

---

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ

Elementbestimmungen in aquatischen Biofilmen  
und Zooplankton mittels Total Reflektierender  
Röntgenfluoreszenz Analytik  
(TXRF)

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.

eingereicht an der  
Leuphana Universität Lüneburg  
Institut für Ökologie und Umweltchemie

von  
Margarete Mages  
Magdeburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil. Ing. Wolfgang Ruck  
2. Prof. Dr. habil. Ralf Ebinghaus  
3. PD Dr. habil. Wolf von Tümpling

Tag der Disputation: 03.09.2013

---

---

**Wasser,**

**... es ist nicht so,**

**dass man dich**

**zum Leben braucht:**

**...du selber bist Leben.**

*Antoine de Saint-Exupéry*

---

---

## VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Gewässeranalytik des Departments Fließgewässerökologie im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ Magdeburg angefertigt.

Wirklich möglich wurde die Promotion erst durch Prof. Dr. habil. Ing. Wolfgang Ruck, der mich als externe Doktorandin an der Universität Lüneburg eingeführt und während der Erarbeitung der Dissertationsschrift durch Diskussionen und mit Ratschlägen unterstützt hat. Mit Dankbarkeit habe ich das Angebot an- und wahrgenommen.

Das Interesse von Prof. Dr. habil. Ralf Ebinghaus am Fortgang der Arbeit war immer wieder ein Motivationsschub die Arbeit zum Abschluss zu bringen. Dafür bin ich ihm sehr verbunden.

Besonderer Dank gilt PD Dr. habil. Wolf von Tümpling, der mich während der gemeinsamen 13 Arbeitsjahre wohlwollend begleitet hat, um dieses Ziel zu erreichen. Viele gemeinsame Diskussionen haben zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Sein aufrichtiges Vertrauen in meine Arbeit empfand ich immer als sehr unterstützend und motivierend.

Allein schafft man eine solche Arbeit nicht und so bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, mit der TXRF meine Kreativität entfalten zu können.

Frau Andrea Hoff, meiner guten Seele im Labor, bin ich für ihre jahrelange unterstützende Arbeit sehr verbunden. Ohne sie hätte ich das umfangreiche Probenaufkommen nicht bewältigen können. Ihr persönliches Engagement hat maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Mit Prof. Dr. Stefan Wölfl verbindet mich eine sehr produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit, aus der u.a. die gemeinsamen wissenschaftlichen Publikationen auf dem Gebiet des Zooplanktons resultieren. Seine fundierten Kenntnisse und Erfahrungen, die er in Diskussionen immer wieder einbrachte, waren eine Bereicherung für mich, die ich sehr zu schätzen gelernt habe.

Herrn Prof. Dr. habil. Walter Geller sei dafür gedankt, dass er während seiner aktiven Zeit am UFZ als Sektionsleiter meine Arbeit wo immer er konnte unterstützt und gefördert hat.

---

Nicht unerwähnt soll bleiben, dass es Prof. (apl.) Dr. habil. Kurt Friese war, der mich vor vielen Jahren auf dem Gebiet der TXRF gefördert und gefordert hat und damit einen wesentlichen Grundstein meiner beruflichen Entwicklung legte. Darüber freue ich mich bis heute.

Gleichzeitig möchte ich Prof. Dr. Markus Weitere erwähnen, der mir als Departmentleiter für Fließgewässerökologie die notwendige Zeit für die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit einräumte.

Allen internen und externen Kolleginnen und Kollegen, die mich motiviert haben, die vorliegende Arbeit einzureichen und für Diskussionen ständig ein offenes Ohr hatten, wie Dipl. Chem. Martina Baborowski, Dr. Jörg Kraft, Heike Goreczka und Ina Siebert sowie alle die ich hier nicht benannt habe, gilt mein Dank für die Unterstützung. Gleiches gilt für das sehr gewissenhafte Korrekturlesen durch Frau Dr. Jennifer Wey und für die vielen Tipps in Word durch Burkhard Kuehn.

Die schnelle und unbürokratische Hilfsbereitschaft der Kollegen der Firma Bruker Nano GmbH, die ich im Laufe der Jahre erfahren habe, wenn das portable TXRF-Gerät mal wieder nicht funktionierte, habe ich gern angenommen. Als Service sucht es seinesgleichen. Knut Freitag bin ich ebenfalls sehr dankbar dafür, dass er zu notwendigen Reparaturen der TXRF 8030 C immer schnell zur Stelle war und manchmal Unmögliches möglich gemacht hat.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle meiner Familie herzlich danken. Meiner Tochter Antje und ihrer kleinen Familie für die mentale und liebevolle Unterstützung. Und vor allem meinem Mann Peter für 40 glückliche Jahre. In den stressigen Zeiten der Fertigung der Arbeit hat er mich ständig motiviert, immer an mich geglaubt und mit Liebe und Fürsorge verwöhnt.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VERWENDETE VERZEICHNISSE UND ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>I</b>
Abbildungsverzeichnis .....	I
Tabellenverzeichnis .....	III
Allgemeine Abkürzungen .....	V
Abkürzungen für chemische Elemente und Verbindungen.....	VI
Abkürzungen für Maßeinheiten.....	VII
<b>KURZFASSUNG</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Elementverhalten in aquatischen Systemen</b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Elementvorkommen im Fließgewässer und deren Bewertung.....	6
2.1.2 Elementanreicherungen in biologischen Kompartimenten .....	8
<b>2.2 Biofilme</b> .....	<b>9</b>
2.2.1 Aufbau und Entwicklung der Biofilme.....	10
2.2.2 Vorkommen und Bedeutung aquatischer Biofilme .....	12
2.2.3 Elementakkumulation in aquatischen Biofilmen .....	13
<b>2.3 Zooplankton</b> .....	<b>15</b>
2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von Zooplankton .....	15
2.3.2 Elementakkumulation im Zooplankton.....	17
<b>2.4 Elementanalytik mit der „Total reflektierenden Röntgenfluoreszenz-Analytik“ (TXRF)</b> .....	<b>17</b>
2.4.1 Physikalisches Prinzip der TXRF und deren Anwendung .....	19
2.4.2 Quantifizierung .....	22
2.4.3 Qualitätssicherung (QS).....	24
<b>3 EXPERIMENTELLER TEIL ZUR ELEMENTBESTIMMUNG IN BIOLOGISCHEN PROBEN</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 TXRF-Analytik und Qualitätssicherung (QS)</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 TXRF-Equipment .....	28
3.1.2 Qualitätssicherung (QS).....	29
<b>3.2 Elementuntersuchungen in Biofilmen</b> .....	<b>34</b>

---

3.2.1	Aufwuchsträgertests für Elementakkumulationen in Biofilmen .....	35
3.2.2	Felduntersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen.....	42
3.2.2.1	Spezifische Sorptionseffekte in Biofilmen von Erzbergbaugebieten, am Beispiel der Region des Mansfelder Landes .....	42
3.2.2.2	Großskalige Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Ungarn .....	53
<b>3.3</b>	<b>Elementanreicherung in Zooplanktonproben .....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Methodenentwicklung zur Elementbestimmung in Einzelindividuen (Krebstiere – Crustacea) .....	61
3.3.2	Methodenadaption zur Reduzierung der organischen Matrix mittels Kalt-Plasma- Veraschung (CPA).....	71
3.3.3	Felduntersuchungen zur Elementakkumulation - Vergleich portable und stationäre TXRF - Anwendungen am Beispiel einer Probennahme an der Tisza, Ungarn .....	85
<b>4</b>	<b>INTERPRETATION UND DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Biofilme.....</b>	<b>93</b>
4.1.1	Einschätzung der Methodenentwicklung zur Elementakkumulation in Biofilmen unterschiedlicher Aufwuchsträger.....	93
4.1.2	Bewertung der Ergebnisse der Felduntersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen .....	94
4.1.2.1	Spezifische Sorptionseffekte in Biofilmen des Mansfelder Landes .....	94
4.1.2.2	Großskalige Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Ungarn .....	96
<b>4.2</b>	<b>Zooplankton .....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Einschätzung der entwickelten und adaptierten Methoden zur Elementbestimmung in Einzelindividuen .....	97
4.2.1.1	„Dry“- und „Wet“-Methoden .....	97
4.2.1.2	Eignung der CPA-Methode zur Reduzierung der organischen Matrix .....	99
4.2.2	Bewertung der Ergebnisse der Felduntersuchungen am Beispiel einer Probennahme an der Tisza, Ungarn.....	99
<b>4.3</b>	<b>Gewässerrelevante Bewertung der Elementakkumulation in biologischen Proben.....</b>	<b>100</b>
4.3.1	Vergleich der Elementgehalte in untersuchten Biofilmen mit Grenzwerten für Schwebstoffe/Sedimente der EU-WRRL.....	101
4.3.2	Vergleich der Elementgehalte in Makrozoobenthos- und Zooplanktonproben in Anlehnung an die Grenzwerte für Schwebstoffe/Sedimente der EU-WRRL.....	104
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>111</b>
	<b>EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>127</b>

---

## VERWENDETE VERZEICHNISSE UND ABKÜRZUNGEN

### Abbildungsverzeichnis

- 2-1: Entwicklungsphasen von aquatischen Biofilmen (BOCH 2005, geändert Mages)
- 2-2: Modellvorstellung eines aquatischen Biofilms (MAGES et al. 2006)
- 2-3: Bedeutung des Zooplanktons und der Biomanipulation zur Trinkwasseraufbereitung (WAHNBACHTALSPERRENVERBAND 2010)
- 2-4: Atommodell
- 2-5: Totalreflektion von Röntgenstrahlen für die Spektralanalyse
- 2-6: Schematischer Aufbau eines TXRF-Spektrometers
- 3-1: Stationäres TXRF-Spektrometer 8030 C (links) und portables Tischgerät S2 PICOFOX™ (rechts)
- 3-2: Feldaufbau des portablen TXRF-Spektrometers mit entsprechendem Equipment (MAGES et al. 2004b)
- 3-3: Probenpräparation für die TXRF unter Feldbedingungen (MAGES et al. 2004b)
- 3-4: Filtration unter Feldbedingungen
- 3-5: Zählraten gereinigter Probenträger bei unterschiedlichen Expositionszeiten (MAGES et al. 2003)
- 3-6: Unterwasseraufnahmen natürlich gewachsener Biofilme im Schlüsselstollen (Mansfelder Land)
- 3-7: Biofilmwachstum auf langen Polycarbonat-Trägern (MAGES et al. 2006)
- 3-8: Biofilmwachstum auf runden Polycarbonat-Trägern, links vor dem Auslegen und rechts nach entsprechender Aufwuchszeit
- 3-9: Schema der Biofilmpräparation (MAGES et al. 2004a, geändert)
- 3-10: Überführung der Aufwuchsträger für den Transport in Polycarbonatröhrchen
- 3-11: Getrockneter Biofilm mit sichtbaren Partikeleinschlüssen (MAGES et al. 2006)
- 3-12: Netzstruktur der getrockneten Biofilme (MAGES et al. 2006, geändert)
- 3-13: Verteilungsmuster der mit der  $\mu$ -XRF detektierten Elemente in den getrockneten Biofilmen (Aufnahmen: U. Waldschläger, Bruker Nano, Berlin)
- 3-14: Einzugsgebiet Mansfelder Land mit den Probenstellen Schlüsselstollen und Schlenze (BABOROWSKI und BOZAU 2006, geändert Mages)
- 3-15: Schwebstoffeintrag der Schlenze (BABOROWSKI und BOZAU 2006, geändert Mages)

- 3-16: Frischbiofilm mit sichtbar stark ausgeprägter EPS
- 3-17: Schwammartiger Frischbiofilm mit sichtbarer EPS
- 3-18: Getrockneter Biofilm mit sichtbaren Kavernen
- 3-19: Biofilm der Schlenze (MAGES et al. 2006)
- 3-20: Sorptionseffekte ausgewählter Elemente in saisonalen Biofilmen des Schlüsselstollens
- 3-21: Probennahmestellen in Verlauf der Tisza, mit dem Zufluss Szamos, Probennahme 2002 (ÓVÀRI et al. 2004b)
- 3-22: Zusammenfluss Szamos und Tisza, mit sichtbar hohem Schwebstoffeintrag über die Szamos
- 3-23: Präparationstechniken der „Wet“- und „Dry“-Methoden (MAGES et al. 2001, geändert)
- 3-24: Wiederfindungsraten ausgewählter Elemente im zertifizierten Referenzmaterial CRM 414, ohne Wägung, Quantifizierung mittels bekanntem Zn-Gehalt als internem Standard, Messungen mit den TXRF-Spektrometern PICOFOX und 8030 C (MAGES et al. 2004b)
- 3-25: Präparierte *Daphnia pulex*-Einzelindividuen vor (links) und nach (rechts) der Veraschung in einem CPA (WOELFL et al. 2003)
- 3-26: Probenträger in der Plasmawolke des CPA
- 3-27: TXRF-Spektrum einer einzelnen *Daphnia pulex* vor (durchgehende Linie) und nach der Veraschung (gestrichelte Linie) (WOELFL et al. 2003)
- 3-28: Untergrund vor und nach der Veraschung in Relation zur Trockenmasse einzelner *Daphnia pulex*, n = 28, weiß = vor Veraschung, schwarz = nach Veraschung (WOELFL et al. 2003)
- 3-29: Verhältnis Signal zu Untergrund vor und nach der Veraschung von einzelnen *Daphnia pulex*-Individuen mit dem CPA, n = 28 (WOELFL et al. 2003)
- 3-30: Schema der Feld- und Laborpräparation von Zooplanktonproben
- 3-31: Selektierung der Zooplanktonproben im Feld (Foto: K. Rahn, UFZ)
- 3-32: Feldeinsatz des portablen TXRF-Spektrometers PICOFOX™ (Foto: K. Rahn, UFZ)
- 3-33: Spektrum der Elementmessung einer einzelnen *Daphnia*, präpariert nach der „Wet-Methode“ im Feld
- 3-34: Signifikante Unterschiede der Zn-Ergebnisse für die Spektrometer PICOFOX™ und 8030 C (WOELFL et al. 2003)

3-35: Nicht signifikante Unterschiede der Sr- und Cu-Ergebnisse für die Spektrometer PICOFOX™ und 8030 C (WOELFL et al. 2003)

### Tabellenverzeichnis

- 3-1: Technische Spezifikation der verwendeten TXRF-Spektrometer
- 3-2: Zertifizierte Elementgehalte und analytische Ergebnisse mit den Wiederfindungsraten des Referenzmaterials CRM 414 ( $n = 10$ ) (MAGES et al. 2006)
- 3-3: Absolute Elementgehalte kontaminierter Probenträger und Wiederfindungsraten des Referenzmaterials NIST 1643 d,  $n = 3$  (MAGES et al. 2006, ergänzt)
- 3-4: Elementgehalte in Biofilmen unterschiedlichen Trägermaterials [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2006, geändert)
- 3-5: Limnologische Begleitparameter der Gewässer Schlüsselstollen und Schlenze (Mai – August,  $n = 5$ ,  $\text{mg L}^{-1}$ ) (BABOROWSKI und BOZAU 2006, MAGES et al. 2006)
- 3-6: Elementgehalte in der gelösten Wasserphase am Austritt des Schlüsselstollens im Vergleich zur Schlenze (Mai – August 2005,  $n = 5$ , Angaben in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) mit den entsprechenden Anreicherungsfaktoren (AF) (MAGES et al. 2006)
- 3-7: Ausgewählte Elementgehalte in Abhängigkeit von der Aufwuchszeit der Biofilme im Schlüsselstollen, im Vergleich zu den Elementgehalten der Biofilme der Schlenze [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ], mit den entsprechenden Anreicherungsfaktoren (AF)
- 3-8: Mittlere Elementgehalte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen ( $s$ ) der großskaligen Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Probennahme 2002,  $n = 3$ ,  $s =$  Standardabweichung [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2004a)
- 3-9: Saisonaler Vergleich der Elementgehalte in Biofilmprouben von Szamos und Tisza der Probenkampagnen 2000 und 2002 [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2004a)
- 3-10: TXRF-Analyse von Einzelindividuen von *Daphnia pulex* (Laja See, Chile, 14,1 - 33,8  $\mu\text{g}$  Einwaage pro Einzelindividuum,  $n = 10$ ), aufgestockt mit einem Element-Mix von K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr und Pb (MAGES et al. 2001)
- 3-11: TXRF-Analyse von zertifiziertem Referenzmaterial CRM 414 (Einwaage 12,3 - 51,9  $\mu\text{g}$ ), aufgestockt mit den Elementen K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn und Sr (MAGES et al. 2001)

- 
- 3-12: Vergleich der „Dry“- und „Wet“-Methode für die Elementbestimmung in einzelnen *Daphnia pulex*-Individuen. Ergebnisse des "erweiterten  $t$ -Test" (MAGES et al. 2001)
- 3-13: Absolute Elementgehalte vor und nach der Veraschung im Sauerstoff-Plasma,  $n = 30$  (WOELFL et al. 2003)
- 3-14: TXRF-Analyse von zertifiziertem Referenzmaterial CRM 414 (Spurenelemente im Plankton,  $> 98\%$  *Daphnia magna*) vor und nach der Veraschung im Sauerstoff-Plasma ( $n = 8$ ), WFR = Wiederfindungsrate (WOELFL et al. 2003, geändert)
- 3-15: Vergleich der Zählrate Untergrund vor und nach der Veraschung (CPA) von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen aus dem Laja See (Chile). Ergebnisse nach dem  $t$ -Test, Signifikanz  $P < 0,05$  ( $n = 28$ ),  $R_{back}$  wurde nach Formel (10) berechnet, (WOELFL et al. 2003, geändert)
- 3-16: Vergleich „Signal – Untergrund – Verhältnis“ vor und nach der Veraschung von *Daphnia pulex* (Laja See, Chile). Ergebnisse nach dem  $t$ -Test, Signifikanzniveau  $P < 0,05$  ( $n = 28$ ), in Klammer = Messbereich, (WOELFL et al. 2003, geändert)
- 3-17: Verhältnisse der ermittelten Elementgehalte vor und nach der Veraschung von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen (Laja See, Chile) im März und November 2001 (Einwaage 2,5 – 47,9  $\mu\text{g}$ ) [%] (WOELFL et al. 2003)
- 3-18: Prüfung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen vor und nach der Veraschung mittels  $t$ -Test, Signifikanzniveau  $P < 0,05$  (WOELFL et al. 2003)
- 3-19: Ergebnisse der Felduntersuchungen für Trägerblindwerte, Elementkonzentrationen im Waschwasser und absoluten Elementgehalte in einzelnen *Daphnia*-Individuen
- 3-20: Statistische Bewertung der Vergleichbarkeit beider Methoden.  $f$  = Freiheitsgrad,  $t = t$ -Wert,  $t_{(0,99;f)}$  =  $t$ -Wert für ein Signifikanzniveau von 99 %
- 4-1: Grenzwerte der EU-WRRL für Oberflächenwasser, Schwebstoff/Sediment und analysierte Elementgehalte im Oberflächenwasser (OFW) und in Biofilmen ausgewählter Probennahmeorte an der Tisza, Ungarn. Auszüge aus der Tabelle 3-8 (Biofilme Tisza) sowie Oberflächenwasser aus ÓVÁRI et al. (2004a)
- 4-2: Vergleich der Grenzwerte der EU-WRRL für Schwebstoff/Sediment und der saisonalen Elementanreicherungen in Biofilmen von Tisza und Szamos der Probenkampagnen 2000 und 2002 [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2004a)

4-3: Referenz- und Grenzwerte der EU-WRRL für Schwebstoff/Sediment und Elementgehalte in Makrozoobenthosproben aus der Tisza, Ungarn (WOELFL et al. 2004b) sowie Zooplankton aus einem kupferbelasteten Bergausee und einem Referenzsee in Chile [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (WOELFL et al. 2004a)

### Allgemeine Abkürzungen

A	relative Atommasse
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AF	Anreicherungsfaktor
ARGE	Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe
BCR <sup>®</sup>	European Community Bureau <sup>®</sup>
C	Konzentration
CPA	Kalt-Plasma-Veraschung
CRM	zertifiziertes Referenzmaterial
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
E	Energie der Röntgenstrahlung
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
GF- AAS	Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometrie
GLP	Gute Laborpraxis
ggf.	gegebenenfalls
ICP MS	Induktiv gekoppeltes Plasma mit Massenspektrometer
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser
n	Anzahl der Einzelmessungen bzw. -individuen
N	Nettointensität
NWG	Nachweisgrenze
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
RFA	Röntgenfluoreszenz-Analytik
s	Standardabweichung
sub-boiling	hochgereinigte Chemikalien
t	Messzeit
Tab.	Tabelle

TXRF	Total reflektierende Röntgenfluoreszenz-Analytik
UBA	Umweltbundesamt
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ
V	Volumen
WFR	Wiederfindungsrate
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
Z	Ordnungszahl
$\bar{x}$	Mittelwert
$\mu$ -XRF	Mikro-Röntgenfluoreszenz-Analyse
$\delta$	Dekrement
$\rho$	Dichte [ $\text{g cm}^{-3}$ ]

### **Abkürzungen für chemische Elemente und Verbindungen**

Al	Aluminium
As	Arsen
Br	Brom
Ca	Calcium
Cd	Cadmium
Co	Kobalt
Cr	Chrom
Cu	Kupfer
Fe	Eisen
Ga	Gallium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hg	Quecksilber
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
K	Kalium
Mn	Mangan
Mo	Molybdän
Ni	Nickel
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P	Phosphor
Pb	Blei
Rb	Rubidium

---

S	Schwefel
Sc	Scandium
Si	Silizium
Sr	Strontium
W	Wolfram
Zn	Zink

**Abkürzungen für Maßeinheiten**

fg	Femtogramm
h	Stunde
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
min	Minute
mbar	Millibar
mg	Milligramm
Mt	Megatonne = 1.000.000 Tonnen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
sec	Sekunde
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter



---

## KURZFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden in unterschiedlichen aquatischen biologischen Proben Akkumulationsuntersuchungen ausgewählter Elemente durchgeführt. Als Probenmaterial dienten Biofilme und Zooplankton aus verschiedenen aquatischen Systemen (bergbaubeeinflusst und unbeeinflusst). Beide biologisch unterschiedlichen Habitate können einerseits extrem empfindlich auf erhöhte Elementkonzentrationen reagieren. Andererseits können sie sich durch verschiedenste Mechanismen und „Überlebensstrategien“ an erhöhte Metallkonzentrationen adaptieren. In der aquatischen Nahrungskette sind sie ein wichtiges Bindeglied und zeigen den ökologischen Zustand natürlicher Gewässer an.

Für Biofilme und Zooplankton wurden im Rahmen dieser Arbeit deshalb Methoden entwickelt und modifiziert, um bei Probenmaterialien im  $\mu\text{g}$ -Bereich effektive reproduzierbare Elementbestimmungen durchführen zu können. Die Anwendung war für Biofilme weniger kompliziert, da mit 500  $\mu\text{g}$  ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand. Analytisch aufwendiger stellte sich die Anwendung für Zooplankton heraus. Hier lag der Fokus in der Elementbestimmung auf Einzelindividuen, deren Absolutgewichte zwischen 10 und 50  $\mu\text{g}$  lagen. Parallele Untersuchungen ausgewählter Referenzmaterialien bestätigten die Eignung dieser Methode. Mit dem Einsatz einer Kalt-Plasma-Veraschung zur Reduzierung der organischen Matrix konnte die Methode weiter modifiziert werden.

Für die Elementakkumulation in Biofilmen wurde die Eignung natürlicher und künstlicher Aufwuchsträger untersucht und verglichen. Daraus schlussfolgernd ergaben sich Untersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen zweier unterschiedlicher Oberflächengewässer. Einerseits machte die Bewertung von Biofilmen innerhalb von Longitudinalprofiluntersuchungen eines bergbaubeeinflussten Fließgewässers (Tisza, Ungarn) den Einfluss von Schadstoffeinträgen nach Havarie-Ereignissen sichtbar. Andererseits ergaben Untersuchungen an natürlichen Biofilmen eines Stollensystems zur Haldenentwässerung (Mansfelder Land, Mitteldeutschland) zeitabhängige Sorptionseffekte ausgewählter Elemente.

Die angewendeten Methoden wurden unter optimalen Laborbedingungen und unter Einhaltung der Guten Laborpraxis (GLP) entwickelt. Als Analysetechnik standen zwei TXRF-Geräte zur Verfügung, die prinzipiell für Elementanalysen mit kleinsten Probenmengen bzw. Probenvolumina auskommen.

Sowohl die stationäre als auch die portable TXRF waren für alle Untersuchungen sehr gut geeignet und erbrachten im Vergleich mit zertifizierten Referenzmaterialien akzeptable Wiederfindungsraten.

Weiterhin galt es zu überprüfen, inwieweit die zur Verfügung stehende Analysetechnik auch mobil eingesetzt werden kann. Dafür wurde die entwickelte „*Wet*“- Methode vor Ort in Ungarn angewendet und der Elementgehalt in einzelnen Zooplanktonindividuen semi-quantitativ bestimmt. Die eingesetzte portable TXRF vom Typ S2 PICOFOX™ erwies sich für diese Fragestellung als sehr gut geeignet.

Abschließend wurden die ermittelten Elementakkumulationen in ausgewählten biologischen Proben der Biofilme und im Zooplankton anhand der Grenzwerte der EU-WRRL bewertet.

---

## 1 PROBLEMSTELLUNG

In unbeeinflussten, natürlichen Flusseinzugsgebieten hat sich ein ökologisches Gleichgewicht herausgebildet, das sich einerseits aus der Wasserspiegellage und Strömung ergibt und andererseits dem Einfluss von Erosionen sowie Sedimentationen und Remobilisierungen Rechnung trägt. Die aquatische Flora und Fauna hat sich dementsprechend angepasst und die damit verbundenen Bioakkumulationen und Biomagnifikationen von Substanzen und Elementen sind als natürliche Phänomene zu betrachten.

Durch die bis heute anhaltende Urbanisierung und Industrialisierung sowie die Intensivierung der Land- und Forstwirtschaft wurde und wird dieses natürliche ökologische Gleichgewicht vieler Oberflächengewässer nachhaltig beeinflusst. Neben dem zunehmendem Eintrag von erodiertem Bodenmaterial aus land- und forstwirtschaftlichen Nutzflächen und dem Wegfall von natürlichen Auen kommt es zum verstärkten Eintrag von Nährstoffen, organischen Kontaminanten und anorganischen Schadstoffen (wie Schwermetallen und Arsen, beispielsweise aus dem Bergbau und urbanen Bereichen) in die Gewässer.

Häufiger auftretende Extremhochwasserereignisse, Veränderungen der Artendiversität und Abundanzen im Gewässer sowie Nutzungseinschränkungen, beispielsweise in der Binnenfischerei durch extreme Schadstoffakkumulationen, waren und sind sichtbare Folgen dieser Veränderungen.

Nicht zuletzt, um diesen negativen Störungen des ökologischen Gleichgewichtes in europäischen Oberflächengewässern Einhalt zu gebieten und wo notwendig und möglich einen guten ökologischen Zustand wieder herzustellen, ist aus umweltpolitischer Sicht die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL) Anfang 2000 in Kraft getreten. Neben morphodynamischen Aspekten sowie der Festlegung von Zeigerarten und Abundanzen für die biologische Gewässergüte ist der chemische Zustand, u. a. anhand der Liste der prioritären Substanzen im Wasserkörper und den Sedimenten (u. a. Cd, Hg, Ni und Pb) zu charakterisieren. Durch die Einhaltung von festgelegten Grenzwerten ist der gute chemische Zustand zu gewährleisten.

Die Untersuchungen zur chemischen Gewässergüte sind dabei auf die Wasser- und Sedimentphase fokussiert. In Sondermessprogrammen sind ggf. auch chemisch-analytische Untersuchungen an Fischen durchzuführen. Dabei beruhen diese Messprogramme auf den vielfältig vorhanden wissenschaftlichen Untersuchungen zur Schadstoffakkumulation in den Sedimenten und dem Belastungsgrad von Fischen.

Weit weniger erforscht sind demgegenüber ablaufende Prozesse und Funktionen der Elementan- bzw. -abreicherung in Biofilmen, Makrozoobenthos und Zooplankton. Dabei sind beispielsweise Biofilme, die u. a. die Grenzfläche Wasser-Sediment besiedeln, aktiv an Sorptions- und ggf. Desorptionsprozessen von Schadstoffen beteiligt. Zooplankton, das durch Filtration als Nahrungsquelle vorrangig Phytoplankton nutzt, kann zusätzlich wichtige Informationen über den Grad der Akkumulation von anorganischen Schadstoffen in der Nahrungskette höherer Trophiestufen liefern und den Transfer beschreiben.

Detaillierte wissenschaftliche Untersuchungen u. a. zum Verhalten von Elementen mit Bezug zu niedrigen Trophiestufen im Oberflächengewasser sind deshalb notwendig, um die Akkumulations-, Desorptions- und Biomagnifikationsprozesse beschreiben und charakterisieren zu können. Welche natürlichen Prozesse signifikant sind und wie groß der anthropogene Einfluss ist, kann so für die unteren Stufen der Nahrungskette ermittelt werden.

Problematisch ist die Tatsache, dass viele Elementbestimmungen im Spurenbereich mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bzw. der Induktiv gekoppelten Plasma (ICP) Methoden mit Massen- oder optischer Emissionsdetektion durchgeführt werden. Sie benötigen für qualitätsgesicherte Analyseergebnisse Probenmengen im mg-Bereich. Biofilmuntersuchungen sind auf Grund der gewonnenen geringen Probengewichte deshalb oftmals nur kumulativ möglich. Eine reproduzierbare quantitative Aussage zur Elementakkumulation in einzelnen Zooplanktonindividuen, insbesondere altersabhängig, ist mit den o. g. Methoden überhaupt nicht möglich. Hinzu kommt die oftmals arbeits- und zeitaufwendige Probenvorbereitung.

Basierend auf diesem Kenntnisstand ergibt sich das Ziel der Arbeit, TXRF-Methoden zur Elementbestimmung in Biofilmproben und einzelnen Zooplanktonindividuen zu entwickeln bzw. bestehende Methoden zu modifizieren, um eine zuverlässige und „einfache“ Bestimmung der Elementgehalte in Proben im  $\mu\text{g}$ -Bereich zu ermöglichen. Ausgewählte Feldanwendungen sind dabei als Nachweis der Praxistauglichkeit anzusehen.

Im Rahmen der Arbeit wird deshalb auf methodische Untersuchungen zur definierten und kontaminationsfreien Biofilmgewinnung auf unterschiedlichen Trägermaterialien eingegangen und die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der Elementakkumulation im Zooplankton beschrieben, die die Möglichkeit der Nutzung von Einzelindividuen als Probe bieten.

---

Zur Charakterisierung der Elementverteilung als auch der Elementakkumulation in aquatischen Biofilmen und in Zooplanktonorganismen werden TXRF-Untersuchungen von Proben aus verschiedenen aquatischen Systemen (bergbaubeeinflusst und unbeeinflusst) vorgestellt. Zusätzlich erfolgt eine Bewertung von Longitudinalprofiluntersuchungen eines bergbaubeeinflussten Fließgewässers (Tisza, Ungarn) sowie von zeitabhängigen Sorptionseffekten (Mansfelder Land, Mitteldeutschland), um die Praxistauglichkeit nachzuweisen.

Für die Ermittlung der Elementakkumulation im Zooplankton wird die Entwicklung von Methoden beschrieben, die die Elementbestimmung in Einzelindividuen ermöglichen. Zooplanktonproben ausgewählter Gewässer bilden die Grundlage für die Abschätzung der Einsatzmöglichkeiten der entwickelten Analyseverfahren, sowohl bei Feldversuchen, als auch im Labor.

Wesentliche Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen basieren auf den folgenden wissenschaftlichen Publikationen:

1. **Mages, M.**, Woelfl, S., von Tümpling jun., W. (2001) A method for trace element determination of single *Daphnia* specimen using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 56 (11) 2209-2217
2. Woelfl, S., **Mages, M.**, Encina, F. (2003) Cold plasma ashing improves the trace element detection of single *Daphnia* specimens by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 58 (12) 2157-2168
3. **Mages, M.**, Óvári, M., von Tümpling, W., Kröpfl, K. (2004a) Biofilms as bioindicator for polluted waters? Total reflection X-ray fluorescence analysis of biofilms of the Tisza River (Hungary). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (4) 1095-1101
4. **Mages, M.**, Woelfl, S., Óvári, M., von Tümpling jr., W., Encina, F. (2004b) The use of a portable total reflection X-ray fluorescence spectrometer for trace element determination in fresh water microcrustaceans (*Daphnia*). *Spectrochimica Acta Part B* 59 (8) 1265-1272
5. **Mages, M.**, von Tümpling jun., W., van der Veen, A., Baborowski, M. (2006) Element determination in natural biofilms of mine drainage water by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 61 (10-11) 1146-1152.



---

## 2 THEORETISCHER TEIL

Elementbelastungen der Gewässer sind mit der menschlichen Besiedlung von Gebieten eng verbunden. Im Elbeinzugsgebiet beispielsweise konnte durch Sedimentkernuntersuchungen die Belastung bis ins Mittelalter zurückverfolgt werden (KRÜGER et al. 1999). Untersuchungen des Dauereises der Arktis haben nachgewiesen, dass bereits zur Römerzeit extreme Bleibelastungen in der Atmosphäre vorhanden waren, die mit Sicherheit auch die lokalen und regionalen Gewässer der damaligen Zeit beeinträchtigt haben (MARQUARDT und SCHÄFER 1997).

Da eine routinemäßige Spurenelementanalytik erst seit ca. 60 Jahren mittels AAS möglich ist (WELZ und SPERLING 1996), existieren auch erst seit dieser Zeit Routineuntersuchungen im Einzugsgebietsmaßstab mit Bezug zur Elementbelastung in den Gewässern. Die Wasser- und Sedimentqualität standen dabei zuerst im Fokus. Bei älteren Verfahren war eine extreme Voranreicherung notwendig, die eine flusseinzugsgebietsbezogene Aus- und Bewertung des Elementverhaltens im Gewässer einschließlich wesentlicher Transformations- und Akkumulationsprozesse nicht möglich machten (JORDAN et al. 1941).

Im Folgenden wird deshalb einerseits auf die wissenschaftlichen Erkenntnisse der Dynamik von Elementschadstoffen im Gewässer eingegangen und andererseits der Stand des Wissens bezogen auf die zu betrachtenden Biofilme und das Zoobenthos beschrieben, sowie die in der Arbeit angewandte Analysetechnik vorgestellt und auf die Notwendigkeit der Qualitätssicherung hingewiesen.

### 2.1 Elementverhalten in aquatischen Systemen

Elemente und deren Verbindungen gehören zu den natürlichen Bestandteilen der Erdkruste und sind in variierenden Konzentrationen bzw. Gehalten ubiquitär nachweisbar (PRESS und SIEVER 1995). Erst mit dem Beginn der Förderung von Bodenschätzen und den damit zahlreich verbundenen industriellen Prozessen wie Erzaufbereitung, Metallverhüttung, Metallbe- und -verarbeitung, Zementherstellung, Energiegewinnung und Chemieindustrie (Farbpigmente, Katalysatoren) gelangten sie als Schadstoffe über das Abwasser bzw. gebunden in Aerosolen mit der Abluft in die aquatische Umwelt (FELLENBERG 1990). Dabei ist in Fließ- und Standgewässern ein generell unterschiedliches Verhalten zu verzeichnen. Während es in den Sedimenten der Standgewässer zu einer permanenten Akkumulation kommt und Umlagerungen oftmals auf das Standgewässer selbst begrenzt bleiben (ZERLING et al. 2001), ist die räumliche Verlagerung der

elementbelasteten Sedimente im Fließgewässer von größerer Bedeutung. In den Flusssedimenten reichern sich Elemente an, werden bei größerer Strömung wieder remobilisiert, transportiert und sedimentieren fluss- bzw. stromabwärts wieder. Letztendlich erfolgt der Eintrag der Elementschadstoffe in die maritimen Bereiche. Bindungsumlagerungen, die die Mobilität im Wasser stark erhöhen, können dazu führen, dass Einträge im Grundwasser nachweisbar werden (FELLENBERG 1990). Die Elementanreicherung in Sedimenten geogenen Ursprungs wurden beispielsweise von SCHRECK et al. (2005) und SCHUBERT et al. (2003, 2005) ausführlich in der Bergbauregion Mansfelder Land untersucht und bewertet.

Zusätzlich kann der anthropogene Elementeintrag in die Oberflächengewässer zur Beeinträchtigung der Lebensgrundlagen aquatischer Lebensgemeinschaften führen. Für das Einzugsgebiet der Elbe konnte so nachgewiesen werden, dass beispielsweise die Flussperlmuschel bis auf wenige Standorte ausgestorben ist. Gleiches gilt für eine Reihe von Fischarten im Zeitraum bis 1990 (BLOHM et al. 1994, GAUMERT et al. 1994).

Eine ausführliche Beschreibung des Elementverhaltens im Fließgewässer sowie Erläuterungen zur Elementakkumulation in Biofilmen und im Zoobenthos erfolgen in den folgenden Unterkapiteln.

### **2.1.1 Elementvorkommen im Fließgewässer und deren Bewertung**

Elementuntersuchungen im Wasserkörper, in aquatischen Organismen und im Sediment bilden die Grundlage für die Ermittlung des chemischen Belastungszustandes eines Fließgewässers. Sie sind die Informationsquelle über die Verteilung, Bindungsform, Bioakkumulation und Remobilisierung der verschiedenen Metalle und können nur als Gesamtheit betrachtet werden (ABO-RADY 1983).

Neben den in Deutschland und Europa von der Bedeutung her abnehmenden industriellen Punktquellen (UBA-Texte 2006) und Einträgen aus der Landwirtschaft sind Siedlungsabwässer für die Elementbelastung deutscher Flüsse und Ströme relevant. Einleitungen aus kommunalen Kläranlagen und die Belastung durch diffuse Quellen stellen dabei Hauptursachen dar. Die daraus resultierende Elementfracht liegt im Durchschnitt bei 75 % (BÖHM et al. 2001). Als diffuse Emissionen dominieren die Einträge aus urbanen Flächen.

Hierbei sind vor allem die bei Regen über die Trenn- und Mischkanalisation eingeleiteten Elementschadstoffe sowie der direkte Eintrag des Abriebs von Reifenmaterialien und von Brems- und Straßenbelägen zu nennen. Hinzu kommen Erosionen, die einen Beitrag von 31 % leisten (BÖHM et al. 2001). Der Eintrag über das Grundwasser entspricht mit ca. 20 % in etwa dem geogenen Eintrag. Nicht zu vernachlässigende Emissionsquelle bilden die Dränagen, die bei Cd (17 %) und Zn (15 %) eine wichtige Rolle spielen (BÖHM et al. 2001).

Elemente, die atmosphärischen Ursprungs sind, bzw. aus diffusen und punktuellen Einleitungen resultieren und in Oberflächengewässer gelangen, zeigen ein sehr stark differenziertes Mobilitätsverhalten (WESTRICH et al. 2000, FÖRSTNER und SALOMONS 2004). Danach werden Transport und Verbleib im Fließgewässer wesentlich durch deren Verteilung in der gelösten, kolloidalen und partikulären Phase bestimmt (BABOROWSKI et al. 2003).

In Abhängigkeit von der Fließdynamik können Schadstoffbelastungen durch Verdünnung (Hochwasserereignisse) schnell verringert werden oder partikulär gebundene Elemente reichern sich im Sediment an (FÖRSTNER und MÜLLER 1974, BRÜMMER et al. 1994, KERN 1997, WESTRICH et al. 2000). Ist die Adsorptions- und Absorptionskapazität der Sedimente erreicht, kommt es zu einer Resuspension bzw. Mobilisierung und folgend zu einem Anstieg der Metallionen in der Wasserphase (WESTRICH 1985, FELLEBERG 1990, KERN 1997, WESTRICH et al. 2000). Diese Vorgänge werden wesentlich von verschiedenen hydrodynamischen und chemisch-physikalischen Prozessen gesteuert (LEGE et al. 1996). Der pH-Wert hat dabei auf die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit einen großen Einfluss (FÖRSTNER und SALOMONS 2004). Während höhere pH-Werte die Schwermetallverfügbarkeit vermindern, bewirkt eine Gewässerversauerung eine z. T. erhebliche Metallmobilisierung (WESTRICH et al. 2000).

Um die durch Elementschadstoffe verursachte chemische Belastung von Fließgewässern ermitteln zu können, werden unter anderem Elementuntersuchungen im Schwebstoff bzw. schwebstoffbürtigen Sediment durchgeführt. (FÖRSTNER und MÜLLER 1974, BABOROWSKI et al. 2004). Die Datenerhebung erfolgt vorrangig an größeren und mittleren Gewässern, an denen eine Belastung zu erwarten ist, bzw. an kleineren Gewässern, die mit ihrer Belastung einen punktuellen Eintrag darstellen. Die deutschlandweit anerkannte Aus- und Bewertung erfolgt nach der bestehenden Güteklassifikation für Fließge-

wässer. Dabei werden, analog zur Bewertung der „Biologischen Gewässergüte“ (Saprobienindex), für die chemische Klassifizierung 4 Haupt- und 3 Nebenklassen definiert.

Die Güteklassen werden mit fortschreitender Belastung von unbelastet bis ökologisch zerstört bewertet (EU-WRRL 2000). Daraus schlussfolgernd werden für die Elemente Blei, Cadmium, Nickel und Quecksilber derzeit im Rahmen der Überarbeitungen zur EG-Wasserrahmenrichtlinie EU-weit Umweltqualitätsnormen für die Einstufung abgeleitet. Damit soll bis 2015 ein guter chemischer Zustand der Gewässer erreichbar werden.

Der Zustand der Gewässer wird als „gut“ eingeschätzt, wenn sowohl der ökologische als auch der chemische Zustand als „gut“ bewertet werden (EU-WRRL 2000).

Die Maximalwerte für Schwermetalle in Sedimenten wurden für Cr mit  $640 \text{ mg kg}^{-1}$ , Cu mit  $160 \text{ mg kg}^{-1}$  und Zn mit  $800 \text{ mg kg}^{-1}$  festgelegt. Generell kann für deutsche Fließgewässer eingeschätzt werden, dass im Zeitraum 1999-2005 eine deutliche Abnahme der Schadstoffbelastungen an allen LAWA-Messstellen zu verzeichnen war (UBA-Texte 2007). Einen entscheidenden Beitrag zu dieser Umweltentlastung haben vor allem Maßnahmen im Bereich der Industrie durch verschärfte gesetzliche Anforderungen geleistet. Auch der seit 1990 eingetretene Rückgang industrieller Aktivitäten in den neuen Bundesländern und damit verbundene reduzierte Schadstoffbelastungen haben wesentlich beigetragen. Bereits 2000 spielten industrielle Direkteinleitungen nur noch eine untergeordnete Rolle (UBA-Texte 2006).

### ***2.1.2 Elementanreicherungen in biologischen Kompartimenten***

Elemente werden von aquatischen Organismen, abhängig von der Art und den Elementspezifikationen, über Atmungsorgane, Körperoberflächen und mit der Nahrung aufgenommen. Während die Aufnahme gelöster Elemente vorrangig über die Kiemen (Fische) oder die Körperoberfläche (Evertebraten) erfolgt, werden partikulär gebundene Metalle hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen (CHAPMAN et al. 1996, LUOMA und RAINBOW 2005).

In Abhängigkeit von der Exposition bzw. der Belastungsdauer können Elementgehalte in den Organismen unterschiedlich bewertet werden. Stetig ansteigende Gehalte, die keine unmittelbare Sättigungsphase erreichen, weisen auf eine „Netto-Akkumulation“ hin, während konstante Gehalte in der Aufnahme phase auf eine „Regulation“ hindeuten. Netto-

Akkumulatoren sind nicht in der Lage, die Ausscheidungsrate von Stoffen der Aufnahme-rate anzupassen, während Regulatoren konstante Elementgehalte im Körper innerhalb eines großen Bereichs externer Exposition aufrechterhalten können. Diese Fähigkeit der Organismen hängt stark von ihrer Artzugehörigkeit und den Stoffeigenschaften ab (ZAUKE et al. 2001).

Damit wird deutlich, dass erst das Verständnis der Akkumulationsstrategie eines Organismus die Bewertung gemessener Elementgehalte im Sinne einer unterschiedlichen bioverfügbaren Belastung der Umwelt erlaubt (RAINBOW et al. 1990, RAINBOW 1993, ZAUKE et al. 1995). Die Bioverfügbarkeit von Elementen ist wesentlich von deren Bindungsform und den biologischen Eigenschaften der Organismen abhängig (ZAUKE et al. 1996, LUOMA und RAINBOW 2005). Unter der Bioakkumulation von Elementen wird sowohl die extrazelluläre Adsorption, als auch die intrazelluläre absorbierte Stoffmenge verstanden. Die intrazelluläre Aufnahme von Metallionen erfolgt metabolismusabhängig und teilweise verlangsamt (CHAPMAN et al. 1996). Die Fähigkeit dieser Metallanreicherung wird durch den Anreicherungsfaktor (AF) bzw. Biokonzentrationsfaktor (BC) charakterisiert und bildet den Quotienten zwischen dem Metallgehalt im Organismus und der Metallkonzentration in der Wasserphase (ABO-RADY 1983). Dabei zeigen die Organismen, abhängig von der Elementspezifikation und physikalischen Basisparametern, unterschiedliche Anreicherungs-faktoren (ABO-RADY 1983, MEYLAN et al. 2003).

## 2.2 Biofilme

Bereits bei fossilen Funden konnte nachgewiesen werden, dass Biofilme vor mehr als 3 Milliarden Jahren existierten und somit eine der ältesten, noch heute bestehenden Lebensformen darstellen (CHARACKLIS und MARSHALL 1990). Eine erste große Entdeckung der Biologie in Biofilmen wurde 1683 von Antonie van Leeuwenhoek vorgestellt, der mit einem selbstgebauten Mikroskop Bakterien im Zahnbelag entdeckte (MEIER 1998, FLEMMING und WINGENDER 2001). Doch erst die 1943 durchgeführten umfangreichen Untersuchungen von ZOBELL hinsichtlich der Adsorption von Nährstoffen auf Glasoberflächen und die damit verbundene Ansiedelung von Mikrokolonien führte zu weiterführenden systematischen Untersuchungen des sessilen Wachstums von Mikroorganismen (ZOBELL 1943).

1964 untersuchten MITCHELL und MARSHALL in Bakterienreinkulturen die ersten Stadien der Biofilmbildung. Dabei differenzierten sie erstmalig die reversible Adsorption

von Bakterien an Oberflächen und die anschließende irreversible Bindung, die erste Phase der Biofilmbildung (Abb. 2-1).

In den letzten 3 Jahrzehnten hat die Intensität auf dem Gebiet der Biofilmforschung zugenommen. Nicht zuletzt durch die Vielfalt der Biofilme wurden die unterschiedlichsten Variationen in differenzierten Habitaten untersucht.

Die Besiedelung von Grenzflächen jeglicher Art ermöglicht den Biofilmen das ubiquitäre Auftreten, bevorzugt werden allerdings feste Oberflächen im feuchten Milieu (COSTERTON 1999, FLEMMING und WINGENDER 2001). Biofilme sind an den wichtigsten globalen Kreisläufen beteiligt, mobilisieren Mineralien und wirken durch ihre Fähigkeit Kohlenstoff zu binden wesentlich dem Treibhauseffekt entgegen. Einen wesentlichen Beitrag liefern sie zur Abwasser- und Abluftreinigung. Hier sei hauptsächlich die biologische Abwasserreinigung mittels Belebtschlamm (MANSER und SIEGRIST 2005) und die Anwendung von Biofiltern (JOSS et al. 2005) genannt.

Neben diesen positiven Effekten existieren Bereiche, in denen Biofilme zu großen Schäden führen können. Technisch und wirtschaftlich bedeutsam sind Biofilmbeläge an praktisch allen Materialien, an denen durch Biofouling und Biokorrosion hohe wirtschaftliche Schäden auftreten können (LEE und CHARACKLIS 1993, FLEMMING und WINGENDER 2002, FANG et al. 2002, WANNER und BAUCHROWITZ 2005).

HALL-STOODLEY et al. bezeichneten 2004 Biofilme treffend als „Dynamisches System mit den Eigenschaften eines facettenreichen Ökosystems“.

### **2.2.1 Aufbau und Entwicklung der Biofilme**

Biofilme entwickeln sich dort wo kleinste Mikroorganismen synergistische Gemeinschaften eingehen. Voraussetzung für diesen Zusammenhalt ist die Ausbildung einer polymeren Matrix, der so genannten „Extrazellulären polymeren Substanz“ (EPS). Diese besteht hauptsächlich aus hochmolekularen Polysacchariden, Proteinen sowie kleine Mengen von Lipiden und Nukleinsäuren. Sie werden von den Organismen selbst gebildet und ausgeschieden (FLEMMING und WINGENDER 2001, 2002). Der entsprechende Informationsaustausch zur Bildung der EPS erfolgt von Zelle zu Zelle und wird als *Quorum sensing* bezeichnet (WATERS und BASSLER 2005). Wie komplex und funktionell die EPS, auch als EPS-Matrix bezeichnet, ist, zeigen wissenschaftliche Publikationen in der Biofilmforschung. FLEMMING et al. (2007) nennt die EPS „House of biofilm cells“. Er bewertet in seinem „Guest Commentary“ den Stand der Forschung erst als den Beginn des

Verstehens des Konstruktionsprinzips, der sehr differenzierten Funktionen und der Dynamik innerhalb der EPS (FLEMMING et al. 2007).

Der Transportmechanismus zur Nährstoffversorgung ist wesentlich von der Beschaffenheit und dem Diffusionsverhalten der EPS abhängig (FLEMMING und WINGENDER 2001; 2002). Während sich im äußeren Bereich der EPS vorwiegend aerobe Bakterien ansiedeln, finden Anaerobier im sauerstoffarmen Biofilminnenen ideale Adaptionsbedingungen (De BEER et al. 1994, 1996). Diese differenzierten Ansprüche begünstigen die Entstehung von Mikrokonsortien (BISHOP 1997), die sich optimal an Umweltbedingungen anpassen (FLEMMING und WINGENDER 2001).

Die in Abb. 2-1 gezeigte Biofilmentwicklung kann bereits innerhalb weniger Stunden beginnen (CHARACKLIS und MARSHALL 1990).

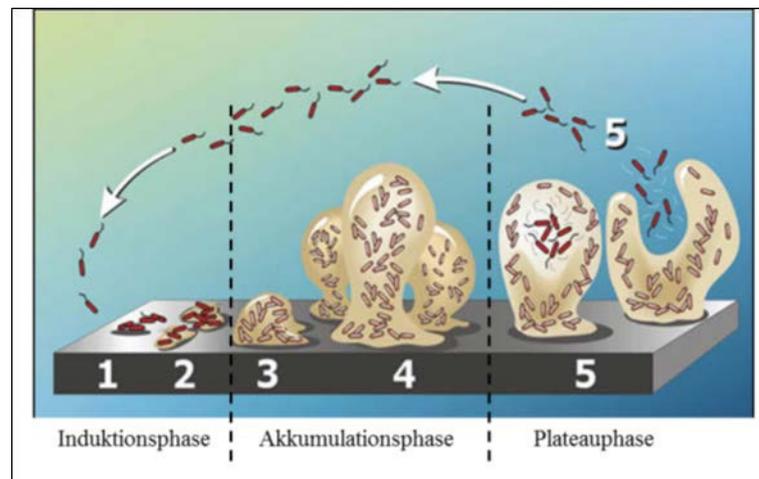


Abb. 2-1: Entwicklungsphasen von aquatischen Biofilmen (BOCH (2005), geändert Mages)

Während der **Induktionsphase** wird über das reversible Anheften von Bakterien (1) die EPS gebildet und es kommt zum irreversiblen Anheften (2). Dabei ist entscheidend, welches Medium (flüssige Phase: abhängig von Temperatur, pH-Wert, gelöste anorganische und organische Stoffkomponenten, hydrodynamische Parameter) und Substrat (feste Phase: abhängig von Chemismus, Oberflächenspannung und –ladung, Eignung für Besiedelung) den Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

In der **Akkumulations- bzw. Wachstumsphase** entwickelt sich der vorhandene Biofilm stetig weiter und hinzukommende Mikroorganismen werden adsorbiert (3). Eine Schlüsselrolle übernehmen dabei folgende Faktoren: Nährstoffkonzentration und deren Verfüg-

barkeit, Diffusionsverhalten innerhalb des Biofilms, Temperatur und biologische Diversität. Es erfolgt ein intensiver Informationsaustausch - „*Quorum sensing*“ (4).

Die **Plateauphase** stellt den 3. Abschnitt in der Biofilmentwicklung dar. Das für das Wachstumsumfeld mögliche Dickenwachstum ist abgeschlossen und Zuwachs- und Ablösprozesse verlaufen weitestgehend im Gleichgewicht. Das Ablösen von einzelnen oder größeren Konglomeraten kann unterschiedlichen Faktoren unterliegen, wie Erosion, Abweiden, Ablösung und Abrasion (5) (FLEMMING und WINGENDER 2001).

### 2.2.2 Vorkommen und Bedeutung aquatischer Biofilme

Im aquatischen Milieu leben nur ca. 1 % der Bakterien dispergiert im Wasser, während ca. 99 % aller Bakterien in Biofilmen auf natürlichen und synthetischen Aufwüchsen oder in frei schwimmenden Mikrokonsortien existieren (COSTERTON et al. 1987). In diesem Milieu bilden sich Biofilme hauptsächlich an den Grenzflächen zwischen Gas- und Flüssigphasen (z.B. Wasseroberfläche), Flüssig- und Festphasen (Gewässergrund) und Flüssig- und Flüssigphasen (Öl in Wasser).

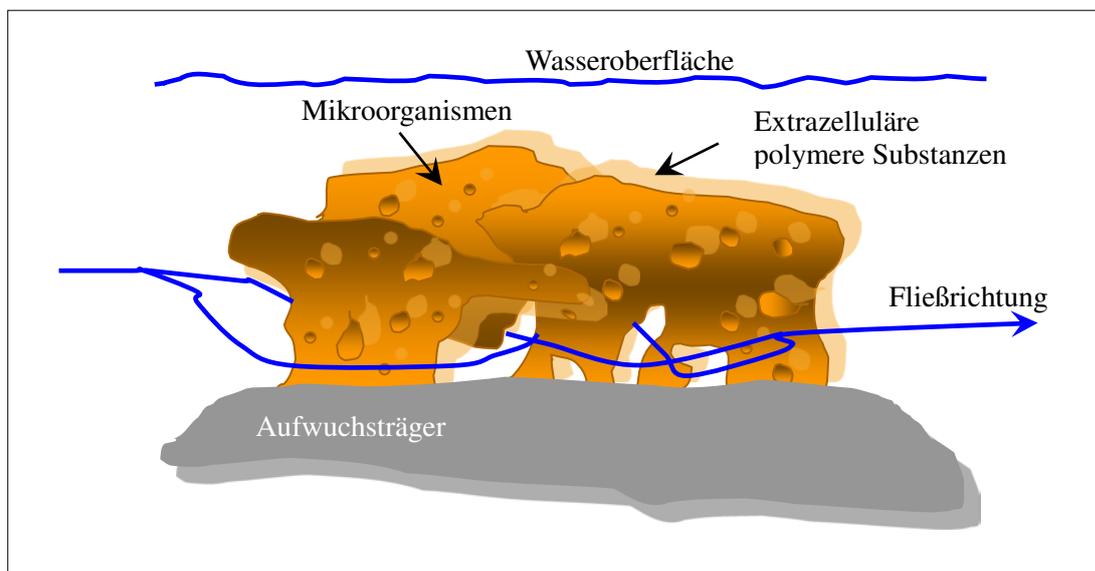


Abb. 2-2: Modellvorstellung eines aquatischen Biofilms (MAGES et al. 2006)

In dem in Abbildung 2-2 dargestellten aquatischen Biofilm-Modell werden die mehr oder weniger große Kavernen sichtbar, über die die Biofilme mit Medium umspült und so mit Nährstoffen und Sauerstoff teilweise bis in die untersten Schichten versorgt werden.

In Fließgewässern kommen algendominierte autotrophe Biofilme auf der Flusssohle und bakteriendominierte heterotrophe Biofilme hauptsächlich in Lückensystemen der Sedi-

mentationsschicht vor. Als Biomasseproduzenten bzw. Destruenten bilden sie in der Nahrungskette ein wichtiges Bindeglied (WANNER und BAUCHROWITZ 2005).

STOODLEY et al. untersuchten 1999 und 2000 den Einfluss der Fließgeschwindigkeit und der Bioverfügbarkeit von Nährstoffen auf die Biofilmstruktur und damit die Hydrodynamische Komplexität der Entwicklung aquatischer Biofilme. (STOODLEY et al. 1999, 2000).

Für die Abschätzung des Gefährdungspotentials von erhöhten Elementkonzentrationen bzw. -gehalten für Gewässer werden u. a. ökotoxikologische Testverfahren genutzt, wie beispielsweise der Leuchtbakterientest oder die Ermittlung des Saprobienindex. Ein weiteres besonders geeignetes Modellsystem für die Schadstoffbelastung von Gewässern bieten natürliche Gewässerbiofilme. Durch ihre zentrale Rolle im Stoffhaushalt, den Wechselwirkungen mit toxischen Substanzen und der Fähigkeit stationär über einen längeren Zeitraum Schadstoffe zu akkumulieren sind sie für die Modellierung von Belastungszuständen geeignet. Erste mathematische Modellversuche zur Beschreibung von Stofftransport und -umsatz in Biofilmen wurden bereits 1976 von WILLIAMSON und McCARTY (1976) und LA MOTTA (1976) entwickelt. Es folgten 1996 die Modellierung der oligotrophen Biofilmbildung, der Bleiaufnahme in den Biofilmkomponenten (NELSON et al. 1996) und 2000 eine mikroskalige Modellierung der Bakterien- und Biofilmdynamik (DILLON und FAUCI 2000). Neben weiteren Modellen entwickelte die EAWAG mit ihrem Simulationsprogramm „Aquasim“ ein heute weltweit verwendetes Computerprogramm für die Identifikation und Simulation aquatischer Biofilmsysteme (REICHERT 1998, WANNER 2005).

### ***2.2.3 Elementakkumulation in aquatischen Biofilmen***

Aquatische Biofilme können extrem empfindlich auf erhöhte Elementkonzentrationen reagieren. Während einige Metalle wie Kupfer und Zink in Abhängigkeit von der Konzentration auch für Gewässerorganismen essentiell sind, wirken Blei und Cadmium bereits gering verfügbar toxisch (BEHRA et al. 2005).

Vorrangig findet man in Fließgewässern Biofilme mit eher flacher Struktur, die in ihrer EPS neben Bakterien, Algen, Plankton und Pilzen, Schwebstoffe und schwebstoffbürtiges Sediment einlagern. In diesen Kompartimenten sind bereits die partikulär gebundenen Elemente der Wasserphase eingebettet. Sie ermöglichen allerdings keine Aussage darüber, welche Metallgehalte aus der gelösten Phase vom Biofilm direkt akkumuliert werden.

Laboruntersuchungen (KNAUER et al. 1997, CAMPBELL et al. 2002), von z. B. in Reaktoren gezüchteten Biofilmen (ZIMMERMANN 1997, GOLL 2001, MAGES et al. 2004a, ÓVÁRI et al. 2004a) haben gezeigt, dass Biofilme, die in Fliessgewässern mit einem relativ hohen Schwebstoffgehalt aufwuchsen, gelöste Elemente sehr gut absorbieren.

MEYLAN et al. untersuchten 2004 den Einfluss von Regenwasser auf die Metallakkumulation in Biofilmen und konnten anhand ihrer Mikrokosmosstudien feststellen, dass die Bioverfügbarkeit, die das eigentliche Gefahrenpotential für Mikroorganismen darstellen, durch die unterschiedlichsten Metallspezies bestimmt wird (MEYLAN et al. 2004, KRÖPFL et al. 2006). Wie diese intrazellulär in den Biofilmen agieren, konnte MEYLAN et al. (2003, 2004) am Beispiel für Cu und Zn nachweisen. Während der intrazelluläre Zn-Gehalt mit den freien Zinkionen im Wasser korreliert, kann das intrazelluläre Cu auch aus verschiedenen schwach komplexierten Spezies aufgenommen werden. BEHRA et al. stellten dagegen 2005 fest, dass die Elemente Cu und Pb leichter bioverfügbar sind, wenn sie in ionischer Form als  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Pb}^{2+}$  vorliegen.

Als Schutzmechanismus vor extrem toxischen Elementen haben viele aquatische Biofilme einen selektiven Entgiftungsmechanismus entwickelt. Über selbstgebildete intrazelluläre Moleküle, sogenannte Phytochelatine, wird akkumuliertes überschüssiges Metall gebunden und ist nicht mehr bioverfügbar. Diese Chelatbildung wird, in Abhängigkeit von den Parametern Nährstoffe, Licht und Temperatur, unter anderem durch erhöhte Elementgehalte im Wasser ausgelöst (LE FAUCHEUR et al. 2005). Außerdem enthält die Zellwand von Mikroorganismen funktionelle Gruppen die Elemente binden können. Sie fungieren damit als Barriere und können die Aufnahme toxischer Elemente kontrollieren. Dieser Vorgang wird als Biosorption bezeichnet. Die Aufnahme erfolgt schnell und temperaturunabhängig und ist, abhängig von den Milieubedingungen, reversibel (VOLESKY 1990). Weiterhin entscheidend sind die Algendominanz innerhalb des Biofilms und deren artenspezifische Elementtoleranz (LE FAUCHEUR et al. 2005).

MEYLAN et al. (2005) untersuchten unter anderem mit Kupfer und Zink belastetes Sediment im Kanton Zürich. Sie konnten feststellen, dass durch Starkregen mobilisierte Metalle sehr schnell in Biofilmen akkumuliert wurden. GOLL (2001) und ÓVÁRI et al. (2004b) wiesen in Laborversuchen nach, dass aquatische Biofilme nach einer zeitlich abhängigen Sorption Metalle wieder freisetzen können. Für diese Versuche wurden in speziellen Reaktoren Biofilme gezüchtet, bekannte Elementgehalte zugesetzt und das

Sorptionsverhalten zeitlich untersucht. Am Beispiel von Cu wurde die Abnahme der gelösten Fraktion in der Wasserphase gegenüber der Anreicherung im Biofilm bereits nach 1 h Reaktionszeit sichtbar. Nach 2 h Anreicherung wurde, mit geringen Schwankungen, die Plateauphase der Kupferkonzentration im Biofilm erreicht.

### 2.3 Zooplankton

Plankton umfasst die Gesamtheit der frei im Wasser schwebenden und sich selbst bewegendenden Organismen (HENTSCHEL und WAGNER 2004).

Nachdem bereits 1846 die Planktonforschung von dem berühmten Meeresbiologen Johannes Peter Müller systematisiert wurde, führte Victor Hensen 1889, kurz vor seiner ersten wissenschaftlichen Expedition, den Begriff „Plankton“ ein.

Wissenschaftlich haben UHLMANN und HORN 2001 unterschieden:

- Bakterioplankton (bakterielles Plankton): Kokken, Stäbchen, Vibrionen
- Phytoplankton (pflanzliches Plankton): Kieselalgen, Grünalgen, Dinoflagellaten usw.
- Einzellige Kieselalgen, die den Hauptteil des Phytoplanktons ausmachen. Diese Zellen sind von einer zweiteiligen Schale (Theka) aus Kieselsäure umgeben. Verschiedenen Untersuchungen zufolge ist die größte gebundene Menge an Kohlendioxid nicht in den tropischen Wäldern, sondern im pflanzlichen Plankton der Weltmeere gebunden (OTT 1996).
- Zooplankton (tierisches Plankton): Copepoden, Krill, Pfeilwürmer, Fischlarven, Polychaetenlarven und einige ausgewachsene (adulte) Borstenwürmer, Kleinkrebse und Krebslarven, Seesterne, Manteltiere sowie ihre Larven, Kammerlinge und andere Protozoen etc.

#### 2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von Zooplankton

Das Planktonaufkommen wird in Gewässern als ubiquitär bezeichnet. Alle planktischen Organismen, die keine Photosynthese betreiben und deren Nahrungsquelle andere Organismen sind, werden zum Zooplankton gezählt. Dabei wird zwischen herbivoren und carnivoren Zooplanktern unterschieden. Zum herbivoren Zooplankton zählen jene Arten, die sich direkt vom Phytoplankton ernähren. Zooplankter, die sich von anderem Zooplankton ernähren, bezeichnet man als carnivor. Diese Fraßbeziehungen sind in der Nahrungskette

miteinander gekoppelt. Einige Organismen besitzen die Fähigkeit sowohl Partikel und Organismen aufzunehmen und auch Photosynthese zu betreiben. Diese werden als mixotroph bezeichnet. Wie groß ihr Anteil im Nahrungsgefüge ist, hängt von der Beschaffenheit des Gewässers ab (UHLMANN und HORN 2001).

In limnischen Ökosystemen nehmen das Zooplankton und hierbei besonders die Kleinkrebse, eine Schlüsselposition ein. Indem sie das Phytoplankton filtrieren, regulieren sie den Pflanzenwuchs. Sie geben Auskunft über den ökologischen Belastungszustand eines Gewässers (SCHMINKE 2004).

Eine große Rolle spielt das Zooplankton, vorrangig *Daphnia*, bei der Trinkwassergewinnung. Hierbei nutzt man, wie in Abb. 2-3 dargestellt, das Prinzip der „Biomaniplulation“. Es wird ersichtlich, dass die Wasserqualität wesentlich vom Zooplanktonaufkommen abhängt. So filtriert das Zooplankton Algen der Fraktion  $< 30 \mu\text{m}$ , Schwebstoffe und Bakterien sowie in diesen gebundene organische und anorganische Schadstoffe. Werden diese Zooplankter durch eine zu große Population an Friedfischen gefressen, wird dieser Ablauf gestört. Als Folge davon dominieren dann die für die Trinkwassergewinnung unerwünschten kleinzelligen Planktonorganismen. Durch einen verstärkten Einsatz von Raubfischen kann das notwendige ökologische Gleichgewicht wieder hergestellt werden (WAHNBACHTALSPERRENVERBAND 2010).

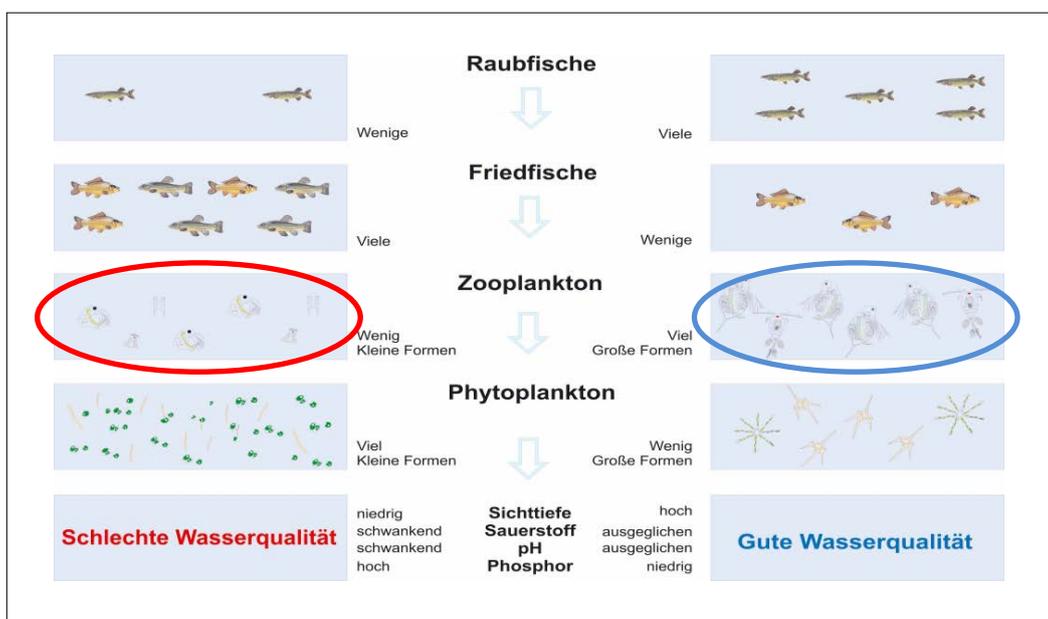


Abb. 2-3: Bedeutung des Zooplanktons und der Biomaniplulation zur Trinkwasseraufbereitung (WAHNBACHTALSPERRENVERBAND 2010)

Darüber hinaus stellt Zooplankton einen wichtigen Indikator für sich abzeichnende Klimaveränderungen dar. Dabei wird die rückläufige Nahrungsverfügbarkeit der sommerlichen Phytoplankton-Blüten und winterlicher Eisalgen als Indiz für systematische Änderungen der Planktonhäufigkeit- und Zusammensetzung angenommen (SCHRÖDER 2005).

### **2.3.2 Elementakkumulation im Zooplankton**

In einer Vielzahl von Fachpublikationen wird auf die Elementakkumulation im Plankton eingegangen. Dabei sind unterschiedlichste Forschungsansätze bedeutsam. Die wichtigsten Elemente führen aufgrund ihrer Persistenz in der Umwelt zu Elementanreicherungen in den aquatischen Ökosystemen und tendenziell zu einer Bioakkumulation, vorrangig im Zooplankton (VEENA et al. 1997). Bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen können die Elemente zu schädigenden bzw. toxischen Wirkungen auf die Entwicklung von aquatischen Organismen in der Wasserphase führen. Darüber hinaus entwickeln einige Zooplanktonarten Elementtoleranzen und passen sich ihren Lebensbedingungen an (MUYSEN und JANSSEN 2002). WOELFL et al. (2004a) verglichen Zooplankton aus einem unbelasteten chilenischen See mit dem eines kupferbelasteten Wasserreservoirs in der chilenischen Andenregion. Dabei konnte teilweise eine 8-fach höhere Kupferkonzentration im Zooplankton des belasteten Reservoirs festgestellt werden.

In Abhängigkeit von der Artzugehörigkeit, den chemischen Eigenschaften der Elemente und den Milieubedingungen können die Aufnahme und die Ausscheidung von Elementen wesentlich variieren (ZAUKE et al. 2001). Die dafür entwickelten Akkumulationsstrategien reichen von Netto-Akkumulatoren bis zu reinen Regulatoren. Während Netto-Akkumulatoren nicht in der Lage sind, die Ausscheidungsrate der Aufnahmerate anzupassen, können Regulatoren einen konstanten Elementgehalt im Organismus gegen eine externe Exposition aufrechterhalten (ZAUKE et al. 2001).

## **2.4 Elementanalytik mit der „Total reflektierenden Röntgenfluoreszenz-Analytik“ (TXRF)**

Die Total reflektierende Röntgenfluoreszenz-Analytik (TXRF) ist eine energiedispersive, zerstörungsfreie Analysenmethode, die in den letzten Jahrzehnten als eigenständige Technik in der Mikro- und Spurenanalytik (KLOCKENKÄMPER 1987, von BOHLEN 1988, PRANGE et al. 1991, REUS et al. 1993, von BOHLEN 2007) sowie in der Halbleiter- und Oberflächenanalytik (von BOHLEN 2007) von zunehmender Bedeutung ist.

Aufbauend auf dem Prinzip der herkömmlichen Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) entwickelten YONEDA und HORIUCHI 1971 einen apparativen Versuchsaufbau, bei dem zur Reduzierung des Störuntergrundes die Röntgenstrahlung in einem niedrigen Winkel auf die polierte Oberfläche eines planen Probenträgers fokussiert wurde.

Sowohl einfallender als auch ausfallender Strahl regen die Probe zur Reflektion an und bildet die Grundlage für die Totalreflektion (YONEDA und HORIUCHI 1971). Während in der Anfangszeit der TXRF für einzelne Elemente Nachweisgrenzen im Nanogramm-Bereich erreicht wurden, konnten Ende der siebziger Jahre die Detektionsgrenzen durch entsprechende instrumentelle Veränderungen teilweise auf 5 pg reduziert werden (WOBRAUSCHEK und AIGINGER 1975). Weiterentwicklungen von KNOTH und SCHWENKE führten 1978 zum Bau des ersten Prototypen. 1981 folgte die erste kommerzielle Herstellung. 1990 wurden die TXRF-Geräte mit Drehanodenröhren für die Anregungsstrahlung und Multilayern zur Monochromatisierung der Primärstrahlung ausgerüstet. Dies führte nochmals zur Verbesserung des Nachweisvermögens. Der heutige Einsatz von Synchrotron-Strahlung (SR-TXRF) ermöglicht eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenzen der Methode im unteren fg-Bereich (RIEDER et al. 1995). So konnten STRELI et al. (2006) für Ni eine NWG von 8 fg detektieren. Derartig konfigurierte Anlagen konnten sich aufgrund der Gerätegröße und des finanziellen Aufwandes bisher nur vereinzelt etablieren.

Seit 1995 wurden eine Vielzahl von Publikationen zu technischen Entwicklungen der TXRF und ihren umfangreichen Applikationen in Spezialausgaben der *Spectrochimica Acta* veröffentlicht (WOBRAUSCHEK 2007). Mit der Anwendung der TXRF ist es möglich, ein breites Spektrum der Elemente des Periodensystems simultan qualitativ zu erfassen und mit hoher Präzision bis in den pg-Bereich zu quantifizieren. Der geringe Bedarf an Verbrauchsmaterialien bietet für die Elementbestimmung eine sehr gute Alternative zu herkömmlichen spektroskopischen Analysemethoden, wie der AAS und der ICP-MS (SANZ-MEDEL 1998, KAHLE et al. 2002). Hinzu kommt die hohe Einsatzflexibilität, vor allem zur Analyse biologischer Feststoffproben, die oft nur in geringer Einwaage (unterer  $\mu\text{g}$ -Bereich) zur Verfügung stehen (PETTERSON 1998).

### 2.4.1 *Physikalisches Prinzip der TXRF und deren Anwendung*

#### (1) *Röntgenfluoreszenz*

Grundlegendes physikalisches Prinzip des Elementnachweises im Probenmaterial mittels TXRF bildet die Röntgenfluoreszenzanalyse und dabei die Nutzung primärer Röntgenstrahlung. Röntgenstrahlung bedeutet hierbei die elektromagnetische Strahlung mit Photonenenergie im keV-Bereich. Entstehende Röntgenspektren bestehen aus überlagerten diskreten Linien, die für die einzelnen Elemente jeder Probe charakteristisch sind.

Diese diskreten Linien, genannt Linienspektrum, werden erzeugt, wenn durch Röntgenstrahlen Elektronen der Atome der inneren Schalen herausgeschleudert werden. Daraus resultierend befinden sich die Atome in einem höherenergetischen Zustand. Werden die dabei entstehenden Lücken durch Elektronen der äußeren Schalen aufgefüllt, kann ein Röntgenquant emittiert werden (Abb. 2-4). Das wiederum führt zum Erscheinen von Spektrallinien bzw. Peaks im Röntgenspektrum. In Abhängigkeit des Ortes der Elektronenübergänge (K-, L- oder M-Schale) werden die entstehenden Spektrallinien als K-, L- oder M-Linien bezeichnet. Zur weiteren Differenzierung wird mit  $\alpha$  die stärkste Linie und mit  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$  und  $\iota$  die schwächeren Linien bezeichnet. Zahlen als Indizes ermöglichen eine weitere Unterscheidung. Die Energie  $E$  der einzelnen Spektrallinien ist von der Ordnungszahl  $Z$  abhängig und wird nach dem Moseley'schen Gesetz wie folgt interpretiert:

$$E_i = k_i * (Z - \sigma_i)^2 \quad (1)$$

$E_i$ : Energie der Spektrallinien

$Z$ : Ordnungszahl

$k_i$  und  $\sigma_i$ : Konstanten

Die Werte der Konstanten  $k_i$  und  $\sigma_i$  sind abhängig von den einzelnen Spektrallinien. Diese Linien stehen elementspezifisch immer im gleichen Verhältnis und ergeben ein Elementspektrum. Bei einer simultanen Anregung der detektionsfähigen Elemente nehmen alle Linien gleichermaßen an Intensität zu (KLOCKENKÄMPER 1987).

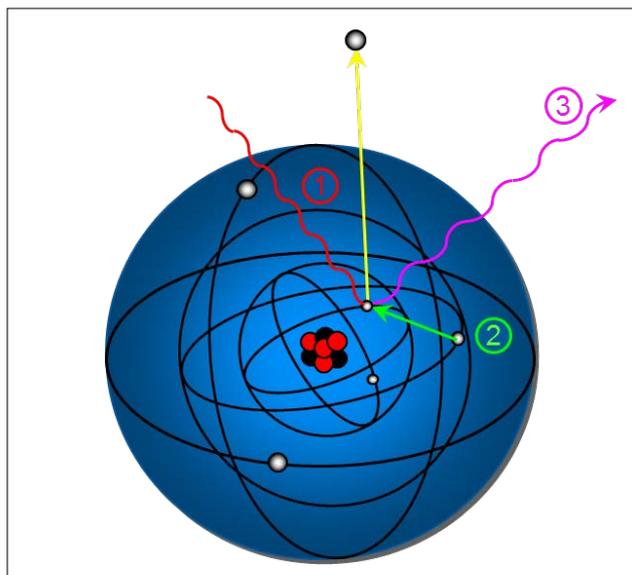


Abb. 2-4: Atommodell: (1) Röntgenstrahlen beschießen Elektronen der inneren Schalen, (2) entstehende Lücken werden mit Elektronen äußerer Schalen aufgefüllt und (3) freiwerdende Energie wird in Form von element-spezifischer Fluoreszenzstrahlung abgegeben und detektiert

## (2) Totalreflektion

Totalreflektion ist die vollständige Reflektion von Röntgenstrahlung beim Übergang vom optisch dichteren zum optisch dünneren Medium (Quarzglas, Plexiglas, Glaskohlenstoff oder Saphir). Voraussetzung ist, dass die Oberfläche entsprechend poliert und eben ist und der Messwinkel dementsprechend klein. Für Röntgenstrahlung ist jedes Medium optisch dünner als Vakuum, da der Brechungsindex  $n$  kleiner als 1 ist. Die Abweichung zu 1 wird als Dekrement  $\delta$  bezeichnet und wie folgt berechnet (KLOCKENKÄMPER 1991):

$$\delta = 4,12 \cdot 10^{-4} \cdot (Z_i/A_i) \cdot \rho \cdot E^{-2} \quad (2)$$

$\delta$ : Dekrement

$Z$ : Ordnungszahl des Elementes  $i$

$A_i$ : relative Atommasse des Elementes  $i$

$\rho$ : Dichte des Mediums [ $\text{g cm}^3$ ]

$E$ : Energie der Röntgenstrahlung [keV]

Die Eindringtiefe beträgt nur wenige nm, so dass Streustrahlung weitestgehend minimiert wird. Die Anregungsstrahlung wird fast vollständig reflektiert und einfallender und reflektierender Röntgenstrahl regen die Probe mit einer sehr hohen Ausbeute zur charakteristischen Fluoreszenzstrahlung an (Abb. 2-5).

Diese wird über einen senkrecht zum ein- bzw. ausfallenden Strahl angeordneten energie-dispersiven Halbleiterdetektor erfasst und letztendlich nach entsprechender Umwandlung als energetisches Röntgenspektrum ausgewiesen.

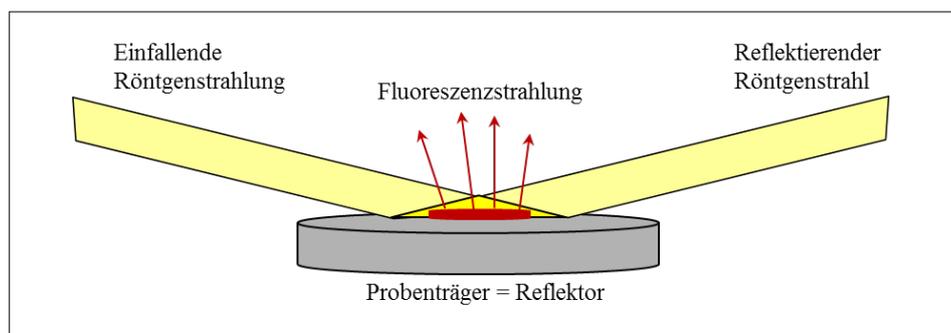


Abb. 2-5: Totalreflektion von Röntgenstrahlen für die Spektralanalyse

In der Abb. 2-6 ist der Aufbau und Strahlengang eines TXRF-Spektrometers schematisch dargestellt. Bei den einzelnen Gerätetypen variieren, je nach Anforderung, die Röntgenröhre, die optische Strahlenführung, die Ausrichtung der Probenträger und der Detektortyp.

Als Voraussetzung für die Totalreflektion gilt die Präparation als dünne Schicht, mit einer Schichthöhe von max. 10  $\mu\text{m}$  (KLOCKENKÄMPER 1987). Die derzeit erreichbaren Nachweisgrenzen liegen teilweise unterhalb von 10 pg bzw.  $10^{10}$  Atomen  $\text{cm}^{-2}$ .

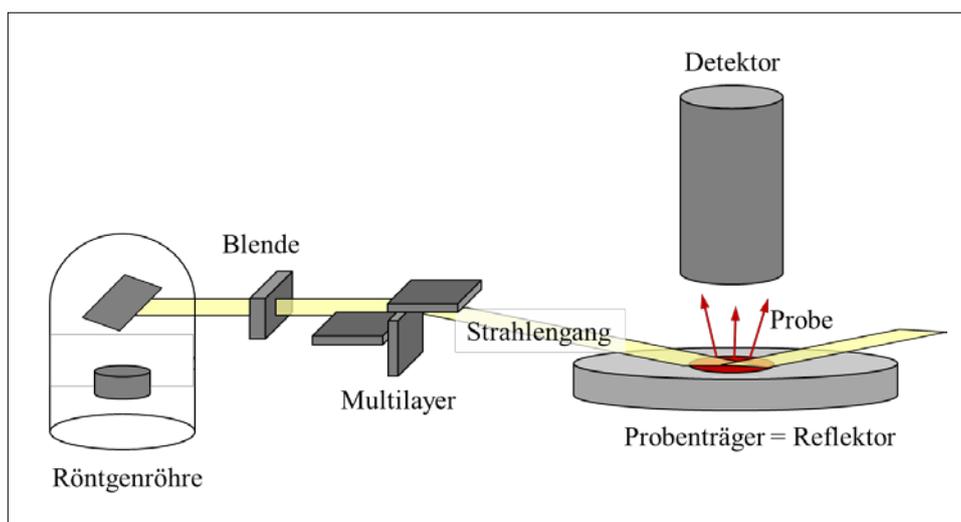


Abb. 2-6: Schematischer Aufbau eines TXRF-Spektrometers (Bruker Nano GmbH, geändert Mages)

### (3) Anwendungsgebiete sowie Vor- und Nachteile der TXRF

Die Publikationen der letzten 3 Jahrzehnte und entsprechende Literaturlauswertungen, wie beispielsweise von WOBRAUSCHEK 2007 und SZOBOSZLAI et al. 2009, beschreiben den vielfältigen Einsatz der TXRF. Prinzipiell können Elemente in fast allen Flüssigkeiten und Feststoffproben mit der TXRF bestimmt werden, vorausgesetzt die Präparation in dünnen Schichten ist gewährleistet. Die Anwendung erfolgt vorrangig in den Bereichen der Umweltchemie (Wasser-, Luft-, Boden- und Feststoffproben), der Biomedizin und Forensik und in der Industrie zur Qualitätskontrolle.

Die Vorteile der Methode sind wie folgt begründet:

- Simultanbestimmung der meisten Elemente
- geringes Proben-, bzw. Präparationsvolumen ( $\mu\text{g}$ - und  $\mu\text{L}$ -Bereich)
- niedrige Kosten an Verbrauchsmaterialien (kein Trägergas)
- frei von Memory-Effekten
- qualitative und quantitative Auswertung bis in den Ultraspurenbereich
- einfache Quantifizierung über interne Standardisierung
- ständige Kalibrierungen entfallen

Wie jede Analysenmethode weist auch die TXRF Nachteile auf. Diese sind:

- aufwendiges Reinigungsprozedere der Probenträger
- Voraussetzung für die Präparation in dünnen Schichten ist eine geübte Handhabung
- leichte Elemente sind nur mit sehr hoher Standardabweichung bzw. Wechsel der Anregungsstrahlung oder Einsatz einer Vakuumkammer detektionsfähig

#### 2.4.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung für die TXRF-Analytik basiert auf der Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Analyten. Bei gleichzeitiger Verwendung eines internen Standards bekannter Konzentration ergibt sich folgende Korrelation (KLOCKENKÄMPER 1987):

$$c_x = \frac{N_x / S_x}{N_{is} / S_{is}} * c_{is} \quad (3)$$

- $c_x$ : Konzentration Analyt  
 $N_x$ : Nettointensität Analyt  
 $S_x$ : relative Empfindlichkeit Analyt  
 $c_{iS}$ : Konzentration interner Standard  
 $N_{iS}$ : Nettointensität interner Standard  
 $S_{iS}$ : relative Empfindlichkeit interner Standard

Bei kommerziell hergestellten TXRF-Spektrometern sind die notwendigen Kalibrierfaktoren bereits in der Software hinterlegt, die Berechnung der Dotierung des Elementes für die interne Standardisierung vereinfacht sich dann wie folgt:

$$V_{iS} = \frac{c_{iSP}}{c_{iS}} * V_P \quad (4)$$

- $V_P$ : Volumen der Probe  
 $V_{iS}$ : Volumen interner Standard (Dotiervolumen)  
 $c_{iSP}$ : Konzentration interner Standard in der Probe  
 $c_{iS}$ : Konzentration interner Standard

Für die interne Standardisierung ist darauf zu achten, dass eine Überlagerung mit anderen Elementpeaks vermieden wird und der Peak des internen Standards eine relevante Höhe im Verhältnis zu den Analytenpeaks aufweist. Nur so ist eine reproduzierbare Entfaltung der Spektren möglich (KLOCKENKÄMPER 1987).

Für die Quantifizierung mit der TXRF sind folgende Hauptschritte der Probenpräparation möglich:

1. nach der Zugabe eines internen Standards werden flüssige Proben (10 - 20  $\mu$ L) direkt auf den Probenträger aufgebracht und eingetrocknet. Proben mit geringen Elementgehalten können direkt auf den Probenträgern aufkonzentriert werden
2. festes Probenmaterial wird aufgeschlossen und wie flüssiges Probenmaterial weiterbehandelt
3. Feste Mikroproben, wie Aerosole, Gefrierschnitte, Zooplankton usw. werden direkt mit der Zugabe eines internen Standards auf dem Probenträger aufgeschlossen (KLOCKENKÄMPER 1987).

Zur qualitativen Analyse bzw. für einen „Fingerprint“ ist der Abrieb einer Probe vollkommen ausreichend.

### **2.4.3 Qualitätssicherung (QS)**

Die Qualitätssicherung umfasst als Gesamtheit alle Tätigkeiten des Qualitätsmanagements, der Qualitätsplanung, der Qualitätslenkung und der Qualitätsprüfungen. Im Qualitätsmanagement liegt dabei die Aufgabe der Gesamtführung, die die Qualitätspolitik festlegt und zur Ausführung bringt. Die Qualitätsplanung beinhaltet das Auswählen, Klassifizieren und Gewichten der Qualitätsmerkmale, sowie das Konkretisieren der Qualitätsforderung hinsichtlich der Berücksichtigung von Anspruchsniveau und Realisierungsmöglichkeiten. Mit der Qualitätslenkung werden die Werte der Qualitätsmerkmale überwacht. Als Qualitätsmerkmal wird das die Qualität mitbestimmende Merkmal definiert (FUNK et al. 1992).

Besonders im Spurenbereich sind, beginnend von der Probennahme über die Probenvorbereitung bis hin zur Messung, systematische und zufällige Fehler zu unterscheiden, die das Mess- bzw. Analyseergebnis wesentlich beeinflussen können. Analyseergebnisse sind nur dann von wissenschaftlichem Nutzen, wenn sie „richtig“ sind (FECHER 1997).

Die für diese Arbeit relevanten Maßnahmen der analytischen Qualitätssicherung werden im Folgenden beschrieben.

#### *(1) Kontaminationsrisiken bei TXRF-Untersuchungen*

Für das Arbeiten im Spurenbereich stellen die Umgebungsbedingungen, die verwendeten Verbrauchsmaterialien und letztlich der Bearbeiter selbst mögliche Kontaminationsquellen dar. Bereits 1972 wies TÖLG auf die Einhaltung definierter Qualitätskriterien zur Spurenanalytik hin. Neben dem „*sub-boiling*“ von Säuren, der Verwendung von „sterilen Werkbänken“ und diverser Reinigungsapparaturen lag der Fokus stets in der Vermeidung von Kontaminationen. FECHER (1997) resümierte treffend, dass durch vereinfachte Handhabung hochempfindlicher Analysengeräte Anwendern suggeriert wird, dass mit dem Gerät allein die Genauigkeit und Richtigkeit der Analyseergebnisse gewährleistet ist.

Wie auch andere Messprinzipien ermöglicht die TXRF die direkte Überprüfung auf Kontaminationen der für die weitere Probenbearbeitung verwendeten Reagenzien und Säuren (PRANGE et al. 1991).

Durch die oftmals geringen Probenmengen sollte zur Vermeidung von Kontaminationen die Probenbearbeitung weitestgehend unter einer sterilen Arbeitsbank „clean bench“ erfolgen (TÖLG 1972, KLOCKENKÄMPER 1987).

Die in der Analytik übliche und vom Arbeitsschutz verlangte Anwendung von Einweg-Handschuhen ist in diesem Zusammenhang für die Spurenanalytik kritisch zu prüfen. Bedingt durch den Galvanisierungsprozess, bei dem Zinkoxid als Hilfsstoff eingesetzt wird (OHNESORGE und WILHELM 1991), ist das Element Zn an allen Einweg-Handschuhen nachweisbar und stellt ein Kontaminationsrisiko dar.

Neben der Verwendung besonders gereinigter Probenbehälter aus geeigneten Kunststoffmaterialien stehen auch diverse Hilfsmittel, wie Scheren, Messer und Skalpelle, aus Keramik zur Verfügung (RUHNKE 1997, KLOCKENKÄMPER 1987). Zur Vermeidung von Elementkontaminationen im Probenvorbereitungsprozess sollte das gesamte Equipment metallfrei sein.

#### (2) *Blindwertmessungen*

Als Blindproben werden Analysenproben bezeichnet, die frei von der zu bestimmenden Komponente sind und wie eine reale Probe den gesamten Analysenablauf durchlaufen. Das Analyseergebnis dieser Probe wird als Blindwert bezeichnet (FUNK et al. 1992). GASPARNON zeigte 1998 die Notwendigkeit der Blindwertmessungen über den gesamten Probenverlauf im Feld als Indiz eventueller Kontaminationen.

Bei der Anwendung der TXRF ist zusätzlich noch zwischen den „Probenblindwerten“ einerseits und den Messungen des leeren Probenträgers andererseits, die ebenfalls als Blindwerte („Probenträgerblindwerte“) bezeichnet werden, zu unterscheiden.

Während die „Probenblindwerte“ alle Reagenzien beinhalten und das gesamte Probenbearbeitungsprozedere „erleben“, stellen die „Probenträgerblindwerte“ die Verunreinigungen der Präparationsträger (Quarzglasprobenträger, Reflektor usw.) dar.

Die Reinheit der Probenträger ist Voraussetzung für das Arbeiten im Spurenbereich (KLOCKENKÄMPER 1987).

### (3) *Routinemäßige Validierung der Nachweisgrenzen*

Voraussetzung für eine reproduzierbare Quantifizierung ist die regelmäßige Überprüfung der Nachweisgrenzen (NWG). Diese wird für die TXRF vorzugsweise mit Einzelelementstandards (ICP-Qualität) durchgeführt.

Dazu wird eine definierte Menge eines geeigneten Elementstandards auf einen Probenträger präpariert und gemessen.

Für die Mo-Anregung werden vorrangig 1 ng Ni und für die W-Anregung 1 ng Cd verwendet.

Die Nachweisgrenze berechnet sich nach folgender Gleichung (KLOCKENKÄMPER 1987):

$$NWG = \frac{\sqrt[3]{\text{Untergrund}}}{\text{Nettosignal}} * \sqrt{\frac{t(\text{sec})}{1000}} * 1000 \quad (5)$$

*Untergrund:* Differenz der Zählraten von Brutto- und Nettosignal

*Nettosignal:* reale Zählrate für den Einzelelementstandard

*t:* Messzeit in Sekunden

Die Bestimmung der Nachweisgrenze ermöglicht die Überprüfung, ob das gesamte optische System optimal eingestellt ist. Geringste Abweichungen der Anregungsstrahlung, zum Beispiel durch die Alterung der Röntgenröhre oder Veränderungen des Strahlenganges, können so nachgewiesen werden. Die regelmäßige Kontrolle sollte deshalb ein wesentlicher Bestandteil der Qualitätssicherung sein (KLOCKENKÄMPER 1987).

Ein wichtiger Aspekt der Qualitätssicherung bei der Anwendung der TXRF ist die regelmäßige Durchführung der Gain-Korrektur. Damit wird die, besonders nach längerer Betriebszeit auftretende, Drift der spektroskopischen Verstärkung korrigiert. Kommerzielle Geräte bieten diese Korrektur bereits in der Software integriert an (HANDBUCH Bruker Nano GmbH 2008).

---

### **3 EXPERIMENTELLER TEIL ZUR ELEMENTBESTIMMUNG IN BIOLOGISCHEN PROBEN**

Entsprechend der Motivation der Arbeit wurden eigene Methodenentwicklungen und -adaptionen zur Elementbestimmung an biologischem Material sowie exemplarische Feldeinsätze zu deren Bewertung realisiert. Zum einen wurde umfangreiches Biofilmmaterial, teilweise natürlich gewachsenen Ursprungs und parallel auf künstlichem Trägermaterial kultiviert, untersucht. Das unterschiedliche Akkumulations- bzw. Sorptionsverhalten in bergbaubeeinflussten Regionen (Mansfelder Land in Deutschland und Einzugsbereich der Tisza in Ungarn) wurde näher betrachtet und bewertet. Andererseits wurde methodisch untersucht, inwieweit die TXRF die Möglichkeit bietet, in einzelnen Zooplankton-Individuen reproduzierbare und gewichtsabhängige Elementbestimmungen durchzuführen. Der Einsatz und die Eignung einer portablen TXRF bei Felduntersuchungen versus stationäre TXRF stellten einen weiteren wesentlichen Aspekt zur effektiven Elementbestimmung dar. Voraussetzung für das präparative Arbeiten war die Einhaltung und Anwendung bestehender Qualitätsrichtlinien, die Berücksichtigung gerätespezifischer Eigenheiten und Einbindung jahrelanger eigener Erfahrungen.

#### **3.1 TXRF-Analytik und Qualitätssicherung (QS)**

Für die quantitativen Elementbestimmungen, teilweise in Mikroproben, wurde die TXRF genutzt. Der Einsatz zweier TXRF-Systeme, zum einen eines stationären und andererseits eines portablen Spektrometers, boten die Möglichkeit des unmittelbaren Vergleiches sowohl für die praktische Anwendung als auch mit Bezug zu Wiederfindungsraten.

Zur Bewertung der entwickelten Methoden wurden Qualitätssicherungsmaßnahmen, wie in Kap. 2.4.3 beschrieben, genutzt. Diese Maßnahmen sind Bestandteil der in der Problemstellung angeführten Publikationen.

### 3.1.1 TXRF-Equipment

Für die Methodenentwicklungen und die folgenden Felduntersuchungen kamen folgende in Abb. 3-1 dargestellten TXRF-Analysengeräte zum Einsatz:

- stationäre Messungen im Labor:  
TXRF 8030 C (Cameca (ehemals Atomika) Oberschleißheim, Deutschland)
- Feldmessungen:  
S2 PICOFOX™ (vormals PicoTAX) (Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland)

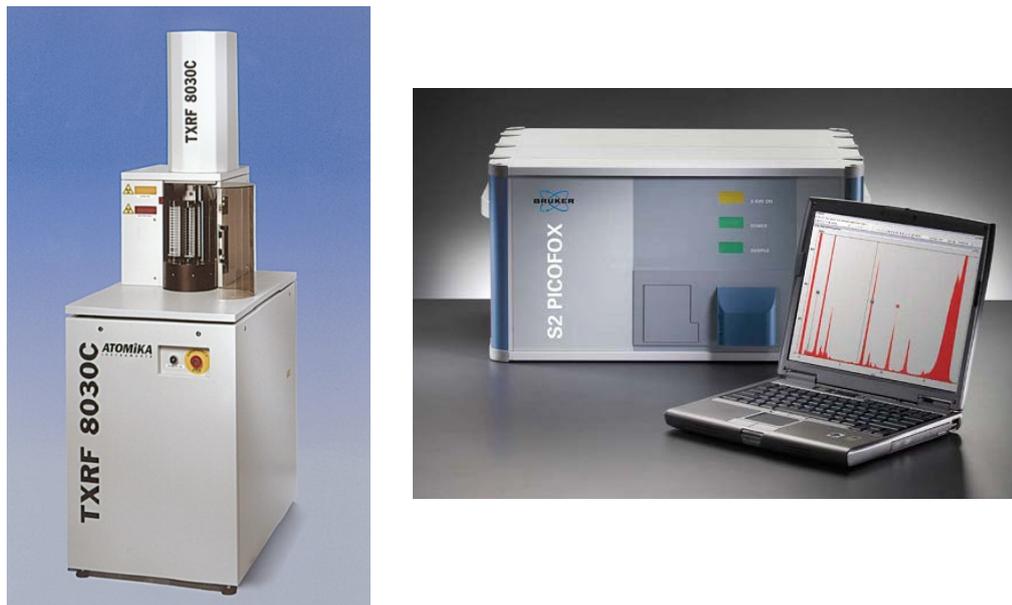


Abb. 3-1: Stationäres TXRF-Spektrometer 8030 C (links) und portables Tischgerät S2 PICOFOX™ (rechts)

In Tabelle 3-1 sind die Spezifikationen der verwendeten TXRF-Spektrometer dargestellt. Das Tischgerät PICOFOX™, mit Peltier-gekühltem X-flash Detektor, luftgekühlter Röntgenröhre und relativ wartungsfreier Mechanik ausgestattet, ist vielfältig einsetzbar. Das stationäre Großgerät 8030 C ermöglicht zwar einen hohen Probendurchsatz, ist aber aufgrund der komplizierten pneumatisch gesteuerten Mechanik wesentlich störanfälliger. Hinzu kommt die ständige Versorgung mit flüssigem Stickstoff für den Si(Li)-Detektor und die Wartung der wassergekühlten Röntgenröhre.

Tab. 3-1: Technische Spezifikationen der verwendeten TXRF-Spektrometer

	<b>TXRF 8030 C</b>	<b>PICOFOX™</b>
Röntgenröhre	Mo/W- Anregung 50 kV, 45 mA Wasserkühlung	Mo-Anregung 50 kV, 1 mA Luftkühlung
Optik		Multilayer Monochromator
Detektor	Si(Li), 80 mm <sup>2</sup> Kühlung mit flüssigem Stickstoff	Si Drift Detektor XFlash® 30 mm <sup>2</sup> , <150 eV (Mn K $\alpha$ ) Peltier-Kühler (PEC)
Auflösung	148 eV	<150 eV
Autosampler	8 Kassetten á 18 Proben­träger	1 Kassette für 25 Proben­träger
Größe, Gewicht	Standgerät	Tischgerät 450 x 590 x 300 mm, 37 kg
Gasverbrauch	Synthetische Luft für pneumati- schen Antrieb der Mechanik	kein Verbrauch

### 3.1.2 Qualitätssicherung (QS)

Entsprechend den Ausführungen in Kap. 2.4.3 wurden die folgenden Qualitätssicherungsmaßnahmen für die in den Kapiteln 3.2 und 3.3 aufgeführten Untersuchungen durchgeführt. Sie sind teilweise Bestandteil folgender eigener Veröffentlichungen: MAGES et al. 2006, MAGES et al. 2004b, MAGES et al. 2003.

#### (1) Blindwertmessungen

Als optisches Medium für die TXRF-Analysen wurden für alle Messungen Quarzglasproben­träger verwendet. Für die Überprüfung der Reinheit wurden die nach individuell angepassten Arbeitsanweisungen gereinigten Proben­träger mit der TXRF analysiert. Als interner Standard wurde das in der Raumluft enthaltene und ebenfalls detektierte Argon verwendet. Zur Quantifizierung wurde ein mit 1 ng Ni präparierter Proben­träger wiederholt mit der TXRF gemessen und der so erhaltene Messwert als Absolutgehalt ausgewiesen. Der Mittelwert bildet die interne Standardisierung für alle weiteren Blindwertmessungen der Proben­träger. Liegen die Absolutgehalte für Fe bei  $\leq 0,040$  ng und für Ni, Cu, Zn, Cr, Pb und As bei  $\leq 0,010$  ng, können die Proben­träger als gereinigt und kontaminationsfrei eingeschätzt werden. Die gereinigten Proben­träger wurden für alle folgenden Präparationen verwendet.

(2) *Wiederfindungsraten in biologischen Proben*

Die gesamte Prozedur der Probenvorbereitung, einschließlich der Messungen, wurde mit zertifiziertem Referenzmaterial CRM 414 für Plankton (BCR<sup>®</sup> 1993, QUEVAUVILLER et al. 1993a) überprüft. Dazu wurden ca. 500 µg Referenzmaterial (n = 10) auf einer Ultramikrowaage mittels Gewichts Differenz gewogen, nach dem in Abb. 3-9 angeführten Aufschluss- und Präparationsschema bearbeitet und 1000 s mit der TXRF 8030 C gemessen. Die Quantifizierung erfolgte, wie allgemein bevorzugt, über das Element Ga.

Der Aufschluss des zertifizierten Referenzmaterials ergab Wiederfindungsraten zwischen 85,1 und 114 %, wie aus Tabelle 3-2 ersichtlich. Das Element Ni ausgenommen, sind die relativen Standardabweichungen mit Bezug zu den zertifizierten Ergebnissen kleiner als 10 %. In Relation zu den von QUEVAUVILLER et al. (1993a) angeführten Homogenitäten bei einer Einwaage von mehr als 500 mg, zeigen die mit der TXRF analysierten Ergebnisse auch bei Einwaagen von ca. 500 µg Wiederfindungsraten, die in der Routine derartig kleine Probenmengen zur Analyse zulassen.

Tab. 3-2: Zertifizierte Elementgehalte und analytische Ergebnisse mit den Wiederfindungsraten des Referenzmaterials CRM 414 (n = 10) (MAGES et al. 2006)

Element	Elementgehalt zertifiziert	Standard- abweichung	Elementgehalt analysiert	Standard- abweichung	Wiederfin- dungsrate
	[µg g <sup>-1</sup> ]	[µg g <sup>-1</sup> ]	[µg g <sup>-1</sup> ]	[µg g <sup>-1</sup> ]	[%]
K <sup>1</sup>	7.550	170	6.750	400	89,4
Ca <sup>2</sup>	65.000	2.000	63.500	2.690	97,7
Cr	23,8	1,2	23,0	3,4	96,6
Mn	299	12	269	8	90,0
Fe <sup>1</sup>	1.850	190	1.870	132	101
Ni	18,8	0,8	21,5	3,9	114
Cu	29,5	1,3	30,1	2,5	102
Zn	112	3	106	8,7	94,6
Sr <sup>1</sup>	261	25	222	7,5	85,1

<sup>1</sup> = Anhaltswerte, <sup>2</sup> = informative Werte

Das bestätigen auch teilweise die Untersuchungen von DOMBOVÀRI et al. (2000). Dabei wurden für unterschiedlichstes zertifiziertes Referenzmaterial, mit Einwaagen von 1 bis 50 mg, vergleichbare Wiederfindungsraten ermittelt.

Homogenitätsuntersuchungen in festem Referenzmaterial wurden 2008 von MOLLEY und SIEBER mithilfe der  $\mu$ -XRF durchgeführt und klassifiziert.

### (3) QS bei Feldeinsätzen

Nach dem Aufbau des gesamten Equipments im Feld (Abb. 3-2) und einer Aufwärmzeit von 30 min war die Durchführung von Stabilitätstests notwendig. Das ist besonders nach dem Transport zwischen einzelnen Probenstellen wichtig und stellt gleichzeitig ein Qualitätsmaß für die Stabilität des Strahlenganges dar. Ein bereits im Labor präparierter und gemessener Probenträger (Standardlösung mit Sr, Pb und Ni) wurde wiederholt gemessen und die Zählraten der Elemente verglichen. Bei abweichenden Zählraten der gemessenen Elemente musste der optische Strahlengang entsprechend der Arbeitsvorschriften für das PICOFOX™ korrigiert werden.



Abb. 3-2: Feldaufbau des portablen TXRF-Spektrometers mit entsprechendem Equipment (MAGES et al. 2004b)

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden folgende Vorsorgemaßnahmen getroffen:

- Aufstellung Notstromaggregat in einer Entfernung von ca. 15 m auf der windabgewandten Seite
- Probenpräparation unter staubarmen Bedingungen (Abb. 3-3)
- Verwendung von Einwegartikeln, besonders für die Filtration von Wasserproben (Abb. 3-4)



Abb. 3-3: Probenpräparation für die TXRF unter Feldbedingungen (MAGES et al. 2004b)



Abb. 3-4: Filtration unter Feldbedingungen

Zur Überprüfung von Kontaminationen wurden Probenträger nach 8, 32 und 48 h Expositionszeit an der Luft mit der TXRF gemessen. Die Zählraten sind in Abb. 3-5 dargestellt. Bei gleichbleibendem Argon-Peak kam es über die gesamte Kontaminationszeit zu erheblichen Anreicherungen für die Elemente Ca, Fe, Cu und Zn.

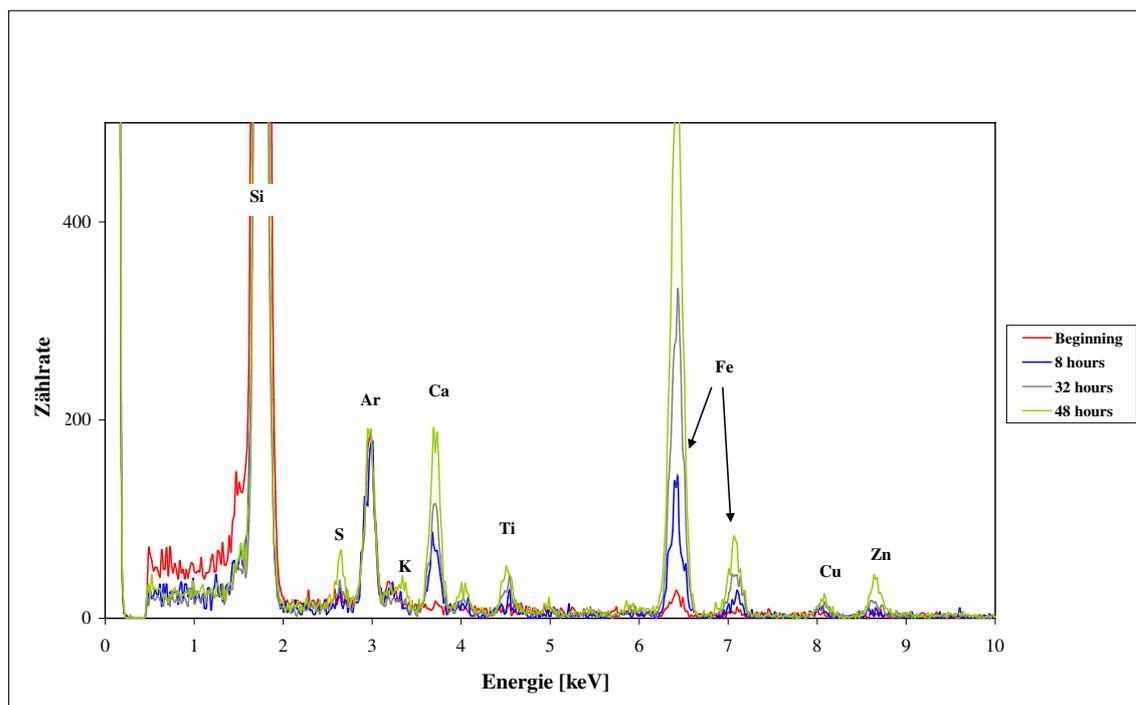


Abb. 3-5: Zählraten gereinigter Probenträger bei unterschiedlichen Expositionszeiten (MAGES et al. 2003)

Zur Verifizierung dieser Aussagen wurden die Probenträger mit 5 ng Ga als Bezugselement dotiert. Auch bei diesen Messungen wurde die Anreicherung der Elemente K, Ca, Fe Mn und Zn sichtbar; Absolutgehalte sind in Tab. 3-3 aufgeführt. Während die Elemente Ca, Ni, Cu Br, Rb und Sr vernachlässigt werden können, liegen für Zn mit  $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$  und Fe mit  $559 \mu\text{g L}^{-1}$  Anreicherungen vor.

Diese Werte bewegen sich bereits in den Konzentrationsbereichen von Oberflächenwasser. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass ein wirklich kontaminationsfreies Arbeiten bei Feldeinsätzen schwierig zu realisieren ist. Das Ziel muss sein, bei Feldarbeiten alle Arbeitsschritte genau zu überprüfen und, wie in den Abbildungen 3-3 und 3-4 dargestellt, Kontaminationen zu minimieren.

Als weitere Möglichkeit der Überprüfung der Genauigkeit im Feldeinsatz wurde zertifiziertes Referenzmaterial, in diesem Fall der Wasserstandard NIST 1643 d, analog zu den Wasserproben analysiert. Die in Tabelle 3-3 dargestellten Ergebnisse ergeben mit Wiederfindungsraten (WFR) zwischen 90 % und 104 % keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 3-3: Absolute Elementgehalte kontaminierter Probenträger und Wiederfindungsraten des Referenzmaterials NIST 1643 d (n = 3) (MAGES et al. 2006, ergänzt)

Element	Absolutgehalt Probenträger [ng]	Elementgehalt zertifiziert [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Elementgehalt gemessen [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Wiederfindungs- rate [%]
K	3,44	$2.360 \pm 35$	$2.290 \pm 70$	97,1
Ca	3,03	$31.000 \pm 500$	$30.000 \pm 1.000$	96,5
V		$35,1 \pm 1,40$	$33,2 \pm 2,00$	94,6
Cr		$18,5 \pm 0,2$	$18,9 \pm 1,7$	102
Mn	0,17	$37,7 \pm 0,83$	$37,4 \pm 0,8$	99,4
Fe	5,59	$91,2 \pm 3,9$	$94,0 \pm 2,2$	103
Ni	< 0,03	$58,1 \pm 2,7$	$60,1 \pm 1,1$	104
Cu	< 0,02	$20,5 \pm 3,8$	$19,8 \pm 0,7$	96,4
Zn	0,100	$72,5 \pm 0,65$	$69,0 \pm 2,8$	95,3
As		$56,0 \pm 0,73$	$50,9 \pm 1,2$	90,8
Ba		$506 \pm 8,9$	$482 \pm 10$	95,2

### 3.2 Elementuntersuchungen in Biofilmen

Elementuntersuchungen in Biofilmen sind bis heute eine analytische Herausforderung, nicht zuletzt dadurch bedingt, dass oftmals nur geringe Mengen an Probenmaterial zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, dass sich Biofilme auf unterschiedlichen Aufwuchsträgern nicht identisch entwickeln und Vergleiche der Bioakkumulation beispielsweise innerhalb einer Zeitreihe deshalb schwierig realisierbar sind. Andererseits bietet die Aus- und Bewertung von Elementakkumulationen in Biofilmen die Möglichkeit einen zeitintegrierten Überblick über die chemische Gewässergüte von 6 bis 8 Wochen vor der Probenahme zu erhalten.

### **3.2.1 Aufwuchsträgertests für Elementakkumulationen in Biofilmen**

#### *(1) Motivation*

Neben Steinen können Polycarbonatträger, Betonteile, Porzellanplatten usw. als natürliche bzw. künstliche Aufwuchsträger dienen. Unterschiede bei der Biofilmbildung und Elementakkumulation sind nicht ausgeschlossen, wie u. a. bei KRÖPFL et al. 2006 nachgewiesen, und wesentlich von den Milieubedingungen und der Bioverfügbarkeit der Elemente abhängig (MEYLAN et al. 2005).

Inhomogenitäten der Elementverteilung auf ein und demselben Aufwuchsträger müssen ebenfalls Berücksichtigung finden (FRIESE et al. 1997).

Eigene Untersuchungen zur Beschreibung der Unterschiede wurden durchgeführt, um möglichst optimale Probennahmen durchführen zu können und wurden in MAGES et al. 2004a und 2006 veröffentlicht.

#### *(2) Analytische Herangehensweise*

Um die Varianz der Elementakkumulation in Biofilmen besser beurteilen zu können, wurden sowohl auf Steinen natürlich gewachsene (Abb. 3-6) als auch die auf unterschiedlichen Trägern *in situ* kultivierte Biofilme untersucht. Als Trägermaterial kam Polycarbonat in unterschiedlicher Form zum Einsatz. Die in Abbildung 3-7 ersichtlichen Träger wurden bereits von EIDNER (2004) für Feldversuche erfolgreich eingesetzt und entsprechen den Aufwuchsträgern in Reaktoren gezüchteter Biofilme (GOLL 2001, OVÁRI et al. 2004b). Der Einsatz und die Entnahme dieser Aufwuchsträger aus der Haltevorrichtung erwiesen sich nach starkem Bewuchs als sehr problematisch. Daraus schlussfolgernd wurden die in Abb. 3-8 dargestellten Polycarbonat-Träger entwickelt, die sich in der Praxis als besser geeignet herausstellten. Nach der Vorreinigung mit einem basischen Detergent (RBS 50, Firma Roth, Deutschland), Reinigung mit 10 %iger Salpetersäure und spülen mit Reinstwasser wurden die Träger an geeigneten Stellen ausgebracht.

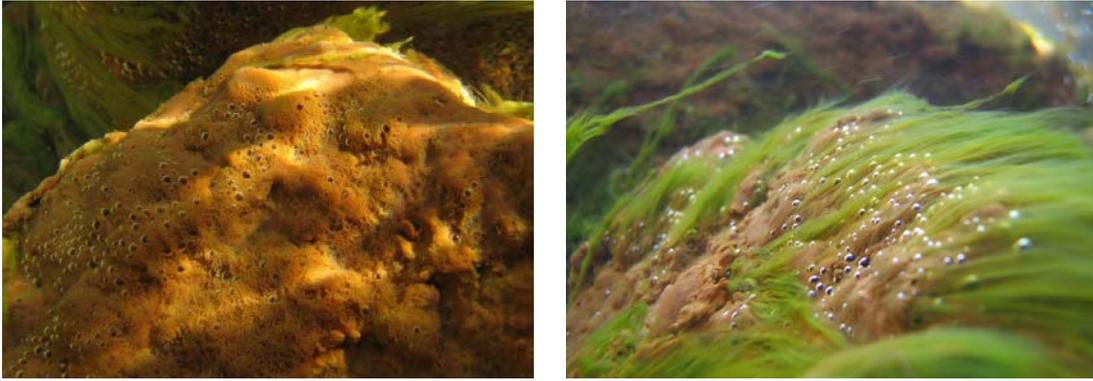


Abb. 3-6: Unterwasseraufnahmen natürlich gewachsener Biofilme im Schlüsselstollen (Mansfelder Land) (MAGES et al. 2006)



Abb. 3-7: Biofilmwachstum auf langen Polycarbonat-Trägern (MAGES et al. 2006)



Abb. 3-8: Biofilmwachstum auf runden Polycarbonat-Trägern, links vor dem Auslegen und rechts nach entsprechender Aufwuchszeit (MAGES et al. 2006)

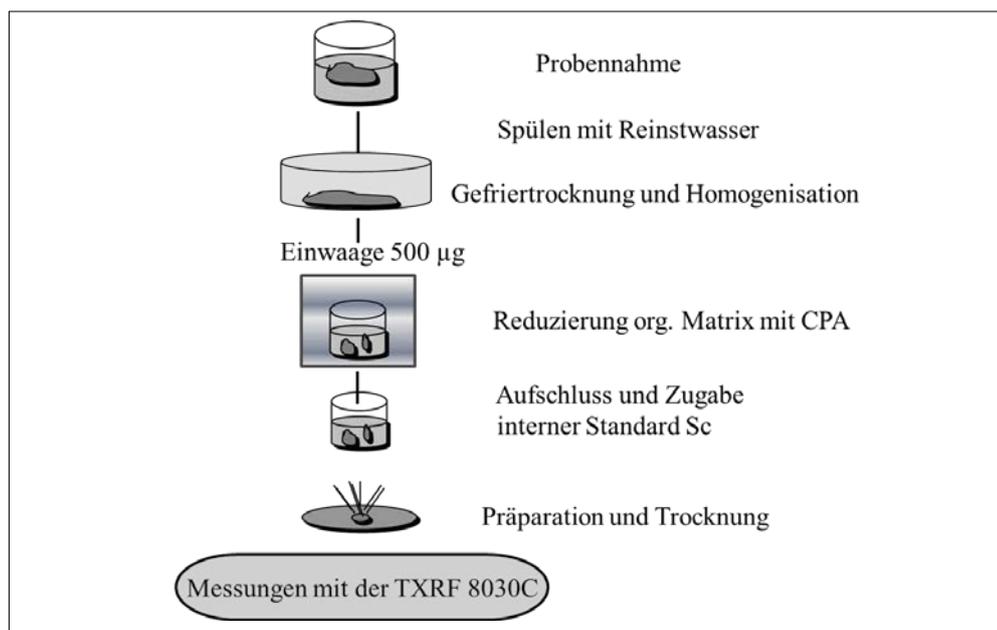


Abb. 3-9: Schema der Biofilmpräparation (MAGES et al. 2004a, geändert)

In Abbildung 3-9 sind die weiteren Bearbeitungsschritte der Biofilmpräparation dargestellt. Die Biofilme der Steine wurden direkt unter Wasser, unter Zuhilfenahme von keramischen Pinzetten und Skalpell, in entsprechend große Teflongefäße überführt. Die Biofilme auf den langen Aufwuchsträgern wurden in 50 mL Polycarbonatröhrchen (Sarstedt, Deutschland) transportiert (Abb. 3-10) und die Biofilme auf den runden Trägern in Polypropyldosen. Um den Erhalt der Biofilmstruktur gewährleisten zu können, wurden alle Proben in Umgebungswasser transportiert. Dieses Verfahren hat sich für alle Probennahmen, bei denen ein unmittelbares Einfrieren in Flüssigstickstoff nicht gewährleistet werden kann bzw. die weitere Bearbeitung negativ beeinflussen würde, bewährt. Der Transport erfolgte ausschließlich in Kühlboxen.



Abb. 3-10: Überführung der Aufwuchsträger für den Transport in Polycarbonatröhrchen

Im Labor erfolgte die weitere Aufarbeitung des Probenmaterials. Zunächst wurden alle Proben mittels Stereomikroskop (Stemi 11, Zeiss, Deutschland) betrachtet und für die Dokumentation Ausschnitte fotografiert. Gut sichtbare „Verunreinigungen“, wie eingebundene Holzteile, Pflanzenreste usw., die die Quantifizierung negativ beeinflussen könnten, wurden mechanisch entfernt.

Die anhaftende Salzmatrix, die als Störmatrix die Messungen negativ beeinflusst, wurde durch Spülen mit Reinwasser reduziert.

Nach anschließendem Gefriertrocknen (Alpha 1, Christ, Deutschland) wurden die Biofilme von den Aufwuchsträgern mittels Keramikskalpell abgetragen und in Quarzmikromörsern homogenisiert. Jeweils ca. 500 µg Probenmaterial wurden auf einer Ultramikrowaage (S 4, Sensitivität 0,1 µg, Sartorius, Deutschland) gewogen und in ein 10 mL Quarzglasbecherglas überführt. Zur Reduzierung der organischen Matrix wurde der Kohlenstoffanteil in einem Sauerstoffplasma, entsprechend Kap. 3.3.2, 3 h bei einer Leistung von 300 Watt oxidiert.

Zu dem veraschten Probenmaterial wurden 500 µL HNO<sub>3</sub> und 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (suprapur, Merck, Deutschland) für den Aufschluss und 200 ng Sc für die interne Standardisierung dotiert. Voruntersuchungen ergaben, dass in den Biofilmen eine erhöhte Anreicherung von Blei zu erwarten war, die wiederum zu Linienüberlappungen mit Gallium führen könnte. Aus diesem Grund wurde für die interne Standardisierung das Element Scandium bevorzugt. Der anschließende Aufschluss erfolgte in den o.g. abgedeckten Quarzglasbechern 1 h bei 120 °C auf einer Heizplatte.

Für eine optimale Präparation in dünnen Schichten (KLOCKENKÄMPER 1987) und der Reduzierung der Zählrate wurden die Proben mit Reinstwasser verdünnt. 10 µL der homogenisierten Lösung wurden zentriert auf Quarzglasträgern aufgetragen und auf einer Heizplatte bei 80 °C getrocknet. Alle aufgeschlossenen Proben wurden dreifach präpariert und 1000 s mit der TXRF 8030 C gemessen.

Für die Überprüfung der Elementverteilung bzw. -akkumulationsmuster im Biofilm wurden runde Polycarbonatträger mit getrocknetem Aufwuchs in ein Epoxid-Harz (SpeciFix Resin und SpeciFix-20, Firma Struers, Deutschland) eingebettet. Nach einem vertikalen Schnitt wurden die Querschnitte mittels Schleifpapier geschliffen (320-, 500- und 1200er Körnung).

Anschließend wurden Teilbereiche der Oberfläche mittels  $\mu$ -XRF abgescannt (Mikro-Röntgenfluoreszenz-Analyse, M4 Tornado, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland). Bei dieser Methode wird zur Auflösung im Mikrometerbereich der Röntgenstrahl optisch auf wenige Mikrometer fokussiert.

Sowohl der Anregungs- als auch der Detektionsstrahl wird durch je eine Röntgenlinse geleitet und so die Probe dreidimensional gescannt. Man erhält ein sogenanntes „Mapping“ der überlagerten Elemente, das zur Darstellung einzelner Elemente auch nachträglich bearbeitet werden kann (interne Angaben von Bruker Nano, Berlin).

Der Scan erfolgte mit einer Schrittweite von 12  $\mu\text{m}$  und einer Gesamtzeit von 5 h. Für die Anregungsstrahlung wurde eine Rh-Röhre (50 kV, 600  $\mu\text{A}$ ) verwendet. Der Röntgenfokus auf der Probe betrug ca. 25  $\mu\text{m}$ . Die Messungen und die Computerbearbeitung der Ergebnisse der  $\mu$ -XRF wurden durch die Firma Bruker Nano (Berlin) durchgeführt.

### ***(3) Ergebnisse zur Elementakkumulation in Biofilmen differenzierter Aufwuchsträger***

Die Elementgehalte der analysierten Biofilme von unterschiedlichsten Aufwuchsträgern sind in Tab. 3-4 dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann eingeschätzt werden, dass das differenzierte Aufwuchsmaterial, mit Ausnahme von Pb und Ni keinen wesentlichen Einfluss auf die Elementakkumulation hat. Das erhöhte Akkumulationsverhalten von Pb und Ni hauptsächlich auf den neu entwickelten runden Aufwuchsträgern, korreliert mit den im Kapitel 3.2.2.1 (Spezifische Sorptionseffekte in Biofilmen von Erzbergbaugebieten, am Beispiel der Region des Mansfelder Landes) gefundenen Sorptionsergebnissen. Da die Probennahmen nicht nach zeitlich gleicher Aufwuchsdauer erfolgten, kann angenommen werden, dass die unterschiedlichen Auslegungszeiten die Akkumulation wesentlich beeinflusst haben. Das Alter der auf den Steinen gewachsenen Biofilme kann zeitlich nicht zugeordnet werden.

Tab. 3-4: Elementgehalte in Biofilmen unterschiedlichen Trägermaterials [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2006, geändert)

Element	Trägermaterial		
	Langer Träger	Runder Träger	Natürlicher Aufwuchs auf Steinen
	n = 6	n = 4	n = 12
Pb	50.900 - 115.000	359.000 - 449.000	90.300 - 377.000
Cu	3.180 - 7.000	2.290 - 7.910	3.630 - 13.900
Zn	4.690 - 8.560	5.510 - 10.600	4.690 - 16.100
Ni	60 - 99	229 - 326	82 - 250
Fe	32.000 - 63.400	18.600 - 71.000	34.000 - 104.000
Ca	11.500 - 25.500	17.800 - 19.800	12.400 - 35.300

Die Varianzen innerhalb der aufgeführten Konzentrationsbereiche können durch Inhomogenitäten im Probenmaterial begründet sein. Es kann davon ausgegangen werden, dass:

- a) die partikulären Einschlüsse, sichtbar in den getrockneten Biofilmproben in Abb. 3-11, die Homogenität des Probenmaterials und damit die Quantifizierung negativ beeinflusst haben,

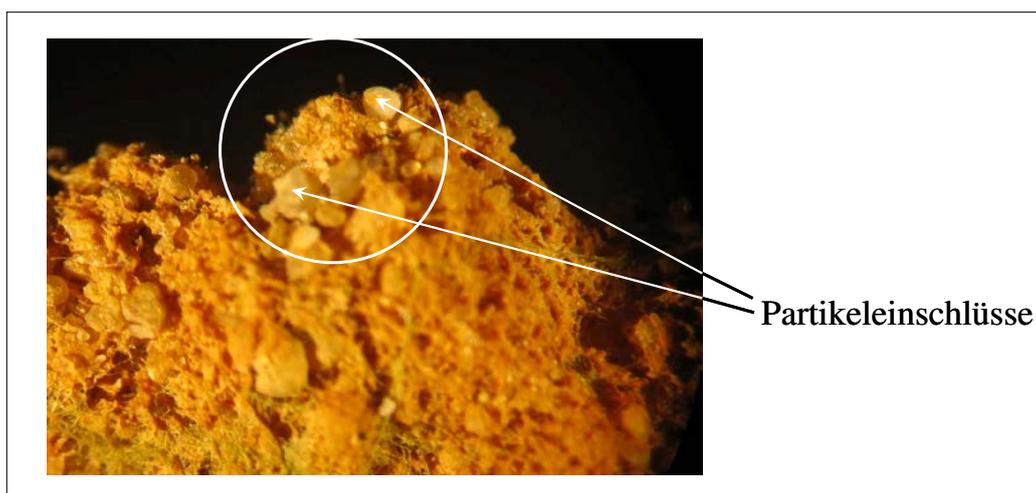


Abb. 3-11: Getrockneter Biofilm mit sichtbaren Partikeleinschlüssen (MAGES et al. 2006)

- b) bedingt durch die stark vernetzte Struktur, wie in Abb. 3-12 ersichtlich, die getrockneten Biofilme nicht gleichmäßig homogenisiert waren und damit inhomogene Elementverteilungen vorlagen,



Abb. 3-12: Netzstruktur der getrockneten Biofilme (MAGES et al. 2006, geändert)

- c) die Elemente unterschiedlich eingebunden werden (Abb. 3-13).

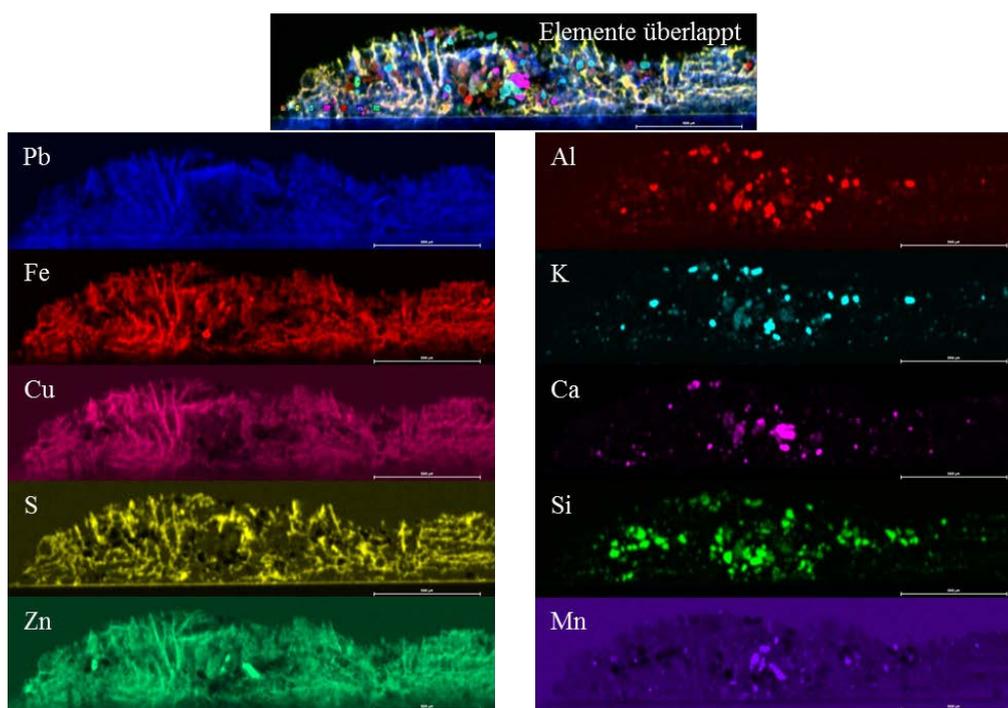


Abb. 3-13: Verteilungsmuster der mit der  $\mu$ -XRF detektierten Elemente in den getrockneten Biofilmen (Aufnahmen: U. Waldschläger, Bruker Nano Berlin)

Die in Abb. 3-13 dargestellten Elementverteilungen bzw. -akkumulationsmuster weisen für die einzelnen Elemente große Unterschiede auf. Im Scan mit der  $\mu$ -XRF wird eindeutig ersichtlich, dass die Elemente Al, K, Ca, Si und Mn kolloidal oder partikulär an- oder

eingelagert sind. Demgegenüber sind die Elemente Pb, Fe, Cu S und Zn organisch eingebettet.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann angenommen werden, dass die in Tab. 3-4 dargestellten Schwankungen der Elementgehalte innerhalb gleicher Trägermaterialien von allen aufgeführten Faktoren abhängig ist. Folglich führen die partikulären Einschlüsse und die vernetzte Probenmatrix zu großen Inhomogenitäten innerhalb der Probe und beeinflussen die Einwaage und somit die Quantifizierung wesentlich.

### ***3.2.2 Felduntersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen***

In den folgenden Teilkapiteln wird beschrieben, wie die in 3.2.1 entwickelte Methode zur Untersuchung der Elementakkumulation in Biofilmen und die daraus gewonnenen Erkenntnisse in Feldeinsätzen angewendet wurden. Zum einen ergab sich die Möglichkeit Untersuchungen zu Elementsorptionsseffekten in Biofilmen bergbaubeeinflusster Minenwässer und ihrer unmittelbaren Vorflut des mitteldeutschen Mansfelder Landes durchzuführen (Kap. 3.2.2.1).

Beprobungen im Längsprofil der Saale bzw. Elbe sind schwierig, da die Gewässer durch verschiedene Bergbau- und Industriegebiete nachhaltig beeinflusst wurden und werden. Die Biofilmbildung einerseits aber auch die Elementakkumulation andererseits wird deshalb multifaktoriell beeinflusst. Anders war die Situation an der Tisza (Ungarn) nach den Bergbauunfällen von Baia Mare und Baia Borsa im Jahre 2000. Dort ergab sich die Möglichkeit einer großskaligen Beprobung und Untersuchung von Biofilmen im Wasserkörper eines im Oberlauf durch Bergbau temporär extrem beeinflussten Gewässers (Kap. 3.2.2.2).

Die folgenden Arbeiten basieren auf den Veröffentlichungen MAGES et al. 2004a und MAGES et al. 2006 und teilweise unveröffentlichten Ergebnissen.

#### ***3.2.2.1 Spezifische Sorptionseffekte in Biofilmen von Erzbergbaugebieten, am Beispiel der Region des Mansfelder Landes***

##### *(1) Motivation*

Aus der Auswertung der erhöhten Anreicherung der Elemente Pb und Ni in den Biofilmen künstlicher Aufwuchsträger (Kap. 3.2.1 Aufwuchsträgertests für Elementakkumulationen in Biofilmen) ergab sich die Frage, inwieweit das Akkumulationsverhalten von den unterschiedlichen Sorptionsbedingungen im Biofilm abhängig ist. Mit den Biofilmen eines

Entwässerungstollens (Schlüsselstollen) im stillgelegten Kupferbergbau des Mansfelder Landes ergab sich exemplarisch für bergbaubeeinflusste Gewässer die Möglichkeit Biofilme diesbezüglich zu analysieren. Da in diesem Milieu die Elemente vorrangig aus der gelösten Phase akkumuliert werden, bieten sie für die folgenden Untersuchungen die besten Voraussetzungen. Weiterhin war bedingt durch die gleichbleibend saisonale Temperatur des Stollenwassers mit keinem oder nur marginalem temperaturabhängigen Absterben der Biofilme zu rechnen. Damit stellte dieses Beprobungsgebiet die besten Bedingungen für Felduntersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen dar.

Nach BABOROWSKI und BOZAU (2006) befinden sich in der Wasserphase des Stollenauslaufes die Elemente Zn und Ni ausschließlich und Cu mit > 90 % gelöst. Eisen dagegen liegt fast vollständig partikulär gebunden vor. Das Wasser des Schlüsselstollens bietet somit ein Überangebot an Pb-, Zn-, Cu- und Ni-Ionen, die für die Akkumulation leichter verfügbar sind (MEYLAN et al. 2003, BEHRA et al. 2005) und in den Biofilmen dementsprechend einfacher akkumuliert werden können. SCHRECK und FREYER (2008) geben an, dass mehr als 90 % der aus dem Mansfelder Bergbauland ausgetragenen Metalle in gelöster Form vorliegen. Da der Austrag hauptsächlich über das schwebstoffarme Grundwasser erfolgt, ist nur ein Bruchteil der Metalle kolloidal gebunden und somit auch für Biofilme verfügbar.

### (2) *Untersuchungsgebiet*

Das Mansfelder Land erstreckt sich über eine Fläche von ca. 760 km<sup>2</sup> und kann dem Mitteldeutschen Raum zugeordnet werden. Mit seiner Ausdehnung bis in den Ostharz wird über diese Fläche ein wesentlicher Teil der östlichen Wasserscheide des Harzes und Harzvorlandes entwässert. Letztendlich über den Wassereintrag in die Saale zählt das Mansfelder Land somit zum Einzugsgebiet der Mittleren Elbe (SCHRECK et al. 2004).

Im Gebiet des Mansfelder Landes wurden in 800 Jahren insgesamt 2,6 Mt reines Kupfer und 14.200 t reines Silber gefördert. (HARTWIG et al. 1999). Um 1970 wurde der Bergbau in der Mansfelder Region gänzlich eingestellt.

Für die Entwässerung der gesamten Mansfelder Erzbergbauregion wurde von der Mitte des 18. bis zum Ende des 19. Jhd. ein für damalige Verhältnisse großes Stollensystem mit über 50 Schächten und Lichtlöchern gebaut. Mit dem Durchschlag des Schlüsselstollens im Jahre 1879 wurde die gesamte Wasserhaltung der Mansfelder Mulde auf diesen Stollen (Länge ca. 32 km) ausgerichtet. Auch heute noch erhält er mit der Abführung von

20 - 25 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> den bestehenden hydrologischen Zustand. Über ein Mundloch tritt der Schlüsselstollen ca. 1,5 km vor Friedeburg an die Oberfläche, mündet nach 100 m in die Schlenze und bildet gemeinsam den Zulauf zur Saale (VEREIN MANSFELDER BERG- UND HÜTTENLEUTE E.V. 2013).

### (3) *Probennahme und Probenvorbereitung*

Die Stellen für die Probennahmen der unterschiedlichen Biofilmtypen, der Wasserprobenentnahmen sowie der Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter sind in Abb. 3-14 dargestellt und in BABOROWSKI und BOZAU (2006) publiziert. Zur Bestimmung der limnologischen Begleitparameter wurden die Wasserproben ca. 20 cm unterhalb der Oberfläche mittels Probenschöpfer entnommen und in Hilfsflaschen überführt. Für die Analyse der Basisparameter erfolgte die Abtrennung der suspendierten partikulären Stoffe (SPM) über Whatman GF/F Glasfaserfilter (Vakuumfiltration, 200 mbar). *In situ* vor Ort erfolgte die Messung der physikalisch-chemischen Parameter, wie pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Wassertemperatur und Leitfähigkeit mittels Elektroden (WTW). Für die Bestimmung der Nährstoffgehalte (NO<sub>3</sub>-N und NH<sub>4</sub>-N) und der Anteile an gelöstem Kohlenstoff (DIC und DOC) wurden Teilproben über Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm, Millipore, Frankreich) filtriert (BABOROWSKI und BOZAU 2006). Die Analyse erfolgte nach den Richtlinien der Deutschen Einheitsverfahren DIN 38405-38406. Die Gehalte von Na, K, Mg, Cl und SO<sub>4</sub> wurden ionenchromatographisch ermittelt (GAT Gamma Analystechnik, ICA 5000 Serie, Deutschland).

Für die Kohlenstoffbestimmung kam ein Analysengerät der Firma Dimatec, Deutschland zum Einsatz. Die Analyse der Elementgehalte erfolgte aus dem Filtrat der Wasserproben. Dafür wurden die Gesamtproben mittels Einweg-Spritzenvorsatzfilter (Zelluloseacetat, Porengröße 0,2 µm, Millipore, Frankreich) filtriert und das Filtrat mit HNO<sub>3</sub> (65 %ig, suprapur Merck, Deutschland) stabilisiert.

Für die quantitative Analyse wurden 100 µg L<sup>-1</sup> Gallium als Bezugselement zugesetzt, jeweils 10 µL dieser Probensuspension auf Quarzglasträgern präpariert und mit der TXRF 8030 C gemessen.

Für die Biofilmversuche wurden die in Kap. 3.2.1, Abb. 3-8 angeführten runden Polycarbonatträger im Auslauf des Schlüsselstollens ausgelegt. Als Referenz wurden in der Schlenze, vor dem Zufluss des Schlüsselstollens, ebenfalls Aufwuchsträger deponiert. Bedingt durch den relativ hohen Schwebstofftransport in der Schlenze und einer daraus

resultierenden starken Sedimentation und bei Starkregen hoher Transportdynamik, zeigte sich das Deponieren der Halterungen als sehr schwierig. Aufgrund dessen mussten die Biofilme sofort nach der Entnahme durch Spülen mit Umgebungswasser von den Sedimentationsschichten befreit werden.

Die Entnahme der Proben erfolgte in unterschiedlichen Zeitabständen von einem Monat bis zu einem  $\frac{3}{4}$  Jahr (Abb. 3-20). Die Präparation der Proben und die Messungen mit der TXRF wurden analog den Ausführungen in Kap. 3.2.1, (2) *Analytische Herangehensweise* durchgeführt.

Durch Voruntersuchungen war die hohe Salzmatrix in der Wasserphase, die den Untergrund der TXRF-Messungen stört, bekannt. Um diese besonders an der EPS anhaftende Salzfracht zu eliminieren, wurden die Biofilme mit vorentsalztem Wasser gespült. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die sehr stark ausgeprägte EPS (Abb. 3-16) während des Spülens als Schutzschicht gegen ein mögliches „Leaching“ der absorbierten Elemente dient (FLEMMING et al. 2007). Das Spülen mit filtriertem Umgebungswasser, wie sonst üblich (FRIESE et al. 1997, WOELFL et al. 2004a), zeigte durch den hohen gelösten Salzgehalt keinen Effekt.

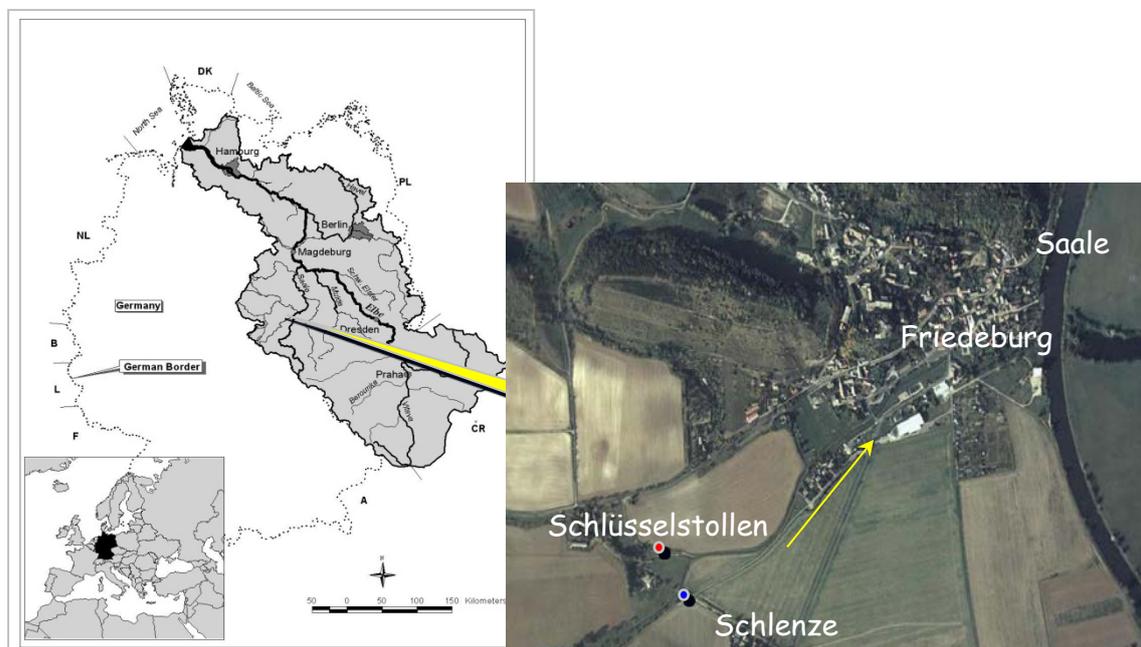


Abb. 3-14: Einzugsgebiet Mansfelder Land mit den Probenstellen Schlüsselstollen und Schlenze (BABOROWSKI und BOZAU 2006, geändert)

Im Ergebnis der Untersuchungen konnte für die Basisparameter nachgewiesen werden, dass das Wasser des Schlüsselstollens charakterisiert ist durch eine relativ konstante Leit-

fähigkeit ( $45,8 \text{ mS cm}^{-1}$ ), einen Sauerstoffgehalt von ca.  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , einem pH-Wert von 7,4 und ganzjähriger Wassertemperatur von ca.  $12 \text{ °C}$  (Tab. 3-5). Dies wirkt sich erheblich auf die Wasserbeschaffenheit der Schlenze (Saale-Zufluss) aus. Bedingt durch die hohe Salz- und Schwermetallfrachten ist sie als Punktquelle im Saaleinzugsgebiet anzusehen (BABOROWSKI und BOZAU 2006).

Die in Tabelle 3-5 aufgeführten Ergebnisse für die Nährstoffkonzentrationen lassen den Schluss zu, dass die Wasserphase des Schlüsselstollens extrem nährstoffarm ist. Dagegen wurden in den Proben sehr hohe Konzentrationen von Ca, K, Na, Mg gemessen. Die mit  $24,6 \text{ mg L}^{-1}$  als überdurchschnittlich hoch anzusehende Trockenmasse ist mit den hohen Chlorid- und Sulfatgehalten zu erklären und stellt in diesem Zusammenhang keinen Nachweis für einen hohen Schwebstoffanteil dar (Abb. 3-15).

Tab. 3-5: Limnologische Begleitparameter der Gewässer Schlüsselstollen und Schlenze (Mai – August,  $n = 5$ ) (BABOROWSKI und BOZAU 2006, MAGES et al. 2006)

	Ausgang Schlüsselstollen		Schlenze	
	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$
NH <sub>4</sub> -N [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	0,20	0,02	0,46	0,49
NO <sub>2</sub> -N [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	0,01	0,01	0,32	0,18
NO <sub>3</sub> -N [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	4,87	0,09	8,57	0,44
SRP (TP) [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	< 0,003	-	0,36	0,11
Na [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	8.200	603	75	1,6
K [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	43	2	16	1,1
Mg [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	143	5	54	2
Cl [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	12.800	990	122	3
SO <sub>4</sub> [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	1.790	34	455	13
	Ausgang Schlüsselstollen		Schlenze	
pH		7,4		8,3
O <sub>2</sub> [ $\text{mg L}^{-1}$ ]		10,4		8
Trockenmasse [ $\text{mg L}^{-1}$ ]		24,6		33,8
Wassertemperatur [ $\text{°C}$ ]		11,8		15
Leitfähigkeit [ $\text{mS cm}^{-1}$ ]		45,8		1,7

Demgegenüber verhält sich die Wasserphase der Schlenze oberhalb des Schlüsselstollenzulaufes mit hoher Nährstoffbelastung und dem vorliegenden Anionen- und Kationengefüge konträr (Tab. 3-5).

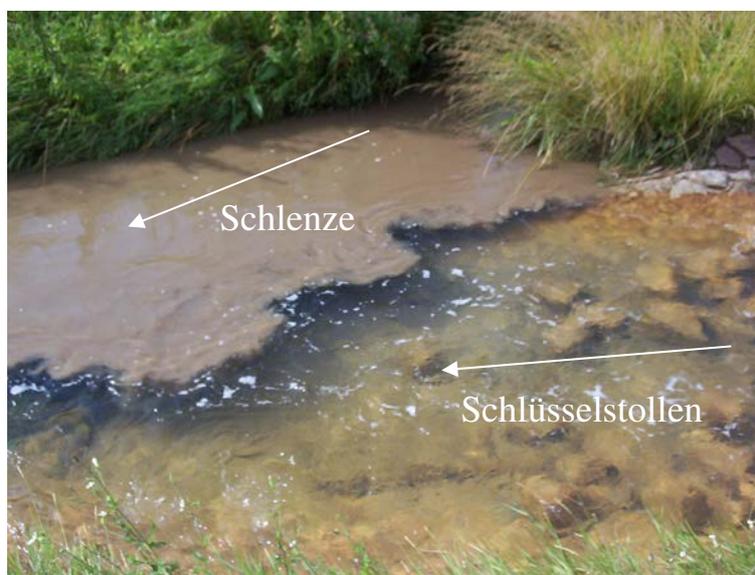


Abb. 3-15: Schwebstoffeintrag der Schlenze (BABOROWSKI und BOZAU 2006, geändert)

Die Ergebnisse der Elementkonzentrationen der analysierten Oberflächenwasserproben von Schlüsselstollen und Schlenze (zeitgleich zu den Biofilmen entnommen) sind im direkten Vergleich in Tabelle 3-6 dargestellt. Bereits in der Wasserphase zeigen sich sehr große Unterschiede einiger Elemente. Obwohl der Schlüsselstollen den ehemaligen Kupferabbau entwässert und die geogenen Gesteinsschichten erhöhte Kupfergehalte aufweisen (JANKOWSKI 1995), dominieren in der gelösten Wasserphase vorrangig Pb und Zn. Die Gehalte von  $713 \mu\text{g L}^{-1}$  bzw.  $18 \text{ mg L}^{-1}$  führen zu Anreicherungsfaktoren von 1.400 für Pb und 625 für Zn. Erhöhte Zinkbelastungen mit 126 bis zu  $497 \mu\text{g L}^{-1}$  wurden von den Staatlichen Ämtern auch an unterschiedlichsten Grundwasserprobestellen des Mansfeld-Sangerhäuser Bergbaureviers gefunden und bestätigen die extremen Elementkonzentrationen im Filtrat der Wasserproben (GRUNDWASSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT 2001).

Der Kupfergehalt im Schlüsselstollen ist mit  $326 \mu\text{g L}^{-1}$  gegenüber den Werten der Schlenze ( $31 \mu\text{g L}^{-1}$ ) um das ca. Zehnfache erhöht und vergleichbar mit dem Verhalten von Nickel ( $233 \mu\text{g L}^{-1}$  Schlüsselstollen und  $29,6 \mu\text{g L}^{-1}$  Schlenze).

Die Calciumkonzentration im Wasser des Schlüsselstollens liegt mit  $700 \text{ mg L}^{-1}$  im Bereich von Referenzwerten für das Mansfelder Land. An den Messstellen in Erdeborn wurden teilweise Konzentrationen von über  $2 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Diese Konzentrationen sind charakteristisch für calciumreiche Zech- und Buntsandsteinwässer sowie tertiäre Tiefenwässer. Die in den letzten Jahren insgesamt sinkenden Calciumkonzentrationen weisen an einigen Rohwasserstellen noch Belastungen zwischen  $24$  und  $285 \text{ mg L}^{-1}$  auf (GRUNDWASSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT 2001).

Während die Elementkonzentrationen im Filtrat der Schlüsselstollenwasserproben ein Ranking von

$$\text{Ca} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Fe}$$

aufweisen, zeichnet sich die Elementanreicherung normiert auf die Elementkonzentrationen der Schlenze-Filtrate wie folgt ab (Tab. 3-6):

$$\text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Fe} > \text{Ca}.$$

Tab. 3-6: Elementgehalte in der gelösten Wasserphase am Austritt des Schlüsselstollens im Vergleich zur Schlenze (Mai – August 2005,  $n = 5$ , [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ], mit den entsprechenden Anreicherungsfaktoren (AF) (MAGES et al. 2006)

Element	Schlüsselstollen		Schlenze		AF
	Elementgehalte	<i>s</i>	Elementgehalte	<i>s</i>	Schlüsselstollen zu Schlenze
Pb	713	50	0,5	0,01	1.400
Zn	18.000	1.480	28,7	8,7	625
Cu	326	25	31,0	16,4	11
Ni	233	62	29,6	8	8
Fe	202	61	57,8	16,9	3,5
Ca	700.000	51.200	207.000	15.800	3,4

Vergleiche mit Literaturangaben von Elementkonzentrationen in der Region des Mansfelder Landes lassen erhöhte Elementkonzentrationen in der Wasserphase des Schlüsselstollens erwarten (SCHRECK et al. 2004, JANKOWSKI 1995). Untersuchungen zum Konzentrationsverhalten von Elementen aus dem Schlüsselstollen über die Schlenze in die Saale wurden von BABOROWSKI und BOZAU (2006) in Messkampagnen von Mai bis August 2004 durchgeführt. Wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist die Tat-

sache, dass bis zum Zufluss in die Saale keine signifikante Verdünnung des abführenden Stollenwassers durch den Zusammenfluss mit der Schlenze stattfindet. Mit einem 20fach höheren Wassereintrag gegenüber der Schlenze dominiert der Schlüsselstollen die Schwermetalleinträge. Die Konzentrationen der Elemente wie Pb, Zn, Cu, Ni und Fe variieren entsprechend der Wasserverhältnisse punktuell über den gesamten Verlauf und innerhalb der Messkampagnen, zeigen aber keinen signifikanten Trend (BABOROWSKI und BOZAU 2006).

#### **(4) Ergebnisse der Biofilmuntersuchungen**

Für die Aus- und Bewertung der charakteristischen Eigenschaften der Biofilme wurden die folgenden Schwerpunkte gesetzt, die im Folgenden im Detail diskutiert werden:

- a) Struktur der untersuchten Biofilme im Vergleich
  - b) Elementakkumulationen in den Biofilmen des Schlüsselstollens
- a) Die auf natürlichem Trägermaterial aufgewachsenen Biofilme im Bereich des Schlüsselstollens sind gekennzeichnet durch eine starke rostbraune Färbung (Abb. 3-16). Ungewöhnlich ist, dass schon die „frischen“ Biofilme eine für Fließgewässer untypisch zähe und schwammartige EPS aufwiesen (Abb. 3-17). Selbst im getrockneten Zustand waren die Kavernen der Gaseinschlüsse sichtbar (Abb. 3-18). Es kann deshalb angenommen werden, dass:
- aufgrund der hohen Elementverfügbarkeit in der gelösten Wasserphase eine besonders starke EPS als Barriere ausgebildet wurde
  - die EPS einen Schutzmechanismus gegen die hohe Strömung aufbaut
  - durch die saisonal gleichbleibende Temperatur die Milieubedingungen für ein stärkeres Dickenwachstum gegeben waren.

Demgegenüber zeigen die Biofilme der Schlenze, die als Referenzbiofilme dienen, mit ihrem begrenztem Höhenwachstum eine eher typische Struktur für aquatische Biofilme in Oberflächengewässern (Abb. 3-19).



Abb. 3-16: Frischbiofilm mit sichtbar stark ausgeprägter EPS



Abb. 3-17: Schwammartiger Frischbiofilm mit sichtbarer EPS



Abb. 3-18: Getrockneter Biofilm mit sichtbaren Kavernen



Abb. 3-19: Biofilm der Schlenze (MAGES et al. 2006)

b) Mit den auf künstlichen Aufwuchsträgern gebildeten Biofilmen des Schlüsselstollens ergab sich die Möglichkeit, das Sorptionsverhalten einiger Elemente in aufwachsenden natürlichen Biofilmen zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die an fest/flüssigen Grenzflächen abspielenden Wechselwirkungen als Sorptionsprozesse bezeichnet werden (CHARACKLIS und MARSHALL 1990). Sorptionsmittel und sorbierter Stoff können dabei eine chemische Bindung eingehen bzw. anderweitig angelagert werden. Als für die Proben charakteristische Elemente wurden Zn, Cu, Pb und Ni betrachtet. In der Abb. 3-20 sind die Gehalte der Elemente in Abhängigkeit zur Aufwuchszeitdauer dargestellt. Vier Wochen nach dem Ausbringen der Träger wurden die ersten Proben analysiert. Signifikante Unterschiede im Akkumulationsverhalten konnten bereits in dieser Wachstumsphase nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der im Filtrat nachgewiesenen Elementkonzentration (von Zn über Pb und Cu bis zum Ni abnehmend) wird deutlich, dass die Absorption nicht nur von der Elementkonzentration im Oberflächenwasser abhängt, sondern wesentlich von der Verfügbarkeit freier Sorptionsplätze (FLEMMING 1996). Während Pb und Ni bereits zu Beginn relativ stark absorbiert wurden, erfolgte die Aufnahme für Zn und Cu eher verhalten. MEYLAN et al. haben 2003 in ihren Untersuchungen zur Elementakkumulation in Algenbiofilmen dagegen nachgewiesen, dass Algenbiofilme bereits nach kurzer Kontaminationszeit sehr schnell die Metalle Cu und Zn akkumulieren und langsam wieder an das Medium abgeben.

Untersuchungen einer Beprobung nach weiteren 14 Tagen Wachstum lassen den Schluss zu, dass die Elementakkumulation einer starken Dynamik unterliegt. Ein relativ schneller Abfall der Pb- und Ni-Gehalte verlief zugunsten der Zn- und Cu-Akkumulation. Das Plateau wurde für alle Sorptionen nach weiteren 14 Tagen Verweilzeit im Gewässer erreicht. Anschließende Probennahmen zeigten keine weiteren signifikanten Veränderungen. Für Pb wurde unabhängig von der Depositions- bzw. Aufwuchszeit eine sehr hohe Akkumulation im Biofilm nachgewiesen. Ausgehend von einer Pb-Konzentration von  $713 \mu\text{g L}^{-1}$  in der Wasserphase (Tab. 3-6) und dem Vergleich mit den analysierten Bleigehalten im Biofilm von 127 bis  $531 \text{ mg g}^{-1}$  (Tab. 3-7), wird das temporäre maximale Akkumulationspotential mit Anreicherungsfaktoren bis zu 750.000 deutlich.

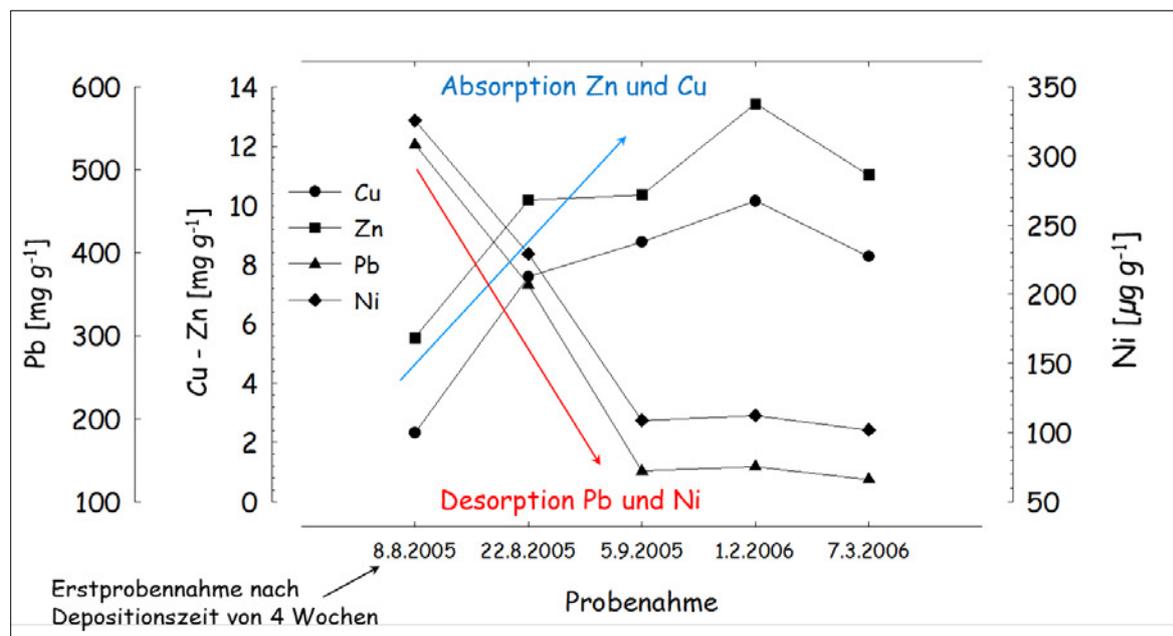


Abb. 3-20: Sorptionseffekte ausgewählter Elemente in saisonalen Biofilmen des Schlüßelstollens

Im Vergleich dazu wurden in den Biofilmen der Schlenze-Probenstelle, die als Referenzstandort diente, relativ geringe Elementgehalte nachgewiesen (Tab. 3-7). Bezogen auf die Ergebnisse dieser Referenzbiofilme konnten für die Elementgehalte der Schlüßelstollen-Biofilme die in Tab. 3-7 aufgelisteten Anreicherungsfaktoren berechnet werden. Während sich die Anreicherung für Fe, Ni und Zn zwischen 4 und 20 bewegt, liegt sie für Cu bei 156 und erhöht sich für Pb sogar auf den Faktor 2.360. Einzige Ausnahme bildet der Ca-Gehalt in den Biofilmen der Schlenze. Mit einem mittleren Gehalt von 100 mg g<sup>-1</sup> korreliert das Ergebnis nicht mit dem Ca-Gehalt in der Wasserphase von 207 mg L<sup>-1</sup> (Tab. 3-6). Einerseits besteht die Möglichkeit, dass bedingt durch die geringe Verfügbarkeit an den gelösten Elementen Pb, Zn, Cu und Ni ein Großteil der freien Sorptionsplätze durch Ca belegt wird (FLEMMING 1996). Ein weiterer Aspekt könnte das erhöhte Vorhandensein von Diatomeen in der Schlenze sein, die durch partikuläre Einbindungen den Ca-Gehalt beeinflussen würden. Inwieweit auch das Vorhandensein von Gipskristallen, bezeichnet als „Mansfelder Gips“, den Ca-Gehalt im Biofilm beeinflusst, wurde nicht näher untersucht (ARBEITSKREIS KLIMA UND NATURGEFAHREN 2010).

Tab. 3-7: Ausgewählte Elementgehalte in Abhängigkeit von der Aufwuchszeit der Biofilme im Schlüsselstollen, im Vergleich zu den Elementgehalten der Biofilme der Schlenze [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ], mit den entsprechenden Anreicherungsfaktoren (AF)

Proben- nahme	Schlüsselstollen					Schlenze 8.8.2005	AF
	8.8.2005	22.8.2005	5.9.2005	1.2.2006	7.3.2006		
Element							
Pb	531.000	361.000	137.000	143.000	127.000	110	2.360
Cu	2.320	7.600	8.760	10.200	8.300	47,5	156
Zn	5.530	10.200	10.400	13.400	11.000	500	20
Ni	326	229	109	112	102	24,9	7
Fe	20.500	69.400	72.300	67.300	58.400	13.300	4
Ca	18.100	18.800	21.200	19.400	22.600	105.000	0,2

Basierend auf den Elementgehalten der Schlenze-Biofilme und den Elementbereichen der analysierten Biofilme im Schlüsselstollen wurden die in Tabelle 3-7 angeführten Anreicherungsfaktoren berechnet. Daraus resultiert ein Ranking der Anreicherung wie folgt:

$$\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Fe} > \text{Ca}.$$

Bezugnehmend auf die Anreicherung von der Schlenze zum Schlüsselstollen entspricht dieses Ranking, ausgenommen bei Zn und Cu, den Angaben in der Wasserphase (Tab. 3-6) und den Reaktorversuchen von JANG et al. 2001. Sie analysierten, allerdings selektiv in der EPS, eine Akkumulationsfolge von  $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Ni}$ .

### 3.2.2.2 Großskalige Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Ungarn

#### (1) Problemstellung

Infolge starker Regenfälle kam es im Januar und März 2000 zum Dambruch von Rückhaltebecken jeweils einer Gold- und Bleimine im Nordosten Rumäniens. In deren Folge wurde die Tisza im Januar 2000 mit  $100.000 \text{ m}^3$  Zyanid- und schwermetallhaltigem Abwasser über die Szamos belastet. Im März 2000, nach einem erneuten Dambruch in Baia Borsa, wurden mit  $150.000 \text{ m}^3$  Schlamm und Sediment Schwermetalle wie Cd, Pb, Cu und Zn im oberen Einzugsgebiet der Tisza eingetragen (SOLDAN et al. 2001, KRAFT et al. 2003).

Der toxische Einfluss auf benthische Organismen wie Fische und Periphyton wurde 2000 von SALYI et al. nachgewiesen. Inwieweit durch die erhöhten Metallgehalte sowohl in der Wasserphase als auch im Sediment eine langzeitwirksame Bioakkumulation stattgefunden hat, wurde im Folgenden in Biofilmen untersucht. Während der Probenkampagnen in den Jahren 2000 und 2002 wurden umfangreiche Biofilmproben entnommen. Aufgrund der unterschiedlichen Wasserstände (leichtes Hochwasser im Herbst 2002) konnte das Probenmaterial nicht überall an den gleichen Stellen entnommen werden.

### (2) *Untersuchungsgebiet*

Mit einer Gesamtfläche von ca. 157.000 km<sup>2</sup> und einer Gesamtlänge von 966 km zählt die Tisza mit ca. 5,6 % des Gesamtabflusses zu den größten Donauzuflüssen. Das Einzugsgebiet der Tisza verteilt sich auf fünf Länder (Ukraine, Rumänien, Slowakei, Ungarn und Serbien). Während der Oberlauf durch die Karpaten geprägt wird, weisen die mittlere und untere Tisza einen typischen Tieflandcharakter aus. Die in Ungarn gelegene „Mittlere Tisza“ mit den größten Zuflüssen (Szamos, Bodrog, Zagyva, Hármas-Körös und Maros) sowie ein Teil der „Unteren Tisza“ bis zur serbischen Grenze nehmen mit 28,6 % den zweitgrößten Flächenanteil ein. Dabei liegen ca. 25 % in der großen ungarischen Tiefebene. Die Nebenflüsse der Tisza unterscheiden sich in ihren hydrogeographischen Charakteristiken, in Form, Lage, Größe und auch in der Bodenbeschaffenheit und Landbedeckung wesentlich voneinander (TISZA RIVER PROJECT 2003). National als auch international werden große Anstrengungen unternommen, das einzigartige Ökosystem der Uferfeuchtgebiete des Tisza-Einzugsgebietes, mit seiner teilweise endemischen Artenvielfalt von Flora und Fauna, zu schützen und zu revitalisieren.

In der Abb. 3-21 ist der Verlauf der Tisza mit den entsprechenden Probenstellen dargestellt. Das Beprobungsgebiet liegt im nordöstlichen Teil Ungarns. Die Probenstelle S 1 befindet sich an einem Altarm der Szamos, dessen Ergebnisse den Referenzzustand darstellen und entsprechend verwendet wurden. An den Probenstellen S 2 und S 3 für die Szamos sowie T 1 für die Tisza wurden jeweils Proben vor dem Zusammenfluss der Flüsse entnommen. Direkt in Tokaj (T 2) wurde die Tisza nach der Durchmischung beider Flüsse beprobt. T 3 wurde in Tiszakeszi beprobt. Die folgenden Stellen T 4 und T 5 befinden sich am Tisza-Stausee. Während T 4 unmittelbar am äußeren Becken liegt, befindet sich die Probenstelle T 5 oberhalb der Staumauer ca. 500 m von dieser entfernt.

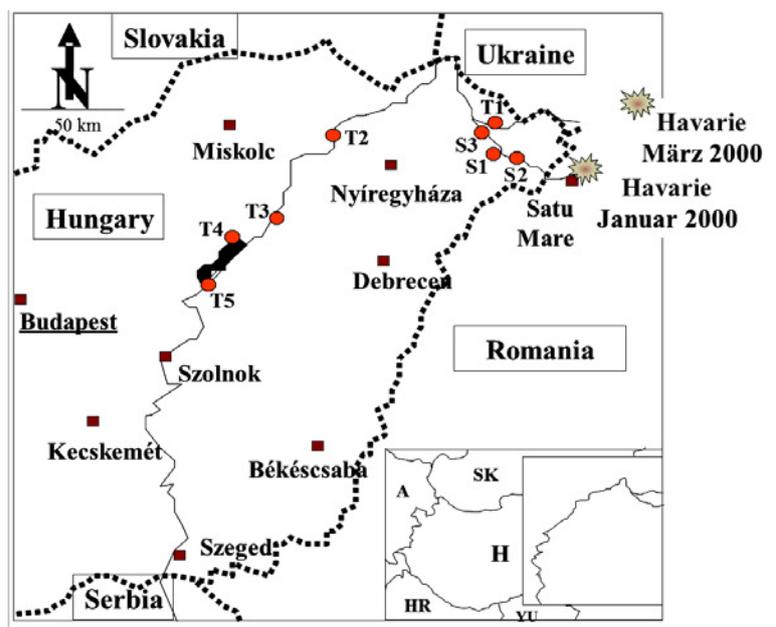


Abb.3-21: Probennahmestellen im Verlauf der Tisza, mit dem Zufluss der Szamos, Probenahme 2002 (MAGES et al. 2004b, geändert)

### (3) *Probennahme*

Unter Beachtung der in Kap. 2.4.3 aufgeführten Kriterien zur Vermeidung bzw. Reduzierung von Kontaminationen erfolgte die Entnahme der Biofilme an ausgesuchten Stellen und differenzierten Trägermaterialien, wie Steine, Holzteile, Gummireifen oder Metalloberflächen. Biofilme, die eine bereits sichtbare Sedimentationsschicht aufwiesen, wurden direkt mit filtriertem Umgebungswasser (Celluloseacetat, Porengröße 0,2 µm, Sartorius, Deutschland) gespült und grobe Verunreinigungen entfernt. Das Probenmaterial wurde in PTFE-Behälter (7 mL, Savillex, USA) überführt und für den Transport in flüssigem Stickstoff gelagert.

### (4) *Methoden und Analytik*

Die gefrorenen Proben wurden im Labor in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1, Christ, Deutschland) getrocknet (-20 °C). Das gesamte Probenmaterial (teilweise nur 500 µg) wurde in PTFE-Behältern mit konischem Boden (Savillex, USA) mittels Mikro-Pistill homogenisiert. 300 – 500 µg Probenmaterial wurden auf einer Ultra-Mikrowaage (S4, Sartorius, Deutschland) gewogen und wiederum in PTFE-Behälter (7 mL) überführt (Differenzwägung). Nach der Zugabe von 1,5 mL HNO<sub>3</sub> (65 %, suprapur, Merck, Deutschland) und 50 ng Ga (interner Standard) wurden die Gefäße mit einem

Spezialschlüssel verschlossen. Der Aufschluss erfolgte mittels Mikrowelle (MARS 5, Firma CEM, Deutschland), in Spezialbehältern für Mikroproben. Bei einer Leistung von 300 W und einem Druck von 0,5 bar war eine Haltezeit von 10 min ausreichend. Zur Qualitätskontrolle wurde nach dem gleichen Prozedere zertifiziertes Referenzmaterial (Plankton CRM 414, BCR<sup>®</sup>) aufgeschlossen.

Die Analysierung mit der TXRF erfolgte nach den Ausführungen in Kapitel 3.1.

#### **(5) Ergebnisse der großskaligen Längsprofiluntersuchungen**

Die Analysenergebnisse der natürlich gewachsenen Biofilme der Flüsse Szamos und Tisza sind in Tabelle 3-8 aufgelistet. Mit erhöhten Elementakkumulationen deuten sie auf eine erhebliche Belastung hin. Besonders deutlich wird die Schadstoffbelastung der Szamos an den Probenstellen S 1 und S 3 im Vergleich zu S 2, einem unbelasteten Altarm der Szamos. Dieser Altarm diente für alle Untersuchungen als Referenzstelle, da es hier zu keinerlei Kontaminationen durch den Dambruch kam. Die Unterschiede der Elementgehalte zu den beiden folgenden Probenstellen liegen teilweise im Bereich von 2 Größenordnungen (z.B. Zn mit einem Faktor von 145). Erhöhte Elementgehalte im Vergleich zu S 2 wurden auch für Cu (Faktor 25), As (Faktor 12) und Cr (Faktor 9) nachgewiesen.

Aufgrund ungünstiger Probennahmbedingungen wurde der Biofilm an der Probenstelle S 1 an einem Eisenboot entnommen. Damit verbunden sind erhöhte Cr, Fe und Zn Gehalte. Der erhöhte Bleigehalt resultiert vermutlich aus Altanstrichen (Bleimennige als Korrosionsschutz). Für eine weitere Aus- und Bewertung ist diese Probe deshalb nicht geeignet und ist ein Beweis für ein ungewolltes Kontaminationsrisiko. Die Ergebnisse werden durch die signifikanten Unterschiede zu den Biofilmen vom Aufwuchsträger Stein (S 3) bestätigt.

Die Variabilität von K, Ca und Sr ist charakteristisch für den geogenen Hintergrund an den einzelnen Probenstellen und weist an S 1 und S 3 keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Abb. 3-22 zeigt den hohen Schwebstoffgehalt der Szamos während des Zusammenfließens beider Flüsse. Nach der Vermischung (T 2) wurden für die Elemente Mn, Cu, Zn und As wesentlich geringere Elementakkumulation gefunden. Für Cr hingegen konnte eine Erhöhung festgestellt werden. Die Elemente Fe, Ni und Pb zeigten nur marginale Veränderungen. Diese unterschiedlichen Konstellationen der Akkumulation zeigten sich

auch an den folgenden Probennahmestellen T 3 - T 5. Teilweise kam es immer wieder zu den unterschiedlichsten An- bzw. Abreicherungen, die auf keine Synergie hinweisen. Geht man bei den Biofilmen von heterogenen biologischen Gefügen aus, sind diese Abweichungen als natürlich einzustufen. Abhängig von der Bioverfügbarkeit der Elemente, den freien Sorptionsplätzen, der heterogenen Verteilung von Mikrokolonien im Biofilm und den saisonalen Milieubedingungen verläuft das Akkumulationsverhalten sehr differenziert (CHARACKLIS und MARSHALL 1990).

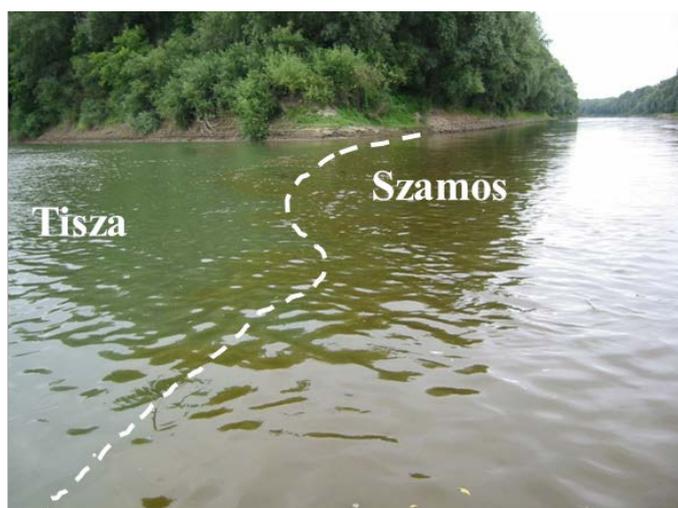


Abb. 3-22: Zusammenfluss Szamos und Tisza, mit sichtbar hohem Schwebstoffeintrag über die Szamos

Der hohe Zn-Gehalt an der Probenstelle T 2, mit  $4.780 \mu\text{g g}^{-1}$ , lässt sich einer bekannten Kontaminationsquelle zuordnen. Das Abtragen des Biofilmes erfolgte von einer Gummimatte eines Ponton, die ein reiches Biofilmwachstum aufwies. Unter Beachtung aller Voraussetzungen für die Vermeidung von Kontaminationen während der Probengewinnung konnte ein geringer Gummiabtrag nicht vermieden werden. Nach Literaturrecherchen resultiert der hohe Zinkgehalt aus dem Vulkanisierungsprozess während der Gummiproduktion, bei dem Zinkoxid als Hilfsstoff eingesetzt wird (OHNESORGE und WILHELM 1991).

Tab. 3-8: Mittlere Elementgehalte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen ( $s$ ) der großskaligen Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Probenahme 2002,  $n = 3$ ,  $s =$  Standardabweichung [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2004a)

Probenort	Győrtelek Alarn-Szamos	Szamoságyi Szamos	Olcsva Szamos	Tiszaadony Tisza	Tokaj Tisza	Tiszakeszi Tisza	Tiszavalk Tisza-Stausee	Kisköre Tisza-Stausee								
Code-Nr.	S 2	S 1	S 3	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5								
Substrat	Holz	Eisenboot	Stein	Stein	Gummi	Eisenboot	Aluminium	Stein								
Element	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$						
K	17.400	1.000	5.450	110	8.910	4.130	13.000	2.400	11.000	200	13.600	4.000	19.600	500	15.000	800
Ca	87.400	300	28.400	600	31.900	3.200	13.200	1.300	19.800	500	21.400	800	25.100	400	34.200	6.700
Cr	10,4	1,1	96,7	6,5	34,7	10,3	73,6	6,1	56,0	12,6	72,5	9,3	<30		72,6	10,0
Mn	1.900	30	13.400	200	10.700	1.000	2.730	210	2.230	40	2.810	110	27.100	300	1.350	160
Fe	6.580	600	47.100	500	26.900	700	27.400	800	28.800	400	34.300	700	10.700	100	31.500	1.100
Ni	19,3	0,8	64,7	1,5	75,1	4,7	64,1	2,0	36,9	4,7	47,2	0,8	14,4	2,7	40,4	3,5
Cu	8,21	1,05	209	0	228	17	83,3	8,6	63,0	2,2	82,4	0,5	19,7	4,3	53,7	3,7
Zn	38,5	1,9	5.570	50	2.430	160	751	36	4780	80	535	18	88,7	2,9	213	15,0
As	7,94	1,07	96,1	1,8	99,0	1,9	24,6	1,3	31,8	3,7	30,8	0,4	42,1	1,7	21,1	1,9
Sr	266	1	150	4	191	156	171	78	89,4	2,9	106	30	90,2	2,1	166	58,0
Pb	12,5	1,3	217	6	72,6	10,3	57,0	7,4	46,9	5,3	65,6	1,6	8,3	3,4	29,3	4,0

---

Der saisonale Vergleich der Elementakkumulation zu unterschiedlichen Beprobungszeiten wird in Tabelle 3-9 ersichtlich. Mit Ausnahme von Cu an den Stellen S 3, T 2 und As an T 5, weisen alle Elemente eine deutliche Erhöhung von 2000 zu 2002 auf. Als Ursache kommt in Frage, dass i) die Spurenelemente mit dem Sediment flussabwärts transportiert worden sind, ii) in Abhängigkeit von der Biofilmstruktur, den Transportmechanismen und der Anhaftung der Biofilme (vertikal oder horizontal) unterschiedliche Akkumulationen, z.B. differenzierte Sedimentation auf horizontalen Biofilmen, erfolgen (CHARACKLIS und MARSHALL 1990) und iii) abhängig von dem saisonalen Wachstum (2000 Sommer, 2002 Herbst) Austauschmechanismen stattfanden. Letztere Annahme würde die Desorption der Elemente K, Ca und Sr zugunsten der Elementanreicherung vermuten lassen. Auch der unmittelbare Vergleich der Bioverfügbarkeit der Elemente und den verfügbaren Sorptionsplätzen könnte hier eine wesentliche Rolle spielen (FLEMMING 1996). Resümierend müssen bereits bei der Beprobung von Biofilmen alle signifikanten Umgebungsbedingungen beachtet und dokumentiert werden damit für die Auswertung fundierte Angaben zur Verfügung stehen.

Tab. 3-9: Saisonaler Vergleich der Elementgehalte in Biofilmprouben von Szamos und Tisza der Probenkampagnen 2000 und 2002 [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGFS et al. 2004a)

Jahr	Probenort	Proben- stelle	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Pb
2000	Olesva	S3	16.100	42.900	78,0	7.010	24.800	59,0	261	1.520	77,0	206	68,0
2002			8.910	31.900	34,7	10.700	26.900	75,1	228	2.430	99,0	191	72,6
2000	Tokaj	T2	1.150	10.300	10,3	4.270	4.050	17,5	118	195	18,3	36,1	10,1
2002			11.000	19.800	56,0	2.230	28.800	36,9	63,0	4.780	31,8	89,4	46,9
2000	Tiszavalk	T4	28.900	13.500	79,0	1.920	23.800	35,2	38,0	157	27,6	188	56,5
2002			13.600	21.400	72,5	2.810	34.300	47,2	82,4	535	30,8	106	65,6
2000	Kisköre	T5	27.300	35.900	76,0	780	22.900	34,9	35,6	151	38,2	190	23,4
2002			15.000	34.200	72,6	1.350	31.500	40,4	53,7	213	21,1	166	29,3

### 3.3 Elementanreicherung in Zooplanktonproben

In der Nahrungskette aquatischer Systeme nimmt Zooplankton als Filtrierer von Phytoplankton und der damit verbundenen Aufnahme und Anreicherung von Elementen eine wichtige Rolle ein. Bereits in niedrigen Konzentrationen können einzelne Elemente schädigende und toxische Auswirkungen auf aquatische Organismen haben. Im folgenden Kapitel wurde untersucht, inwieweit die Elementbestimmung in einzelnen Individuen möglich ist und modifiziert werden kann. Die Anwendung der portablen TXRF-Technik ermöglichte die praktische Überführung der entwickelten Methoden bei Feldeinsätzen.

#### 3.3.1 Methodenentwicklung zur Elementbestimmung in Einzelindividuen (Krebstiere – Crustacea)

##### (1) Problemstellung

Für die Bewertung aquatischer ökologischer Systeme spielt das Zooplankton als unteres Bindeglied der Nahrungskette eine relevante Rolle. Standard ist nach wie vor der „Daphnien-Test“, der als Biotest für ökotoxikologische Bewertungen verwendet wird. Er gibt Auskunft über die zeitlichen Überlebensraten in Abhängigkeit verschiedener Schadstoffkonzentrationen. Eine Elementanreicherung in einzelnen Individuen wird dabei außer Betracht gelassen. Aber genau diese Aussagen sind für einzelne Ereignisse, wie Havarien, bei denen eine „Task Force“ direkt vor Ort notwendig ist, von besonderer Bedeutung. Die Anwendung von Biotestverfahren und hier speziell der *Daphnien-Test*, setzen eine Versuchszeit von 24 – 48 h bei  $20 \pm 2$  °C voraus (STREIT 1994). Dieser Zeitfaktor kann bei Havarien im Umweltbereich zu hoch sein. Eine schnelle Analyse in Einzelindividuen, teilweise direkt im Havariebereich, könnte als Alternative zur Anwendung kommen.

Hinzu kommt, dass Elementbestimmungen in Zooplanktonproben in wissenschaftlichen Publikationen ausschließlich in Sammelproben analysiert wurden. Dabei konnten keine direkten Aussagen über das Akkumulationsverhalten einzelner Individuen einer Art getroffen werden. So separierten CHEN et al. (2000) Zooplankton über aufwendige Filtrationstechniken und schlossen anschließend das Probenmaterial inkl. Filter auf. Dieser Ansatz, mit aufwendigen unterschiedlichsten Präparationsschritten, birgt zusätzlich immer wieder die Gefahr nicht erkannter Kontaminationen. Weitere Autoren verwendeten Einwägen von 10 bis 200 mg, um für die Anwendung von AAS und ICP-OES ausreichend Probenlösung zur Verfügung zu haben. Teilweise konnten mit der AAS nur Einzelelementanalysen durchgeführt werden und die klassische Probenvorbereitung beinhaltete zusätz-

liche Arbeitsschritte, wie aufwendige Aufschlüsse in der Mikrowelle (CLASON und ZAUKE 2000, KAHLE et al. 2003). Die nachfolgende Methodenentwicklung soll für die Anwendung der TXRF eine bisher wenig beachtete Möglichkeit der Differenzierung zur Elementbestimmung in Einzelindividuen, bzw. generell in biologischen Proben mit geringen Einwaagen, bieten.

## (2) Methoden und Analytik

Für die Bestimmung von Elementgehalten in Einzelindividuen von Crustaceen (*Daphnia pulex*) wurden zwei unterschiedliche Präparationstechniken entwickelt (Abb. 3-23):

- **„Dry“-Methode** („Troocken“-Methode), geeignet für klassische Labormessungen und
- **„Wet“-Methode** („Nass“-Methode), geeignet für Schnellbestimmungen im Feld

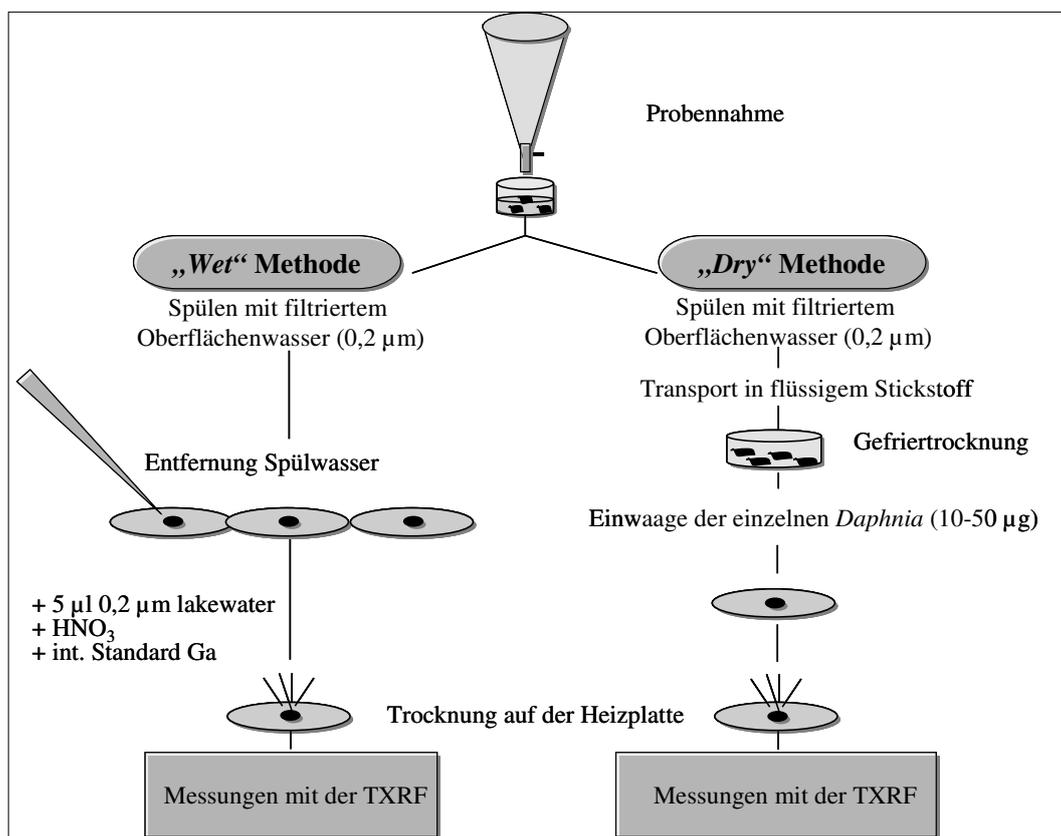


Abb.: 3-23: Präparationstechniken der „Wet“- und „Dry“-Methoden (MAGES et al. 2001, geändert)

Die Probenahme erfolgte mit einem metallfreien Netz für Zooplankton (Durchmesser: 20 cm; Maschenweite: 200 µm). Die Proben wurden bei 4 °C im Umgebungsmedium gelagert und im Labor umgehend weiterverarbeitet. Wie in Abbildung 3-23 ersichtlich, wurde das Probenmaterial von der anhaftenden Matrix durch Spülen mit filtriertem Um-

gebungswasser (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, Celluloseacetat, Sartorius) „gereinigt“. Um den Stressfaktor für das Zooplankton zu minimieren und ein Ausschwemmen akkumulierter Elemente zu verhindern wurde dieser Arbeitsschritt schonend durchgeführt. Die Verwendung von Reinstwasser hätte sofort zu osmotischen Druckveränderungen innerhalb der Crustaceen bzw. in den Zellen und somit zu einem Ausschwemmen der Elemente geführt (ATKINS und De PAULA 2005).

Das Probenmaterial wurde für die nachfolgenden Methodenentwicklungen wie folgt aufgeteilt:

### „Dry“-Methode

Für die „Dry“-Methode wurde das Zooplankton bei -40 °C gefroren und gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1). Aus dem getrockneten Zooplankton wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi 11, ZEISS) *Daphnia pulex* taxonomisch bestimmt, selektiert und mit metallfreien Pinzetten von anhaftenden Verunreinigungen gesäubert.

Auf einer Ultramikrowaage S 4 (Empfindlichkeit 0,1 µg, Sartorius, Deutschland) wurde das Trockengewicht bestimmt und nach der folgenden Formel über die relative Luftfeuchtigkeit korrigiert (BERBEROVIC et al. 1989, BERBEROVIC 1990).

$$DW_0(\mu\text{g ind}^{-1}) = \frac{DW_x}{1 + AH_x * CF} \quad (6)$$

- $DW_0(\mu\text{g ind}^{-1})$ : Trockengewicht pro Individuum, extrapoliert auf 0% Luftfeuchtigkeit  
 $DW_x$ : Trockengewicht  
 $AH_x$ : relative Luftfeuchtigkeit während der Wägung  
 $CF$ : empirischer Korrekturfaktor ( $0,00293 \pm 0,00013$ )

Die Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 33,1 % und 44,3 %.

Die Trockengewichte der Daphnien bewegten sich in einer Größenordnung von 3 bis 40 µg. Die gewogenen Daphnien wurden auf Quarzglasprobenträgern zentriert aufgetragen, mit 5 µL Reinstwasser fixiert und luftgetrocknet. Nach der Zugabe von 5 µL HNO<sub>3</sub> (suprapur, Merck, Deutschland) incl. 5 ng Gallium als internen Standard, erfolgte der Aufschluss auf einer Heizplatte bei 80 °C. Die Messungen wurden mit der stationären TXRF 8030 C durchgeführt.

**„Wet“-Methode**

Für die Präparation nach der „Wet“-Methode wurde das Zooplankton luftgetrocknet, *Daphnia pulex* selektiert und wie oben beschrieben gesäubert.

Mittels Mikroskop (ZEISS Axioplan II) wurden bei einer 25-fachen Vergrößerung unter Verwendung eines Bild-Analyse-System (Kontron, ZEISS) die Körperlängen der einzelnen Daphnien vermessen. Das Trockengewicht wurde schließlich über die zuvor bestimmte „Körperlängen – Trockengewichts – Relation“ nach WÖLFL (1995; n = 130) ermittelt.

$$DW_0 (\mu g \text{ ind}^{-1}) = a * L^b \quad (7)$$

$DW_0 (\mu g \text{ ind}^{-1})$ : Trockengewicht pro Individuum, extrapoliert auf 0% Luftfeuchtigkeit

$L$ : Körperlänge (mm)

$a$  und  $b$ : Regressionskoeffizienten

Vergleichende Längenmessungen des einzelnen Probenmaterials zeigten, dass die nassen und luftgetrockneten Daphnien ein 3 % geringeres Längenmaß als die gefriergetrockneten Proben aufwiesen und über den Korrekturfaktor  $f$  entsprechend korrigiert werden mussten.

Daraus resultierend wurde das endgültig korrigierte Trockengewicht wie folgt ermittelt (8):

$$DW_{\text{korr}} (\mu g) = DW_{\text{unkorr}} (\mu g) * f \quad (8)$$

$DW_{\text{korr}}$ : korrigiertes Trockengewicht [ $\mu g$ ]

$DW_{\text{unkorr}}$ : unkorrigiertes Trockengewicht [ $\mu g$ ]

$f$ : empirisch ermittelter Korrekturfaktor (1,0816).

Die weitere Probenpräparation erfolgte analog der „Dry“-Methode.

**(3) Qualitätssicherung durch die Ermittlung der Wiederfindungsrate**

Zur Validierung wurde sowohl das zertifiziertes Referenzmaterial als auch das verwendete Probenmaterial einbezogen. Die Verifizierung der Präparation und Analysierung von Zooplanktonproben als Einzel-Individuen erwies sich allerdings als sehr kompliziert, wenn erst, wie bei QUEVAUVILLER et al. (1993a) angegeben, Mindestwaagen von 500  $\mu g$  reproduzierbare Ergebnisse bringen.

Während für die Analyse von Probenmaterialien mit größerer Einwaage, z.B. von Biofilmen, der Aufschluss in separaten Gefäßen erfolgt und somit zertifiziertes Referenzmaterial dem gleichen Prozedere wie den Proben unterzogen werden kann (Kapitel 3.1.2), erfolgte der Aufschluss des Zooplankton als Einzelindividuum direkt auf dem Probenträger. Die Überprüfung der Richtigkeit der gesamten Präparationsschritte, einschließlich der Mikroaufschlüsse auf dem Träger und letztendlich die Reproduzierbarkeit der Messungen mit zertifiziertem Material in Analogie zu den realen Proben bildeten die Grundlage für die Methodvalidierung.

Folgende Möglichkeiten der Kontrolle für die Präparation von Zooplankton kamen zur Anwendung:

- a) Aufstockungen von Einzelindividuen mit einem Element-Mix (Standardaddition)
- b) Direkte Präparation und Aufschluss von zertifiziertem Referenzmaterial auf Quarzglasträgern und anschließende Aufstockung mit einem Element-Mix
- c) Standardlose Quantifizierung über zertifizierten Zn-Gehalt

Der Ablauf der Präparation dieser Möglichkeiten erfolgte nach folgenden differenzierten Schemen:

zu a) *Aufstockungen von Einzelindividuen mit einem Element-Mix (Standardaddition)*

Einzelindividuen von *Daphnia* (14,1 – 33,8 µg Trockengewicht, n = 10), nach der „Dry“-Methode analysiert, wurden mit einem Standardmix der Elemente K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Pb aufgestockt und nochmals mit der TXRF analysiert. Die Differenz beider Messungen ergab die Wiederfindungsraten der aufgestockten Elemente.

Die Wiederfindungsrate (WFR) errechnet sich bei dieser Anwendung wie folgt:

$$WFR = \frac{D_s}{D_{orig}} * 100 \quad (9)$$

WFR: Wiederfindungsrate (5)

$D_s$ : Differenz Elementgehalt *Daphnia* und Mix (4)

$AE_s$ : Absolute Elementgehalte Mix (1)

$D_{orig}$ : Elementgehalt pro *Daphnia* (3)

In Tabelle 3-10 sind neben den absoluten Elementgehalten im Element-Mix (1) und bezogen auf den Element-Mix pro *Daphnia* (2), der gemessene Elementgehalt in den Einzelindividuen *Daphnia pulex* (3) und in den aufgestockten *Daphnia pulex* abzüglich Element-Mix (4) dargestellt. Die Wiederfindungsrate der einzelnen Elemente wurde ermittelt und in Tab. 3-10 unter (5) aufgeführt.

Mit Ausnahme von Cu (120 %) und Ni (80 %) variieren die Wiederfindungsraten der analysierten Elemente zwischen 102 und 111 %. Die relativ großen Abweichungen von Cu und Ni können mit der Annäherung an die Bestimmungsgrenzen für diese Probenmatrix begründet werden.

Tab. 3-10: TXRF-Analyse von Einzelindividuen von *Daphnia pulex* (Laja See, Chile, 14,1 - 33,8 µg Einwaage pro Einzelindividuum,  $n = 10$ ), aufgestockt mit einem Element-Mix von K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr und Pb (MAGES et al. 2001)

Element	Element-Mix		<i>Daphnia pulex</i>		(5) Wiederfindungsrate (WFR) [%]
	(1)	(2)	(3)	(4)	
	Abs. Elementgehalt Mix [ng]	Elementmix pro <i>Daphnia</i> [µg g <sup>-1</sup> ]	Elementgehalt pro <i>Daphnia</i> [µg g <sup>-1</sup> ]	Differenz Elementgehalt <i>Daphnia</i> und Mix [µg g <sup>-1</sup> ]	
K	26	1.470	9.200	9.580	104
Ca	108	6.090	45.600	46.700	102
Mn	2,6	145	63	70	111
Fe	9,7	546	429	444	104
Ni	0,25	14	7,7	6,1	80
Cu	0,22	13	8,5	10,2	120
Zn	0,22	159	120	130	108
Sr	2,4	134	126	133	105
Pb	0,28	16	6,7	7,3	109

zu b) *Direkte Präparation und Aufschluss von zertifiziertem Referenzmaterial und anschließende Aufstockung mit einem Element-Mix*

Als geeignetes zertifiziertes Referenzmaterial wurde CRM 414 ausgewählt. Dieses Referenzmaterial besteht zu > 97 % aus *Daphnia magna* (BERBEROVIC 1990). Das Probenmaterial wurde auf einer Ultramikrowaage (S4, Sartorius) im Bereich von 12,3 - 51,9 µg auf Wägebepapier gewogen und möglichst zentriert auf Quarzglasprobenträger überführt. Das Wägen und Überführen zeigte sich auf Grund der statischen Aufladung des Materials als sehr aufwendig und fehlerbehaftet und musste mehrfach wiederholt werden.

Die Gewichtsermittlung erfolgte durch Differenzwägung. Analog dem Mikroaufschluss für einzelne *Daphnia pulex* wurde das auf den Trägern überführte Referenzmaterial mit 10 µL HNO<sub>3</sub> (suprapur, Merck, Deutschland) und 5 ng Gallium als internen Standard, direkt auf einer Heizplatte bei 100 °C aufgeschlossen. Nach dem Messen mit der TXRF wurden die Träger mit einem Element-Mix aufgestockt und wiederholt gemessen.

In Tabelle 3-11 sind die Ergebnisse der direkten Präparation und des Aufschlusses von zertifiziertem Referenzmaterial und anschließender Aufstockung mit einem Element-Mix mit den entsprechenden Wiederfindungsraten aufgelistet.

Geht man davon aus, dass nur ca. 5 % der von QUEVAUVILLER et al. (1993a) empfohlenen Einwaage für eine signifikante Wiederfindung eingesetzt wurden, sind die Wiederfindungsraten zwischen 86 und 119 %, mit Ausnahme von Cr mit 141 %, akzeptabel. Zu berücksichtigen ist auch der aufwendige Transfer auf den Probenträger. Während das Probenmaterial aus „nur“ einem Individuum besteht, in diesem Fall einer einzelnen *Daphnia pulex*, liegt das Referenzmaterial fein homogenisiert vor. Damit kann für das Element Cr angenommen werden, dass aufgrund seiner Bindungsform innerhalb der Probenmatrix stark ausgeprägte Inhomogenitäten vorliegen. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender subjektiver Fehler ist der gesamte Prozess der Einwaage, bei dem es trotz Einhaltung der Qualitätssicherung zu Materialverlust kommen kann.

Tab. 3-11: TXRF-Analyse von zertifiziertem Referenzmaterial CRM 414 (Einwaage 12,3 - 51,9  $\mu\text{g}$ ), aufgestockt mit den Elementen K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn und Sr (MAGES et al. 2001)

Element	Zertifizierte Referenzwerte CRM 414	Element-Mix		mit Element-Mix aufgestocktes Referenzmaterial	
	Mittelwert + Standardabweichung [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	Absoluter Element- gehalt [ng]	Elementgehalt bezogen auf Einwaage [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	Differenz Element- gehalt Ref.Mat. - Mix [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	Wiederfindungsrate (WFR) [%]
K	7.550 $\pm$ 170	26	1.040	7.830 $\pm$ 766	104
Ca	65.000 $\pm$ 200	108	4.300	65.400 $\pm$ 5.000	101
Cr	23,8 $\pm$ 1,2	0,6	22	34 $\pm$ 10,5	141
Mn	299 $\pm$ 12	2,6	103	261 $\pm$ 29,1	87
Fe	1.850 $\pm$ 190	9,7	386	1.930 $\pm$ 401	104
Ni	18,8 $\pm$ 0,8	0,25	10	22 $\pm$ 4,6	119
Cu	29,5 $\pm$ 1,3	0,22	9	31 $\pm$ 6,4	106
Zn	112 $\pm$ 3	0,22	112	111 $\pm$ 16,4	99
Sr	261 $\pm$ 25	2,4	94	224 $\pm$ 23	86

zu c) *Standardlose Quantifizierung über zertifizierten Zn-Gehalt*

Zur Überprüfung, inwieweit ein bekannter Elementgehalt in der Probe für die Quantifizierung geeignet ist, wurde zertifiziertes Referenzmaterial ohne Wägung auf Quarzglasprobenträgern positioniert, mit Salpetersäure aufgeschlossen und mit der TXRF gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über ein im Referenzmaterial zertifiziertes Bezugselement, in diesem Fall Zn.

Der Bezug auf Zn wurde nach folgenden Punkten entschieden:

- optimale Signalintensität für den Quantifizierungsbereich (Signal – Untergrund – Verhältnis)
- für das zertifizierte Referenzmaterial CRM 414 reproduzierbare Wiederfindungsraten (Tab. 3-11), daher Annahme einer guten Zn-Homogenität innerhalb der Proben
- Zn ist nur geringfügig partikulär gebunden und somit leicht löslich

Basierend auf den in Abbildung 3-24 dargestellten Ergebnissen kann von einem akzeptablen direkten Aufschluss auf dem Probenträger ausgegangen werden.

Diese Methode ist somit eine gute Alternative u. a. für Feldversuche, wenn keine geeignete Ultramikrowaage zur Verfügung steht. Sie bietet weiterhin die Möglichkeit das gesamte Präparationsprozedere qualitativ zu überprüfen.

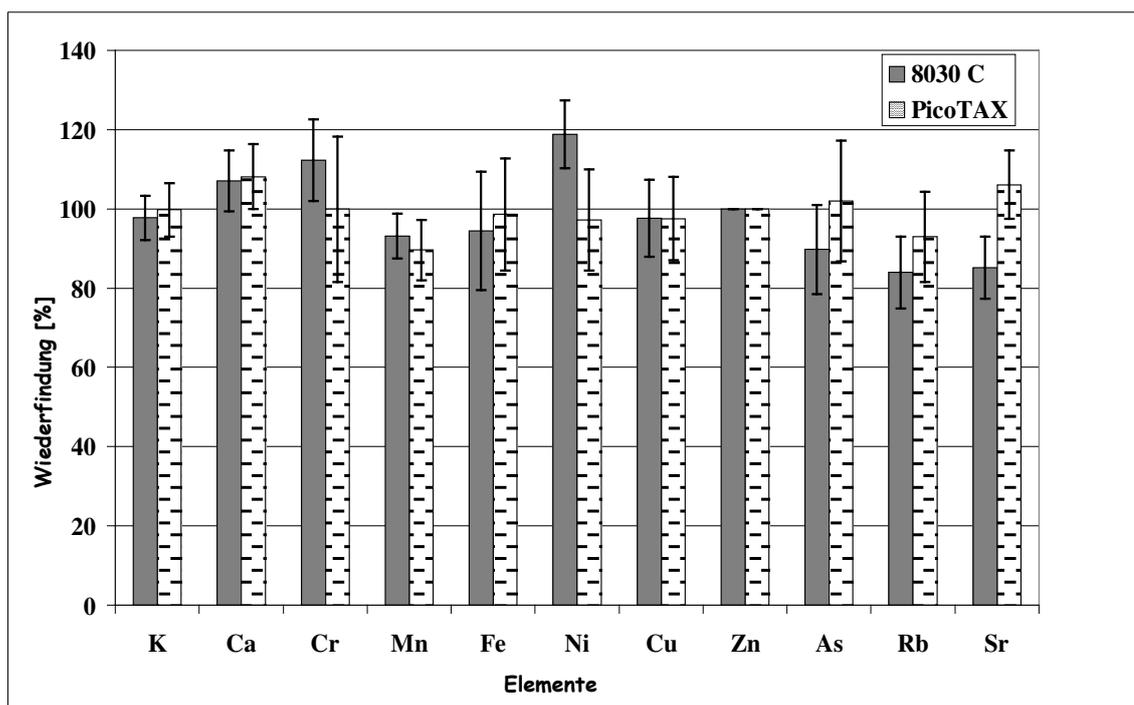


Abb. 3-24: Wiederfindungsraten ausgewählter Elemente im zertifizierten Referenzmaterial CRM 414 ohne Wägung, Quantifizierung mittels bekanntem Zn-Gehalt als internem Standard, Messungen mit den TXRF-Spektrometern PICOFOX™ und 8030 C (MAGES et al. 2004b)

(4) ***Ergebnisse der Methodenentwicklung zur Elementbestimmung in Einzelindividuen (Zooplankton): „Dry“ – und „Wet“-Methode***

Die beiden Präparationstechniken, die „trockene (Dry)“- und die „nasse (Wet)“-Methode, wurden entwickelt um in einzelnen Mikrocrustaceen, hier *Daphnia pulex*, Elementakkumulationen untersuchen zu können. Während für die klassischen Vorbereitungsmethoden biologisches Probenmaterial mit einer Einwaage im *mg-Bereich* benötigt wird, wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne Exemplare im *µg-Bereich* präpariert und analysiert.

Die „Wet“-Methode ist vorrangig für Feldstudien geeignet, wenn keine Kühlmöglichkeiten zur Verfügung stehen bzw. Probenpunkte selektiert werden sollen. Voraussetzung ist hierfür, dass die „Körperlängen – Trockengewichts – Relation“ bekannt ist (DUMONT et al. 1975, BOTTRELL et al. 1976). Als wichtiger Aspekt bei der Bearbeitung von lebendem Zooplankton ist das Spülen zu beachten. Durch den Einsatz von filtriertem Seewasser werden der physiologische Stress und das daraus resultierende Auslaugen von Elementen, wie P, K und S, weitestgehend minimiert (PETERS 1987).

Im Gegensatz dazu wurde die „Dry“-Methode als quantitative Methode für den Spurenbereich im Labormaßstab entwickelt. Der Zeitfaktor sollte bei dieser Methode nicht unterschätzt werden. Im Vergleich zur „Wet“-Methode fallen zusätzliche Präparationsschritte an, wie die Gefriertrocknung und das aufwendige und fehlerbehaftete Wägeprozedere.

Die Ergebnisse des erweiterten *t*-Tests sind in Tabelle 3-12 aufgeführt und zeigen, dass außer für die Elemente S, Mn und Sr keine signifikanten Unterschiede auftreten. Es kann angenommen werden, dass die Differenzen für diese Elemente aus den höheren Elementgehalten in der Wasserphase resultieren. Für Sr, das ubiquitär vorkommt, kann diese Annahme mit  $19 \mu\text{g L}^{-1}$  als relevant eingeschätzt werden. Während für die Präparation nach der „Dry“-Methode Reinstwasser verwendet wurde, kam bei der „Wet“-Methode  $5 \mu\text{L}$  filtriertes Seewasser zum Einsatz.

Tab. 3-12: Vergleich der „Dry“- und „Wet“-Methode für die Elementbestimmung in einzelnen *Daphnia pulex*-Individuen. Ergebnisse des "erweiterten *t*-Test" (MAGES et al. 2001)

Element	<i>t</i>	T <sub>95,25</sub>	T <sub>99,25</sub>	Differenz der Methoden
P	1,34	2,06	2,79	nicht signifikant
S	2,30	2,06	2,79	signifikant
K	0,91	2,06	2,79	nicht signifikant
Ca	1,77	2,06	2,79	nicht signifikant
Mn	3,03	2,06	2,79	signifikant
Fe	1,34	2,06	2,79	nicht signifikant
Cu	1,10	2,06	2,79	nicht signifikant
Zn	1,57	2,06	2,79	nicht signifikant
Br	0,27	2,06	2,79	nicht signifikant
Sr	2,38	2,06	2,79	signifikant

### 3.3.2 Methodenadaption zur Reduzierung der organischen Matrix mittels Kalt-Plasma-Veraschung (CPA)

#### (1) Problemstellung

Bei der im Kapitel 3.3.1 beschriebene Methodenentwicklung zur Analyse von Elementen in gefriergetrocknetem Zooplankton wurden Kohlenstoff-Gehalte von ca. 90 mg g<sup>-1</sup> nachgewiesen (BCR<sup>®</sup> 1993). Diese können bei der direkten Messung von Einzelindividuen Streu- und Absorptionseffekte hervorrufen und damit zu schlechteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bzw. zu einer größeren Varianz führen. Diese Effekte, hier Matrixeffekte genannt, galt es zu minimieren. Für die Eliminierung der Kohlenstoffmatrix kamen nur die Methoden in Frage, die den Einsatz der bereits auf den Probenträger präparierten Zooplanktonproben gewährleisteten. Auch hierbei stand die Vermeidung bzw. Reduzierung von Kontaminationen im Vordergrund.

Die vielfach angewandte mikrowelleninduzierte Aufschlussmethode wurde aufgrund der geringen Probenmenge nicht in Erwägung gezogen und ist nur für den Aufschluss von Sammelproben geeignet. Als geeignete Methode bot sich die Veraschung in einem aktivierten Sauerstoffplasma (CPA) an. Dabei bestand die Möglichkeit, die Probe direkt auf

dem Trägermaterial, das für die anschließende Elementbestimmung mit der TXRF verwendet wird, zu veraschen.

Dazu entwickelten KAISER und TSCHÖPEL unter der Federführung von TÖLG bereits 1971 eine Veraschungsapparatur, nach der das Prinzip der „kalten Verbrennung“ mit aktiviertem Sauerstoff (GLEIT 1965) als Aufschlussverfahren angepasst wurde (MORSCHES und TÖLG 1970).

Neben technischen Anwendungen (Halbleitertechnologie) wird die CPA hauptsächlich zur Verbesserung der Bestimmungsgrenze von Spurenelementen in biologischen Materialien und hier speziell für die TXRF eingesetzt. Bereits in den 80er Jahren wurde nachgewiesen, dass in biologischen Proben im kalten Sauerstoffplasma bei max. 180 °C Kohlenstoff verascht wird (RAPTIS et al. 1983). Weiterführende Anwendungen mit den unterschiedlichsten Applikationen für den biologischen Bereich und der Aerosol-Analytik folgten (BETHEL et al. 1989, REUS 1991, WHITE und LAWRENCE 1995, JAKES und MITCHELL 1996, DE STASIO et al. 1997, SCHMELING und KLOCKOW 1997, THEISEN und NIESNER 1999, CARVALHO et al. 2001, WOELFL et al. 2003, WAGNER und MAGES 2010).

Kohlenstoff nimmt im Zooplankton (*Daphnia*) mit ungefähr 50 % der Trockenmasse (BERBEROVIC 1990, Zertifikat CRM 414, BCR<sup>®</sup>) einen wesentlichen Anteil der Matrixstruktur ein. Diese hohe Matrix beeinflusst hauptsächlich das Nachweisvermögen einiger Spurenelemente, wie Chrom und Nickel. Daraus resultieren bei geringen „Signal-zu-Untergrund-Verhältnissen“ erhöhte Standardabweichungen, die eine exakte Quantifizierung mit der TXRF negativ beeinflussen können. Erst mit der CPA-Technik ist die einfache Oxidation der organischen Matrix, die Voraussetzung für spektroskopische Untersuchungen von Spurenelementen, gegeben (DE STASIO et al. 1997, THEISEN und NIESNER 1999, WAGNER und MAGES 2010). Durch die Umgehung aufwendiger Aufschlussstechniken und Vermeidung unzähliger Zwischenschritte werden außerdem Kontaminationen des Probenmaterials wesentlich minimiert.

In der Abbildung 3-25 sind bereits präparierte Zooplanktonproben, in diesem Fall *Daphnia pulex*, dargestellt. Sie zeigen vor und nach der Veraschung erhebliche Unterschiede in der Struktur des Präparationsfleckes (z.B. Kraterbildung vor der Veraschung) (WOELFL et al. 2003).

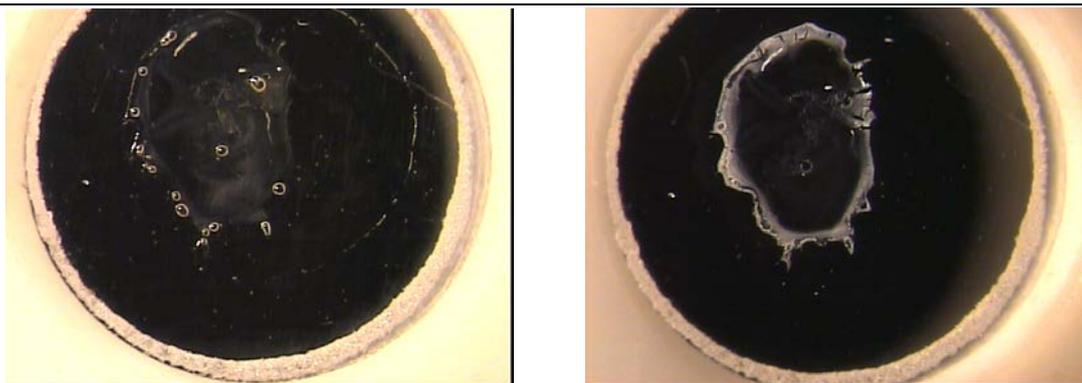


Abb. 3-25: Präparierte *Daphnia pulex*-Einzelindividuen vor (links) und nach (rechts) der Veraschung in einem CPA (WOELFL et al. 2003)

Ziel dieser Methodenentwicklung war es deshalb:

- a) den Untergrund für die TXRF-Messungen zu reduzieren,
- b) die Annahme zu bestätigen, dass das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis zunimmt und
- c) Wiederfindungsraten und Elementverluste nach der Veraschung zu überprüfen

#### (2) Analytische Herangehensweise

Für die Durchführung der Versuche kam ein Kalt-Plasma-System der Firma PVA TePla AG vom Typ 100 zum Einsatz. Um die Eigenschaften des Plasmas erreichen zu können, werden Hochfrequenzwellen in eine Vakuumkammer (0,5 bis 2 Millibar) geleitet. Unter Einleitung eines Reaktionsgases zerschlagen die durch die Hochspannung beschleunigten freien Elektronen das Gas in Ionen (positive Ladung), Elektronen (negative Ladung), Radikale sowie neutrale Teilchen, das Gas wird quasi „ionisiert“. Als Folge leuchtet in der Prozesskammer eine Plasmawolke (Abb. 3-26). Dabei reagieren die chemischen Radikale je nach Art des Gases mit der Oberfläche des Werkstücks und bilden flüchtige Verbindungen, die mit der Vakuumpumpe abgesaugt werden. Die Reaktion wird wesentlich durch die Radikale und die ultraviolette Strahlung bestimmt, das Leuchten wird durch das „Zurückspringen“ kurzfristig frei gewordener Elektronen auf den positiv geladenen Kern der neutralen Teilchen ausgelöst.

Kennzeichnend für dieses „Niederdruckplasma“ ist, dass hier Reaktionen in einem Temperaturbereich zwischen 60 und 180 °C ablaufen, die unter Atmosphärendruck erst bei mehreren hundert Grad möglich wären (Firmen-Gerätespezifikation).

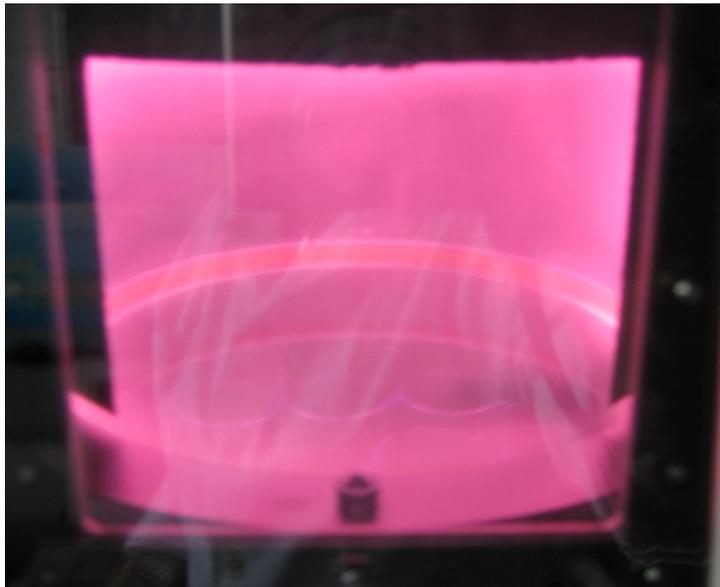


Abb. 3-26: Probenträger in der Plasmawolke des CPA

Für die Entwicklung und Verifizierung dieser neuen Methode mussten alle Proben vor und nach der Veraschung mit der TXRF gemessen werden. Die Präparation wurde wie folgt durchgeführt:

- Im ersten Schritt wurden die Zooplankton-Proben analog der unter 3.3.1 beschriebenen „Dry“-Methode auf Quarzglasträgern präpariert und mit der TXRF gemessen.
- Anschließend wurden die gleichen Proben im Sauerstoffplasma ausgesetzt und der Kohlenstoff oxidiert.

Folgende Parameter wurden vorausgesetzt:

Sauerstoff	–	Reinheit 99,995 % und 1 mbar
Leistung	–	300 Watt
Reaktionszeit	–	2 h.

Alle Quarzglasträger wurden sowohl vor als auch nach der Veraschung mit der TXRF gemessen und ausgewertet.

(3) *Qualitätskontrolle*a) *Kontaminationen durch die CPA*

Für die Qualitätskontrolle wurden 30 gereinigte Quarzglassträger vor und nach der Veraschung als Blindwerte behandelt, mit der TXRF gemessen und die Intensitäten über das Argon-Signal (Kap. 3.1.2) ausgewertet.

Anfänglich auftretende Kontaminationen konnten durch folgende geringfügige Veränderungen reduziert bzw. vernachlässigt werden:

- für das nach dem Veraschen notwendige Konditionieren der Reaktionskammer mit Raumluft hat sich das Vorschalten eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße) bewährt
- weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zuführung von Sauerstoff über zentrale legierte Metalleitungssysteme ebenfalls zu Cu- und Ni- Kontaminationen führt. Alternativ wurde eine stationäre Sauerstoff-Gasversorgung (10 L Flasche) über PVC-Zuleitungen eingesetzt.

Die in Tabelle 3-13 aufgeführten Absolutgehalte zeigen nach der Veraschung keine signifikanten Unterschiede und somit keine Kontaminationen durch den Veraschungsprozess an.

Tab. 3-13: Absolute Elementgehalte vor und nach der Veraschung im Sauerstoff-Plasma, n = 30 (WOELFL et al. 2003)

Element	vor der Veraschung [ng]	nach der Veraschung [ng]
Cr	< 0,01	< 0,01
Mn	< 0,01	< 0,01
Fe	0,03	0,03
Ni	< 0,01	< 0,01
Cu	< 0,01	< 0,01
Zn	< 0,01	< 0,01
As	< 0,01	nicht nachweisbar
Rb	< 0,01	< 0,01
Sr	< 0,01	< 0,01

b) *Qualitätskontrolle mit Referenzmaterial*

Zur Überprüfung der Wiederfindungsrate dieser Methode wurde zertifiziertes Referenzmaterial Plankton CRM 414 (BCR<sup>®</sup> 1993, QUEVAUVILLER et al. 1993b) verwendet. Dazu wurden 10 - 30 µg Referenzmaterial nach den Angaben in Kap. 3.3.1 direkt auf Quarzglassträger überführt, mit 5 µL HNO<sub>3</sub> und 5 ng Ga (interner Standard) aufgeschlossen und mit der TXRF analysiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-14 dargestellt und weisen nach der Auswertung mittels *t*-Tests nach ZAR (1984) keine signifikanten Abweichungen auf. Die Wiederfindungsraten für alle aufgeführten Elemente bewegen sich im Bereich von 78 bis 115 %. Außer für die Elemente Mn und Ni verbesserten sich die Wiederfindungsraten nach der Veraschung signifikant.

Tab. 3-14: TXRF-Analyse von zertifiziertem Referenzmaterial CRM 414 (Spurenelemente im Plankton, > 97% *Daphnia magna*) vor und nach der Veraschung im Sauerstoff-Plasma (n = 8), WFR = Wiederfindungsrate (WOELFL et al. 2003, geändert)

Element	Referenzmaterial CRM 414 [µg g <sup>-1</sup> ]	WFR vor CPA (1) [%]	WFR nach CPA (2) [%]	<i>t</i> -Test	Differenz zwischen (1) und (2) <i>t</i> <sub>95,8</sub> = 2,31
Ca	65.000	88	92	1,15	nicht signifikant
Cr	23,8	90	105	1,73	nicht signifikant
Mn	299	81	80	-0,24	nicht signifikant
Fe	1.850	88	94	0,83	nicht signifikant
Ni	18,8	115	115	0,02	nicht signifikant
Cu	29,5	89	93	0,77	nicht signifikant
Zn	112	93	95	0,31	nicht signifikant
As	6,82	94	96	0,37	nicht signifikant
Rb	11,6	78	81	0,61	nicht signifikant
Sr	261	79	80	0,04	nicht signifikant
Pb	3,97	83	89	0,34	nicht signifikant

#### (4) *Ergebnisse zur Reduzierung der organischen Matrix*

Für die Elementuntersuchungen mittels TXRF ergeben sich nach der Kaltplasmaveraschung folgende positive Effekte:

- a) Reduzierung des Untergrundes nach der Veraschung
- b) Verbesserung des Signal – Untergrund – Verhältnis
- c) Verbesserung der Wiederfindungsraten nach der Veraschung

#### zu a) *Ergebnisse zur Reduzierung des Untergrundes nach Veraschung*

Über die Software der TXRF 8030 C ist es möglich, die Zählraten für Untergrund und Elementsignal zu separieren, um somit den Einfluss der Kaltplasma-Veraschung überprüfen zu können.

Die Reduzierung des Untergrundes ( $R_{back}$ ) durch den CPA basiert auf folgender Berechnung:

$$R_{back} (\%) = \frac{B_b - B_a}{B_b} * 100 \quad (10)$$

$B_b$ : Untergrund vor Veraschung

$B_a$ : Untergrund nach Veraschung

In Tabelle 3-15 sind die Ergebnisse ausgewählter Elemente dargestellt. Mittels  $t$ -Test konnten signifikante Unterschiede des Untergrundes vor und nach der Veraschung nachgewiesen werden. Die daraus resultierende Reduzierung des Untergrundes  $R_{back}$ , bewegt sich im Mittel für Zn bei 27 %, für Cr, Mn, Fe, Ni, Cu und As bei 31 – 39 % und 46 % für Rb und Sr.

Mit Ausnahme von As schwankt die Reduzierung des Untergrundes vor und nach der Veraschung (Minimum und Maximum) für alle aufgeführten Elemente zwischen 5 und 70 %. Für As kann angenommen werden, dass einerseits der Veraschungsprozess zu Probenverlust geführt hat. Andererseits können die Schwankungen bedingt sein durch das geringe Messsignal, das nur geringfügig über der Nachweisgrenze liegt, wie in Abb. 3-27 ersichtlich.

Tab. 3-15: Vergleich der Zählrate Untergrund vor und nach der Veraschung (CPA) von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen aus dem Laja See (Chile). Ergebnisse nach dem *t*-Test, Signifikanzlevel  $P < 0,05$  ( $n = 28$ ),  $R_{back}$  wurde nach Formel (10) berechnet, (WOELFL et al. 2003, geändert)

Element	Untergrund				
	Varianz vor CPA (Zählrate)	Varianz nach CPA (Zählrate)	$R_{back}$ [%]	<i>P</i> -Wert	Differenz vor und nach CPA
Cr	730 – 7.500	580 – 1.420	31 ± 11 (6 - 55)	0,000	signifikant
Mn	2.600 – 7.500	2.000 – 4.880	31 ± 12 (5 - 52)	0,000	signifikant
Fe	3.750 – 10.400	2.600 – 6.900	36 ± 9 (20 - 55)	0,000	signifikant
Ni	2.360 – 7.770	1.950 – 5.600	34±12 (7 - 51)	0,000	signifikant
Cu	2.600 – 7.900	2.000 – 4.600	39 ± 12 16 - 56)	0,000	signifikant
Zn	4.300 – 12.900	3.000 – 10.000	27 ± 11 (6 - 45)	0,000	signifikant
As	3.700 – 12.700	3.600 – 8.200	33 ± 16 ((-10) -60)	0,000	signifikant
Rb	3.900 – 13.100	2.300 – 7.260	46 ± 12 (18 - 70)	0,000	signifikant
Sr	7.910 – 24.100	4.600 – 12.000	46 ± 11 (24 - 69)	0,000	signifikant

Die Spektren vor und nach der Veraschung sind in der Abbildung 3-27 überlagert dargestellt. Dabei wird ersichtlich, wie sich nach der Veraschung, bei gleichzeitiger Reduzierung der Anregungsintensität, die Zählraten der Elemente erhöhten. Besonders markant für die Elemente K, Ca, Mn, Fe, Zn und Sr. Auffallend ist, dass Br (leichtflüchtiges Element) nach der Veraschung fast vollständig vom Untergrundrauschen überlagert wird.

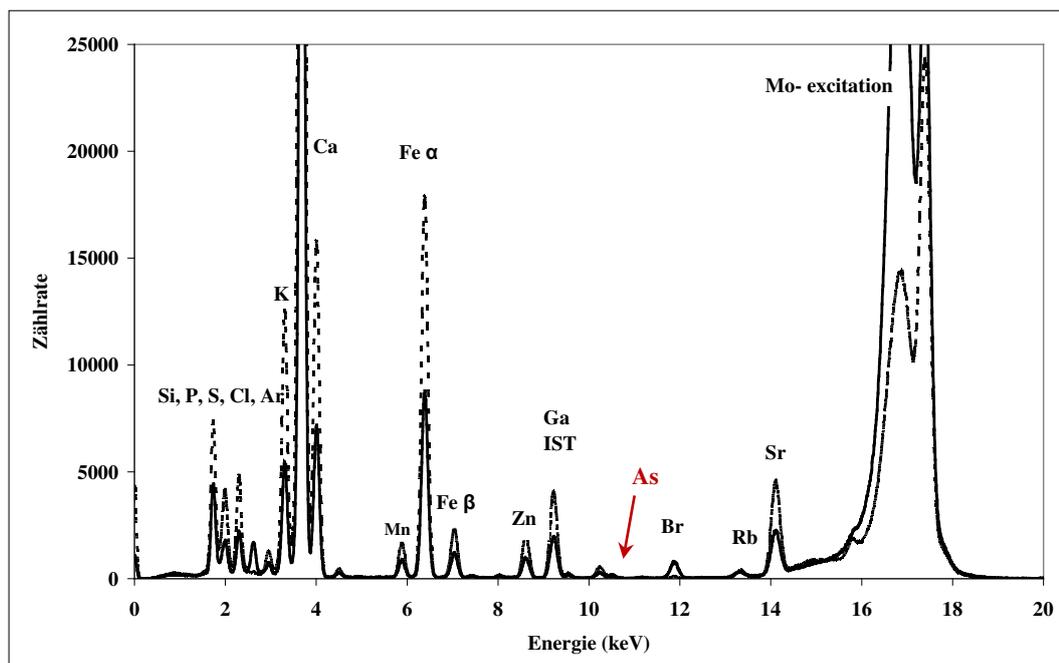


Abb. 3-27: TXRF-Spektrum einer einzelnen *Daphnia pulex* vor (durchgehende Linie) und nach der Veraschung (gestrichelte Linie) (WOELFL et al. 2003)

Die Reduzierung des Untergrundes in Abhängigkeit vom Trockengewicht (DW) der Einzelindividuen ist exemplarisch in der Abb. 3-28 dargestellt. Es zeigt sich, dass schwere Individuen, die natürlicherweise einen höheren Kohlenstoffgehalt aufweisen auch einen höheren Matrixverlust und damit einen geringeren Untergrund erlangen. Der Anstieg „Untergrund – Trockengewicht“ verringert sich nach der CPA, das bedeutet, dass die Reduzierung  $R_{back}$  mit erhöhtem Untergrund zunimmt (Abb. 3-29).

Wie bekannt beeinflusst Kohlenstoff den Untergrund eines TXRF-Spektrums wesentlich und führt zu störenden Matrixeffekten (KLOCKENKÄMPER 1987). Die Beseitigung dieser Matrix durch den Veraschungsprozess führt letztendlich dazu, dass das Untergrundsignal der einzelnen Individuen mit zunehmendem Gewicht im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Veraschung deutlich verringert wird. Die Abnahme des Anstiegs wird in Abb. 3-28 deutlich sichtbar. Daraus schlussfolgernd nimmt  $R_{back}$  mit erhöhtem Gewicht der Individuen zu.

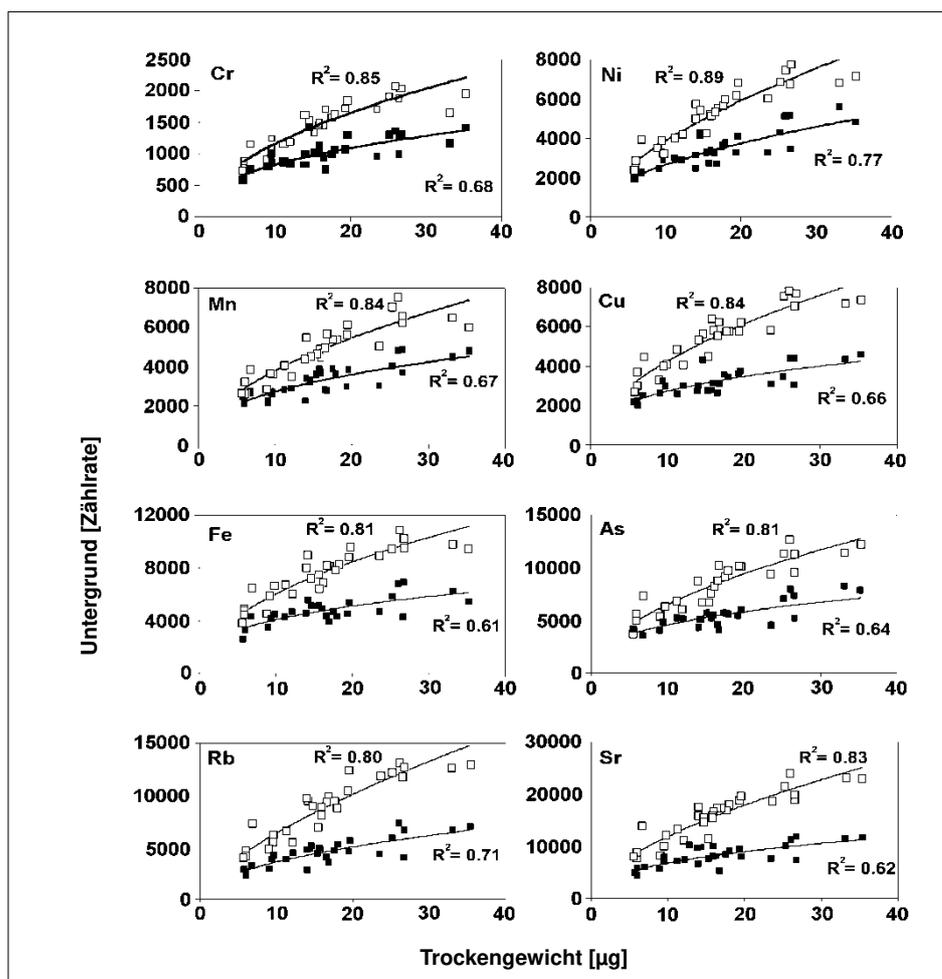


Abb. 3-28: Untergrund vor und nach der Veraschung in Relation zur Trockenmasse einzelner *Daphnia pulex* (n = 28), weiß = vor Veraschung, schwarz = nach Veraschung (WOELFL et al. 2003)

#### zu b) Ergebnisse zur Verbesserung des Signal–Untergrund–Verhältnis

Die Abweichungen zwischen den „Signal–Untergrund–Verhältnissen“ vor und nach der Kaltplasmaveraschung wurden nach ZAR mittels *t*-Test geprüft (ZAR 1984). Dieser Test basiert auf der Null-Hypothese, dass zwei Messreihen ein und der gleichen Grundgesamtheit angehören. Für diese Auswertung wurde Statgraph<sup>TM</sup> und Systat für Windows<sup>TM</sup> genutzt.

Generell kann für alle Elemente, mit Ausnahme von Cr, eine Zunahme des Verhältnisses von Signal und Untergrund mit einem Faktor von 1,5 bis 2,5 und damit signifikante Unterschiede durch den Veraschungsprozess festgestellt werden (Tab. 3-16).

Tab. 3-16: Vergleich „Signal–Untergrund–Verhältnis“ vor und nach der Verarschung von *Daphnia pulex* (Laja See, Chile). Ergebnisse nach dem *t*-Test, Signifikanzniveau  $P < 0,05$  ( $n = 28$ ), in Klammern = Messbereich, (WOELFL et al. 2003, geändert)

Element	Signal – zu – Untergrund Verhältnis				
	Mittlere Varianz und (Min-Max)		Verhältnis (e) zu (d) ( $\bar{x}$ ) (f)	<i>P</i> -Wert	Differenz vor und nach CPA
	vor CPA (d)	nach CPA (e)			
Cr	0,04 ± 0,05 (0 - 0,16)	0,07 ± 0,06 (0 - 0,19)	1,7 ± 1,7 (0,13 - 6,7)	0,112	nicht signifikant
Mn	1,2 ± 0,3 (0,5 - 1,9)	1,8 ± 0,5 (0,8 - 3,0)	1,5 ± 0,3 (1 - 2,3)	0,000	signifikant
Fe	8,6 ± 2,4 (3,0 - 12)	14,6 ± 3,1 (4,9 - 19,2)	1,8 ± 0,36 (1,3 - 2,7)	0,000	signifikant
Ni	0,2 ± 0,1 (0,10 - 0,50)	0,34 ± 0,12 (0,14 - 0,55)	1,6 ± 0,5 (0,8 - 2,6)	0,001	signifikant
Cu	0,2 ± 0,1 (0 - 0,3)	0,4 ± 0,1 (0,1 - 0,7)	2,5 ± 2,0 (0,5 - 9,8)	0,000	signifikant
Zn	2,4 ± 0,4 (1,6 - 3,2)	3,5 ± 0,8 (1,8 - 5,0)	1,4 ± 0,20 (1 - 1,8)	0,000	signifikant
As	1,5 ± 0,6 (0,5 - 3,4)	2,1 ± 0,6 (1,1 - 3,3)	1,6 ± 0,33 (0,9 - 2,3)	0,000	signifikant
Rb	1,3 ± 0,2 (0,8 - 1,7)	2,2 ± 0,7 (1,0 - 3,6)	1,7 ± 0,38 (0,9 - 2,5)	0,000	signifikant
Sr	4,8 ± 0,7 (3,6 - 6,8)	9,2 ± 1,3 (6,7 - 11,8)	2,0 ± 0,40 (1,4 - 3,0)	0,000	signifikant

In der Abb. 3-29 sind die Ergebnisse zusätzlich grafisch dargestellt. Alle Datenpunkte, die oberhalb der Diagonalen liegen, weisen darauf hin, dass nach der CPA eine Zunahme des „Signal-Untergrund-Verhältnisses“ vorliegt.

Die nicht systematische Streuung der Chromwerte ist der Nachweis, dass die erwartete Verbesserung des „Signal-Untergrund-Verhältnis“ für das Element Cr nicht gegeben ist.

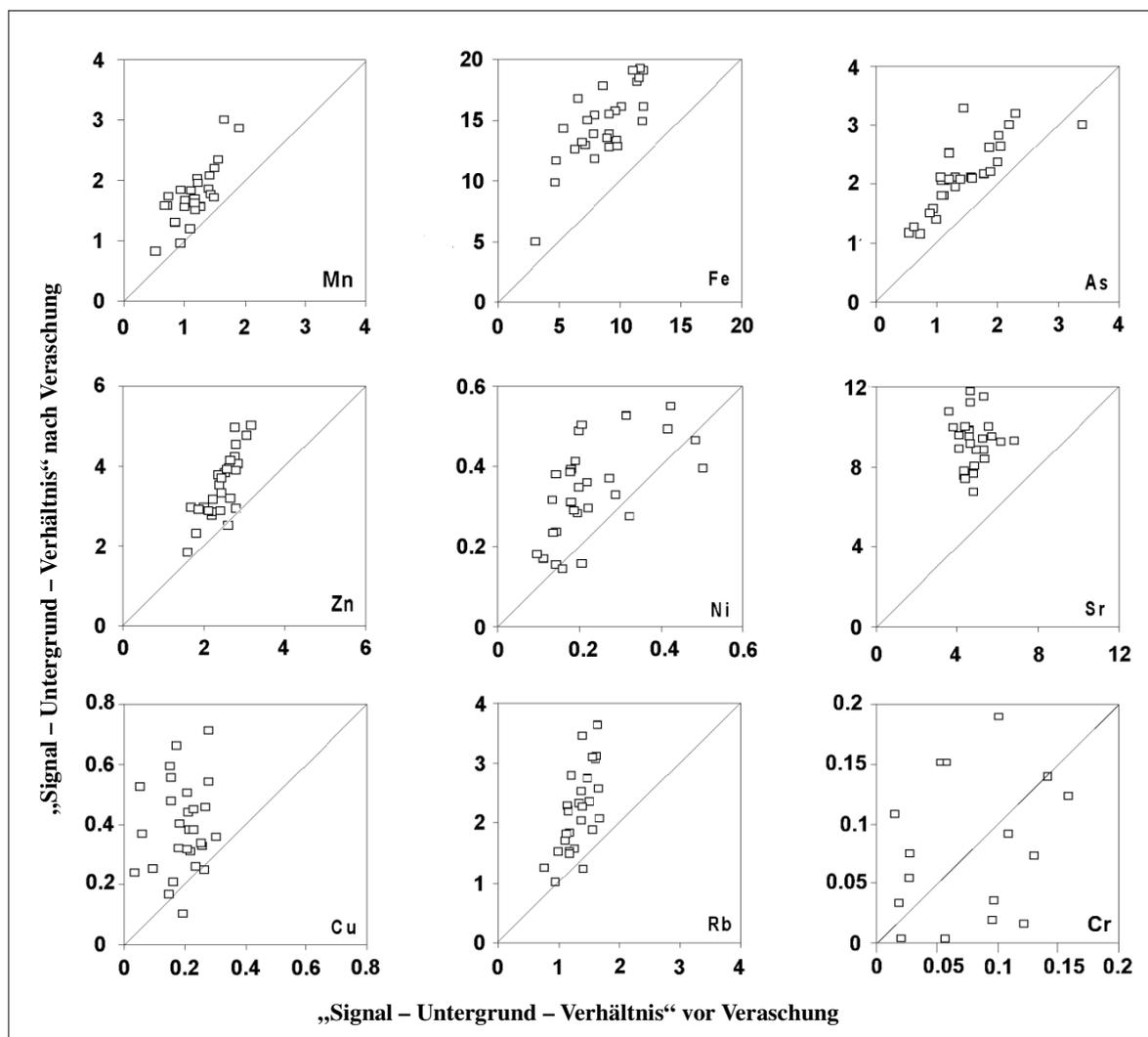


Abb. 3-29: Verhältnis Signal zu Untergrund vor und nach der Veraschung von einzelnen *Daphnia pulex*-Individuen mit dem CPA, n = 28 (WOELFL et al. 2003)

**zu c) Ergebnisse zur Verbesserung der Wiederfindungsraten nach der Veraschung**

In b) wurde ausschließlich das „Signal-Untergrund-Verhältnis“ betrachtet. Im Folgenden werden die realen Elementgehalte der Daphnien vor und nach der Veraschung ausgewertet (Tab. 3-17 und 3-18). Während für die Reduzierung der Untergrundmatrix, wie in Tab. 3-15 und Abb. 3-28 ersichtlich und die Veränderung des Signal-Untergrund-Verhältnisses, in Tab. 3-16 und Abb. 3-29 dargestellt, positive Effekte signifikant nachweisbar waren, kam es bei der Überprüfung der Wiederfindungsraten nach der Veraschung zu größeren Abweichungen. Nur für die Elemente Cu, Zn, Fe und Rb und teilweise auch für Cr und Sr führte der Veraschungsprozess zu einer besseren Wiederfindungsrate. Im Durchschnitt nahm die Wiederfindungen um 1,5 – 13,6 % zu und lag für Rb am höchsten. Das bestätigte die anfangs aufgestellte These der zu erwartenden Erhöhung der Elementgehalte in den *Daphnia*-Individuen durch den Veraschungsprozess nur teilweise. Keine signifikanten Unterschiede konnten für Mn, As, Pb, Sr (November), Cr (März) und Pb (März) festgestellt werden.

Tab. 3-17: Verhältnisse der ermittelten Elementgehalte vor und nach der Veraschung von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen (Laja See, Chile) im März und November 2001 (Einwaage 2,5 – 47,9 µg) [%] (WOELFL et al. 2003)

	<i>Daphnia</i> März 2001		<i>Daphnia</i> November 2001	
	Minimal- Maximalverhältnis	$\bar{x} \pm s$	Minimal- Maximalverhältnis	$\bar{x} \pm s$
Cr	51 - 133	91,3 ± 26,1	62 - 142	101 ± 22,8
Mn	89 - 114	100 ± 5,2	89 - 114	100 ± 5,1
Fe	86 - 143	110 ± 11,4	88 - 150	106 ± 10,8
Ni	55 - 139	91,6 ± 15,8	58 - 146	92,1 ± 15,6
Cu	77 - 150	107 ± 15,4	74 - 154	106 ± 15,0
Zn	94 - 122	106 ± 5,4	93 - 115	102 ± 3,3
As	61 - 176	101 ± 25,3	47 - 150	105 ± 21,5
Rb	63 - 177	114 ± 21,5	83 - 120	104 ± 6,5
Sr	94 - 113	103 ± 3,7	94 - 108	100 ± 1,9
Pb	67 - 131	97,8 ± 25,1	49 - 171	98,4 ± 35,3

Tab. 3-18: Prüfung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse von *Daphnia pulex*-Einzelindividuen vor und nach der Veraschung mittels *t*-Test, Signifikanzniveau  $P < 0,05$  (WOELFL et al. 2003)

	März 2001 (n = 69)		November 2001 (n = 70)	
	<i>P</i> -Wert	Differenz zwischen den Methoden	<i>P</i> -Wert	Differenz zwischen den Methoden
Cr	0,440	nicht signifikant	0,028	signifikant
Mn	0,570	nicht signifikant	0,345	nicht signifikant
Fe	0,000	signifikant	0,000	signifikant
Ni	0,001	signifikant	0,000	signifikant
Cu	0,004	signifikant	0,014	signifikant
Zn	0,000	signifikant	0,000	signifikant
As	0,792	nicht signifikant	0,413	nicht signifikant
Rb	0,000	signifikant	0,000	signifikant
Sr	0,000	signifikant	0,519	nicht signifikant
Pb	0,842	nicht signifikant	0,796	nicht signifikant

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Veraschung im kalten Sauerstoffplasma keinen nennenswerten Einfluss auf die Wiederfindungsrate von realen Proben hat.

Demgegenüber verringerten sich Ni (91,6 – 92,1 %) und Cr mit 91,3 % nach CPA erheblich. Der eigentliche Grund für diesen Elementverlust konnte nicht festgestellt werden. Hypothetisch kann angenommen werden, (1) dass auch nach der CPA noch teilweise Inhomogenitäten auftreten bzw. das Probenmaterial sehr differenziert zur Fluoreszenz angeregt wird oder, (2) bedingt durch das geringe Messsignal für Cr, Ni und Pb und der hohen Matrix erhöhte Elementgehalte vorgetäuscht werden. Das zeigt wiederum, dass Messergebnisse, die sich im Bereich der Bestimmungsgrenze bewegen sehr sorgfältig betrachtet werden sollten, wenn das Probenmaterial gleichzeitig eine hohe Matrix aufweist.

Der generelle Elementverlust ist erst in höheren Temperaturbereichen nachvollziehbar (HELSEN et al. 1999) und für die CPA nur für leicht flüchtige Elemente, im vorliegenden Fall für Br, relevant. Auch ein Ionen-Sputtering (SCHMELING und KLOCKOW 1997), das die Gehalte bestimmter Spurenelemente (Cu, Ni und Fe) erhöht, sollte nicht aufgetre-

ten sein. Um das zu vermeiden besitzt der CPA eine getrennte Prozess- und Plasmakammer.

### **3.3.3 Felduntersuchungen zur Elementakkumulation - Vergleich portable und stationäre TXRF - Anwendungen am Beispiel einer Probennahme an der Tisza, Ungarn**

#### *(1) Motivation*

Um bereits bei „vor Ort“-Untersuchungen wesentliche Informationen über die Bioakkumulation u. a. von Schwermetallen und Arsen in Zooplankton zu erhalten, wurde während einer Messkampagne in Ungarn an der Tisza getestet, inwieweit ein portables TXRF-Spektrometer schnelle Ergebnisse für ein Probenstellen-Screening liefert. Dabei kam die in Kap. 3.3.1 vorgestellte „Wet“-Methode, mit der Bestimmung von Elementen in Einzelindividuen von *Daphnia pulex* direkt im Feld zur Anwendung.

Mit der unter 3.1.1 beschriebenen portablen Analysetechnik (PICOFOX™) ist es bereits während der Felduntersuchungen möglich, erste Informationen über das Bindungsverhalten der im Gewässer vorhandenen Elemente zu erhalten. Daraus resultieren ggf. erste Aussagen über gravierende Belastungszustände im Gewässer und geben wiederum erste Erkenntnisse über bioverfügbare Elemente für die Akkumulation z. B. in Biofilmen und Zooplankton.

#### *(2) Material und Methoden*

Zum Vergleich wurden mit dem Probenmaterial sowohl Feld- als auch Laborversuche durchgeführt. In der Abbildung 3-30 sind für die Elementbestimmung in Einzelindividuen die einzelnen Präparationsschritte der Feld- und Laborversuche dargestellt. Ein Teil des gewonnenen Zooplanktons wurde selektiert, luftgetrocknet und nach der Zugabe eines internen Standards (Ga) und dem Aufschluss auf einer Heizplatte die detektionsfähigen Elemente mit dem portablen TXRF-Spektrometer vor Ort analysiert.

Eine weitere Teilmenge wurde für die Präparation und Messung im Labor nach der „Dry“-Methode überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und transportiert.

Die nach der „Dry“-Methode präparierten Proben wurden im Labor vergleichend mit beiden TXRF-Spektrometern analysiert.

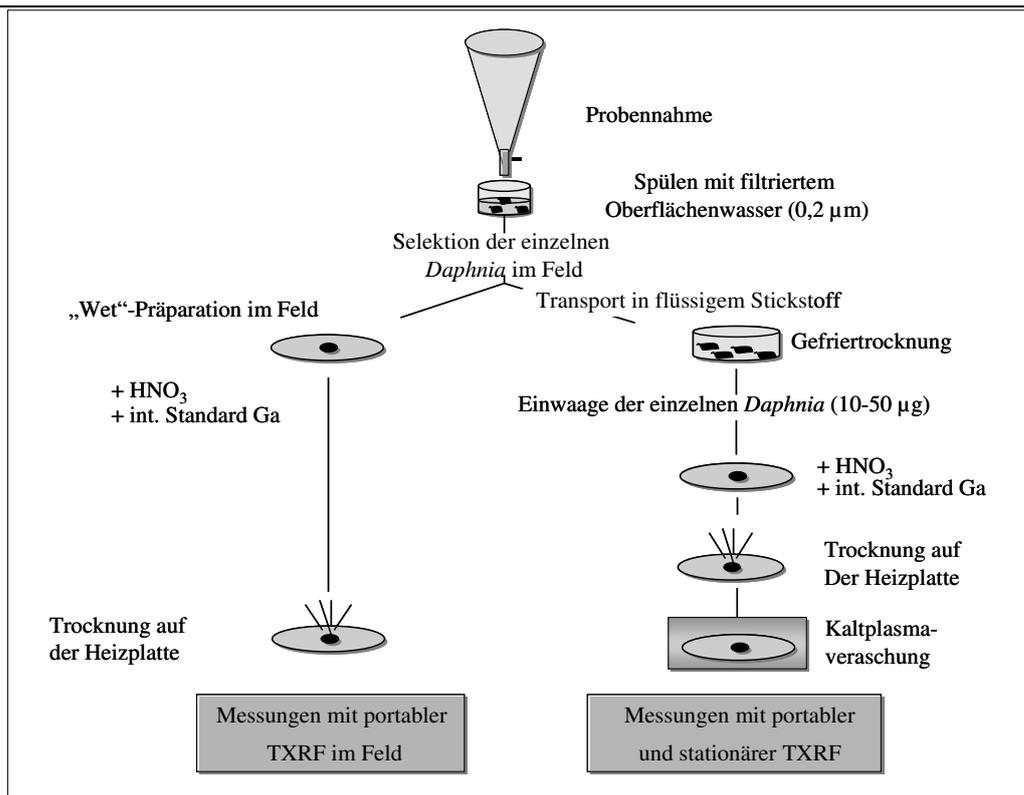


Abb. 3-30: Schema der Feld- und Laborpräparation von Zooplanktonproben

a) *Präparation und Analytik im Feld*

Über ein metallfreies Planktonnetz (Blendenöffnung: 20 cm, Maschenweite: 100 µm; Hydrobios, Kiel, Deutschland) wurde an der Probenstelle T 5 (Kap. 3.2.2.2, Abb. 3-21) Zooplankton entnommen. Das Probenmaterial wurde dreimal mit filtriertem Seewasser (Einweg-Spritzenvorsatzfilter, Zelluloseacetat, Porengröße 0,2 µm, Millipore, Frankreich) gewaschen und mittels Stereo-Mikroskop selektiert (Abb. 3-31). Entsprechend der „Wet“-Methode (Kap. 3.3.1) wurde das Zooplankton (*Daphnia spec.*) direkt auf gereinigten Quarzglasprobenträgern positioniert und mit 5 µL  $\text{HNO}_3$ , der 1 mg L<sup>-1</sup> Ga als interner Standard zugesetzt wurde, versetzt und auf einer Heizplatte bei ca. 100 °C aufgeschlossen (Abb. 3-3). Die Elementbestimmung erfolgte direkt vor Ort mit dem portablen TXRF-Spektrometer PICOFOX™ (Kap. 3.1 und Abb. 3-2).



Abb. 3-31: Selektierung der Zooplanktonproben im Feld (Foto: K. Rahn, UFZ)



Abb. 3-32: Feldeinsatz des portablen TXRF-Spektrometers PICOFOX™ (Foto: K. Rahn, UFZ)

*b) Präparation und Analytik im Labor*

Das bereits im Feld eingefrorene Zooplankton wurde im Labor entsprechend der „Dry“-Methode (Kap. 3.3.1), dargestellt in der Abb. 3-23, weiter bearbeitet. Das heißt, nach Gefriertrocknung, anschließender Selektierung und Wägung auf der Ultramikrowaage wurden die Einzelindividuen von *Daphnia* (Einzelgewicht zwischen 3 und 19 µg) auf Quarzglasprobenträgern positioniert, mit internem Standard versetzt und mit Salpetersäure aufgeschlossen.

Nach der im Kap. 3.3.2 angeführten modifizierten Applikation wurde der Kohlenstoff im kalten Sauerstoffplasma oxidiert und die Proben vergleichend mit den TXRF-Spektrometern 8030 C (stationär) und PICOFOX™ (portabel) (Kap. 3.1.1) analysiert.

(3) *Ergebnisse der Felduntersuchungen und der Vergleichsmessungen portable und stationäre TXRF im Labor*

a) *Ergebnisse der Felduntersuchungen*

Auf der Basis der „Wet“-Methode zeigten die Feldanwendungen reproduzierbare Ergebnisse. Wie bereits die Überprüfung der Wiederfindungen mit zertifiziertem Referenzmaterial in Kap. 3.3.1 ergab, kann die Anwendung der Methode für eine semiquantitative Elementbestimmung im Feld in biologischen Proben als geeignet eingeschätzt werden. In der Abb. 3-33 sind in einem Spektrum die Elemente einer einzeln präparierten und gemessenen *Daphnia* dargestellt. Anhand der absoluten Menge des zugegebenen Elementstandards Ga ist die semiquantitative Bestimmung im Einzelindividuum möglich und für die Festlegung bzw. Selektierung von Probenstellen und einem ersten Screening über mögliche Schadstoffbelastungen durchaus ausreichend.

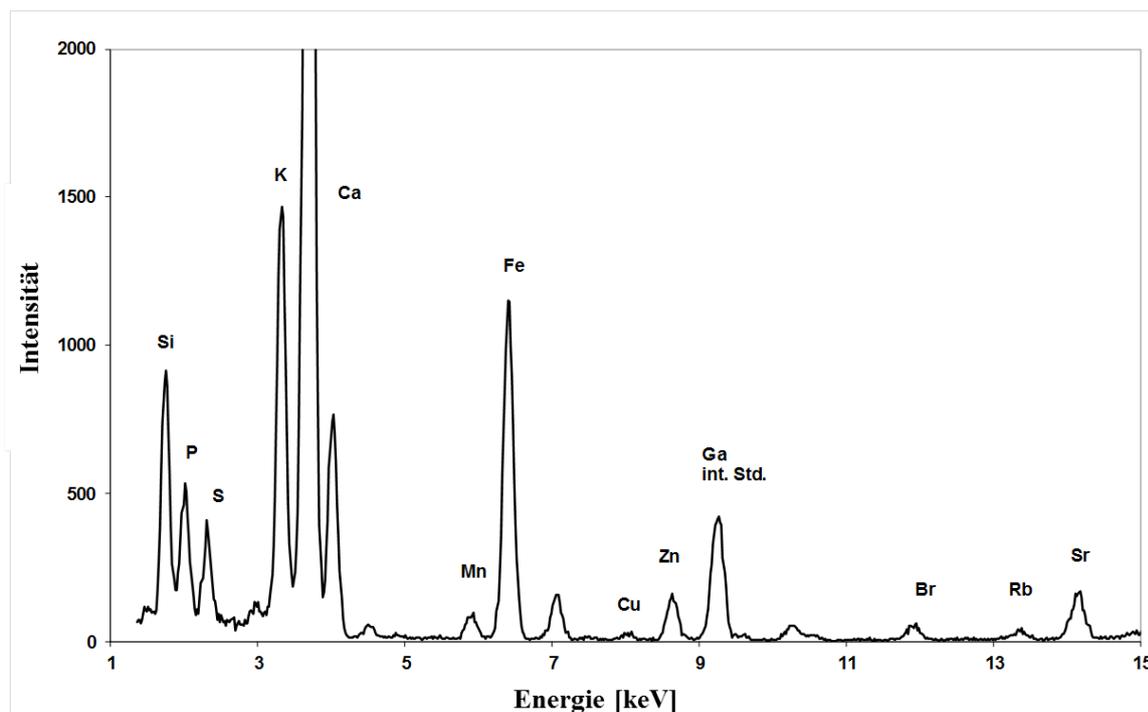


Abb. 3-33: Spektrum der Elementmessung einer einzelnen *Daphnia*, präpariert nach der „Wet“-Methode im Feld (WOELFL et al. 2003)

In Tabelle 3-19 sind zu den absoluten Elementgehalten der einzelnen *Daphnia* die Blindwerte der Träger und Elementkonzentrationen des Waschwassers aufgelistet. Anhand der vorliegenden Elementkonstellationen können die Konzentrationen im Waschwasser vernachlässigt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Waschwasser als Umgebungsmedium mit dem Zooplankton im Gleichgewicht steht. Das Waschen in filtriertem Umgebungswasser verhindert dabei die Veränderung des osmotischen Druckes und ein Ausschwemmen von Elementen.

Tab. 3-19: Ergebnisse der Felduntersuchungen für Trägerblindwerte, Elementkonzentrationen im Waschwasser und absoluten Elementgehalte in einzelnen *Daphnia*-Individuen

Element	Blindwert Träger im Feld [ng]	Waschwasser (filtriertes Oberflächenwasser) [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<i>Daphnia</i> Einzelindividuen [ng]
K	3,44	3.730	152
Ca	3,03	53.100	530
Cr	< 0,07	< 1,6	< 0,33
Mn	0,17	9,1	2,15
Fe	5,59	6,04	23,4
Ni	< 0,03	2,36	< 0,14
Cu	< 0,02	2,06	0,26
Zn	0,10	1,16	1,67
As	< 0,02	3,50	0,13
Sr	0,06	223	1,96
Pb	0,05	< 1,5	0,23

**b) Ergebnisse der Vergleichsmessungen portable und stationäre TXRF**

Zum Vergleich ob beide Messungen vergleichbare Ergebnisse liefern oder signifikante Unterschiede existieren, wurde das statistische Verfahren des erweiterten *t*-Testes genutzt. Für As, Cu, K, Mn, Ni und Sr wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt (Tabelle 3-20). Lediglich für Ca, Fe, Pb und Zn waren signifikante Unterschiede nachweisbar.

Tab. 3-20: Statistische Bewertung der Vergleichbarkeit beider Methoden.  $f$  = Freiheitsgrad,  $t$  =  $t$ -Wert,  $t_{(0,99;f)}$  =  $t$ -Wert für ein Signifikanzniveau von 99 %

Element	$f$	$t$	$t_{(0,99;f)}$	Methodendifferenz
As	11	2,16	3,11	nicht signifikant
Ca	60	5,59	2,66	signifikant
Cu	7	2,66	3,5	nicht signifikant
Fe	60	6,78	2,66	signifikant
K	60	2,51	2,66	nicht signifikant
Mn	60	0,45	2,66	nicht signifikant
Ni	40	0,12	2,7	nicht signifikant
Pb	40	10,8	2,7	signifikant
Sr	60	0,78	2,66	nicht signifikant
Zn	60	3,50	2,66	signifikant

Wie in Abb. 3-34 ersichtlich, wurden mit dem PICOFOX™ z. B. höhere Zn-Gehalte analysiert. Im Vergleich zur analytischen Messunsicherheit für biologische Proben kann eine Methodendifferenz von 5 % für Zink allerdings als akzeptabel angesehen werden.

Für Pb bewegen sich die Ergebnisse beider Spektrometer im Bereich der Nachweisgrenze und führten zu höheren Messunsicherheiten und letztlich zur Akzeptanz der signifikanten Unterschiede. Für die Elemente Ca und Fe wird angenommen, dass die Ursache fehlender Korrelation in Inhomogenitäten innerhalb des Probenmaterials liegt. Es wird vermutet, dass vorrangig an Partikel gebundenes Fe oral inkorporiert wurde und somit unterschiedliche Schichtdicken zu unterschiedlichen Fluoreszenzausbeuten führte.

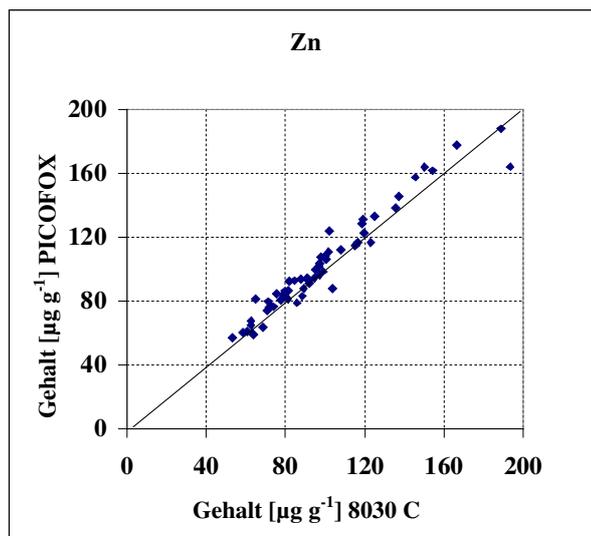


Abb. 3-34: Signifikante Unterschiede der Zn-Ergebnisse für die Spektrometer PICOFOX<sup>TM</sup> und 8030 C (WOELFL et al. 2003)

In Abbildung 3-35 sind exemplarisch für die Elemente Sr und Cu die nicht signifikanten Unterschiede der beiden verwendeten Spektrometer grafisch dargestellt.

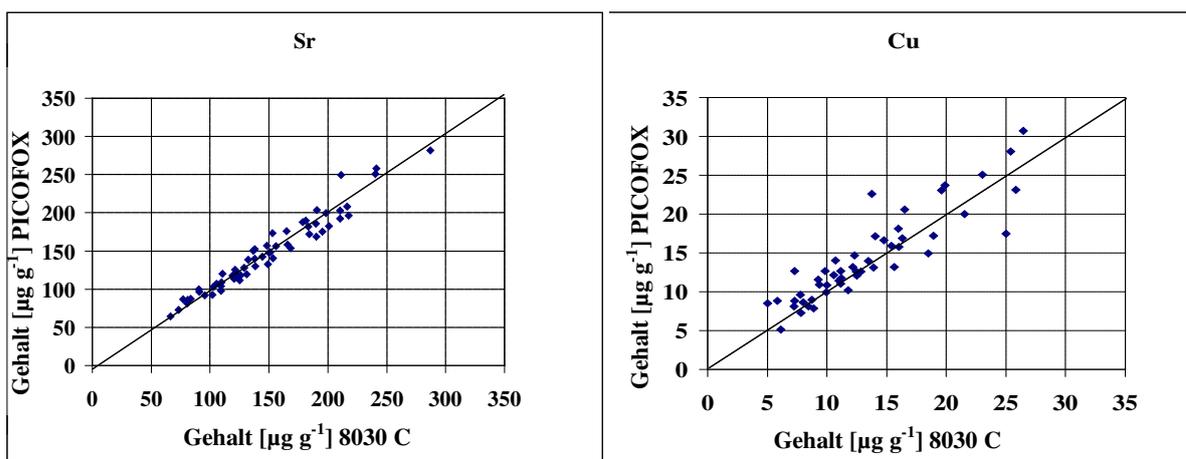


Abb. 3-35: Nicht signifikante Unterschiede der Sr- und Cu-Ergebnisse für die Spektrometer PICOFOX<sup>TM</sup> und 8030 C (WOELFL et al. 2003)



## 4 INTERPRETATION UND DISKUSSION

Die im Kapitel 3 aufgeführten eigenen Untersuchungen fokussierten hauptsächlich auf den Methodenentwicklungen zur Elementbestimmung in Biofilmen und in einzelnen Zooplanktonindividuen. Die weiterführenden Arbeiten im Feld zeigten dabei mehrfach die Notwendigkeit der Adaption an Freilandgegebenheiten und ergaben als Ergebnis gute Korrelationen sowohl in der Wiederfindung mit zertifizierten Referenzmaterialien als auch in Laborvergleichen.

### 4.1 Biofilme

#### 4.1.1 *Einschätzung der Methodenentwicklung zur Elementakkumulation in Biofilmen unterschiedlicher Aufwuchsträger*

Um künftig Biofilme ggf. als Bioindikator zu nutzen, galt es zu vergleichen, inwieweit zur Bestimmung der Elementakkumulation in Biofilmen bei Freilandeinsätzen Probenmaterial direkt von natürlichen Aufwuchsträgern gewonnen werden kann und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Für den methodischen Ansatz wurde Biofilmmaterial von natürlichen und ausgelegten Aufwuchsträgern gewonnen. Dabei war bekannt, dass der Biofilm in Abhängigkeit von den Milieubedingungen auf dem Trägermaterial sehr inhomogene Kompartimente ausbilden kann (PETTERSON 1998, KRÖPFL et al. 2006, HOEFLER et al. 2006). Die Relevanz der unterschiedlichen Milieubedingungen für ein optimales Biofilmwachstum wurde 2002 von WANNER für die Biofilmmodellierung ausgewiesen. Danach spiegeln Umwandlungs- und Transportprozesse die gesamte Komplexität der Biofilme wieder. Zu den Umwandlungsprozessen zählen sowohl Substratverbrauch und -produktion, als auch das Wachstum und der Abbau von Mikroorganismen (WANNER 2005). Die Transportprozesse beschreiben nach dem EAWAG-Modell (WANNER 2005) die Advektion und Diffusion der Substrate aus der Wasserphase zur Biofilmoberfläche und von dort in die einzelnen Kavernen (s. Abb. 2-2) und Zellzwischenräume, die Adsorption und Abschwemmung von Mikroorganismen an der Biofilmoberfläche, die aktive und passive Verschiebung einzelner Mikroorganismen oder ganzer Kolonien und schließlich die Volumenänderung durch Wachstum und Absterben der Mikroorganismen in der Biofilmmatrix. Werden diese wichtigen, nach WANNER definierten Faktoren zur Bewertung der Elementgehalte in den Biofilmen herangezogen, zeigen sich wesentliche Korrelationen.

Wird weiterhin noch berücksichtigt, dass das Akkumulationsverhalten von freien Sorptionsplätzen abhängig ist (FLEMMING 1996), kann eingeschätzt werden, dass die verwendeten künstlichen Polycarbonatträger zum Aufwuchs aquatischer Biofilme keine relevanten Unterschiede zu natürlichen Trägermaterialien aufweisen.

Für die großen Messbereiche der Elementgehalte sind neben den Inhomogenitäten innerhalb des Biofilms, bedingt durch größere partikuläre Einschlüsse (s. Abb. 3.11) und stark vernetzter Struktur (s. Abb. 3.12), u. a. die stark variierenden Elementbindungen verantwortlich. Das konnte in der Arbeit durch Untersuchungen mit der  $\mu$ -XRF nachgewiesen werden, wo unterschiedliche Einlagerungen der Elemente als kolloidal an- oder eingelagert bzw. organisch eingebunden sichtbar wurden (s. Abb. 3.13). Als nicht zu vernachlässigender Aspekt kann auch die von FRIESE et al. (1997) angeführte bakterienabhängige Elementakkumulation angesehen werden. Für die in einzelnen Biofilmabschnitten erhöhten Mangangehalte wurden manganoxidierende Bakterien angenommen (FRIESE et al. 1997).

#### **4.1.2 Bewertung der Ergebnisse der Felduntersuchungen zur Elementakkumulation in Biofilmen**

##### 4.1.2.1 Spezifische Sorptionseffekte in Biofilmen des Mansfelder Landes

###### a) *Struktur der untersuchten Biofilme des Schlüsselstollens*

Nach COSTERTON et al. (1987) schwankt die Biofilmdicke in normalen Fließgewässern zwischen 50 und 150  $\mu\text{m}$  und ist im Wesentlichen abhängig von der Bioverfügbarkeit der Nährstoffe. Biofilme, die in einem aquatischen System mit erhöhter Nährstoffbereitstellung aufwachsen, weisen meist ein geringeres Dickenwachstum auf. Das konnte auch in der Arbeit für die untersuchten Biofilme der Schlenze (s. Abb. 3-19) nachgewiesen werden. Demgegenüber konträr verhält sich das Wachstum und letztendlich die Struktur von Biofilmen extrem oligotropher Gewässer (COSTERTON et al. 1987, FLEMMING 1996). Die im Schlüsselstollen des Mansfelder Landes selbst untersuchten Biofilme bestätigen diese Aussage. Mit einer Wasserfracht von 20 – 25  $\text{m}^3 \text{min}^{-1}$  wirken starke Scherkräfte auf die Biofilme und beeinflussen das Wachstum positiv (CHRISTENSEN und CHARACKLIS 1990). In diesem extrem nährstoffarmen Gewässer (s. Tab. 3-5) entwickelten sich, bei saisonal gleichbleibender Temperatur, die Biofilme mit einer Wachstumshöhe von bis zu 15 mm (s. Abb. 3-16, 3-17).

*b) Sorptionseffekte in den untersuchten Biofilmen*

Die für dieses Wachstum notwendigen Nährstoffe zur Biofilmbildung wurden vorrangig aus den im Oberflächengewässer verfügbaren gelösten Elementen aufgenommen. Im Wasser des Schlüsselstollens wurden z. B. für Pb  $713 \mu\text{g L}^{-1}$  und für Zn  $18 \text{ mg L}^{-1}$  analysiert (s. Tab. 3-6). Die bei diesen Konzentrationen bereits toxisch wirkenden Elemente müssten nach COLLINS und STOTZKY (1989) zu Hemmungen des Zellwachstums und morphologischen Veränderungen der Zellen führen und als Enzym-Inhibitoren die Photosynthese verringern bzw. hemmen. Aufwendige Untersuchungen, die von LE FAUCHEUR und SIGG (2005) an der EAWAG durchgeführt wurden, widersprechen der Aussage teilweise. Sie fanden, dass die Mikroorganismen als Überlebensstrategie Glutathion und damit Phytochelatine bilden und somit gegenüber Metallen resistent sind. Weiterhin gehen sie davon aus, dass die Bildung der Phytochelatine wesentlich von der Artenzusammensetzung im Biofilm abhängig ist. Ähnliche Aussagen traf GADD bereits 1993. Als Phytochelatine werden intrazelluläre Polypeptide bezeichnet, deren Bildung wesentlich von den Metallgehalten der Umgebung abhängig ist.

Für die Biofilme des Schlüsselstollens könnten die Ergebnisse nach LE FAUCHEUR und SIGG (2005) relevant sein und das enorme Wachstum unter den teilweise widrigen Milieubedingungen begründen. Nach WANNER und BAUCHROWITZ (2005) wären für das Biofilmwachstum im Schlüsselstollen „chemoautotrophe Bakterien“ verantwortlich, die für ihre Generierung anorganische Stoffe verwenden. Diese Bakterien gelten als „Schwermetalltolerant“, wenn trotz einer hohen Toxizität ein starkes Wachstum verzeichnet werden kann (JAECKEL 2002).

Es kann angenommen werden, dass diese Aussagen auch für die Biofilme des Schlüsselstollens zutreffen. Damit würde die augenscheinlich sichtbar starke Ausbildung der EPS (s. Abb. 3-16, 3-17) als Schutzmechanismus dienen und für die Mikroorganismen als eine Art „Nährstoffdepot“ zur Verfügung stehen (COSTERTON et al. 1987). Auch MEYLAN et al. (2005) konnten feststellen, dass die Aufnahme von Metallen wesentlich von der EPS abhängig ist und je nachdem, wie schnell diese „Schranke“ überwunden wird, der Austausch der freien Sorptionsplätze erfolgt. Die hohen Akkumulationsraten für Blei korrelieren nicht mit der Zinkakkumulation. Während im Oberflächenwasser nur  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$  Blei gelöst sind, wurden zu Beginn der Akkumulation im Biofilm bereits  $531 \text{ mg g}^{-1}$  aufgenommen. Zink dagegen wurde nur „schwach“ induziert.

Eine Zinkkonzentration in der gelösten Wasserphase von  $18 \text{ mg L}^{-1}$  führte im Biofilm lediglich zu einer Anreicherung von  $5,5 \text{ mg g}^{-1}$  (s. Tab. 3-6, 3-7). Der Grund für diese stark variierenden Akkumulationen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Inwieweit für die im Biofilm des Schlüsselstollens stattfindenden Interaktionen der hohe Chloridgehalt von ca.  $13 \text{ mg L}^{-1}$  relevant ist (s. Tab. 3-5), konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. ZÄNKER et al. (2000, 2002) fanden z. B. in stillgelegten Grubenwässern Blei an Kolloiden gebunden. Dass die kolloidale Bindung am Chlorid erfolgte, kann allerdings nur vermutet werden. Ein Indiz für diese Vermutung ist die Aussage von HORNBURG und BRÜMMER (1993), die bei hohen Salzgehalten eine schwere Mobilisierbarkeit von Blei beschreiben.

In Abhängigkeit von der Biodiversität im Biofilm werden die Elemente letztlich, wie in Kap. 3.2.2.1 erläutert, in der Plateauphase an- bzw. abgereichert. Die in der Abb. 3-20 dargestellten Sorptionseffekte der Elemente Zn, Cu, Pb und Ni lassen vermuten, dass abhängig von den mikrobiellen Spezies und der Lebenszeit nach dem Absterben und Verflüssigen der Bakterien die Elemente wieder freigesetzt werden. Anhand der Ergebnisse der  $\mu$ -XRF kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass nur organisch gebundene Elemente den Sorptionsmechanismen unterliegen. Denn sowohl Blei als auch Zink und Kupfer liegen homogen verteilt vor (s. Abb. 3-13).

#### *4.1.2.2 Großskalige Längsprofiluntersuchungen an der Tisza, Ungarn*

Die unter 3.2.1 durchgeführten Untersuchungen zur Elementakkumulation natürlich gewachsener Biofilme wurden in Ungarn am Beispiel der Tisza praktisch angewendet. Während der Probennahmen in 2000 und 2002 wurden an differenzierten Stellen Biofilme entnommen und im Labor am UFZ in Magdeburg analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Biofilme eines Altarmes als Referenzobjekt ideal geeignet sind. Im Vergleich zum weiteren Verlauf von Szamos und Tisza sind sie nicht oder nur marginal in das Überschwemmungsgebiet eingebunden. Sowohl Flora als auch Fauna unterliegen somit einem eigenen Akkumulationsregime. Das bestätigen auch die in 3.3.3 durchgeführten Feldversuche zur Elementanreicherung in Zooplanktonproben.

Wie bereits von BABOROWSKI et al. (2002) untersucht, erfolgt der hohe Elementeintrag über die Szamos in die Tisza hauptsächlich aus dem gelösten Anteil der Elementkonzentration im Oberflächenwasser und den partikulären Stoffeinträgen. Diese variieren, in Abhängigkeit von der Flussdynamik, mehr oder weniger stark (LEWANDOWSKI

et al. 1995, BABOROWSKI et al. 2002). Vergleichende Untersuchungen zur Sedimentdynamik wurden 2007 von van der VEEN et al. veröffentlicht. Sie bestätigen das Bindungsverhalten ausgewählter Elemente im Flussverlauf der Tisza, beginnend vom intensiven Eintrag über die Szamos bis zur beruhigenden Sedimentation im Tisza-Stausee. Umfangreiche Ergebnisse zur Freisetzung von Metallen im Einzugsgebiet der Tisza und die daraus folgende ökologische Beeinträchtigung der Umwelt wurden von MACKLIN et al. (2003) veröffentlicht. Dabei wurde das gesamte Auengebiet von Tisza und Szamos untersucht und ausgewertet.

## **4.2 Zooplankton**

Der Forschungsansatz zur Elementakkumulation in Zooplanktonproben wurde in einzelne Schwerpunkte untergliedert. Vordergründig stand die Fragestellung, inwieweit die Anwendung der TXRF dafür geeignet ist, in einzelnen Individuen differenzierte und teilweise gewichtsabhängige Elementakkumulationen zu untersuchen. Dafür wurden zwei Methoden („Dry“- und „Wet“-Methode) entwickelt, die in Abhängigkeit von der Probenpräparation für Freilandversuche und klassische Laboruntersuchungen validiert wurden.

In Auswertung dieser Ergebnisse wurde getestet, ob durch die Veraschung in einem Sauerstoffplasma die organische Matrix in den Proben reduziert und damit die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse verbessert werden kann. Zum Einsatz kam ein kommerzieller Kalt-Plasma-Verascher.

Während einer Messkampagne an der Tisza in Ungarn konnte die o. g. „Wet“-Methode unter realen Probennahmebedingungen angewendet werden. Als Analysetechnik wurde die unter 3.1.1 beschriebene portable TXRF S2 PICOFOX<sup>TM</sup> eingesetzt. Das Probenmaterial wurde anschließend im Labor mit der stationären TXRF 8030 C analysiert und die Ergebnisse versus portable TXRF ausgewertet.

### ***4.2.1 Einschätzung der entwickelten und adaptierten Methoden zur Elementbestimmung in Einzelindividuen***

#### ***4.2.1.1 „Dry“- und „Wet“-Methoden***

Einwaagen von Zooplankton-Sammelproben im mg-Bereich lassen einerseits Aussagen über die Aufnahme von Elementen in Zooplankton zu, andererseits aber keine Differenzierung der Akkumulation in Einzelindividuen. Die von KAHLE et al. (2002) durchgeführten Mikroaufschlüsse zeigten zwar gute Wiederfindungsraten der Referenzmaterialien.

lien, verwendeten mit 10 mg Probenmaterial allerdings nur eine „klassische“ Mischprobe. Die Bestimmung von Elementen, wie Cd, Cu, Pb, Co und Ni, wurde dafür mittels GF-AAS durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass demgegenüber beide entwickelten Methoden für die Bestimmung von Elementgehalten in Einzelindividuen geeignet sind. Die „*Wet*“-Methode bietet vor allem erste Informationen über Kontaminationen und ist somit speziell für die Selektierung unbekannter Probenstellen geeignet. Als erstes Indiz bietet sie semi-quantitative Informationen über z. B. Schadstoffbelastungen nach Umwelthavarien. Voraussetzung ist hierfür, dass die „Körperlängen–Trockengewichts–Relation“ bekannt (DUMONT et al. 1975, BOTTRELL et al. 1976, WOELFL 1995) und damit die indirekte Bestimmung der Trockenmasse gewährleistet ist (BIRD und PRAIRIE 1985).

Im Gegensatz dazu wurde die „*Dry*“-Methode als quantitative Methode für den Spurenbereich entwickelt und unter Beachtung der labortechnischen Voraussetzungen qualitativ überprüft und validiert. Der Zeitfaktor spielt bei dieser Methode eine wesentliche Rolle. Im Vergleich zur „*Wet*“-Methode fallen zusätzliche Schritte, wie die Gefriertrocknung und das subjektiv beeinflusste Wägeprozedere an.

Nach wie vor gibt es in der Literatur nur wenige Aussagen über gewichtsbezogene Akkumulationsstrategien und -mechanismen in Zooplankton und nach den Ergebnissen von ZAUKE et al. (2001) besteht hierbei erheblicher Forschungsbedarf. Die Differenzierung innerhalb einzelner Arten, die Akkumulationen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und toxikologische Veränderungen einzelner Individuen könnten mit der TXRF-Anwendung wesentlich informativer ausgewertet werden. So wurden von WOELFL et al. (2004a) mit Hilfe der „*Dry*“-Methode vergleichende Untersuchungen an Zooplanktonproben durchgeführt. Zum einen wurde Zooplankton kupferbelasteter Wasserreservoirs einer chilenischen Bergbauregion untersucht und mit Zooplankton unbelasteter Seen verglichen. Wie erwartet konnte die höchste Signifikanz im Kupfer festgestellt werden. Die belasteten Zooplanktonarten wiesen gegenüber den unbelasteten Individuen eine 8-fach höhere Elementkonzentration auf (WOELFL et al. 2004a). Es ist bekannt, dass neben den Milieubedingungen auch Spezies-spezifische Eigenschaften eine wesentliche Rolle bei der Elementakkumulation spielen und die Bewertung der daher sehr variablen Bioakkumulationen in biologischen Proben erschweren. Aus diesem Grund wurden u. a. von LUOMA und RAINBOW (2005) und ZAUKE et al. (2001) Bewertungsmodelle entwickelt, die aber immer von einer homogenen Biomasse jeder Art ausgehen.

Für die Bewertung innerhalb einer Art bietet die Anwendung der entwickelten „Dry“-Methode wesentlich effizientere Ergebnisse.

Die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methoden wurde von MOLLOY und SIEBER (2008) untersucht. Sie konnten mit Hilfe der  $\mu$ -XRF feststellen, dass Einwaagen von Referenzmaterialien, in Abhängigkeit vom Element, bereits ab 11  $\mu\text{g}$  durchaus vergleichbare Ergebnisse bringen. Eine weitere Applikation wurde in MAGES et al. 2008 vorgestellt. Darin wurden Akkumulationsversuche in Embryonen des Zebraärbblings durchgeführt. Diese Einwaagen lagen noch unter denen von *Daphnia* und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

#### 4.2.1.2 *Eignung der CPA-Methode zur Reduzierung der organischen Matrix*

Der Einsatz der Kaltplasmaveraschung reduziert für die Analysierung von Elementen in biologischen Proben die organische Matrix signifikant, wie auch bei JAKES und MITCHELL (1996), DE STASIO et al. (1997) und CARVALHO et al. (2001) beschrieben. Die Wiederfindungsraten mit zertifiziertem Referenzmaterial bestätigen die Annahme teilweise. Besonders bei der Verwendung von biologischen Mikroproben vereinfacht diese Methode den gesamten analytischen Prozess der Probenpräparation und minimiert Kontaminationen erheblich.

Dieser schonenden Aufschlusstechnik sollte, insbesondere für die TXRF-Analytik, vor den klassischen Techniken der Vorrang gegeben werden. Hier sei als wesentlicher Vorteil die schonende Oxidation im Sauerstoffplasma bei Temperaturen unter 180 °C genannt. Hinzu kommt, dass das zu veraschende Material, unter Einhaltung der im Kap. 3.3.2 genannten Arbeitsbedingungen, direkt im Präparationsgefäß bzw. auf dem Probenträger verascht werden kann.

#### 4.2.2 *Bewertung der Ergebnisse der Felduntersuchungen am Beispiel einer Probennahme an der Tisza, Ungarn*

Während einer Messkampagne in Ungarn an der Tisza wurde die portable TXRF S2 PICOFOX™ hauptsächlich für die direkte Analyse von Zooplanktonproben eingesetzt. Unter Berücksichtigung der in 2.4.3 und 3.3.3 vorgegebenen Qualitätskriterien wurde vor Ort die „Wet“-Methode angewendet. Es zeigte sich, dass diese „vereinfachte Methode“ durchaus für Felduntersuchungen geeignet ist, um semiquantitativ die Elementakkumulation im Zooplankton vor Ort nachweisem zu können. Die Überprüfung mit zertifizierten Referenzmaterialien ergab akzeptable Wiederfindungsraten.

Die semiquantitative Elementbestimmung ist im Feld durchaus auch für andere biologische Proben geeignet. In Abhängigkeit von den zu erwartenden Ergebnissen kann bei einem ersten Screening als Bezugselement ein bekannter Elementgehalt dienen. Wie bereits 2003 von FREIMANN methodisch entwickelt und mehrfach angewendet, ist die Bestimmung von Schwermetallen in marinen Sedimenten ohne Aufschluss gut geeignet.

Zur Überprüfung der Eignung der „Dry“-Methode für Feldeinsätze wurden alle präparierten Zooplanktonproben mit der portablen und der stationären TXRF analysiert und die Ergebnisse verglichen. Dabei korrelieren die Ergebnisse innerhalb der zugelassenen Toleranzgrenzen für biologische Proben. Der Einsatz der portablen TXRF erweist sich für alle angegebenen Einsätze als geeignet.

### **4.3 Gewässerrelevante Bewertung der Elementakkumulation in biologischen Proben**

Die Beurteilung der Qualität von Oberflächengewässern kann auf der Grundlage naturräumlicher oder wirkungsbezogener Bewertungsverfahren erfolgen. Dabei orientiert sich der naturräumliche Ansatz an den anthropogenen Veränderungen gegenüber den geogenen Hintergrundinformationen der Stoffkonzentrationen (SCHNEIDER et al. 2003). Die wirkungsbezogene Bewertung fundiert dagegen auf der Einbeziehung unterschiedlichster Kriterien, wie z.B. die Trinkwasserverordnung, den Richtlinien für Fischgewässer, Gewässergüteklassifikationen für Schutzgüter usw., die konkrete Qualitätsstandards gewährleisten (SCHNEIDER et al. 2003). In der EU-Wasserrahmenrichtlinie sind sowohl für Oberflächenwasser als auch für Schwebstoffe und Sedimente Grenzwerte festgelegt bzw. werden empfohlen (Tabelle 4-1).

Um den Belastungszustand von Fließgewässern beurteilen zu können, wurden vorrangig die Ergebnisse der Elementgehalte in den Schwebstoffen und der Wasserphase sowie die Elementanreicherungen im Sediment herangezogen. Dabei bildet nach wie vor die Gesamtkonzentration der Elemente das Kriterium. Tatsächlich hängt die Bioverfügbarkeit der Elemente, die das eigentliche Gefahrenpotential für Mikroorganismen darstellen, von den vorliegenden Metallspezies in der gelösten Wasserphase ab (MEYLAN et al. 2003, 2004).

Eine wesentliche Grundlage für die Bewertung von Ökosystemen bilden Organismen in Oberflächenwässern, die die Elemente teilweise als Filtrierer (Zooplankton) direkt bzw. kumulativ über Zellbarrieren (Biofilm) aufnehmen. Unabhängig von der Trophieebene führt die Elementaufnahme in Organismen mit Sedimentkontakt zu höheren Akkumulationsraten als bei denen die sich in der Wasserphase frei bewegen (PROSI und MÜLLER 1987).

Aufgrund der hohen Mobilität von Zooplankton sollte die Bewertung der Elementanreicherung ausschließlich mit den Grenzwerten von Schwebstoffen verglichen werden. Im Biofilm hingegen können kausale Zusammenhänge sowohl zu den Grenzwerten der Schwebstoffe als auch zum Sediment bestehen. Das ist einerseits vom Milieu in der Wasserphase und weiterhin von der Positionierung der Auswuchsträger abhängig. Das konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Biofilme in der Schlenze und im Schlüsseltollen (Kap. 3.2.2.1) festgestellt werden. Bedingt durch den sehr hohen Schwebstoffgehalt in der Schlenze lagerte sich die Sedimentationsschicht hauptsächlich auf den vertikalen Biofilmen ab.

#### ***4.3.1 Vergleich der Elementgehalte in untersuchten Biofilmen mit Grenzwerten für Schwebstoffe/Sedimente der EU-WRRL***

Am Beispiel der großskaligen Längsprofiluntersuchungen an der Tisza in Ungarn wird im Folgenden versucht, die Elementakkumulation in biologischen Proben hinsichtlich der Grenzwerte der EU-WRRL (EU-Wasserrahmenrichtlinie) zu bewerten. Für die Datenerhebung wurden die Ergebnisse des Kapitels 3.2.2 (Tab. 3-8 und 3-9) und Daten aus ÓVÁRI et al. (2004a) und WOELFL et al. (2004c) verwendet. In Tabelle 4-1 wurden die Elementgehalte des Oberflächenwassers und der Biofilme ausgewählter Probenstellen der Tisza den empfohlenen Grenzwerten der EU-WRRL gegenübergestellt. Als Information werden für das Oberflächenwasser auch die geogenen Hintergrundwerte (SCHNEIDER et al. 2003) angegeben.

Der Vergleich der Elementkonzentrationen des Oberflächenwassers zu den Grenzwerten ist eindeutig und zeigt wie erwartet an, dass in der Szamos Grenzwerte um den Faktor 5 für Cu und 10 für Zn überschritten werden. Gleichzeitig ist eine Erhöhung der Cu-Gehalte in Tokaj und am Stausee der Tisza ersichtlich. Cu ist fischtoxisch und führt bereits bei niedrigen Konzentrationen ( $\approx 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) zu Schädigungen von z. B. Phytoplankton. Für As gibt es in der Wasserphase keine Abweichungen vom Grenzwert.

Abweichend ist allerdings das Verhältnis vom As im Oberflächenwasser zur Anreicherung im Biofilm an den Probenstellen S 2 und S 3. Am Probenort S 2, einem unbelasteten Altarm der Szamos, der als Referenzstelle genutzt wurde, ist der As-Gehalt mit  $7,12 \mu\text{g L}^{-1}$  doppelt so hoch wie der maximale geogene Hintergrund ( $0,3 - 3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und weist im Biofilm „nur“ eine Anreicherung mit einem Faktor von 1.120 auf. An S 3 wiederum, der stark kontaminierten Szamos, ist der As-Gehalt mit  $4,46 \mu\text{g L}^{-1}$  nur halb so hoch wie an S 2, führt aber im Biofilm zu einer Anreicherung von  $99,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , also mit einem Faktor von 22.200. Diese Werte zeigen eindeutig, dass die Anreicherung im Biofilm nur aus der starken Schwebstofffracht (s. Abb. 3-22) resultieren kann. Daraus resultieren ebenso die Elementanreicherungen im Biofilm für die Elemente Cu und Zn. Würden auch hier die empfohlenen Grenzwerte der EU-WRRL zugrunde gelegt, wäre an S 3, vor dem Zufluss der Tisza, der Cu-Gehalt um das 3-fache erhöht. Der Grenzwert für Zn mit  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  würde um  $2.000 \mu\text{g g}^{-1}$  überschritten. Der an der Probenstelle T 2 angegebene Zn-Gehalt im Biofilm resultiert aus einer Kontaminationsquelle während der Probennahme (Kap. 3.2.2.2).

In Tabelle 4-2 wurden die Grenzwerte für Schwebstoffe/Sedimente der EU-WRRL mit den saisonalen Anreicherungen in den Biofilmen der Probennahmen in 2000 und 2002 verglichen. Hier zeigen sich eindeutig die Folgen der Sedimentation und damit eine Anreicherung in 2002 für die meisten Elemente. Der hohe Zinkgehalt in Tokaj (T 2) resultiert, wie bereits im Kap. 3.2.2.2 beschrieben, aus belastetem Probennahmesubstrat.

Für die saisonalen Abweichungen kann nicht abgeschätzt werden, ob bei der Probennahme nur „frisches“ Material entnommen oder auch abgestorbene überlagerte Biofilme gesammelt wurden. Als Fazit könnte anhand der Ergebnisse abgeleitet werden, dass Elementgehalte in Biofilmen, die die empfohlenen Grenzwerte für Sedimente/Schwebstoffe signifikant überschreiten, auch auf erhöhte Belastungen der Sedimente schließen lassen. Insofern könnte die portable TXRF für ein erstes Screening nach Havarien eingesetzt werden. Inwieweit dafür die Analyse kleiner Biofilmfragmente oder ein kurzzeitiger Aufwuchs auf TXRF-Trägern eine geeignete Alternative darstellen, könnte in weiterführenden Arbeiten getestet werden.

Tab. 4-1: Grenzwerte der EU-WRRL für Oberflächenwasser (OFW) [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ], Schwebstoff/Sediment [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] und analysierte Elementgehalte im Oberflächenwasser [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] und in Biofilmen [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] ausgewählter Probenahmeorte an der Tisza, Ungarn. Auszüge aus den Tabellen 3-8 und 3-9 sowie aus ÓVÁRI et al. (2004a) und WOELFL et al. (2004c)

<b>Grenzwerte nach EU-WRRL</b>													
Analysierte Elementgehalte ausgewählter OFW und Biofilmproben													
OFW	OFW geogener Hintergrund	Schwebstoff/Sediment	Szamos Altarm		Szamos Olesva		Tisza vor Szamos		Tisza Tokaj		Tisza Stausee		
			S 2	S 3	T 1	T 2	T 5	T 1	T 2	T 5			
	OFW	Biofilm	OFW	Biofilm	OFW	Biofilm	OFW	Biofilm	OFW	Biofilm	OFW	Biofilm	
Cr	<b>50</b>	1,3 - 5	<b>320</b>	-	10,4	-	34,7	-	73,6	-	56,0	-	72,6
Ni	<b>4,4</b>	0,6 - 2,2	<b>120</b>	3,56	19,3	4,84	75,1	1,65	64,1	2,61	36,9	2,40	40,4
Cu	<b>2</b>	0,5 - 2	<b>80</b>	1,66	8,21	10,9	228	1,64	83,3	3,35	63,0	3,30	53,7
Zn	<b>14</b>	1,8 - 7	<b>400</b>	<1,1	38,5	145	2430	3,61	751	7,89	4780	4,88	213
As	<b>10</b>	0,3 - 3,5	<b>40</b>	7,12	7,94	4,46	99,0	<1,1	24,6	1,74	31,8	3,75	21,1
Pb	<b>10</b>	0,4 - 1,7	<b>100</b>	<2,0	12,5	6,44	72,6	<1,4	57,0	1,63	46,9	1,83	29,3

Tab. 4-2: Vergleich der Grenzwerte der EU-WRRL für Schwebstoff/Sediment und der saisonalen Elementanreicherungen in Biofilmen von Tisza und Szamos der Probenkampagnen 2000 und 2002 [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (MAGES et al. 2004a)

Jahr	Probenort	Proben- -stelle	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Pb	
			<b>Grenz- werte</b>	<b>320</b>	<b>120</b>	<b>80</b>	<b>400</b>	<b>40</b>	<b>100</b>
2000	Olcsva	S3	78,0	59,0	261	1.520	77,0	68,0	
2002			34,7	75,1	228	2.430	99,0	72,6	
2000	Tokaj	T2	10,3	17,5	118	195	18,3	10,1	
2002			56,0	36,9	63,0	4.780	31,8	46,9	
2000	Tiszavalk	T4	79,0	35,2	38,0	157	27,6	56,5	
2002			72,5	47,2	82,4	535	30,8	65,6	
2000	Kisköre	T5	76,0	34,9	35,6	151	38,2	23,4	
2002			72,6	40,4	53,7	213	21,1	29,3	

#### 4.3.2 Vergleich der Elementgehalte in Makrozoobenthos- und Zooplanktonproben in Anlehnung an die Grenzwerte für Schwebstoffe/Sedimente der EU-WRRL

Die Referenz- und Grenzwerte der EU-WRRL bilden die Grundlage für den Vergleich der Elementakkumulation in Makrozoobenthos- und Zooplanktonproben. Zur Anwendung kamen Makrozoobenthosproben nach dem Zusammenfluss Szamos und Tisza (WOELFL et al. 2004b, 2006b) und Zooplanktonproben aus einem Wasserreservoir in Chile, dem Rapel, der aus dem Einzugsgebiet der Cu-Minenregion gespeist wird (WOELFL et al. 2004a).

Das Benthos, gesammelt in der Sedimentschicht, weist keine Überschreitung der Grenzwerte auf (Tab. 4-3). Hier kann angenommen werden, dass die Anreicherungen im Sediment nur in der obersten reaktiven Schicht vorliegen und über das Benthos keine direkte Aufnahme erfolgt.

Bezogen auf die Toxizität für aquatische Lebensgemeinschaften ist ein Kupfergehalt von  $40 \mu\text{g g}^{-1}$  allerdings bereits als grenzwertig anzusehen. Der Zinkgehalt mit  $194 \mu\text{g g}^{-1}$  liegt über dem Referenzwert mit  $140 \mu\text{g g}^{-1}$  und zeigt bereits eine Anreicherung.

Die Ergebnisse der Zooplanktonproben können als starke Cu-Belastung eingeschätzt werden. Auch hier ist von einer erhöhten Toxizität auszugehen. Die Werte liegen mit 62,7 und  $67,4 \mu\text{g g}^{-1}$  zwar unter dem empfohlenen Grenzwert von  $80 \mu\text{g g}^{-1}$ , aber da es sich hierbei um ein wichtiges Bindeglied der Nahrungskette handelt, kann der Grenzwert als nicht relevant angenommen werden. Die von DITTMAR 2011 angeführte Elementfolge für die Toxizität in der Reihenfolge:

**Cu** > Cr > Zn > Pb > Ni für Zooplankton und

**Cu** > Pb > Zn > Ni für Phytoplankton

korrelieren in keiner Weise mit den Grenzwerten nach der EU-WRRL. Diese geben, wie in Tab. 4-3 dargestellt, ein Ranking von

Zn > Cr > Ni > Pb > **Cu** > As vor.

Unter Berücksichtigung der Toxizität ist, wie am Beispiel Cu deutlich sichtbar, die Einstufung der Grenzwerte der Elemente für die verschiedensten Planktonarten bisher nicht möglich. Die Trennung der Grenzwerte für Schwebstoffe von Sedimenten, unter Berücksichtigung der Toxizität für biologische Proben, wäre für die Bewertung von Zooplankton- und Makrozoobenthosproben eher relevant.

Weiterhin werden für die Bewertung der Gewässergüte ausschließlich Fische und wirbellose Tiere verwendet. Dabei zeigen die langen Akkumulationszeiten von Elementen und die sehr aufwendige Präparation, einschließlich der Analytik, nur langfristige und dauerhafte Elementanreicherungen an. Kurzfristige Aussagen über die Akkumulation von Schadstoffen in Zooplanktonproben, wie mit den in Kap. 3.3 entwickelten Methoden möglich, wären eine weitere Alternative für z. B. die Abschätzung von Gefährdungen für aquatische Ökosysteme nach Havarieereignissen.

Tab. 4-3: Referenz- und Grenzwerte der EU-WRRL für Schwebstoff/Sediment und Elementgehalte in Makrozoobenthosproben aus der Tisza, Ungarn (WOELFL et al. 2004b, 2006b) sowie Zooplankton aus einem kupferbelasteten Bergbausee und einem Referenzsee in Chile [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] (WOELFL et al. 2004a)

Schwebstoff/Sediment	Grenzwerte nach EU-WRRL	Analysierte Elementgehalte ausgewählter Zooplankton- und Makrozoobenthosproben				
		Benthos Tisza, Ungarn	Zooplankton Stausee Rapel, Chile Cu-belastet	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Bosmina chilensis</i>	Zooplankton Laja See, Chile unbelastet
Cr	80	320	-	-	-	-
Ni	60	120	32,6	16,8	10,3	7,99
Cu	40	80	40,0	62,7	67,4	8,09
Zn	140	400	194	102	115	90,3
As	-	40	5,9	7,9	6,35	4,4
Pb	30	100	15,7	-	-	-

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden in unterschiedlichen aquatischen Biota Akkumulationsuntersuchungen ausgewählter Elemente durchgeführt. Als Untersuchungsgegenstand wurde Probenmaterial aus aquatischen Biofilmen und Zooplankton aus verschiedenen aquatischen Systemen (bergbaubeeinflusst und unbeeinflusst) gewonnen. Beide biologisch unterschiedlichen Probenmaterialien können einerseits extrem empfindlich auf erhöhte Elementkonzentrationen reagieren. Andererseits ist eine Adaption durch verschiedenste Mechanismen und „Überlebensstrategien“ an erhöhte Metallkonzentrationen möglich. In der aquatischen Nahrungskette sind sie ein wichtiges Bindeglied und können den ökologischen Zustand natürlicher Gewässer anzeigen.

Für Biofilme und Zooplankton wurden unter optimalen Laborbedingungen und unter Berücksichtigung der analytischen Qualitätssicherung Methoden entwickelt und weiter modifiziert, um in Probenmaterialien im  $\mu\text{g}$ -Bereich reproduzierbare Elementbestimmungen zu ermöglichen. Die Anwendungen zeigten sich für Biofilme weniger kompliziert, da mit 500  $\mu\text{g}$  ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand. Analytisch aufwendiger stellte sich die Anwendung für die Zooplanktonanalytik dar. Hier lag der Fokus in der Elementbestimmung in Einzelindividuen, deren absolute Einzelgewichte zwischen 5 und 10  $\mu\text{g}$  lagen.

Ein wesentlicher Bestandteil der durchgeführten Versuche war die Einbindung der analytischen Qualitätssicherung. Dabei wurden sowohl in den Laborversuchen als auch in den Feldeinsätzen zertifizierte Referenzmaterialien dem gleichen Analysenprozedere wie die realen Proben unterzogen und die Wiederfindungsraten bestimmt. Das Referenzmaterial CRM 414, mit  $> 97\%$  *Daphnia magna*, wurde aufgrund der biologischen Vergleichbarkeit für Biofilme und Zooplankton als geeignet befunden. Die Einwaagen des Referenzmaterials für die Biofilmvergleiche lagen bei ca. 500  $\mu\text{g}$ . Dabei wurden für die Elemente Cr, Mn, Fe, Ni, Cu und Zn Wiederfindungsraten zwischen 90 und 114 % gefunden.

Für die Anwendungen der Vergleiche mit dem Zooplankton schwankten die Einwaagen des Referenzmaterials zwischen 10 und 60  $\mu\text{g}$ . Diese Einwaagen liegen bei ca. 5 % der von QUEVAUVILLER et al. (1993a) empfohlenen Angaben für signifikante Wiederfindungsraten. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass auch mit geringeren Einwaagen akzeptable Wiederfindungen erzielt werden können. So konnten für die Elemente Mn, Fe, Ni, Cu und Zn Wiederfindungsraten zwischen 87 und 119 % ermittelt

werden. Es wird angenommen, dass die abweichende Wiederfindung von 141 % für das Element Cr aus Inhomogenitäten des Referenzmaterials resultiert, bzw. sich hierbei die geringe Einwaage nachteilig auswirkt.

Als Analysetechnik kamen für die Untersuchungen der Biofilm- und Zooplanktonproben zwei TXRF-Geräte zum Einsatz. Die stationäre TXRF 8030 C, die für die Kühlung der Detektionseinheit flüssigen Stickstoff benötigt, und die standortunabhängige portable TXRF PICOFOX<sup>TM</sup>, deren Detektor mittels Peltier-Modul gekühlt wird. Sie benötigt im Feldeinsatz lediglich ein Notstromaggregat. Sowohl die stationäre als auch die portable TXRF zeigten sich für alle Untersuchungen als sehr gut geeignet und erbrachten im Vergleich mit zertifizierten Referenzmaterialien reproduzierbare Wiederfindungsraten.

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, bietet die Anwendung der TXRF die Möglichkeit der Detektion vieler für die aquatische Umwelt relevanter Elemente im Spurenbereich. Auf mögliche Kontaminationen, speziell im Feld, wie Windrichtung, Staubbelastung und Kontaminationen durch die Probennahmen, wurde in der Arbeit eingegangen. Die ständigen Kontrollen der Blindwerte bestätigten die Notwendigkeit des möglichst kontaminationsfreien Arbeitens. So konnten auf Leerträgern nach einer Expositionszeit von 48 h Elementanreicherungen für Zn von  $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$  und für Fe von  $559 \mu\text{g L}^{-1}$  detektiert werden.

Für die Elementuntersuchung in Biofilmen wurde die Eignung natürlicher und künstlicher Aufwuchsträger getestet und verglichen. Dazu wurden natürlich aufgewachsene Biofilme und Biofilme von definiertem Trägermaterial, in diesem Fall Polycarbonat, gewonnen und mit selbst entwickelten Präparationen vorbereitet, um die Elementbestimmung mit der TXRF 8030 C zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den Feldversuchen festgestellt, dass das Aufwuchssubstrat keine Relevanz für das Biofilmwachstum hat. Lediglich bei den künstlichen Aufwuchsträgern kam es zu erhöhten Akkumulationsraten von Pb und Ni. Da das Umgebungsmilieu durch gleichbleibende Temperatur keinem saisonalen Einfluss unterliegt, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um sorptionsbedingte Austauschmechanismen handeln könnte. Daraus schlussfolgernd wurden in Biofilmen eines Stollensystems zur Haldenentwässerung (Mansfelder Land, Mitteldeutschland) zeitabhängige Sorptionseffekte ausgewählter Elemente untersucht. Mit einem differenzierten Entnahmeregime konnten signifikante Austauschmechanismen nachgewiesen werden.

Nach einer Depositionszeit von 4 Wochen konnte festgestellt werden, dass Pb mit  $531 \text{ mg g}^{-1}$  und Ni mit  $326 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  relativ stark absorbiert wurden, während die Aufnahme von Zn mit  $5.530 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  und Cu mit  $2.320 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  eher verhalten verlief.

Abbildung 3-20 zeigt grafisch den Sorptionsverlauf der Elemente Pb, Ni, Zn und Cu. Nach 14 Tagen konnte eine relativ schnelle Desorption von Pb und Ni und ein wesentlicher Anstieg der Elementgehalte von Zn und Cu festgestellt werden. 8 Wochen nach Auslegen der Träger wurde für die verglichenen Elemente ein Plateauzustand erreicht. Somit kann geschlussfolgert werden, dass ein relativ schneller Abfall der Pb- und Ni-Gehalte zugunsten der Anreicherung der Elemente Zn und Cu verlief.

Welche Dimension die Anreicherung der einzelnen Elemente in Abhängigkeit von der Aufwuchszeit der Biofilme umfasst, zeigt Tabelle 3-7. Hier variieren Elementgehalte von  $109 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  für Ni bis  $531.000 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  für Pb. Diese Werte korrelieren nicht mit den gelösten Elementgehalten der Wasserphase. Während die Elementkonzentrationen im Wasser des Schlüsselstollens folgendes Ranking aufweisen

$$\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni},$$

erfolgten die Akkumulationen im Biofilm nach dem Muster

$$\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni}.$$

Am Beispiel von Longitudinaluntersuchungen eines bergbaubeeinflussten Fließgewässers (Tisza, Ungarn) wurde der Einfluss von Schadstoffeinträgen nach Havarie-Ereignissen auf die Elementanreicherung in Biofilmen untersucht und bewertet. Ausgehend von Proben eines unbelasteten Altarms der Szamos als Referenzstelle wurden sowohl die Biofilme der kontaminierten Szamos als auch der Tisza vor und nach dem Zusammenfluss beider Flüsse untersucht. In den Biofilmen der Szamos zeigten sich im Vergleich zu den Referenzbiofilmen Anreicherungen von teilweise 2 Größenordnungen. Zn wurde z. B. mit einem Faktor von 145 angereichert, Cu mit 25, As mit 12 und Cr mit 9. Nach der Einmischung in die Tisza und in deren Längsprofil variieren die Elementgehalte in den Biofilmen teilweise stark. Das kann einerseits vom Probennahmeort und dessen unmittelbaren urbanen Einleitungen über Nebenflüsse beeinflusst werden und andererseits auf Inhomogenitäten des Biofilms hinweisen.

Als Filtrierer von Plankton spielt Zooplankton mit der möglichen Anreicherung von Elementen in der Nahrungskette aquatischer Systeme eine wichtige Rolle.

Bisherige Aussagen bezogen sich ausschließlich auf die Biogesamtmasse von Zooplankton und gaben keine Auskunft über die Akkumulation in Einzelindividuen.

Erst mit den entwickelten „Dry“-und „Wet“-Methoden ergaben sich Aussagen über gewichtsadaptierte Akkumulationen in Einzelindividuen. Der Vergleich beider Methoden zeigte für die Elemente P, K, Ca, Fe, Cu und Zn keine signifikanten Unterschiede. Mit dem Einsatz einer Kalt-Plasma-Veraschung konnte außerdem durch die Reduzierung der organischen Matrix das Signal-Untergrund-Verhältnis reduziert werden und ermöglichte eine verbesserte quantitative Detektion der Elemente.

Weiterhin konnte während Feldversuchen an der Tisza in Ungarn getestet werden, inwieweit die „Wet“-Methode bei Havarien als „Task-Force“ geeignet ist und sehr schnell Aussagen über Belastungen in Biota zulässt. Die Anwendung zeigte, dass die Methode für eine semi-quantitative Elementbestimmung im Feld geeignet ist. Die eingesetzte portable TXRF vom Typ S2 PICOFOX™ erwies sich sowohl von der Handlichkeit als auch von der Robustheit als ideales Spektrometer zur Analyse von Elementen sowohl in Wasserproben als auch in unterschiedlichen biologischen Proben. Dabei waren Aussagen über die partikulären Bindungen von Elementen bereits vor Ort möglich.

Es stand die Frage, inwieweit für die Bewertung des Belastungszustandes die Ergebnisse der Biofilm- und Zooplanktonproben in Anlehnung an die EU-WRRL verglichen werden können. Für die Bewertung mittels Zooplankton wäre aufgrund der Mobilität eine Parallelität mit dem Schwebstoff wahrscheinlicher. Dagegen besteht für das Kompartiment Biofilme, die im horizontalen Aufwuchs einer ständigen Sedimentation unterliegen, eher ein Bezug zum Sediment. Leider sind aus den bestehenden Klassifizierungen mit den unterschiedlichsten Grenzwerten von ARGE und LAWA keine eindeutigen Differenzierungen für Schwebstoffe und Sedimente ersichtlich. Da biologische Proben (und in dieser Arbeit speziell Biofilme) einer sehr hohen Heterogenität unterliegen und das Wachstum wesentlich von den Milieubedingungen und den Interaktionen innerhalb der Mikrodiversität abhängt, ist eine klassifizierte Bewertung von Ökosystemen aus heutiger Sicht eher fraglich und mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit z. Z. nicht realisierbar. Hier besteht Handlungsbedarf in der Definition für die unterschiedlichen Klassifizierungen von Schwebstoffen und Sedimenten und daraus schlussfolgernd der Bezug zu aquatischen Lebensgemeinschaften.

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABO-RADY, M.D.K. (1983) Anreicherung von Schwermetallen in Bachforellen im Vergleich zu Wasserpflanzen und Sedimenten. *Z Lebensm Unters Forsch* 177, 339-344.
- ARBEITSKREIS KLIMA UND NATURGEFAHREN (2010) Geomorphologie, naturräumliche Ressourcen und Naturgefahren, Universität Giessen, <http://www.unigiessen.de/geographie.htm> (Zugriff:18.10.2012)
- ATKINS, P.W., De PAULA, J. (2005) *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH Weinheim, 4.Auflage, S. 169.
- BABOROWSKI, M., KRAFT, J., MAGES, M., KARRASCH, B., von TÜMPLING, W., ÓVAR, M., ZÁRÁY, GY. (2002) Untersuchungen zum Eintrag von gelösten und partikulären Stoffen aus der Szamos in die Theiß (Ungarn). Deutsche Gesellschaft für Limnologie (DGL) – Tagungsbericht Tutzing.
- BABOROWSKI, M., v. der KAMMER, F. FRIESE, K. (2003) Transport von Schwermetallen bei Hochwasserführung der Elbe: gelöst, partikel- oder kolloidgebunden? Vortrag: Statusseminar des BMBF-Ad hoc- Verbundprojekt, 27.-29.8.2003, Freiberg.
- BABOROWSKI, M., v. TÜMPLING, W., FRIESE, K. (2004) Behaviour of suspended particulate matter (SPM) and selected trace metals during the 2002 summer flood in the River Elbe (Germany) at Magdeburg monitoring station. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 8 (2) 135-150.
- BABOROWSKI, M., BOZAU, E. (2006): Impact of former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). *Appl. Geochem.* 21, 1073-1082.
- BCR® (1993), Zertifikat für CRM 414, Zertifikat für Referenzmaterial Zooplankton, Report EUR 14558 EN.
- BEHRA, R., RUPEREZ, W., WAGNER; b., KISTLER, D., SIGG, L., NAVARRO, E., ROBINSON, C. (2005) Wie wirken sich Metalle auf Algenbiofilme aus? *Eawag News: Biofilme*, 60d, 16-18.
- BERBEROVIC, R. (1990) Elemental composition of two coexisting *Daphnia* species during the seasonal course of population development in Lake Constance. *Oecologia* 84, 340-350.
- BERBEROVIC, R., PINTO-COELHO R.M. (1989) Dry first, measure later: a new procedure to preserve and measure zooplankton for ecophysiological studies. *J. Plankton Res.* 11 (5) 1109-1116.

- BETHEL, U., HAMM, V., KNÖCHEL, A. (1989) Untersuchungen zur Bestimmung von Spurenelementen in Blutserum mit Hilfe der Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse. *Anal. Chem.* 335, 855-859.
- BIRD, D.F., PRAIRIE, Y.T. (1985) Practical guidelines for the use of zooplankton length-weight regression equations *J. Plankton Res.* 7, 955-960.
- BISHOP P.L. (1997) Biofilm structure and kinetics. *Water Sci. Tech.*, 36 (1) 287-294.
- BLOHM, H.-P., GAUMERT, D., KÄMMEREIT, M. (1994) Leitfaden für die Wieder- und Neuansiedlung von Fischarten. *Binnenfischerei Niedersachsen*, S. 90.
- BOCH, J. (2005) Quorum & Antibiotika. Vorlesungsreihe 06, Universität Halle, Institut für Genetik, Abt. Pflanzengenetik.
- BOHLEN von, A. (1988) Microtome sections of biomaterials for the trace analysis by TXRF. *Fres. Anal. Chem.* 331, 454-458.
- BOHLEN von, A. (2007) TXRF-Literatursammlung. ISAS Dortmund, <http://ms.ansci.de/fileadmin/img/pb4/pdf/TXRF-Publ-List.pdf> [11. Mai 2007].
- BÖHM, E., HILLENBRAND, T., MARSCHEIDER-WEIDEMANN, F., SCHEMPP, C. (2001) Bilanzierung des Eintrags prioritärer Schwermetalle in Gewässer, Forschungsbericht 29822243, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit – Wasserwirtschaft. Umweltbundesamt, UBA, Reportnr.: UBA-FB 000181.
- BOTTRELL, H.-H., DUNCAN, A., GLIWICZ, M.Z., GRYGIEREK, E., HERZIG, A., HILLBRICHT-ILKOWSKA, A. (1976) *Norw. J. Zool.* 24, 419-456.
- BRÜMMER, G.W., ZEIEN, H., HILLER, D.A., HORNBURG, V. (1994) Bindungsformen und Mobilität von Cadmium und Blei in Böden. In: *Beurteilung von Schwermetallen in Böden von Ballungsgebieten: Arsen, Blei und Cadmium*. DECHEMA, Frankfurt a.M., S. 197-218.
- CAMPBELL, P.G.C., ERRÉCALDE, O., FORTIN, C., HIRIART-BAER, V.P., VIGNEAULT, B. (2002) Metal bioavailability to phytoplankton applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology, C-Tox. Pharm.*, 133, 189-206.
- CARVALHO, M.L., CUSTÓDIO, P.J., REUS, U., PRANGE, A. (2001) Elemental analysis of human amniotic fluid and placenta by total-reflection X-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence: child weight and maternal age dependence. *Spectrochim. Acta B* 56 (11) 2175-2180.

- CHAPMAN, P.M., ALLEN, H.E., GODTFREDSSEN, K., Z'GRAGGEN, M.N. (1996) Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environ. Sci. Technol.* 30 (10), 448A-452A.
- CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. (1990) (eds) *Biofilms*. Wiley, New York.
- CHEN, C.Y., STEMBERGER, R.S., KLAUE, B., BLUM, J.D., PICKHARDT, P.C., FOLT, C.L. (2000) Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 45 (7) 1525-1536.
- CHRISTENSEN, B.C., CHARACKLIS, W.G. (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: W.G. Characklis, K.C. Marshall (eds) *Biofilms*, John Wiley, New York, 93-130.
- CLASON, B., ZAUKE, G.P. (2000) Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods evaluation and verification of toxicokinetic models. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57, 1410-1422.
- COLLINS, Y.E., STOTZKY, G. (1989) Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: *Metal Ions and Bacteria*. Beveridge, T.J. und Doyle, R.J. (eds). John Wiley & Sons, New York, 31-90.
- COSTERTON, J.W. (1999) Introduction to biofilm – discussion. *J. Antimicro. Agents*, 11, 217-221.
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, K.G., LADD, P.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 435-464.
- CSÁNYI, B. (2002) International Commission for the Protection of the Danube River, Joint Danube Survey: Investigation of the Tisza River and its Tributaries, Final Report. Prepared by: Institut for Water Pollution Control, VITUKI.
- DE BEER, D., STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z. (1994) Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms: *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 636-641.
- DE BEER, D., STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z. (1996) Liquid Flow and Mass Transport in Heterogeneous Biofilms, *Wat. Res.*, 30 (11) 2761-2765.
- DE STASIO, G., CAPOZI, M., DROUBAY, T.C., MERCANTI, D., CIOTTI, M.T., LORUSSO, G.F., ANDRES, R., SUDA, T., PERFETTI, P., TONNER, B.P., MARGARITONDO, G. (1997) The effect of ashing on cells: spectroscopy of physiological elements. *Anal. Biochem.* 252, 106-109.
- DILLON, R., FAUCI, L. (2000) A microscale model of bacterial and biofilm dynamics. *Biotech. Bioengin.*, 68, 5, 536-547.

- DITTMAR, T. (2011) Schwermetalle. Vorlesung Wasserinhaltsstoffe. TU-Dresden, [http://tu-dresden.de/die\\_tu\\_dresden/fakultaeten/fakultaet\\_forst\\_geo\\_und\\_hydrowissenschaften](http://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/fakultaet_forst_geo_und_hydrowissenschaften) (17.6.2012)
- DOMBOVÁRI, J., BECKER, J.S., DIETZE, H.-J. (2000) Multielement analysis in small amounts of environmental reference materials with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 407-413.
- DUMONT, H.J., Van de VELDE, I., DUMONT, S. (1975) The dry weight estimate of biomass in a selection of cladocera, copepoda and rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, 19, 75-97.
- EIDNER, A. (2004) Struktur und Entwicklung benthischer Biofilme in Fließgewässern – Messungen und Simulation. Dissertation Fakultät III der Technischen Universität Berlin, D 83.
- EU-WRRL - Richtlinie des Rates zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik (2000) Amtsblatt der europäischen Gemeinschaft L 327/1, Richtlinie 2000/60/EG.
- FANG, H.H.P., XU, L-C., CHAN, K-Y (2002) Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Res.* 36, 4709-4716.
- FECHER, P. (1997) ICP-Massenspektrometrie. In: MATTER, L. (ed.), *Elementspurenanalytik in biologischen Matrices*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- FELLENBERG, G. (1990) *Chemie der Umweltbelastung*, Teubner Verlagsgesellschaft; Stuttgart.
- FLEMMING H-C, WINGENDER, J (2002) Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit* 36 (1), 30-42.
- FLEMMING, H.-C., NEU, T.R., WOZNIAK, D.J. (2007) The EPS Matrix: The „House of biofilm cells“ – Guest Commentary, *J. Bact.* 189 (22) 7945-7947.
- FLEMMING, H.-C. (1996) Sorption sites in biofilms. *Water Sci. Technol.* 32 (8), 27-33.
- FLEMMING. H.-C., WINGENDER, J. (2001) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* 31 (3), 169-180.
- FÖRSTNER, U., MÜLLER. G. (1974) *Schwermetalle in Flüssen und Seen als Ausdruck der Umweltverschmutzung*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- FÖRSTNER, U., SALOMONS, W. (2004) Elements and compounds in sediments. In: MERIAN, E., ANKE, M., IHNAT, M., STOEPLER, M. (eds): Metals and their compounds in the environment, Vol. 1, 2nd ed., 149-162.
- FREIMANN, P. (2003) Bestimmung von Fe in marinen Sedimenten ohne Aufschluss. Vortrag, 1. Magdeburger TXRF-Workshop, UFZ Magdeburg.
- FRIESE, K., MAGES, M., WENDT-POTTHOFF, K., NEU, T.R. (1997) Determination of heavy metals in biofilms from the River Elbe by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B* 52, 1019-1025.
- FUNK, W., DAMMANN, V., DONNEVERT, G., (1992): Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- GADD, G.M. (1993) Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, 124, 25–60.
- GAUMERT, T., KÜCHLER, L., RASCHEWSKI, U. und THIEME, S. (1994) Schadstoffmonitoring mit *Dreissena polymorpha* in der tidefreien Elbe zwischen Schmilka und Schnackenburg. In: GUHR, H., PRANGE, A., PUNCOCHÁR, P., WILKEN, R.-D. und BÜTTNER, B. (eds), Die Elbe im Spannungsfeld zwischen Ökologie und Ökonomie. Internationale Fachtagung in Cuxhaven vom 8. bis 12. November 1994 - 6. Magdeburger Gewässerschutzseminar. Stuttgart, Leipzig: B.G. Teubner, 453-460.
- GASPARON, M. (1998) Trace metals in water samples: minimising contamination during sampling and storage, *Environ. Geol.* 36 (3-4), 207-214.
- GLEIT, C.E. (1965) High frequency electrodeless discharge systems for ashing organic matter. *Anal. Chem.* 37(2), 314-315.
- GOLL, D. (2001) Modellierung der Sorptionseigenschaften von Biofilmen. Diplomarbeit, FH Magdeburg-Stendal.
- GRUNDWASSERGÜTEBERICHT SACHSEN-ANHALT (1997-2001) „Beschreibende Auswertung“. Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt, Geschäftsbereich Gewässerkundlicher landesdienst, Sachbereich Wasserwirtschaftliche Grundlagen, Willi-Brundert-Str. 14, 06132 Halle (Saale).
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95-108.
- HANDBUCH S2 PICOFOX™ (2008), Bruker Nano GmbH.
- HARTWIG, H. J., KNITSCHKE, G., KUYUMCU, M. (1999): 800 Jahre Kupferschieferbergbau – Die Kupferschiefererzlagertstätten Mansfeld/Sangerhausen und ihre berg-

- bauliche Nutzung 1200-1990. In: HARTMANN, O. (Ed.), Kali-, Steinsalz und Kupferschiefer in Mitteldeutschland. Veröff. GGW 205, Berlin, 23-35.
- HELSEN, L., VAN den BULCK, E., MULLENS, S., MULLENS, J. (1999) Low-temperature pyrolysis of CCA-treated wood: thermogravimetric analysis. *Anal. Appl. Pyrol.* 52, 65-86.
- HENTSCHEL, E.J. und WAGNER, G.H. (2004) *Zoologisches Wörterbuch*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 7. Auflage.
- HOEFLER, H., STRELI, C., WOBRAUSCHEK, P., ÓVARI, M., ZÁRAY, GY. (2006) Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim Acta B* 61, 10, 1135-1140.
- HORNBURG, V. & BRÜMMER, G.W. (1993) Verhalten von Schwermetallen in Böden. 1. Untersuchungen zur Schwermetallmobilität.- *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 156, 467-477.
- JAECKEL, P. (2002). Wirkungen von Schwermetallen auf aquatische Pilze aus mikrobiellen Biozönosen des Mansfelder Landes. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- JAKES, K. A. und MITCHEL, J.C. (1996) Cold plasma ashing preparation of plant phytoliths and their examination with scanning electron microscopy and energy dispersive analysis of X-rays. *J. Archaeol. Sci.*, 23, 149-156.
- JANG, A., KIM, S.M., KIM, S.G., LEE, S.G., KIM, I.S. (2001) Effect of heavy metals (Cu, Pb and Ni) on the compositions of EPS in biofilms. *Water Sci. and Techn.* 43, 6, 41-48.
- JANKOWSKI, G. (1995) Zur Geschichte des Mansfelder Kupferschieferbergbaus, GDMB, Clausthal-Zellerfeld.
- JORDAN, G., MANTHEY-HORN, M., MEINCK, F., SANDER, P., SCHMIDT, R. (1941) Die chemischen Untersuchung von Abwasser unter Berücksichtigung der Schlammanalyse und der Vorflutuntersuchung. Selbstverlag der Preup. Landesanstalt für Wasser-, Boden- und Lufthygiene. Berlin-Dahlem, 138-140.
- JOSS, A., MAURER, M., SIEGRIST, H. (2005) Biofilter auf dem Prüfstand. *Eawag News: Biofilme*, 60d, 24-27.
- KAHLE, J., CLASON, B., ZAUKE, G.-P. (2002) Multielement Analyse von Cd, Cu, Pb, Co und Ni für marine Evertebraten mittels Graphit Ofen Atom Absorptions Spektrometrie (GFAAS) und Zeeman Untergrund Korrektur. *Laborpaxis* 26 (1), 42-43.

- KAHLE, J., CLASON, B., ZAUKE, G.-P. (2003) Sequential determination of Cd, Cu, Pb, Co and Ni in marine invertebrates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy and Zeeman background correction. *Varian AA at Work* No 129 2003; 1-15.
- KAISER, G., TSCHÖPEL, P., TÖLG, G. (1971) Aufschluss mit aktiviertem Sauerstoff bei Bestimmung extrem niedriger Spurenelementgehalte in organischem Material. *Anal. Chem.* 253, 177-179.
- KERN, U. (1997) Transport von Schweb- und Schadstoffen in staugeregelten Fließgewässern am Beispiel des Neckars. *Mitteilungen: Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart*, Heft 93.
- KLOCKENKÄMPER, R. (1991) Totalreflektions - Röntgenfluoreszenzanalyse. In: *Analytiker Taschenbuch Bd. 10*. H. Günzler, Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- KLOCKENKÄMPER, R. (1987) Total-reflection x-ray fluorescence analysis. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim.
- KNAUER, K., BEHRA, R., SIGG, L. (1997) Effects of free Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Tox. Chem.* 16, 220-229.
- KNOTH, J., SCHWENKE, H. (1978) An X-ray fluorescence spectrometer with totally reflecting sample support for trace analysis at the ppb level. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 291, 200-204.
- KRAFT, C., von TÜMPLING jun, W., ZACHMANN, W. (2003) Auswirkungen von Schwermetallemissionen nach Unfällen im rumänischen Bergbau auf das Sediment der Flüsse Szamos und Theiss (Ungarn). *Zbl. Geol. Palaeont. Teil 1 (1/2)* 153-169.
- KRÖPFL, K., VLADÁR, P., SZABÓ, K., ÁCS, É., BORSODI, A.K., SZIKORA, S., CAROLI, S., ZÁRAY, GY. (2006) Chemical and biological characterisation of biofilms formed on different substrata in Tisza river (Hungary). *Environ. Pollut.* 144, 626-631.
- KRÜGER, F., PRANGE, A., JANTZEN, E. (1999) ): Ermittlung geogener Hintergrundwerte an der Mittelelbe und deren Anwendung in der Beurteilung von Unterwassersedimenten. *Hamburger Bodenkundliche Arbeiten* 44: 39-51.
- LA MOTTA, E.J. (1976) Internal diffusion and reaction in biological films. *Environ. Sci. & Technol.*, 10, 8, 765-769.
- LE FAUCHEUR, S., SIGG, L., BEHRA, R. (2005) Phytochelatine als Metallindikatoren? *Eawag News: Biofilme*, 60d, 22-23.

- LEE, W., CHARACKLIS, W.G. (1993) Corrosion of mild steel under anaerobic biofilm. *corrosion*. 49, 3, 186-199.
- LEGE, T., KOLDITZ, O., ZIELKE, W. KASPER, H., HÄGER, F. (1996) Strömungs- und Transportmodellierung. In: Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Handbuch zur Erkundung des Untergrundes von Deponien und Altlasten, Band 2, Springer-Verlag Berlin.
- LEWANDOWSKI, Z., STOODLEY, P. und ALTOBELLI, S. (1995) Experimental and Conceptual Studies on Mass Transport in Biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 31, 1, 153-162.
- LUOMA, S.N., RAINBOW, P.S. (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Bio-dynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7, 1921-1931.
- MACKLIN, M.G., BREWER, P.A., BALTEANU, D., COULTHARD, T.J., DRIGA, B., HOWARD, A.J., ZAHARIA, S. (2003) The long term fate and environmental significance of contaminant metals released by the January and March 2000 mining tailings dam failures in Maramures Country, upper Tisza Basin, Romania. *Appl. Geochem.* 18 (2) 241-257.
- MAGES, M., BANDOW, N., KÜSTER, E., BRACK, W., von TÜMPLING jun. W. (2008) Zinc and cadmium accumulation in single zebrafish (*Danio rerio*) embryos – A total reflection X-ray fluorescence spectrometry application. *Spectrochim. Acta B* 63, 1443-1449.
- MAGES, M., ÓVÁRI, M., von TÜMPLING Jr., W., KRÖPFL, K. (2004a) Biofilms as bioindicator for waters? Total reflection X-ray fluorescence analysis of biofilms of the Tisza River (Hungary). *Anal. Bioanal. Chem.* 378 1095-1101.
- MAGES, M., von TÜMPLING jun., W., van der VEEN, A., BABOROWSKI, M. (2006) Element determination in natural biofilms of mine drainage water by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B* 61, 1146-1152.
- MAGES, M., WOELFL, S., ÓVÁRI, M., von TÜMPLING jun., W. (2003) The use of a portable total reflection X-ray fluorescence spectrometer for field investigation. *Spectrochim. Acta B* 58, 2129-2138.
- MAGES, M., WOELFL, S., ÓVÁRI, M., von TÜMPLING jun., W., ENCINA, F. (2004b) The use of a portable total reflection X-ray fluorescence spectrometer for trace element determination in freshwater microcrustaceans (*Daphnia*). *Spectrochim. Acta B* 59, 1265-1272.
- MAGES, M., WOELFL, S., von TÜMPLING jun., W. (2001) A method for trace element determination of single *Daphnia* specimens using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B* 56, 2209-2217.

- MANSER, R., SIEGRIST, H. (2005) Belebtschlamm – Biofilme als Flocken. Eawag News 60d, 28-30.
- MARQUARDT, H., SCHÄFER, S.G. (Hrsg.) (1997) Lehrbuch der Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- MEIER, K. (1998) Geheimnisse des Antonie van Leeuwenhoek: ein Beitrag zur Frühgeschichte der Mikroskopie. Pabst Science Publisher.
- MEYLAN, S., BEHRA, R., SIGG, L. (2003) Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. *Enviro. Sci. Techn.* 37, 5204-5212.
- MEYLAN, S., BEHRA, R., SIGG, L. (2004) Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: a microcosm study. *Enviro. Sci. Techn.* 38, 3104-3111.
- MEYLAN, S., SIGG, L., BEHRA, R. (2005) Metallakkumulation in Algenbiofilmen. Eawag News: Biofilme, 60d, 19-21.
- MOLLOY, J.L., SIEBER, J.R. (2008) Classification of microheterogeneity in solid samples using  $\mu$ XRF. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 995-1001.
- MORSCHES, B., TÖLG, G. (1970) Beiträge zur Bestimmung von Spurenelementen in biologischem Material bei begrenzter Einwaage. *Anal. Chem.* 250, 81-99.
- MUYSSSEN, B.T.A., JANSSEN, C.R. (2002) Accumulation and regulation of zinc in *Daphnia magna*: Links with homeostasis and toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 4,
- MÜLLER, G. (1979) Schwermetalle in den Sedimenten des Rheins, Veränderungen seit 1971, *Umschau* 79, 778-783.
- NELSON, Y.M., LION L., SHULER, M., GHIORSE, W.C. (1996) Modeling oligotrophic biofilm formation and lead adsorption to biofilm components. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2027-2035.
- OHNESORGE, F.K., WILHELM, M. (1991) Zinc. In: MERIAN E. (ed) Metals and their compounds in the environment. VCH, Weinheim.
- OTT, J. (1996) Meereskunde, 2. Auflage, UTB Stuttgart.
- ÓVÁRI, M., MAGES, M., von TÜMPLING jun., W., KRÖPFL, K., ZÁRAY, G. (2004a) Total reflection X-ray fluorescence spectrometric determination of element inlets from mining activities at the upper Tisza catchment area, Hungary. *Spectrochim. Acta B* 59, 1173-1181.

- ÓVÁRI, M., MAGES, M., WOELFL, S., von TÜMPLING jun., W., KRÖPFL, K. (2004b) Investigation of the bioavailability of metals bound on sediments for periphyton communities (biofilms) in freshwater. In: CSER, M.A., SZIKLAI, I.S., ETIENNE, J.-C., MAYMARD, Y., CENTENO, J., KHASSANOVA, L., COLLERY, Ph. (Eds.), *Metals Ions in Biology and Medicine*, John Libbey Eurotext, Paris, Vol. 8. 311-314.
- PETERS, R.H. (1987) Daphnia culture. In: PETERS, R. H., DE BERNARDI, R., (Eds.) *DAPHNIA. MEM.-IST.-ITAL.-IDROBIOL.* Vol. 45, 483-495.
- PETTERSON, R.P. (1998) A method for trace element determination of marine periphyton communities on discs of float glass (without sample preparation) using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 53, 101-115.
- PRANGE, A., KRAMER, K., REUS, U. (1991) Determination of trace elements impurities in ultrapure reagents by total reflection X-ray spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 46, 1385-1393.
- PRESS, F. und SIEVER, R. (1995) *Allgemeine Geologie, Einführung in das System Erde.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, S. 36.
- PROSI, F. und MÜLLER, G. (1987) Bioverfügbarkeit und Aufnahme von Schwermetallen aus definierten limnischen Sedimenten in sedimentfressenden Organismen einer benthischen Nahrungskette. In: LILLELUND, K., DE HAAR, U., ELSTER, H.-J., KARBE, L., SCHWOERBEL, I., SIMONIS, W. (Eds.), *Bioakkumulation in Nahrungsketten*, Forschungsbericht der DFG, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 258-265.
- QUEVAUVILLER, P., VERCOUTERE, K., MUNTAU, H., GRIEPINK, B (1993b) The Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels-Luxembourg, EUR 14558 EN.
- QUEVAUVILLER, P., VERCOUTERE, K., MUNTAU, H., GRIEPINK, B. (1993a) Certified reference material (CRM 414) for the quality control of trace element analysis in plankton. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 345 (1993) 12-17.
- RAINBOW, P.S. (1993) The significance of trace metal concentration in marine invertebrates. In: DALLINGER & RAINBOW (Eds.), *Ecotoxicology of metals in invertebrates.* Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 4-23.
- RAINBOW, P.S., PHILLIPS, D.J.H. DEPLEDGE, M.H. (1990) The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates, a need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Pollut. Bull.*, 21, 321-324.

- RAPTIS, S.E., KNAPP, G., SCHALK, A.P. (1983) Novel method for the decomposition of organic and biological materials in an oxygen plasma excited at high frequency for elemental analysis. *Anal. Chem.* 316, 482-487.
- REICHERT, P. (1998): *Aquasim 2.0 – User Manual*. Eawag, Dübendorf.
- REUS, U. (1991) Determination of trace elements in oils and greases with total reflection X-ray fluorescence: sample preparation methods. *Spectrochim. Acta B*, 46, 10, 1403-1411.
- REUS, U., MARKERT, B., HOFFMEISTER, C., SPOTT, D., GUHR, H. (1993) Determination of trace metals in river water and suspended solids by TXRF spectrometry. A methodical study on analytical performance and sample homogeneity. *Fres. Anal. Chem.* 347, 430-435.
- RUHNKE, G. (1997) Grundlegende Anforderungen für eine richtige Elementspurenanalytik. In: MATTER, L. (Ed.), *Elementspurenanalytik in biologischen Matrices*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- RIEDER, R., WOBRAUSCHEK, P., LADISICH, W., STRELI, C., AINGINGER, H., GARBE, S., GAUL, G., KNÖCHEL, A., LECHTENBERG, F. (1995) *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res.*, A355, 648-653.
- SALYI, G., CSABA, G., DARIN, E.G., OROSZ, E., LANG, M., MAJOROS, G., KUNSAGI, Z., NIKLESZ, C., (2000) Effect of the cyanide and heavy metal pollution passed in river Szamos and Tisza on the aquatic flora and fauna with special regard to the fish. *Magyar Allatorvosok Lapja* 122, 8, 493-500.
- SANZ-MEDEL, A. (1998) Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochim. Acta Part B*, 53, 197-211.
- SCHNEIDER, P., NEITZEL, P.L., SCHAFFRATH, M., SCHLUMPRECHT, H. (2003) Leitbildorientierte physikalisch-chemische Gewässerbewertung - Referenzbedingungen und Qualitätsziele. Forschungsbericht 20024226 UBA-FB 00322, Umweltbundesamt.
- SCHMELING, M., KLOCKOW, M.D. (1997) Sample collection and preparation for analysis of airborne particulate matter by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 346, 121-126.
- SCHMINKE, H. K. (2004) Crustacea, Krebse. in: WESTHEIDE & RIEGER (Hrsg.), *Spezielle Zoologie. Teil 1. Einzeller und wirbellose Tiere*. Gustav Fischer, Jena.
- SCHRECK, P., FREYER, K. (2008) Zur Verbreitung von Metallen aus Bergbaurückständen auf dem Wasserpfad: Elementspezifische Transportmechanismen und Bilanzie-

- ung der Metallfrachten im Mansfelder Land (TRANSMET) <http://geo.uni-leipzig.de> (Zugriff: 22.8.2011).
- SCHRECK, P., SCHUBERT, M., FREYER, K., TREUTLER, H.C., WEISS, H. (2005) Multi metal contaminated stream sediment in the Mansfeld mining district: metal provenance and source detection. *Geochem. Explor. Environ. Anal.* 5, 1-7.
- SCHRECK, P., WENNRICH, R., STÄRK, H.J., SCHUBERT, M., WEISS, H. (2004) Mansfeld - the contribution of a mining-affected catchment area to regional riverine pollution. *UFZ-Bericht 18/2004*, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ GmbH, Leipzig, 169-170.
- SCHRÖDER, B. (2005) Telepolis Internet, <http://www.heise.de/tp/artikel/20/20302/1.html> (Zugriff: 18.5.2007).
- SCHUBERT, M., MORGENSTERN, P., WENNRICH, R., FREYER, K., WEISS, H. (2003) The weathering behavior of heavy metals in ore processing residues (Mansfeld Region, Germany). *Mine Water Environ.* 22, 2-6.
- SCHUBERT, M., WENNRICH, R., WEISS, H., SCHRECK, P., ZELLER, T., OTTO H.H. (2005) Formation of heavy metal bearing phases at a spring affected by the weathering of ore processing residues. *Eur. Journal Mineral.* 17, 119-128.
- SOLDAN, P., PAVONIC, M., BOUCEK, J., KOKES, J., (2001) Baia Mare accident-brief ecotoxicological report of Czech experts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 3, 255-261.
- Standard methods for the examination of water and wastewater. (1995) 8711-Daphnia. 19th edition APHA, The Library of Congress.
- STOODLEY, P., BOYLE, J.D. and LAPPIN-SCOTT, H.M., (2000) Influence of flow on the structure of bacterial biofilms. In: BELL, C.R., BRYLINSKY, M., JOHNSON-GREEN, P. (Eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th Intl. Symp. on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 263-269
- STOODLEY, P., DODDS, I., BOYLE, J.D., LAPPIN-SCOTT H.M. (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 19-28.
- STREIT, B. (1994) *Lexikon der Ökotoxikologie*. VCH Weinheim, 2.Auflage, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- STRELI, C., PEPPONI, G., WOBRAUSCHEK, P., JOKUBONIS, C., FALKENBERG, G., ZARAY, G., BROKAERT, J., FITTSCHEN, U., PESCHEL, B. (2006) Recent results of synchrotron radiation induced total reflection X-ray fluorescence analysis at HASYLAB, beamLine L. *Spectrochim. Acta B*, 61, 1129-1134.

- SZABO, S., POSTA, J., GOSZTONYI, G., MESZAROS, I., PROKISCH, J. (2008) Heavy metal content of flood sediments and plants near the River Tisza. *AGD Landsc. Environ.* 2, 2, 120-131.
- SZOBOSZLAI, N., POLGÀRI, Z., MIHUCZ, V.G., ZÀRAY, G. (2009) Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications – a review. *Anal. Chem. Acta* 633, 1-18.
- THEISEN, M., NIESNER, R. (1999) Elemental analysis of airborne dust samples with TXRF: comparison of oxygen-plasma ashing on sapphire carriers and acid digestion for sample preparation. *Anal. Chem.* 365, 332-337.
- TISZA RIVER PROJECT (2003) Real-life scale integrated catchment models for supporting water- and environmental management decisions. Final Report of Workpackage 3. EU Contract No. EVK1-CT-2001-00099.
- TÖLG, G. (1972) Extreme trace analysis of the elements – Methods and problems of sample treatment, separation and enrichment. *Talanta*, 19, 1489-1521.
- UBA-Texte (2006 und 2007) [www.umweltbundesamt.de/wasser/index.htm](http://www.umweltbundesamt.de/wasser/index.htm). (Zugriff: 27.5.2009)
- UHLMANN, D, HORN, W. (2001) *Hydrobiologie der Binnengewässer*. Verlag Eugen Ulmer; Stuttgart.
- VEEN van der, A., BABOROWSKI, M., KRAFT, C., KRAFT, J., MAGES, M., ÓVARI, M., von TÜMPLING, W. (2007) Dynamics of heavy metals and arsenic - Hungarian Tisza river sediments after mining spills in the catchment area In: WESTRICH, B., FÖRSTNER, U. (Hrsg.) *Sediment dynamics and pollutant mobility in rivers. An interdisciplinary approach*. Environmental sciences, Springer, Berlin, S. 335 – 342.
- VEENA, B., RADHAKRISHNAN, C. K., CHACKO, J. (1997) Heavy metal induced biochemical effects in an estuarine teleost. *Indian. Journal Marine Sci.* 26, 74-77.
- VEREIN MANSFELDER BERG- UND HÜTTENLEUTE E.V. (Hrsg.) (2013) Mansfelder Kupferspuren, <http://kupferspuren.artwork.de> (Zugriff: 01.04.2013)
- VOLESKY, B. (1990) Biosorption of fungal biomass. In: VOLESKY, B. (Ed.); *Biosorption of heavy metal*. CRC press, Boca Raton, Florida.
- WAHNBACHTALSPERRENVERBAND (2010) Siegelsknippen, 53721 Siegburg <http://www.wahnbach.de/Zooplankton.175.0.html> (Zugriff: 25.5.2011).
- WAGNER, A., MAGES, M. (2010) Total-Reflection X-ray fluorescence analysis of elements in size-fractionated particulate matter sampled on polycarbonate filters —

- Composition and sources of aerosol particles in Göteborg, Sweden. *Spectrochim. Acta Part B* 65 471–477.
- WANNER, O. (2002) Modeling of biofilms. In: BITTON, G. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, 2083-2094.
- WANNER, O. (2005) Biofilmmodelle: Werkzeuge für die Forschung. *Eawag News: Biofilme*, 60d, 8-10.
- WANNER, O., BAUCHROWITZ, M. (2005) Biofilme sind allgegenwärtig. *Eawag News: Biofilme*, 60d, 4-7.
- WATERS, C.M., BASSLER, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 319-346.
- WELZ, B., SPERLING, M. (1996) *Atomabsorptionsspektrometrie*. 4. Auflage. VCH Weinheim.
- WESTRICH, B. (1985) Hydromechanische Einflussfaktoren auf das Transportverhalten kontaminierter Schwebstoffe in Flüssen. *Mitteilungen des Deutschen Verbandes für Wasserwirtschaft und Kulturbau*, Heft 9, Bonn.
- WESTRICH, B., HAAG, F., KERN, U. (2000) Mobilität von Schadstoffen in den Sedimenten staugeregelter Flüsse - Dynamik und Bilanzierung von Schwebstoffen und Schwermetallen in einer Stauhaltungskette. Abschlussbericht PW 96.182, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft.
- WHITE, R.T., LAWRENCE, C.W. (1995) Low-temperature decomposition of botanical and biological samples for multielement analysis by high-frequency induced oxygen-argon-fluorine plasma. *J AOAC int.* 78, 1, 99-109.
- WILLIAMSON, K., McCARTY (1976) A model of substrate utilization by bacterial films. *J. Water Pollution Control Federation* 48, 1, 9-24.
- WOBRAUSCHEK, P. (2007) Total reflection X-ray fluorescence analysis—a review. *X-Ray Spectrom.* 36, 289–300.
- WOBRAUSCHEK, P., AIGINGER, H. (1975) Total-reflection X-ray fluorescence spectrometric determination of elements in nanogram amounts. *Anal. Chem.* 47, 852-855.
- WOELFL, S. (1995) Untersuchungen zur Zooplanktonstruktur einschließlich der mikrobiellen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der mixotrophen Ciliaten in zwei südchilenischen Andenflusseseen. Dissertation, Universität Konstanz, Fakultät für Biologie.

- WOELFL, S., MAGES, M., ENCINA, F. (2003) Cold plasma ashing improves the trace element detection of single *Daphnia* specimens by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 58 2157-2168.
- WOELFL, S., MAGES, M., MERCADO, S. (2004a) Determination of trace elements in planktonic microcrustaceans using total reflection X-ray fluorescence (TXRF): First results from two Chilean lakes. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 1088-1094.
- WOELFL, S., MAGES, M., ÓVARI, M., GELLER, W. (2004b) Determination of heavy metals in macrozoobenthos (chironomid larvae) from the river Tisza by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. CSER, M.A., SZIKLAI, I.S., ETIENNE, J.-C., MAYMARD, Y., CENTENO, J., KHASSANOVA, L., COLLERY, Ph. (Eds.), *Metals Ions in Biology and Medicine*, Vol. 8., John Libbey Eurotext, Paris, 330-333.
- WOELFL, S., MAGES, M., ÓVARI, M., GELLER, W. (2006b) Determination of heavy metals in macrozoobenthos from the rivers Tisza and Szamos by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B* 61, 1153-1157.
- YONEDA, Y., HORIUCHI, T. (1971): Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis. *Rev. Sci. Instrum.* 42, 1069.
- ZÄNKER, H., MOLL, H., RICHTER, W., BRENDLER, V., HENNIG, C., REICH, T., KLUGE, A., HÜTTIG, G. (2002) The colloid chemistry of acid rock drainage solution from an abandoned Zn-Pb-Ag mine. *Appl. Geochem.* 17 (5) 633-648.
- ZÄNKER, H., RICHTER, W., BRENDLER, V., NITSCHKE, H. (2000) Colloid-borne uranium and other heavy metals in the water of a mine drainage gallery. *Radiochim. Acta* 88, 619-624.
- ZAR, J. (1984) *Biostatistical Analysis*, 2nd ed., Prentice-Hall International Editions Englewood cliffs, N.J.
- ZAUKE, G.-P., PETRI, G., RITTERHOFF, J., MEURS, H.-G. (1996) Theoretical background for the assessment of the quality status of ecosystems: lessons from studies of heavy metals in aquatic invertebrates, *Senckenbergiana marit.* 27, 207-214.
- ZAUKE, G.-P., RITTERHOFF, J., CLASON, B. (2001) Schwermetalle in aquatischen Evertibraten: Bioakkumulation – Metabolismus – evaluative Modelle. In: STEINBERG, BRÜGGEMANN, KÜMMERER, LIESS, PFLUGMACHER, ZAUKE (Hrsg.), *Stress in limnischen Ökosystemen. Neue Ansätze in der ökotoxikologischen Bewertung von Binnengewässern*. Parey Buchverlag Berlin, 146-159.
- ZAUKE, G.-P., von LEMM, R., MEURS, H.-G., BUTTE, W. (1995) Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in

- 
- semicontrolled toxicokinetic flow-through experiments. *Environ. Pollut.* 90, 209-219.
- ZERLING, L., MÜLLER, A., JENDRYSCHIK, K., HANISCH, C., ARNOLD, A. (2001) Der Bitterfelder Muldestausee als Schadstoffsенke. Entwicklung der Schwermetallbelastung von 1992 bis 1997. Abhandlung d. Sächs. Akad. d. Wiss. zu Leipzig, Math.-Nat. Kl. 59, 4, 69.
- ZIMMERMANN, S. (1997) Laborversuche zum Adsorptionsverhalten Zink, Kupfer und Arsen an Biofilmen der Elbe. Diplomarbeit, FH Magdeburg, Fachbereich Wasserwirtschaft.
- ZOBELL, C. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46, 39-56.

## **EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere, dass ich die eingereichte Dissertation „Elementbestimmungen in aquatischen Biofilmen und Zooplankton mittels Total Reflektierender Röntgenfluoreszenz Analytik (TXRF)“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe.

Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Margarete Mages

Magdeburg, 05.09.2013