellt (vgl. Abbildung 4.4b).



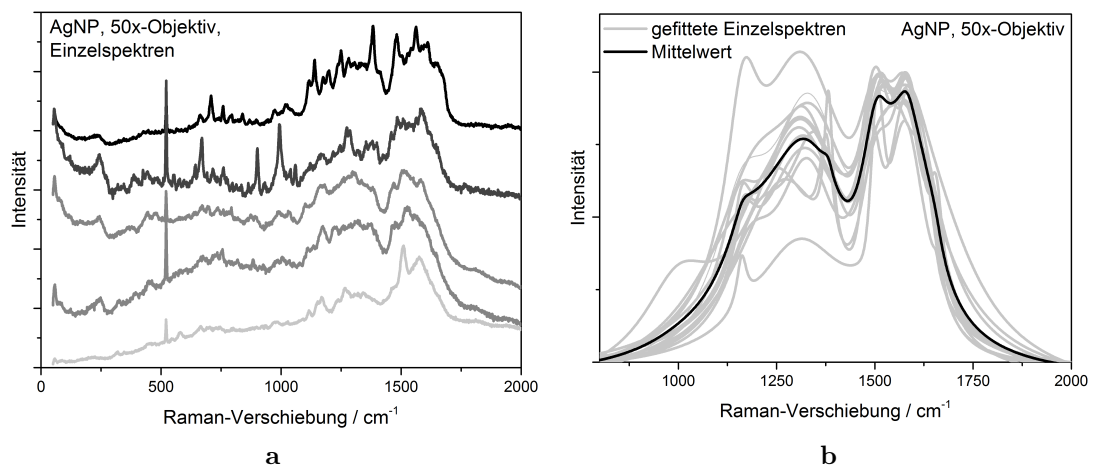
**Abb. 4.5.:** Einbandenfit nach Basislinienkorrektur eines Raman-Spektrums der HS1 bei 532-nm-Anregungswellenlänge.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.6.:** (a) und (b): Lineare Regressionen ( $n = 5$ ,  $m = 10$ ) der G-Peakposition bei 532 nm in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Anteils mit zwei unterschiedlichen  $0.5 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Proben.

Die mit dem 532-nm-Laser erhaltenen Spektren wurden im weiteren Verlauf zunächst Basislinien-korrigiert und mittels Einbandenfit genähert. Aus Abbildung 4.5 lässt sich erkennen, dass der Fit nur eine sehr grobe Näherung der Bandenposition darstellt, da der Fluoreszenzuntergrund große Teile des Spektrums überlagert. Darüber hinaus wird der D-Peak bei ca.  $1350 \text{ cm}^{-1}$  vollständig vom Fluoreszenzuntergrund überlagert, was die Auswertung der Spektren erschwert. Um die Anwendbarkeit der Analyse mit 532-nm-Anregungswellenlänge genauer zu untersuchen, wurde eine lineare Regression mit Proben unterschiedlichen  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Anteils (HS1, HS10, HS25, HS50 und HS99) durchgeführt, welche in Abbildung 4.6a dargestellt ist. Insgesamt ergibt sich ein linearer Verlauf mit einer Nachweisgrenze (NG) von  $3.8 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  und einer Bestimmungsgrenze (BG) außerhalb des betrachteten Bereiches. Die Verfahrensstandardabweichung ( $s_0$ ) beträgt  $2.6 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Für eine Analyse von Realproben ist die RM mit 532-nm-Anregungswellenlänge damit nicht geeignet, da eine Bestimmung des Isotopengehaltes nicht stattfinden kann. Eine genauere Evaluierung der Kalibriergerade zeigt zusätzlich, dass der Wert der HS50 (ca.  $0.50 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ) eine sehr hohe Standardabweichung besitzt und beispielsweise unter dem Wert der HS99 (ca.  $0.99 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ) liegt. Um Fehler bei der Synthese der HS50 auszuschließen, wurde die Reaktion wiederholt. Die Kalibrierung mit der neu erhaltenen HS50 ist in Abbildung 4.6b dargestellt. Durch die Verwendung der neuen HS50 können die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verringert werden ( $\text{NG} = 2.0 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ,  $\text{BG} = 7.1 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ,  $s_0 = 7.1 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ). Diese sind jedoch ebenfalls nicht ausreichend für Umweltproben. Für die weiteren Analysen wurde die neu synthetisierte HS50 verwendet.



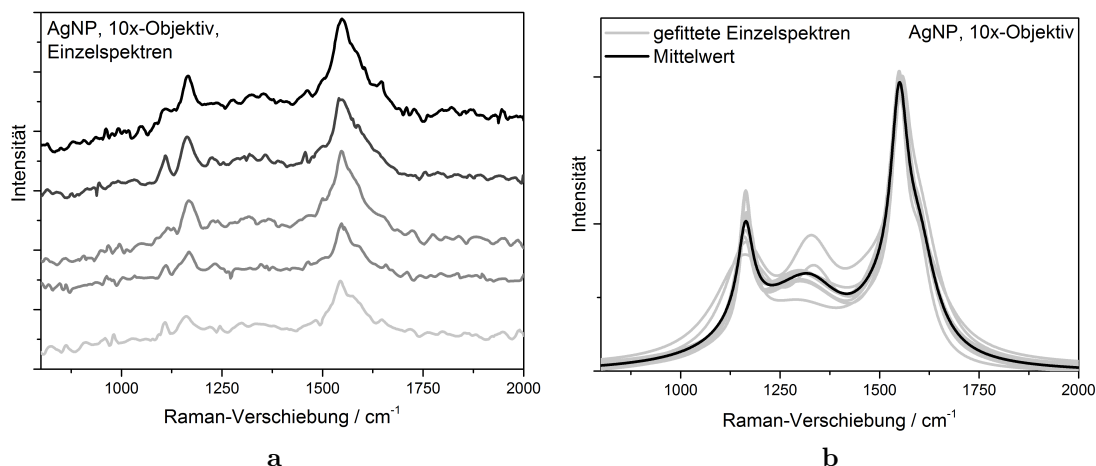
**Abb. 4.7.:** (a) SERS-Einzelspektren der HS1 an unterschiedlichen Positionen; (b) Basislinienkorrigierte und gefittete SERS-Einzelspektren sowie Mittelwertspektrum.

#### 4.1.5. SERS

Da die Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) durch elektromagnetische sowie chemische Wechselwirkungen Raman-Signale verstärken und zusätzlich Fluoreszenz verringern kann (vgl. Kapitel 2.1.6), sollte anhand von HS1 überprüft werden, inwiefern sich die Kombination aus SIRM und SERS (sogenannte SIRM-SERS) eignet, um SOM zu analysieren. Beispielfhaft sind die SERS-Einzelspektren, die an fünf unterschiedlichen Positionen der HS1 aufgenommen wurden, in Abbildung 4.7a dargestellt. Die SERS-Spektren unterschieden sich dabei deutlich von den in Kapitel 4.1.4 gezeigten RM-Spektren. Durch die Verstärkung werden einzelne Signale erkennbar und der Fluoreszenzuntergrund ist deutlich geringer. Sowohl der D-, als auch der G-Peak, lassen sich in der Hüllkurve der Spektren (welche sich aus dem Fünfbandenfit ergibt) eindeutig erkennen. In den SERS-Spektren setzen sich dabei sowohl der D-, als auch der G-Peak aus weiteren einzelnen Peaks zusammen, welche ebenfalls verstärkt werden. Da die Verstärkung dabei deutlich von der Anlagerung der Silbernanopartikel (AgNP) an die Probe abhängt, welche sich positionsbedingt unterscheidet, werden in jedem Spektrum die einzelnen Signale unterschiedlich intensiv verstärkt. Es ist folglich unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur bedingt möglich, reproduzierbare SERS-Spektren zu erhalten (vgl. Abbildung 4.7a).

Abbildung 4.7b, in der die basislinienkorrigierten und mittels Fünfbandenfit angenäherten Spektren dargestellt sind, unterstreicht diesen Sachverhalt. Die Fits der Einzelspektren weichen stark voneinander ab. Zusätzlich besitzen sie zwei Maxima im Bereich des G-Peaks um 1590 cm<sup>-1</sup>. Da beide Maxima je nach Probenposition verschieden intensiv ausgeprägt sind, kommt es zu großen Variationen in der Über-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.8.:** (a) SERS-Einzelspektren bei 10×-Objektiv der HS1 an unterschiedlichen Positionen; (b) Basislinienkorrigierte und gefittete Einzelspektren sowie Mittelwertspektrum.

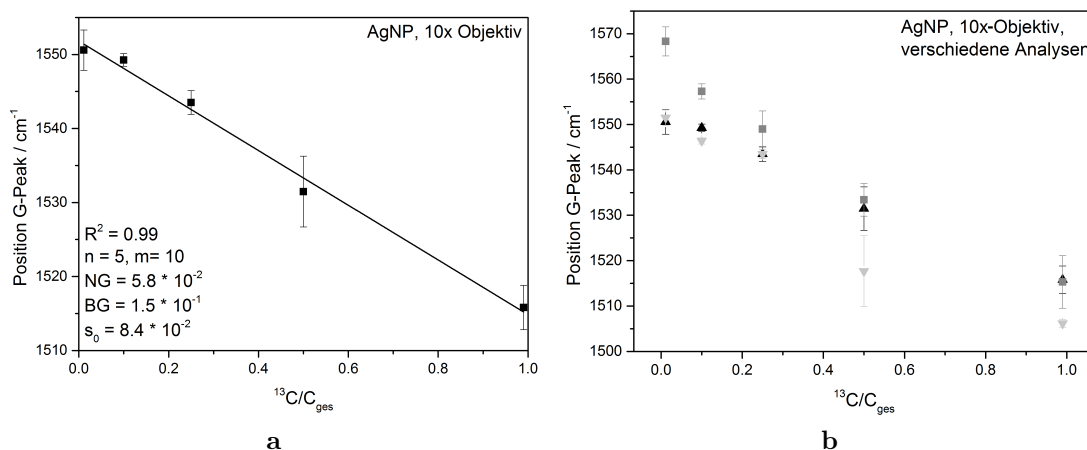
lagerung beider Maxima, wodurch eine reproduzierbare Bestimmung der Position des G-Peaks nicht möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass SERS bei der Analyse der HS angewendet werden kann. Auf Grund des Mechanismus der Verstärkung ist es jedoch zur reproduzierbaren Bestimmung des Isotopengehaltes anhand der Verschiebung des G-Peaks nicht geeignet. Dennoch kann SERS verwendet werden, um Informationen über die strukturelle Zusammensetzung von SOM zu erhalten.

##### 4.1.6. SERS bei geringerer Vergrößerung

Es wurde weiterhin überprüft, inwiefern eine Analyse der HS mit AgNP bei einer geringeren Vergrößerung (10×-Objektiv) durchgeführt werden kann. Hierbei werden die Signale über größere Probenvolumina gemittelt, wodurch die Reproduzierbarkeit erhöht werden kann. Es zeigt sich eine Fluoreszenzverringering, welche eine Analyse der HS erlaubt (vgl. Abbildung 4.8a). Zusätzlich lassen die in Abbildung 4.8b gezeigten, mittels Fünfbandenfit erhaltenen Spektren eine hohe Reproduzierbarkeit erkennen. Die Kalibrierung der G-Peak-Position in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses mit AgNP und 10×-Objektiv ist in Abbildung 4.9a dargestellt. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einer NG von  $5.8 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ , einer BG von  $1.5 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  und  $s_0$  von  $8.4 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ .

Die Wiederholung der Analyse an mehreren Tagen mit frisch erzeugten Kolloiden (unterschiedliche Ansätze) zeigt, dass die erhaltene Position des G-Peaks für die einzelnen HS innerhalb einer Probe (mit gleichen AgNP) reproduzierbar ist. Für den Vergleich der Analysen mit verschiedenen AgNP variieren die Ergebnisse



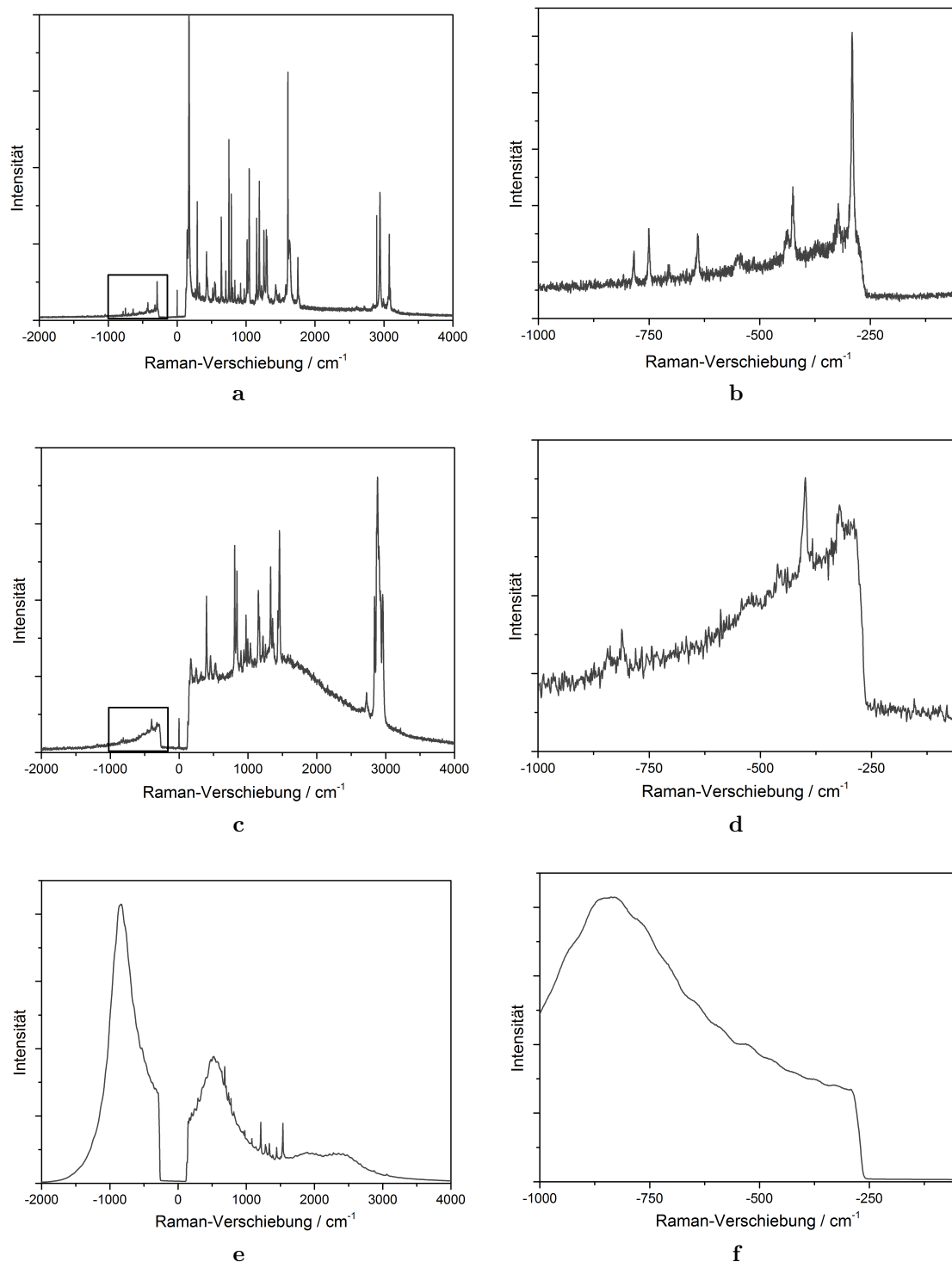
**Abb. 4.9.:** a) Lineare Regressionen ( $n = 5$ ,  $m = 10$ ) der G-Peakposition in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Anteils bei SERS bei geringer Vergrößerung; (b) G-Peakpositionen in unterschiedlichen Analysen.

jedoch stark. SERS bei geringer Vergrößerung ist folglich nicht geeignet, um eine vorhandene Kalibrierung wieder zu verwenden. Obwohl intensiv auf die Verwendung gleicher Reaktionsbedingungen bei der Synthese der AgNP geachtet wurde, können Unterschiede in der Oberflächenzusammensetzung der AgNP nicht vollständig ausgeschlossen werden. Durch die abweichende Beschaffenheit können die AgNP an verschiedenen Stellen der HS adsorbiert werden, wodurch die unterschiedlichen Peakintensitäten hervorgerufen werden.

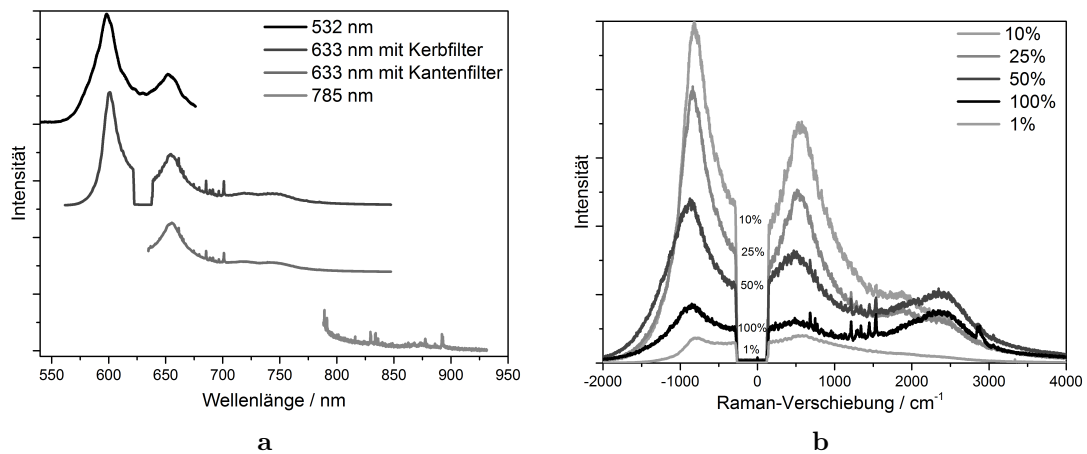
#### 4.1.7. Anti-Stokes-Fluoreszenz

Als weitere Methode zur Vermeidung von Fluoreszenz sollte validiert werden, inwiefern sich die Analyse im Anti-Stokes(AS)-Bereich eignet. Dafür wurden drei Substanzen ausgewählt, die im Stokes-Bereich sowohl eine ausgeprägte Fluoreszenz als auch Raman-Signale zeigten. Die AS-Raman-Spektren der Acetylsalicylsäure (ASS), der PP-Probe und der PS-Probe bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Alle Proben zeigen die charakteristischen Raman-Signale sowohl im Stokes-, als auch Anti-Stokes-Bereich, wobei jene im Stokes-Bereich deutlich intensiver sind. Zusätzlich ist im AS-Bereich die Intensität der Signale indirekt proportional zu den Wellenzahlen (betragsmäßig höhere Wellenzahlen führten zu schwächeren Signalen). Dies stimmt mit theoretischen Überlegungen überein, dass laut Boltzmann-Verteilung die angeregten Zustände höherer Energie geringer besetzt sind. Die AS-RM eignet sich daher nur in geringem Maße für die Analyse von Proben, welche ihre charakteristischen Signale hauptsächlich bei hohen Wellenzahlen zeigen (z.B: Polyethylen oder Kohlenwasserstoffe).

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.10.:** (a) Raman-Spektrum einer ASS-Tablette; (b) Vergrößerung des Anti-Stokes-Bereiches ( $-1000 \text{ cm}^{-1}$  bis  $-50 \text{ cm}^{-1}$ ) der ASS-Tablette; (c) Raman-Spektrum einer PP-Probe; (d) Vergrößerung des Anti-Stokes-Bereiches der PP-Probe; (e) Raman-Spektrum einer PS-Probe; (f) Vergrößerung des Anti-Stokes-Bereiches der PS-Probe.



**Abb. 4.11.:** (a) Spektren eines Kunststoffbeutels bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (in nm); (b) Spektren bei unterschiedlicher Anregungsenergie (in Prozent der Maximalleistung) bei 633-nm-Anregungswellenlänge.

In allen Proben ist im Stokes-Bereich ein deutlicher Fluoreszenzuntergrund zu erkennen. Zusätzlich ist jedoch auch ein Hintergrund im AS-Bereich vorhanden. Bei der ASS- und PP-Probe ist die Fluoreszenz im AS-Bereich deutlich geringer als im Stokes-Bereich. Insgesamt lässt sich eine Hüllkurve erkennen, welche sich über den gesamten Bereich erstreckt und nur durch den Ausschnitt des Kerbfilters ( $-260 - 115 \text{ cm}^{-1}$ ) unterbrochen wird. Eine Identifikation der ASS- und PP-Probe ist durch die alleinige Aufnahme des AS-Bereiches möglich (vgl. Abbildungen 4.10b und 4.10d). Bei der PS-Probe hingegen ist ein so starker Fluoreszenzuntergrund vorhanden, dass eine Identifizierung allein durch den AS-Bereich unmöglich wird (vgl. Abbildung 4.10f). Dies zeigt, dass nicht in allen Fällen eine Identifikation der Probe durch die Verwendung des AS-Bereiches erfolgen kann.

Unter Berücksichtigung der Energieerhaltung muss die Energie der emittierten Photonen aus der Fluoreszenz gleich oder geringer der eingestrahltten Energie sein, falls keine zusätzlichen Prozesse Energie liefern. Um optische Interferenzeffekte auszuschließen, wird die PS-Probe in einem Multiwellenlängenansatz untersucht, dessen Ergebnisse in Abbildung 4.11a dargestellt sind. In allen vier Anordnungen (532 nm, 633 nm und 785 nm; jeweils mit Kantenfiltern sowie 633 nm mit Kerbfilter) ist das Emissionsmaximum des Hintergrundes relativ zur absoluten Wellenlänge konstant. Das Emissionsmaximum ist folglich eine intrinsische Eigenschaft der Proben und damit unabhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge. Optische Interferenzen können daher als Ursache ausgeschlossen werden, da diese bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen variieren würden.

Um mögliche Mehrphotoneneffekte auszuschließen, wurden die PS-Probe bei unterschiedlicher Laserenergie untersucht. Da Mehrphotonenprozesse stark mit der

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Photonendichte korrelieren, sollte es mit zunehmender Laserintensität zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität des Anti-Stokes- zu Stokes-Bereiches kommen. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie Abbildung 4.11b zeigt. Die Fluoreszenzintensität erhöht sich sowohl im Anti-Stokes- als auch im Stokes-Bereich mit zunehmender Laserleistung (von 1% bis 10% optische Dichte), dann tritt sogenanntes *photobleaching* auf. Dieser Effekt bewirkt eine Zerstörung der Fluorophore durch eine hohe Laserleistung und damit eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Zusätzlich kommt es zu einer Veränderung der relativen Intensitäten der drei Maxima zueinander. Unter den gewählten Messbedingungen ist eine Identifikation der Probe ab 50% optischer Dichte (ca. 6.3 mW) möglich.

Eine physikalische Erklärung für den Fluoreszenzuntergrund im AS-Bereich kann nicht mit Sicherheit gegeben werden. Die AS-Fluoreszenz wird jedoch vor allem in der Fluoreszenzspektroskopie und Laserkühlung angewandt. Eine ausführliche Beschreibung der zugrundeliegenden quantenmechanischen Effekte kann in der zugehörigen Literatur gefunden werden.[221–224] Kurz zusammengefasst, stammt die zusätzliche Energie des emittierten Photons aus Wechselwirkungen mit den Schwingungsgrundzuständen des Probenmoleküls.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die AS-RM unter gewissen Umständen zur Vermeidung eines Fluoreszenzuntergrundes geeignet ist. Da das Fluoreszenzmuster unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, könnte ein vorheriger Scan des Fluoreszenzuntergrundes (beispielsweise mittels eines Fluoreszenzspektrometers) bereits wichtige Hinweise liefern, ob sich AS-RM für die Analyse der Probe eignet. Falls die Proben bei den Wellenlängen, die dem AS-Bereich entsprechen, nur eine geringe Fluoreszenz zeigen, ist die Analyse mittels AS-RM möglich. Die Untersuchung der Proben mit RM im Stokes-Bereich, falls möglich in Kombination mit *photobleaching*, erscheint jedoch deutlich sinnvoller und zielführender. Die AS-RM wurde folglich nicht für die weitere Analyse der HS verwendet.

##### 4.1.8. Temperaturabhängige RM

Als nächstes wurde überprüft, ob sich die von Ess et al. [225] beschriebene temperaturabhängige Abnahme des Fluoreszenzhintergrundes bei der RM-Analyse von verschiedenen Rußen auch auf die künstlichen Huminsäuren anwenden lässt. Die temperaturabhängigen RM-Spektren von HS1 sind in Abbildung 4.12 gezeigt. Es lässt sich eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzhintergrundes von 300 bis 500 K erkennen, danach bleibt der Hintergrund in etwa konstant. Eine Überlagerung der RM-Signale durch den Hintergrund ist ebenfalls deutlich sichtbar. Abbildung 4.13 zeigt die basislinienkorrigierten und auf den G-Peak normierten Spektren in Abhängigkeit der Temperatur. Es lässt sich (mit Ausnahme des ersten Wertes) eine



#### 4.1. Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie von SOM

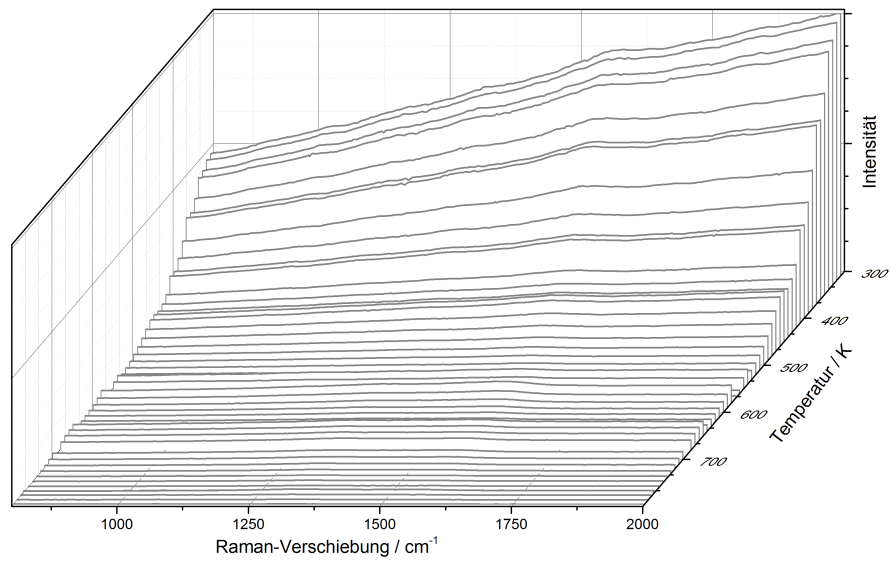


Abb. 4.12.: Temperaturabhängige Raman-Spektren der HS1.

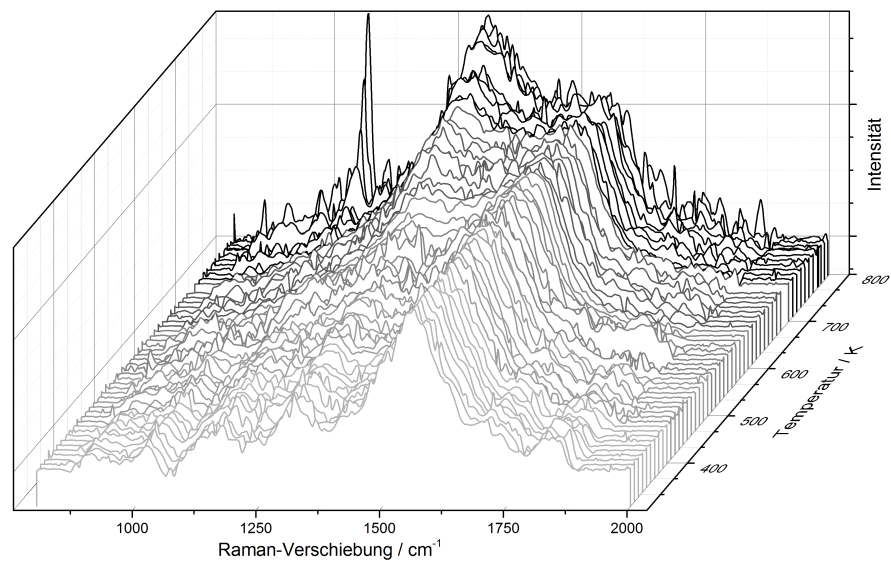
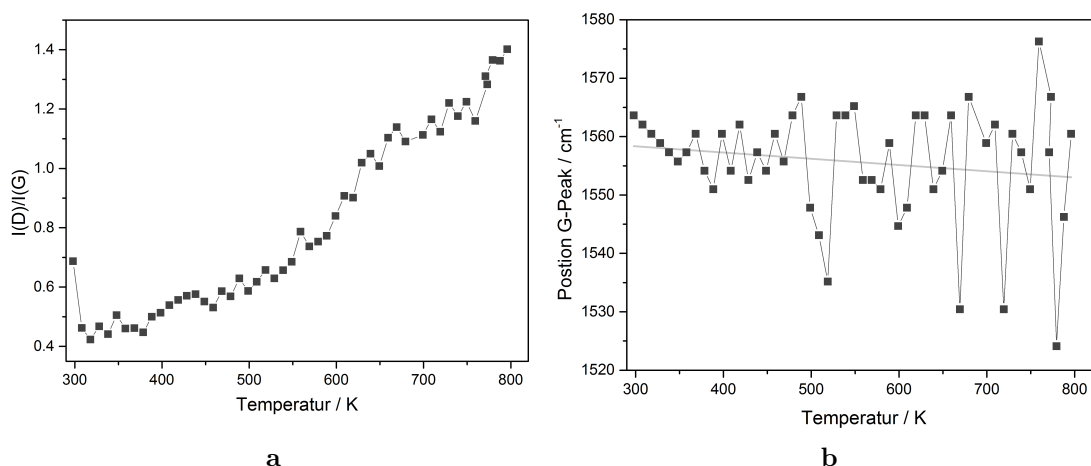


Abb. 4.13.: Basislinienkorrigierte temperaturabhängige Raman-Spektren der HS1.

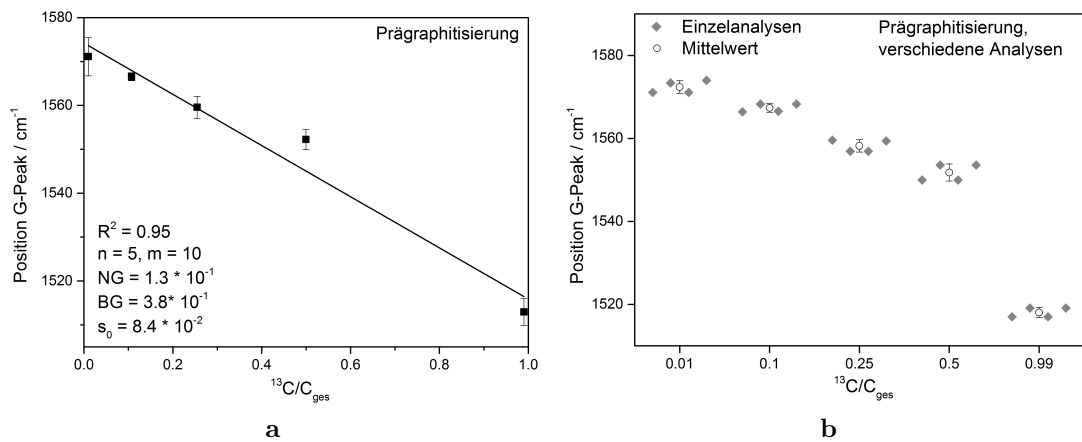
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.14.:** (a) Relatives Intensitätsverhältnis von D- und G-Peak der HS1 ( $I(D)/I(G)$ ) in Abhängigkeit der Temperatur; (b) Position des G-Peaks von HS1 in Abhängigkeit der Temperatur.

kontinuierliche Zunahme der relativen D-Peak-Intensität erkennen, das  $I(D)/I(G)$ -Verhältnis nimmt folglich ebenfalls zu (vgl. Abbildung 4.14a). Ab ca. 750 K zeigt sich zudem ein Signal bei ca.  $1070\text{ cm}^{-1}$ , welches der CN-Streckschwingung zugeordnet werden kann.[219]. Insgesamt kann gefolgert werden, dass sich die strukturelle Ordnung der Huminsäure bereits bei kleinen Temperaturen ändert. Die ungeordneten, amorphen Anteile in der HS werden über den gesamten Temperaturverlauf oxidiert und es bleiben geordnetere graphitähnliche Strukturen zurück. Dies ist in Übereinstimmung mit den von Ess et al.[225] berichteten Ergebnissen, die ebenfalls eine Zunahme der strukturellen Ordnung in der Ruß-Nanostruktur mit steigender Temperatur beobachteten.

Weiterhin kommt es mit steigender Temperatur zu einer starken Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, was sich dadurch erklären lässt, dass bei höheren Temperaturen der Großteil der HS bereits oxidiert wurde, wodurch nur noch eine geringe Menge zur Analyse zur Verfügung steht. Zusätzlich verschiebt sich die Position des G-Peaks zunächst mit zunehmender Temperatur zu kleineren Wellenzahlen. Ab ca. 350 K streuten die Werte der Positionen so stark, dass keine weiteren Aussagen zur Position getroffen werden können. Eine mögliche Erklärung liegt in dem verringerten Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie der zunehmenden Halbwertsbreite des G-Peaks. Da so eine genaue Bestimmung der Position des G-Peaks nur schwer möglich ist und die Einzelanalysen vorbereitungsintensiv und sehr zeitaufwändig sind, ist die Hochtemperatur für Routineanalysen nur bedingt geeignet, weshalb weitere Methoden zur Fluoreszenzminimierung bei SIRM-Analysen von HS untersucht wurden.



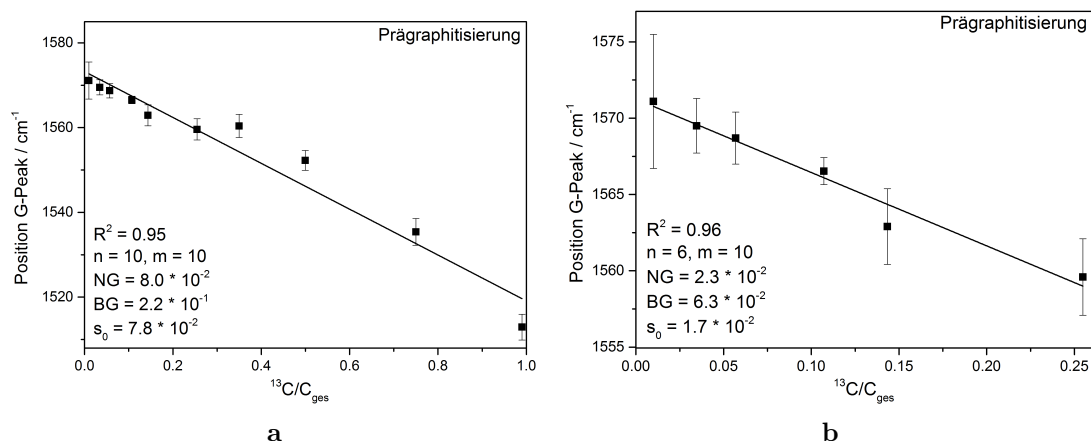
**Abb. 4.15.:** (a) Lineare Regression ( $n = 5$ ,  $m = 10$ ) der G-Peakposition in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Anteils bei Prägraphitisation; (b) Darstellung der bei vier Analysen erhaltenen Werte der G-Peak-Position sowie Mittelwerte der Einzelanalysen.

#### 4.1.9. Prägraphitisation

Eine weitere Analysemöglichkeit stellt die Prägraphitisation dar, bei der gezielt hohe Laserleistungen angewandt werden, um eine Degradation der Fluorophore zu gewährleisten. Es wird die Isotopenzusammensetzung der verbleibenden Probe analysiert. Durch die Einwirkung der hohen Temperaturen kann es zusätzlich zu einer Veränderung der Struktur der HS kommen (Prägraphitisation), für Aussagen zum Isotopengehalt ist jedoch ausschließlich die Position des G-Peaks von Bedeutung, solange eine vergleichbare Nanostruktur der Proben sichergestellt werden kann.

In Abbildung 4.15a ist die lineare Regression der fünf synthetisierten Proben zu sehen. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einer NG von  $1.3 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ , einer BG von  $3.8 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  und einer  $s_0$  von  $8.4 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Durch eine Vierfachbestimmung der Proben konnte eine gute Reproduzierbarkeit der G-Peak-Positionen mit nur geringfügigen Abweichungen der einzelnen Werte gezeigt werden (vgl. Abbildung 4.15b). Da die bisherigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Umweltanalysen nicht ausreichend sind, wurden lineare Regressionen für weitere Proben durchgeführt. Dazu wurden HS mit  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Gehalten von ca. 0.025, 0.05, 0.15, 0.35 und 0.75 synthetisiert. Die daraus erhaltene lineare Regression ist in Abbildung 4.16a gezeigt. Durch die weiteren Kalibrierpunkte konnte die Nachweisgrenze auf  $8.0 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ , die Bestimmungsgrenze auf  $2.2 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  und  $s_0$  auf  $7.8 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  gesenkt werden. Bei Betrachtung der einzelnen Werte fällt zudem auf, dass vor allem die Werte bis  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  einen linearen Zusammenhang zeigen, während die Werte ab ca.  $0.35 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  stärker von der Kalibriergerade abweichen. Da die für Umweltproben zu erwartenden Isotopenverhältnisse vor allem

## 4. Ergebnisse und Diskussion



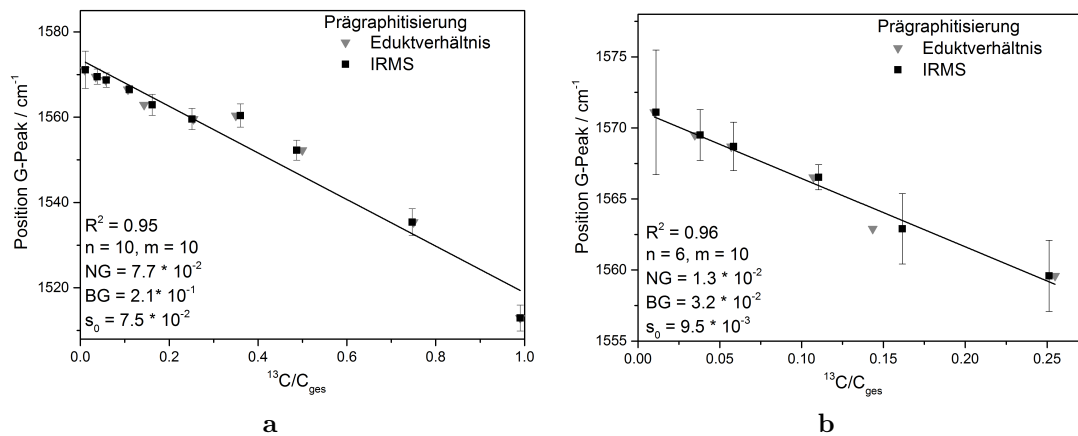
**Abb. 4.16.:** (a) Lineare Regression bei Prägraphitisierung der künstlichen Huminsäuren unter Einbezug weiterer Kalibrierpunkte ( $n = 10$ ,  $m = 10$ ); (b) Lineare Regression der Werte bis  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ .

im Bereich unter  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  liegen, wurde zur Optimierung der Kalibrierung eine lineare Regression der  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Werte bis einschließlich  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  durchgeführt, welche in Abbildung 4.16b zu sehen ist. Die daraus erhaltene Nachweisgrenze beträgt  $2.3 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ , bei einer Bestimmungsgrenze von  $6.3 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  und  $s_0$  von  $1.7 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ .

Es kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, wodurch die größere Abweichung der G-Peak-Positionen über  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  hervorgerufen wird. Eine Möglichkeit besteht in Isotopenfraktionierungseffekten während der Synthese. Es sind nur die Herstellerangaben für die  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Gehalte der Edukte bekannt. Informationen zum Einfluss der Isotopenfraktionierung bei der Synthese der HS liegen nicht vor. Daher könnte die bisher verwendete Annahme, dass der  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Gehalt der Produkte dem der Edukte entsprach, fehlerhaft sein. Um dies ausschließen zu können, wurden Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie-Analysen der Proben durchgeführt.

### 4.1.10. Validierung der Kalibrierung mittels IRMS

Die durch die IRMS-Analysen erhaltenen Werte der Isotopenzusammensetzung von <sup>12</sup>C-Glucose, <sup>12</sup>C-Harnstoff und den künstlichen Huminsäuren sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Als Vergleich sind zusätzlich die aus den Eduktkonzentrationen berechneten  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Werte gezeigt. Auf Grund der hohen <sup>13</sup>C-Konzentration konnten die Proben mit  $0.99 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Anteil (<sup>13</sup>C-Glucose, <sup>13</sup>C-Harnstoff und HS99) nicht analysiert werden. Bei den meisten Proben stimmen die mittels IRMS bestimmten Werte mit den theoretischen Isotopenanteilen überein. Ausnahmen hiervon sind die HS2.5 und HS15, die relative Fehler von 34.2% bzw. 11.5% aufweisen.



**Abb. 4.17.:** (a) Lineare Regression der G-Peak-Positionen in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses bei Prägraphitisierung unter Einbezug der IRMS-Ergebnisse ( $n = 10, m = 10$ ); (b) Lineare Regression bis  $0.25 \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  ( $n = 6, m = 10$ ).

Da insgesamt keine systematischen Abweichungen zu beobachten waren, können Isotopenfraktionierungseffekte während der Synthese ausgeschlossen werden.

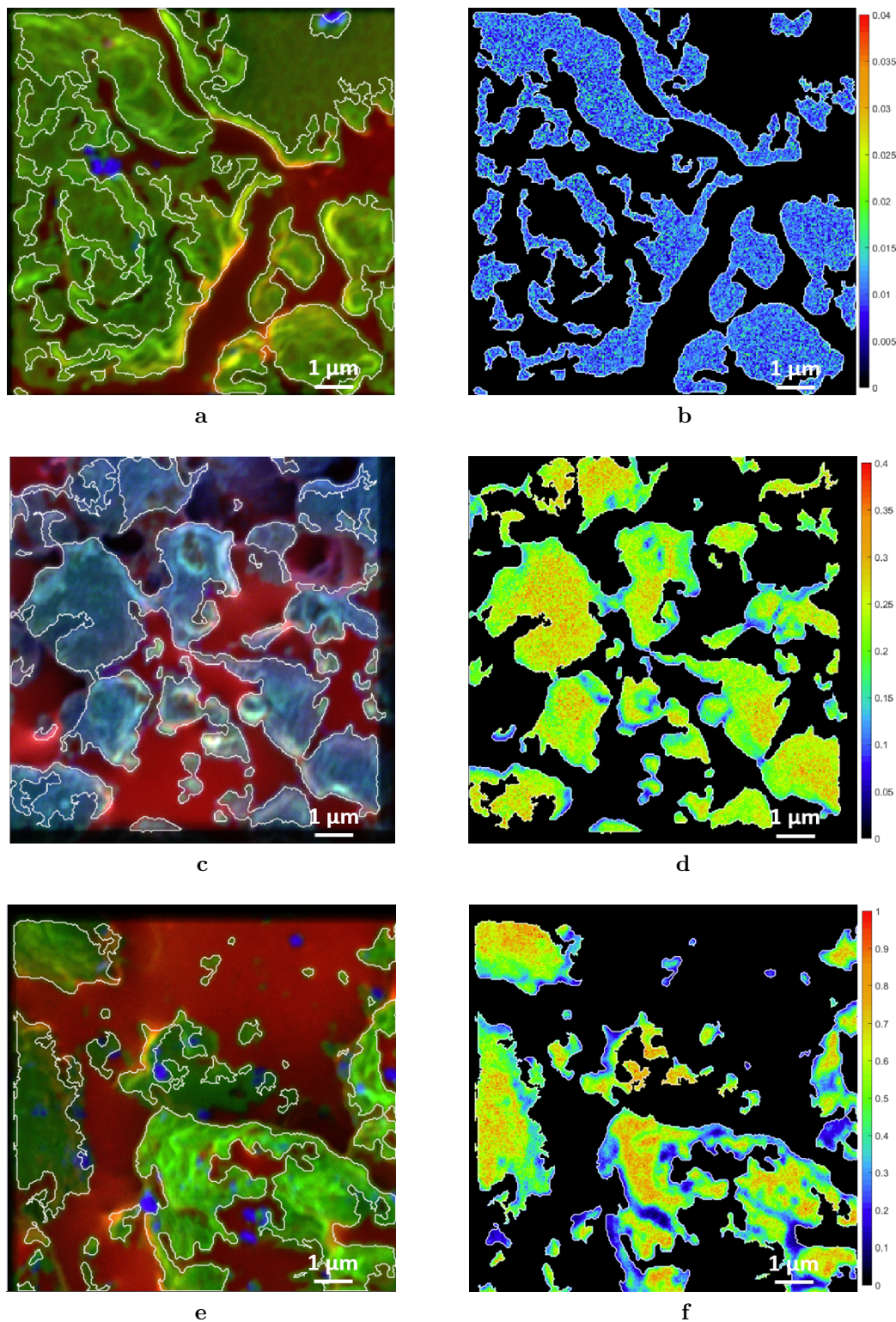
Durch Kombination mit den IRMS-Ergebnissen konnten verbesserte lineare Regressionen der G-Peak-Positionen in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses erstellt werden, welche in Abbildung 4.17 zu sehen sind. Die NG der Kalibrierung über den gesamten Bereich konnte geringfügig gesenkt werden (von  $8.0 \cdot 10^{-2} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  auf  $7.7 \cdot 10^{-1} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ). Bei der linearen Regression im Bereich bis  $0.25 \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  konnte die Nachweisgrenze von  $2.3 \cdot 10^{-2} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  auf  $1.3 \cdot 10^{-2} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  verringert werden. Die jeweiligen Bestimmungsgrenzen betragen  $2.1 \cdot 10^{-1} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bzw.  $3.2 \cdot 10^{-2} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bei einer Verfahrensstandardabweichung von  $7.5 \cdot 10^{-2} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bzw.  $9.5 \cdot 10^{-3} \ ^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Mit der Prägraphitisierung wurde somit eine geeignete Methode für das Bestimmen des  $^{13}\text{C}$ -Isotopengehalts in künstlichen Huminsäuren mittels SIRM entwickelt, welche verlässliche Informationen mit einer räumlichen Auflösung von bis zu  $1 \ \mu\text{m}$  liefert. Inwiefern sich die SIRM in Kombination mit der Prägraphitisierung für die Analyse von Realproben eignet, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

#### 4.1.11. Kombination mit NanoSIMS

Der Vergleich der SIRM mit NanoSIMS, welche bereits bei der Analyse von SOM eingesetzt wird (vgl. Kapitel 2.2.4), sollte helfen die erhaltenen Informationen zu verifizieren und zu erweitern. Die Ergebnisse der NanoSIMS-Analyse von HS1, HS25 und HS50 sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Hierbei sind auf der linken Seite die räumliche Verteilung der Ionen  $^{12}\text{C}^-$  (rot),  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (grün) und  $^{35}\text{Cl}^-$  (blau)



#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.18.:** Ergebnisse der NanoSIMS-Analyse für HS1 (a und b), HS 25 (c und d) und HS50 (e und f)  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Links: Zusammengesetzte Bilder aus den Ionen  $^{12}\text{C}^-$  (rot),  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (grün) und  $^{35}\text{Cl}^-$  (blau) mit ROIs (weiße Umrandungen); Rechts: Isotopenverhältnisse ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in den ROIs. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. Carsten W. Müller.

**Tab. 4.1.:** Vergleich der durch Kombination der Edukte erhaltenen theoretischen  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Werte mit den Ergebnissen aus der IRMS. (Proben mit  $0.99 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  konnten auf Grund des hohen Isotopengehalts nicht analysiert werden.)

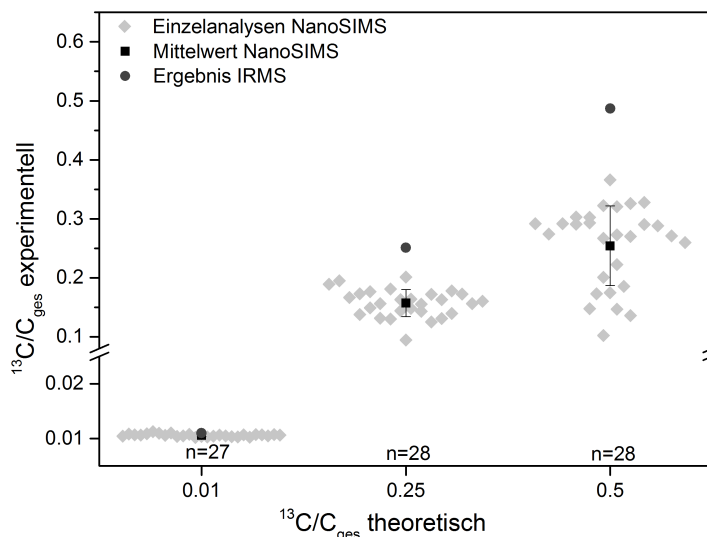
Probe	$^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ theoretisch	$^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ IRMS
$^{12}\text{C}$ -Glucose	0.011	0.011
$^{12}\text{C}$ -Harnstoff	0.011	0.011
HS1	0.011	0.011
HS2.5	0.025	0.038
HS5	0.057	0.058
HS10	0.107	0.110
HS15	0.143	0.162
HS25	0.255	0.251
HS35	0.350	0.360
HS50	0.500	0.487
HS75	0.690	0.747

für die einzelnen HS graphisch dargestellt. In weiß sind die interessanten Bereiche (ROIs, von *engl.*: region of interests) markiert, in denen die weitere Analyse des Isotopenverhältnisses stattfand. Die Abbildungen auf der rechten Seiten zeigen eine graphische Darstellung des Isotopenverhältnisses in Form von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . In Abbildung 4.19 sind die Ergebnisse der Punktmessungen des Isotopenverhältnisses (nach Umrechnung in  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ ) dargestellt. Der Mittelwert der Einzelmessungen sowie die mittels IRMS bestimmten Isotopenverhältnisse sind ebenfalls eingezeichnet.

Die HS mit natürlicher Abundanz (HS1, Abbildung 4.18b) besitzt ein nahezu homogenes  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis über die Probenoberfläche hinweg. Die HS25 (Abbildung 4.18d) zeigt im Vergleich dazu wie erwartet erhöhte Werte für das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis. Zusätzlich variiert die Isotopenzusammensetzung der einzelnen Partikel deutlich. Darüber hinaus werden an den Ecken und Rändern der ROIs geringere Anteile an  $^{13}\text{C}$  nachgewiesen, während der gemessene  $^{13}\text{C}$ -Gehalt im Inneren der ROIs erhöht ist. Dieser Trend kann auch bei HS50 (Abbildung 4.18f) beobachtet werden, bei der die Unterschiede zwischen Rand und Innerem der ROIs deutlich stärker ausgeprägt sind. Diese Inhomogenität in den Isotopenverhältnissen kann durch die topologischen Unterschiede in der Probe erklärt werden. Diese verursachen diverse Streueffekte oder sind für durch die Matrix hervorgerufene Einflüsse auf das Ionisationsvermögen verantwortlich.[79]

Die Ergebnisse der Punktmessungen (Abbildung 4.19) stimmen mit den für die graphischen Darstellungen beschriebenen Verläufen überein. HS1 zeigt nur eine geringe

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.19.:** Mit NanoSIMS bestimmte  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisse für drei HS-Proben (HS1, HS25, HS50) im Vergleich zu den Werten aus der IRMS-Analyse.

Streuung der Zusammensetzung, während bei HS25 und vor allem HS50 eine deutlich stärkere Abweichung zu erkennen ist. Die erhaltenen Mittelwerte des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses weichen vor allem bei höheren  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnissen deutlich von den mittels IRMS erhaltenen Ergebnissen ab. So beträgt das  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnis für HS1  $0.010 \pm 0.000$   $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  (IRMS: 0.0110), für HS25  $0.157 \pm 0.023$   $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  (IRMS: 0.2512) und für HS50  $0.250 \pm 0.068$   $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  (IRMS: 0.489). Die relativen Abweichungen der NanoSIMS-Analyse im Vergleich zur IRMS-Analyse liegen somit bei 3.6%, 37.5% bzw. 28.8%.

Sowohl mit SIRM als auch NanoSIMS konnten die Stabilisotopengehalte der Proben mit einer hohen räumlichen Auflösung bestimmt werden. Im Gegensatz zur NanoSIMS können mittels SIRM auch nicht leitende Proben direkt analysiert werden, wodurch nur eine geringe bzw. keine Probenvorbereitung notwendig ist. Dies ermöglicht eine schnelle, kostengünstige und verlässliche Analyse ohne Verwendung eines Hochvakuums. Die Vorteile der NanoSIMS liegen hingegen in der noch deutlich höheren räumlichen Auflösung und der geringen Eindringtiefe, durch die Oberflächenanalysen möglich werden. Die mittels NanoSIMS erhaltenen Werte streuen jedoch innerhalb einzelner Partikel stark, was durch topologische Effekte erklärt werden kann. Darüber kommt es zu deutlichen Abweichungen vom mittels IRMS-Analysen bestimmten Isotopenverhältnis. Die SIRM lieferte einen allgemeineren Überblick über den Isotopengehalt der HS. Auf Grund der deutlich geringeren Analysekosten stellt sie eine zukünftige Alternative zur NanoSIMS dar, falls der Isotopengehalt von SOM mit einer räumlichen Auflösung von bis zu 1  $\mu\text{m}$  bestimmt werden soll.



#### 4.1.12. Zusammenfassung der SIRM von SOM

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung der SIRM für die Analyse von organischen Bodenstoffen überprüft werden. Dazu wurde zunächst mit  $^{13}\text{C}$ -markierte Holzkohle aus Pyrolyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Position des G-Peaks im Raman-Spektrum stark von der strukturellen Ordnung der Proben abhing, da dieser aus einer Überlagerung von G- und D2-Bande entsteht. Eine Bestimmung des Isotopengehaltes der  $^{13}\text{C}$ -markierten Holzkohle war somit ohne Vergleich mit unmarkierten Holzkohlen gleicher Nanostruktur nicht möglich. Die erhaltenen Ergebnisse legten jedoch die Vermutung nahe, dass der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der markierten Holzkohle gering ist.

Um SIRM ohne den Einfluss unterschiedlicher Nanostrukturen in der Proben untersuchen zu können, sollten als Nächstes künstliche Huminsäuren mit bekanntem  $^{13}\text{C}$ -Gehalt synthetisiert werden. Hierfür wurde die Reaktion von Glucose mit Harnstoff in kochender Salzsäure gewählt, da die benötigten Edukte mit vollständiger Markierung kommerziell erhältlich waren. Die SIRM der unmarkierten und markierten Edukte bestätigte die vorhergesagte Rotverschiebung der Raman-Signale bei Verwendung schwererer Isotope. ATR-FTIR-Analysen der zunächst synthetisierten (unmarkierten)  $^{12}\text{C}$ -Huminsäure (HS1), welche zur Reaktionskontrolle durchgeführt wurden, bestätigten das Stattfinden der Reaktion durch eine Änderung der funktionellen Gruppen.

Bei der Analyse der HS zeigte sich eine hohe Autofluoreszenz, welche als Hintergrund in den Raman-Spektren auftrat und die Raman-Signale überlagerte. Daher sollten unterschiedliche Methoden zur Verringerung dieser Autofluoreszenz untersucht werden. Zunächst wurde überprüft, inwiefern sich die Wahl unterschiedlicher Anregungswellenlängen auf den Fluoreszenzhintergrund auswirkte. Bei Verwendung der Laser mit 633-nm- und 785-nm-Anregungswellenlänge konnten keine Signale der HS in den Spektren erkannt werden. Die Analyse mit 532-nm-Anregungswellenlänge zeigten einen leicht ausgeprägten G-Peak, der D-Peak war auch hier nicht zu erkennen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten einen linearen Zusammenhang der G-Peak-Positionen und des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses. Auf Grund der geringen Intensität des G-Peaks in den Spektren waren die Fits jedoch sehr fehlerbehaftet, wodurch sich relativ hohe Nachweisgrenzen ergaben, welche für die Analyse von Realproben nicht ausreichend waren.

Als nächstes wurde SERS auf ihre Eignung zur Analyse von HS überprüft. Durch die Verwendung von Silberkolloiden und eines Objektivs mit 50 $\times$ -Vergrößerung konnte eine elektromagnetische und chemische Verstärkung der Raman-Signale erreicht werden. Diese variierte jedoch zwischen den Einzelspektren in der Probe, da sie stark von der Position der Anlagerung der AgNP an der Probe abhing. Es zeigte sich, dass in den SERS-Spektren der G-Peak aus der Überlagerung zweier Banden

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

bestand, welche unterschiedlich intensiv verstärkt wurden, wodurch es zu großen Abweichungen der G-Peak-Position der einzelnen Probe kam. Eine reproduzierbare Bestimmung der G-Peak-Position mittels SERS war folglich nicht möglich. Die Verwendung von AgNP und eines 10×-Objektivs zur SERS-Analyse mit geringerer Vergrößerung erlaubte reproduzierbare Ergebnisse innerhalb einer Analyse, da eine Mittlung der Spektren über größere Probenvolumina stattfand. Die linearen Regressionen der G-Peak-Positionen in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses an mit jeweils neu synthetisierten AgNP durchgeführten Analysen zeigten jedoch, dass die G-Peak-Position stark von den verwendeten Kolloiden abhing. Reproduzierbare Ergebnisse konnten nicht erhalten werden. Eine mögliche Ursache lag auch hier in der unterschiedlich starken Verstärkung der beiden am G-Peak beteiligten Banden.

Da Fluoreszenz im Generellen nur bei niedrigeren Energien verglichen mit der des eingestrahltten Lichtes (Stokes-Bereich) auftreten sollte, wurde überprüft, ob die Analyse im Anti-Stokes-Bereich geeignet ist, Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Dazu wurden zunächst Proben gewählt, die zusätzlich zu einem Fluoreszenzhintergrund scharfe Raman-Signale aufwiesen (ASS, PP und PS). Es zeigte sich, dass alle drei Proben im Anti-Stokes-Bereich einen unterschiedlich stark ausgeprägten Fluoreszenzhintergrund besaßen. Die Analyse der PS-Probe bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ergab, dass die absolute Position (relativ zur Wellenlänge) und die Form der Fluoreszenz konstant blieb und folglich eine intrinsische Eigenschaft der Probe war. Die Beteiligung von Mehrphotonenprozessen an der Anti-Stokes-Fluoreszenz konnte durch die Verwendung unterschiedlicher Anregungsenergien ausgeschlossen werden, da kein Zusammenhang zwischen Photonendichte und AS-Fluoreszenz festgestellt wurde. Die AS-RM ist daher nur bedingt zur Fluoreszenzvermeidung geeignet.

Da bekannt ist, dass Temperaturerhöhungen Einfluss auf den Fluoreszenzhintergrund haben können, wurde überprüft inwiefern ein Erhitzen die Analyse der HS vereinfacht. Eine höhere Temperatur führte zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Zusätzlich nahm jedoch auch das I(D)/I(G)-Verhältnis zu, was für eine Oxidation der Probe bereits ab geringen Temperaturen sprach. Durch die aus der Oxidation resultierende Abnahme der Probenmenge folgte ein verringertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, das die Bestimmung der G-Peak-Position deutlich erschwerte und für größere Streuungen sorgte. Da die Messungen zusätzlich vorbereitungsintensiv und sehr zeitaufwändig waren, ist die Hochtemperatur-RM nur in geringem Maße für die Analyse der HS geeignet.

Die Prägraphitisierung der HS mit hoher Laserleistung lieferte erste vielversprechende Ergebnisse. Durch die Einwirkungen hoher Temperaturen wurden die Fluorophore vermindert und die Isotopenzusammensetzung der Probe konnte bestimmt werden. Da hierfür ausschließlich die Position des G-Peaks relevant war, waren eventuell auftretende Änderungen der Nanostruktur der HS nur von geringem Interesse.

## 4.2. RM-Analyse von fraktionierten Bodenproben

Die Prägraphitisierung lieferte eine gute lineare Regression der G-Peak-Positionen in Abhängigkeit des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnisses mit einer hohen Reproduzierbarkeit der Werte. Nach Synthese weiterer HS bei unterschiedlichen Isotopenverhältnissen konnte die Nachweisgrenze auf  $8.0 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  verringert werden. Wurde ausschließlich der für Umweltproben relevante Bereich bis  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  betrachtet, so ergab sich eine Nachweisgrenze von  $2.3 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Die anschließende Validierung der  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Werte der einzelnen HS mittels IRMS ergab insgesamt eine gute Übereinstimmung. Unter Verwendung dieser Werte konnte die Nachweisgrenze auf  $7.7 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  (gesamter Bereich) bzw.  $1.3 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  (bis 0.25) gesenkt werden. Die Bestimmungsgrenzen lagen bei  $2.1 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bzw.  $3.2 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Mit der Prägraphitisierung wurde somit eine Methode entwickelt, um SIRM für die Quantifizierung des  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Anteils in organischen Bodenproben anwenden zu können.

Die Analyse mittels NanoSIMS zeigte vor allem bei HS25 und HS50 starke Unterschiede in der Isotopenzusammensetzung innerhalb und am Rand der ROIs. Inwiefern dies die tatsächliche Zusammensetzung der Proben widerspiegelte oder durch Streu- und Matrixeffekte auf Grund der Topologie hervorgerufen wird, bleibt Gegenstand zukünftiger Studien. Die experimentell bestimmten Isotopenverhältnisse zeigten größere Abweichungen der einzelnen Messungen zueinander. Auch die Mittelwerte der Messungen wichen deutlich von den mittels IRMS bestimmten Werten ab.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die SIRM soweit optimiert werden, dass die Analyse von Proben zur Bestimmung der Isotopenzusammensetzung ermöglicht wurde. Mittels dieser Methode können schnelle und verlässliche Analysen von SOM mit hoher räumlicher Auflösung durchgeführt werden, deren Ergebnisse die mittels NanoSIMS getroffenen Aussagen ergänzen können. Auf Grund der vergleichbar geringen Kosten eignet sich die SIRM zusätzlich als Alternative zur NanoSIMS.

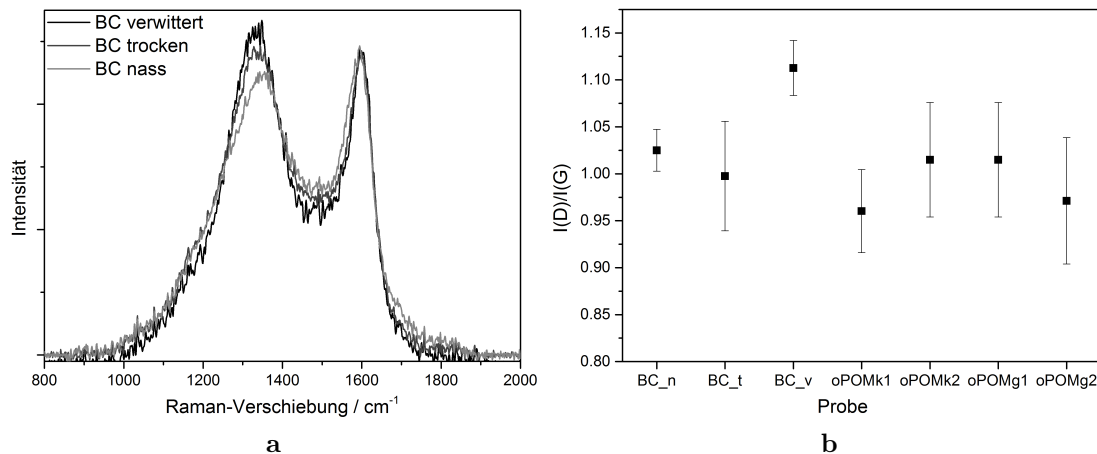
## 4.2. RM-Analyse von fraktionierten Bodenproben

### 4.2.1. RM-Analyse der Bodenproben

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels RM untersucht werden, inwiefern sich die Nanostrukturen einzelner physikalischer Fraktionen der Bodenproben nach Zugabe von Holzkohle (BC, von *engl.*: biochar) veränderten. Die Kombination mit den von Projektpartnern erhaltenen Ergebnissen aus CPMAS-NMR sollte helfen umfangreiche Informationen zu erhalten, welche Rückschlüsse auf den an der Erhöhung der Wasserrückhaltefähigkeit durch BC-Zugabe beteiligten Mechanismus ermöglichen. Dazu wurde zunächst die BC untersucht, welche den Böden hinzugefügt wurde. „BC

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

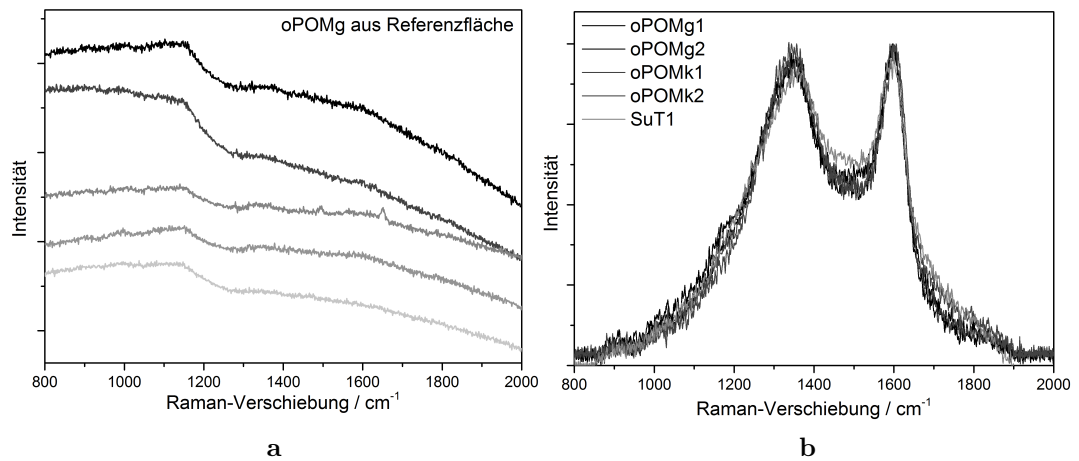
nass” bezeichnet die feuchte Holzkohle, so wie sie dem Boden hinzugefügt wurde, „BC trocken” ist die für weitere Analysenschritte getrocknete Holzkohle, während „BC verwittert” dem Boden ein Jahr nach dem Austrag wieder entnommen wurde.



**Abb. 4.20.:** (a) Normierte Raman-Mittelwertspektren von nasser, getrockneter und verwitterter Holzkohle nach Basislinienkorrektur; (b) relative Intensitätsverhältnisse von G- und D-Peak der Holzkohlen (nass: BC\_n, trocken: BC\_t, verwittert: BC\_v) und Fraktionen aus den Flächen mit Kohlezugabe.

Die mittels RM erhaltenen nach einer Basislinienkorrektur normierten Mittelwertspektren der verschiedenen Holzkohlearten sind in Abbildung 4.20a gezeigt, eine Übersicht der relativen Intensität der D-Bande ( $I(D)/I(G)$ ) findet sich in Abbildung 4.20b. In den Mittelwertspektren aller drei Holzkohlearten lassen sich Unterschiede in der relativen Intensität der G-Bande erkennen. Das  $I(D)/I(G)$ -Verhältnis und damit auch die strukturelle Ordnung nimmt von „BC nass” zu „BC verwittert” zu. Dabei ist zu beachten, dass nach Abbildung 4.20b auf Grund der hohen Standardabweichung in den Analysen von „BC trocken” keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem  $I(D)/I(G)$ -Verhältnis von „BC trocken” und „BC nass” zu beobachten sind. Das  $I(D)/I(G)$ -Verhältnis der verwitterten Holzkohle ist dahingegen deutlich erhöht. Die zunehmende Ordnung der Nanostruktur lässt sich dadurch erklären, dass nach dem Ausbringen auf das Feld zunächst die ungeordneten, amorphen Strukturen abgebaut und in das SOM integriert werden. Zurück bleibt eine geordnetere Holzkohle.

Die Raman-Mittelwertspektren, welche aus den einzelnen physikalischen Fraktionen der Flächen mit BC-Addition (oPOM: okkludiertes partikuläres organisches Material, g: größer als 20  $\mu\text{m}$ , k: kleiner als 20  $\mu\text{m}$ , SuT: Schluff und Ton, 1 und 2: Replikate, vgl. Kapitel 3.3.2) gewonnen werden, sind in Abbildung 4.21b dargestellt, während Abbildung 4.21a die Raman-Analyse der Proben aus den Kontrollflächen am Beispiel oPOMg zeigt. Die erhaltenen  $I(D)/I(G)$ -Verhältnisse der Fraktionen



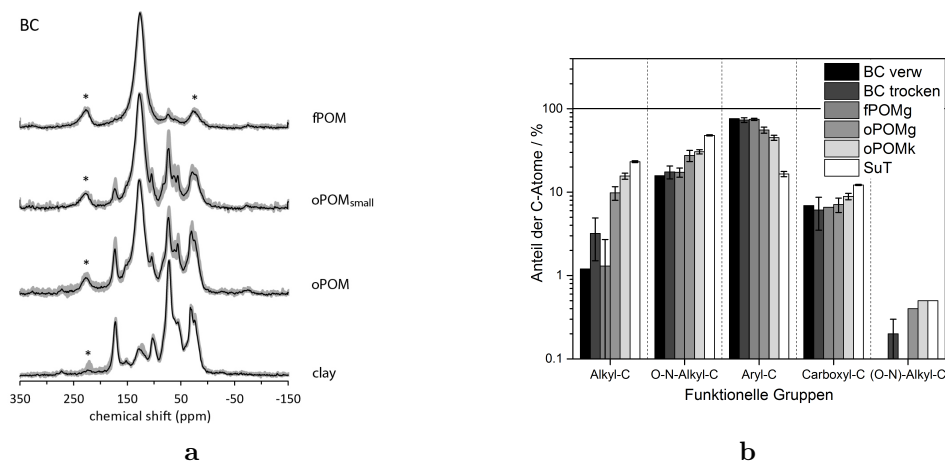
**Abb. 4.21.:** (a) Raman-Spektren einer Fraktion aus der Kontrollfläche (keine Kohlezugabe) am Beispiel von oPOMg; (b) Normierte Raman-Mittelwertspektren der einzelnen Bodenfraktionen in den Flächen mit Kohlezugabe nach Basislinienkorrektur.

aus den Flächen mit Kohlezugabe sind ebenfalls in Abbildung 4.20b eingefügt. Die Mittelwertspektren der einzelnen Fraktionen zeigen sehr ähnliche Raman-Spektren, die  $I(G)/I(G')$ -Verhältnisse unterschieden sich nicht statistisch signifikant und liegen im Bereich jener von „BC nass“ bzw. „BC verwittert“. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass einzelne Fraktionen hohe Ähnlichkeiten in der Ordnung der Nanostruktur besitzen, welche in etwa der Struktur der ausgebrachten Holzkohle entspricht. Leichte Unterschiede im Bereich zwischen den beiden Peaks sprechen für einen größeren Anteil an amorphen Strukturen in der SuT-Fraktion im Vergleich zu den oPOM-Fractionen. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, sind hier jedoch weitere Analysen von Nöten. Auf Grund der bei der Fraktionierung erhaltenen geringen Probenmengen wurde keine RM-Analyse der fPOM-Fractionen durchgeführt, da die gesamte Probe für weitere Untersuchungen der Projektpartner benötigt wurde. Die Raman-Spektren aus den Kontrollbereichen zeigen keinerlei Signale kohlenstoffhaltiger Verbindungen. Es kann folglich von einem höheren Anteil an ungeordnetem, amorphen Kohlenstoff in den Fraktionen nach BC-Zugabe ausgegangen werden.

#### 4.2.2. Kombination von RM und NMR

Die Ergebnisse der von Lydia Paetsch durchgeführten CPMAS-NMR-Spektroskopie der Fraktionen aus den Feldern mit BC-Zugabe sind in Abbildung 4.22a dargestellt. In Abbildung 4.22b sind die erhaltenen Integrale nach Mahieu et al.[73] den einzelnen funktionellen Gruppen zugeordnet. Bei den Anteilen der Alkyl-C, O-N-Alkyl-C und Aryl-C lassen sich im Gegensatz zu RM deutliche Unterschiede zwischen den oPOM

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.22.:** (a) CPMAS-NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen; (b) relativer Anteil der Kohlenstoffatome in den einzelnen funktionellen Gruppen. Zuordnung nach Mahieu et al. [73]. Mit freundlicher Genehmigung von Lydia Paetsch, Lehrstuhl für Bodenkunde.

und SuT-Fraktionen erkennen. Dies bedeutet, dass es in den einzelnen Fraktionen zu stärkeren Unterschieden in den funktionellen Gruppen, wie sie mittels NMR beschrieben werden, kommt. Die gesamte Kristallinität in den Nanostrukturen der Fraktionen, wie sie mittels RM beschrieben wird, bleibt jedoch unverändert.

Die Kombination aus CPMAS-NMR und RM kann daher hilfreich sein, ergänzende, komplementäre Informationen zu erhalten, welche dann Rückschlüsse auf den Einfluss der Strukturänderungen auf die Wasserrückhaltekapazität geben können. Die Ergebnisse der Projektpartner (hier nicht dargestellt) zeigen in dem untersuchten Feldexperiment allerdings keine Änderung der Wasserrückhaltefähigkeit und des Pflanzenwachstums nach BC-Zugabe, daher ist eine Wiederholung des Versuches mit anderen Bodenarten (z.B sandige Böden) sinnvoll.

### 4.2.3. Zusammenfassung der Analyse von fraktionierten Bodenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der RM für die Analytik von Bodenproben aus physikalischer Fraktionierung untersucht. Eine Bestimmung der Strukturen der Bodenbestandteile ist im Hinblick auf Aussagen zur Wasserrückhaltefähigkeit wichtig. Zunächst wurden Holzkohle vor und nach dem Ausbringen auf ein Feld untersucht. Es zeigte sich, dass innerhalb eines Jahres die strukturelle Ordnung der Holzkohle-Nanostruktur auf dem Feld deutlich zunimmt. Es werden folglich zunächst die ungeordneten, amorphen Anteile abgebaut und in das SOM integriert, wodurch eine geordnete Holzkohle zurückbleibt.

Die RM-Analyse der physikalischen Fraktionen ergab keine strukturellen Unterschiede der Nanostrukturen der Fraktionen. Lediglich ein geringer Anteil in den amorphen Strukturen in der SuT-Fraktion, im Vergleich zu den oPOM-Fraktionen, konnte festgestellt werden. Die RM-Spektren der Fraktionen aus den Kontrollflächen, denen keine Holzkohle zugesetzt wurde, zeigten keine Signale von kohlenstoffhaltigen Verbindungen, wodurch von deutlich geringeren Mengen an SOM ausgegangen werden konnte.

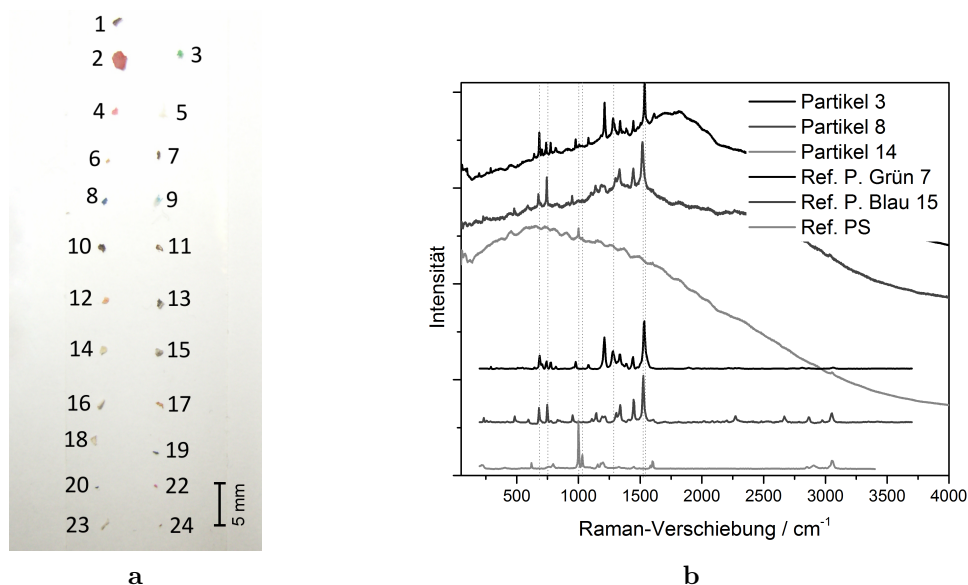
Der Vergleich mit CPMAS-NMR zeigte das Potential der RM für die Analyse von SOM. Die NMR-Ergebnisse sprachen für eine deutlich veränderte Zusammensetzung der funktionellen Gruppen in den einzelnen Fraktionen nach Kohlezugabe, während die RM-Analysen bestätigten, dass die Gesamt-Nanostruktur unverändert blieb. Da bei den in dieser Arbeit untersuchten Böden keine Einflüsse einer Holzkohlezugabe auf die Wasserrückhaltefähigkeit beobachtet werden konnten, sind in Zukunft weitere Studien nötig, um verlässliche Aussagen zum Mechanismus treffen zu können.

## 4.3. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern

### 4.3.1. Identifikation

Die Raman-Mikrospektroskopie wurde weiterhin angewandt, um in Sedimentproben des Gardasees eine große Anzahl an MP-Partikeln zu identifizieren. Zusätzlich zu Partikeln aus synthetischen Polymeren können auch solche nachgewiesen werden, welche Pigmente enthalten, in denen aber keine Polymersignale vorhanden sind. Ein Großteil dieser Partikel zeigt von MP abweichende optische und mechanische Eigenschaften, wie beispielsweise eine hohe Brüchigkeit. Weiterhin können in einigen dieser Partikel zusätzliche Bestandteile wie z.B. Gips und Ölsäure, die häufig in Farben und Lacken vorkommen, identifiziert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Bruchstücke von Farben und Lacken handelt, welche auf ähnlichen Wegen wie MP in aquatische Systeme gelangen und sich dort ebenfalls anreicherten. Diese werden analog zu MP als Mikropigmente (MPig) bezeichnet. Bei den Ergebnissen wird im Folgenden zwischen MP-Partikel, in denen das Polymer den Hauptbestandteil darstellt, gefärbten MP-Partikeln, die sowohl Pigmente und Kunststoff enthalten, und MPig-Partikel, in denen Pigmente der Hauptbestandteil sind, unterschieden. Es soll hierbei erwähnt werden, dass MPig-Partikel auch Bindemittel aus synthetischen Polymeren, wie Acrylate und Polystyrol, enthalten können. Diese kommen jedoch nur in geringfügigen Mengen vor, so dass sie meist nicht mittels RM identifiziert werden können.

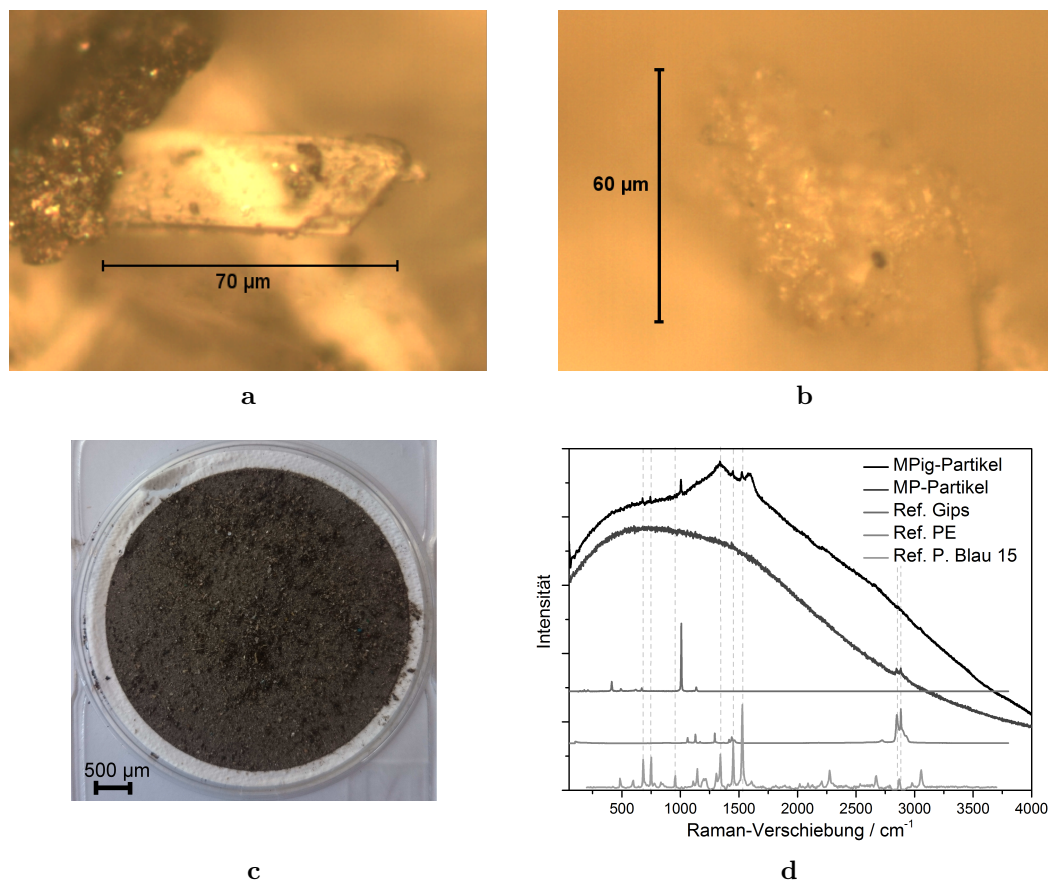
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.23.:** (a) Beispiele für Mikroplastik- und Pigmentpartikel aus der Größenklasse L-MPP (500  $\mu\text{m}$  – 5 mm), (b) Spektren sowie Referenzen für einige ausgewählte Partikel (P. = Pigment, Ref. = Referenz).

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, erfolgt eine Einteilung der Partikel in verschiedene Größenklassen (VS-MPP: 1  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ , S-MPP: 50  $\mu\text{m}$  – 500  $\mu\text{m}$  und L-MPP: 500  $\mu\text{m}$  – 5 mm). In Abbildung 4.23 sind beispielhaft MP- und MPig-Partikel der größten Größenklasse L-MPP, inklusive der RM-Identifikation, gezeigt. Die einzelnen Partikel wurden auf einem Klebeband fixiert und dann einzeln mittels RM identifiziert (vgl. Abbildung 4.23a). Abbildung 4.23b zeigt die Spektren einiger ausgewählter Partikel (Partikel 3, Partikel 8 und Partikel 14) sowie die dazugehörigen Referenzspektren von Pigment Grün 7, Pigment Blau 15 und PS. Durch den Vergleich mit Referenzspektren ist eine eindeutige Zuordnung der MP- und MPig-Partikel zur Polymer- bzw. Pigmentsorte möglich. Die Identifikation von Partikeln der Größenklassen VS-MPP und S-MPP ist am Beispiel eines MPig- bzw. eines MP-Partikels in Abbildung 4.24 gezeigt. Das MPig-Partikel besitzt in der größten Dimension eine Länge von ca. 70  $\mu\text{m}$ , das MP-Partikel ca. 60  $\mu\text{m}$ . Beide Partikel sind daher der Größenklasse S-MPP zuzuordnen, die Analyse von kleineren Partikeln (VS-MPP) erfolgte jedoch analog. Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, wird die Analyse in fünf Teilbereichen auf einem Quarzfaserfilter (vgl. Abbildung 4.24c) durchgeführt. Die Spektren der Partikel erlauben eine Identifikation der Beispielpartikel als Pigment Blau 15 (mit Gips als Bindemittel) bzw. als PE-Partikel (vgl. Abbildung 4.24d).



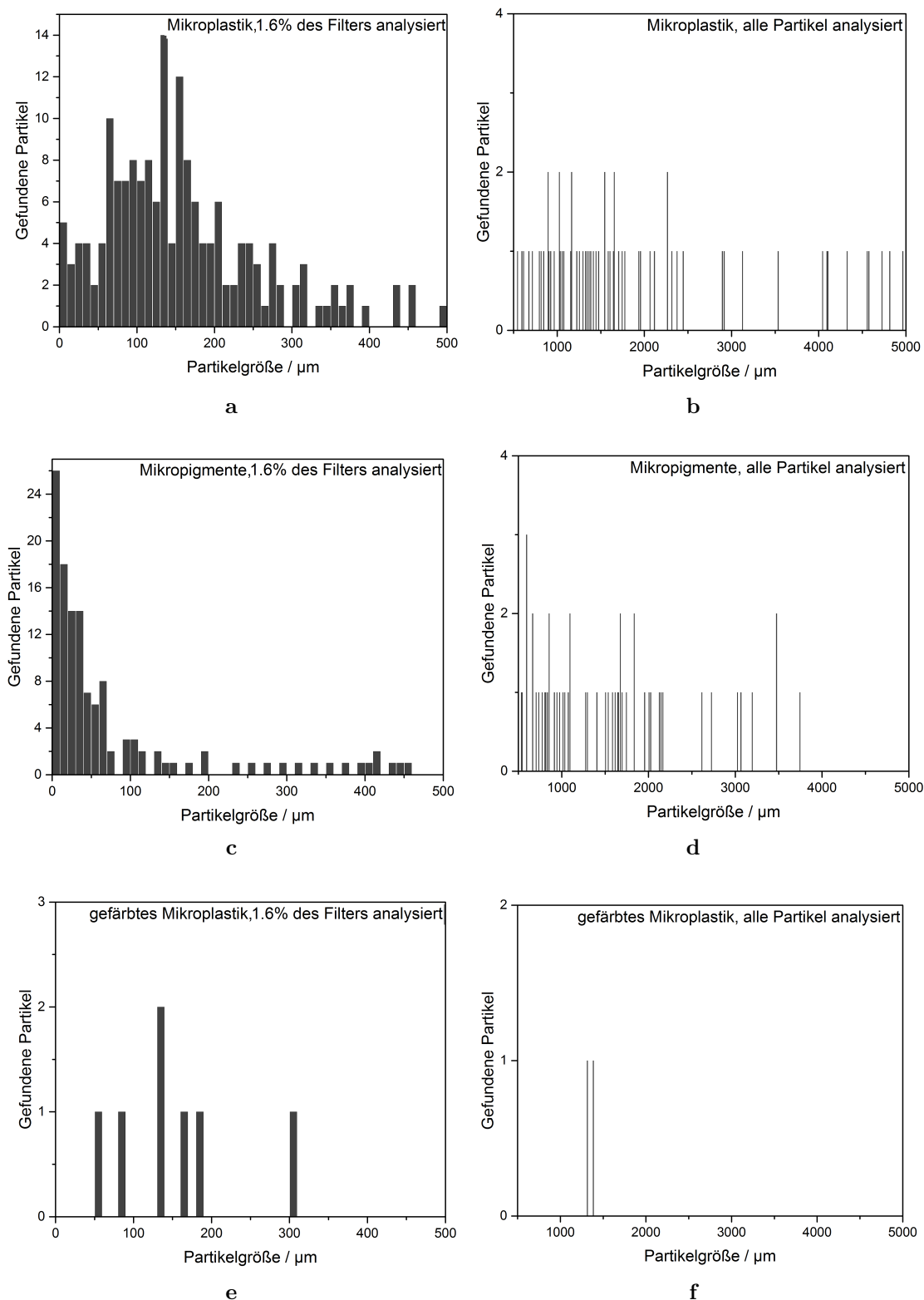


**Abb. 4.24.:** Mikroskopische Aufnahme eines identifizierten MPig-Partikels mit einer Größe von ca. 70 µm (a), eines MP-Partikels mit einer Größe von ca. 60 µm (b); fotografische Aufnahme einer Filterprobe (c); sowie Spektren der Partikel aus (a) und (b) und zugehörige Referenzspektren von Gips (Calciumsulfat-Dihydrat,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), PE und Pigment Blau 15 (Ref. = Referenz, P. = Pigment).

### 4.3.2. Größenverteilung

Insgesamt wurden 226 Mikroplastikpartikel und 149 Mikropigmentpartikel identifiziert. Die kleinsten Partikel besaßen hierbei eine Größe von 9 µm für MP und 4 µm für MPig. In Abbildung 4.25 ist die Größenverteilung aller Partikel gezeigt. Es ist hierbei wichtig, zwischen den Größenklassen VS-MPP/S-MPP (Partikel <500 µm), in denen 1.6% der Filterfläche untersucht wurden, und der Größenklasse L-MPP (Partikel >500 µm), bei der die vollständige Analyse aller abgetrennter Partikel stattfand, zu unterscheiden. Bei Partikelgrößen über 500 µm sind allgemein nur wenige MP-Partikel vorhanden. Deren Anzahl nimmt mit sinkender Größe geringfügig zu. Unterhalb ca. 400 µm steigt die Partikelanzahl deutlich an. Sie nimmt bis ca. 130 µm zu und fällt anschließend wieder ab. Da die Grenze der räumlichen Auflösung der RM bei Realproben bei ca. 1 µm liegt, ist eine Analyse

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

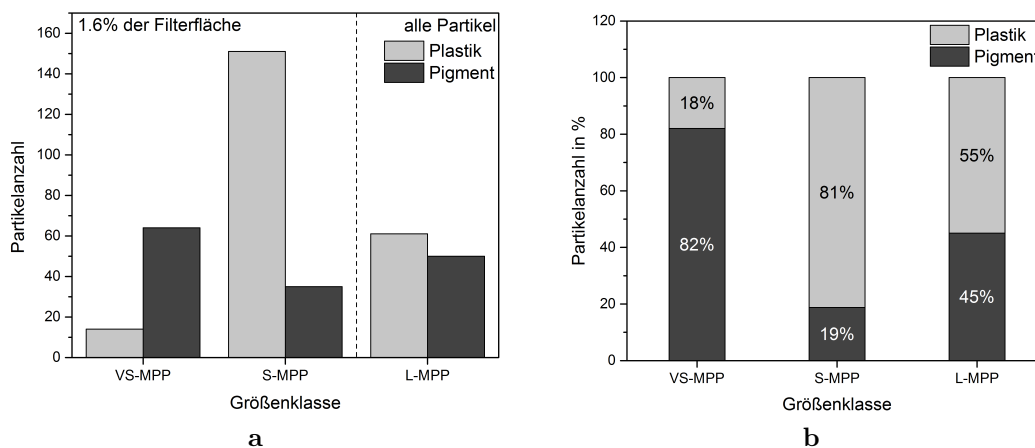


**Abb. 4.25.:** Identifizierte MP-Partikel <500 μm (a); >500 μm (b), identifizierte Pigmentpartikel <500 μm (c); >500 μm (d) und identifizierte gefärbte MP-Partikel <500 μm (e); >500 μm (f).

### 4.3. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern

der MP-Partikel nur bis zu diesem Wert möglich. Aus dem Verlauf der Partikelanzahl kann jedoch gefolgert werden, dass auch unter dieser Größenordnung weitere MP-Partikel vorhanden sein können. Ob die Partikelanzahl im Nanometerbereich mit sinkender Größe weiter abnimmt oder eine zusätzliche Mode auftritt, ist unklar und bedarf weiterer Forschung.

Die Größenverteilung der MPig-Partikel unterscheidet sich deutlich von jener der MP-Partikel (Abbildung 4.25c und 4.25d). Analog zur Größenverteilung der MP-Partikel ist für die MPig-Partikel ebenfalls in der L-MPP-Größenklasse ( $>500 \mu\text{m}$ ) eine Zunahme mit geringerem Partikeldurchmesser zu beobachten. Es muss hierbei jedoch erwähnt werden, dass allgemein nur wenige MPig-Partikel in diesem Größenbereich gefunden wurden, wodurch nur grobe Aussagen möglich sind. Auch bei Partikeln  $<500 \mu\text{m}$  setzt sich dieser Trend fort. Insgesamt wurden bis  $100 \mu\text{m}$  nur wenige Partikel ( $n = 24$ , bei  $100 - 500 \mu\text{m}$ ) identifiziert. Unter  $100 \mu\text{m}$  lässt sich ein starker Anstieg beobachten, der sich bis zur räumlichen Auflösungsgrenze der RM von  $1 \mu\text{m}$  fortsetzt. Die meisten identifizierten MPig-Partikel ( $n = 26$ ) besitzen eine Größe kleiner als  $10 \mu\text{m}$ , insgesamt wurden 101 Partikel mit einer Größe unter  $100 \mu\text{m}$  nachgewiesen. Der annähernd exponentielle Anstieg der Partikelanzahl mit abnehmender Größe legt die Vermutung nahe, dass auch im Nanometerbereich eine nicht geringfügige Anzahl an Pigmentpartikel vorhanden sein könnte. Die Gesamtanzahl an gefärbten Plastikpartikeln (vgl. Abbildung 4.25e und 4.25f) ist zu gering, um Aussagen über deren Verteilung treffen zu können.



**Abb. 4.26.:** a) Absolute Partikelanzahl sowie b) prozentuale Verteilung in den einzelnen Größenklassen.

Eine Zusammenfassung aller identifizierten Pigment- und Plastikpartikel ist in Abbildung 4.26 gezeigt. Zur besseren Darstellung wurden die gefärbten MP-Partikel auf Grund ihrer geringen Anzahl vernachlässigt. Bei Betrachtung der absoluten Partikelanzahl (Abbildung 4.26a) ist zu beachten, dass hier ebenfalls bei VS-MPP und S-MPP nur ein kleiner Teil der Filterfläche analysiert wurde, während bei

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

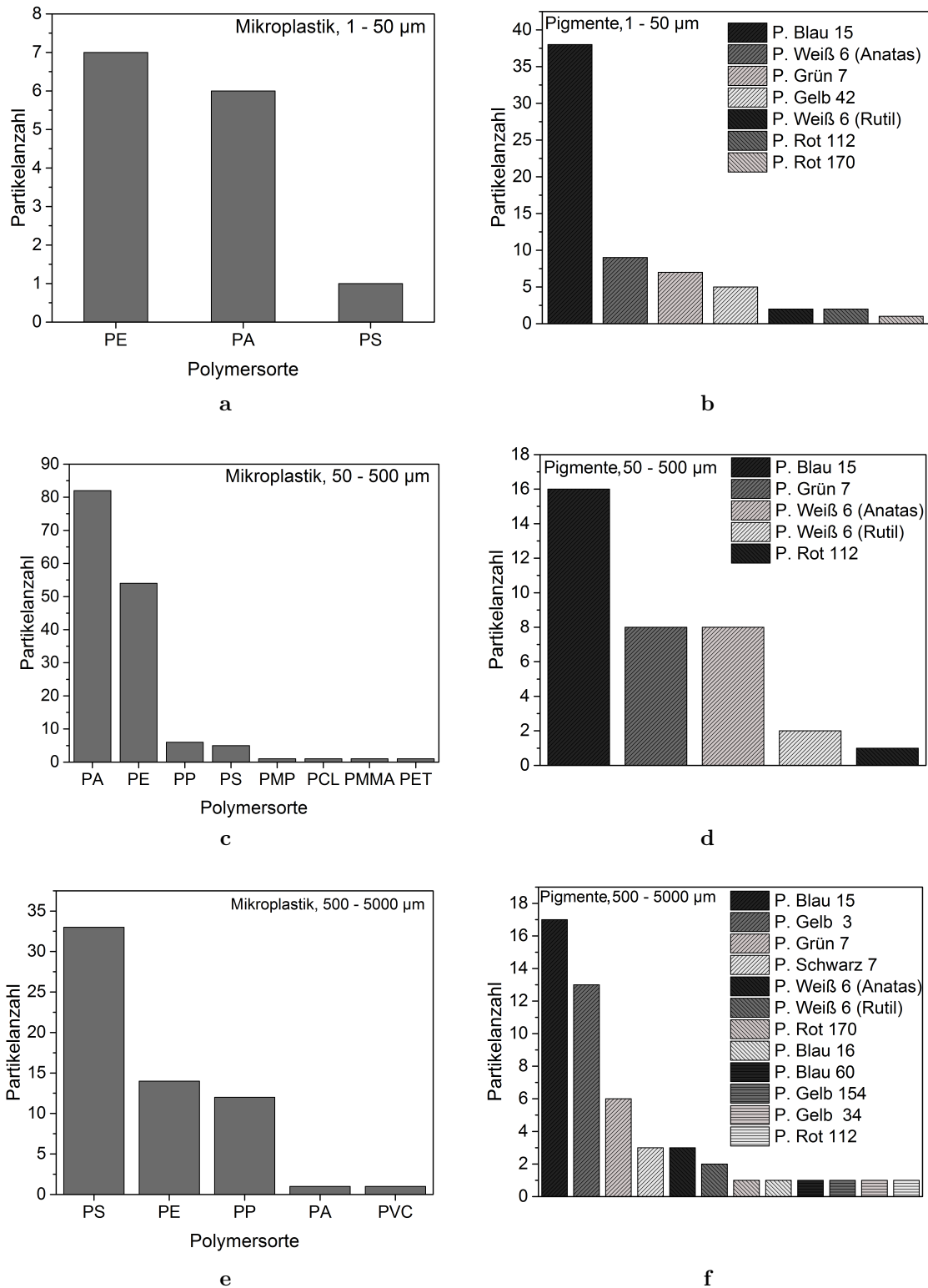
L-MPP alle Partikel untersucht wurden. Die absoluten Partikelzahlen der VS-MPP- und S-MPP-Größenklassen müssten folglich mit ca. 60 multipliziert werden, um vergleichbare Werte zu erhalten. Es kann jedoch nicht von einer homogenen Verteilung der Partikel auf dem Filter ausgegangen werden, daher wurde auf eine Hochrechnung verzichtet, weil diese sehr fehlerbehaftet wäre. Die höchste MP-Partikelanzahl tritt in der S-MPP-Größenklasse (50 – 500  $\mu\text{m}$ ) auf, während Pigmente vor allem bei Partikeln kleiner 50  $\mu\text{m}$  vorhanden waren. Eine Angabe der prozentualen Verteilung von MP- und MPig-Partikel über alle Größen gemittelt ist auf Grund der zuvor beschriebenen unterschiedlichen analysierten Flächen nicht sinnvoll. Sie kann jedoch für die einzelnen Größenklassen angegeben werden (vgl. Abbildung 4.26b). In der VS-MPP-Größenklasse liegt hierbei der Anteil an MPig-Partikeln bei 82%, während er für S-MPP auf 19% abnimmt. Dies ist jedoch vor allem durch die starke Zunahme der MP-Partikel begründet. Bei Partikeln  $>500 \mu\text{m}$  (L-MPP) sind 45% aller identifizierten Partikel MPig zuzuordnen. MP kommt in der kleinsten Größenklasse (VS-MPP) nur in geringfügigem Maße (18%) vor, während in der S-MPP-Größenklasse 81% aller identifizierten Partikel dem MP zuzurechnen sind. Partikel  $>500 \mu\text{m}$  bestehen zu 55% aus synthetischen Polymeren.

#### 4.3.3. Identifizierte Polymer- und Pigmentsorten

Die Polymer- und Pigmentzusammensetzung in den einzelnen Größenklassen ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Bei Partikeln kleiner 50  $\mu\text{m}$  wurden neben einem PS-Partikel ausschließlich PE und PA identifiziert, welche ungefähr gleich häufig auftraten (PE:  $n = 7$ , PA:  $n = 6$ ). Im Bereich 50 – 500  $\mu\text{m}$  setzt sich dieser Verlauf fort, auch hier sind PA und PE die mit Abstand am meisten identifizierten Polymersorten, wobei PA in Vergleich zu PE deutlich häufiger vorhanden war (PA:  $n = 82$ , PE:  $n = 54$ ). In geringerer Anzahl wurden auch PP ( $n = 6$ ), PS ( $n = 5$ ), Polymethylpenten (PMP) ( $n = 1$ ), Polycaprolacton (PCL) ( $n = 1$ ), PMMA ( $n = 1$ ) und PET ( $n = 1$ ) gefunden. In der L-MPP-Größenklasse (500 – 5000  $\mu\text{m}$ ) konnte nur ein PA-Partikel identifiziert werden, obwohl in diesem Bereich im Gegensatz zu den anderen Größen alle Partikel analysiert wurden. Die weiteren Partikel in dieser Größenklasse bestanden aus PS ( $n = 33$ ), PE ( $n = 14$ ), PP ( $n = 12$ ) und PVC ( $n = 1$ ). Die unterschiedliche Verteilung der Polymersorten in den Größenklassen lässt darauf schließen, dass einige Polymere wie PA vorwiegend kleinere MP-Partikel ( $<500 \mu\text{m}$ ) ausbilden, während beispielsweise PS fast ausschließlich bei MP-Partikeln  $>500 \mu\text{m}$  auftritt. Die Ergebnisse betonen, wie wichtig eine Identifikation der Polymersorten in Abhängigkeit der Größe ist, da eine gemittelte Angabe der MP-Zusammensetzung die eigentliche Verteilung und deren Entstehung nicht korrekt wiedergibt.

Die Verteilung der MPig-Sorten variiert im Vergleich zum MP weniger stark über die Größenklassen. In allen Klassen wurde Pigment Blau 15 am häufigsten identifiziert

### 4.3. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern



**Abb. 4.27.:** Identifizierte Polymere und Pigmente in den Größenklassen VS-MPP (1 – 50 µm, a und b), S-MPP (50 – 500 µm, c und d) und L-MPP (500 – 5000 µm, e und f).

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

(VS-MPP: 38 , S-MPP: 16, L-MPP: 17). Weiterhin kommen Pigment Grün 7 (VS-MPP: 7 , S-MPP: 7, L-MPP: 8), Pigment Weiß 6 (Anatas, VS-MPP: 9, S-MPP: 8, L-MPP: 3) und Pigment Weiß 6 (Rutil, VS-MPP: 2, S-MPP: 2, L-MPP: 2) in allen Größenklassen vor. Zusätzlich wurden die folgenden Pigmente in geringeren Mengen gefunden: Pigment Schwarz 7, Pigment Blau 16, 17, 27, 29, 60, Pigment Braun 7, Pigment Orange 5, 34, Pigment Rot 3, 19, 48, 102, 112, 170, 275, 276, Pigment Violett 23, 310, und Pigment Gelb 1, 3, 7, 34, 42, 154, 210. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass für Pigment Weiß 6 nicht absolut sichergestellt werden kann, dass es sich bei den Partikeln um Lacke oder Farben handelte, da  $\text{TiO}_2$  ebenso in kristalliner Form natürlich in der Umwelt vorkommen kann. Da aber die Hauptanwendungen von Rutil und Anatas im Bereich der Pigmente liegt und sie mit Abstand zu den wichtigsten Weißpigmenten zählen,[20] werden sie im Generellen zu den Pigmenten gerechnet.[226] Bei Pigment Weiß 6 wird normalerweise nicht zwischen den  $\text{TiO}_2$ -Modifikationen unterschieden, da RM eine Unterscheidung ermöglicht, ist diese Information zusätzlich angegeben.

Es sind weitere Studien nötig, um festzustellen, inwiefern die Identifikation der Pigmentpartikel durch ihren Wirkungsquerschnitt bei der Raman-Streuung beeinflusst wird. Es ist möglich, dass Pigment Blau 15 und Pigment Grün 7 stärkere Raman-Signale zeigen, wodurch eine schnellere Identifikation erfolgen kann, während andere Pigmente nur schlechte Raman-Streuer sind. Dies würde die Verteilung der Pigmentsorten verändern, da nicht alle Partikel erfolgreich identifiziert werden können. Der Einfluss auf die Größenverteilung ist allerdings als gering anzusehen, da die Zunahme bei kleinen Partikelzahlen bereits stark ausgeprägt ist. Da auch für die Mikro-FTIR-Spektroskopie unterschiedliche Wirkungsquerschnitte der Pigmente erwartet werden können, ist mit den momentan vorhandenen Instrumenten eine vollständig artefaktfreie Identifikation von Pigmentpartikeln nicht möglich. Auf Grund des hohen Wirkungsquerschnittes fast aller Polymere[227, 228] kann bei der MP-Analytik mittels RM davon ausgegangen werden, dass ein unterschiedlicher Wirkungsquerschnitt keine signifikante Fehlerquelle darstellt.

#### 4.3.4. Belastung mit Schwermetallen

Die Ergebnisse der ICP-MS-Analyse von 11 Partikeln aus dem Gardasee sind in Abbildung 4.28 dargestellt. In P3 und P6, welche Pigment Grün 7 beinhalten, kann Blei in einer Konzentration von 227.02 bzw. 219.70  $\mu\text{g/g}$  nachgewiesen werden. P6 besteht aus gefärbtem PE, während es sich bei P3 um einen Pigmentpartikel handelt. Da in den anderen Partikel, in denen ebenfalls Pigment Grün 7 vorhanden ist (P1, P2, P7, P8 und P9), kein Pb nachgewiesen werden kann, ist ein direkter Einfluss des Pigments auf den Pb-Gehalt fraglich. P6 enthält zusätzlich als einziges der untersuchten Partikel Cadmium in einer Konzentration über der Nachweisgrenze. Da Kupfer in vielen Pigmenten, wie auch z.B. Pigment Blau 15 und Pigment Grün

### 4.3. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Gewässern

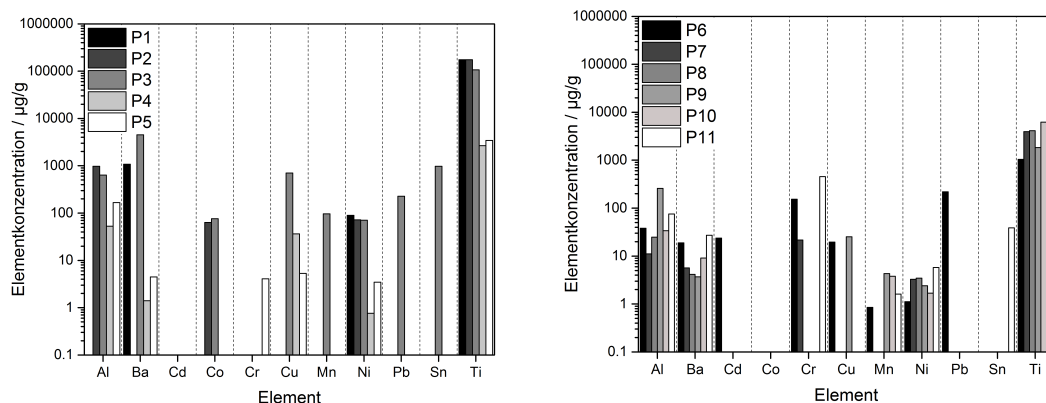


Abb. 4.28.: Ergebnisse der ICP-MS-Analyse der Partikel aus dem Gardasee.

7 als Zentralatom dient, muss bei Partikeln, die diese Pigmente enthalten, mit erhöhten Cu-Konzentrationen gerechnet werden. So enthält das Pigmentpartikel P3 beispielsweise eine Cu-Konzentration von 706.48 µg/g, auch im untersuchten Pigmentpartikel P4 (Pigment Blau 15) ist Cu nachzuweisen (36.35 µg/g). In den mit kupferhaltigen Pigmenten gefärbten Kunststoffpartikeln sind die Cu-Konzentrationen hingegen mit 5.32 – 25.34 µg/g (P5, P6 und P9) deutlich geringer oder liegen sogar unter der Nachweisgrenze (P1, P2, P7, P8). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Pigmente und damit auch das Cu als Zentralatom in gefärbten Kunststoffpartikeln in geringerem Maße vorhanden sind, während sie in Pigmentpartikel den Hauptbestandteil darstellen. Titan kann in allen Partikeln in Konzentrationen von 1.82 – 175.51 mg/g nachgewiesen werden. Die vergleichsweise hohen Konzentrationen lassen sich dadurch erklären, dass Ti in Form von TiO<sub>2</sub> sowohl bei der Kunststoff-, als auch bei der Lack- und Farbproduktion als Füllstoff, Bindemittel und Aufheller verwendet wird.[20, 229] Auch die direkte Verwendung als Pigment ist möglich (vgl. Pigment Weiß 6). Bei P5, welches dieses Pigment enthält, ist jedoch im Vergleich zu den anderen Partikeln keine erhöhte Ti-Konzentration erkennbar, was wahrscheinlich der vielseitigen Verwendung von TiO<sub>2</sub> in Kunststoff und Lacken geschuldet ist. Da Bariumverbindungen ähnlich wie Titan als Füllstoff und Bindemittel verwendet werden,[229] ist es nicht weiter verwunderlich, dass in fast allen Partikel (mit Ausnahme von P2) Ba in Konzentrationen von 1.40 µg/g bis 4.52 mg/g nachgewiesen wird. Al ist als ubiquitäres Element in P2 – P11 in Konzentrationen von 11.08 – 980.85 µg/g vorhanden, während Nickel in allen Partikel in geringfügigen Konzentrationen von 0.76 – 89.75 µg/g vorkommt. In P3 kann eine erhöhte Sn-Konzentration von 975.25 µg/g nachgewiesen werden. Kobalt, Chrom, Mangan sind vereinzelt in Partikeln vorhanden.

Die Ergebnisse der als Referenz untersuchten zerschnittenen Schraubverschlüsse sind in Abbildung 4.29 gezeigt. Es können in allen Proben mit den Gardaseepartikeln vergleichbare Konzentrationen an Al (31.05 – 1309.42 µg/g) nachgewiesen

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

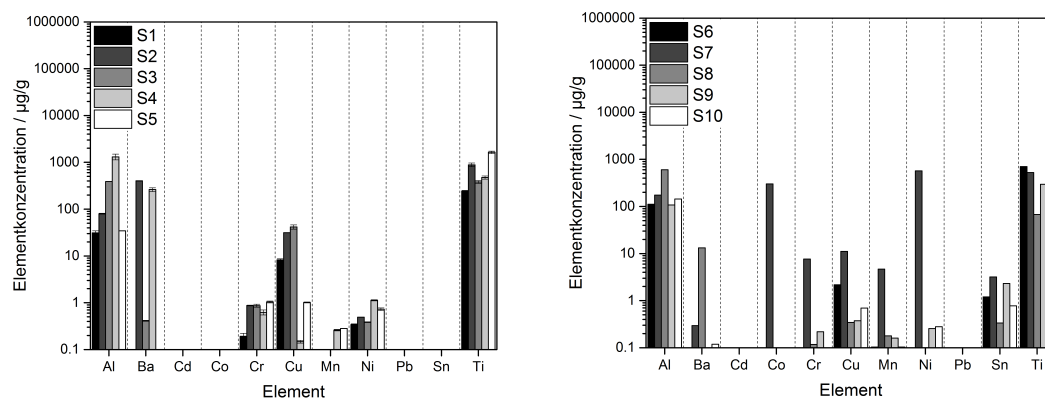


Abb. 4.29.: Ergebnisse der ICP-MS-Analyse der Referenzproben.

werden. Auch Ba ist in 6 Proben vorhanden, hier sind die Konzentrationen geringer als in den Gardaseepartikeln (0.29 – 402.24 µg/g). Cu befindet sich in allen untersuchten Proben. Die Werte von 0.14 – 41.72 µg/g sind vergleichbar mit den Gardaseepartikeln (ausgenommen P3 mit deutlich erhöhten Cu-Konzentrationen). Co, Cr und Mn sind in ähnlichen geringen Konzentrationen wie in den Gardaseepartikeln vorhanden. Die Ni-Konzentration ist mit 0.255 – 1.13 µg/g ebenfalls gering. Eine Ausnahme hiervon stellt die Probe S7 dar, bei der 571.08 µg/g Ni nachgewiesen werden kann. Co ist in zwei Proben enthalten, die Cd- und Pb-Werte liegen für alle Referenzproben unter der Nachweisgrenze. Ti ist in allen Proben in deutlich geringeren Konzentrationen (241 – 1637.31 µg/g) anwesend. Inwiefern bei der Herstellung der Schraubdeckel geringere Konzentrationen an TiO<sub>2</sub> verwendet wurden oder eine Anreicherung von Ti in den Gardaseepartikeln erfolgte, kann nicht eindeutig festgestellt werden.

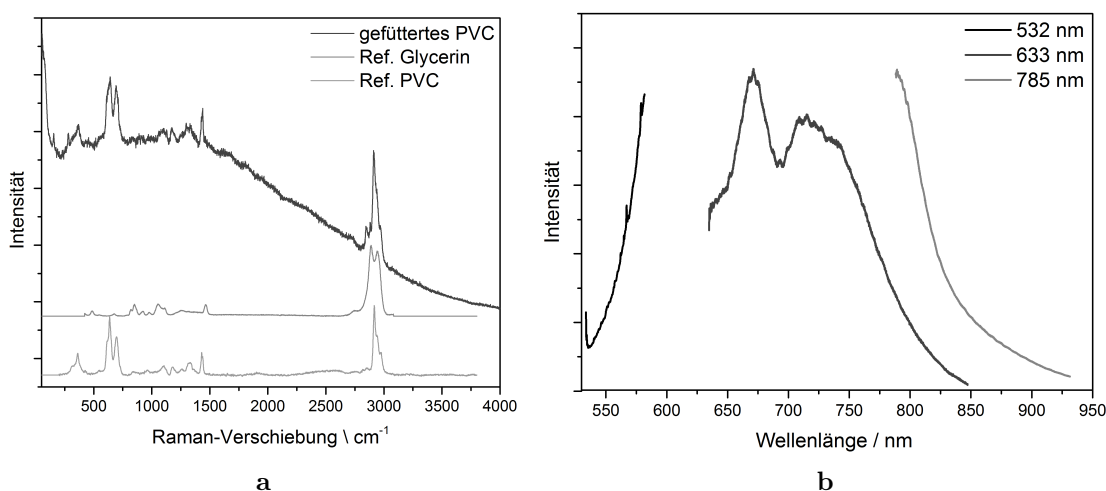
Die in zwei Gardaseepartikeln ermittelten Pb-Konzentrationen von mehr als 200 mg/g liegen deutlich über der von Nakashima et al.[230] für Makroplastik eines japanischen Strandes berichteten Konzentration von  $13.5 \pm 8.4$  µg/g. Zusätzlich überschritten sie die Konzentrationen in Pellets für die Kunststoffproduktion (unter 1.08 µg/g Cu), die an der Küste Englands gefunden wurden.[194] Da die Elementkonzentrationen der Gardaseepartikel mit Ausnahme von Ti vergleichbar mit den Konzentrationen in den Referenzproben sind, kann davon ausgegangen werden, dass der Großteil der Metalle bereits bei der Produktion zum Kunststoff bzw. Pigment hinzugefügt wurde. Eine Anreicherung der Partikel mit Schwermetallen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist aber auf Grund der geringen Konzentrationen der Elemente im Wasser des Gardasees [231] unwahrscheinlich. Der hohe Metallgehalt in den Partikeln kann jedoch, unabhängig davon, ob er direkt bei der Produktion vorhanden ist oder sich am Partikel anreichert, eine Gefahr für die Umwelt darstellen. Daher wurden viele nachgewiesene Elemente (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni) von der Umweltschutzbehörde der USA (EPA) als *priority pollutants* (vorrangige Schadstoffe) klassifiziert.[232] Einige davon wirken auf verschiedene



Wasserorganismen toxisch oder schädlich.[112, 233] Pb und Cd, welche in einigen Partikel nachgewiesen wurden, werden als besonders toxisch angesehen.[232] Ba kann ebenfalls in hohen Konzentrationen schädlich wirken. So bestimmten Lira et al.[234] die mittlere effektive Dosis ( $EC_{50}$ ) für Fadenwürmer, bei der 50% aller Organismen eine verlangsamte Fortpflanzung und Entwicklungszeit zeigten, auf eine Konzentration von 1075  $\mu\text{g/g}$  Ba. Ähnlich hohe Konzentrationen konnten in einigen Gardaseepartikeln nachgewiesen werden. Auch für Ni wurden nachteilige Wirkungen auf *D. magna* gezeigt,[233] während Co und Cr allergische Reaktionen der Haut beim Menschen hervorrufen können.[235]

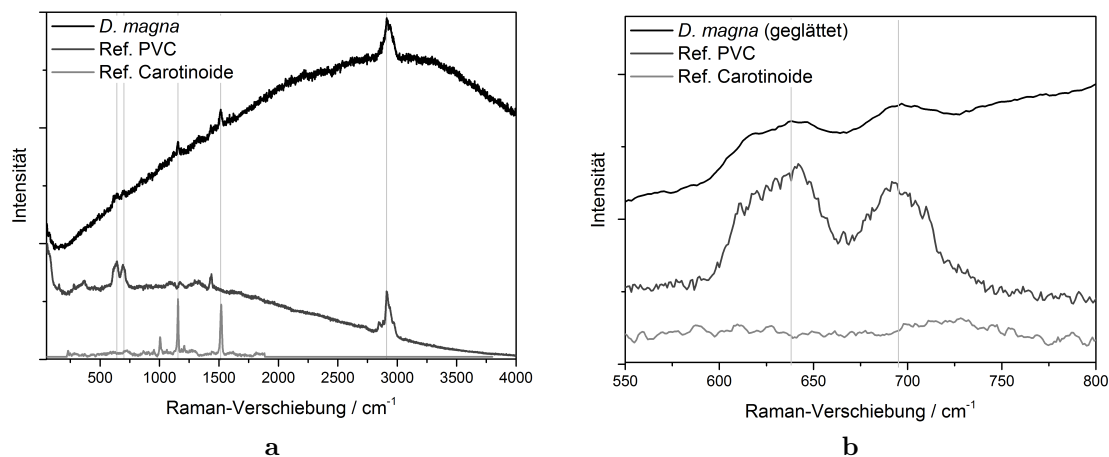
#### 4.3.5. 3D-Raman-Imaging in Wasserorganismen

Weiterhin sollte eine Methode entwickelt und optimiert werden, um MP *in situ* in limnischen Organismen mittels RM nachzuweisen. Als Beispielorganismus hierfür wurde der Große Wasserfloh (*Daphnia magna*) gewählt. Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern eine Detektion des verfütterten PVCs im Einbettungsmedium möglich ist. Abbildung 4.30a zeigt die hierfür aufgenommenen Raman-Spektren des PVCs sowie des Einbettungsmediums Vectashield. Die PVC-Partikel lassen sich eindeutig anhand des Referenzspektrums identifizieren. Das Einbettungsmedium zeigt schwache Signale von Glycerin, welches nach Herstellerangaben den Hauptbestandteil darstellt.[236] Im spektralen Bereich von 600 bis 800  $\text{cm}^{-1}$ , bei dem die für PVC-typischen Signale auftreten, zeigt Glycerin keine Signale. Daher wird eine Identifikation der PVC-Partikel nicht durch Überlagerung mit den Signalen des Einbettungsmediums erschwert und sollte auch in eingebetteten *D. magna* möglich sein.



**Abb. 4.30.:** (a) Raman-Spektren des verwendeten Vectashield und PVC, sowie Referenzspektren (Ref.) von Glycerin und PVC, (b) Fluoreszenz von *D. magna* bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

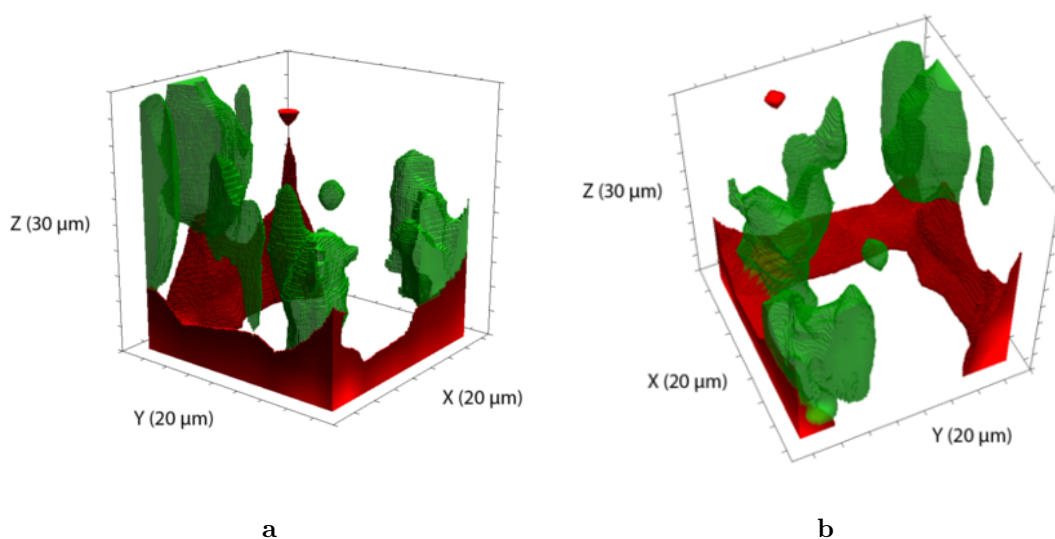
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.31.:** (a) Raman-Spektrum des Darms einer mit PVC-verfütterten Daphnie, sowie Referenzspektren (Ref.) von PVC und Carotinoiden, b) geglättetes Spektrum mit zugehörigen Referenzen im spektralen Bereich von 550 – 800  $\text{cm}^{-1}$ .

Da die zum Züchten von *D. magna* benötigten Algen hohe Mengen an Chlorophyll enthalten, muss mit hohen Chlorophyllkonzentrationen im Darm gerechnet werden. Chlorophyll besitzt eine starke Eigenfluoreszenz mit einem Maximum bei 683 nm und einer starken Schulter von 700 – 750 nm,[237] welche die Identifikation der PVC-Partikel erschweren kann. Daher wurden die Proben analog zu Kapitel 4.1.4 zunächst bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen untersucht (532 nm, 633 nm und 785 nm), um zu überprüfen, welche Wellenlänge sich am besten zur Analyse eignet. Abbildung 4.30b zeigt die Raman-Spektren des Darms von *D. magna*, aufgenommen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Da die Intensität der Spektren neben der Wellenlänge von einer Vielzahl an Parametern wie Laserleistung, Messzeit und Objektiv abhängt, soll hier auf einen quantitativen Vergleich der Spektrenintensitäten verzichtet werden, weswegen die gezeigten Spektren zur besseren Übersicht normiert wurden. Insgesamt lässt sich mit zunehmender Anregungswellenlänge zunächst ein Anstieg des Hintergrundes erkennen, bis das erste Maximum der Fluoreszenzemission bei ca. 670 nm erreicht wird. Ein weiteres breites Maximum lässt sich bei 708 – 743 nm erkennen, anschließend nimmt der Hintergrund wieder ab. Beide Maxima stimmen in etwa mit jenen von Chlorophyll überein, wodurch Chlorophyll als Hauptursache für die Eigenfluoreszenz von *D. magna* bestätigt wurde. Da die für PVC typischen Raman-Signale im Bereich von 600 – 800  $\text{cm}^{-1}$  liegen, ist es sinnvoll eine Anregungswellenlänge zu wählen, bei der in diesem Bereich eine möglichst geringe Fluoreszenz vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Analysen mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm durchgeführt.

In Abbildung 4.31a sind das Raman-Spektrum des Gastrointestinaltrakts von *D. magna* sowie die zugehörigen Referenzspektren dargestellt. Es lassen sich zwei



**Abb. 4.32.:** 3D-Maps der untersuchten Stelle (PVC in grün und Carotinoide in rot). Aus [116].

Signale bei  $1155\text{ cm}^{-1}$  und  $1513\text{ cm}^{-1}$  erkennen, welche den Carotinoiden, einer Gruppe von Lipochromen, zugeordnet werden können. Von diesen ist bekannt, dass sie im Gastrointestinaltrakt von *D. magna* angereichert werden, wodurch sie als Indiz verwendet werden können, dass auf den Darm fokussiert ist (vgl. Kapitel 3.4.7). Zusätzlich sind auch die beiden PVC-Signale zwischen  $600\text{ cm}^{-1}$  und  $800\text{ cm}^{-1}$ , sowie die ebenfalls von PVC verursachte starke CH-Streckschwingung mit einem Maximum bei  $2910\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Die Vergrößerung des spektralen Bereiches von  $550 - 800\text{ cm}^{-1}$  sowie das geglättete *D. magna*-Spektrum zeigen (Abbildung 4.31b), dass eine eindeutige Identifikation von PVC möglich ist. Die RM ist folglich geeignet, um die Akkumulation von MP in Wasserorganismen inkl. einer Lokalisierung auf betroffene Organe *in situ* zu untersuchen.

Zusätzlich wurde die RM-Analytik soweit optimiert, dass das Erstellen dreidimensionaler chemischer Abbildungen (*engl.*: images) der Verteilung der PVC-Partikel im Gastrointestinaltrakt von *D. magna* möglich ist. Eine solche Verteilung ist in Abbildung 4.32 gezeigt. Hierbei entsprechen die grün eingezeichneten Flächen den Signalen von PVC, während die roten Flächen die Carotinoide darstellen. Etwa in der Mitte der Abbildung lässt sich ein rundes PVC-Partikel mit einem Durchmesser von ca.  $15\text{ }\mu\text{m}$  erkennen, welches von weiteren größeren PVC-Partikeln sowie Carotinoiden umgeben ist. Die RM eignet sich folglich, um neben der Identifikation und Lokalisierung der Mikroplastikakkumulation in Organismen auch dreidimensionale chemische Maps der Verteilung aufzunehmen.

#### 4.3.6. Zusammenfassung der MP-Analytik aus limnischen Gewässern

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt und bestätigt werden, dass eine Belastung mit Mikroplastik nicht nur in marinen Systemen vorherrscht, sondern auch in nicht geringem Umfang in limnischen Ökosystemen vorhanden ist. Dazu wurde als Fallbeispiel die MP-Belastung des Gardasees in Italien untersucht. Hierfür wurden in Kooperation mit der Universität Bayreuth Sedimentproben an verschiedenen Stränden des Gardasees entnommen und mittels des *Munich Plastic Sediment Separator (MPSS)* einer Dichtefraktionierung unterzogen. Die erhaltenen Partikel wurden anschließend mittels Raman-Mikrospektroskopie identifiziert. Die RM-Analyse wurde zur Identifikation von MP verschiedenster Größen und Polymersorten weiterentwickelt und optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die RM sich für eine zerstörungsfreie, kontaktlose Identifizierung und Quantifizierung von Mikroplastik mit einer Ortsauflösung von bis zu 1  $\mu\text{m}$  eignet. Da die vollständige Analyse kleiner MP-Partikel (<500  $\mu\text{m}$ ) aus Zeit- und Kostengründen nicht möglich war, wurde ein Protokoll entwickelt, das eine repräsentative Analyse des Filters ermöglichte. Hierfür wurden alle, sich in fünf auf der Filterfläche angeordneten Bereiche befindlichen Partikel untersucht. Insgesamt wurden so 1.6% der Gesamtfilterfläche analysiert.

Im Fallbeispiel Gardasee wurde zusätzlich zu Mikroplastik eine Vielzahl an Partikeln, welche Pigmente, aber keine nachweisbaren Polymere enthielten, identifiziert. Diese Pigmentpartikel (MPig) stammen vorwiegend aus Farben und Lacken, welche z.B. im Schiffsbau eingesetzt werden. Es wurden Größenverteilungen der MP-, MPig-, sowie der gefärbten MP-Partikel erstellt. Weiterhin wurde die Polymer- und Pigmentzusammensetzung in den einzelnen, zuvor festgelegten Größenklassen (VS-MPP: 1 – 50  $\mu\text{m}$ , S-MPP: 50 – 500  $\mu\text{m}$ , L-MPP: 500 – 5000  $\mu\text{m}$ ) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die MP-Partikelanzahl mit abnehmender Größe bis ca. 130  $\mu\text{m}$  zunahm und anschließend wieder abfiel. Im Gegensatz dazu nahm die MPig-Partikelanzahl kontinuierlich mit sinkendem Partikeldurchmesser zu, sie zeigte in etwa einen exponentiellen Anstieg. Die meisten MPig-Partikel waren unter 50  $\mu\text{m}$  vorhanden. Über die Größenverteilung von gefärbtem MP konnten auf Grund der geringen Partikelanzahl keine Aussagen getroffen werden. Die Polymerzusammensetzung in den einzelnen Größenklassen unterschied sich stark. Bei Partikeln unter 500  $\mu\text{m}$  wurden hauptsächlich PE und PA nachgewiesen, während in der L-MPP-Größenklasse der Großteil der Partikel aus PS bestand und PA nur in sehr geringem Maße vorkam. Die Zusammensetzung der Pigmente war in allen Größenklassen in etwa gleich, am häufigsten traten hier Pigment Blau 15, Pigment Grün 7 und Pigment Weiß 6 auf. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der MP- und MPig-Analytik im Bereich 1 – 500  $\mu\text{m}$ , da hier mit einer starken Zunahme der Partikelanzahl sowie einer Änderung der Polymerzusammensetzung gerechnet werden muss. Da vor allem kleine Partikel oftmals als besonders

#### 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

schädlich für Organismen betrachtet werden, sollte keinesfalls auf eine Analyse der VS-MPP-Größenklasse verzichtet werden.

Zusätzlich wurde mittels ICP-MS der Metallgehalt einiger ausgewählter Partikel aus dem Gardasee sowie von Referenzproben aus Schraubverschlüssen untersucht. In einigen Partikeln konnten toxische Elemente wie Pb, Cd, Ba und Ni nachgewiesen werden. Teilweise waren diese in für Wasserorganismen schädlichen Konzentrationen vorhanden. Durch Vergleich mit den Referenzproben sowie dem relativ sauberen Wasser des Gardasees konnte gefolgert werden, dass die Metallgehalte bereits bei der Produktion in die Kunststoff- und Pigmentprodukte gelangten und weniger durch eine Anreicherung aus den Ökosystemen entstanden. MP- und MPig-Partikel konnten folglich als mögliche Eintragsquelle von Schwermetallen in aquatische Ökosysteme identifiziert werden.

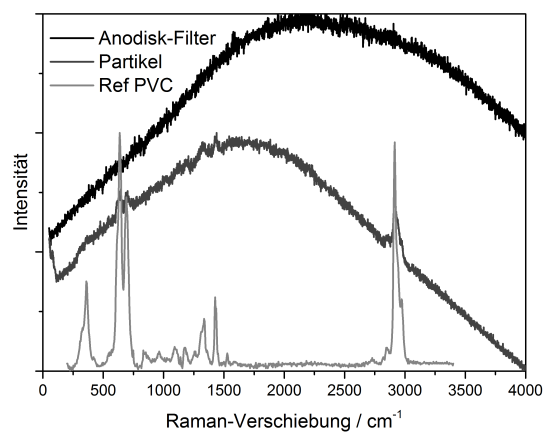
Weiterhin wurde die Anwendbarkeit der RM für die Analyse der MP-Belastung von Wasserorganismen gezeigt. Dazu wurden in Kooperation mit der Universität Bayreuth die Wasserflöhe *D. magna* mit einer Mischung aus Algen und PVC-Partikeln gefüttert. Um mögliche Interferenzen der Raman-Signale mit einem Fluoreszenzhintergrund durch das Chlorophyll aus den Algen gering zu halten, wurden zunächst unterschiedliche Anregungswellenlängen verwendet. Nach Wahl der am besten geeigneten Anregungswellenlänge von 532 nm, konnten mittels RM PVC-Partikel direkt im Gastrointestinaltrakt von *D. magna* nachgewiesen werden. Da die im restlichen Darm angereicherten Carotinoide ebenfalls Raman-Signale zeigten, war es möglich ein dreidimensionales chemisches Abbild der Verteilung von PVC und Carotinoiden im Gastrointestinaltrakt darzustellen.

## 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

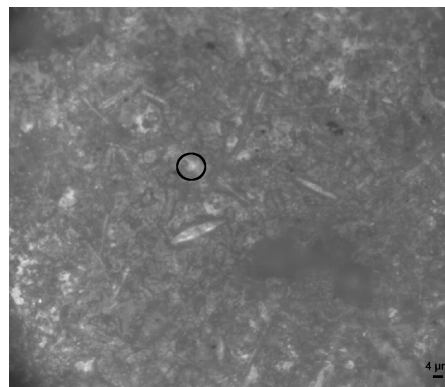
### 4.4.1. Vorversuche

Der folgende Teil befasst sich mit der MP-Belastung und deren Folgen für limnische Organismen am Beispiel von einheimischen Muscheln (*Unio sp.*), wie der Malermuschel (*Unio pictorum*) und der Großen Flussmuschel (*Unio tumidus*). Als erster Schritt wurden Anodisc( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )-, Nitrocellulose- und Polycarbonatfilter auf ihre Eignung für die Raman-Analyse von MP-Partikeln, die aus einem Säureaufschluss von Muscheln stammten, überprüft. Die erhaltenen Spektren und mikroskopischen Aufnahmen der Filter sind in Abbildung 4.33 gezeigt. Auf allen drei Filtern ist der Nachweis von PVC nach dem Säureaufschluss mittels RM möglich. Es können folglich alle Filterarten verwendet werden. Der Anodiscfilter zeichnet sich durch seine glatte Oberfläche, welche die Raman-Analyse von kleinen MP-Partikel vereinfacht,

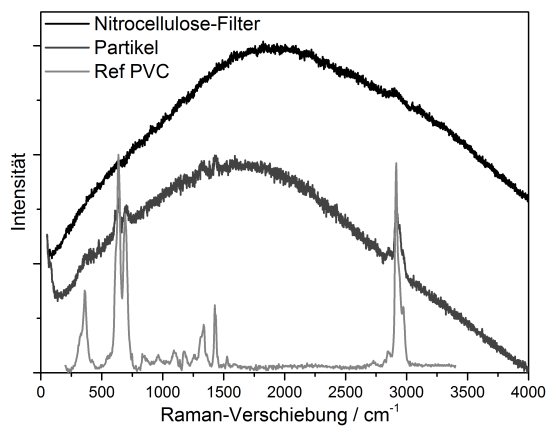
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



a



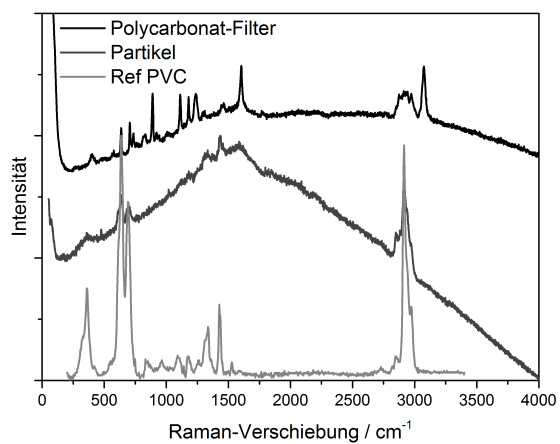
b



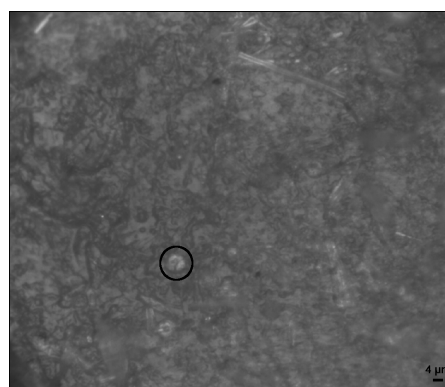
c



d



e

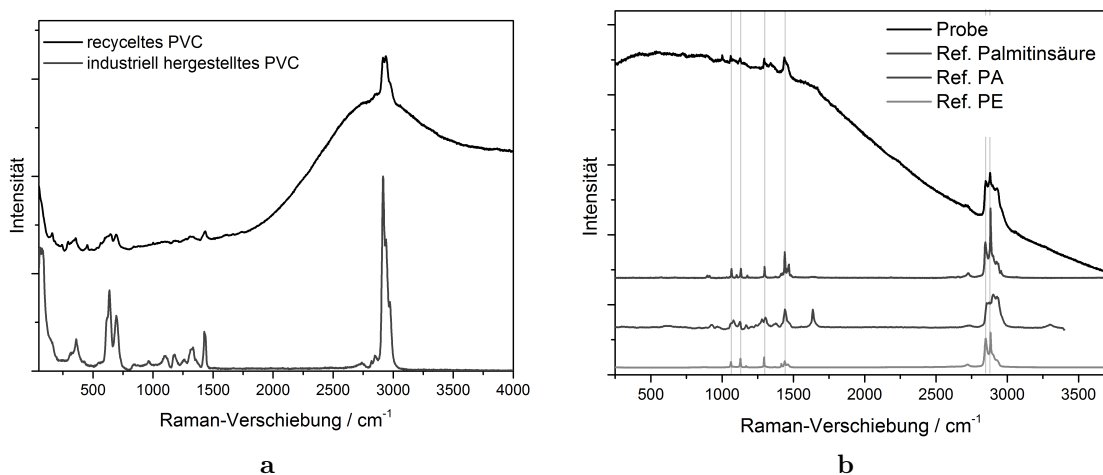


f

**Abb. 4.33.:** Raman-Spektren des Filterhintergrundes, eines PVC-Partikels auf dem Filter und einer PVC-Referenz, sowie mikroskopische Aufnahme für Anodisc- (a und b), Nitrocellulose- (c und d) und Polycarbonatfilter (e und f).

#### 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

sowie den nicht vorhandenen Raman-Signalen des Filtermaterials aus. Als Nachteile sind der relativ hohe Fluoreszenzhintergrund des Filters, die schwere Handhabung aufgrund der hohen Sprödigkeit des Materials und die hohen Kosten im Vergleich zu den anderen Filtermaterialien zu nennen. Die unebene Oberfläche des Nitrocellulosefilters, welcher ein Faserfilter ist, erschwert vor allem die Identifikation kleinerer Partikel. Auch der relativ hohe Fluoreszenzhintergrund des Filtermaterials behindert die Identifikation von MP. Polycarbonat(PC)-Filter sind einfach in der Handhabung, deutlich kostengünstiger als die Anodisfilter und besitzen eine glatte Oberfläche, die die Raman-Analyse von MP erleichtert. Weiterhin zeigte der Filter nur einen geringen Fluoreszenzhintergrund und war auch gegen höhere Laserleistungen beständig. Als Nachteil der PC-Filter ist zu nennen, dass die Identifikation von PC-Partikeln aus der Umwelt deutlich erschwert wird. Sie ist weiterhin durch den konfokalen Aufbau des Raman-Mikroskops sowie durch Unterscheidung von den für die Filter typischen Untergründe möglich, allerdings dadurch zeitaufwändig. Auf Grund der beschriebenen Vorteile, und da PC in Umweltproben nur in geringem Maß zu erwarten ist (vgl. Kapitel 4.3), wurden die weiteren Analysen mit PC-Filter durchgeführt.



**Abb. 4.34.:** (a) Raman-Spektren zweier für die Fütterung geplanter PVC-Sorten, (b) Raman-Spektren der Probe sowie Referenzspektren (Ref.) von Palmitinsäure, PA 6.6 und PE.

Weiterhin wurden zwei unterschiedliche PVC-Sorten auf die Eignung zur Identifikation mittels RM überprüft. Es handelt sich dabei um ein durch Recycling wiedergewonnenes PVC sowie ein industriell hergestelltes PVC. Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.3 wurde ein höherer Fluoreszenzhintergrund für das recycelte PVC erwartet, da von zahlreichen Verunreinigungen ausgegangen werden kann. Die durchgeführte RM-Analyse kann dies bestätigen (vgl. Abbildung 4.34a). Das recycelte PVC zeigt im Vergleich zum industriell hergestellten PVC einen stärkeren Hintergrund im Bereich von  $2000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  und somit deutlich schwächer ausge-

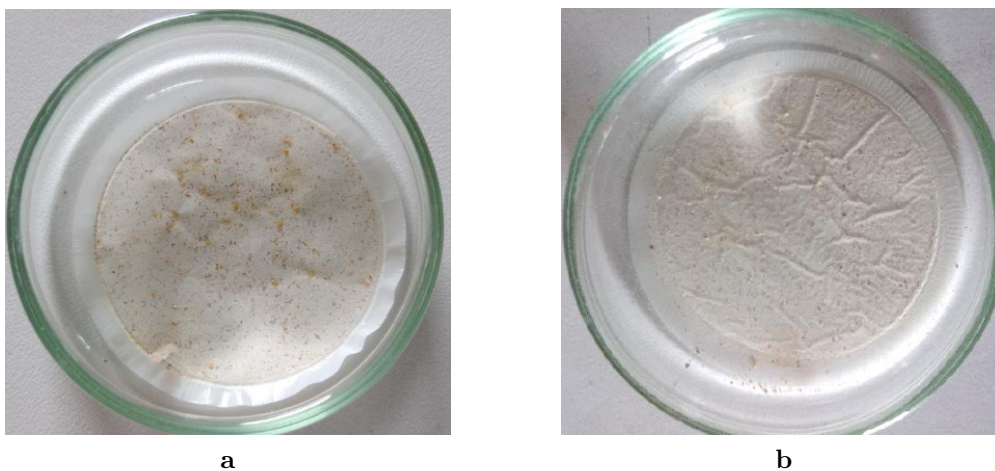


#### 4. Ergebnisse und Diskussion

prägte Signale. Da das industriell hergestellte PVC zusätzlich frei von Rückständen war, wurde im Expositionsversuch sowie bei allen weiteren Analysen ausschließlich das industriell hergestellte PVC verwendet.

Die ersten Analysen der Filter nach dem Säureaufschluss von Muscheln zeigen in fast allen Spektren ähnliche Signale. Diese liegen zum Teil in einem spektralen Bereich, in dem auch typische Signale von PA und PE (vgl. Abbildung 4.34b) auftreten, wodurch eine Identifikation der MP-Partikel erschwert wird. Zusätzlich sind auf den Filtern gelbe Rückstände zu erkennen, die zusammenkleben und kleine Kugeln bilden. Die Rückstände können nach einer Raman-Analyse durch Vergleich mit der Datenbank als Palmitinsäure identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um eine gesättigte Fettsäure, welche in größeren Mengen in Muscheln vorkommt.[238] Durch zusätzliche Behandlung mit Isopropanol nach der Filtration können die Fettsäurereste gelöst und entfernt werden. In Abbildung 4.35 ist ein Filter vor und nach der Behandlung mit Isopropanol gezeigt. Die zuvor vorhandenen gelben Kugeln sind nach dem Spülen der Filter mit Isopropanol entfernt. Die Raman-Signale von Palmitinsäure treten ebenfalls nicht mehr auf.

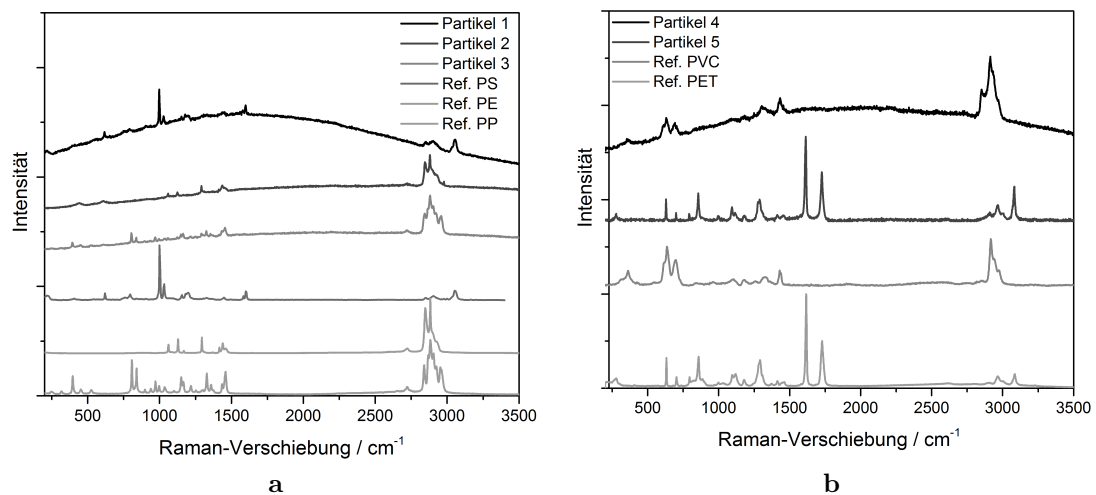
Um den Einfluss des Säureaufschlusses mit  $\text{HNO}_3$  auf unterschiedliche Polymertypen zu überprüfen, wurden in Kooperation mit dem LfU in Partikel zerkleinerte Alltagsgegenstände mit unterschiedlicher Zusammensetzung (PS, PE, PP, PVC, PET, PA und PUR) dem Muschelgewebe vor dem Aufschluss hinzugegeben. Die Partikel wurden vor und nach dem Aufschluss unter einem optischen Mikroskop betrachtet und vermessen. Zusätzlich erfolgte die Identifikation der Partikel auf dem Filter mittels RM. Die mikroskopischen Aufnahmen der Partikel befinden sich im Anhang (Abbildungen A.1 und A.2), die Raman-Spektren mit den zugehörigen Referenzspektren sind in Abbildung 4.36 dargestellt. PA und PUR können nach



**Abb. 4.35.:** Fotografische Aufnahme des Filters (a) vor und (b) nach Behandlung mit Isopropanol.



#### 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen



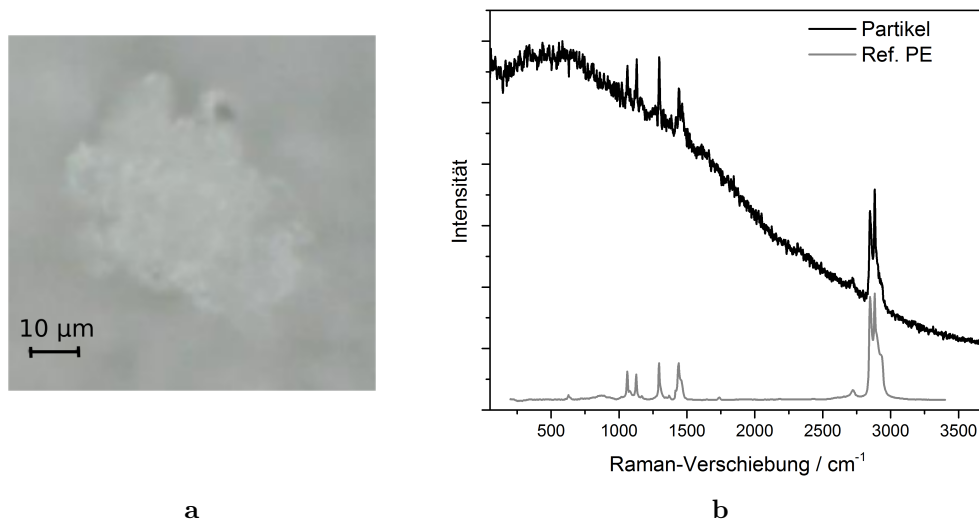
**Abb. 4.36.:** Raman-Spektren der identifizierten Partikel sowie zugehörige Referenzspektren (Ref.) von PS, PE, PP, PVC und PET.

dem Aufschluss auf dem Filter nicht wiedergefunden und identifiziert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Claessens et al.[118] überein, die feststellten, dass Nylonfasern nach dem Aufschluss nicht mehr auffindbar waren. Bei den PA- und PUR-Proben handelte es sich um Fasern. Da diese eine deutlich größere Oberfläche als beispielsweise sphärische Partikel besitzen, bieten sie mehr Angriffsfläche für die Säure, wodurch eine schnellere Zersetzung stattfinden kann. Alle anderen zugeetzten Partikel können auf dem Filter wiedergefunden und mittels RM identifiziert werden. Die Raman-Signale sind bei allen Partikeln deutlich zu erkennen, der Einfluss des Säureaufschlusses auf eine Erhöhung des Hintergrundes ist daher als gering anzusehen. Die Partikelformen und -größen von PP, PE, PVC und PET sind nach dem Aufschluss nahezu unverändert, lediglich die Probe aus PS weist eine deutlich andere Form auf. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass PP, PE, PVC und PET den Säureaufschluss nahezu unbeschadet überstehen, während PA und PUR vollständig zersetzt werden und PS ebenfalls angegriffen wird. Da im Expositionsversuch ausschließlich die Identifikation von PVC von Interesse ist, kann der Säureaufschluss in diesem problemlos angewandt werden. Im Feldversuch muss damit gerechnet werden, dass Partikel und Fasern aus PA, PUR und PS während der Probenaufarbeitung (teilweise) verloren gehen können.

#### 4.4.2. Blindproben

In den zur Methodvalidierung angefertigten Blindproben der Laborluft konnte kein MP nachgewiesen werden. Auch in den Proben der verwendeten Chemikalien befand sich kein MP. In der Kontrollprobe eines Aufschlusses wurde ein PE-Partikel identifiziert. Dieser besitzt eine Größe von ca. 50  $\mu\text{m}$  Länge und 30  $\mu\text{m}$  Breite und

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



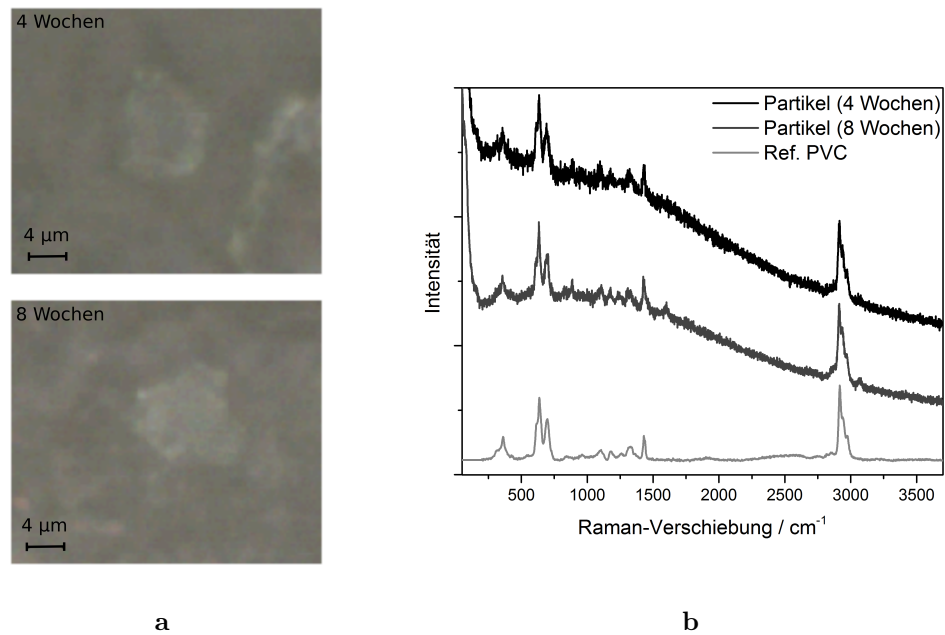
**Abb. 4.37.:** Mikroskopische Aufnahmen (a), sowie Raman-Spektren des PE-Partikels aus der Blindprobe und einer PE-Referenz (b).

ist in Abbildung 4.37 dargestellt. Um höhere statistische Sicherheit zu erlangen, wurde die analysierte Fläche auf dem Filter für Partikel  $<50 \mu\text{m}$  von 1.8% auf 3.6% vergrößert. Es wurden jedoch keine weiteren MP-Partikel identifiziert, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass eine größere Verunreinigung der Proben mit PE unwahrscheinlich ist. Weiterhin wurden weder im Expositions-, noch im Feldversuch, PE-Partikel nachgewiesen, weshalb eine Kontamination der Proben mit PE ausgeschlossen werden kann.

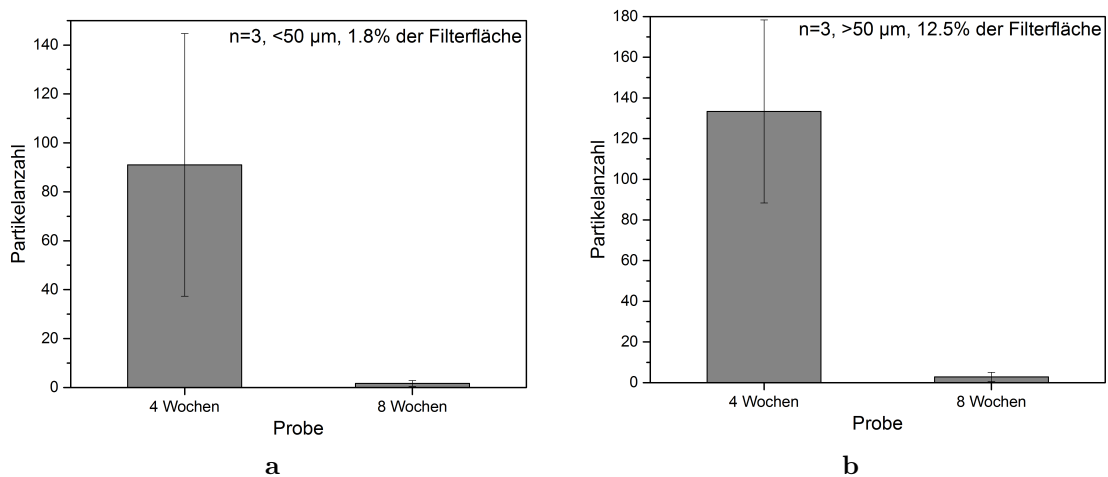
#### 4.4.3. Expositionsversuch

Der Expositionsversuch befasste sich mit der MP-Aufnahme von Muscheln. Dazu wurden die Organismen zunächst 4 Wochen PVC-Partikeln ausgesetzt. Nach zusätzlichen 4 Wochen in sauberem Wasser erfolgte eine weitere Analyse. Es konnten sowohl in der 4-Wochen-, als auch in der 8-Wochen-Probe, PVC-Partikel in den Größengruppen  $<50 \mu\text{m}$  und  $>50 \mu\text{m}$  nachgewiesen werden. In Abbildung 4.38 ist beispielhaft die Identifikation zweier PVC-Partikel mit einer Größe kleiner gleich  $10 \mu\text{m}$  ( $9 \times 6 \mu\text{m}$  bzw.  $10 \times 10 \mu\text{m}$ ) aus der 4- bzw. 8-Wochen-Probe gezeigt. Für Partikel kleiner  $50 \mu\text{m}$  wurden in der 4-Wochen-Probe  $91 \pm 54$  Partikel pro Filter festgestellt, während in der 8-Wochen-Probe  $2 \pm 1$  Partikel pro Filter vorhanden waren (vgl. Abbildung 4.39a). Hierbei wurden insgesamt je 1.8% der effektiven Filterfläche von 3 Filtern, die jeweils mit dem Aufschluss zweier Muscheln beladen waren, untersucht. Für Partikel  $>50 \mu\text{m}$  ließen sich in der 4-Wochen-Probe  $133 \pm 45$  Partikel pro Filter und in der 8-Wochen-Probe  $3 \pm 2$  Partikel pro Filter nachweisen (12.5% der effektiven Filterfläche, 3 Filter mit je 2 Muscheln, vgl. Abbildung 4.39b).

#### 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

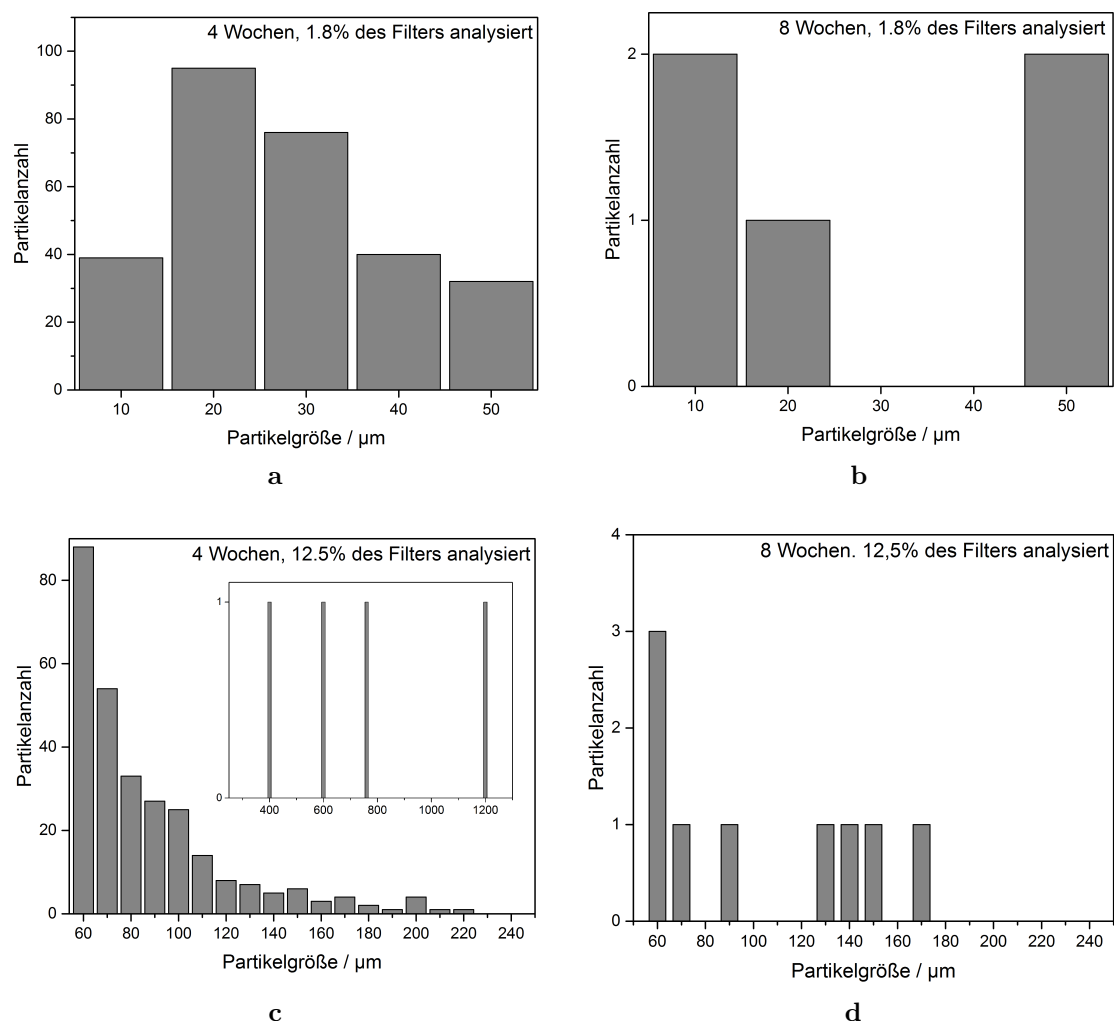


**Abb. 4.38.:** Mikroskopische Aufnahmen (a), sowie Raman-Spektren zweier PVC-Partikel aus der 4-Wochen- bzw. 8-Wochen-Probe und PVC-Referenzspektrum (b).



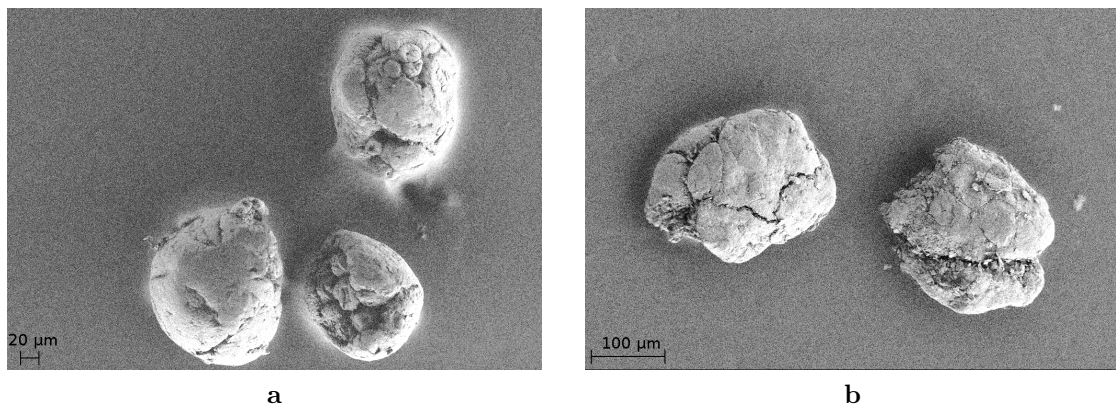
**Abb. 4.39.:** Identifizierte PVC-Partikel in den 4-Wochen- und 8-Wochen-Proben für Partikel (a)  $< 50 \mu\text{m}$ , und (b)  $> 50 \mu\text{m}$ .

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.40.:** Größenverteilung der identifizierten PVC-Partikel des Expositionsversuches, Partikel  $< 50 \mu\text{m}$  (a) nach 4 Wochen und (b) nach 8 Wochen, sowie Partikel  $> 50 \mu\text{m}$  (c) nach 4 Wochen und (d) nach 8 Wochen. Es wurden jeweils 3 Filter mit 2 Muscheln untersucht.

Die Größenverteilung der verfütterten PVC-Partikel ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es wurde ein Gemisch aus Partikeln, welche nach Herstellerangaben jeweils  $< 17 \mu\text{m}$  und  $< 100 \mu\text{m}$  sind, verfüttert. In den Partikelgrößenverteilungen ließen sich jedoch auch Partikel, welche deutlich größer als  $100 \mu\text{m}$  waren, feststellen (vgl. Abbildung 4.40). Dies kann z. B. durch eine Agglomeratbildung der Primärpartikel verursacht werden. Durch die Bildanalyse mittels des optischen Mikroskops kann dies jedoch nicht bestätigt werden. Wahrscheinlicher ist, dass die Spezifikation der verfütterten Partikel ungenau ist. Allgemein lässt sich bei den 4-Wochen-Proben sowohl für Partikel  $> 50 \mu\text{m}$ , als auch  $< 50 \mu\text{m}$ , eine Zunahme der Anzahl bis ca.  $20 \mu\text{m}$  feststellen. Die Abnahme zwischen  $60 \mu\text{m}$  und  $50 \mu\text{m}$  liegt in den unterschiedlich analysierten Flächen begründet. Um Aussagen treffen zu können, inwiefern die Zunahme der Partikelanzahl bei kleineren Größen durch die unterschiedliche

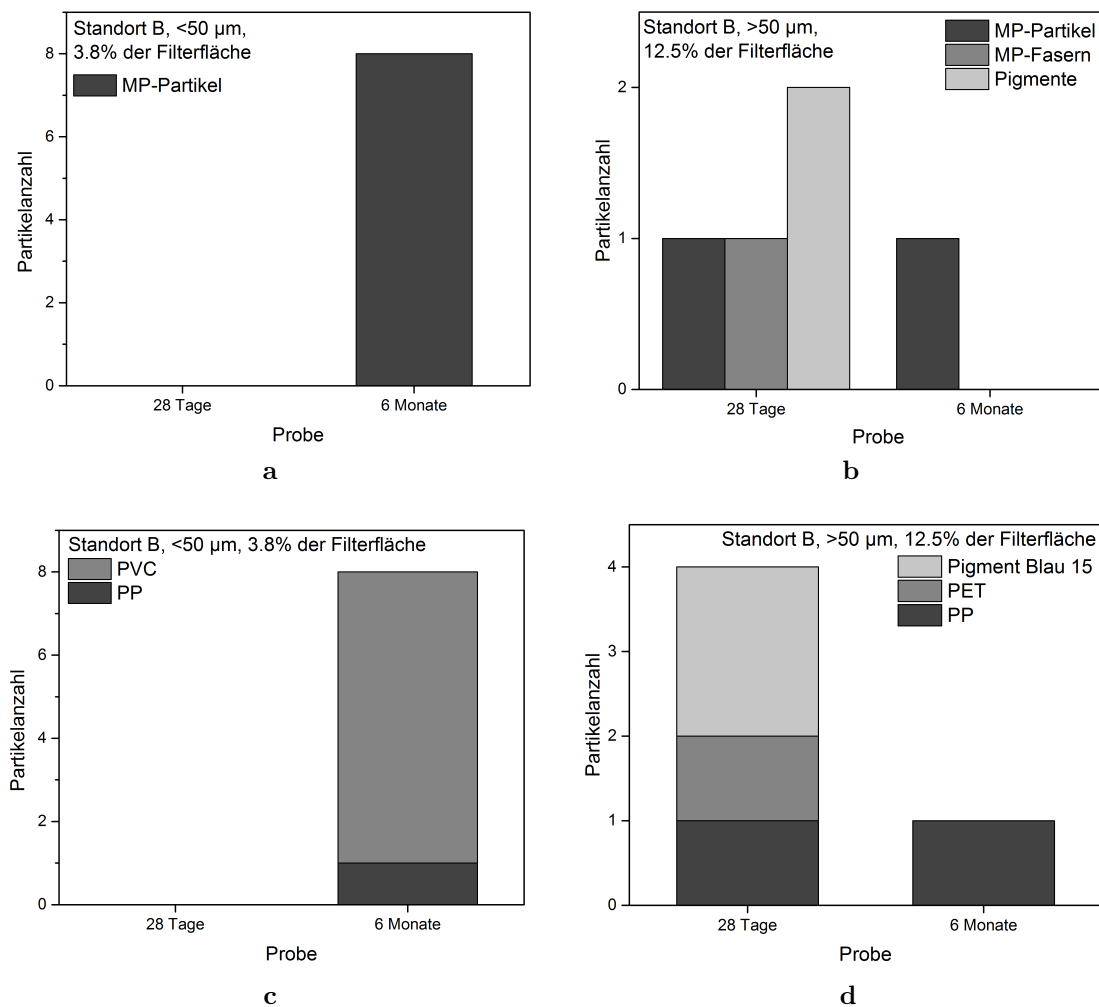


**Abb. 4.41.:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verfütterten PVC-Partikel mit Spezifikation (a)  $<17\ \mu\text{m}$ , und (b)  $<100\ \mu\text{m}$ .

Aufnahmefähigkeit der Muscheln oder durch die Größenverteilung der verfütterten Partikel beeinflusst wird, sind weitere Studien zur Größenzusammensetzung der verfütterten Partikel notwendig. In den 8-Wochen-Proben  $<50\ \mu\text{m}$  und  $>50\ \mu\text{m}$  wurden ebenfalls Partikel identifiziert, was darauf rückschließen lässt, dass selbst nach 4 Wochen in sauberem Wasser noch Partikel in den Muscheln verbleiben. Dies bestätigt die Ergebnisse von van Cauwenberghe und Janssen,[178] die nach dreitägiger Kultivierung von Muscheln für den menschlichen Verzehr in sauberem Wasser ebenfalls Partikel fanden. Auf Grund der geringen Anzahl an gefundenen Partikeln in den 8-Wochen-Proben können keine statistisch relevante Aussagen über die Größenverteilung getroffen werden. Insgesamt kann jedoch festgestellt werden, dass es zwischen den 4- und 8-Wochen-Proben zu einer starken Abnahme der Partikelanzahl kommt. Die meisten Partikel werden folglich bei Hälterung in sauberem Wasser wieder ausgeschieden. Es ist wichtig zu erwähnen, dass im Gegensatz zu den 4-Wochen-Proben, bei denen PVC-Partikel bis  $1200\ \mu\text{m}$  detektiert wurden, in den 8-Wochen-Proben ausschließlich PVC-Partikel  $\leq 170\ \mu\text{m}$  nachgewiesen werden konnten.

Weiterhin wurden rasterelektronenmikroskopische Abbildungen der Oberfläche der verfütterten PVC-Partikel aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4.41 gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass die untersuchten Partikel deutlich größer als die vom Hersteller angegebene Spezifikation sind. Es muss hierbei jedoch erwähnt werden, dass es sich auf Grund der geringen Anzahl der untersuchten Partikel nicht um eine repräsentative Stichprobe der Gesamtverteilung handelt. Bei allen Partikeln zeigt sich eine raue, rissige Struktur, die die effektive Oberfläche erhöht und damit etwaiges Auswaschen von Kunststoffadditiven erleichtert. Weiterhin könnten die Risse als Vorstufe einer Degradation der Partikel und des Zerfalls in kleinere Partikel betrachtet werden. Auf dem rechten Partikel in Abbildung 4.41b zeigt sich beispielsweise ein deutlicher Riss, der als Ausgangspunkt für ein Zerbrechen in kleinere Partikel dienen könnte. Dies könnte zusätzlich ein Auswaschen von Additiven begünstigen.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.42.:** Identifizierte MP-Partikel, MP-Fasern sowie Pigmente mit Größen <math><50\ \mu\text{m}</math> (a), und >math>>50\ \mu\text{m}</math> (b); Zusammensetzung der identifizierten Partikel und Fasern <math><50\ \mu\text{m}</math> (c), und >math>>50\ \mu\text{m}</math> (d).

#### 4.4.4. Feldversuch

Um die MP-Belastung von limnischen Organismen unter realen Bedingungen festzustellen, wurde zusätzlich ein Feldversuch an einer Kläranlage durchgeführt. Dessen Ergebnisse sind in Abbildung 4.42 dargestellt. Es wurden am Standort B (innerhalb der Kläranlage) insgesamt 8 Partikel <math><50\ \mu\text{m}</math> nachgewiesen, welche sich alle in der Probe mit 6-monatiger Exposition befinden. In der 28-Tage-Probe wurden keine MP-Partikel kleiner <math>50\ \mu\text{m}</math> gefunden. Bei den größeren Partikeln (>math>>50\ \mu\text{m}</math>) waren in der 28-Tage-Probe ein MP-Partikel, eine MP-Faser und zwei Pigmente vorhanden, während in der 6-Monate-Probe ein MP-Partikel nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zum Expositionsversuch wurden für Partikel <math><50\ \mu\text{m}</math> am Standort B 3.6% der effektiven Filterfläche untersucht. Bei Partikeln >math>>50\ \mu\text{m}</math> wurden 12.5% der effektiven Filterfläche analysiert. In den als Kontrolle verwendeten Proben aus

#### 4.4. Analyse von Mikroplastik aus limnischen Organismen

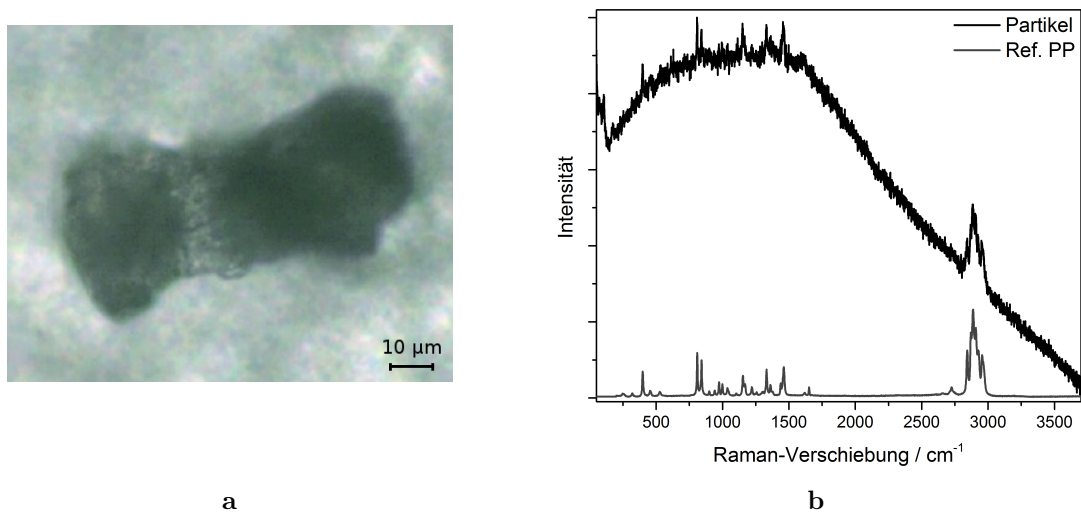


Abb. 4.43.: (a) Mikroskopische Aufnahme, und (b) Raman-Spektrum sowie Referenzspektren (Ref.) eines gefundenen PP-Partikels.

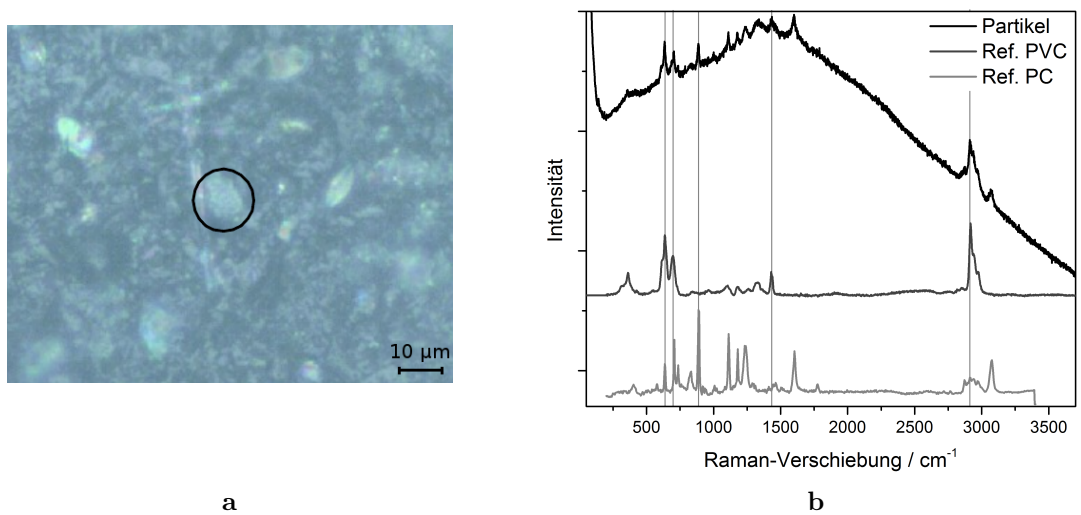


Abb. 4.44.: (a) Mikroskopische Aufnahme, und (b) Raman-Spektrum sowie Referenzspektrum (Ref.) eines gefundenen PVC-Partikels.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Standort D (Teich) konnte kein Kunststoff nachgewiesen werden. Die chemische Zusammensetzung der identifizierten Partikel und Fasern ist in Abbildung 4.42c und 4.42d gezeigt. Der Großteil der Partikel  $<50\ \mu\text{m}$  (87.5%) bestand aus PVC, es konnte weiterhin auch PP nachgewiesen werden. Für Partikel  $>50\ \mu\text{m}$  wurden in der 28-Tage-Probe sowie in der 6-Monate-Probe ein PP-Partikel identifiziert (vgl. Abbildung 4.43). In der 28-Tage-Probe befanden sich zusätzlich eine PET-Faser und zwei Pigment Blau 15-Partikel.

Die überwiegende Mehrheit der gefundenen Partikel war kleiner  $50\ \mu\text{m}$  (91.7% unter Berücksichtigung der unterschiedlichen analysierten Anteile der Filter). Dies stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen Verläufen der verstärkten Aufnahme mit abnehmender Partikelgröße überein.[177] 7 der 8 identifizierten Partikel  $<50\ \mu\text{m}$  besaßen einen Durchmesser unter  $20\ \mu\text{m}$ . Das kleinste Partikel war  $8 \times 5\ \mu\text{m}$  groß (vgl. Abbildung 4.44). Hierbei handelt es sich um das kleinste bisher in aus der Umwelt stammenden Biotaprobe spektroskopisch identifizierte MP-Partikel. Da die Größe der meisten Partikel deutlich unter der Auflösung der Mikro-FTIR-Spektroskopie liegt, ist RM hier die einzig geeignete Methode um einen vollständigen Überblick über die MP-Belastung von Muscheln zu erhalten.

#### 4.4.5. Zusammenfassung der MP-Analytik aus limnischen Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Umwelt ein Aufschluss- und Analyseverfahren (weiter)entwickelt, um die MP-Belastung in einheimischen Muscheln als Modellorganismen für limnische Lebewesen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst unterschiedliche Filterarten getestet und die Beständigkeit verschiedener Polymersorten gegenüber dem Säureaufschluss überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass der PC-Filter am besten für die Analyse geeignet ist und die meisten Polymersorten den  $\text{HNO}_3$ -Aufschluss unverändert überstehen. Weiterhin wurde die Nachbehandlung der Filter optimiert, um störende Matrixeffekte zu beseitigen.

In dem darauffolgenden Expositionsversuch konnte die Eignung der entwickelten Aufschluss- und Analysemethoden bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass Muscheln Kunststoffpartikel aufnehmen können. Diese konnten teilweise noch nach 4-wöchiger Hälterung unter MP-freien Bedingungen nachgewiesen werden. Der in der Literatur beschriebene Verlauf der verstärkten Aufnahme mit abnehmender Größe konnte bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die entwickelte Methode auch für die Analyse von Biotaprobe geeignet ist.

In Muschelproben, die in Kläranlagenwasser gehältert wurden, konnten ebenfalls MP-Partikel nachgewiesen werden. Der gefundene PVC-Partikel mit einer Größe



von  $8 \times 5 \mu\text{m}$  ist der kleinste, bisher in aus der Umwelt stammenden Biotaprobe gefundene, Partikel. Dies betont insbesondere die Eignung von RM auch kleinste Partikel in Realproben nachweisen zu können. Der Großteil der identifizierten MP-Partikel bestand aus PVC. Insgesamt waren in der Probe nach 6 Monaten deutlich mehr Partikel vorhanden wie nach 28 Tagen. Inwiefern es sich hier, um eine Akkumulation von Partikeln oder um eine Momentaufnahme der Belastung der Kläranlage handelt, muss in weiteren Studien überprüft werden.

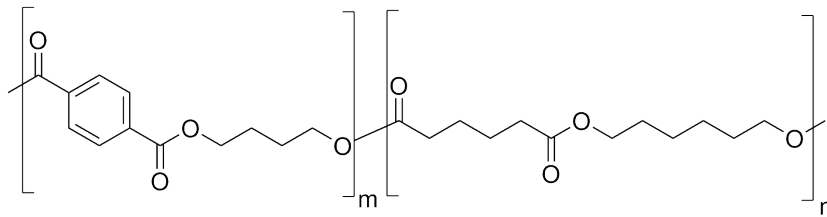
## 4.5. Bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe

### 4.5.1. Polymersorten

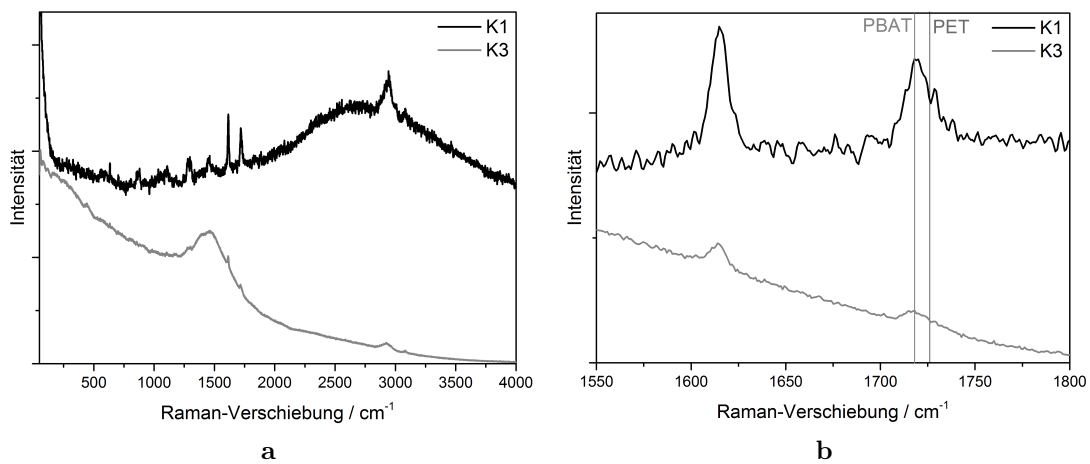
Es wurden Alltagsgegenstände (Kunststofftüten und Verpackungsmaterial) aus bioabbaubaren (B), kompostierbaren (K) und recycelten (R) Kunststoffen untersucht, um ihre Zusammensetzung sowie die daraus resultierenden Einflüsse auf die Umwelt besser einschätzen zu können. Mit Ausnahme der Probe K2, bei der ein starker Fluoreszenzhintergrund vorhanden war, konnten alle Polymersorten identifiziert werden. Tabelle 4.2 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse. Die beiden kompostierbaren Proben K1 und K3 bestehen aus Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT, vgl. Abbildungen 4.45). Da sich die Raman-Spektren auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von PBAT und PET nur geringfügig unterscheiden, muss sehr viel Wert auf eine genaue Identifikation gelegt werden. Diese kann anhand der CO-Streckschwingung erfolgen, welche bei PBAT bei  $1718 \text{ cm}^{-1}$  und bei PET bei  $1726 \text{ cm}^{-1}$  liegt.[239, 240] Die erhaltenen Spektren von K1 und K3 sind in Abbildung 4.46 dargestellt. PBAT ist ein industriell verwendetes Polyester-Copolymer, das vor allem auf Grund seiner kostengünstigeren Herstellung im Vergleich zu anderen kompostierbaren Polymeren geschätzt wird. Dabei können mit PE vergleichbare Eigenschaften erzielt werden.[241, 242]

Die bioabbaubaren Proben bestehen aus Polylactid (PLA), PE und PS. Als Beispiel hierzu ist ein Raman-Spektrum der Probe B1 in Abbildung 4.47 gezeigt. Von PLA ist bekannt, dass es vor allem durch Hydrolyse der Esterbindung abgebaut werden kann.[243]. Neuere Studien zeigen, dass PS durch einige Mikroorganismen unter speziellen Bedingungen im Boden abgebaut werden kann.[244]. Inwiefern die dem Verpackungsmaterial laut Herstellerangaben[245] hinzugefügten Enzyme eine Zersetzung unter Umweltbedingungen erlauben, bleibt offen. Auch PE-Folien können nach Zugabe verschiedener Additive, die die Oxidation erleichtern, bioabbaubar werden.[246] Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass sowohl PE, als auch PS durch die oxidativen Zusätze in Alltagsbedingungen nur in geringem Maße bzw.

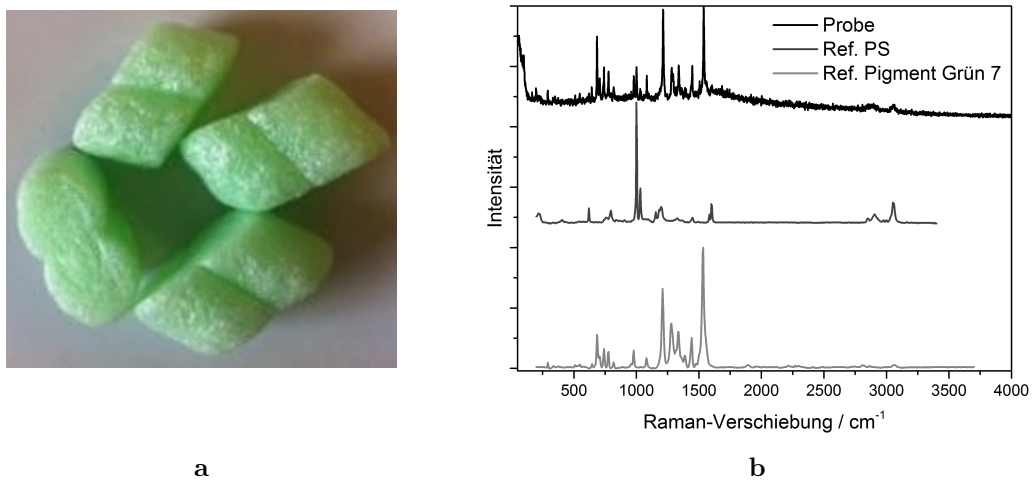
#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 4.45.:** Strukturformel des kompostierbaren Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT).



**Abb. 4.46.:** (a) Raman-Spektren der kompostierbaren Proben K1 und K3; (b) Vergrößerung des Bereiches von 1550 bis 1800 cm<sup>-1</sup> mit Kennzeichnung der Bandenposition von PBAT und PET.



**Abb. 4.47.:** (a) Fotografische Aufnahme der Probe B1; (b) Raman-Spektren der Probe sowie Referenzen für PS und Pigment Grün 7.

**Tab. 4.2.:** Bezeichnung, identifizierte Polymersorten und Art der bioabbaubaren (B), kompostierbaren (K) und recycelten (R) Kunststoffproben (n.i. = nicht identifiziert).

Bezeichnung	Polymersorte	Art
K1	Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT)	kompostierbar
K2	n.i.	kompostierbar
K3	Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT)	kompostierbar
B1	Polylactid (PLA)	bioabbaubar
B2	Polyethylen (PE)	bioabbaubar
B3	Polystyrol (PS)	bioabbaubar
R1	Polyethylen (PE)	recycelt
R2	Polyethylen (PE)	recycelt
R3	Polyethylen (PE)	recycelt

nicht abgebaut werden können.[247] Eine vollständige Zersetzung der bioabbaubaren Proben erscheint daher fraglich. Viel wahrscheinlicher ist die Freisetzung kleiner MP-Partikel, die auf Grund ihrer geringen Masse und Größe nicht im Rahmen der DIN-Normen, welche eine Restmasse von 10 Gew.-% bei einer Größe >2 mm erlauben, erfasst werden. Alle recycelten Proben (R1, R2 und R3) bestehen, wie angegeben, aus PE.

#### 4.5.2. Pigmentbestandteile

Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, können mittels RM neben Polymerarten auch verwendete Pigmente identifiziert werden. Eine Analyse der Pigmente wurde für alle gefärbten Proben durchgeführt. Bei mehrfarbigen Proben wurden alle unterschiedlich gefärbten Bereiche untersucht. Ein Beispiel für die Identifikation eines Pigments mittels RM ist in Abbildung 4.47 gezeigt, während Tabelle 4.3 die erhaltenen Ergebnisse zusammenfasst. Die kompostierbaren und bioabbaubaren Proben enthielten ausschließlich Pigment Grün 7 (Polychlorkupferphthalocyanin), während in den Proben aus recyceltem Kunststoff auch Pigment Blau 15 (Kupferphthalocyanin) und Pigment Violett 27 (Kristallviolett) nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist hierbei, dass die selben Pigmente wie in Kapitel 4.3 nachgewiesen wurden. Dies ist zum einen auf die verstärkte Verwendung von grüner Farbe in kompostierbaren und bioabbaubaren Proben zurückzuführen, zum anderen kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine höhere Empfindlichkeit der RM gegenüber dieser Pigmente nicht ausgeschlossen werden.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

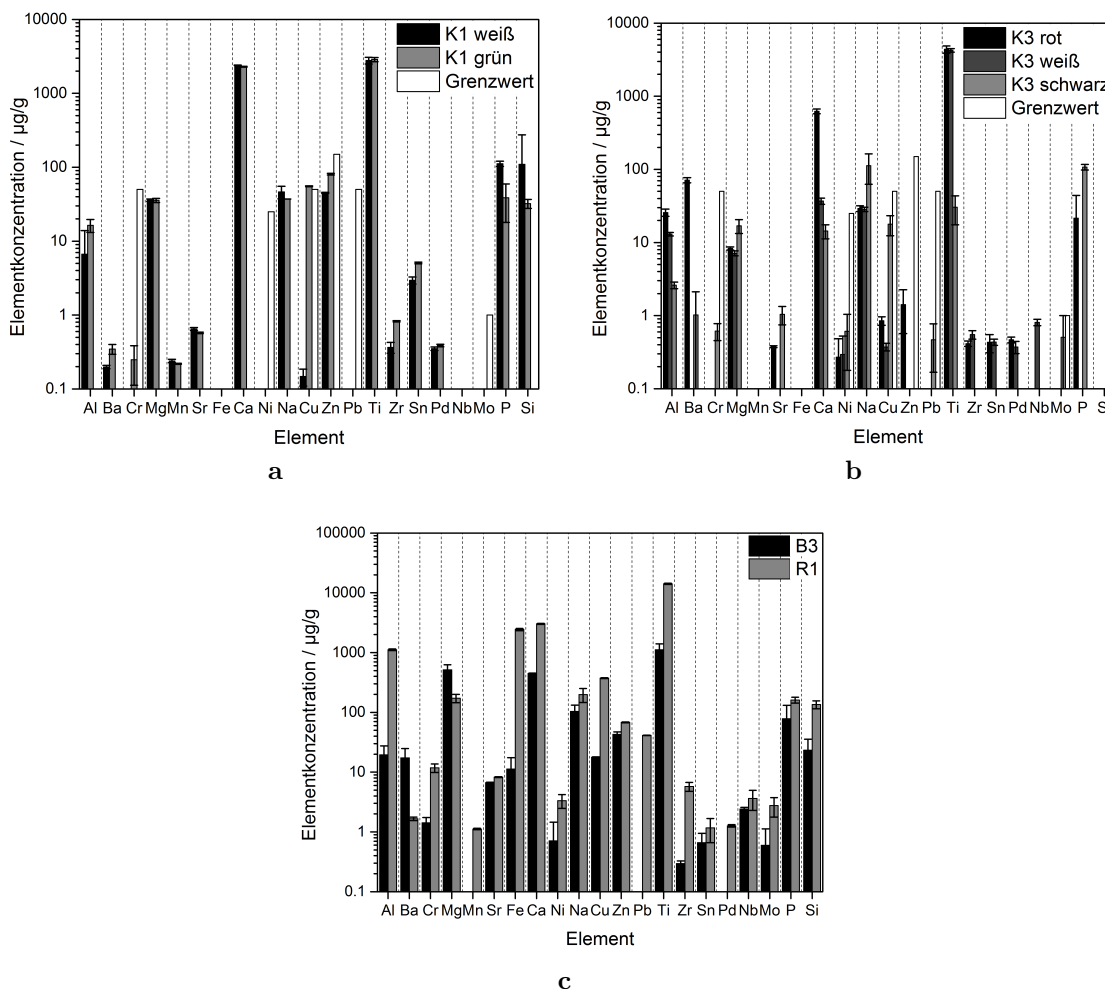
**Tab. 4.3.:** Bezeichnung, Farbe der untersuchten Stelle, mittels RM identifizierte Pigmente und Art der bioabbaubaren, kompostierbaren und recycelten Kunststoffproben (n.i. = nicht identifiziert bzw. keine Farbe vorhanden).

Probe	Farben	Pigmente	Art		
K1	grün	Pigment Grün 7	kompostierbar		
K2	grün	n.i.	kompostierbar		
K3	schwarz	n.i.	kompostierbar		
	rot	n.i.			
B1	farblos	n.i.	bioabbaubar		
B2	farblos	n.i.	bioabbaubar		
B3	grün	Pigment Grün 7	bioabbaubar		
R1	grün	Pigment Grün 7	recycelt		
R2	dunkelblau	Pigment Blau 15	recycelt		
	hellblau	Pigment Blau 15			
	gelb	n.i.			
	rot	n.i.			
	orange	n.i.			
	grün	Pigment Grün 7			
	violett	Pigment Violett 27			
	braun	n.i.			
	R3	blau		Pigment Blau 15	recycelt
		grün		Pigment Grün 7	
rot		n.i.			
gelb		n.i.			
schwarz		n.i.			

#### 4.5.3. Schwermetallanalytik

Pigmente bestehen oftmals aus einem organischem Gerüst und einem Schwermetallzentralatom (siehe Kapitel 4.3). Zusätzlich werden bei der Produktion von Kunststoffen schwermetallhaltige Verbindungen z.B. als Füllstoffe verwendet. Im Gegensatz zu den Analysen der MP-Partikel aus dem Gardasee wurden hier ausschließlich neue, nicht verwendete Kunststoffprodukte untersucht, wodurch sichergestellt wird, dass es sich um einen inhärenten Bestandteil der Produkte handelt. In Abbildung 4.48 sind Ergebnisse der ICP-MS-Analysen der unterschiedlich gefärbten Proben von K1, K3, B3 und R1 gezeigt. Für kompostierbare Proben sind die von DIN EN 14995[174] festgelegten Grenzwerte ebenfalls eingezeichnet. Mit Ausnahme der grünen Bereiche von K1, welche erhöhte Kupferwerte enthalten ( $55.17 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$  bei einem Grenzwert von  $50 \mu\text{g/g}$ ), werden alle Grenzwerte eingehalten.

#### 4.5. Bioabbaubare, kompostierbare und recycelte Kunststoffe



**Abb. 4.48.:** Ergebnisse der ICP-MS-Analysen der unterschiedlich gefärbten Stellen für K1 (a), und K3 (b), inklusive der Grenzwerte nach DIN EN 14995 [174] sowie Gesamtanalysen von B3 und R1 (c).

Zum Wert von K1 muss jedoch hinzugefügt werden, dass hier grüne Stellen, die über den Gesamtbereich der Probe verteilt waren, gesammelt wurden. Bei einer Untersuchung der Gesamtprobe mit weißen und grünen Bereichen, wie sie auch in DIN EN 14995 vorgeschrieben ist, sind folglich deutlich geringere Werte zu erwarten. Die Metallkonzentrationen der unterschiedlich gefärbten Stellen von K1 sind insgesamt ähnlich, nur bei Cu unterscheiden sie sich deutlich. Die weißen Anteile besitzen Konzentrationen von  $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  Cu, während in den grünen Anteilen  $55.17 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$  Cu vorhanden sind. Dies bestätigt die Vermutung, dass Pigmente als Quelle für Schwermetalle dienen können. Die roten Stellen von K3 zeigen vor allem einen stark erhöhten Ba-Wert ( $71.23 \pm 5,98 \mu\text{g/g}$ ) im Vergleich zu den anders pigmentierten Bereichen (siehe Abbildung 4.48b). Dies spricht für die Verwendung von Ba-haltigen roten Pigmenten wie z.B. Pigment Rot 53:1 (Bariumsalz der 5-Chloro-2-[(2-hydroxy-1-naphthalenyl)azo]-4-methylbenzoesulfonsäure), [248] welches häufig zum Bedrucken von Kunststoffen verwendet wird. Da das rote Pigment auf

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Grund des hohen Fluoreszenzhintergrundes mittels RM jedoch nicht identifiziert werden kann, können keine genauen Aussagen zum verwendeten Pigment getroffen werden. Sowohl die weißen, als auch roten Bereiche, beinhalten deutlich mehr Ti ( $4246.65 \pm 226.58 \mu\text{g/g}$  bzw.  $4388.72 \pm 499.20 \mu\text{g/g}$ ) als die schwarz eingefärbten Bereiche ( $30.45 \pm 13.02 \mu\text{g/g}$ ), wodurch eine Verwendung von  $\text{TiO}_2$  als weißes Pigment bzw. Farbaufheller angenommen werden kann.

Die vom Hersteller als frei von Schwermetallen[245] beworbene Probe B3 beinhaltet nachweisbare Konzentrationen der Schwermetalle Ba, Cr, Sr, Fe, Ni, Cu, Zn, Zr, Sn, Nb und Mo (vgl. Abbildung 4.48c). Da die DIN EN 14995 nicht für als bioabbaubar klassifizierte Proben gültig ist, kann sie nicht auf die Probe B3 angewandt werden. Als grober Richtwert kann jedoch festgestellt werden, dass sämtliche für kompostierbare Proben geltende Grenzwerte nicht überschritten werden. Eine starke Umweltgefährdung durch die Probe kann folglich ausgeschlossen werden. Probe R1 besitzt hohe Konzentrationen an Cu ( $373.71 \pm 6.98 \mu\text{g/g}$ ), Pb ( $41.27 \pm 0.37 \mu\text{g/g}$ ) und Mo ( $2.77 \pm 1.00 \mu\text{g/g}$ ), die nahe (für Pb) an den Grenzwerten der DIN EN 14995 liegen bzw. diese deutlich überschreiten (Cu und Mo). Auch hier sind diese Grenzwerte rechtlich nicht verbindlich, da es sich um kein kompostierbares Material handelt. Die deutliche Überschreitung der Grenzwerte legt jedoch eine Umweltgefährdung durch die Probe nahe, falls keine sachgemäße Entsorgung erfolgt.

#### 4.5.4. Zusammenfassung der Analytik von bioabbaubaren, kompostierbaren und recycelten Kunststoffen

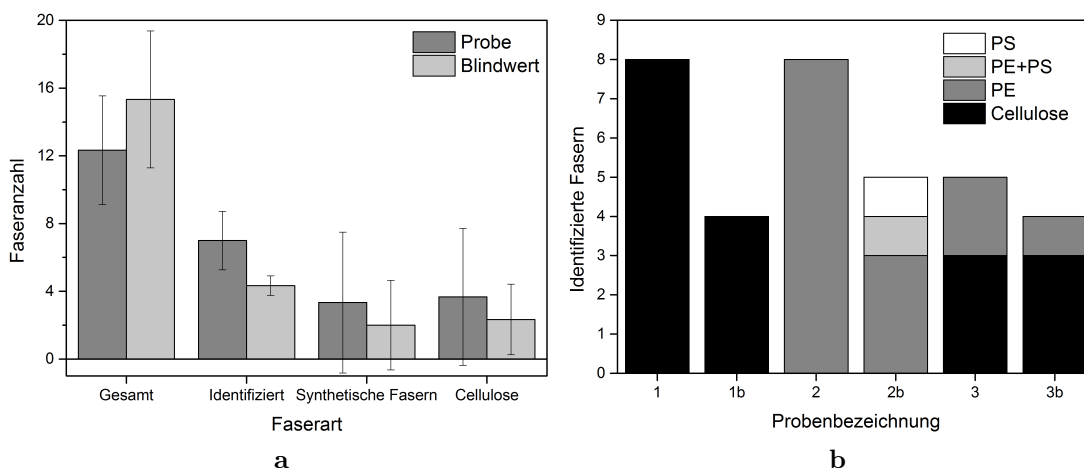
Es wurden jeweils 3 kompostierbare, bioabbaubare und recycelte Kunststoffproben auf ihre Zusammensetzung bezüglich Polymer, Pigmente und Schwermetallgehalt untersucht. Bis auf eine kompostierbare Probe konnte die Polymerzusammensetzung aller Proben bestimmt werden. Die kompostierbaren Proben bestanden aus Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT) einem Polyester, dessen Kompostierbarkeit bekannt ist. Die bioabbaubaren Proben setzten sich aus Polylactid (PLA), Polyethylen (PE) und Polystyrol (PS) zusammen, während alle recycelten Proben aus Polyethylen (PE) bestanden. Vor allem die Bioabbaubarkeit der PE- und PS-Probe unter realen Bedingungen ist fraglich.

An Pigmenten wurden hauptsächlich die kupferhaltigen Pigmente Pigment Grün 7 (Polychlorkupferphthalocyanin) und Pigment Blau 15 (Kupferphthalocyanin) nachgewiesen. Pigment Violett 27 war ebenfalls vorhanden. Die ICP-MS-Analyse einiger Proben zeigte, dass die untersuchten kompostierbaren Kunststoffe die durch die DIN EN 14995 vorgegebenen Grenzwerte einhalten. Bei Probe K1 lagen Cu-Werte der grün pigmentierten Bestandteile etwas über dem Grenzwert. Unter Betrachtung der Gesamtprobe konnte jedoch keine Überschreitung festgestellt

werden. Die Analyse zeigte zudem deutlich die Verwendung Cu- bzw. Ba-haltiger Pigmente zur grünen bzw. roten Einfärbung. So besaß Probe R1 hohe Werte an Cu, Pb und Mo, was eine Umweltgefährdung bei nicht sachgemäßer Entsorgung vermuten lässt. Die Kennzeichnung der Verpackungen als recycelt oder bioabbaubar kann dazu führen, dass durch den Verbraucher eine Entsorgung auf den Biomüll erfolgt. Durch eine unvollständige Zersetzung können sich dann kleine PE- und PS-Partikel bilden, welche zur MP-Last in der Umwelt beitragen können.

## 4.6. Analyse von Mikroplastik aus Bier

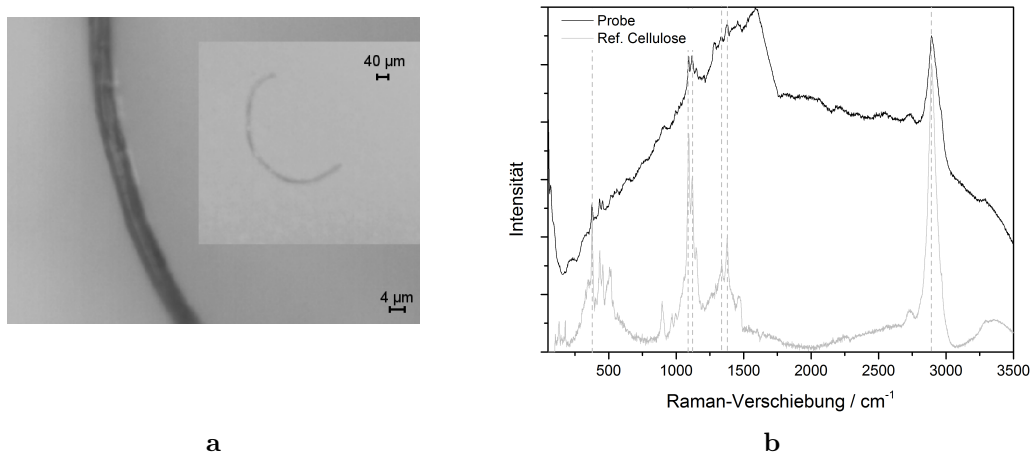
### 4.6.1. Synthetische Fasern



**Abb. 4.49.:** (a) Übersicht über die gesamte Faseranzahl, identifizierte bzw. synthetische Fasern sowie Cellulose; (b) Zusammensetzung der identifizierten Fasern in den einzelnen Proben (Probe b ist jeweils der zugehörige Blindwert). Übersetzt und modifiziert nach [249].

Um die Belastbarkeit der in der Literatur beschriebenen MP-Befunde in Getränkeproben zu überprüfen, wurde Bier auf seinen Gehalt an synthetischen Fasern untersucht. Es wurden sowohl in der Bier-, als auch den zugehörigen Blindproben, Fasern gefunden (vgl. Abbildung 4.49a). Die Gesamtanzahl der Fasern lag zwischen 10 und 19 Fasern pro Filter (entspricht 0.33 L Bier). Einige der Fasern konnten auf Grund des hohen Fluoreszenzhintergrundes nicht identifiziert werden. In der ersten Probe befanden sich sowohl auf dem Proben-, als auch auf dem zugehörigen Blindfilter, ausschließlich Cellulosefasern (vgl. Abbildungen 4.49b und 4.50). Da Cellulose ein natürlich vorkommendes Polymer darstellt, wird es nicht zu den synthetischen Polymeren gerechnet. Probe 2 enthielt nur synthetische Fasern aus PE, im zugehörigen Blindwert 2b war auch eine PS-Faser sowie eine Faser aus

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



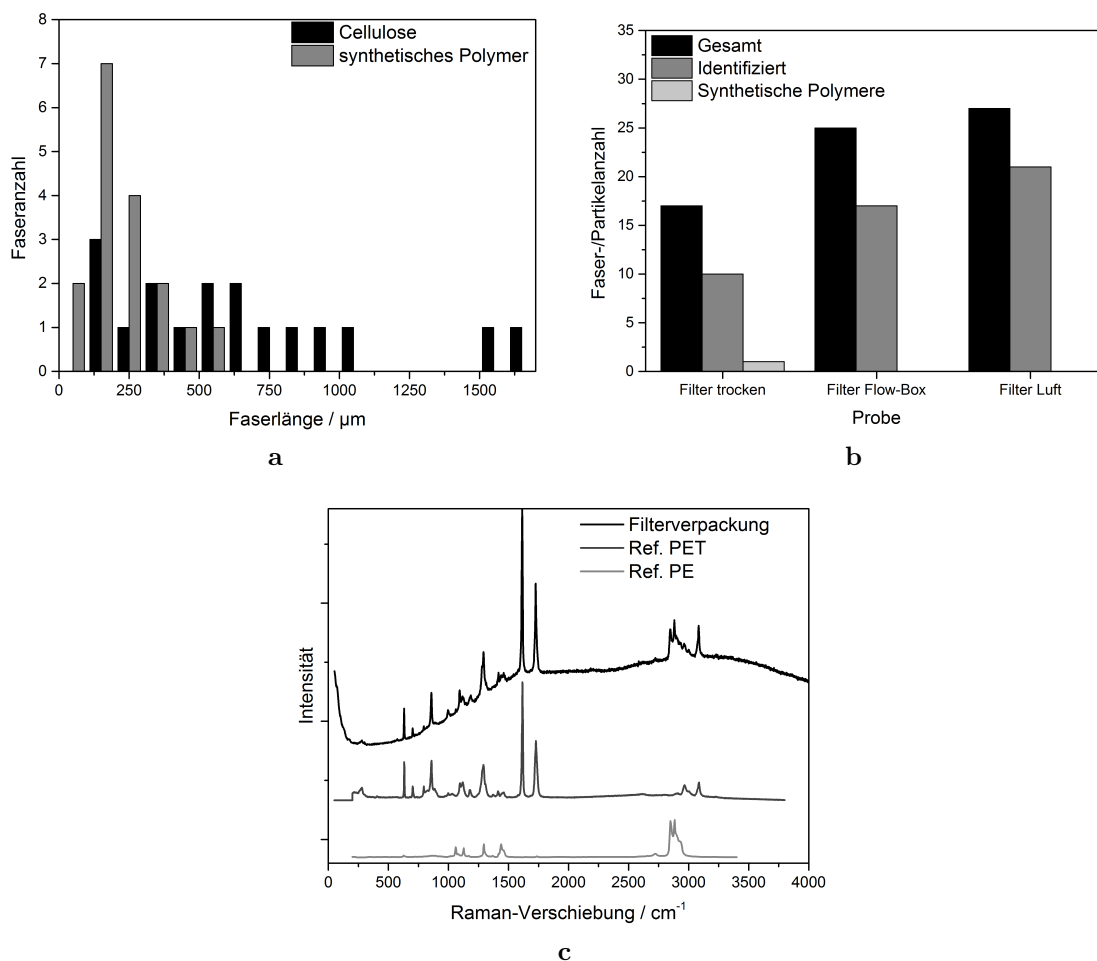
**Abb. 4.50.:** (a) Mikroskopische Aufnahme einer Faser mit 50 $\times$ -Objektiv (10 $\times$  im eingebetteten Bild); (b) Raman-Spektrum der Faser mit Referenzspektrum (Ref.) von Cellulose. Übersetzt und modifiziert nach [249].

einer Mischung von PE und PS vorhanden. In Probe 3 bzw. 3b wurden sowohl Cellulose als auch PE nachgewiesen. Statistische Analysen zeigen bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% keine signifikanten Unterschiede der Verteilungen von Probe und Blindprobe in den einzelnen Kategorien der Abbildung 4.49a (Gesamtanzahl, identifizierte Fasern, Fasern aus synthetischen Polymeren, Fasern aus Cellulose).

Alle Fasern sind kürzer als 5 mm. Die Fasern aus synthetischen Polymeren werden somit alle dem Mikroplastik zugerechnet. Bei Betrachtung der Längenverteilung (siehe Abbildung 4.51a) lässt sich erkennen, dass die Fasern aus synthetischen Polymeren bzw. Cellulose unterschiedliche Größenverteilungsmuster besitzen. Synthetische Fasern sind durchschnittlich kürzer als jene aus Cellulose. Die nachgewiesenen Fasern aus synthetischen Polymeren sind zwischen 40 und 550 µm lang, während die Cellulosefasern Längen von 140 bis 1600 µm aufweisen. Die Ursache der unterschiedlichen Verteilungsmuster kann ohne Kenntnis der Quellen nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Am wahrscheinlichsten erscheinen unterschiedliche Eintragspfade, die in den verschiedenen Längen resultierten.

Es wurden zusätzlich unterschiedliche Kontaminationsquellen untersucht. Die Ergebnisse der Analyse der drei hierfür verwendeten Blindfilter sind in Abbildung 4.51b dargestellt. Bereits auf dem trockenen, frisch aus der Verpackung entnommenen Filter befanden sich einige Cellulosefasern sowie ein PE-Partikel. Eine Untersuchung der Verpackung ergab, dass diese aus einer Mischung aus PET und PE bestand (vgl. Abbildung 4.51c), wodurch ein Eintrag der in den Proben gefundenen PE-Fasern über die Filterverpackung als wahrscheinlich anzusehen ist. Im Rahmen des Produktionsprozesses des Verpackungsmaterials können möglicherweise PE-Fasern an der Folie anhaften, welche dann nach dem Auspacken auf dem Filter verweilen. Auf den angefeuchteten Kontrollfiltern der Laborluft in und außerhalb der Lamina





**Abb. 4.51.:** (a) Verteilung der synthetischen bzw. Cellulosefasern in Abhängigkeit der Faserlänge; (b) Übersicht der auf den drei Blindfiltern gefundenen und identifizierten Fasern/Partikeln sowie der Anteil an synthetischen Polymeren; (c) Raman-Spektrum der Filterverpackung sowie Referenzen von PET und PE.

Flow-Box wurden ausschließlich Cellulosefasern identifiziert, was vermuten lässt, dass eine Verunreinigung der Probe mit Cellulosefasern aus der Laborluft stattfindet. Diese stammen höchstwahrscheinlich von der Kleidung des Laborpersonals sowie von im Labor verwendeten Alltagsgegenständen. Eine untersuchte Faser enthielt neben Cellulose auch Indigo, welches ein bei der Herstellung von Denimstoffen verwendeter Farbstoff ist. Dies lässt eine Kontamination durch vom Laborpersonal getragene Jeans vermuten. Die Analyse eines trockenen Filters, welcher sich über einen Zeitraum von 7 Tagen neben dem Raman-Mikroskop befand, zeigte keine nachträgliche Kontamination.

Da der Vergleich von Proben und Blindfiltern keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Verteilungen der Faseranzahl zeigt, ist eine Verunreinigung des Bieres nicht anzunehmen. Durch das ubiquitäre Vorkommen von Fasern aus Cellulose

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

und synthetischen Polymeren ist die Verwendung von Blindproben essentiell, um belastbare Aussagen treffen zu können. Da Fasern vor allem an angefeuchteten Filtern anlagerten, ist weiterhin die Wahl repräsentativer Blindproben nötig. Bisherige Ergebnisse zum Vorkommen von synthetischen Fasern in Bier[129] konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die dort verwendete Probennahme und Analysemethoden lassen vermuten, dass die Ergebnisse unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten nicht belastbar waren. Ein vor kurzem veröffentlichter Artikel des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes (CVUA) in Karlsruhe kam zu den gleichen Schlussfolgerungen.[250] Bevor verlässliche Daten zur Belastung von Bier mit synthetischen Fasern erhalten werden können, müssen ausführliche sowohl qualitative als auch quantitative Analysen durchgeführt werden. Zusätzlich müssen die Ursachen der Verunreinigungen und mögliche Methoden zur Verringerung derselben ausführlich untersucht werden.

##### 4.6.2. Zusammenfassung der MP-Analytik in Bier

Es wurden drei Bierproben auf ihre Verunreinigung mit Fasern aus synthetischen Polymeren untersucht. Dabei wurden sowohl in den Proben, als auch in den zugehörigen Blindproben, vergleichbare Mengen an synthetischen Fasern sowie Cellulosefasern gefunden. Eine statistisch signifikante Verunreinigung des Bieres konnte nicht festgestellt werden. Die synthetischen Fasern bestanden zum größten Teil aus PE. Zusätzlich wurden eine Faser aus PS und eine Faser einer Mischung aus PE und PS nachgewiesen. Da das Verpackungsmaterial der Filter PE enthält, muss dieses als mögliche Kontaminationsquelle in Betracht gezogen werden.

Die Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Wahl repräsentativer Blindproben, insbesondere bei der Analyse von Fasern, ist. Des Weiteren ist eine Bestimmung der Faserzusammensetzung (z.B. durch spektroskopische Methoden) essentiell, da ansonsten oftmals Cellulose, welche ubiquitär vorkommt und beispielsweise von Laborkleidung über die Luft transportiert wird, fälschlicherweise dem MP zugerechnet werden kann. Die in einer zuvor durchgeführten Studie berichteten Verunreinigungen von Bier mit synthetischen Fasern konnten nicht bestätigt werden. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Kontaminationen aus der Probennahme bzw. Artefakte bei der Identifizierung handelte.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Analyse von Stabilisotopen mit der Raman-Mikrospektroskopie (Stabilisotopen-Raman-Mikroskopie, SIRM) erprobt und für die Anwendung auf organisches Bodenmaterial optimiert. Ziel war es, Aussagen zu den an der Erhöhung der Wasserrückhaltefähigkeit beteiligten Mechanismen treffen zu können. Bisherige Studien berichteten von einem Anstieg der verfügbaren Wassermenge im Boden nach der Zugabe von Holzkohle, systematische Studien fehlen jedoch. Um den Abbau und Verbleib der Holzkohleprodukte im Boden zu verstehen, ist es sinnvoll, mit Stabilisotopen markierte Substanzen auszubringen und deren Verbleib über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Da eine Beteiligung von Bodenaggregaten angenommen wird, sind Verfahren mit räumlichen Auflösungen im Mikrometerbereich von besonderer Bedeutung. Mit Ausnahme der Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie, welche ein Hochvakuum benötigt und daher mit hohen Kosten und einer längeren Probenvorbereitung verbunden ist, finden bisher keine weiteren Methoden zur Bestimmung der räumlichen Isotopenverteilung in Bodenproben Anwendung.

Um die SIRM für die Analyse von organischem Bodenmaterial zu entwickeln, wurde zunächst eine  $^{13}\text{C}$ -markierte Holzkohle mit unbekanntem Isotopengehalt untersucht. Es zeigte sich im Vergleich mit anderen Holzkohlen und Rußen, dass die für die Bestimmung des Isotopengehaltes verwendete Position des G-Peaks im Raman-Spektrum aus einer Überlagerung der G- und D2-Bande bestand und sich daher mit der strukturellen Ordnung verschob. Ohne Vergleich zu einer unmarkierten Holzkohle, welche unter den gleichen Bedingungen produziert wurde, konnte eine Bestimmung des Isotopengehalts nicht erfolgen. Die erhaltenen Ergebnisse ließen jedoch vermuten, dass der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der Holzkohle als gering angenommen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurden künstliche Huminsäuren als Modells substanz für organisches Bodenmaterial synthetisiert. So war es möglich, Substanzen mit bekanntem  $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ -Verhältnis zu erhalten, welche eine SIRM-Analyse ohne den Einfluss unterschiedlicher Nanostrukturen ermöglichten. Die gewählte Reaktion aus Glucose und Harnstoff wurde erfolgreich mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen der Edukte durchgeführt. In den Raman-Spektren zeigte sich eine für diese Substanzklasse typische Autofluoreszenz, welche die Raman-Signale überlagert. Im Folgenden wurden daher unterschiedliche Methoden auf ihre Eignung zur Fluoreszenzvermeidung überprüft. Bei der Wahl unterschiedlicher Anregungswellenlängen (532 nm, 633 nm und 785 nm) war ausschließlich bei 532 nm ein G-Peak-Signal erkennbar. Dieses Signal besaß jedoch nur eine geringe Intensität, was im Rahmen der linearen Regression unterschiedlicher Isotopenverhältnisse zu einer relativ

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

hohen Nachweisgrenze führte, welche für die Analyse von Realproben nicht ausreichend war. Die Oberflächen-verstärkte Raman-mikrospektroskopische Analyse mit Silbernanopartikel (AgNP) und einem 50×-Objektiv führte zu einer deutlichen Verringerung des Fluoreszenzuntergrundes und einer erfolgreichen elektromagnetischen wie auch chemischen Verstärkung der Raman-Signale. Da die Verstärkung von der Position der Anlagerung der AgNP abhing, unterschieden sich die Einzelspektren innerhalb einer Probe deutlich, wodurch eine reproduzierbare Isotopenbestimmung nicht möglich war. Die Verwendung von AgNP und geringer optischer Auflösung (10×-Objektiv) zeigte innerhalb einer Analyse unter Einsatz derselben AgNP reproduzierbare Ergebnisse. Jedoch konnten mit verschiedenen AgNP-Ansätzen keine vergleichbaren Ergebnisse erhalten werden, da auch hier die Position des G-Peaks von der Anlagerung der Kolloide abhing. Es wurde zudem überprüft, ob sich die Analyse im Anti-Stokes-Bereich, in welchem die inelastische Streuung mit höherer Energie (Frequenz) als das einstrahlende Licht auftritt, eignete, um Fluoreszenz zu vermeiden. Hierzu wurden zunächst Proben untersucht, welche zusätzlich zu einer starken Fluoreszenz scharfe Raman-Signale besaßen. In allen drei Proben war zusätzlich zu etwaigen Raman-Signalen eine ausgeprägte Fluoreszenz im Anti-Stokes-Bereich zu erkennen. Weitere Analysen ergaben, dass die absolute Position des Fluoreszenzmaximums (relativ zur Wellenlänge) konstant blieb. Durch Analysen mit unterschiedlichen Anregungsenergien konnten zusätzlich Mehrphotonenprozesse als Ursache ausgeschlossen werden. Insgesamt konnte keine Eignung der Anti-Stokes-RM zur Fluoreszenzvermeidung festgestellt werden. Ebenfalls wurde überprüft, inwiefern sich die Hochtemperatur-RM, welche bei der Analyse von Rußen zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz führte, auch auf die künstlichen Huminsäuren angewandt werden konnte. Eine Abnahme des Hintergrundes konnte mit steigender Temperatur beobachtet werden, zusätzlich sank jedoch auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, was durch die Abnahme der Probenmenge durch Oxidation verursacht wurde.

Die Analyse der Huminsäuren mit hoher Laserleistung, welche zu einer Degradation der Fluorophore führte, lieferte reproduzierbare Ergebnisse innerhalb der Probe, wie auch über mehrere Ansätze verteilt. Durch die hohen Temperaturen kann es zusätzlich zu einer Änderung der Nanostruktur der Huminsäuren kommen, diese sind in der Bestimmung des Isotopengehaltes jedoch nur von untergeordneter Bedeutung. Die Kombination der Ergebnisse mit IRMS-Messungen lieferte eine Nachweisgrenze von  $8.0 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  über den gesamten Bereich, bzw.  $1.3 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bei Betrachtung der Werte bis  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . Die Bestimmungsgrenzen betragen  $2.2 \cdot 10^{-1} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  über den gesamten Bereich bzw.  $3.2 \cdot 10^{-2} \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$  bei Betrachtung der Werte bis  $0.25 \text{ }^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$ . NanoSIMS-Untersuchungen ergaben eine starke Streuung der Isotopenverhältnisse vor allem bei Proben mit höheren Anteilen an  $^{13}\text{C}$ . Inwiefern dies durch die Probe oder durch Matrix- und Streueffekte hervorgerufen wurde, bleibt Gegenstand weiterer Studien. Mit der Prägraphitisierung

konnte eine für die SIRM-Analytik von Bodenproben geeignete Methodik zu Fluoreszenzverringerng entwickelt werden.

In der Bodenkunde werden oftmals sogenannte physikalische Fraktionierungsmethoden zur Bestimmung der unterschiedlichen Anteile im Boden angewandt. Im Hinblick auf eine Erhöhung der Wasserrückhaltefähigkeit, wurden eine Fläche nach Zugabe von Holzkohle, sowie eine Kontrollfläche, mit zahlreichen Analysemethoden untersucht. In dieser Arbeit wurde überprüft, welche Aussagen durch die Verwendung der RM gewonnen werden können. Der Vergleich der Holzkohle vor dem Ausbringen auf das Feld mit der dem Feld nach einem Jahr entnommenen Holzkohle, zeigte eine Zunahme der strukturellen Ordnung in der verwitterten Kohle. Dies legte die Vermutung nahe, dass vor allem die ungeordneten, amorphen Anteile abgebaut und in das organische Bodenmaterial integriert wurden, wodurch die zurückbleibende verwitterte Holzkohle eine geordnetere Nanostruktur besaß. Die RM-Analyse der einzelnen Fraktionen nach Holzkohlezugabe ergab, mit Ausnahme eines etwas erhöhten amorphen Anteils in der Schluff- und Tonfraktion, keine Unterschiede in den Nanostrukturen. In den Fraktionen der Kontrollflächen konnten keinerlei Signale durch kohlenstoffhaltige Substanzen beobachtet werden. Es wurde daher von deutlich geringeren Mengen an organischer holzkohleartigen Bodensubstanz ausgegangen. Die CPMA-S-NMR-Spektroskopie zeigte eine deutlich veränderte Zusammensetzung der funktionellen Gruppen in den Fraktionen nach Holzkohlezugabe, während die RM-Ergebnisse für eine unveränderte Gesamtordnung der Nanostrukturen der Proben sprachen. Dies zeigte das Potential der RM, die bei der Analyse von organischen Bodensubstanzen ergänzende Informationen über die strukturelle Ordnung der Proben treffen kann. Da bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben kein Einfluss der Holzkohlezugabe auf die Wasserrückhaltefähigkeit beobachtet werden konnte, müssen in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, um verlässliche Aussagen zum Mechanismus zu erhalten.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse von Mikroplastik (MP). MP bezeichnet im generellen Kunststoffpartikel kleiner als 5 mm. Eine untere Größengrenze wurde bisher nicht einheitlich definiert. In dieser Arbeit wurde eine Grenze von 1 µm aus analytischer Sicht für sinnvoll befunden, da somit der vollständige Mikrometerbereich abgedeckt wurde. In den letzten Jahren rückte MP zunehmend in den Fokus des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses. Die Zahl an Veröffentlichungen zum Vorkommen von MP, dessen Aufnahme von Organismen und den daraus resultierenden Risiken, stieg folglich deutlich. Dennoch fehlt es vor allem im Binnenwasserbereich an umfangreichen, vergleichbaren Studien, die verlässliche Aussagen ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde daher am Fallbeispiel des Gardasees in Italien bestätigt, dass eine Belastung mit MP in einem bisher nicht vermuteten Umfang in limnischen Ökosystemen vorhanden ist. Es wurden zahlreiche MP-Partikel verschiedenster Größen

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

untersucht und deren Polymerzusammensetzung sowie etwaige enthaltene Pigmente mittels RM bestimmt. Partikel über 500  $\mu\text{m}$  wurden hierbei direkt analysiert, während die Evaluation kleinerer Partikel (1 – 500  $\mu\text{m}$ ) auf einem Filter stattfand. Aus Zeitgründen konnte hier nur ein Bereich des Filters analysiert werden. Zusätzlich zu MP wurden zahlreiche Partikel identifiziert, welche Pigmente aber keine nachweisbaren Mengen an Polymeren enthielten. Diese wurden als Mikropigmentpartikel (MPig) bezeichnet. Eine umfangreiche Analyse der gefundenen Partikel zeigte, dass die MP-Größenverteilung ein Maximum bei ca. 130  $\mu\text{m}$  besaß, während die Anzahl an MPig mit abnehmender Partikelgröße kontinuierlich zunahm. Die Polymerzusammensetzung der MP-Partikel hing von der Größe ab. Im Bereich größerer Partikel (500  $\mu\text{m}$  – 5 mm) wurden am häufigsten Polystyrol, Polyethylen und Polypropylen identifiziert, während bei kleineren Größen (1  $\mu\text{m}$  – 500  $\mu\text{m}$ ) neben Polyethylen auch Polyamide häufig aufzufinden waren. Die MPig-Zusammensetzung war über die Größenklassen in etwa konstant. Die Ergebnisse betonen, wie wichtig es ist, die Partikel <500  $\mu\text{m}$  in die Analyse von MP einzuschließen, da die meisten Partikel in diesem Größenbereich vorhanden sind und zusätzlich von einer Änderung der Polymerzusammensetzung ausgegangen werden kann. Die Bestimmung des Metallgehalts einiger (pigmentierter) Partikel mittels ICP-MS fand toxische Elemente wie Pb, Cd, Ba und Ni in teilweise für Wasserorganismen schädlichen Konzentrationen (z.B. Ba: 4.52 mg/g und Ni: 89.75  $\mu\text{g/g}$ ). Vergleiche mit frischen Referenzproben konnten zeigen, dass die Metalllast bereits bei der Produktion vorhanden war und nicht durch eine Anreicherung an der Partikeloberfläche im Ökosystem entstand. MP- und MPig-Partikel konnten somit als mögliche Eintragsquellen von Schwermetallen in aquatische Ökosysteme identifiziert werden. Anhand der Analyse von mit Polyvinylchlorid gefütterten Großen Wasserflöhen (*Daphnia magna*) konnte das Potential der RM zur *in situ*-Untersuchung von MP in Organismen untersucht werden. Neben einer Identifikation des PVC konnte auch die Machbarkeit einer dreidimensionalen Analyse der Verteilung des MPs im Gastrointestinaltrakt der Organismen gezeigt werden.

In einem weiteren Projekt wurde die RM-Analytik für die Untersuchung der MP-Aufnahme von Muscheln optimiert. Dazu wurde zunächst eine Aufschlussmethode für Muschelgewebe weiterentwickelt, nach für die RM geeigneten Filterarten gesucht, sowie notwendige Nachbehandlungen getestet. Die entwickelte Methode konnte anschließend erfolgreich auf Organismen angewandt werden, welchen im Labormaßstab PVC verabreicht wurde. Es wurde gezeigt, dass Muscheln Kunststoffpartikel aufnehmen können, welche zum Teil auch noch nach 4-wöchiger Hälterung in sauberem Wasser nachgewiesen werden konnten. Der in der Literatur beschriebene Trend, dass die Aufnahme mit Abnahme der Partikelgröße zunimmt, konnte bestätigt werden. Die Eignung der RM zur Identifikation von MP in Muscheln konnte auch in Realproben aus einer Kläranlage gezeigt werden. Im Gegensatz zur Kontrollprobe konnten hier einige MP-Partikel nachgewiesen werden, welche hauptsächlich aus PVC bestanden und kleiner als 50  $\mu\text{m}$  waren.

Die Evaluierung von kompostierbaren, bioabbaubaren und recycelten Kunststoffproben sollte zeigen, inwiefern sich diese als Alternativen zur MP-Vermeidung eignen. Die kompostierbaren Proben bestanden aus Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT), die bioabbaubaren aus Polylactid (PLA), Polyethylen (PE) oder Polystyrol (PS), während in den recycelten Proben ausschließlich PE identifiziert wurde. Bei den meisten Proben wurden schwermetallhaltige Pigmente nachgewiesen, vor allem das kupferhaltige Pigment Grün 7 (Polychlorkupferphthalocyanin). Die Untersuchung mittels ICP-MS ergab hohe Cu-Werte (bis zu 373.71 µg/g), welche jedoch für kompostierbare Proben unter dem gültigen Grenzwert lagen. Bei einer recycelten Probe wurden erhöhte Werte an Cu, Pb und Mo nachgewiesen, was eine Umweltgefährdung bei unsachgemäßer Entsorgung darstellen kann. Eine Entsorgung von als bioabbaubar gekennzeichnetem Kunststoffmüll auf den Biomüll kann durch eine unvollständige Zersetzung als Quelle für weitere PE- und PS-Partikel in der Umwelt dienen.

Die Untersuchung von Bier auf den Gehalt an synthetischen Fasern konnte die Befunde bisheriger Studien nicht bestätigen. Der Vergleich mit Kontrollproben zeigte keine statistisch signifikante Belastung des Bieres mit synthetischen Fasern. Es waren vergleichbare Mengen an Fasern in Probe und Kontrolle vorhanden, von denen die meisten als natürliche Cellulose identifiziert wurden. Trotz der Verwendung einer partikelarmen Umgebung können Kontaminationen aus der Luft nicht komplett ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig die Verwendung von Kontrollproben sowie einer geeigneten Identifikationsmethode ist, um richtige und belastbare Aussagen zum MP-Vorkommen treffen zu können. Vor allem im Falle von Fasern ist eine vollständige Vermeidung von Kontaminationen kaum möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit die RM für die Analyse der Stabilisotopenzusammensetzung von organischen Bodensubstanzen sowie Mikroplastik optimiert werden konnte. In weiteren Studien sollte die Anwendbarkeit der RM-Analyse auf mit Stabilisotopenmarkierten Realproben untersucht werden. Weiterhin sollten Studien zur Analyse von Bodenproben durchgeführt werden, bei denen eine Beeinflussung der Wasserrückhaltekapazität durch Kohlezugabe sichergestellt ist. Die erhaltenen Informationen können dann helfen, Aussagen über die an der Erhöhung der Wasserrückhaltefähigkeit beteiligten Mechanismen zu treffen und damit eine konstante landwirtschaftliche Produktivität, auch während Dürren, gewährleisten zu können.

Da die Analytik von MP ein relativ neues Forschungsgebiet darstellt, sollten zunächst Studien zur Harmonisierung und Standardisierung der Probennahme, Probenaufbereitung und Identifikation durchgeführt werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar sind. Des Weiteren ist eine Erweiterung der Analysen von MP aus unterschiedlichen Matrices wie Trinkwasser,

## *5. Zusammenfassung und Ausblick*

Süßwasser und Abwasser sinnvoll. Die Untersuchung von zusätzlichen Organismen kann weitere Aufschlüsse über die Umweltgefährdung durch MP sicherstellen.



# Literatur

- [1] Bericht der Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The state of food and agriculture, **2016**.
- [2] K. Schwabe, J. Albiac, J. D. Connor, R. Hassan, L. Meza-Gonzalez, „Introduction“ in *Drought in arid and semi-arid regions: A multi-disciplinary and cross-country perspective*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2013**, S. 1–21.
- [3] Bericht der World Health Organization and UNICEF, Progress on sanitation and drinking-water - 2014 update, **2014**.
- [4] Vereinte Nationen (UN), UN Resolution 64/292: The human right to water and sanitation, **2010**.
- [5] Bundesministerium für Gesundheit, TrinkwV2001: Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, **2001**.
- [6] G. Turrell, J. Corset, *Raman microscopy: developments and applications*, Academic Press, London, **1996**.
- [7] A. Smekal, Zur Quantentheorie der Dispersion, *Naturwissenschaften* **1923**, *11*, 873–875.
- [8] C. V. Raman, A new radiation, *Indian Journal of Physics* **1928**, *2*, 387–398.
- [9] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown, *Introductory Raman spectroscopy*, Academic Press, San Diego, **2003**.
- [10] R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*, (Hrsg.: J. Winefordner), Wiley-Interscience, New York, **2002**.
- [11] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*, John Wiley & Sons, Chichester, **2005**.
- [12] W. Otting, *Der Raman-Effekt und seine analytische Anwendung*, Springer-Verlag, Berlin, **1952**.
- [13] G. Landsberg, L. Mendelstam, Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Kristallen, *Naturwissenschaften* **1928**, *16*, 557–558.
- [14] T. H. Maiman, Stimulated optical radiation in ruby, *Nature* **1960**, 493–494.
- [15] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen-Geräte-Anwendungen*, (Hrsg.: R. Niessner), Springer-Verlag, Berlin, **2013**.
- [16] M. Delhaye, P. Dhamelincourt, Raman microprobe and microscope with laser excitation, *Journal of Raman Spectroscopy* **1975**, *3*, 33–43.
- [17] G. J. Puppels, W. Colier, J. H. F. Olminkhof, C. Otto, F. F. M. de Mul, J. Greve, Description and performance of a highly sensitive confocal Raman microspectrometer, *Journal of Raman Spectroscopy* **1991**, *22*, 217–225.

- [18] M. Born, E. Wolf, Principles of optics, *Nature* **1999**, 493–494.
- [19] D. S. Knight, W. B. White, Characterization of diamond films by Raman spectroscopy, *Journal of Materials Research* **1989**, *4*, 385–393.
- [20] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **2008**.
- [21] F. Tuinstra, J. L. Koenig, Raman spectrum of graphite, *The Journal of Chemical Physics* **1970**, *53*, 1126–1130.
- [22] A. C. Ferrari, J. Robertson, Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Physical Review B* **2000**, *61*, 14095–14107.
- [23] Y. Wang, D. C. Alsmeyer, R. L. McCreery, Raman spectroscopy of carbon materials: structural basis of observed spectra, *Chemistry of Materials* **1990**, *2*, 557–563.
- [24] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *American Association for the Advancement of Science* **2004**, *306*, 666–669.
- [25] A. C. Ferrari, J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth et al., Raman spectrum of graphene and graphene layers, *Physical Review Letters* **2006**, *97*, 187401–187404.
- [26] A. C. Ferrari, D. M. Basko, Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene, *Nature nanotechnology* **2013**, *8*, 235–246.
- [27] L. Malard, M. Pimenta, G. Dresselhaus, M. Dresselhaus, Raman spectroscopy in graphene, *Physics Reports* **2009**, *473*, 51–87.
- [28] A. Sadezky, H. Muckenhuber, H. Grothe, R. Niessner, U. Pöschl, Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information, *Carbon* **2005**, *43*, 1731–1742.
- [29] T. Jawhari, A. Roid, J. Casado, Raman spectroscopic characterization of some commercially available carbon black materials, *Carbon* **1995**, *33*, 1561–1565.
- [30] R. Al-Jishi, G. Dresselhaus, Lattice-dynamical model for graphite, *Physical Review B* **1982**, *26*, 4514–4522.
- [31] B. Dippel, H. Jander, J. Heintzenberg, NIR FT Raman spectroscopic study of flame soot, *Physical Chemistry Chemical Physics* **1999**, *1*, 4707–4712.
- [32] Y. Liu, C. Liu, J. Ma, Q. Ma, H. He, Structural and hygroscopic changes of soot during heterogeneous reaction with O<sup>3</sup>, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 10896–10903.

- [33] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2002**, *14*, R597–R624.
- [34] M. Fleischmann, P. Hendra, A. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 163–166.
- [35] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215–5217.
- [36] D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, Surface Raman spectroelectrochemistry, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1977**, *84*, 1–20.
- [37] M. Moskovits, Surface-Enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 485–496.
- [38] P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, *Basic electromagnetic theory of SERS*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [39] R. J. Brown, J. Wang, M. J. Milton, Electromagnetic modelling of Raman enhancement from nanoscale structures as a means to predict the efficacy of SERS substrates, *Journal of Nanomaterials* **2007**, 1–5.
- [40] A. Champion, P. Kambhampati, Surface-enhanced Raman scattering, *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 241–250.
- [41] J. W. Linnett, The force constants of some carbon-carbon bonds, *Transactions of the Faraday Society* **1941**, *37*, 469–473.
- [42] S. Fan, L. Liu, M. Liu, Monitoring the growth of carbon nanotubes by carbon isotope labelling, *Nanotechnology* **2003**, *14*, 1118–1123.
- [43] W. E. Huang, R. I. Griffiths, I. P. Thompson, M. J. Bailey, A. S. Whiteley, Raman microscopic analysis of single microbial cells, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 4452–4458.
- [44] P. Kubryk, J. S. Kölschbach, S. Marozava, T. Lueders, R. U. Meckenstock, R. Niessner, N. P. Ivleva, Exploring the potential of stable isotope (resonance) Raman microspectroscopy and surface-enhanced Raman scattering for the analysis of microorganisms at single cell level, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 6622–6630.
- [45] X. Li, W. Cai, L. Colombo, R. S. Ruoff, Evolution of graphene growth on Ni and Cu by carbon isotope labeling, *Nano Letters* **2009**, *9*, 4268–4272.
- [46] W. E. Huang, K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A. S. Whiteley, M. Wagner, Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function, *Environmental Microbiology* **2007**, *9*, 1878–1889.

- [47] M. Li, W. E. Huang, C. M. Gibson, P. W. Fowler, A. Jousset, Stable isotope probing and Raman spectroscopy for monitoring carbon flow in a food chain and revealing metabolic pathway, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 1642–1649.
- [48] B. R. Carvalho, Y. Hao, A. Righi, J. F. Rodriguez-Nieva, L. Colombo, R. S. Ruoff, M. A. Pimenta, C. Fantini, Probing carbon isotope effects on the Raman spectra of graphene with different  $^{13}\text{C}$  concentrations, *Physical Reviews B* **2015**, *92*, 125406-1–125406-5.
- [49] C. Zhang, Q. Li, B. Tian, Z. Huang, W. Lin, H. Li, D. He, Y. Zhou, W. Cai, Isotope effect of the phonons mean free path in graphene by micro-Raman measurement, *Science China Physics Mechanics & Astronomy* **2014**, *57*, 1817–1821.
- [50] O. Frank, L. Kavan, M. Kalbac, Carbon isotope labelling in graphene research, *Nanoscale* **2014**, *6*, 6363–6370.
- [51] S. Haider, M. Wagner, M. C. Schmid, B. S. Sixt, J. G. Christian, G. Häcker, P. Pichler, K. Mechtler, A. Müller, C. Baranyi et al., Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of chlamydiae, *Molecular Microbiology* **2010**, *77*, 687–700.
- [52] M. Li, P. C. Ashok, K. Dholakia, W. E. Huang, Raman-activated cell counting for profiling carbon dioxide fixing microorganisms, *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 6560–6563.
- [53] H. Noothalapati, S. Shigeto, Exploring metabolic pathways in vivo by a combined approach of mixed stable isotope-labeled Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 7828–7834.
- [54] P. Kubryk, R. Niessner, N. P. Ivleva, The origin of the band at around  $730\text{ cm}^{-1}$  in the SERS spectra of bacteria: a stable isotope approach, *Analyst* **2016**, *141*, 2874–2878.
- [55] M. Kalbac, O. Lehtinen, A. V. Krashennnikov, J. Keinonen, Ion-irradiation-induced defects in isotopically-labeled two layered graphene: enhanced in-situ annealing of the damage, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 1004–1009.
- [56] M. Kalbac, J. Kong, M. S. Dresselhaus, Raman spectroscopy as a tool to address individual graphene layers in few-layer graphene, *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 19046–19050.
- [57] M. Kalbac, O. Frank, L. Kavan, Effects of heat treatment on Raman spectra of two-layer  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  graphene, *Chemistry–A European Journal* **2012**, *18*, 13877–13884.

- [58] L. Liu, S. Fan, Isotope labeling of carbon nanotubes and formation of  $^{12}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  nanotube junctions, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 11502–11503.
- [59] M. H. Rümmele, M. Löffler, C. Kramberger, F. Simon, F. Fülöp, O. Jost, R. Schönfelder, A. Grüneis, T. Gemming, W. Pompe et al., Isotope-engineered single-wall carbon nanotubes; A key material for magnetic studies, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 4094–4098.
- [60] Z. Liu, X. Li, S. M. Tabakman, K. Jiang, S. Fan, H. Dai, Multiplexed multicolor Raman imaging of live cells with isotopically modified single walled carbon nanotubes, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13540–13541.
- [61] H.-P. Blume, G. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, K. Stahr, B.-M. Wilke, S. Thiele-Bruhn, G. Welp, „Organische Bodensubstanz“ in *Lehrbuch der Bodenkunde*, (Hrsg.: H.-P. Blume, G. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, K. Stahr, B.-M. Wilke), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**, S. 51–81.
- [62] J. M. Oades, The retention of organic matter in soils, *Biogeochemistry* **1988**, *5*, 35–70.
- [63] I. Kögel-Knabner, The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter, *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, *34*, 139–162.
- [64] M. v. Lützw, I. Kögel-Knabner, K. Ekschmitt, E. Matzner, G. Guggenberger, B. Marschner, H. Flessa, Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review, *European Journal of Soil Science* **2006**, *57*, 426–445.
- [65] I. Kögel-Knabner, G. Guggenberger, M. Kleber, E. Kandeler, K. Kalbitz, S. Scheu, K. Eusterhues, P. Leinweber, Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2008**, *171*, 61–82.
- [66] D. Rowell, „Organische Bodensubstanz“ in *Bodenkunde: Untersuchungsmethoden und ihre Anwendungen*, (Hrsg.: D. Rowell), Springer, Berlin, **1997**, S. 61–98.
- [67] T. G. Huntington, „Available Water Capacity and Soil Organic Matter“ in *Encyclopedia of Soil Science*, hrsg. von W. Chesworth, Taylor & Francis, Dordrecht, **2007**, S. 139–143.
- [68] R. J. Haynes, R. Naidu, Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review, *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **1998**, *51*, 123–137.

- [69] R. Haynes, M. Beare, „Aggregation and organic matter storage in mesothermal, humid soils“ in *Structure and organic matter storage in agricultural soils*, hrsg. von M. R. Carter, B. A. Stewart, CRC Press, Boca Raton, **1996**, S. 213–262.
- [70] J. Lehmann, J. Gaunt, M. Rondon, Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – A review, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* **2006**, *11*, 395–419.
- [71] S. Jeffery, F. G. A. Verheijen, M. van der Velde, A. C. Bastos, A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis, *Agriculture Ecosystems & Environment* **2011**, *144*, 175–187.
- [72] I. Kögel-Knabner, NMR in Soil Science  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies, *Geoderma* **1997**, *80*, 243–270.
- [73] N. Mahieu, E. Randall, D. Powlson, Statistical analysis of published carbon-13 CPMAS NMR spectra of soil organic matter, *Soil Science Society of America Journal* **1999**, *63*, 307–319.
- [74] I. Kögel-Knabner, Analytical approaches for characterizing soil organic matter, *Organic Geochemistry* **2000**, *31*, 609–625.
- [75] B. T. Christensen, Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover, *European Journal of Soil Science* **2001**, *52*, 345–353.
- [76] A. Kölbl, I. Kögel-Knabner, Content and composition of free and occluded particulate organic matter in a differently textured arable Cambisol as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2004**, *167*, 45–53.
- [77] K. Heister, C. Hoeschen, G. J. Pronk, C. W. Mueller, I. Kögel-Knabner, NanoSIMS as a tool for characterizing soil model compounds and organomineral associations in artificial soils, *Journal of Soils and Sediments* **2012**, *12*, 35–47.
- [78] C. W. Mueller, A. Kölbl, C. Hoeschen, F. Hillion, K. Heister, A. M. Herrmann, I. Kögel-Knabner, Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using NanoSIMS – From single particles to intact aggregates, *Organic Geochemistry* **2012**, *42*, 1476–1488.
- [79] C. W. Mueller, P. K. Weber, M. R. Kilburn, C. Hoeschen, M. Kleber, J. Pett-Ridge, Advances in the analysis of biogeochemical interfaces: NanoSIMS to investigate soil microenvironments, *Advances in Agronomy* **2013**, *121*, 1–46.
- [80] J. Ribeiro-Soares, L. G. Caçado, N. P. S. Falcão, E. H. Martins Ferreira, C. A. Achete, A. Jorio, The use of Raman spectroscopy to characterize the carbon materials found in Amazonian anthrosoils, *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44*, 283–289.

- [81] S. Yamauchi, Y. Kurimoto, Raman spectroscopic study on pyrolyzed wood and bark of Japanese cedar: temperature dependence of Raman parameters, *Journal of Wood Science* **2003**, *49*, 235–240.
- [82] O. Francioso, C. Ciavatta, S. Sánchez-Cortés, V. Tugnoli, L. Sitti, C. Gessa, Spectroscopic characterization of soil organic matter in long-term amendment trials, *Soil Science* **2000**, *165*, 495–504.
- [83] Z. Xing, C. Du, K. Tian, F. Ma, Y. Shen, J. Zhou, Application of FTIR-PAS and Raman spectroscopies for the determination of organic matter in farmland soils, *Talanta* **2016**, *158*, 262–269.
- [84] Z. Xing, C. Du, Y. Zeng, F. Ma, J. Zhou, Characterizing typical farmland soils in China using Raman spectroscopy, *Geoderma* **2016**, *268*, 147–155.
- [85] Y. Yang, H. A. Chase, Applications of Raman and surface-enhanced Raman scattering techniques to humic substances, *Spectroscopy Letters* **1998**, *31*, 821–848.
- [86] Y.-H. Yang, T. Wang, Fourier transform Raman spectroscopic characterization of humic substances, *Vibrational Spectroscopy* **1997**, *14*, 105–112.
- [87] E. Vogel, R. Geßner, M. H. B. Hayes, W. Kiefer, Characterisation of humic acid by means of SERS, *Journal of Molecular Structure* **1999**, *482–483*, 195–199.
- [88] G. Corrado, S. Sanchez-Cortes, O. Francioso, J. V. Garcia-Ramos, Surface-enhanced Raman and fluorescence joint analysis of soil humic acids, *Analytica Chimica Acta* **2008**, *616*, 69–77.
- [89] P. Carletti, M. L. Roldán, O. Francioso, S. Nardi, S. Sanchez-Cortes, Structural characterization of humic-like substances with conventional and surface-enhanced spectroscopic techniques, *Journal of Molecular Structure* **2010**, *982*, 169–175.
- [90] „Kunststoff“ auf Duden online, <http://www.duden.de/rechtschreibung/Kunststoff>, zuletzt aufgerufen am 12.12.2016.
- [91] PlasticsEurope, Plastics The Facts 2014/2015: an analysis of European plastics production, demand and waste data, <http://www.plastics-europe.org/Document/plastics-the-facts-2015.aspx?FolID=2>, zuletzt aufgerufen am 27.01.2016.
- [92] J. A. Ivar do Sul, M. F. Costa, The present and future of microplastic pollution in the marine environment, *Environmental Pollution* **2014**, *185*, 352–364.
- [93] M. R. Gregory, Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **2009**, *364*, 2013–2025.

- [94] E. L. Teuten, J. M. Saquing, D. R. U. Knappe, M. A. Barlaz, S. Jonsson, A. Bjorn, S. J. Rowland, R. C. Thompson, T. S. Galloway, R. Yamashita et al., Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife, *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **2009**, *364*, 2027–2045.
- [95] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, T. S. Galloway, Microplastics as contaminants in the marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62*, 2588–2597.
- [96] D. Eerkes-Medrano, R. C. Thompson, D. C. Aldridge, Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs, *Water Research* **2015**, *75*, 63–82.
- [97] R. Dris, H. Imhof, W. Sanchez, J. Gasperi, F. Galgani, B. Tassin, C. Laforsch, Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-)plastic particles, *Environmental Chemistry* **2015**, *12*, 539–550.
- [98] E. R. Graham, J. T. Thompson, Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2009**, *368*, 22–29.
- [99] P. G. Ryan, C. J. Moore, J. A. van Franeker, C. L. Moloney, Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, *364*, 1999–2012.
- [100] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson, Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks, *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 9175–9179.
- [101] V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R. C. Thompson, M. Thiel, Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification, *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, 3060–3075.
- [102] A. Stolte, S. Forster, G. Gerdtz, H. Schubert, Microplastic concentrations in beach sediments along the German Baltic coast, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *99*, 216–229.
- [103] H. K. Imhof, N. P. Ivleva, J. Schmid, R. Niessner, C. Laforsch, Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles, *Current Biology* **2013**, *23*, R867–R868.
- [104] D. A. Cooper, P. L. Corcoran, Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii, *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60*, 650–654.
- [105] P. L. Corcoran, M. C. Biesinger, M. Grifi, Plastics and beaches: A degrading relationship, *Marine Pollution Bulletin* **2009**, *58*, 80–84.



- [106] A. Turner, L. Holmes, Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean), *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62*, 377–381.
- [107] R. C. Thompson, Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. G. John, D. McGonigle, A. E. Russell, Lost at Sea: Where is all the plastic?, *American Association for the Advancement of Science* **2004**, *304*, 838–838.
- [108] M. Zbyszewski, P. Corcoran, Distribution and degradation of fresh water plastic particles along the beaches of Lake Huron, Canada, *Water Air & Soil Pollution* **2011**, *220*, 365–372.
- [109] F. Galgani, G. Hanke, S. Werner, L. Oosterbaan, P. Nilsson, D. Fleet, S. Kinsey, R. Thompson, J. Van Franeker, T. Vlachogianni et al., Monitoring guidance for marine litter in European seas, MFSD Leitline, **2013**.
- [110] M. A. Browne, T. S. Galloway, R. C. Thompson, Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines, *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, 3404–3409.
- [111] M. Claessens, S. D. Meester, L. V. Landuyt, K. D. Clerck, C. R. Janssen, Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast, *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62*, 2199–2204.
- [112] D. Lithner, A. Larsson, G. Dave, Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition, *Science of the Total Environment* **2011**, *409*, 3309–3324.
- [113] H. K. Imhof, J. Schmid, R. Niessner, N. P. Ivleva, C. Laforsch, A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments, *Limnology and Oceanography-Methods* **2012**, *10*, 524–537.
- [114] M.-T. Nuelle, J. H. Dekiff, D. Remy, E. Fries, A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments, *Environmental Pollution* **2014**, *184*, 161–169.
- [115] H. K. Imhof, C. Laforsch, A. C. Wiesheu, J. Schmid, P. M. Anger, R. Niessner, N. P. Ivleva, Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes, *Water Research* **2016**, *98*, 64–74.
- [116] N. P. Ivleva, A. C. Wiesheu, R. Niessner, Microplastic in aquatic ecosystems, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *7*, 1720–1739.
- [117] E. Fries, J. H. Dekiff, J. Willmeyer, M.-T. Nuelle, M. Ebert, D. Remy, Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy, *Environmental Science: Processes & Impacts* **2013**, *15*, 1949–1956.

- [118] M. Claessens, L. Van Cauwenberghe, M. B. Vandegehuchte, C. R. Janssen, New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms, *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *70*, 227–233.
- [119] A. S. Tagg, M. Sapp, J. P. Harrison, J. J. Ojeda, Identification and quantification of microplastics in wastewater using focal plane array-based reflectance micro-FTIR imaging, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 6032–6040.
- [120] K. Enders, R. Lenz, C. A. Stedmon, T. G. Nielsen, Abundance, size and polymer composition of marine microplastics 10 µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *100*, 70–81.
- [121] R. Lenz, K. Enders, C. A. Stedmon, D. M. A. Mackenzie, T. G. Nielsen, A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *100*, 82–91.
- [122] M. J. Löder, G. Gerdts, „Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal“ in *Marine Anthropogenic Litter*, (Hrsg.: M. Bergmann, L. Gutow, M. Klages), Springer International Publishing, Cham, **2015**, S. 201–227.
- [123] M. G. J. Löder, M. Kuczera, S. Mintenig, C. Lorenz, G. Gerdts, Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples, *Environmental Chemistry* **2015**, *12*, 563–581.
- [124] M. Cole, H. Webb, P. K. Lindeque, E. S. Fileman, C. Halsband, T. S. Galloway, Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms, *Scientific Reports* **2014**, *4*, 4528.
- [125] J. H. Dekiff, D. Remy, J. Klasmeyer, E. Fries, Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney, *Environmental Pollution* **2014**, *186*, 248–256.
- [126] M. Eriksen, S. Mason, S. Wilson, C. Box, A. Zellers, W. Edwards, H. Farley, S. Amato, Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes, *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *77*, 177–182.
- [127] F. Remy, F. Collard, B. Gilbert, P. Compère, G. Eppe, G. Lepoint, When microplastic is not plastic: The ingestion of artificial cellulose fibers by macrofauna living in seagrass Macrophytodetritus, *Environmental Science & Technology* **2015**, *49*, 11158–11166.
- [128] Y. K. Song, S. H. Hong, M. Jang, G. M. Han, M. Rani, J. Lee, W. J. Shim, A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *93*, 202–209.

- [129] G. Liebezeit, E. Liebezeit, Synthetic particles as contaminants in German beers, *Food Additives & Contaminants: Part A* **2014**, *31*, 1574–1578.
- [130] M. R. Gregory, Accumulation and distribution of virgin plastic granules on New Zealand beaches, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **1978**, *12*, 399–414.
- [131] A. K ppler, F. Windrich, M. L der, M. Malanin, D. Fischer, M. Labrenz, K.-J. Eichhorn, B. Voit, Identification of microplastics by FTIR and Raman microscopy: a novel silicon filter substrate opens the important spectral range below 1300 cm<sup>-1</sup> for FTIR transmission measurements, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 6791–6801.
- [132] A. Vianello, A. Boldrin, P. Guerriero, V. Moschino, R. Rella, A. Sturaro, L. Da Ros, Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification, *Estuarine Coastal and Shelf Science* **2013**, *130*, 54–61.
- [133] J. P. Harrison, J. J. Ojeda, M. E. Romero-Gonzalez, The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments, *Science of the Total Environment* **2012**, *416*, 455–463.
- [134] I. W. Levin, R. Bhargava, Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: Integrating microscopy and molecular recognition, *Annual Review of Physical Chemistry* **2005**, *56*, 429–474.
- [135] R. Salzer, H. Siesler, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2014**.
- [136] A. K ppler, D. Fischer, S. Oberbeckmann, G. Schernewski, M. Labrenz, K.-J. Eichhorn, B. Voit, Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 8377–8391.
- [137] L. Van Cauwenberghe, A. Vanreusel, J. Mees, C. R. Janssen, Microplastic pollution in deep-sea sediments, *Environmental Pollution* **2013**, *182*, 495–499.
- [138] D. Fabbri, Use of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry to study environmental pollution caused by synthetic polymers: a case study: the Ravenna Lagoon, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2001**, *58–59*, 361–370.
- [139] E. Duemichen, U. Braun, R. Senz, G. Fabian, H. Sturm, Assessment of a new method for the analysis of decomposition gases of polymers by a combining thermogravimetric solid-phase extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **2014**, *1354*, 117–128.

- [140] E. Dümichen, A.-K. Barthel, U. Braun, C. G. Bannick, K. Brand, M. Jekel, R. Senz, Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method, *Water Research* **2015**, *85*, 451–457.
- [141] F. Murray, P. R. Cowie, Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758), *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62*, 1207–1217.
- [142] C. M. Boerger, G. L. Lattin, S. L. Moore, C. J. Moore, Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre, *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60*, 2275–2278.
- [143] F. Collard, B. Gilbert, G. Eppe, E. Parmentier, K. Das, Detection of anthropogenic particles in fish stomachs: An isolation method adapted to identification by Raman spectroscopy, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2015**, *69*, 331–339.
- [144] E. J. Carpenter, J. Smith, K. L., Plastics on the Sargasso sea surface, *American Association for the Advancement of Science* **1972**, *175*, 1240–1241.
- [145] E. J. Carpenter, S. J. Anderson, G. R. Harvey, H. P. Miklas, B. B. Peck, Polystyrene spherules in coastal waters, *American Association for the Advancement of Science* **1972**, *178*, 749–750.
- [146] J. B. Buchanan, Pollution by synthetic fibres, *Marine Pollution Bulletin* **1971**, *2*, 23.
- [147] M. R. Gregory, Plastic pellets on New Zealand beaches, *Marine Pollution Bulletin* **1977**, *8*, 82–84.
- [148] J. G. Shiber, Plastic pellets on the coast of Lebanon, *Marine Pollution Bulletin* **1979**, *10*, 28–30.
- [149] P. G. Ryan, The characteristics and distribution of plastic particles at the sea-surface off the southwestern Cape Province, South Africa, *Marine Environmental Research* **1988**, *25*, 249–273.
- [150] H. K. Khordagui, A. H. Abu-Hilal, Industrial plastic on the southern beaches of the Arabian Gulf and the western beaches of the Gulf of Oman, *Environmental Pollution* **1994**, *84*, 325–327.
- [151] D. G. Shaw, R. H. Day, Colour- and form-dependent loss of plastic microdebris from the North Pacific Ocean, *Marine Pollution Bulletin* **1994**, *28*, 39–43.
- [152] C. J. Moore, S. L. Moore, M. K. Leecaster, S. B. Weisberg, A comparison of plastic and plankton in the North Pacific Central Gyre, *Marine Pollution Bulletin* **2001**, *42*, 1297–1300.

- [153] C. J. Moore, S. L. Moore, S. B. Weisberg, G. L. Lattin, A. F. Zellers, A comparison of neustonic plastic and zooplankton abundance in southern California's coastal waters, *Marine Pollution Bulletin* **2002**, *44*, 1035–1038.
- [154] K. L. Law, S. Morét-Ferguson, N. A. Maximenko, G. Proskurowski, E. E. Peacock, J. Hafner, C. M. Reddy, Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre, *American Association for the Advancement of Science* **2010**, *329*, 1185–1188.
- [155] T. Kukulka, G. Proskurowski, S. Morét-Ferguson, D. W. Meyer, K. L. Law, The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris, *Geophysical Research Letters* **2012**, *39*, L07601.
- [156] D. K. A. Barnes, F. Galgani, R. C. Thompson, M. Barlaz, Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **2009**, *364*, 1985–1998.
- [157] R. W. Obbard, S. Sadri, Y. Q. Wong, A. A. Khitun, I. Baker, R. C. Thompson, Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice, *Earth's Future* **2014**, *2*, 315–320.
- [158] F. Faure, M. Corbaz, H. Baecher, L. de Alencastro, Pollution due to plastics and microplastics in Lake Geneva and in the Mediterranean Sea, *Journal of Archaeological Science* **2012**, *65*, 157–164.
- [159] F. Faure, C. Saini, G. Potter, F. Galgani, L. F. Alencastro, P. Hagmann, An evaluation of surface micro- and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea, *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, *22*, 12190–12197.
- [160] C. M. Free, O. P. Jensen, S. A. Mason, M. Eriksen, N. J. Williamson, B. Boldgiv, High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake, *Marine Pollution Bulletin* **2014**, *85*, 156–163.
- [161] A. Lechner, H. Keckeis, F. Lumesberger-Loisl, B. Zens, R. Krusch, M. Tritthart, M. Glas, E. Schludermann, The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river, *Environmental Pollution* **2014**, *188*, 177–181.
- [162] S. Klein, E. Worch, T. P. Knepper, Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-Main Area in Germany, *Environmental Science & Technology* **2015**, *49*, 6070–6076.
- [163] C. Moore, G. Lattin, A. Zellers, Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California, *Journal of Integrated Coastal Zone Management* **2011**, *11*, 65–73.

- [164] L. T. Yonkos, E. A. Friedel, A. C. Perez-Reyes, S. Ghosal, C. D. Arthur, Microplastics in four estuarine rivers in the Chesapeake Bay, USA, *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 14195–14202.
- [165] R. A. Castañeda, S. Avlijas, M. A. Simard, A. Ricciardi, Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **2014**, *71*, 1767–1771.
- [166] S. Rech, V. Macaya-Caquilpán, J. F. Pantoja, M. M. Rivadeneira, D. Jofre Madariaga, M. Thiel, Rivers as a source of marine litter – A study from the SE Pacific, *Marine Pollution Bulletin* **2014**, *82*, 66–75.
- [167] M. Wagner, C. Scherer, D. Alvarez-Munoz, N. Brennholt, X. Bourrain, S. Buchinger, E. Fries, C. Grosbois, J. Klasmeier, T. Marti et al., Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know, *Environmental Sciences Europe* **2014**, *26*, 12.
- [168] J. G. B. Derraik, The pollution of the marine environment by plastic debris: A review, *Marine Pollution Bulletin* **2002**, *44*, 842–852.
- [169] A. L. Andrady, Microplastics in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62*, 1596–1605.
- [170] K. Mattsson, L.-A. Hansson, T. Cedervall, Nano-plastics in the aquatic environment, *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2015**, *17*, 1712–1721.
- [171] A. A. Detzel, B. Kauertz, C. Derreza-Greeven, Untersuchung der Umweltwirkungen von Verpackungen aus biologisch abbaubaren Kunststoffen, (Hrsg.: Umweltbundesamt), <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/untersuchung-umweltwirkungen-von-verpackungen-aus>, zuletzt aufgerufen am 27.01.2016, **2012**.
- [172] Deutsches Institut für Normung, DIN EN ISO 14855-1: Bestimmung der vollständigen aeroben Bioabbaubarkeit von Kunststoff-Materialien unter den Bedingungen kontrollierter Kompostierung – Verfahren mittels Analyse des freigesetzten Kohlenstoffdioxides – Teil 1: Allgemeines Verfahren, **2013**.
- [173] Deutsches Institut für Normung, DIN EN 13432: Verpackung - Anforderungen an die Verwertung von Verpackungen durch Kompostierung und biologischen Abbau - Prüfschema und Bewertungskriterien für die Einstufung von Verpackungen, **2000**.
- [174] Deutsches Institut für Normung, DIN EN 14995: Kunststoffe - Bewertung der Kompostierbarkeit - Prüfschema und Spezifikationen, **2007**.
- [175] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. vom Saal, S. H. Swan, Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **2009**, *364*, 2153–2166.

- [176] E. Besseling, E. M. Foekema, J. A. Van Franeker, M. F. Leopold, S. Kühn, E. L. Bravo Rebolledo, E. Heße, L. Mielke, J. Ijzer, P. Kamminga et al., Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *95*, 248–252.
- [177] M. A. Browne, A. Dissanayake, T. S. Galloway, D. M. Lowe, R. C. Thompson, Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.) *Environmental Science & Technology* **2008**, *42*, 5026–5031.
- [178] L. Van Cauwenberghe, C. R. Janssen, Microplastics in bivalves cultured for human consumption, *Environmental Pollution* **2014**, *193*, 65–70.
- [179] H. Braid, J. Deeds, S. DeGrasse, J. Wilson, J. Osborne, R. Hanner, Preying on commercial fisheries and accumulating paralytic shellfish toxins: a dietary analysis of invasive *Dosidicus gigas* (Cephalopoda Ommastrephidae) stranded in Pacific Canada, *Marine Biology* **2012**, *159*, 25–31.
- [180] P. Farrell, K. Nelson, Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.) *Environmental Pollution* **2013**, *177*, 1–3.
- [181] M. Cole, P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband, R. Goodhead, J. Moger, T. S. Galloway, Microplastic ingestion by zooplankton, *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, 6646–6655.
- [182] A. Ugolini, G. Ungherese, M. Ciofini, A. Lapucci, M. Camaiti, Microplastic debris in sandhoppers, *Estuarine Coastal and Shelf Science* **2013**, *129*, 19–22.
- [183] J. Ramos, M. Barletta, M. F. Costa, Ingestion of nylon threads by Gerreidae while using a tropical estuary as foraging grounds, *Aquatic Biology* **2012**, *17*, 29–34.
- [184] J. F. Provencher, A. J. Gaston, M. L. Mallory, Evidence for increased ingestion of plastics by northern fulmars (*Fulmarus glacialis*) in the Canadian Arctic, *Marine Pollution Bulletin* **2009**, *58*, 1092–1095.
- [185] J. A. van Franeker, C. Blaize, J. Danielsen, K. Fairclough, J. Gollan, N. Guse, P.-L. Hansen, M. Heubeck, J.-K. Jensen, G. Le Guillou et al., Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea, *Environmental Pollution* **2011**, *159*, 2609–2615.
- [186] V. A. Lindborg, J. F. Ledbetter, J. M. Walat, C. Moffett, Plastic consumption and diet of Glaucous-winged Gulls (*Larus glaucescens*), *Marine Pollution Bulletin* **2012**, *64*, 2351–2356.
- [187] M. C. Fossi, C. Panti, C. Guerranti, D. Coppola, M. Giannetti, L. Marsili, R. Minutoli, Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*), *Marine Pollution Bulletin* **2012**, *64*, 2374–2379.

- [188] C. Eriksson, H. Burton, Origins and biological accumulation of small plastic particles in fur seals from Macquarie Island, *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **2003**, *32*, 380–384.
- [189] E. L. Bravo Rebolledo, J. A. Van Franeker, O. E. Jansen, S. M. J. M. Brasseur, Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands, *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *67*, 200–202.
- [190] S. L. Wright, R. C. Thompson, T. S. Galloway, The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review, *Environmental Pollution* **2013**, *178*, 483–492.
- [191] S. C. Gall, R. C. Thompson, The impact of debris on marine life, *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *92*, 170–179.
- [192] J. C. Antunes, J. G. L. Frias, A. C. Micaelo, P. Sobral, Resin pellets from beaches of the Portuguese coast and adsorbed persistent organic pollutants, *Estuarine Coastal and Shelf Science* **2013**, *130*, 62–69.
- [193] A. Bakir, S. J. Rowland, R. C. Thompson, Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions, *Environmental Pollution* **2014**, *185*, 16–23.
- [194] K. Ashton, L. Holmes, A. Turner, Association of metals with plastic production pellets in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60*, 2050–2055.
- [195] M. Fisner, S. Taniguchi, A. P. Majer, M. C. Bicego, A. Turra, Concentration and composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: Implications for small-scale diagnostic and environmental monitoring, *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *76*, 349–354.
- [196] E. Fries, C. Zarfl, Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE), *Environmental Science and Pollution Research* **2012**, *19*, 1296–1304.
- [197] C. M. Rochman, M. A. Browne, B. S. Halpern, B. T. Hentschel, E. Hoh, H. K. Karapanagioti, L. M. Rios-Mendoza, H. Takada, S. Teh, R. C. Thompson, Classify plastic waste as hazardous, *Nature* **2013**, *494*, 169–171.
- [198] A. A. Koelmans, E. Besseling, A. Wegner, E. M. Foekema, Plastic as a Carrier of POPs to Aquatic Organisms: A Model Analysis, *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, 7812–7820.
- [199] D. Herzke, T. Anker-Nilssen, T. H. Nøst, A. Götsch, S. Christensen-Dalsgaard, M. Langset, K. Fangel, A. A. Koelmans, Negligible impact of ingested microplastics on tissue concentrations of persistent organic pollutants in northern fulmars off coastal Norway, *Environmental Science & Technology* **2016**, *50*, 1924–1933.



- [200] E. R. Zettler, T. J. Mincer, L. A. Amaral-Zettler, Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris, *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, 7137–7146.
- [201] K. Kumada, On artificial humic acids, *Soil Science and Plant Nutrition* **1956**, *2*, 106–111.
- [202] M. Hayakawa, H. Nonomura, Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes, *Journal of Fermentation Technology* **1987**, *65*, 609–616.
- [203] N. Leopold, B. Lendl, A New method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723–5727.
- [204] M. Knauer, N. P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch, Optimized surface-enhanced Raman scattering (SERS) colloids for the characterization of microorganisms, *Analytical Sciences* **2010**, *26*, 761–766.
- [205] Deutsches Institut für Normung, DIN 32645: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, **2008**.
- [206] Z. Muccio, G. P. Jackson, Isotope ratio mass spectrometry, *Analyst* **2009**, *134*, 213–222.
- [207] W. Meier-Augenstein, H. F. Kemp, „Stable Isotope Analysis: General Principles and Limitations“ in *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*, John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, **2009**.
- [208] L. Polerecky, B. Adam, J. Milucka, N. Musat, T. Vagner, M. M. M. Kuypers, Look@NanoSIMS – a tool for the analysis of nanoSIMS data in environmental microbiology, *Environmental Microbiology* **2012**, *14*, 1009–1023.
- [209] A. M. Herrmann, K. Ritz, N. Nunan, P. L. Clode, J. Pett-Ridge, M. R. Kilburn, D. V. Murphy, A. G. O’Donnell, E. A. Stockdale, Nano-scale secondary ion mass spectrometry – A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article, *Soil Biology and Biochemistry* **2007**, *39*, 1835–1850.
- [210] C. W. Mueller, N. Brüggemann, K. Pritsch, G. Stoelken, S. Gayler, J. B. Winkler, I. Kögel-Knabner, Initial differentiation of vertical soil organic matter distribution and composition under juvenile beech (*Fagus sylvatica* L.) trees, *Plant and Soil* **2009**, *323*, 111–123.
- [211] M. W. I. Schmidt, C. Rumpel, I. Kögel-Knabner, Evaluation of an ultrasonic dispersion procedure to isolate primary organomineral complexes from soils, *European Journal of Soil Science* **1999**, *50*, 87–94.

- [212] W. Amelung, W. Zech, Minimisation of organic matter disruption during particle-size fractionation of grassland epipedons, *Geoderma* **1999**, *92*, 73–85.
- [213] D. Magni, N. Chinaglia, A. Maffiotti, P. Borasi, L. and Lefebvre, D. Zanella, *Alpine Lakes. A Common Approach to the Characterization of Lakes and Their Chatchment Area*, JTS Alpine Space, **2008**.
- [214] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, C. E. Taylor, Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, *Analytical Chemistry* **1980**, *52*, 2283–2289.
- [215] R. Withnall, B. Z. Chowdhry, J. Silver, H. G. Edwards, L. F. de Oliveira, Raman spectra of carotenoids in natural products, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2003**, *59*, 2207–2212.
- [216] J. Green, Carotenoids in Daphnia, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **1957**, *147*, 392–401.
- [217] F. Rager, Durchführung eines Expositionsversuchs mit Muscheln und Entwicklung einer Probenaufbereitungsmethode für die Analyse von Mikroplastik mittels Raman-Mikrospektroskopie, Bachelorarbeit, München, **2015**.
- [218] M. Mathlouthi, D. Vinh Luu, Laser-Raman spectra of D-glucose and sucrose in aqueous solution, *Carbohydrate Research* **1980**, *81*, 203–212.
- [219] R. Keuleers, H. O. Desseyn, B. Rousseau, C. Van Alsenoy, Vibrational analysis of urea, *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 4621–4630.
- [220] J. S. Ribeiro, S. S. Ok, S. Garrigues, M. de la Guardia, FTIR tentative characterization of humic acids extracted from organic materials, *Spectroscopy Letters* **2001**, *34*, 179–190.
- [221] S. Kumazaki, Anti-Stokes fluorescence of oxazine 1 in solution with continuous wave laser excitation at 785 nm, *Chemical Physics* **2013**, *419*, 107–112.
- [222] F. Auzel, Multiphonon-assisted anti-Stokes and Stokes fluorescence of triply ionized rare-earth ions, *Physical Review B* **1976**, *13*, 2809–2817.
- [223] A. Rayner, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, Condensed-phase optical refrigeration, *Journal of the Optical Society of America B* **2003**, *20*, 1037–1053.
- [224] R. K. Jain, C. Hu, T. K. Gustafson, S. S. Elliot, M. S. Chang, Absorption processes associated with anti-Stokes fluorescence in rhodamine B solutions, *Journal of Applied Physics* **1973**, *44*, 3157–3161.

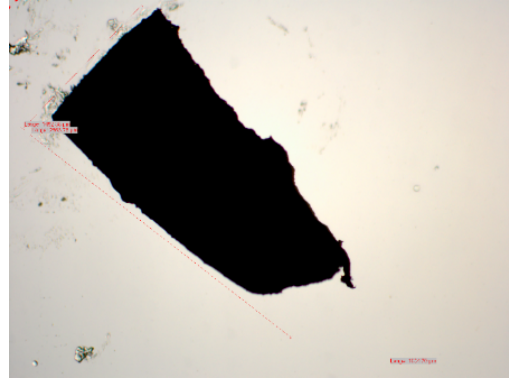
- [225] M. Ess, D. Ferry, E. Kireeva, R. Niessner, F.-X. Ouf, N. Ivleva, In situ Raman microspectroscopic analysis of soot samples with different organic carbon content: Structural changes during heating, *Carbon* **2016**, *105*, 572–585.
- [226] *Colour Index Interational 4th Edition*, Society of Dyers und Colourists, **2014**.
- [227] P. J. Hendra, Laser-Raman spectra of polymers, *Advances in Polymer Science* **1969**.
- [228] J. L. Koenig, Raman scattering of synthetic polymers - A review, *Applied Spectroscopy Reviews* **1971**, *4*, 233–305.
- [229] D. Stoye, *Paints, coatings, and solvents*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [230] E. Nakashima, A. Isobe, S. Kako, T. Itai, S. Takahashi, Quantification of toxic metals derived from macroplastic litter on Ookushi Beach, Japan, *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, 10099–10105.
- [231] European Environment Agency (EEA), Waterbase - Transitional, coastal and marine waters, <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/waterbase-transitional-coastal-and-marine-waters-11>, **2015**.
- [232] Q. Mahmood, A. Rashid, S. S. Ahmad, M. R. Azim, M. Bilal, „Current status of toxic metals addition to environment and its consequences“ in *The Plant Family Brassicaceae: Contribution Towards Phytoremediation*, (Hrsg.: A. N. Anjum, I. Ahmad, E. M. Pereira, C. A. Duarte, S. Umar, A. N. Khan), Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**, S. 35–69.
- [233] A. Münzinger, F. Monicelli, A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1991**, *22*, 24–31.
- [234] V. F. Lira, G. A. P. Santos, S. Derycke, M. E. L. Larrazabal, V. G. Fonsêca-Genevois, T. Moens, Effects of barium and cadmium on the population development of the marine nematode *Rhabditis (Pellioditis) marina*, *Marine Environmental Research* **2011**, *72*, 151–159.
- [235] G. Forte, F. Petrucci, A. Cristaudo, B. Bocca, Market survey on toxic metals contained in tattoo inks, *Science of The Total Environment* **2009**, *407*, 5997–6002.
- [236] Vector Laboratories, Vectashield mounting medium data sheet, <http://docs.vectorlabs.com/protocols/H-1000.CE.pdf>, zuletzt aufgerufen am 27.01.2016, **2009**.
- [237] R. Pedrós, I. Moya, Y. Goulas, S. Jacquemoud, Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, *7*, 498–502.

- [238] F. Chu, J. Greaves, Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*, *Marine Biology* **1991**, *110*, 229–236.
- [239] Y. Cai, D. J. Lv, J. Feng, Y. Liu, Z. Wang, M. Zhao, R. Shi, Discrimination of poly(butylenes adipate-co-terephthalate) and poly(ethylene terephthalate) with Fourier transform infrared microscope and Raman spectroscopy, *Spectroscopy Letters* **2012**, *45*, 280–284.
- [240] Y. Cai, J. Lv, J. Feng, Spectral characterization of four kinds of biodegradable plastics: poly (lactic acid), poly (butylenes adipate-co-terephthalate), poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylenes succinate) with FTIR and Raman spectroscopy, *Journal of Polymers and the Environment* **2013**, *21*, 108–114.
- [241] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance, *Journal of environmental polymer degradation* **1997**, *5*, 81–89.
- [242] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.-D. Deckwer, R.-J. Müller, Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere* **2001**, *44*, 289–299.
- [243] A. Gupta, V. Kumar, New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique, *European Polymer Journal* **2007**, *43*, 4053–4074.
- [244] N. Atiq, S. Ahmed, M. I. Ali, B. Ahmad, G. Robson, Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil, *African Journal of Microbiology Research* **2010**, *4*, 1537–1541.
- [245] Flo-Pak Green - Der Green Aspekt, <https://www.flopak-green.de/>, zuletzt aufgerufen am 08.11.2016, **2016**.
- [246] I. Jakubowicz, Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE), *Polymer Degradation and Stability* **2003**, *80*, 39–43.
- [247] Y. Tokiwa, B. Calabria, C. Ugwu, S. Aiba, Biodegradability of Plastics, *International Journal of Molecular Sciences* **2009**, *10*, 3722–3742.
- [248] C. Westmoreland, D. Gatehouse, D and C Red No. 9: Genotoxic or non-genotoxic carcinogen?, *Mutation Research Letters* **1992**, *281*, 163–167.
- [249] A. C. Wiesheu, P. M. Anger, T. Baumann, R. Niessner, N. P. Ivleva, Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages, *Analytical Methods* **2016**, *8*, 5722–5725.
- [250] D. W. Lachenmeier, J. Kocareva, D. Noack, T. Kuballa, Microplastic identification in German beer-an artefact of laboratory contamination, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **2015**, *111*, 437–440.

# A. Anhang



a



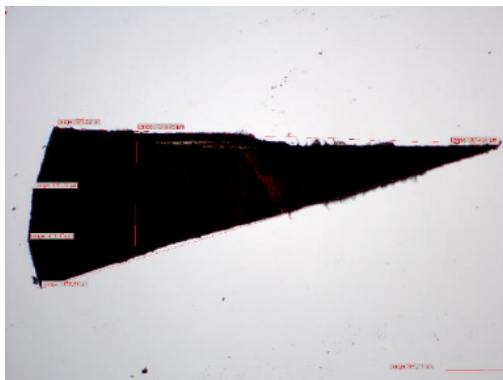
b



c



d

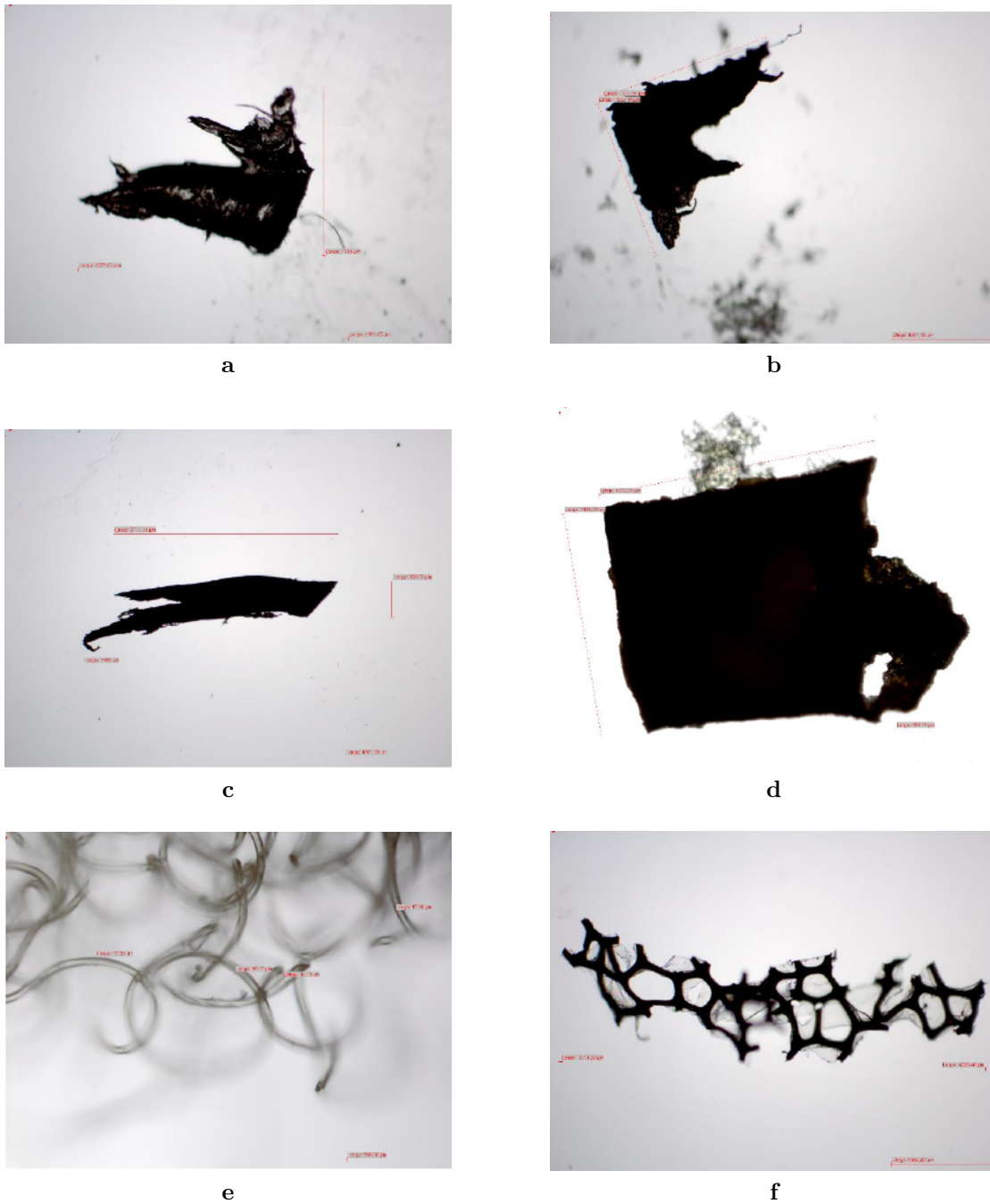


e



f

Abb. A.1.: Mikroskopische Aufnahme der Plastikprobe vor und nach dem Säureaufschluss. (a/b) PVC, (c/d) PP, (e/f) PE. Aufnahmen: Florian Rager



**Abb. A.2.:** Mikroskopische Aufnahme der Plastikprobe vor und nach dem Säureaufschluss. (a/b) PET, (c/d) PS sowie (e) PA und (f) PUR vor dem Säureaufschluss. Aufnahmen: Florian Rager

# B. Geräte und Materialien

## B.1. Chemikalien

<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glucose 99% (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)  
<sup>13</sup>C-Harnstoff 99% (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)  
D-Glucose-Monohydrat (für biochemische Zwecke, Merck KGaA)  
Harnstoff >99.5% (p.a., Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)  
Hydroxylammoniumchlorid 98% (ACS reagent, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)  
Isopropanol >99.5% (zur Synthese, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Natriumhydroxid >99% (p.a., Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Natronlauge 0.1 mol/L (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)  
Polyvinylchlorid-Partikel <100 µm / <17 µm (Goodfellow GmbH, UK)  
Printex XE2-Ruß (Evonik Carbon Black GmbH, Deutschland)  
Saccharose >99.5% (ph. Eur., Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Salpetersäure 68% (reinst, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Salzsäure 37% (reinst, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Schwefelsäure 98% (p.a., Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Silbernitrat 99% (ph. Eur., Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Silica Gel Orange 2 – 5 mm (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, USA)  
Wasserstoffperoxid 30% (p.a., Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)  
Zinkchlorid >97% (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

## B.2. Versuchsorganismen

*Daphnia magna* (Züchtung Universität Bayreuth, Deutschland)  
*Unio pictorium* (Fördefisch, Deutschland)  
*Unio tumidus* (Fördefisch, Deutschland)

### B.3. Material

- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Filter Anodisk, (0.2 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, GE Healthcare Europe, Deutschland)
- Einmalkanülen Sterican (40 mm / 120 mm, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Einmalspritzen Injekt (2 mL / 5 mL / 10 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Exsikkator Rotilabo (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Kalk-Natron-Objektträger (76 mm × 26 mm, 1 mm, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Nitrocellulosefilter (0.45 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Sartorius AG, Deutschland)
- Pasteurpipetten (230 mm, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Petrischalen Steriplan aus Kalk-Soda-Glas (verschiedene Volumina, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Polycarbonat-Filter Millipore (0.4 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser, Merck KGaA, Deutschland)
- Quarzfaserfilter Tissuquartz Pallflex (Pall Life Sciences, USA)
- Quarzfaserfilter Whatman QM-A (Retentionseffizienz bei 2.2 µm 98%, GE Healthcare Europe, Deutschland)
- Reaktionsgefäße Rotilabo (2 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Rundkolben Klarglas (25 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Schlangenkühler (250 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen Eco (50 mL, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland)

### B.4. Instrumente

- ATR-FTIR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA)
- CPMAS-NMR Bruker Avance III 200 (Bruker Biospin GmbH, Deutschland)
- Filtrationsanlage (Sartorius AG, Deutschland)
- Graphitfunkengenerator (GfG 1000, Palas GmbH, Deutschland)
- Heizrührer IKA RH basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG)
- ICP-MS Elan 6100 (PerkinElmer, USA)
- IRMS Finnigan MAT 253 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kamerasystem Leica MS5 (Leica Camera AG, Deutschland)



Kerzenfilter (TAX, MTS Filtertechnik, Deutschland)  
Kontaktthermometer (IKA-Werke GmbH & Co. KG)  
Laborwaage AT261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Deutschland)  
Laminar Flow Box Spectec 11-0302 (Spectec, Deutschland)  
Mikrowellenaufschlussgerät MARSXpress (CEM GmbH, Deutschland)  
Munich Plastic Sediment Separator (Eigenbau Institut)  
NanoSIMS Cameca 50 L (Cameca SAS, Frankreich)  
Raman-Mikroskop LabRAM System (Horiba Scientific, Japan)  
Raman-Mikroskop RENISHAW 2000 (Renishaw, UK)  
Reinstwasseranlage Millipore-Q Plus 185 (Merck Millipore, USA)  
REM Sigma (Carl Zeiss AG, Detschland)  
Schwimmvorrichtung Muschelkäftig (Eigenbau, LfU)  
Ultraschallbad Ultraschallbehandlung Sonopuls HD220 (Bandelin, Deutschland)  
Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG)  
Vortexer RS-VF10 (Phoenic Instruments, Deutschland)  
Vortexer TopMix FB15024 (Fisher Scientifc, USA)  
Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Deutschland)

## B.5. Software

GRAMS 32 (Thermo Galactic, USA)  
ImageJ 1.45s (National Institute of Health, USA)  
LabSpec 5.74.29, 6.3.40, 6.4.20 (Horiba Scientific, Japan)  
Matlab R2013b (The MathWorks Cooperation, USA)  
Microsoft Excel 2013 (Microsoft Cooperation, USA)  
OMNIC 8.0.342 (Thermo Scientific, USA)  
OriginPro 2016G (OriginLab, Cooperation, USA)  
SpectralID 3.03 (Thermo Scientific, USA)  
WiRe 1.2 (Renishaw, UK)

# C. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

## Lateinische Symbole

Symbol	Einheit	Beschreibung
$a$	$\text{m/s}^2$	Beschleunigung
$a$		Entwicklungsstelle Taylorpolynom
$A_1$		Atom 1 im Molekül
$A_2$		Atom 2 im Molekül
$b$		Steigung der Kalibriergeraden
$d$	nm	optische Auflösung
$E$	J	Elektromagnetische Feldstärke des Lichts
$f$		Freiheitsgrade
$F$	N	Kraft
$h$	Js	Plank'sches Wirkungsquantum
$k$	N/m	Kraftkonstante einer Feder
$L_a$	nm	Clustergröße der Kristalle
$m$		Wiederholungen einzelner Messungen
$m$	kg	Masse
$m_1$	kg	Masse des Atoms 1
$m_2$	kg	Masse des Atoms 2
$n$		Anzahl der Kalibriermessungen
$n$	mol	Stoffmenge
$N$		Atomanzahl
$n_{12}$		Anteil an $^{12}\text{C}$
$n_{13}$		Anteil an $^{13}\text{C}$
NA		Numerische Apertur des Objektivs
$P_0$	W	Ausgangsleistung des Lasers
$P_P$	W	Laserleistung an der Probe
$q$	m	Auslenkung
$q_0$	m	Schwingungsamplitude
$Q_x$		Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung
$r_1$	m	Abstand des Atoms 1 zum Schwerpunkt
$r_2$	m	Abstand des Atoms 2 zum Schwerpunkt
$s_0$		Verfahrensstandardabweichung
$t$	s	Zeit

Symbol	Einheit	Beschreibung
$t_{f,a}$		Quantil der Student-t-Verteilung
$x$		Position
$x_0$		Schwerpunkt eines Moleküls
$x_1$		Position des Atoms 1 im Molekül während der Schwingung
$x_2$		Position des Atoms 2 im Molekül während der Schwingung
$x_i$		Gehaltsgröße des Kalibrierpunktes
$\bar{x}$		Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben
$s_{y,x}$		Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung

## Griechische Symbole

Symbol	Einheit	Beschreibung
$\alpha$		Polarisationskonstante
$\alpha$		Signifikanzniveau
$\alpha_0$		Polarisierbarkeit in der Gleichgewichtslage
$\lambda$	nm	Wellenlänge
$\lambda_0$	nm	Anregungswellenlänge
$\mu$	kg	reduzierte Masse
$\nu_0$	s <sup>-1</sup>	Schwingungsfrequenz
$\nu_m$	cm <sup>-1</sup>	Bodenwasserspannung
$\nu_m$	1/s	Schwingungsfrequenz des Moleküls
$\tilde{\nu}$	cm <sup>-1</sup>	Wellenzahl
$\tilde{\nu}_{12}$	cm <sup>-1</sup>	Frequenz der Schwingung bei vollständiger <sup>12</sup> C-Substitution
$\tilde{\nu}_{13}$	cm <sup>-1</sup>	Frequenz der Schwingung bei vollständiger <sup>13</sup> C-Substitution
$\omega_0$	s <sup>-1</sup>	Eigenkreisfrequenz
$\psi_m$	hPa	Bodenwasserspannung

## Abkürzungsverzeichnis

2-LG	<i>two layer graphene</i> ; zweischichtiges Graphen
2D-Peak	Im Raman-Spektrum von Graphen sichtbares Signal
AgNP	Silbernanopartikel
AS	Anti-Stokes
ASS	Acetylsalicylsäure
ATR	<i>Attenuated total reflektion</i> ; abgeschwächte Totalreflexion
AWC	<i>Available water content</i> ; verfügbarer Wassergehalt
BC	<i>Biochar</i> ; Holzkohle
BG	Bestimmungsgrenze
CCD	<i>Charge coupled device</i> ; „ladunggekoppeltes Bauteil“, elektronisches Bauteil der Kamera
CE	<i>Chemical enhancement</i> ; chemische Verstärkung
CPMAS	<i>Solid-state cross-polarization magic angle spinning</i> ; Sonderform der Feststoff-Kernspinresonanzspektroskopie
D-Peak	Im Raman-Spektrum sichtbares Signal, Überlagerung der D1- und D4-Bande
D1-Bande	Aus Fit von kohlenstoffhaltigem Material entstehende Bande
D2-Bande	Aus Fit von kohlenstoffhaltigem Material entstehende Bande
D3-Bande	Aus Fit von kohlenstoffhaltigem Material entstehende Bande
D4-Bande	Aus Fit von kohlenstoffhaltigem Material entstehende Bande
D-Bande	Aus Fit von Graphit entstehende Bande, Defekt-Bande
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DFT	Dichtefunktionaltheorie
EA	Elementanalyse
EDS	<i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i> ; Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EM	<i>Electron-multiplying</i> ; Elektronenverstärkung
EME	<i>Electromagnetic enhancement</i> ; elektromagnetische Verstärkung
EN	Europäische Norm
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FC	<i>field capacity</i> ; Feldkapazität
FPA	<i>Focal plane array</i> ; spezielle Anordnung der Detektoren bei der FTIR
fPOM	<i>Free particulate organic matter</i> ; freies partikuläres organisches Material
FT-RS	Fourier-transformierte Raman-Spektroskopie

FTIR	Fourier-transformierte IR-Spektroskopie
FuT	Mineralische Fraktion, Schluff und Ton
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Gew.-%	Gewichtsprozent
GfG	Graphitfunkengenerator
G-Peak	Im Raman-Spektrum sichtbares Signal, Überlagerung der G- und D <sub>2</sub> -Bande
G-Bande	Aus Fit von Graphit oder kohlenstoffhaltigem Material entstehende Bande, graphitsche Bande
HeNe	Helium-Neon
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i> ; höchstes besetztes Molekülorbital
HS	Huminsäure
HSt	Huminstoffe
I(D)/I(G)	Relatives Intensitätsverhältnis von D- zu G-Peak
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ; Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IR	Infrarot-Spektroskopie
IRMS	<i>Isotope ratio mass spectrometry</i> ; Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> ; Internationale Organisation für Normung
LC	<i>Liquid chromatography</i> ; Flüssigchromatographie
LfU	Bayerisches Landesamt für Umwelt
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i> ; niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
LWD	<i>Long working distance</i> ; großer Arbeitsabstand
mikro-FTIR	FTIR-Spektroskopie gekoppelt mit einem Mikroskop
MP	Mikroplastik
MPig	Mikropigmente
MPP	Mikroplastik- und Pigmentpartikel
MPSS	<i>Munich plastic sediment separator</i> ; Gerät zur Dichtefraktionierung
MSFD	<i>Marine strategy framework directive</i> , Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie
MWNT	<i>Multi-wall carbon nanotube</i> ; mehrschichtige Kohlenstoffnanoröhrchen
nanoSIMS	<i>Nanoscale secondary ion mass spectrometry</i> ; Nano Sekundärerionen-Massenspektrometrie
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NG	Nachweisgrenze

## Abkürzungsverzeichnis

NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> ; Kernspinresonanzspektroskopie
OM	<i>Organic matter</i> ; organische Substanzen
OPA	Organisches Plastikadditiv
oPOM	<i>Occluded particulate organic matter</i> ; okkludiertes partikuläres organisches Material
PA	Polyamide
PAH	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> ; Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBAT	Polybutylenadipatterephthalat
PBDE	Polybromierte Diphenyle
PC	Polycarbonat
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PE	Polyethylen
PES	Polyester
PET	Polyethylenterephthalat
PLA	Polylactid
PMMA	Polymethylmethacrylat
POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PU	Polyurethane
PVC	Polyvinylchlorid
PvOH	Polyvinylalkohol
PWP	<i>Permanent wilting point</i> ; Permanenter Welkepunkt
Py-GC/MS	Pyrolyse-Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie
RM	Raman-Mikrospektroskopie
ROI	<i>Region of interest</i> ; interessante Bereiche
RS	Raman-Spektroskopie
SERS	<i>Surface-enhanced Raman Scattering</i> ; Oberflächenverstärkte Raman-Streuung
SIRM	Stabilisotopen-Raman-Mikrospektroskopie
SI-SERS	SERS mit Stabilisotopen
SLG	<i>Single layer graphene</i> ; einschichtiges Graphen
SOM	<i>Soil organic matter</i> ; organische Bodensubstanzen
SPT	<i>Sodium poly tungstate</i> ; Natriumpolywolframat
SWNT	<i>Single-wall carbon nanotube</i> ; einschichtige Kohlenstoffnanoröhrchen
TDS-GC/MS	Thermische Desorptions/Sorptions-Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
TED-GC/MS	Thermische Extraktions/Desorptions-Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
TGA	Thermogravimetrische Analyse

UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation