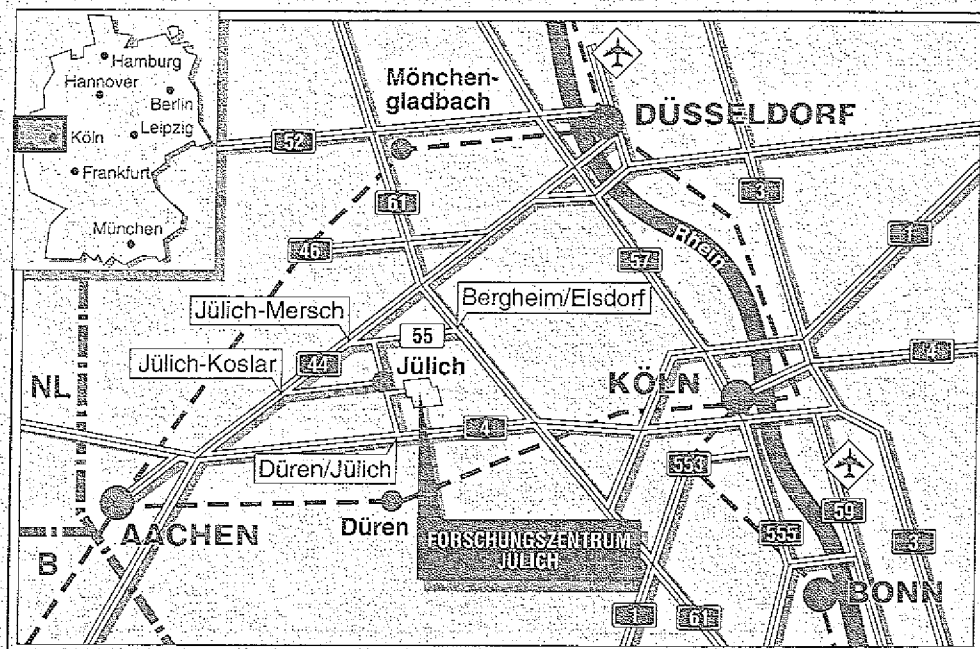


*Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre 4:
Erdöl und Organische Geochemie*

**Molekulare Vorgänge bei mikrobiellem
Abbau von Erdölen und Erdölprodukten
in der Lagerstätte und in Labor-
experimenten**

Sylvia Sabine Schalenbach



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2832

ISSN 0944-2952

Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre 4:

Erdöl und Organische Geochemie Jül-2832

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 024 61 / 61 - 61 02 · Telefax: 024 61 / 61 - 61 03 · Telex: 833 556-70 kfa d

Molekulare Vorgänge bei mikrobiellem Abbau von Erdölen und Erdölprodukten in der Lagerstätte und in Labor- experimenten

Sylvia Sabine Schalenbach

महाराष्ट्र

महाराष्ट्र

महाराष्ट्र

Molekulare Vorgänge bei mikrobiellem Abbau von Erdölen und Erdölprodukten in der Lagerstätte und in Laborexperimenten

EINLEITUNG, PROBLEMSTELLUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1	Einleitung	1
2	Problemstellung	4
3	Literaturübersicht	6
3.1	Biodegradation in der Lagerstätte	6
3.2	Mikrobiologische Aspekte der Biodegradation	20
3.3	Kohlenwasserstoffe in Böden infolge anthropogenen Eintrags	27

DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION EIGENER EXPERIMENTELLER UNTERSUCHUNGEN

4	Mikrobieller Abbau von Reinsubstanzen in Batch-Kultur	38
4.1	<i>n</i> -Heptadecan (<i>n</i> -C ₁₇)	40
4.1.1	Versuchsbedingungen	40
4.1.2	Probenaufbereitung	41
4.1.3	Bedingungen für die instrumentelle Analytik	42
4.1.4	Ergebnisse	44
4.2	<i>n</i> -Heneicosan (<i>n</i> -C ₂₁)	59
4.2.1	Versuchsbedingungen	59
4.2.2	Ergebnisse	59
4.3	2,6,10,14-Tetramethylhexadecan (Phytan)	66
4.3.1	Versuchsbedingungen	66
4.3.2	Ergebnisse	67
4.4	Diskussion der Ergebnisse der Batch-Kulturen zum mikrobiellen Abbau von Reinsubstanzen	82
5	Mikrobieller Abbau von Dieselöl	89
5.1	Batch-Kultur	92
5.1.1	Versuchsbedingungen	92

5.1.2	Probenaufbereitung und Durchführung der Analysen	92
5.1.3	Ergebnisse	92
5.2	Kontinuierliche Kultur	100
5.2.1	Versuchsbedingungen	100
5.2.2	Probenaufbereitung	102
5.2.3	Bedingungen für die instrumentelle Analytik	102
5.2.4	Ergebnisse	104
5.3	Diskussion der Ergebnisse der Abbauprobversuche mit Dieselöl	120

6	Mikrobieller Abbau von Rohölen in der Lagerstätte	127
6.1	Probenaufbereitung	128
6.2	Bedingungen für die instrumentelle Analytik	130
6.3	Ergebnisse	133
6.3.1	Nigeria	133
6.3.2	Kongo	142
6.3.3	Powder River-Becken (Montana)	150
6.3.4	Santa Maria-Becken (Kalifornien)	166
6.3.5	Viking-Graben (Nordsee)	177
6.3.6	Broistedt-Gifhorner Trog (Norddeutschland)	186
6.4	Diskussion der Ergebnisse zum mikrobiellen Abbau von Rohölen in der Lagerstätte	196

ZUSAMMENFASSUNG

202

LITERATURVERZEICHNIS

211

EINLEITUNG, PROBLEMSTELLUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1 Einleitung

Erdöl entsteht aus dem organischen Material abgestorbener Organismen, insbesondere des Zoo- und Phytoplanktons und der Bakterien, sowie der Biomasse höherer Landpflanzen, die, feinverteilt in aquatischem Milieu abgelagert, durch Sauerstoffmangel dem natürlichen Zersetzungsprozeß entzogen werden. Während Sedimentation und früher Diagenese werden aus diesen organischen Bestandteilen unter Mitwirkung von Mikroorganismen durch im einzelnen noch nicht aufgeklärte Prozesse sogenannte "Geopolymere" gebildet (Tissot & Welte 1984, Tegelaar et al. 1989). Durch Kondensations- und Additionsreaktionen bildet sich daraus gegen Ende der Diagenese ein makromolekularer, strukturell wenig definierter Komplex, das Kerogen. Im Zuge fortschreitender Beckenentwicklung kommt es bei anhaltender Sedimentation zu allmählicher Versenkung der Schichtpakete in größere Tiefen, die mit einer langsamen Zunahme des Druckes und der Temperatur verbunden ist. Dabei verändert sich das organische Material innerhalb geologischer Zeiträume von einigen Millionen Jahren, es reift und setzt im Stadium der Katagenese bei Temperaturen von mehr als 50 °C Kohlenwasserstoffe frei. Diese thermokatalytisch gesteuerte Kohlenwasserstoffbildung wird durch den Wasserstoffgehalt des Kerogens limitiert, das schließlich als hochkondensiertes, kohlenstoffreiches Residuum zurückbleibt. Ein Teil der Kohlenwasserstoffe migriert aus den Erdölmuttergesteinen, in denen sie generiert wurden, meist Tonschiefern oder Kalken, in poröse, zum Hangenden mit relativ undurchlässigen Schichten abgedichtete Speichergesteine, häufig Sandsteine, und akkumuliert sich dort zu einem Erdölreservoir (Tissot & Welte 1984).

Mit der Bildung von Erdöllagerstätten sind die biogeochemischen Prozesse jedoch nicht abgeschlossen. Durch die metabolische Aktivität von Mikroorganismen, die durch meteorische Wässer in eine Lagerstätte eingeschleppt wurden, kann es zu einer Biodegradation der thermogenen Kohlenwasserstoffe kommen. Da das durch den Umbau biogener Strukturen entstandene Erdöl infolgedessen durch biochemische Reaktionen auch wieder abgebaut werden kann, schließen sich Degradation und de novo-Synthesen zu einem Kreislauf.

Biodegradation findet nicht nur in der Lagerstätte statt, sondern auch dort, wo Erdöl unmittelbar an der Erdoberfläche austritt, wie heutzutage besonders auffällig z.B. an der kalifornischen Küste und im Golf von Mexiko, oder bei Mineralölschadensfällen, wenn Kohlenwasserstoffe in die Umwelt gelangt sind, sei es nun ins Wasser oder ins Erdreich.

Mikrobielle Aktivität in der Lagerstätte ist aufgrund der dadurch verursachten Veränderung chemischer und physikalischer Eigenschaften des Erdöls ein unerwünschter Prozeß, der immer mit einer Qualitätsminderung einhergeht. In extremen Fällen geht der Abbau sogar so weit, daß eine Förderung dieser Erdöle dann aus ökonomischer Sicht völlig unrentabel bzw. technisch unmöglich wird. Als Beispiele für besonders starke Biodegradation gelten unter anderem die Athabasca-Teersande in Alberta (Kanada) (Rubinstein et al. 1977) und die Orinoco-Schweröl in Venezuela. Um eine Vorstellung von den Dimensionen dieser Biodegradationsprozesse zu geben, hier einige Zahlen: Nach Demaison (1977) betragen die Vorräte an Teer und Schweröl in Alberta etwa 625 Milliarden Barrel, in Venezuela, mit einer der größten Lagerstätten der Welt für extra schweres Öl, sogar 1050 Milliarden Barrel. Damit übersteigt schon die Größe dieser beiden Vorkommen allein die gesamten Ölreserven des Mittleren Osten beträchtlich.

Biodegradation in der Lagerstätte ist ein überaus komplexer Vorgang, der von einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter beeinflusst wird und daher bislang nur unzureichend geklärt werden konnte. Da etwa 10 % der weltweit nachgewiesenen Erdölreserven bakteriell zerstört und weitere 10 % bereits alteriert sind (Hunt 1979), erscheint es notwendig, mehr Informationen über diese Abbauvorgänge und ihre Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Erdöle zu gewinnen.

Ein anderer Aspekt ist die Wechselwirkung zwischen Erdölkohlenwasserstoffen und der Umwelt des Menschen. Im Zuge der Industrialisierung wurden das Erdöl und seine Produkte lange Zeit vorwiegend als Energielieferanten geschätzt und genutzt. Seine Bedeutung als wertvolle Rohstoffquelle hingegen erschloß sich erst in den letzten Jahrzehnten. Die Palette der zahllosen Produkte, die heute aus Erdölkohlenwasserstoffen hergestellt werden, reicht von Farben und Lacken über Düngemittel und Kunststoffe bis zu Waschmitteln und vielem mehr. Aus diesem Grund wird der Bedarf an Erdöl, auch bei allmählich zurückgehendem Anteil an der Energieversorgung, vermutlich auch in Zukunft recht hoch sein oder gar ansteigen.

Das Erdöl birgt ein großes Gefahrenpotential für die Umwelt, da nicht nur während der Exploration und des Überseetransports mit ständig an Größe zunehmenden Tankern, sondern auch bei der Verarbeitung, der Lagerung und dem Umschlag jederzeit eine Kontamination von Boden, Grundwasser und Meerwasser möglich ist. Wer erinnert sich nicht an die zahlreichen Tankerhavarien und die durch sie ausgelösten Umweltkatastrophen? Die Menge der durch den Menschen in die Umwelt eingebrachten Kohlenwasserstoffe ist beträchtlich und ihre Beseitigung bzw. eine Begrenzung der durch sie verursachten Schäden in Zeiten wachsenden Umweltbewußtseins daher augenblicklich eine vor-

rangige Aufgabe. Aus diesem Grund wird versucht, sich die Fähigkeit von Mikroorganismen zum Abbau von Kohlenwasserstoffen zunutze zu machen und gezielt Methoden zur biologischen Sanierung zu entwickeln.

2 Problemstellung

Die biogen gesteuerten Abbauvorgänge von Kohlenwasserstoffen sind sowohl im Bereich von Erdölexploration und -produktion als auch im Hinblick auf die Beurteilung und Beseitigung von Umweltschadensfällen von besonderer Relevanz.

Biodegradation in der Lagerstätte läßt sich daran erkennen, daß die Öle keine *n*-Alkane mehr besitzen, da diese Substanzklasse aufgrund der einfachen Struktur ihrer Verbindungen von den Mikroorganismen als erstes abgebaut wird.

Bei der Erdölexploration gibt es zwei vorrangige Probleme, die im Zusammenhang mit diesen mikrobiellen Abbauvorgängen auftreten. Zum einen ist es nicht ganz leicht, ein Erdöl in der Lagerstätte als biodegradiert anzusprechen, wenn in früher Phase Biodegradation stattgefunden hat und später, in einer zweiten Migrationsphase, dann völlig unbiodegradiertes Öl eingewandert ist, das mit vollständiger *n*-Alkan-Verteilung den typischen "fingerprint" der Biodegradation überdeckt. In diesem Fall gestattet jedoch die Analyse der Biomarker - Verbindungen biogenen Ursprungs, die ihre charakteristische Molekülstruktur vom lebenden Organismus bis hin zur Kohlenwasserstoffgenese so wenig verändert haben, daß eine Korrelation mit biogenen Vorläufern noch möglich ist - eine weitgehende Rekonstruktion der geologischen Abläufe. Hierfür eignen sich insbesondere die Sterane und pentacyclischen Triterpane, da sie erst in einem relativ späten Stadium der Biodegradation angegriffen werden. Auch die Unterscheidung zwischen beginnender Biodegradation und früher Genese bei Erdölen aus tonmineralarmen Sedimenten wie Karbonaten, Evaporiten und Phosphoriten ist derzeit nur mit Hilfe dieser Biomarker möglich, da beide Prozesse zu Erdölen mit Kohlenwasserstoff-Verteilungsmustern im Gaschromatogramm führen können, bei denen die *n*-Alkane (z.B. gegenüber Pristan und Phytan) nicht so deutlich dominieren, wie es bei reifen, unbiodegradierten Ölen aus klastischen Muttergesteinen mit hohem Anteil an Tonmineralen der Fall ist.

Im Umweltbereich sind Biodegradationsstudien nicht nur zur Abschätzung des Gefährdungspotentials nach Mineralölschadensfällen, sondern auch zur Beurteilung des Sanierungserfolges von Bedeutung. Dieser wurde bislang häufig nur pauschal mit der Angabe eines IR-spektrometrisch bestimmten Restgehaltes an Kohlenwasserstoffen oder der Abnahme des Gehaltes an *n*-Alkanen im Gaschromatogramm belegt. In beiden Fällen werden jedoch die Anteile der verschiedenen polaren Substanzklassen mit funktionellen Gruppen nicht berücksichtigt. Die Kenntnisse über die während des Abbaus stattfindenden Prozesse sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch recht dürftig. Daher ist die Bestimmung eines Restgehaltes an Kohlenwasserstoffen fragwürdig, wenn nicht gleichzeitig

bekannt ist, welche Stoffwechselprodukte im Zuge der Degradation gebildet worden sind. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die Metaboliten toxischer sind als die abzubauen Substanz. So ist beispielsweise bekannt, daß die Toxizität der während des Aromatenabbaus auftretenden Epoxide wesentlich größer ist als die der zugehörigen Aromaten (Schäfer-Ridder 1979). Weitere wichtige Aspekte für die Beurteilung des Gefährdungsrisikos bzw. der Sanierungsmöglichkeiten und des Sanierungserfolgs bei Mineralölschadensfällen sind die Verfügbarkeit und das Remobilisierungsverhalten von Metaboliten.

Aufgrund dieser Fragestellungen sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Stoffe im Zuge der Biodegradation neu entstehen. Da der Abbau im wesentlichen unter aeroben Bedingungen erfolgt, war dazu die Betrachtung von teilweise oxidierten Verbindungen vorgesehen und unter diesen zunächst die der Carbon-säuren und Alkohole.

Der Bedeutung des mikrobiellen Abbaus von Kohlenwasserstoffen für die Erdölexploration und -produktion einerseits und den Bereich der biologischen Sanierung von Schadensfällen andererseits Rechnung tragend, ergibt sich eine inhaltliche Gliederung in zwei miteinander verbundene Themenbereiche. Durch Vergleiche mehrerer Serien von Erdölen aus verschiedenen Erdölprovinzen, die jeweils aus demselben Muttergestein stammen, jedoch unterschiedlich stark biodegradiert sind, sollte die Variantenvielfalt "natürlicher" Stoffwechselprodukte mikrobiellen Abbaus in Lagerstätten aufgezeigt werden. Parallel dazu wurden Abbauprobversuche mit Mikroorganismen durchgeführt, die aus erdölverseuchtem Erdreich isoliert wurden und die Fähigkeit zum Kohlenwasserstoffabbau besitzen. Als Substrat für die sowohl in Batch-Kultur als auch in kontinuierlicher Kultur angesetzten Experimente wurde Dieselöl als raffiniertes, einfaches Kohlenwasserstoffgemisch eingesetzt. Batch-Versuche wurden außerdem mit definierten Kohlenwasserstoffen als Reinsubstanzen durchgeführt. Die Versuche waren so konzipiert, daß durch Variation der Versuchsdauer unterschiedliche Abbaustufen für Korrelationszwecke mit dem natürlich degradierten Material zur Verfügung standen.

Ziel war es einerseits, positive Indikatoren für einen beginnenden bakteriellen Abbau von Lagerstättenölen zu finden, wo dies mit anderen Parametern nicht eindeutig möglich ist. Zum anderen wurde versucht, Grundlagen zum Verständnis der molekularen Vorgänge beim bakteriellen Kohlenwasserstoffabbau und damit möglicherweise für die Gewinnung verbesserter Kriterien zur Beurteilung des Erfolgs biologischer Sanierungsverfahren für mineralölverseuchtes Erdreich zu erarbeiten.

3 Literaturübersicht

3.1 Biodegradation in der Lagerstätte

Öl/Öl- und Öl/Muttergesteinskorrelationen sind wichtiger Bestandteil der Bewertung von Erdöllagerstätten. Sie erlauben Aussagen über die genetische Verwandtschaft von Ölen in verschiedenen stratigraphischen Niveaus innerhalb eines Sedimentbeckens, geben Hinweise auf die Zuordnung eines Erdöls zu einem oder in vielen Fällen auch zu mehreren Erdölmuttergesteinen, wenn ein Erdöl beispielsweise ganz offensichtlich ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen aus unterschiedlichen Muttergesteinsschichten darstellt, und sind daher für die Erdölexploration von großem Wert. Diese Korrelationen wurden zunächst auf der Grundlage von Pauschalparametern wie API gravity, Schwefelgehalt etc. durchgeführt, konnten dann mittels GC/MS-Analytik von Biomarkern seit dem Ende der 70er Jahre stetig verfeinert und verbessert werden. Schwierigkeiten ergeben sich häufig dadurch, daß die Öle nach ihrer Akkumulation in Reservoirs durch mikrobiellen Abbau von Kohlenwasserstoffen mehr oder weniger starke Veränderungen erfahren haben, die eine Korrelation mit undegradierten Ölen desselben Muttergesteins erheblich erschweren. Die Biomarker, vor allem Sterane und pentacyclische Triterpane, erweisen sich jedoch auch unter diesen Bedingungen als relativ stabil und werden daher in Fällen starker Biodegradation, in denen die einfacheren Moleküle wie *n*-Alkane und Isoprenoide bereits völlig zerstört sind, als Korrelationsparameter herangezogen.

Die mikrobielle Aktivität in der Lagerstätte führt zu einer Änderung chemischer und physikalischer Eigenschaften des Erdöls (Abb. 3.1.1). Zu Beginn des Abbaus werden Gase und niedermolekulare Verbindungen mit bis zu 15 Kohlenstoffatomen entfernt, so daß Öle mit geringerer API gravity und höherer Viskosität zurückbleiben. Fortschreitende Biodegradation greift dann auch auf den höhermolekularen Bereich über, und durch Degradation von gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen kommt es zu einer relativen Anreicherung von Heterokomponenten und Asphaltenen. Gleichzeitig steigen die Gehalte an Schwefel, Stickstoff, Vanadium und Nickel. Infolge des Abbaus optisch nicht aktiver Verbindungen (z.B. *n*-Alkane) und der dadurch verursachten Anreicherung optisch aktiver Verbindungen (z.B. Sterane, Triterpane, Heterokomponenten) ist daneben auch eine Zunahme der optischen Aktivität zu verzeichnen. Bei den Kohlenstoffisotopen ergibt sich eine positive Verschiebung des $\delta^{13}\text{C}$ -Verhältnisses durch Anreicherung des schwereren ^{13}C -Isotops. All diese durch Biodegradation ausgelösten Reaktionen bewirken in ihrer Gesamtheit eine Änderung des Öl-Typs und haben infolgedessen erhebliche Konsequenzen für Qualität und Quantität der Erdölvorkommen, sind somit natürlich auch von ökonomischer Relevanz.

- 1 - GASES (C₁ - C₆) ✕
- 2 - GOR (GAS/OIL RATIO) ✕
- 3 - GASOLINE RANGE (C₆ - C₁₅) ✕
- 4 - API GRAVITY ✕
- 5 - VISCOSITY ✕
- 6 - CHANGES IN GROSS COMPOSITION OF C₁₅⁺ COMPOUNDS
 - alkanes ✕
 - aromatics ✕
 - NSO's compounds ✕
 - asphaltenes ✕
- 7 - SULPHUR CONTENT ✕
- 8 - NITROGEN CONTENT ✕
- 9 - V AND Ni ✕
- 10 - OPTICAL ACTIVITY ✕
 - alkanes ✕
- 11 - POUR POINT ✕
- 12 - $\delta^{13}\text{C}$
 - whole oil ✕
 - alkanes ✕
 - aromatics = or ✕
 - asphaltenes ✕
- 13 - CHANGES IN OIL TYPES

paraffinic oil	→	naphthenic oils
paraffinic or paraffinic-naphthenic oils	→	aromatic-naphthenic oils
paraffinic condensates	→	naphthenic condensates
condensates	→	light oils
aromatic - intermediate oils	→	aromatic-asphaltic oils

Abb. 3.1.1: Durch Biodegradation veränderte chemische und physikalische Parameter von Erdölen (Connan 1984).

Wegen der großen Bedeutung der Biodegradation sowohl für die Erdölexploration als auch für die Verarbeitung der Rohöle waren die Degradationseffekte Gegenstand zahlreicher Untersuchungen an natürlich gealterten Ölen, die durch Laborversuche zur in vitro-Degradation unter kontrollierten Bedingungen ergänzt wurden. Ergebnisse sind in den Arbeiten von Milner et al. (1977), Connan (1984) und Connan & Restle (1984) zusammenfassend dargestellt.

Danach ergeben sich im molekularen Bereich für die Alkane (Abb. 3.1.2) folgende Effekte:

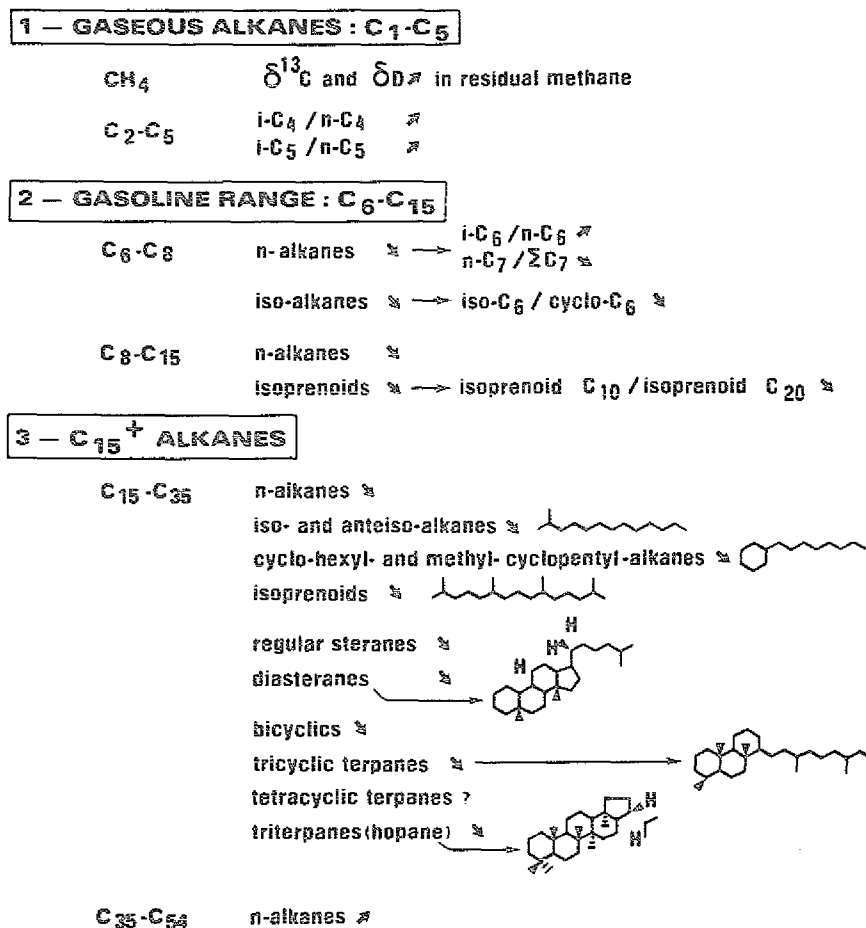


Abb. 3.1.2: Biodegradationseffekte an Alkanen (Connan 1984).

Die unterschiedliche Resistenz der verschiedenen Gruppen molekularer Strukturen gegenüber mikrobiellem Abbau zugrundelegend, stellte Connan (1984) eine Degradationsabfolge der Alkane auf (Abb. 3.1.3). Sie beginnt mit den am leichtesten abbaubaren Komponenten, den C₆-C₁₅ n-Alkanen, und endet mit den tricyclischen Terpanen als den durch Biodegradation am schwersten angreifbaren Alkanen. Unter Berücksichtigung der von Goodwin et al. (1983) bei der Untersuchung von Steranen und Triterpanen gewonnenen Erkenntnis, "that the rate of biodegradation of the different molecular types is not constant and can obviously depend on the prevailing environmental conditions", weist Connan ausdrücklich darauf hin, daß dieses Schema keine allgemeine Gültigkeit besitzt und eine Gruppe von Verbindungen nicht erst vollständig abgebaut werden muß, bevor der Abbau der nächstfolgenden beginnen kann.

C₆-C₁₅ N-ALKANES
C₆-C₁₅ ISOALKANES
C₆-C₁₅ CYCLOALKANES
ISOPRENOIDS

C₁₅-C₃₅ N-ALKANES
ISOALKANES
ANTEISOALKANES
CYCLOHEXYL-AND METHYLCYCLOPENTYLALKANES

C₁₅-C₂₁ ISOPRENOIDS

C₂₇-C₂₉ REGULAR STERANES (C₂₇ > C₂₈ > C₂₉)
C₃₀-C₃₅ HOPANE (C₃₅-C₃₄-C₃₃ > C₃₂-C₃₁-C₃₀ and 22 R > 22 S)
C₂₇ DIASTERANES (20 S > 20 R)

C₂₈-C₂₉ DIASTERANES (C₂₈ > C₂₉^{*})
C₂₇-C₂₉ HOPANE
C₂₁-C₂₂ STERANES (C₂₁ > C₂₂)

TRICYCLIC TERPANES

^{*}C₂₈ > C₂₉: C₂₈ is biodegraded at a faster rate than C₂₉

Abb. 3.1.3: Degradationsabfolge von Alkanen (Connan 1984).

Ergänzend seien nun einige neuere Forschungsergebnisse zur Biodegradation von Alkanen vorgestellt.

Teschner & Wehner (1985) haben Mikroorganismen aus einem biodegradierten Rohöl des Gifhorner Trogs in Niedersachsen isoliert und damit ein nicht biodegradiertes Öl aus demselben Ölfeld angeimpft, das auf diese Weise einer künstlichen Biodegradation unterworfen werden sollte. Bei den Experimenten mit Sauerstoffzufuhr erfolgte ein sehr schneller Abbau von *n*-Alkanen im Bereich *n*-C₁₅ - *n*-C₃₅. Der größte Teil verschwand schon innerhalb von 3 Tagen, wobei alle Verbindungen ohne jegliche Bevorzugung gleich schnell abgebaut wurden. Nach einer Woche begann der Abbau von Isoprenoiden (Pristan und Phytan), und nach 12 Tagen waren überhaupt keine *n*-Alkane mehr nachzuweisen. In den nicht belüfteten Experimenten dagegen war die Aktivität der Mikroorganismen deutlich schwächer, und es fand ein bevorzugter Abbau kurzkettiger *n*-Alkane statt.

Bei leicht modifizierter Versuchsdurchführung erzielten Wehner, Teschner & Bosecker (1986) folgende Ergebnisse: Die Mikroben waren in der Lage, nach einer längeren Phase der Inaktivität infolge fehlenden Nährstoffangebots innerhalb von wenigen Stunden

reaktiviert zu werden und dann mit der Degradation des neu zugegebenen Öls zu beginnen. Bei den Experimenten mit Mischpopulationen (Hefen und Bakterien) unter limitierter Sauerstoffzufuhr war eine bevorzugte Degradation von *n*-Alkanen mit bis zu 20 C-Atomen zu beobachten, längerkettige Moleküle wurden nicht angegriffen. Der Abbau kam bereits in Gang, als nur der gelöste Sauerstoff des wäßrigen Mediums zur Verfügung stand, wurde bei Zugabe von 10 ml/min synthetischer Luft erheblich beschleunigt, und die *n*-Alkane verschwanden innerhalb weniger Tage. Daneben wurden auch Versuche gemacht, in denen ausschließlich Bakterien eingesetzt wurden. Das Abbauverhalten der Bakterien war dem der Mischpopulation vergleichbar, und in beiden Fällen reduzierte sich der Anteil der gesättigten Kohlenwasserstoffe des Öls durch die Degradation der *n*-Alkane um etwa 10 %. Änderungen des Stickstoffangebotes zeigten denselben Effekt hinsichtlich der Degradationsgeschwindigkeit. Es wurden bevorzugt C₁₈- und C₂₀-*n*-Alkane degradiert, daneben aber auch *iso*- und *anteiso*-Alkane sowie Octylcyclohexan.

Während die Degradationssequenz von *n*-Alkanen, Cycloalkanen und Isoprenoiden generell konstant zu sein scheint, zeigen Sterane und pentacyclische Triterpane eine Vielzahl zum Teil stark variierender Abbaumuster.

In leicht bis mäßig degradierten Ölen von der Golfküste Amerikas, durch das Fehlen von *n*-Alkanen und die Anwesenheit von Isoprenoiden gekennzeichnet, sind Sterane durch mikrobielle Aktivität nicht angegriffen. In stark degradierten Ölen hingegen sind sie zu meist völlig zerstört, während Diasterane erhalten bleiben. Biodegradation erfaßt schließlich aber auch sie, mit bevorzugtem Abbau der 20S-Isomere der C₂₇-Verbindungen (Seifert & Moldowan 1979). Ähnliche Beobachtungen machten auch Goodwin et al. (1983) an einem stark degradierten Schweizer Öl, dem *n*-Alkane und acyclische Isoprenoide bereits fehlten: Sterane waren fast ganz entfernt, lediglich die (C₂₇ - C₂₉)-Diasterane waren erhalten. In einem an der Erdoberfläche ausgetretenen Öl gleichen Ursprungs waren dagegen weder Sterane noch Diasterane nachzuweisen. Goodwin et al. (1983) fanden an ihrem Probenmaterial allerdings eine bevorzugte Zerstörung der Moleküle, die an C-20 noch die biologische R-Konfiguration besitzen. Im Gegensatz dazu sind die Sterane zweier Asphaltproben aus Madagaskar (Rulikötter & Wendisch 1982) nicht vollkommen degradiert. Der Abbau begann mit den C₂₇-Verbindungen, sowohl bei den Steranen als auch bei den Diasteranen. Die C₂₈-Diasterane sind ebenfalls ganz verschwunden, 24-Methyl-14 α ,17 α -sterane dagegen nur stark in ihrer Konzentration erniedrigt. Von den 14 β ,17 β -C₂₈-Steranen scheinen nur die 20R-Epimere abgebaut zu sein, und auch für die C₂₉-Sterane gilt die bevorzugte stereospezifische Entfernung der 20R-Epimere sowohl in der 14 α ,17 α - als auch der 14 β ,17 β -Reihe. Dieser bevorzugte Abbau der

Isomere mit biologischer (20R) Seitenkettenkonfiguration gegenüber der geologischen (20S) Konfiguration für die $14\alpha,17\alpha$ - und die $14\beta,17\beta$ -Serie wurde von McKirdy et al. (1983) und Seifert et al. (1984) an australischen bzw. griechischen Ölen bestätigt. Seifert et al. (1984) beobachteten darüber hinaus an diesen Proben folgende Degradationssequenz: Der Abbau beginnt mit der Zerstörung der biologischen $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20R-Isomere. Dann werden die geologischen $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20S-Epimere attackiert und als letztes die $14\beta,17\beta$ -Serie. Innerhalb der $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20S-Serie beginnt der Abbau mit den niederen Homologen ($C_{27} > C_{28} > C_{29}$).

Vier innerhalb eines Teufenintervalls von 12 m gezogene Kernproben aus stark degradierten Ölsanden der Grand Rapids Formation A im Wabasca Deposit (Kanada) zeigen diese spezifischen Biodegradationseffekte trotz starker mikrobieller Überarbeitung der Sterane nicht (Brooks et al. 1988), weder die bevorzugte Entfernung der C_{27} -Verbindungen der Sterane und Diasterane gegenüber den höhermolekularen C_{28} - und C_{29} -Homologen noch den bevorzugten Abbau der 20R-Diastereomere noch das schnellere Verschwinden der $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -Serie verglichen mit der $5\alpha,14\beta,17\beta$ -Serie. Mit zunehmender Tiefe geht auch bei diesen Proben die Konzentration der Sterane deutlich zurück. In der tiefsten Probe sind sie überhaupt nicht mehr nachzuweisen, während die Konzentration der Diasterane ansteigt. Gleichzeitig gewinnen niedrigmolekulare C_{21} - und C_{22} -Sterane zunehmend an Bedeutung, die mikrobieller Abbautätigkeit gegenüber noch resistenter zu sein scheinen als die Diasterane.

Hohe Konzentrationen an C_{21} - und C_{22} -Sternen, die neben C_{28} - und C_{29} -Diasteranen als Hauptkomponenten identifiziert wurden, während C_{28} - und C_{29} -Sterane nahezu vollständig fehlen, sind ebenfalls charakteristisch für ein stark degradiertes Öl des Kelamayi-Ölfeldes aus dem Zungheer-Becken in NW-China (Jiang et al. 1990). Dieses Öl enthält außerdem Verbindungen, die aufgrund ihrer relativen Retentionszeiten und ihrer massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster als C_{25} - und C_{26} -Sterane bestimmt wurden. Das Vorkommen dieser Verbindungen ist sehr bemerkenswert, da bei den Steranen im allgemeinen ein bevorzugter Abbau von C_{27} -Verbindungen erfolgt und von daher für die niedrigeren Homologe ein ähnliches Abbauverhalten erwartet wurde.

Laborversuche zur Biodegradation von Steranen lieferten hingegen etwas andere Ergebnisse. In den Experimenten von Rubinstein et al. (1977), Connan et al. (1980), Teschner & Wehner (1985) und Wehner et al. (1986) blieben die Sterane völlig unverändert.

Im Gegensatz dazu erbrachten Goodwin et al. (1983) den Nachweis, daß in vitro-Biodegradation von Steranen möglich ist. Auf dem Gelände einer Raffinerie aus undichten

Tanks ausgeflossenes Öl wurde bei 30 °C unter aeroben Bedingungen und ohne Zugabe zusätzlicher Organismen abgebaut. In Analogie zu Beobachtungen an natürlich degradierten Ölen zeigte sich, daß sowohl Sterane als auch Diasterane biodegradiert werden können, wobei die folgende Degradationsabfolge besteht: Sterane > Diasterane und $C_{27} > C_{28} > C_{29}$.

Chosson et al. (1991a,b) untersuchten 73 aerobe Bakterien der Genera *Nocardia* (25), *Mycobacterium* (11), *Corynebacterium* (1), *Arthrobacter* (2), *Protoaminobacter* (1) und *Pseudomonas* (33) auf ihre Fähigkeit zum Abbau von Steranen. Während die gram-negativen Gattungen alle vollkommen inaktiv waren, zeigten 7 gram-positive Arten der Gattungen *Nocardia*, *Arthrobacter* und *Mycobacterium* deutliche Abbaureaktionen. Von diesen erwies sich *Nocardia* sp. SEBR 16 als besonders effizient und wurde daher für alle weiteren Experimente verwendet. Im Unterschied zur Versuchsdurchführung von Goodwin et al. (1983) mit Gesamtölen und den in diesen bereits enthaltenen Mischpopulationen von Bakterien und Hefen arbeiteten Chosson et al. (1991a,b) nur mit der Fraktion der verzweigten und cyclischen Alkane bzw. mit einem Gemisch von Reinsubstanzen und einer einzigen Bakterienspezies, der *Nocardia* sp. SEBR 16. Bei dem Öl handelte es sich um das Rozel Point Öl aus Utah (USA), das sich durch eine ungewöhnlich hohe Konzentration regulärer Sterane auszeichnet. Das Gemisch der Reinsubstanzen bestand aus C_{27} -Steranen der Konfigurationen $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20R, $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20S, $5\alpha,14\beta,17\beta$ -20R und C_{28} - und C_{30} - 4α -Methylsteranen der Konfiguration $5\alpha,14\alpha,17\alpha$ -20R. Sowohl für die regulären Sterane als auch die Methylsterane ergab sich danach folgende Degradationssequenz: $\alpha\alpha\alpha R > \alpha\beta\beta R > \alpha\beta\beta S > \alpha\alpha\alpha S$ mit Bevorzugung der niedrigmolekularen Homologe $C_{27} > C_{28} > C_{29}$. Die Verbindungen mit $\alpha\alpha\alpha S$ -Konfiguration schienen während des gesamten Experiments undegradiert zu bleiben, so daß es zu einer relativen Anreicherung dieser Verbindungen kam. In bezug auf die Diastereomere gibt es also Unterschiede zu den von Seifert et al. (1984) bearbeiteten Proben, bei denen die $\alpha\alpha\alpha S$ -Epimere vor der $\alpha\beta\beta$ -Serie abgebaut wurden.

Starke Biodegradation hat nicht nur Auswirkungen auf Konzentration und Verteilungsmuster von Steranen, sondern beeinflusst auch die pentacyclischen Triterpane.

So wurde in stark degradierten Ölen aus dem Kalifornischen Becken (Seifert & Moldowan 1979) und in Proben aus dem Uinta-Becken (Reed 1977) eine Serie von Desmethylhopanen entdeckt. Massenspektrometrische Daten, die statt des für Hopane typischen Schlüsselbruchstücks von m/z 191 ein um 14 Masseneinheiten niedrigeres m/z 177-Fragment ergaben, wurden als Hinweis auf den Verlust einer Methylgruppe im A/B-Ring-Teil des Moleküls gedeutet. Seifert & Moldowan (1979) werteten die vollständige Umwand-

lung der regulären $17\alpha(\text{H})$ -Hopane (C_{29} - C_{33}) in die demethylierten Homologe (C_{28} - C_{32}) als Biodegradationseffekt. Rullkötter & Wendisch (1982) bestimmten diese demethylierten Hopane als $25\text{-nor-}17\alpha(\text{H})$ -Hopane, d.h. die Methylgruppe ging an der C-10-Position verloren und nicht an der C-4-Position, wie Reed (1977) und Seifert & Moldowan (1979) vermutet hatten. Diese Demethylierungsposition ist sehr überraschend, da in der Biosphäre keine an C-25 funktionalisierten Hopanoide bekannt sind. Neben diesen 25-nor -Hopanen trat in den Asphalten aus Madagaskar auch eine Serie von 25-nor -Moretanen auf. Weitergehende Biodegradation der $17\alpha(\text{H})$ -Hopane führte zu einer Öffnung des C-Ringes des terpenoiden Skeletts.

Die 25-nor -Hopane erwiesen sich auch in den folgenden Jahren immer wieder als typisch für stark degradierte Öle (Goodwin et al. 1983, Volkman et al. 1983, Brooks et al. 1988, Requejo & Halpern 1989, Jiang et al. 1990), so daß sich sehr bald die Frage nach der Herkunft dieser Verbindungen stellte. Seifert & Moldowan (1979), Rullkötter & Wendisch (1982) und Volkman et al. (1983) vertraten die Ansicht, sie würden im Zuge der Biodegradation durch Demethylierung der $17\alpha(\text{H})$ -Hopane an der C-10 Position gebildet. Im Gegensatz dazu gehen Goodwin et al. (1983) und Chosson et al. (1991b) davon aus, daß sie bereits im undegradierten Öl vorhanden seien und nur infolge ihrer großen Resistenz gegenüber mikrobieller Abbauproduktivität während der Biodegradation stärker angereichert worden seien. Neueste Studien von Peters & Moldowan (1991) geben keine Anhaltspunkte für eine Bestätigung dieser Hypothese. Sie sehen die 25-nor -Hopane vielmehr ebenfalls als Biodegradationsprodukte der $17\alpha(\text{H})$ -Hopane an. Die mikrobielle Transformation beginnt mit den niedrigmolekularen Homologen, bevorzugt der mit 22R-Konfiguration. Eine Massenbilanz deutet darauf hin, daß diese Reaktion möglicherweise nicht sehr effizient ist und somit wohl auch noch andere Produkte gebildet werden.

In seltenen Fällen kommen 25-nor -Hopane auch in nicht oder leicht degradierten Ölen vor (Volkman et al. 1983, Philp 1983, Howell et al. 1984). Solche Öle enthalten möglicherweise Anteile verschiedener Bildungsphasen. Der Eindruck eines unbiodegradierten Öls mit 25-nor -Hopanen kann beispielsweise dadurch entstehen, daß stark biodegradiertes Öl einer ersten Phase später mit völlig unbiodegradiertem Öl mit typischer n -Alkanverteilung vermischt wurde (Volkman et al. 1983).

$25,28,30\text{-trinor-}17\alpha(\text{H})$ -Hopan unterscheidet sich von den anderen 25-nor -Hopanen dadurch, daß es auch in nicht biodegradierten Ölen beträchtliche Konzentrationen erreicht. Nach Peters & Moldowan (1991) wird es zumindest in den von ihnen untersuchten Proben aber nicht durch Demethylierung von $28,30\text{-dinor}$ -Hopan in der Lagerstätte gebildet und ist somit kein Biodegradationsprodukt.

Darüber hinaus sind auch Öle bekannt, in denen die Hopane abgebaut sind, ohne daß jedoch 25-*nor*-Hopane beobachtet werden. Beispiele hierfür sind ein Öl von der Golfküste Amerikas (Seifert & Moldowan 1979), Asphalte aus der Schweiz (Goodwin et al. 1983), an der Erdoberfläche ausgetretene Öle aus Griechenland (Seifert et al. 1984), Ölsande und Schweröle aus Kanada (Brooks et al. 1988) und Öle aus Jugoslawien (Moldowan et al. 1992).

In Laborversuchen (Goodwin et al. 1983, Chosson et al. 1991b) konnten zwar Biodegradationseffekte an Hopanen studiert werden, 25-*nor*-Hopane traten jedoch bisher niemals auf. Der für natürlich gealterte Öle typische bevorzugte Abbau der Verbindungen mit 22R-Konfiguration bei Hopanen wurde dagegen auch in den Experimenten beobachtet. Moleküle mit höherem Molekulargewicht wurden deutlich schneller abgebaut als ihre niedrigmolekularen Homologe. Moretane lassen sich ebenfalls mikrobiell abbauen, jedoch etwas langsamer als Hopane. Peters & Moldowan (1991) erörterten verschiedene Hypothesen für das Mißlingen dieser Experimente in bezug auf die Bildung von 25-*nor*-Hopanen. So könnten einerseits mikrobielle Ursachen in Frage kommen, wie unterschiedliche Bakterien in den Experimenten und in der Lagerstätte oder für die Bakterien nicht optimal gewählte Versuchsbedingungen. Außerdem arbeiteten Chosson et al. (1991b) nur mit einzelnen Spezies, während in der Lagerstätte Mikroorganismenassoziationen aktiv sind, die aufgrund von Co-Metabolismus ganz andere Abbauleistungen vollbringen können. Andererseits könnte die Methylgruppe an der C-10-Position der Hopane auch zu einem Alkohol, einem Aldehyd oder einer Carbonsäure oxidiert worden sein. Die Carbonsäuren als mögliche Vorläufer der 25-*nor*-Hopane wären dann aber in der polaren Fraktion zu finden, der bisher in diesem Zusammenhang wenig Beachtung geschenkt wurde, weil das Interesse meist nur der Fraktion der gesättigten Kohlenwasserstoffe galt.

Die Untersuchungsergebnisse zum Biodegradationsverhalten der Hopane differieren beträchtlich. Der Abbau der Hopane kann offensichtlich sowohl vor als auch nach dem der Sterane erfolgen. In manchen Fällen werden 25-*nor*-Hopane gebildet, in anderen wiederum nicht. Unterschiede bestehen auch hinsichtlich der Degradationssequenz. Bevorzugter Abbau der höheren Homologe ist ebenso möglich wie der der niederen. Verbindungen mit der biologischen 22R-Konfiguration werden zwar gegenüber solchen mit der 22S-Konfiguration in den meisten Fällen zuerst abgebaut, aber auch die umgekehrte Reihenfolge ist bekannt. "The relative rates of biodegradation of steranes and pentacyclic triterpanes are probably dependent on a range of complex environmental factors which, in turn, affect microbial utilisation of these hydrocarbons" (Goodwin et al. 1983). Es scheint daher dringend erforderlich, die mikrobiellen Aspekte der Biodegradation stär-

ker zu beleuchten und bei der Interpretation der geochemischen Daten zu berücksichtigen, um die einzelnen, zum Teil auch widersprüchlichen Beobachtungen besser verstehen und zu einem homogenen Bild zusammenfügen zu können. Als erster Schritt in diese Richtung sind die Publikationen von Chosson et al. (1991a, b) zu sehen.

Tricyclische Terpane schienen auch durch stärkste Biodegradation nicht verändert zu werden (Seifert & Moldowan 1979, Goodwin et al. 1983, Connan 1984) bis Howell et al. (1984) und Jiang et al. (1990) eine homologe Serie von Verbindungen entdeckten, die sie aufgrund der relativen Retentionszeiten und der massenspektrometrischen Fragmentierung mit Vorbehalten als demethylierte tricyclische Terpane identifizierten. Das Fehlen dieser Komponenten in den nicht degradierten Ölen und die Ähnlichkeit in den relativen Konzentrationen von C_{19} - C_{28} demethylierten tricyclischen Terpanen im Vergleich zu den C_{20} - C_{29} tricyclischen Terpanen veranlaßten Jiang et al. (1990) zu der Schlußfolgerung, die demethylierten Moleküle seien durch Biodegradation der tricyclischen Terpane entstanden. In Laborversuchen wurde diese demethylierte Spezies bisher noch nicht gefunden (Chosson et al. 1991b).

Biodegradationseffekte an Aromaten sind aus einer Übersicht von Connan (1984) zu ersehen (Abb. 3.1.4). Connan weist darauf hin, daß starke Biodegradation von Aromaten nicht immer mit einer drastischen Alteration von Alkanen einhergehen muß. Proben aus dem Aquitanischen Becken, in denen sowohl Aromaten als auch Alkane beträchtlich abgebaut waren, stammten entweder direkt von der Oberfläche oder aus flachen Reservoirs. In größerer Tiefe können stark degradierte Aromaten auch zusammen mit nur leicht veränderten Alkanverteilungen auftreten.

Das Verschwinden der niedrigsiedenden Aromaten Benzol, Toluol und Xylol wird im allgemeinen nicht auf bakterielle Aktivität zurückgeführt, sondern auf den Prozeß des "water washing" (Schaefer & Leythaeuser 1980). Nach experimentellen Daten von McAuliffe (1980) besitzen aromatische Kohlenwasserstoffe eine wesentlich größere Wasserlöslichkeit als *n*-Alkane mit derselben Zahl an Kohlenstoffatomen. Benzol ist 185mal wasserlöslicher als Hexan und Toluol 210mal löslicher als Heptan. Mit zunehmender Kohlenstoffzahl vergrößert sich dieser Unterschied, so daß die Löslichkeiten von Dimethylnaphthalinen und *n*-Dodekan (C_{12}) sogar um den Faktor 600 differieren. Connan (1984) bestätigte den Effekt des "water washing" für Benzol, notierte dagegen, daß die Biodegradation von *n*-Heptan (C_7) und *n*-Oktan (C_8) wesentlich effizienter ist als das "water washing" von Toluol und Xylol.

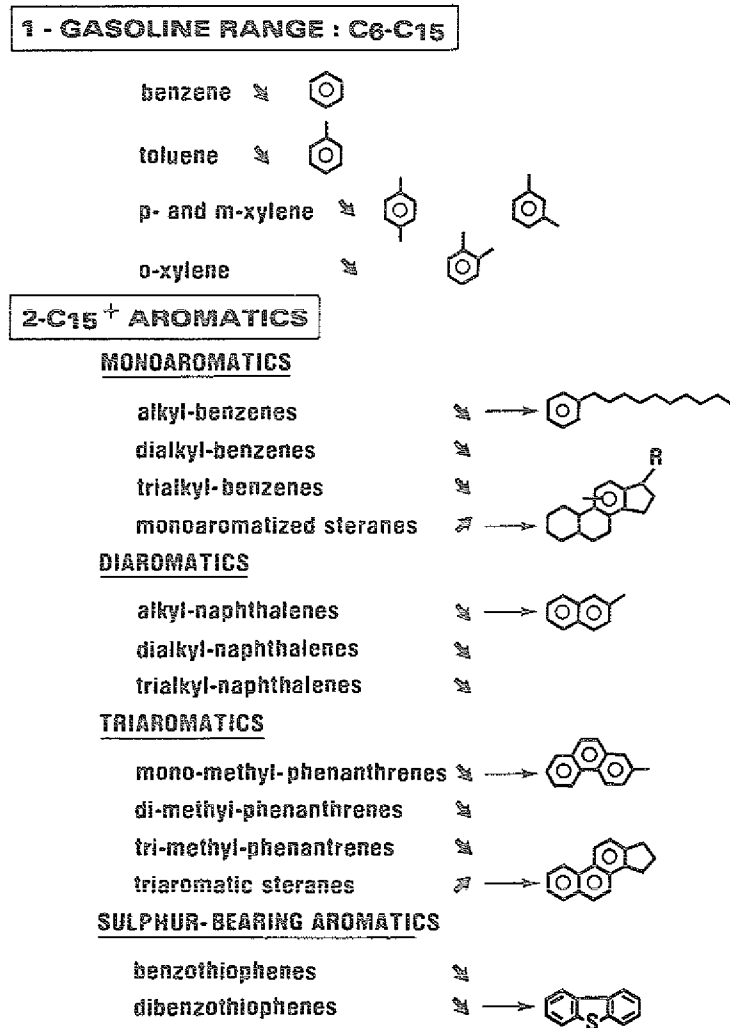


Abb. 3.1.4: Biodegradationseffekte an Aromaten (Connan 1984).

Mono-, Di- und Trialkylbenzole werden sehr schnell mikrobiell abgebaut und fehlen daher meist schon in leicht degradierten Ölen (Snowdon & Powell 1979, Philp & Gilbert 1980, Connan 1981). Der Abbauweg langkettiger Alkylbenzole ähnelt dem der *n*-Alkane, da durch Oxidation der terminalen Methylgruppe des Alkylrestes eine Carbonsäure gebildet wird (Higgins & Gilbert 1978). Die schnelle Degradation der Alkylbenzole lässt sich somit wohl durch die leichte Abbaubarkeit der Alkylreste erklären.

Nach Rowland et al. (1986) besteht eine große Diskrepanz hinsichtlich der Degradationsabfolge von gesättigten Kohlenwasserstoffen und Aromaten bei natürlich und im Labor unter aeroben Bedingungen degradierten Ölen. Bei natürlich gealterten australischen Ölen wurden *n*-Alkane und Isoprenoide abgebaut, bevor die Degradation von Naphthalin, C₁- und C₂-Naphthalinen und anderen alkylaromatischen Kohlenwasserstoffen begann. Bei den Laborversuchen hingegen war die Reihenfolge genau umgekehrt.

Vergleichbare Beobachtungen waren früher schon von Fedorak & Westlake (1981) und Jones et al. (1983) veröffentlicht worden. Fedorak & Westlake (1981) führen dies vor allem auf wechselndes Nährstoffangebot und unterschiedliche Mikrobenassoziationen zurück. Hinzu kommt außerdem, daß zwei Möglichkeiten der aeroben Degradation von alkylaromatischen Kohlenwasserstoffen unterschieden werden können, einerseits die Oxidation aromatischen Ring-Kohlenstoffs und andererseits die Oxidation aliphatischen Alkyl-Kohlenstoffs (Raymond et al. 1971, Ribbons & Eaton 1982). Abgesehen von den zuvor erwähnten Unterschieden zwischen Labor- und Geländebeobachtungen sind die Änderungen innerhalb der aromatischen Fraktion jedoch ähnlich und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Diaromaten sind weniger stabil als Triaromaten, und bezüglich substituierter Aromaten gilt $C_0 < C_1 < C_2 < C_n$ (n: Kohlenstoff-Zahl der Alkyl-Substituenten an einem aromatischen Kern). Darüber hinaus untersuchten Rowland et al. (1986) das Abbauverhalten verschiedener alkylaromatischer Isomere. Bei den Dimethylnaphthalinen, die sich sowohl im Labor als auch im Reservoir leicht degradieren lassen, war in beiden Fällen ein bevorzugter Abbau von 2,7-Dimethylnaphthalin im Vergleich zu 2,6-Dimethylnaphthalin zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den Experimenten verhielten sich 2-Ethyl-naphthalin und 2,3-Dimethylnaphthalin in australischen Ölen sehr resistent. Bei den Trimethylnaphthalinen erwiesen sich in beiden Probenreihen die α,α,β -substituierten 1,3,5- und 1,4,6-Isomere als sehr widerstandsfähig gegenüber mikrobiellem Abbau.

Hinsichtlich des Abbaus von Naphthalin und Methylnaphthalin gelangten Williams et al. (1986) bei der Analyse texanischer Öle zu ähnlichen Resultaten wie Rowland et al. (1986), erinnerten aber daran, daß in diesem Zusammenhang möglicherweise auch Einflüsse des "water washing" als Ursache berücksichtigt werden müßten. Phenanthrene traten in den biodegradierten Ölen nur in sehr geringer Konzentration auf. Methylphenanthrene wurden nicht so schnell abgebaut wie Naphthaline, besaßen jedoch in unterschiedlichen Ölen zum Teil stark variierende Verteilungsmuster. In Übereinstimmung mit Analysenergebnissen von Rowland et al. (1986), die 9-Methylphenanthren sowohl bei der in vitro-Degradation als auch bei den natürlich veränderten Ölen als widerstandsfähigstes Isomer identifizierten, stellte das 9-Methylphenanthren auch in einer Probe dieser texanischen Öle die dominierende Verbindung dar. Im Gegensatz dazu steht die Degradationsreihenfolge 1->9->3->2-Methylphenanthren eines anderen Öls.

Benzo- und Dibenzothiophene waren in den von Williams et al. (1986) untersuchten Ölen ebenfalls nur in extrem geringer Konzentration vorhanden. Benzothiophene werden schneller abgebaut als Dibenzothiophene und verschwinden etwa gleichzeitig mit den Naphthalinen. Der Abbau der Aromaten begann bei diesen Ölen erst nach dem der Isoprenoide und fand dann innerhalb eines engen Biodegradationsbereiches statt. Die

zum Teil sehr widersprüchlichen Daten für C_3 -substituierte Naphthaline veranlaßten Williams et al. (1986) zu folgendem Résumé: "These data may be warning us that biodegradation of aromatics is an unpredictable process with regard to the degradation stages in which it can occur. This unpredictability makes use of aromatic compound disappearance in assessing biodegradation stages of oils somewhat questionable."

Wardroper et al. (1984) befaßten sich mit dem Verhalten von mono- und triaromatischen Steroiden der Strukturtypen I und II (mono-2), III und IV (tri-1) und V und VI (tri-2) (Abb. 3.1.5) bei mikrobiellem Abbau unter natürlichen und simulierten Bedingungen. Bei den natürlich degradierten Ölen zeigte sich erst in dem Augenblick ein Effekt bei den aromatischen Steroiden, als (C_{27} - C_{29})-Sterane, Triterpane und (C_{27} - C_{29})-Diasterane schon stark degradiert waren, also bereits ein fortgeschrittenes Stadium der Biodegradation erreicht war. Als erstes wurde ein Verschwinden der triaromatischen Steroide mit niedrigem Molekulargewicht beobachtet, nämlich von tri-1 (C_{20} - C_{21}) und tri-2 (C_{21} - C_{22}). Nach Wardroper et al. (1984) ist dieses Verschwinden jedoch nicht biodegradationsbedingt, sondern vielmehr auf den Prozeß des "water washing" zurückzuführen. Das am stärksten degradierte Öl zeichnete sich darüber hinaus durch den Verlust hochmolekularer Komponenten aus, wie bei den Steranen auch hier bevorzugt von solchen mit 20R-Konfiguration (C_{26} - C_{28} tri-1, C_{27} - C_{29} tri-2). Bei Laborversuchen in aerobem Milieu bestätigte sich diese Degradationssequenz für aromatische Steroide aller Strukturtypen ebenso wie die Präferenz der Degradation von tri-1 gegenüber tri-2. Unterschiede bestanden dagegen im bevorzugten Verschwinden von C_{26} -Komponenten bei den Strukturtypen III und IV verglichen mit anderen hochmolekularen Isomeren.

Die C_{21} - und C_{22} -monoaromatischen Steroide zeigten sich in natürlich und künstlich gealterten Ölen gleichermaßen resistent. Der experimentell bevorzugte Abbau der C_{27} -Komponenten bzw. mit zunehmender Biodegradation der aller hochmolekularen Komponenten (C_{27} - C_{29}) ließ sich jedoch nur an einem der natürlich degradierten Öle beobachten, das alle Verbindungen mit biologischer Konfiguration an C-20 verloren hatte. Die Degradationsrate der höhermolekularen Verbindungen ähnelte der der triaromatischen Steroide der Strukturtypen III und IV.

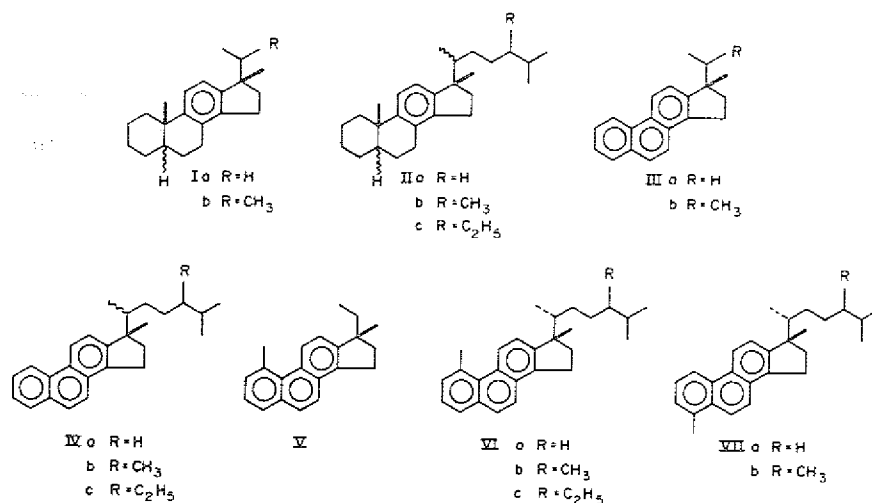


Abb. 3.1.5: Strukturtypen von mono- und triaromatischen Steroiden (Wardroper et al. 1984).

Auch wenn der Einfluß des "water washing" auf die Degradation der Aromaten nur in seltenen Fällen so eindeutig zu erkennen ist, wie an den von Palmer (1984) bearbeiteten philippinischen Ölen, gibt es Anhaltspunkte dafür, daß sowohl Biodegradation als auch "water washing" die Alteration von Aromaten verursachen. Da diese Prozesse gleichzeitig stattfinden können, ist es recht schwierig, die einzelnen Degradationseffekte dem einen oder anderen Prozeß zuzuordnen.

3.2 Mikrobielle Aspekte der Biodegradation

Kohlenwasserstoffe sind nicht nur fossile Relikte, die im Erdöl über Jahrmillionen als Zeugen früheren Lebens erhalten blieben, sondern werden auch gegenwärtig ständig von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen in beträchtlicher Menge synthetisiert (Eglinton & Hamilton 1967, Kolattukudy 1976, Weete 1980, Bachofen 1982, Tornabene 1982). Als dünne wachsartige Überzüge schützen sie die Blattoberflächen der Pflanzen vor Verdunstung und mechanischer Beanspruchung, sind Bestandteil des Blattgewebes, der Samen, Sporen und Früchte. Sie verleihen dem Gefieder der Vögel die lebensnotwendige Wasserresistenz und bewahren die Insekten vor Austrocknung. Darüber hinaus haben sie großen Anteil am Aufbau biologischer Membranen und bilden Energiedepots von Mikroben. Da alle biosynthetisch entstandenen Verbindungen in aerobem Milieu als abbaubar gelten (Schlegel 1985), ist dies natürlich auch für die Kohlenwasserstoffe zu postulieren.

Die Degradation der Kohlenwasserstoffe erfolgt durch Stoffwechselaktivität bestimmter Mikroorganismen, die diese organischen Moleküle als Energiequelle zu nutzen vermögen. Diese Fähigkeit zeichnet nicht nur einige wenige Spezialisten aus, sondern eine Vielzahl von Genera, die zu den Bakterien, Hefen und Pilzen gerechnet werden und nahezu ubiquitär verbreitet sind. Detaillierte Angaben hierzu finden sich u.a. in Atlas (1981), Cerniglia (1981), McGill et al. (1981), Bühler & Schindler (1984), Bartha & Atlas (1987). Bezüglich einiger vor 1970 erschienener Publikationen (Beerstecher 1954, Fuhs 1961, Davis 1967) mahnen Bartha & Atlas (1987) zur Vorsicht, da nicht immer eindeutig geklärt scheint, ob diesen Organismen auch tatsächlich nur Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung standen.

Mikroorganismen sind in ihrem natürlichen Lebensraum in der Regel in Assoziationen vergesellschaftet, die zu erheblich größerer Abbauleistung befähigt sind als die Arten für sich allein betrachtet. Manche Substrate, die keine Zellvermehrung ermöglichen, können offensichtlich in Gegenwart eines nutzbaren Co-Substrates, das Wachstum gestattet, umgesetzt werden (Perry 1979, Pfaender & Buckley III 1984). Dieser Co-Metabolismus ist auch für die Biodegradation von Erdöl und Erdölprodukten von Bedeutung, da diese ein breites Spektrum von Verbindungen enthalten, das von einer einzigen Spezies nicht abgebaut werden kann. Die wenigen dazu im Gelände betriebenen Studien zeigen zum Teil beträchtlich variierende Ergebnisse in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der autochthonen Organismen, den Milieubedingungen, der Zusammensetzung und der Konzentration des Öls. Langfristige Effekte auf wichtige ökologische Funktionen dieser Mikrobenvergesellschaftungen sind bislang ebenso wenig bekannt wie die Auswirkungen

veränderter metabolischer Aktivität auf andere Biota und das Ökosystem insgesamt (Bartha & Atlas 1987).

Obgleich auch eine sauerstoffunabhängige Verwertung von Kohlenwasserstoffen durch anaerobe Organismen *in situ* und *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Young 1984, Berry et al. 1987, Schink 1989), sind die Aerobier zweifellos effektiver. Anaerober Abbau erfolgt zwar erheblich langsamer, könnte, da dies unter geologischem Aspekt vernachlässigbar ist, dennoch durchaus von geochemischer Bedeutung sein. Nach Phillipi (1977) und Connan (1984, 1987) ist aerober Metabolismus nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Starke Biodegradation tritt besonders in oberflächennahen Reservoirs auf, die unter deutlichem Einfluß meteorischer Wässer stehen. Durch diese werden die Mikroben nicht nur in die Erdöllagerstätten transportiert, sondern auch mit notwendigen Nährstoffen, insbesondere Nitrat und Phosphat, und gelöstem molekularem Sauerstoff versorgt. Sie können nur in der wäßrigen Phase existieren, so daß der Abbau im Grenzbereich Öl-Wasser stattfindet. Zudem müssen Temperaturen herrschen, die mikrobielle Aktivität gestatten. Generell läßt diese mit steigender Temperatur nach, extensive Biodegradation ist auf einen Bereich zwischen 20 °C und 60-75 °C beschränkt. Biodegradationseffekte werden aber auch aus arktischen und subarktischen Regionen beschrieben (Malins 1977). Während sich bei niedrigen Temperaturen ebenfalls eine Verringerung der Aktivität verzeichnen läßt, machten Walker & Colwell (1974) die überraschende Beobachtung, daß die Biodegradation bei 0 °C und 3 °C zwar langsamer, aber wesentlich effektiver verläuft als bei höheren Temperaturen.

Kohlenwasserstoffe, insbesondere langkettige und hochkondensierte Moleküle, besitzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit. Kohlenwasserstoffe als Substrat verwertende Mikroorganismen können ihre Stoffwechselaktivität jedoch nur in wäßrigem Milieu entfalten und konzentrieren sich daher an der Grenzfläche zwischen Öl- und Wasserphase. Durch die Produktion oberflächenaktiver Substanzen setzen sie die Grenzflächenspannung herab, das Öl verteilt sich feindispers und wird dadurch besser verfügbar (Zajic & Mahomedy 1984, Bühler & Schindler 1984). Die eigentliche Aufnahme der organischen Verbindungen bietet noch immer Ansatzpunkte zu Diskussionen. So ist beispielsweise nicht geklärt, ob die Kohlenwasserstoffe vollständig gelöst sein müssen oder ob flüssige Kohlenwasserstoffe auch direkt über die Zellmembran aufgenommen werden können (Bartha & Atlas 1987). Unbestritten ist allerdings, daß der Katabolismus nur intrazellulär möglich ist. Da bestimmte Mikroorganismen größere Mengen undegradierter Kohlenwasserstoffe speichern können, besteht die Gefahr, daß diese Verunreinigungen in die Nahrungskette gelangen. Wie auch immer die Aufnahme erfolgt, es ist ein sehr rasch ablaufender Prozeß, der bei alkanverwertenden Hefen schon nach 1 Minute abge-

heit, so daß aus einem geradzahligen n -Alkan auch nur geradzahlige Carbonsäuren bzw. aus einem ungeradzahligen n -Alkan nur ungeradzahlige Carbonsäuren generiert werden können.

Einige Mikroorganismen sind darüber hinaus in der Lage, durch ω -Oxidation auch die zweite terminale Methylgruppe anzugreifen. Dabei wird die durch monoterminalen Abbau entstandene Carbonsäure zuerst zur ω -Hydroxyfettsäure, dann zur ω -Aldehydfettsäure und schließlich zur Dicarbonsäure weiteroxidiert. Durch β -Oxidation kann auch diese in Moleküle kürzerer Kettenlänge umgesetzt werden. Nach Arbeiten von Yi & Rehm (1982) und Rehm (1988) soll die Oxidation der beiden endständigen Methylgruppen nicht nur nacheinander, sondern auch gleichzeitig möglich sein. Als zusätzliche Stoffwechselprodukte treten dadurch α, ω -Diole auf, die sich ebenfalls zu ω -Hydroxyfettsäuren oxidieren lassen (Abb. 3.2.2).

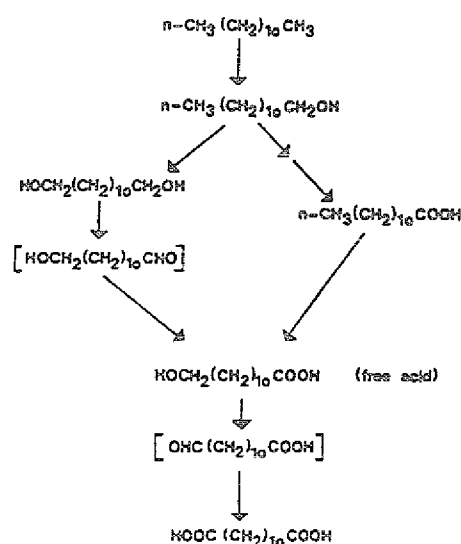


Abb. 3.2.2.: Diterminaler Abbau mit gleichzeitiger Oxidation der beiden endständigen Methylgruppen (Rehm 1988).

Subterminaler Abbau ist vor allem bei Hefen und Pilzen verbreitet (Markovetz 1971). Die Oxidation in der Mitte des Moleküls führt zunächst zur Bildung eines sekundären Alkohols, der mit fortschreitender Degradation nacheinander zu einem Keton und zu einem Ester, meist einem Essigsäureester, umgebaut wird. Durch Hydrolyse spaltet sich das Molekül in einen primären Alkohol und eine Carbonsäure. Während letztere durch β -Oxidation sofort weiter katabolisiert werden kann, muß der Alkohol zuvor erst über den bereits von der monoterminalen Oxidation bekannten Mechanismus via Aldehyd zur Carbonsäure oxidiert werden. Das Auftreten subterminaler Diole und Diketone bei Co-oxidations-Experimenten gibt einen Hinweis darauf, daß eventuell auch ein disubtermi-

naler Abbauweg existiert (Rehm & Reiff 1981). Bei Mikroorganismen, die Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlenstoffquelle verwerten, sind diese Verbindungen bislang allerdings noch nicht gefunden worden.

Die während des Alkanabbaues produzierten Carbonsäuren lassen sich auf unterschiedliche Art und Weise metabolisieren. Neben den zuvor erwähnten Mechanismen der β - und ω -Oxidation kann die Kohlenstoffkette auch durch Hydroxylierung am α -ständigen Kohlenstoffatom um eine C_1 -Einheit verkürzt werden. Als Schlüsselreaktion dieser α -Oxidation gilt die Transformation der Fettsäure in die korrespondierende α -Hydroxyfettsäure, die anschließend auf oxidativem Weg decarboxyliert wird (Fulco 1974, Bühler & Schindler 1984). Die Fettsäuren können dann entweder direkt oder nach Kettenverlängerung und de novo-Synthese in die Lipide von Mikroorganismen eingebaut werden.

Verzweigte Alkane sind generell wesentlich resistenter gegenüber mikrobieller Degradation als die geradkettigen *n*-Alkane. Position und Zahl der Verzweigungen sowie Größe der Substituenten und Grad der Substitution spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Die Rekonstruktion der Abbauewege wurde in erster Linie aufgrund isolierter Stoffwechselprodukte vorgenommen.

Pristan, ein Isoprenoidkohlenwasserstoff mit 19 Kohlenstoffatomen und 4 Methylverzweigungen ist ubiquitär verbreitet in Flora und Fauna, in Mikroorganismen, Sedimenten und Erdölen. Aus diesem Grund wurde er oft als Substrat für Degradationsversuche eingesetzt. McKenna (1972) beobachtete dabei in der verseiften Fraktion Pristansäure und durch β -Oxidation aus dieser hervorgegangene kürzerkettige Säuren wie 4,8,12-Trimethyltridecansäure und 2,6,10-Trimethylundecansäure als Metaboliten bei *Mycobacterium smegmatis*. In Experimenten mit einer *Rhodococcus*-Spezies (Nakajima et al. 1974, 1985) traten neben 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan-1-ol und 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäure, also ebenfalls Pristansäure, in geringer Konzentration auch 2,6,10,14-Tetramethylpentadecandicarbonsäure sowie Pristylpristanat und Pristylaldehyd auf. Abbildung 3.2.3 gibt eine Übersicht über Stoffwechselprodukte und den vermuteten Degradationsverlauf bei *Brevibacterium erythrogenes* (Pirnik et al. 1974).

Danach bildet sich als erstes Produkt die Pristansäure. Durch ω -Oxidation mit nachfolgender sequentieller β -Oxidation einerseits und β -Oxidation andererseits entwickeln sich daraus die beiden Abbaupfade für Mono- und Dicarbonsäuren. Da in allen Fällen, in denen verzweigte Alkane als Substrat angeboten wurden, Dicarbonsäuren als Stoffwechselprodukte entstanden, ist dieser Prozeß offensichtlich zumindest für die Degradation durch coryneforme Bakterien charakteristisch. Die Akkumulation von Pristansäure und

2,6-Dimethylheptandisäure wird als Konsequenz gehinderter β -Oxidation infolge der 2-Methyl-Substitution gedeutet, die Konzentrationsabnahme von 4,8,12-Trimethyltridecansäure und 2,6-Dimethylnonandisäure analog dazu der ungestörten β -Oxidation zugeschrieben.

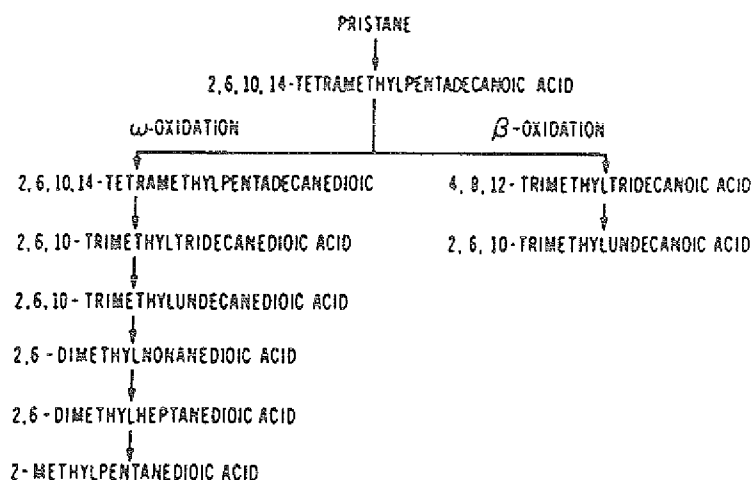


Abb. 3.2.3: Biodegradation von 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan) durch *Brevibacterium erythrogenes* (Pirnik et al. 1974).

Phytan (2,6,10,14-Tetramethylhexadecan), ebenfalls ein Isoprenoidkohlenwasserstoff, wurde in Experimenten von Nakajima et al. (1985) zu 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-1-ol und 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure oxidiert. Ein Abbauschema, wie das zuvor für Pristan vorgestellte, gibt es meines Wissens für Phytan in der Literatur nicht.

Die Verkürzung verzweigter Kohlenstoffketten erfolgt über enzymaktivierte verzweigte Carbonsäuren. In Abhängigkeit von der Position des Alkylsubstituenten bestehen dabei grundsätzliche Unterschiede bezüglich der im einzelnen ablaufenden Prozesse. Befindet sich die Methylgruppe in α -Position zur Carboxylgruppe, ist β -Oxidation durchaus möglich. Bei β -methylsubstituierten Carbonsäuren wird die Einführung einer β -ständigen Carbonylgruppe dagegen durch die Methylgruppe blockiert. Durch Carboxylierung der Methylgruppe und anschließende Eliminierung als Essigsäure bildet sich ein β -Ketoacyl-CoA, das durch β -Oxidation weiter metabolisiert werden kann (Seubert & Fass 1964, Britton 1984).

Cyclische Alkane lassen sich mikrobiell nur schwer degradieren. Aufgrund der äußerst lückenhaften Kenntnisse über die dabei im einzelnen stattfindenden Prozesse sind in der Literatur nur Schemata vermuteter Abbauege für einfache Verbindungen abgebildet (Perry 1984, Trudgill 1984). Laborversuche gaben Hinweise darauf, daß Cooxidation und

Commensalismus bei der Biodegradation im natürlichen Lebensraum der Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zu den cyclischen Kohlenwasserstoffen zeichnen sich cyclische Alkohole und Ketone durch rasche Metabolisierbarkeit aus.

3.3 Kohlenwasserstoffe in Böden infolge anthropogenen Eintrags

Ausgelöst durch eine Reihe spektakulärer Schadensfälle, finden die Prozesse, die aus der Schadstoffbelastung des Bodens resultieren, bei gestiegenem Umweltbewußtsein während der letzten Jahre zunehmende Beachtung in weiten Kreisen der Öffentlichkeit. Maßnahmen zur Reinerhaltung des Wassers und der Luft standen lange Zeit im Vordergrund der Umweltschutzbemühungen, da Verunreinigungen dieser Medien schon früh als Ursache zahlreicher Erkrankungen erkannt wurden. Der Schutz des Bodens hingegen fand weniger Beachtung. Erst als sich auch die Anzeichen für eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch kontaminierte Böden mehrten, rückte auch der Schutz des Bodens verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses.

Wer kennt nicht die Schlagzeilen, die seit einiger Zeit immer wieder durch die Presse gehen und ständig auf neue schwere Kontaminationen des Bodens aufmerksam machen. Als eine der größten derzeit bekannten Altlasten in Europa gilt die Deponie Georgswerder etwa 5 km südlich der Hamburger Innenstadt (Wolf 1985). Bis zu ihrer Schließung im Jahre 1979 wurden dort auf einer Fläche von etwa 450.000 m² annähernd 14 Mio. m³ Müll abgelagert, darunter über 100.000 Chemikalienfässer und mindestens 150.000 m³ Flüssigkeiten in zehn Flüssigmüllbecken und vier Faßlagern. Nachdem große Mengen dioxinhaltiger Sickeröle ausgetreten waren, wurde als erste Sanierungsmaßnahme eine Abdeckung des oberen Deponiebereiches vorgenommen, um durch eine Verminderung der in den Deponiekörper eindringenden Niederschlagsmengen die Schadstoffausbreitung zu minimieren (Schwennicke & Lange 1990). Die Gesamtkosten der Sanierung werden mit 150 Mio. DM beziffert (Föste 1990).

Ein großes Problem bei der Sanierung von Altablagerungen ergibt sich oft dadurch, daß infolge der gemeinsamen Einlagerung von Bauschutt, Haushalts- und Sondermüllabfällen ein breites Spektrum von Kontaminationen vorliegt und in den meisten Fällen keine Unterlagen darüber existieren, welche Stoffe im einzelnen deponiert wurden.

Auch von ehemaligen Betriebsflächen und stillgelegten Anlagen, den sogenannten Altstandorten, kann eine Gefährdung ausgehen. Die häufigsten Altstandorte sind neben Kokerei- und Gaswerksgeländen vor allem Betriebe der chemischen Industrie mit Verunreinigungen an Schwermetallen, Cyaniden und Erdölderivaten. Diese Stoffe haben sich zum Teil in solch hohen Konzentrationen im Untergrund angereichert, daß ganze Siedlungen unbewohnbar werden und der Abrißbirne zum Opfer fallen müssen wie beispielsweise im November 1989 in Bielefeld-Brake. Die Häuser waren über den müllgefüllten Tongruben einer ehemaligen Ziegelei errichtet worden. Auch in Dortmund-

Dorstfeld ahnte zu Beginn der 80er Jahre, als auf einer ungefähr 120.000 m² großen Teilfläche des ehemaligen Zechengeländes eine Neubausiedlung entstand, noch niemand, welche Spuren die industrielle Nutzung hinterlassen hatte. Erste Verdachtsmomente kamen bei kleineren Erdarbeiten auf und erhärteten sich durch nachfolgende Untersuchungen. Aus der Kokerei der bereits vor 25 Jahren stillgelegten und inzwischen abgeräumten Zeche waren offensichtlich jahrzehntelang Cyanide, Schwermetalle und aromatische Kohlenwasserstoffe ins Erdreich gesickert (Gläser & Beitinger 1988). Um innerhalb kürzester Zeit wieder gesunde Wohnverhältnisse zu schaffen, blieb nur der Austausch des Bodens. Anfang 1987 wurde mit den Arbeiten im Kerngebiet der Altlast begonnen, nachdem zuvor alle Wohnungen geräumt und die Gebäude von der Stadt Dortmund angekauft worden waren. Die Austauschtiefe betrug stellenweise bis zu 7 m, so daß insgesamt 65.000 m³ kontaminiertes Erdreich anfielen, von denen etwa 34.000 m³ schwach organisch belastetes Material auf eine stadteigene Deponie für Haushaltsabfälle verbracht, etwa 17.000 m³ stark organisch belastetes Material der thermischen Behandlung zugeführt und etwa 14.000 m³ vorwiegend schwermetallhaltiges Material auf einer Sondermülldeponie endgelagert wurden.

Im Wohngebiet Pionierpark in Mülheim am Main zeigten sich bereits zu Beginn des Bauvorhabens auffällige Verfärbungen des Bodens (Ripper & Riss 1988). Erste chemische Untersuchungen bestätigten eine hohe Schadstoffbelastung, so daß die zuständigen Bau- und Umweltbehörden die Nutzung der zum Teil bereits bezugsfertigen Wohnhäuser untersagte. Nach historischen Recherchen begann die Industrieansiedlung auf dem etwa 5 ha großen Pionierpark-Gelände im Jahre 1880 mit der Gründung einer chemischen Fabrik zur Herstellung von Farbstoffen. Ausweitung der Produktion führte zu einer Steigerung des Energiebedarfs, und so wurde 1903 im westlichen Teil des Geländes ein Gaswerk zur Verkokung von Kohle erbaut, das gleichzeitig Teer als Ausgangsstoff für die Farbenherstellung lieferte. Der Betrieb wurde 1925 stillgelegt, das Gaswerk seitens des neuen Eigentümers zur Versorgung der Stadt Mülheim bis 1939 weiterbetrieben. Da für die anfallenden Teerabfälle nun keine Verwendung mehr bestand, wurden sie in Becken gesammelt. Nach Abriß der Gebäude und Einebnung des Bauschutts im Jahr 1941 war das Gelände zuerst Standort einer Pionierkaserne und wurde nach dem Krieg bis 1972 von den amerikanischen Streitkräften als Druckerei und Lager für Druckereierzeugnisse genutzt. Danach lag es bis zur Erschließung als Wohngebiet durch die Stadt Mülheim brach. In der Farbenfabrik wurden nachweislich Amidobasen, Anilin-Farbstoffe, Azo-Farbstoffe, Azophosphin, Arsenik, Arsensäure und arsenige Säure, Benzolderivate, Chrysophenin, Fuchsin, Naphthol-Farbstoffe, Resorcin-Farbstoffe, Sulfosäuren und Toluol hergestellt, gelagert und weiterverarbeitet. Im Bereich des Gaswerkes fielen bei der Herstellung von Leuchtgas Koks und Teer als Abfallprodukte an, die den Boden

durch Benzol, Toluol, Xylol, Phenol, Kresol, Naphthalin, Anthrazen, Benz(a)pyren, Phenanthren und Cyanide verunreinigten. Das Schadensbild spiegelte sich in analoger Weise im Grundwasser wider.

Die Geschichte des Pionierpark-Geländes steht exemplarisch für viele andere Altstandorte, die ebenfalls im Laufe der Zeit als Produktionsstätten unterschiedlicher Güter gedient haben, bei deren Fertigung fast immer mehr oder minder große Kontaminationen entstanden, die sich zum Teil über Jahrzehnte hinweg zu komplexen Gemischen akkumuliert haben.

Ein großes Gefährdungspotential haben nach Angaben des Rates von Sachverständigen für Umweltfragen auch die Grundstücke inzwischen stillgelegter Tankstellen als vermutlich verunreinigte Altstandorte. Allein für den Zeitraum von 1968 bis 1989 beläuft sich deren Zahl auf fast 28.000. Untersuchungen werden zeigen, welche Kontaminationen im Einzelfall vorliegen.

In der Bundesrepublik Deutschland wurden Ende des Jahres 1988 annähernd 50.000 Altlasten-Verdachtsflächen ermittelt, ohne daß die neuen Bundesländer dabei Berücksichtigung gefunden hätten (Bundestagsdrucksache 11/4104). Dieser Wert entsprach zum damaligen Zeitpunkt sicherlich nicht den tatsächlichen Gegebenheiten, sondern deutete lediglich eine Größenordnung an, da die Erhebungen noch nicht als abgeschlossen galten und ihnen darüber hinaus unterschiedliche Erfassungszeiträume in den einzelnen Bundesländern zugrunde lagen. So hatte Hamburg bereits Anfang der 80er Jahre mit einer systematischen, flächendeckenden Erfassung und Überprüfung begonnen, während in Bayern oder Rheinland-Pfalz erst seit den letzten Jahren landesweite Untersuchungen durchgeführt werden. Unter stärkerer Einbeziehung ehemaliger Betriebsstandorte müssen daher wohl Prognosen von insgesamt mehr als 70.000 altlastverdächtigen Flächen für das ehemalige Bundesgebiet als realistisch angesehen werden (Franzius 1989, UBA 1989). Eine erste Bestandsaufnahme im Gebiet der ehemaligen DDR, die im Rahmen des ökologischen Sanierungs- und Entwicklungsplanes durchgeführt wurde, ergab eine Zahl von nahezu 28.000 Verdachtsflächen. Da der Erfassungsgrad groben Schätzungen zufolge jedoch nur 50-60 % betrug, ist in den neuen Bundesländern mit etwa 60.000 Verdachtsflächen zu rechnen (Wieczorek 1991). Das Gefährdungspotential der Altablagerungen wird generell deutlich niedriger eingeschätzt als das der Altstandorte. Sowohl Altablagerungen als auch Altstandorte werden erst durch Gefährdungsfeststellung und -abschätzung zu Altlasten.

Bodenbelastungen bestehen jedoch nicht nur durch die Kontamination mit Altlasten aus

früheren Jahren, sondern können jederzeit durch unsachgemäßen Umgang mit umweltgefährdenden Stoffen im Bereich der gewerblichen Wirtschaft oder öffentlicher Einrichtungen sowie durch defekte Rohrleitungen und Kanalsysteme auftreten. So sickerten beispielsweise im Mai des Jahres 1991 nach dem vermutlich durch Bergsenkung ausgelösten Bruch einer Ölpipeline an der Autobahn A3 Richtung Oberhausen in Höhe der Anschlußstelle Dinslaken-Nord ungefähr 300.000 Liter Benzin ins Erdreich. Der dadurch entstandene Schaden ist beträchtlich, da ein mehrere ha großes Waldstück abgeholzt werden mußte, um den kontaminierten Boden bis zu einer Tiefe von 70 cm ausheben zu können. Das ebenfalls kontaminierte Grundwasser wird über eigens dafür niedergebrachte Brunnen abgepumpt.

Zu Kontaminationen des Bodens kann es darüber hinaus auch im Bereich der Landwirtschaft durch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln kommen.

Nach der Bodenschutzkonzeption der Bundesregierung erfüllt der Boden eine Vielzahl von Funktionen. Er ist nicht nur Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere und Pflanzen, sondern auch wichtiger Teil der Ökosysteme mit ihren Stoffkreisläufen, insbesondere im Hinblick auf Wasser- und Nährstoffhaushalt, nicht zu vergessen seine Bedeutung als prägendes Element der Natur und Landschaft. Der Boden dient dem Menschen als

- Anbaufläche für die Erzeugung von Nahrungsmitteln, Futtermitteln und pflanzlichen Rohstoffen,
- Fläche für Siedlung, Produktion, Verkehr, Kommunikation,
- Lagerstätte für Abfälle und Filter für immittierte Stoffe,
- Grundwasserspeicher,
- Lagerstätte für Bodenschätze und Energiequellen,
- Erholungsraum,
- Archiv der Natur- und Kulturgeschichte.

Trotz der vielfältigen Nutzungsansprüche gilt es, den Boden zu schützen, und dies umso mehr, als er als Teil anderer Ökosysteme auch deren Funktion nachhaltig beeinflußt. So kann es beispielsweise infolge des Schadstofftransports aus dem Boden in die Pflanzen zu einer Belastung von Nahrungsmitteln kommen. Von grundlegender Bedeutung ist der Boden außerdem wegen seiner Filtereigenschaften für die Güte der Wasserreservoirs, sowohl des Grund- als auch des Oberflächenwassers. Da eine große Zahl undichter Deponien und wilder Kippen existiert, die stellenweise sogar unmittelbar im Grundwasser liegen, hat die Deutsche Forschungsgemeinschaft schon 1976 ein interdisziplinäres Forschungsvorhaben zum "Wasser- und Stoffhaushalt von Abfalldeponien und deren

Wirkungen auf Gewässer" ins Leben gerufen. Es gibt eine Fülle weiterer Wechselbeziehungen, auf deren Betrachtung an dieser Stelle jedoch verzichtet werden soll.

Vor diesem Hintergrund beschlossen die Bundesminister am 28. Februar 1983, daß der Schutz des Bodens künftig umfassend wie Naturschutz und Landschaftspflege, Luftreinhaltung, Lärmbekämpfung, Sicherung des Wasserhaushalts und Abfallbeseitigung unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Zusammenhänge und Wechselwirkungen wahrgenommen werden soll.

Auf der Grundlage der Erstbewertung der Verdachtsflächen wird dazu im Einzelfall zunächst der analytische und finanzielle Rahmen des Untersuchungskonzeptes zur jeweiligen Gefährdungsabschätzung abgesteckt. Als hilfreich erweisen sich in diesem Zusammenhang unter anderem die vom Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten des Landes Nordrhein-Westfalen zusammengestellten "Hinweise zur Ermittlung von Altlasten". Wertvolle Informationen über produktionsspezifische Bodenbelastungen auf stillgelegten Industrie- und Gewerbeflächen geben die "Branchentypische Inventarisierung von Bodenkontaminationen - ein erster Schritt zur Gefährdungsabschätzung für ehemalige Betriebsgelände" des Umweltbundesamtes und die "Erfassung möglicher Bodenverunreinigungen auf Altstandorten" des Kommunalverbandes Ruhrgebiet.

Ist eine Gefährdung für Mensch und Umwelt zu befürchten, sind unverzüglich Maßnahmen zu ergreifen, "durch die sichergestellt wird, daß von der Altlast nach der Sanierung keine Gefahr für Leben und Gesundheit des Menschen sowie keine Gefährdung für die belebte und unbelebte Umwelt im Zusammenhang mit der vorhandenen oder geplanten Nutzung des Standortes ausgehen" (Sondergutachten Altlasten 1989). Die Altlasten sind jedoch eine Hypothek unserer mehr als 100jährigen Industriegeschichte, die sich auch bei größter Anstrengung nicht innerhalb weniger Jahre beseitigen läßt. Dazu mangelt es einerseits an finanziellen Mitteln, andererseits fehlt es aber auch ganz einfach an Erfahrung.

In der aktuellen Sanierungspraxis wird zur Zeit ein breites Spektrum an biologischen, physikalisch-chemischen und thermischen Sanierungstechniken angewandt, mit deren Hilfe eine Beseitigung der Kontaminationen erzielt werden soll. Der Stand der Technik ist infolgedessen durch eine Vielzahl miteinander konkurrierender Verfahren gekennzeichnet, die jedoch alle im wesentlichen auf empirischer Grundlage entwickelt wurden. Zur Erarbeitung einer zweckmäßigen Auswahl von Verfahren und Anlagen für die verschiedenen Anwendungsfälle richtete die Deutsche Forschungsgemeinschaft 1989 einen Sonderforschungsbereich "Reinigung kontaminierter Böden" ein (Stegmann 1990). Die

Methoden, die sich unter dem Stichwort Unterbrechung der Kontaminationswege zusammenfassen lassen, wie Aushub, Verfestigung und Ablagerung auf einer Deponie (Enseling & Krings 1988), Zwischenlagerung in Tanks, Containern oder Schüttgutlagern (Rudat 1988), Einkapselung durch Dichtwände und HDPE-Folien zur Oberflächenabdichtung (Ehresmann & Stroh 1988) oder hydraulische Verfahren (Battermann 1988) tragen dagegen nicht zur Sanierung im eigentlichen Sinne bei, weil die Schadstoffe im Boden verbleiben. Es findet lediglich eine räumliche und/oder zeitliche Verlagerung der Problematik statt. Daß diese Methoden dennoch häufig eingesetzt werden, erklärt sich vermutlich durch ihre relativ "kurzfristige Verfügbarkeit" und "überschaubare Kosten" (Rudat 1988).

Da durch Schadstoffmobilisierung und Eintrag ins Grundwasser unsere lebensnotwendigen Trinkwasserreservoirs gefährdet sind, hat das Umweltbundesamt all die Maßnahmen und Verfahren in einem Leitfaden zusammengestellt, die für den Schutz und die Erhaltung des Grundwassers bei Mineralölschadensfällen von Bedeutung sind.

Großer Forschungsbedarf besteht auch hinsichtlich der im Boden gebildeten Metaboliten, ihrer Mobilität, ihrer Verfügbarkeit und ihrer Ökotoxikologie. In diesem Zusammenhang soll nochmals hervorgehoben werden, daß die gesamte Altlastenproblematik nur durch interdisziplinäre Zusammenarbeit zufriedenstellend bewältigt werden kann. Geologen, Bodenkundler, Chemiker, Mikrobiologen, Bauingenieure, Verfahrenstechniker und Umweltplaner sind hier gleichermaßen gefordert.

Schadstoff-Grenzwerte für Böden sind in der Bundesrepublik bislang noch nicht gesetzlich festgelegt, so daß die Diskussion über den erforderlichen Sanierungsgrad noch immer anhält. Augenblicklich orientieren sich die Sanierungsziele vor allem an der vorhandenen bzw. zukünftigen Nutzung der Standorte (Holland & Straßer 1993). Appel et al. (1987) melden dazu erhebliche Bedenken an, denn "angesichts der großen Zahl der voraussichtlich zu sanierenden Altlasten und kontaminierten Standorte und der damit verbundenen erheblichen Kosten ist bei der Anwendung allein nutzungsbezogener Grenzwerte sogar zu befürchten, daß aus Gründen finanzieller Opportunität nicht die Schadstoffquellen beseitigt oder verschlossen, sondern lediglich bestimmte Nutzungen aufgegeben werden". Die vielfach geäußerte Forderung nach Wiederherstellung des Status quo ante oder der Multifunktionalität von Standorten stößt jedoch nicht nur auf wirtschaftliche, sondern auch auf naturgegebene und technische Grenzen. Infolgedessen wird auf sanierten Flächen sicherlich nicht jede Art von Nutzung möglich sein. Es muß aber unter allen Umständen verhindert werden, daß dadurch eine Zersiedlung solcher Flächen begünstigt wird, denen eine wichtige ökologische Ausgleichsfunktion zukommt.

In Ermangelung eigener Grenzwerte werden oftmals die für Boden und Grundwasser in den Niederlanden verbindlichen Referenz- und Prüfwerte (VROM NL 1988) als Bewertungskriterien übernommen. Die Zusammenstellung dieser Daten wird in der Bundesrepublik im allgemeinen Sprachgebrauch auch als "Holländische" oder "Niederländische Liste" bezeichnet.

Im folgenden werden exemplarisch zwei große Mineralölschadensfälle vorgestellt, Sanierungsmaßnahmen aufgezeigt und Sanierungsziele diskutiert.

Zwischen 1977 und 1980 sind auf dem Gelände des Rhein-Main-Flughafens in Frankfurt an vier verschiedenen Stellen größere Mengen an Kerosin ausgelaufen und bis zur Grundwasseroberfläche versickert (Golwer & Wallhäußer 1985). Die Versickerungsstellen liegen 1,2 km bis 2,5 km im Grundwasseroberstrom eines großen Wasserwerks. Der größte Teil konnte durch mehrjähriges Abpumpen aus Brunnen (etwa 1450 m³) und in einem Fall zusätzlich durch Aushub des verunreinigten Erdreichs (etwa 10.000 m³) beseitigt werden.

Der größte Schadensfall ereignete sich Ende des Jahres 1980 in 2,5 km Entfernung vom Wasserwerk. Aus einer unterirdisch verlegten Leitung zur Betankung von Flugzeugen trat dort in einem Areal von 10 m bis 15 m Durchmesser Kerosin aus. Menge und Kontaminationsdauer ließen sich nicht genau ermitteln. Der Treibstoff versickerte in sandigen und sandig-kiesigen Schichten und breitete sich erst nach Erreichen der Grundwasseroberfläche lateral aus, etwa 100 m im Grundwasseroberstrom und bis zu 150 m im Grundwasserunterstrom. Er verunreinigte dadurch den Untergrund auf einer Fläche von annähernd 31.000 m². Kerosinhaltige Sande wurden infolgedessen, abgesehen von der Versickerungsstelle selbst, nur unmittelbar über der Grundwasseroberfläche erbohrt. Ihre Mächtigkeiten schwankten zwischen 8 cm und 50 cm. Durch Absenkung der Brunnenwasserspiegel um einige Meter und Ansteigen der Grundwasseroberfläche um bis zu 1,3 m infolge hoher Niederschläge in den Jahren 1981 bis 1983 gelangten die Schadstoffe dann auch in Schichten, die im Januar 1981 noch nicht kontaminiert waren, und die Mächtigkeit des Ölkörpers stieg auf 2 m bis 4 m.

Im Zuge der Sanierung wurden 9 Brunnen niedergebracht, aus denen in 3 Jahren zunächst durch Abpumpen, später durch Abschöpfen insgesamt 1389 m³ Kerosin zurückgewonnen werden konnten. Das zur Erzeugung der Entnahmetrichter geförderte Grundwasser wurde über Leichtflüssigkeitsabscheider geschickt und versickerte dann in 7 benachbarten 1,6 m tiefen 50 m x 5 m großen Erdbecken.

Das auf dem Frankfurter Flughafen verwendete Kerosin des Typs Jet A-1 enthält nach Angaben der Esso AG neben Alkanen max. 20 Vol.-% Aromaten, max. 5 Vol.-% Olefine, max. 3 g/kg Schwefel, max. 10 mg/kg Mercaptan-Schwefel sowie 2 Additive, ein Antioxidans und ein Antistatic-Additiv zur Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit des Kraftstoffs.

Um Änderungen der Zusammensetzung der versickerten Treibstoffe in Abhängigkeit von ihrer Verweildauer im Untergrund zu erfassen, wurden 3 Kerosinproben unterschiedlichen Alters mit gaschromatographischen und infrarotspektroskopischen Methoden im Institut Fresenius GmbH in Taunusstein analysiert. Die Probe 1 wurde von frischem Kerosin im November 1983 aus einem Flachbodentank entnommen, bei den Proben 2 und 3 handelt es sich um versickertes Kerosin, das sich 3 bzw. 6 Jahre im Untergrund befand und im November 1983 aus Sanierungsbrunnen geschöpft wurde. Nach Angaben des Herstellers hatte sich die Zusammensetzung des Jet A-1 während dieser Zeitspanne nicht wesentlich geändert, so daß die Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet war.

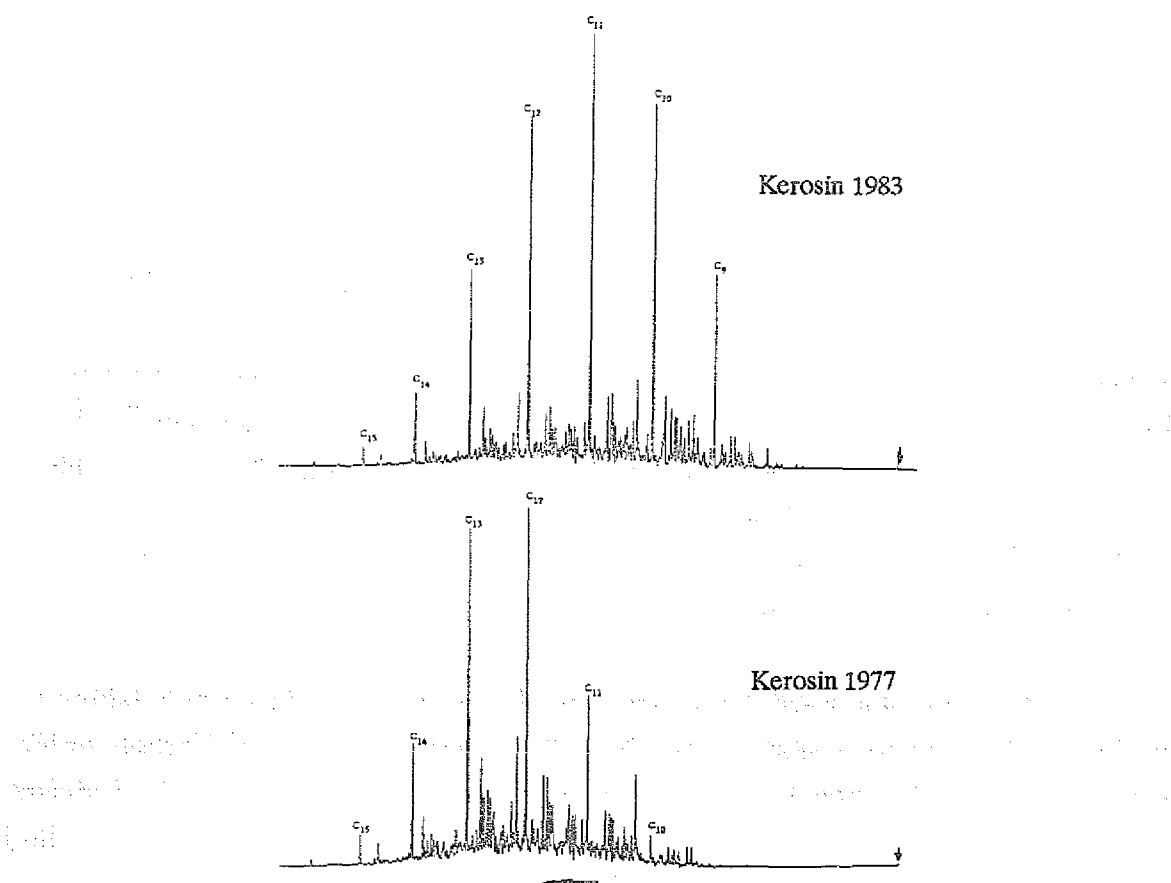


Abb. 3.3.1: Gaschromatogramme von frischem Kerosin (1983) und 1977 versickertem Kerosin.

Innerhalb dieser sechs Jahre haben sich die Gehalte an *n*-Alkanen im Bereich C₉-C₁₁ und an Aromaten deutlich reduziert. Die IR-Spektren der einzelnen Proben unterscheiden sich nicht. Zur Kontrolle, ob während der Sanierungszeit verunreinigtes Grundwasser aus dem Ölkörper abströmt und zur Überprüfung des Sanierungserfolgs wurden in den gepumpten Grundwasserproben Gesamtgehalte an Kohlenwasserstoffen nach DIN 38409 H-18 bestimmt. Untersuchungen zum Abbauverhalten einzelner Substanzklassen wurden hingegen offensichtlich nicht durchgeführt.

Das nach dreijähriger Sanierungszeit noch in der Gesteinssäule verbliebene Kerosin beeinflusst die Beschaffenheit des durchfließenden Grundwassers so stark, daß es typische Merkmale eines sauerstoffreduzierten bis sauerstofffreien Wassers aufweist. Dies sind neben erhöhten Gehalten an Eisen(II)-Ionen und Ammonium und erhöhten CSB-Werten deutlich reduzierte Gehalte an Nitrat im Vergleich zu den außerhalb des kontaminierten Gebietes ermittelten Werten. Eine Temperaturerhöhung des Grundwassers innerhalb des Ölkörpers um bis zu 1 °C, die örtliche Temperaturunterschiede überlagert, wird auf mikrobielle Aktivität zurückgeführt. Die Zahl der Bakterien- und Pilz-Spezies ist in diesem Bereich deutlich geringer als im nicht kontaminierten Untergrund.

Um eine Vorstellung darüber zu ermöglichen, welche Ausmaße durch Kohlenwasserstoffe hervorgerufene Verunreinigungen erreichen können, hier einige Zahlen aus der Altölraffinerie Pintsch in Hanau, die nach Aufdeckung von Umweltschäden im Jahr 1984 geschlossen wurde und seither als eine der größten bekannten Altlasten der BRD gilt. Das Spektrum an Kontaminationen umfaßt:

- ca. 20.000 t teilweise stark kontaminierte oberirdische Anlagenteile und Baumassen der Altölraffinerie,
- ca. 700 t extrem stark kontaminierte unterirdische Leitungen, Schächte und Tanks mit Teilfüllungen,
- 40.000 t - 60.000 t mittel- bis stark kontaminierte heterogene Auffüllungen und Auelehm,
- 340.000 t - 360.000 t mittel-, im Bereich der Grundwasserwechselzone stark kontaminierten Mainterrassenkies,
- 800 t - 1200 t Altöl mit starken Verunreinigungen aus verschiedensten Chlorkohlenwasserstoff-Komponenten bis hin zu PCB als schwimmender Phase auf dem Grundwasserspiegel,
- ca. 60.000 m³ durch gelöste Schadstoffe hochgradig kontaminiertes Grundwasser als Porensättigung des Terrassenkieses.

Da die Sanierung zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist (Ripper et al.

1988, Ripper & Früchtenicht 1989, Ripper 1990), soll die Betrachtung dieses Altstandortes nicht weiter vertieft werden.

Die Bestimmung der Gehalte an Kohlenwasserstoffen zur Kontrolle des Sanierungsfortschritts bzw. zur Dokumentation des Sanierungserfolgs wird trotz der von Püttmann und Jäger et al. bereits 1988 vorgebrachten Kritik wie in den zuvor dargestellten Schadensfällen meist anhand der DIN 38409 H-18 vorgenommen (z.B. Hilker 1989, Lotter 1990, Webb 1990). Sensus strictu gilt diese Methode nur für Wasserproben, wird in letzter Zeit allerdings immer häufiger für die Untersuchung von Böden herangezogen und scheint sogar in den Diskussionen über die Festlegung von Schadstoff-Grenzwerten eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen. Sie dient jedoch nur der summarischen Erfassung der reinen Kohlenwasserstoffe, deren Werte keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Toxizität und der ökologischen Bedenklichkeit gestatten. Dies ist allein durch Identifizierung und Quantifizierung von Einzelsubstanzen möglich. Nachteilig ist außerdem, daß Kohlenwasserstoff-Metaboliten mit polaren Substituenten nicht berücksichtigt werden und somit ein völlig falsches Ergebnis vorgetäuscht werden kann. Auf diese Art und Weise wird nur der Abbau der ursprünglich vorhandenen Stoffe verfolgt, während die zum Teil wesentlich toxischeren, bei den Aromaten auch wasserlöslichen metabolischen Umwandlungsprodukte in die Betrachtung überhaupt nicht mit eingehen. Auf der Basis dieses Kenntnisstandes ist die Erfassung der Kohlenwasserstoffe nach DIN 38409 H-18 allenfalls für Screening-Analysen zur Ermittlung stärkerer Kontaminationen geeignet. Es gilt daher, möglichst rasch ein wesentlich feineres analytisches Instrumentarium zu entwickeln, das den gestiegenen Anforderungen auch gerecht zu werden vermag.

Kohlenwasserstoffverunreinigte Böden werden in zunehmendem Maße durch mikrobiologische Sanierungsverfahren gereinigt (Battermann & Werner 1984, Schüßler 1986, Schwefer & Weirich 1988, Schüßler & Webb 1988, Henke 1989, Stroh et al. 1990, 9. Dechema Fachgespräch Umweltschutz zur mikrobiologischen Reinigung von Böden vom 27./28. Februar 1991). Dabei kommen sowohl in situ- als auch on site- und off site-Verfahren zum Einsatz. Der Vorteil der in situ-Technik besteht darin, daß das belastete Material im Untergrund verbleiben kann. Für on site- und off site-Verfahren muß der Boden dagegen ausgehoben werden und wird dann entweder direkt an Ort und Stelle behandelt (on site) oder in spezielle Anlagen verbracht (off site). Als Beitrag zur Optimierung biologischer in situ-Sanierung wurde unlängst eine Reihe von Publikationen über Laborversuche zum aeroben mikrobiellen Abbau von *n*-Hexadecan vorgelegt (Würdemann et al. 1990, Dalyan et al. 1990a,b, Harder et al. 1991, Harder & Höpner 1991). Untersuchungsschwerpunkt war die Abbauleistung der Mikroorganismen in Abhängigkeit von verschiedenen Bodentypen und Bodenmodellsubstanzen, vom pH-Wert,

von der Temperatur, der Bodenfeuchte und der Nährstoffversorgung. Die Bestimmung der Abbauprodukte erfolgte in allen Experimenten ausschließlich aufgrund der Sauerstoffzehrungsraten. Da jegliche begleitende chemische Analytik fehlt, ist es nicht möglich, die Veränderungen im molekularen Bereich zu erfassen und zu verfolgen. Doch gerade hier besteht der Forschungsbedarf.

Die Situation der Altlastenproblematik ist gegenwärtig dadurch gekennzeichnet, daß für eine umfassende Beurteilung der Auswirkungen von Altlasten auf die natürliche Umwelt nur unzureichende Maßstäbe zur Verfügung stehen. Zum Schutz und zur Erhaltung der allgemeinen Lebensgrundlagen besteht vor allem ein großes Forschungsdefizit hinsichtlich der Erfassung von Abbauprodukten und damit der Langzeitwirkung von Schadstoffen. Da die Altlastenproblematik in den Zuständigkeitsbereich der Länder fällt, ist es außerdem notwendig, zu einer länderübergreifenden Vereinheitlichung der Kriterien für die Beurteilung der Gefährdung und zur Festlegung von (nutzungsabhängigen) Sanierungszielen zu gelangen.

DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION EIGENER EXPERIMENTELLER UNTERSUCHUNGEN

4 Mikrobieller Abbau von Reinsubstanzen in Batch-Kultur

Die nachfolgende Beschreibung der dieser Arbeit zugrunde liegenden experimentellen Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Erdölkohlenwasserstoffen und zum Nachweis dabei gebildeter Metaboliten folgt einer Gliederung, die sich an der zunehmenden Komplexität der Stoffgemische ausrichtet. Am Anfang stehen die Abbauprobversuche mit definierten Einzelverbindungen. Es folgen Batch-Ansätze und Versuche in kontinuierlicher Kultur mit einem Dieselöl. Den Abschluß bilden die Analysen von in ihren Lagerstätten natürlich biodegradierten Erdölen. Diese Gliederung folgt nicht überall dem tatsächlichen Ablauf der experimentellen Untersuchungen, die als Teil einer Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie 3 der KFA Jülich mit dem Abbau von Dieselöl in einem zweistufigen Kultursystem begannen. Erst im Verlauf dieser Arbeiten ergab sich die Notwendigkeit von Untersuchungen an einfacheren Systemen, d.h. von definierten Reinsubstanzen.

Die Auswahl der Reinsubstanzen erfolgte nach zwei Gesichtspunkten. Sie sollten einerseits kein allzu niedriges Molekulargewicht haben, da die Umwandlungsprodukte sonst flüchtig werden und sich dadurch der analytischen Erfassung entziehen könnten. Zum anderen sollte eine klare Unterscheidung von den in der Natur ubiquitär vorhandenen geradkettigen C₁₆- und C₁₈-Säuren (z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure)* möglich sein, um Störungen durch Kontamination und direkten Eintrag der verwendeten Mikroorganismen so gering wie möglich zu halten. Daher erschien es sinnvoll, keine geradzahligen, sondern ungeradzahlige *n*-Alkane als Substrat einzusetzen. Außerdem wurde ein verzweigter Kohlenwasserstoff (Phytan) ausgewählt, der einerseits nach bisher vorliegenden Erkenntnissen schwerer abbaubar ist als *n*-Alkane und der andererseits Abbauprodukte liefern sollte, die leichter als solche erkennbar sind.

*

Die Bezeichnung der offenkettigen Alkane, Alkene, Alkohole und Carbonsäuren erfolgt im weiteren Verlauf der Arbeit mit einer vereinfachten Nomenklatur:

C_{16:0} bedeutet z.B. eine geradkettige Verbindung mit 16 Kohlenstoffatomen (Methoxygruppen der Ester und Trimethylsilylgruppen werden dabei nicht einbezogen) und ohne Doppelbindung. Falls die Angabe der Anzahl von Doppelbindungen fehlt, handelt es sich immer um gesättigte Verbindungen. Alkylverzweigungen und andere Substituenten sowie die Art der Stoffklasse werden zusätzlich angegeben.

Die verwendeten Bakterien wurden aus einem mineralölkontaminierten Boden isoliert und besitzen nachweislich die Fähigkeit zum Kohlenwasserstoffabbau. Nach der Bestimmung von H.-P. Rohns (Institut für Biotechnologie 3 des Forschungszentrums Jülich) handelt es sich um *Acinetobacter junii*. Die näheren Einzelheiten der mikrobiologischen Aspekte sind der Dissertation von Rohns (1992) zu entnehmen.

4.1 *n*-Heptadecan

4.1.1 Versuchsbedingungen

Die Versuche wurden in drei parallelen Ansätzen mit jeweils 40 mg *n*-Heptadecan 99 % der Firma Aldrich auf 100 ml Mineralmedium durchgeführt. Nach massenspektrometrischer Analyse enthält die Reinsubstanz geringe Beimengungen von *n*-Hexadecan (*n*-C₁₆), *n*-Octadecan (*n*-C₁₈) und längerkettigen *n*-Alkanen, aber keine Olefine. Das zur Versorgung der Mikroorganismen mit Nährstoffen angereicherte Kulturmedium hatte folgende Zusammensetzung:

NH ₄ NO ₃	0,40 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,04 g
Spurenelementlösung	1 ml
Fe(II)-EDTA-Lösung	1 ml
H ₂ O entionisiert	ad 1000 ml

Die Spurenelementlösung enthielt:

Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	2 mg
ZnSO ₄ · H ₂ O	2 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	2 mg
CuSO ₄ · H ₂ O	2 mg
H ₂ O entionisiert	ad 1000 ml

Die Fe(II)-EDTA-Lösung bestand aus:

Titriplex III	9,30 g/l
FeSO ₄	6,95 g/l
H ₂ O entionisiert	ad 1000 ml

Es wurde ein C:N-Verhältnis von 100:40 eingestellt. Die Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und während der gesamten Versuchsdauer auf einem Schütteltisch in Bewegung gehalten. Die Erlenmeyerkolben waren mit steriler Watte verschlossen, um das Eindringen von Fremdkeimen zu verhindern. Es gab keine zusätzliche Sauerstoffzufuhr. Um gleichzeitig den Einfluß des pH-Wertes auf die Bildung der Metaboliten studieren zu

können, wurde dieser nicht wie sonst üblich durch Zugabe von KOH konstant gehalten. Die Probennahme (jeweils Aufarbeitung eines Ansatzes) erfolgte nach 5 Tagen, 25 Tagen und 53 Tagen.

4.1.2 Probenaufbereitung

Da es sowohl freie als auch gebundene Metaboliten in wäßriger Lösung sowie in Wachsester eingebundene Metaboliten abzutrennen galt, wurden unterschiedliche Methoden der Probenaufbereitung gewählt.

Zur Gewinnung der löslichen Metaboliten wurden 50 ml des Ansatzes entnommen, mit HCl Suprapur (Merck) angesäuert und mit 3 x 60 ml Diethylether reinst (Merck) extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 zur Analyse (Merck) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Als Veresterungs- bzw. Silylierungsreagenz fanden Diazomethan und Silyl 991 (BSTFA-TCMS 99:1) der Firma Macherey-Nagel Verwendung.

Zur Freisetzung gebundener Abbauprodukte aus der wäßrigen Lösung wurde die andere Hälfte des Ansatzes mit 5 g KOH Suprapur (Merck) in 50 ml destilliertem Methanol zwei Stunden unter Rückfluß unter Stickstoffatmosphäre verseift. Durch Spaltung von Esterbindungen werden dabei Alkohole und Carboxylationen freigesetzt. Die Carboxylationen lassen sich durch Ansäuern in die entsprechenden freien Säuren überführen. Extraktion und anschließende Aufarbeitung erfolgten wie zuvor beschrieben, als Extraktionsmittel wurde jedoch destilliertes Dichlormethan statt des Diethylethers verwendet.

Die Analyse der aus dem Reaktionsmedium als Festkörper abgetrennten Wachsester wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Zum einen wurden sie nur durch kurze Ultraschallbehandlung in destilliertem Dichlormethan gelöst und die Lösung dann sofort in den Gaschromatographen des Massenspektrometers injiziert, um die Wachsester unverändert als hochmolekulare Verbindungen analysieren zu können.

Andererseits wurden die Wachsester durch Hydrolyse mit 35 ml destilliertem Methanol, 1 g KOH Suprapur (Merck) und 2 ml pentadestilliertem H_2O in die Alkohol- und Säurebestandteile aufgetrennt und diese als niedermolekulare Substanzgemische analysiert.

Um Verunreinigungen durch organische Stoffe während der Probenaufbereitung auszuschließen, wurde darauf geachtet, alle Gerätschaften unmittelbar vor ihrer Benutzung mit destilliertem Dichlormethan auszuspülen und nachzureinigen. Kommerziell erhältliche Faltenfilter waren nicht sauber genug, so daß sich vor ihrer Verwendung eine Dichlormethan-Extraktion in einer Soxhlet-Apparatur (24 Stunden) empfahl. Blindproben gaben darüber hinaus Hinweise auf mögliche Kontaminationen durch die benötigten Chemikalien. In vielen Fällen war daher die Verwendung reiner Qualitäten oder eine Vorreinigung erforderlich.

4.1.3 Bedingungen für die instrumentelle Analytik

Die Identifizierung der aus dem Reaktionsmedium nach dem mikrobiellen Abbau isolierten Verbindungen erfolgte ausschließlich aufgrund von GC/MS-Daten. Dabei konnte nicht mit Einzelionenerfassung gearbeitet werden, sondern es mußten stets komplette Massenspektren aufgenommen werden. Zur Auswertung der Produktverteilung diente ergänzend die Anfertigung von Massenchromatogrammen ausgewählter Schlüsselbruchstücke. Alle Messungen, mit Ausnahme der der Reinsubstanzen und der unverseiften Wachsester, wurden unter folgenden analytischen Bedingungen durchgeführt:

Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 4160

Quarzkapillarsäule: CP-Sil 5 CB

Länge: 50 m

Innendurchmesser: 0,25 mm

Außendurchmesser: 0,39 mm

Belegungsstärke: 0,25 μm

Trägergas: Helium

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 110 °C

Aufheizrate: 3 °C/min

Endtemperatur: 320 °C

Haltezeit: 28 min

Kaltaufgabesystem Gerstel

Temperaturprogramm

Aufgabetemperatur: -40 °C

Haltezeit: 30 s

Aufheizrate: 10 °C/s

Haltezeit: 350 °C

Haltezeit: 90 s

Splitlos

Massenspektrometer VG 7070E mit Kratos DS 90 on-line-Datensystem

Ionisierungsenergie: 70 eV

Quellentemperatur: 220 °C

Massenbereich: m/z 45-900

Zykluszeit: 2,3 s/Dekade

Für die Analyse der Reinsubstanzen und der unverseiften Wachsester wurde eine kürzere Säule (10 m) verwendet und dementsprechend ein anderes Temperaturprogramm gefahren.

Quarzkapillarsäule HP U#2

Länge: 10 m

Innendurchmesser: 0,32 mm

Außendurchmesser: 0,40 mm

Belegungsdicke: 0,22 µm

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 110 °C

Aufheizrate: 8 °C/min

Endtemperatur: 320 °C

4.1.4 Ergebnisse

Nach 5 Tagen

Freier Extrakt

Als erste Abbauprodukte traten im freien Extrakt nach fünf Tagen die $C_{17:0}$ -Säure, die durch β -Oxidation aus dieser entstandene $C_{15:0}$ -Säure und, mengenmäßig dominierend, das $C_{17:1}$ -Olefin als einfach ungesättigte Verbindung auf (Abb. 4.1.3.1-4.1.3.5).

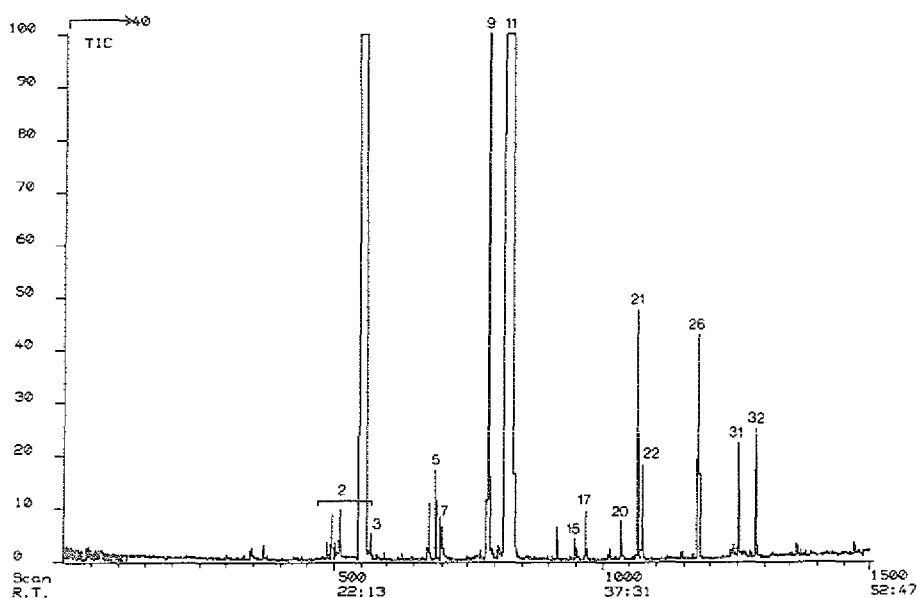


Abb. 4.1.3.1: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des freien Extrakts des Heptadecan-Abbaus nach 5 Tagen

(2: Kontamination (u.a. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 3: Dodecancarbonsäuremethylester, 5: Hexadecan, 7: Kontamination (p-Toluolsulfonsäure-N-methylamid aus Diazomethanherstellung), 9: Heptadecen, 11: Heptadecan, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 17: Kontamination (Phthalat), 20: Hexadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 22: Kontamination (Phthalat), 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 31: Octadecancarbonsäuremethylester, 32: Octadecancarbonsäuremethylester).

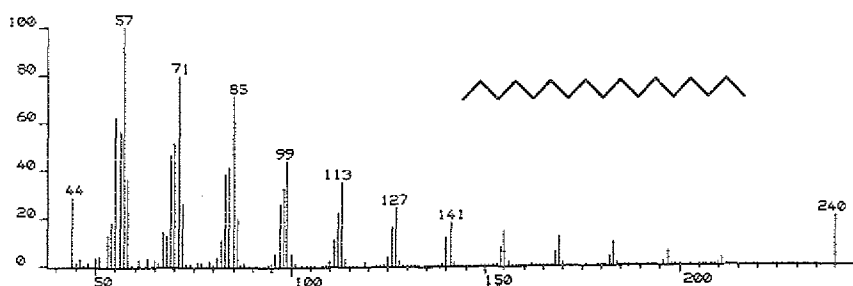


Abb. 4.1.3.2: Massenspektrum von Heptadecan.

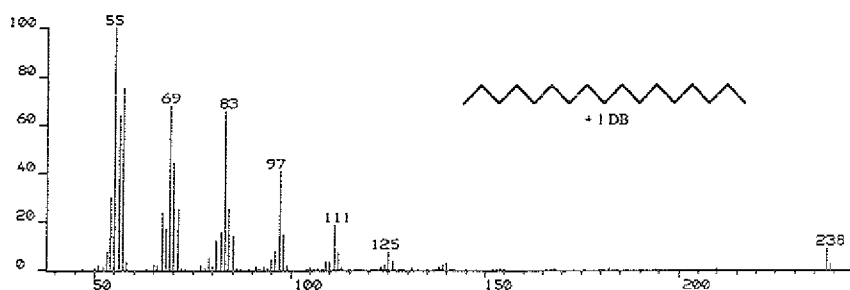


Abb. 4.1.3.3.: Massenspektrum von Heptadecen.

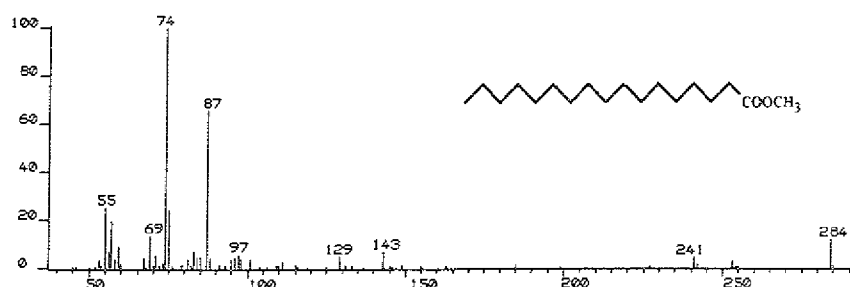


Abb. 4.1.3.4.: Massenspektrum von Heptadecancarbonsäure als Methylester.

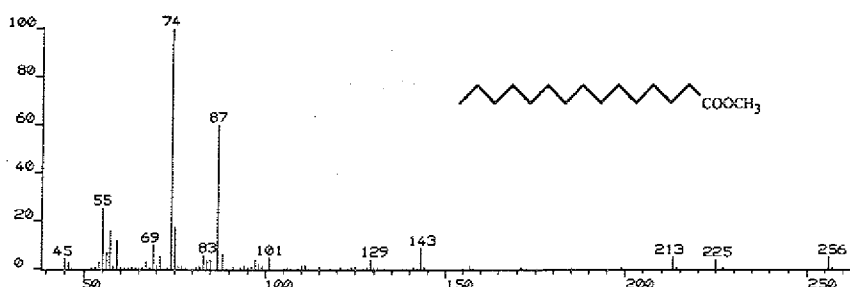


Abb. 4.1.3.5.: Massenspektrum von Pentadecancarbonsäure als Methylester.

Alle anderen Substanzen im Totalionenstromchromatogramm des freien Extrakts (Abb. 4.1.3.1) sind nicht durch mikrobielle Degradation des Heptadecans entstanden. Da aus einem C_{17} - n -Alkan beim Abbau keine C_{18} -Säure gebildet werden kann, sind die $C_{18:0}$ - und $C_{18:1}$ -Säure entweder als Kontamination eingeschleppt worden, oder es handelt sich bei ihnen um Bakterieninhaltsstoffe. Aus einem ungeradzahligen n -Alkan lassen sich nicht ohne weiteres geradzahlige Säuren generieren, so daß die homologe Reihe der geradzahligen Säuren mit $C_{10:0}$ -Säure, $C_{12:0}$ -Säure, $C_{14:0}$ -Säure (liegt unter dem $C_{17:0}$ -Alkan), $C_{16:0}$ -Säure und $C_{16:1}$ -Säure ebenfalls als Kontamination oder Bakterieninhalts-

stoff zu werten ist. Das C_{16} -Alkan ist eine Verunreinigung der Ausgangssubstanz.

Phthalate, Stabilisierungsreagenz des Diethylethers und Methylierungsagens treten als Kontaminationen in allen Proben auf, werden daher nur in den Listen gekennzeichnet, im weiteren Text aber nicht mehr explizit erwähnt.

Verseifter Extrakt

Der zu verseifende Anteil der Probe wurde erst nach fast sechs Monaten aufgearbeitet, nachdem er zwar während der gesamten Zeit im Kühlschrank gestanden hatte, aber nicht angesäuert worden war. Die Mikroorganismen waren offensichtlich auch unter diesen Bedingungen weiter aktiv, da sich ein relativ komplexes Verteilungsmuster von Metaboliten zeigte und die angebotene Kohlenstoffquelle stark abgebaut war (Abb. 4.1.3.6).

Hauptumwandlungsprodukte sind die $C_{17:0}$ - und die $C_{15:0}$ -Säure, die in gleicher Konzentration vorliegen. Die $C_{17:1}$ -Säure (Abb 4.1.3.7) tritt demgegenüber in ihrer Bedeutung etwas zurück. Charakteristisch für die veresterten gesättigten aliphatischen Monocarbonsäuren ist die Bildung des Fragmentions m/z 74 bei der massenspektrometrischen Analyse, das durch Umlagerung eines γ -ständigen Wasserstoffatoms bei der β -Spaltung entsteht. Im Zuge dieser Reaktion, der sogenannten McLafferty-Umlagerung, kommt es zu einer Wasserstoff-Übertragung in einer sechsgliedrigen Übergangskonfiguration (Abb. 4.1.3.8). Das Massenchromatogramm der Spur m/z 74, mit der die gesamte Reihe der genannten Monocarbonsäuren gleichzeitig und spezifisch erfaßt werden kann, ist in Abb. 4.1.3.9 dargestellt.

Daneben gibt es eine homologe Reihe von gesättigten β -Hydroxycarbonsäuren mit 11, 13 und 15 Kohlenstoffatomen, die durch sekundäre Oxidation aus n -Carbonsäuren gebildet werden. Charakteristisch für die methylierten und trimethylsilylierten Derivate ist das Fragmention m/z 175 (Abb. 4.1.3.9-4.1.3.12).

Eine weitere Substanz kann aufgrund des Massenspektrums (Abb. 4.1.3.13) entweder eine Methyl- C_{17} -Säure oder eine Keto- C_{17} -Säure sein, da beide dieselbe Fragmentierung aufweisen, sofern sich, wie in diesem Fall, der Substituent nicht in der Nähe der Carboxylgruppe befindet. Aufgrund der gaschromatographischen Retentionszeit in der Mitte

zwischen n -C₁₇- und n -C₁₈-Säure ist das Vorliegen einer methylverzweigten C₁₇-Säure wahrscheinlicher.

C₁₆- und C₁₈-Säure sind ebenfalls vorhanden, wie im unverseiften Extrakt, aber auch hier nicht als Abbauprodukte zu betrachten.

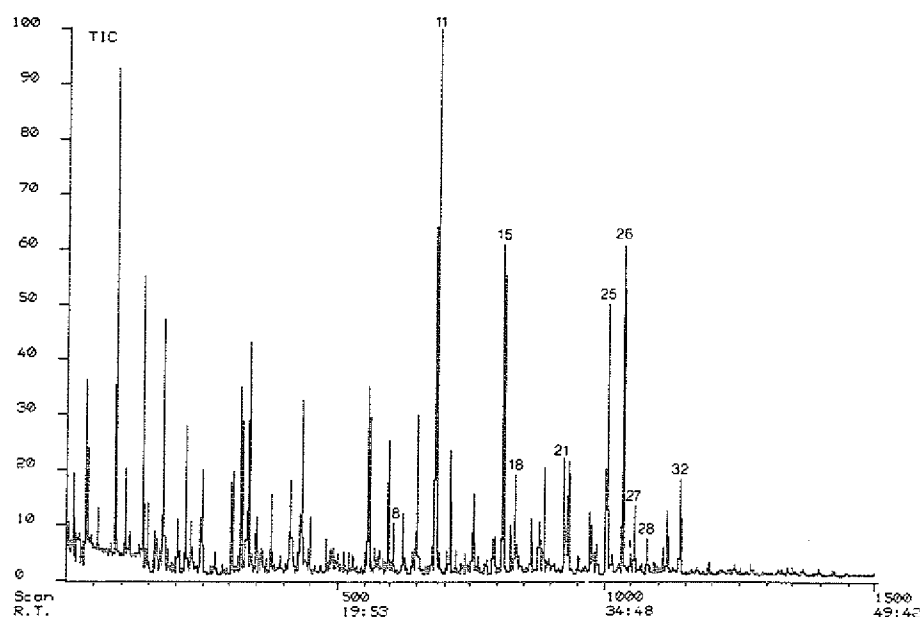


Abb. 4.1.3.6: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des Heptadecan-Abbaus nach 5 Tagen

(8: β -Trimethylsiloxyundecanecarbonsäuremethylester, 11: Heptadecan, 15: Pentadecanecarbonsäuremethylester, 18: β -Trimethylsiloxytridecanecarbonsäuremethylester, 21: Hexadecanecarbonsäuremethylester, 25: Heptadecanecarbonsäuremethylester, 26: Heptadecanecarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxy-pentadecanecarbonsäuremethylester, 28: Methylheptadecanecarbonsäuremethylester, 32: Octadecanecarbonsäuremethylester).

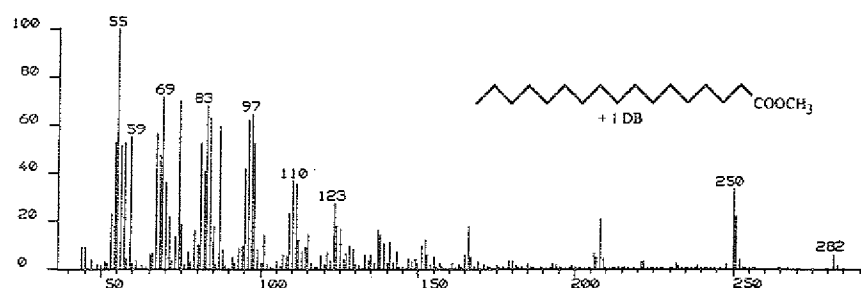


Abb. 4.1.3.7: Massenspektrum von Heptadecanecarbonsäure als Methylester.

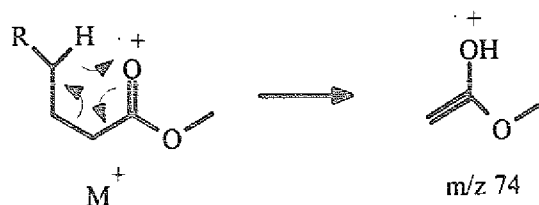


Abb. 4.1.3.8: Bildung des Fragmentions $m/z \ 74$ durch McLafferty-Umlagerung bei der β -Spaltung.

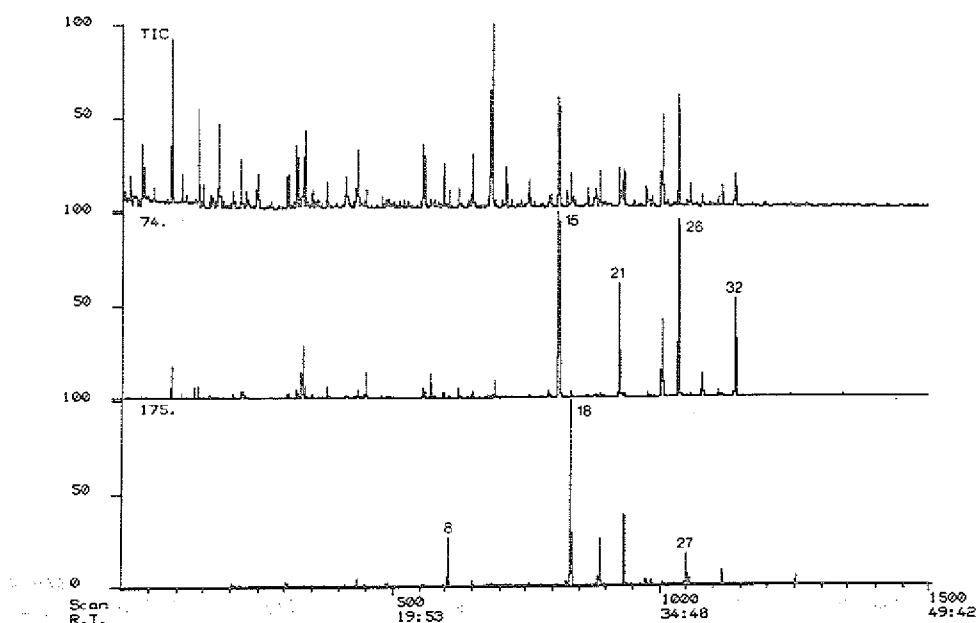


Abb. 4.1.3.9: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentionen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester ($m/z \ 74$) und β -Hydroxycarbonsäuren als Methylester-TMS-ether ($m/z \ 175$).

(8: β -Trimethylsiloxyundecancarbonsäuremethylester, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 18: β -Trimethylsiloxytridecarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxypentadecancarbonsäuremethylester, 32: Octadecancarbonsäuremethylester).

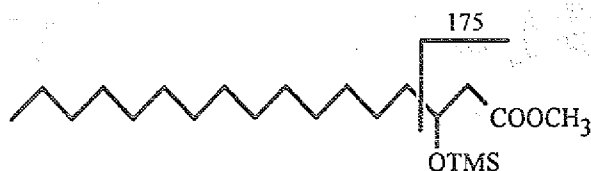


Abb. 4.1.3.10: Charakteristisches Fragmention $m/z \ 175$ für β -Hydroxycarbonsäuren als Methylester-TMS-ether.

Kohlenstoff- zahl	M ⁺	M-15	M-47	M-73	Schlüssel- fragment
11	288	273	241	215	175
13	316	301	269	243	175
15	344	329	297	271	175

Abb. 4.1.3.11: Wichtigste Ionen in den Massenspektren der ungeradzahligen β -Hydroxycarbonsäuren als Methylester-TMS-ether.

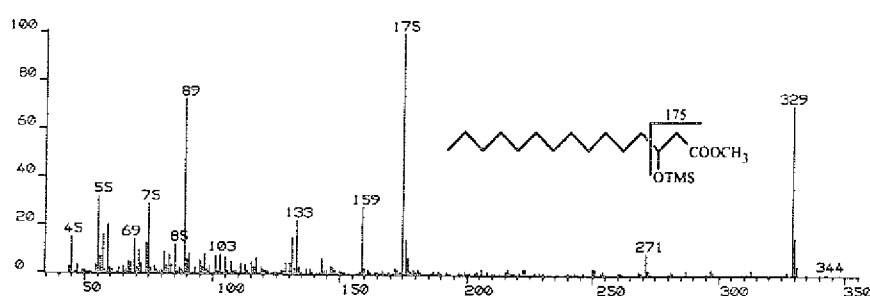


Abb. 4.1.3.12: Massenspektrum von β -Hydroxypentadecanoic acid als Methylester-TMS-ether.

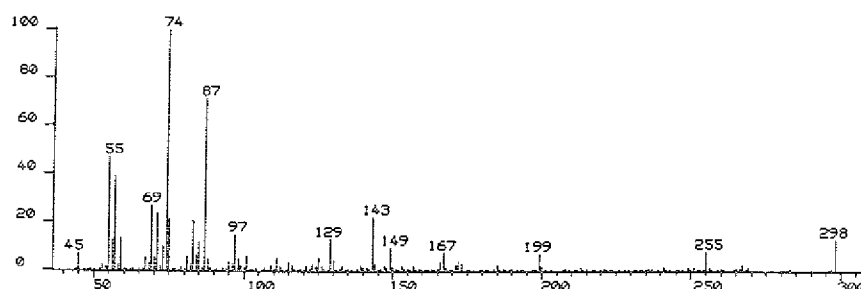


Abb. 4.1.3.13: Massenspektrum von Methylheptadecanoic acid als Methylester (identifiziert aufgrund des Fragmentierungsmusters und der gaschromatographischen Retentionszeit).

Nach 25 Tagen

Freier Extrakt

Im freien Extrakt ließen sich nach fünfundzwanzig Tagen außer den schon in der ersten Probe beobachteten Metaboliten keine neuen Degradationsprodukte nachweisen, Un-

terschiede bestehen lediglich in einem geringfügig höheren Anteil der $C_{17:0}$ -Säure an der gesamten Säureverteilung. Im Vergleich zur Konzentration des umgesetzten Ausgangsprodukts ist diese Zunahme jedoch sehr klein. Die Ursache für den niedrigen Gehalt an freier $C_{17:0}$ -Säure ist vermutlich ihr Einbau in die schon nach wenigen Tagen als gelb-orange gefärbtes Aggregat im Probengefäß schwimmenden Wachsester (siehe Seite 53). Auch in dieser Probe dominiert unter den freien Metaboliten das n - $C_{17:1}$ -Alken.

Verseifter Extrakt

Der verseifte Extrakt enthält nur geringe Mengen an $C_{17:0}$ -Säure, wesentlich weniger als die unverseifte Probe. Auch das $C_{17:1}$ -Alken liegt nur noch in geringer Konzentration vor.

Stattdessen tritt eine Vielzahl von Verbindungen auf, für die der Basispeak m/z 59 charakteristisch ist, die jedoch nicht identifiziert werden konnten. Es handelt sich möglicherweise um Kontaminationen.

Der weitere Abbau der primär gebildeten $C_{17:0}$ -Säure ist zu diesem Zeitpunkt entweder schon so weit fortgeschritten, daß niedrigmolekulare Säuren entstanden sind, die sich dem gaschromatographisch/massenspektrometrischen Nachweis entzogen haben, oder es hat in erster Linie ein Einbau der Metaboliten in die Wachsester stattgefunden.

Nach 53 Tagen

Freier Extrakt

Nach dreiundfünfzig Tagen lassen sich im freien Extrakt mit Ausnahme des $C_{17:1}$ -Alkens keine Abbauprodukte nachweisen (Abb. 4.1.3.14). Die beträchtliche Menge an 12-Hydroxy- $C_{18:0}$ -Säure (Abb. 4.1.3.15) stammt wahrscheinlich aus den Bakterien selbst. Das gesamte Verteilungsmuster deutet darauf hin, daß gleichzeitig sowohl ein vollständiger Abbau der sauerstoffhaltigen primären Metaboliten zu CO_2 und H_2O als auch ein Ein-

bau in die festen Wachsester erfolgt ist. Diese Umwandlungen laufen offensichtlich schneller ab als der weitere Angriff auf das Ausgangsprodukt, denn dieses liegt immer noch in erheblicher Konzentration vor.

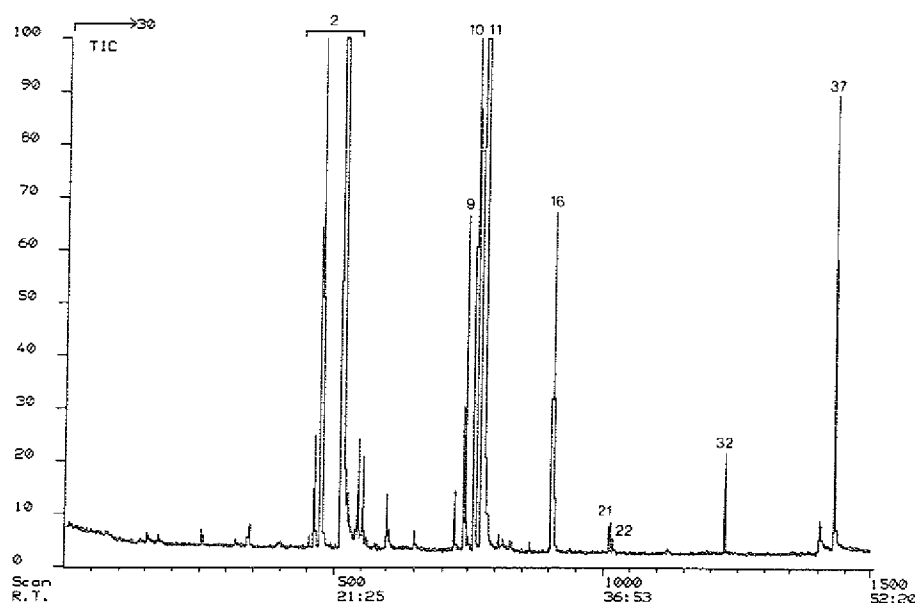


Abb. 4.1.3.14: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des freien Extrakts des Heptadecan-Abbaus nach 53 Tagen

(2: Kontamination (u.a. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 9: Heptadecen, 10: Kontamination (wie 2, aber silyliert), 11: Heptadecan, 16: Kontamination (Phytan), 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 22: Kontamination (Phthalat), 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 37: 12-Trimethylsiloxyoctadecancarbonsäuremethylester).

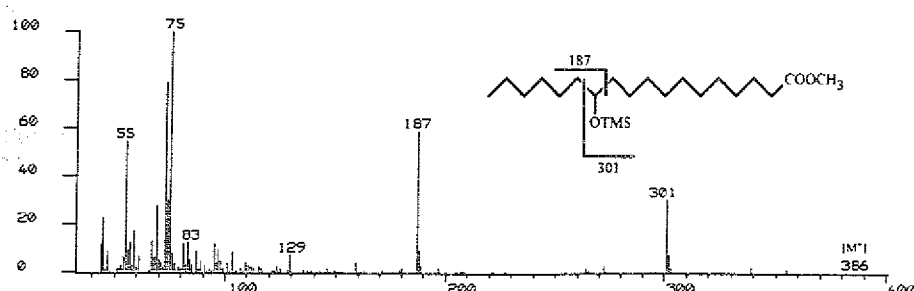


Abb. 4.1.3.15: Massenspektrum von 12-Hydroxyoctadecancarbonsäure als Methylester-TMS-ether.

Verseifter Extrakt

Im verseiften Extrakt sind nur wenige Abbauprodukte zu finden (Abb. 4.1.3.16). Es sind dies neben dem $C_{17:1}$ -Alken die $C_{15:0}$ - und die $C_{17:0}$ -Säure. Im niedrigmolekularen Bereich eluieren außerdem zwei unbekannte Verbindungen mit Basispeak m/z 73 und Molekülmassen der Massen m/z 308 bzw. m/z 324. Die 12-Hydroxy- $C_{18:0}$ -Säure tritt ebenfalls auf, allerdings in geringerer Relativkonzentration als im unverseiften Extrakt.

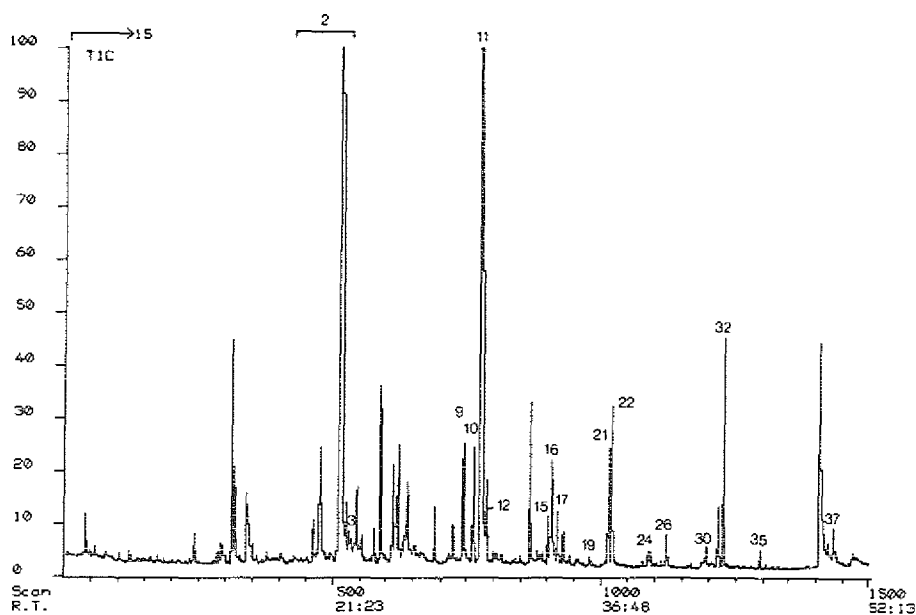


Abb. 4.1.3.16: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des Heptadecan-Abbaus nach 53 Tagen

(2: Kontamination (u.a. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 3: Dodecancarbonsäuremethylester, 9: Heptadecen, 10: Kontamination (wie 2, aber silyliert), 11: Heptadecan, 12: Tetradecancarbonsäuremethylester, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 16: Kontamination (Phytan), 17: Kontamination (Phthalat), 19: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 22: Kontamination (Phthalat), 24: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 35: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 37: 12-Trimethylsiloxyoctadecancarbonsäuremethylester).

Annähernd gleiche Konzentration wie die $C_{17:0}$ -Säure und die 12-Hydroxy- $C_{18:0}$ -Säure weist eine Reihe homologer Verbindungen auf, bei denen es sich nach der massenspektrometrischen Fragmentierung sowohl um 2-Methyl- als auch um 2-Keto-Säuren handeln könnte, da beide dasselbe Fragmentierungsmuster besitzen. Aufgrund der relativen Retentionszeit wird das Vorliegen von methylverzweigten Säuren jedoch favorisiert. Die Säuren enthalten 16, 17 und 18 Kohlenstoffatome und zeichnen sich durch Fragmentionen der Massen m/z 88 und m/z 101 aus (Abb. 4.1.3.17).

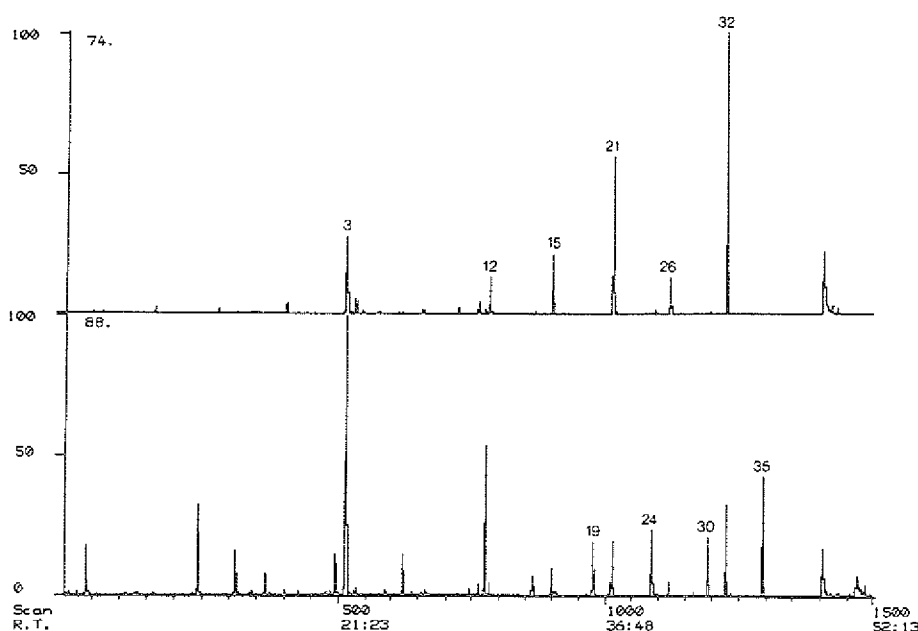


Abb. 4.1.3.17: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (3: Dodecancarbonsäuremethylester, 12: Tetradecancarbonsäuremethylester, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 35: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester).

Auch bei dieser Probe läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden, welcher Anteil des Substrats veratmet und welcher Anteil der Abbauprodukte in die Wachsester eingebaut wurde, da infolge der Konsistenz und schlechten Löslichkeit eine Quantifizierung nicht durchgeführt wurde.

Wachsester

Bereits nach wenigen Tagen traten in allen Proben gelb-orange gefärbte Aggregate auf, die durch GC/MS-Analysen als Wachsester identifiziert wurden. In den Wachsesteraggregaten waren wegen ihrer Lipophilie auch größere Mengen an niedermolekularen organischen Substanzen eingeschlossen. Dabei handelte es sich sowohl um einen Teil der Ausgangssubstanz als auch um Metaboliten.

Unverseifte Wachsester

Die unverseiften Wachsester enthalten neben dominierenden niedermolekularen Komponenten wie dem $C_{17:1}$ -Olefin, den freien $C_{15:0}$ - und $C_{17:0}$ -Säuren sowie der freien $C_{17:1}$ -Säure nur wenige höhermolekulare Bestandteile, die eindeutig dem C_{17} -Substrat zugeordnet werden können. Es sind dies $C_{15:0}$ -Säure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester, $C_{17:0}$ -Säure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester und $C_{17:1}$ -Säure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester (Abb. 4.1.3.18-4.1.3.20), zudem einige Substanzen, die wegen ihrer um 40-50 u höheren Molekülmassen als C_{17} -Alkohol- C_{17} -Säure-Ester mit zusätzlichen Substituenten angesehen werden, bei denen es sich beispielsweise um OH- oder OCH_3 -Gruppen handeln könnte. Eine Strukturaufklärung war wegen des zu geringen Signal/Rausch-Verhältnisses der Spektren nicht möglich. Insgesamt waren die Wachsester wegen ihrer geringen Löslichkeit bei der Analyse gegenüber den okkludierten niedermolekularen Begleitsubstanzen unterrepräsentiert.

Die geringe Löslichkeit der Wachsester deutet ebenfalls darauf hin, daß auch höher vernetzte Substanzen vorliegen als die zuvor beschriebenen. Nach den Ergebnissen, die durch die Verseifung der Wachsester erhalten wurden (Monomere mit zwei funktionellen Gruppen, z.B. Hydroxycarbonsäuren), erscheint dies durchaus möglich. Diese hochmolekularen Substanzen haben sich jedoch einer direkten Analyse im unverseiften Zustand wegen ihrer zu geringen Löslichkeit und Flüchtigkeit entzogen.



Abb. 4.1.3.18: Massenspektrum des Wachsesters aus $C_{15:0}$ -Carbonsäure und $C_{17:0}$ -Alkohol.

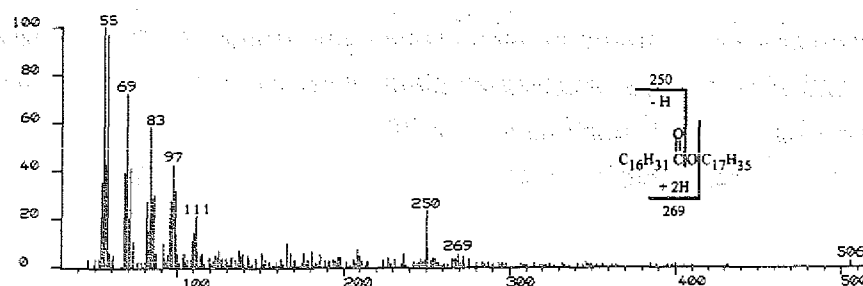


Abb. 4.1.3.19: Massenspektrum des Wachsesters aus $C_{17:1}$ -Carbonsäure und $C_{17:0}$ -Alkohol.

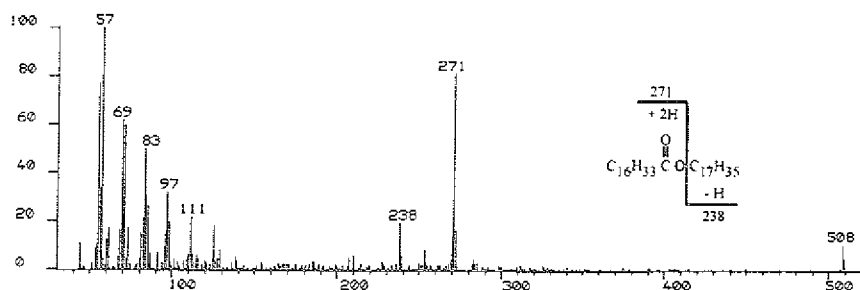


Abb. 4.1.3.20: Massenspektrum des Wachsesters aus $C_{17:0}$ -Carbonsäure und $C_{17:0}$ -Alkohol.

Verseifte Wachsester

Die verseiften Wachsester zeigen ein recht breites Spektrum von Abbauprodukten (Abb. 4.1.3.21).

Ausgehend von dem $C_{17:0}$ -Alkohol (Abb. 4.1.3.22) als dem vermutlich ersten Abbauprodukt hat sich durch Oxidation zunächst die $C_{17:0}$ -Säure gebildet und aus dieser durch schrittweise β -Oxidation dann eine homologe Reihe ungeradzahlgiger Säuren bis hinunter zur $C_{11:0}$ -Säure. Daneben entstand aber auch die einfach ungesättigte $C_{17:1}$ -Säure. Dominierend in der gesamten Säureverteilung sind die in annähernd gleicher, relativ hoher Konzentration vorliegenden $C_{17:0}$, $C_{17:1}$ und $C_{15:0}$ -Säuren.

Die β -Hydroxysäuren sind die erste Stufe der sekundären Oxidation der zunächst gebildeten Carbonsäuren auf dem Weg zur (weiteren) Kettenverkürzung. Die nachfolgende Oxidationsstufe, die Ketocarbonsäuren, lassen sich dagegen nicht fassen, da sie spontan Kohlendioxid abspalten. Auch bei den β -Hydroxycarbonsäuren existiert eine homologe Reihe, die die β -Hydroxy- $C_{17:0}$ -Säure (Abb. 4.1.3.23) und die durch Kettenabbau aus dieser entstandenen β -Hydroxy- $C_{15:0}$, β -Hydroxy- $C_{13:0}$ und β -Hydroxy- $C_{11:0}$ -Säuren umfaßt. Die Konzentrationen der Hydroxysäuren nehmen mit abnehmender Kettenlänge zu. Das Massenchromatogramm des für β -Hydroxy-Säuren als Methylester-TMS-ether typischen Fragmentions m/z 175 ist Abb. 4.1.3.24 zu entnehmen.

Die 3-Methoxysäuren, ebenfalls eine homologe Reihe mit $C_{11:0}$, $C_{13:0}$, $C_{15:0}$ und $C_{17:0}$ -Säure (Abb. 4.1.3.25), könnten eventuell während der Veresterung der β -Hydroxysäuren durch gleichzeitige Methylierung der Hydroxygruppe entstanden sein. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß dieser Prozeß auch in den Organismen stattfindet.

Massenspektrometrische Daten zur Fragmentierung der 3-Methoxycarbonsäuren als 3-Methoxycarbonsäuremethylester sind in Abb. 4.1.3.26 zusammengestellt. Das Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions m/z 117 findet sich in Abb. 4.1.3.24.

Methyl- oder Keto- $C_{17:0}$ -Säure und 2-Methyl- oder 2-Keto- $C_{17:1}$ -Säure repräsentieren eine andere Klasse von Metaboliten.

Die geradzahligen Säuren sind wohl (vorwiegend) als Kontaminationen oder Eintrag aus der Biomasse der Mikroorganismen zu sehen.

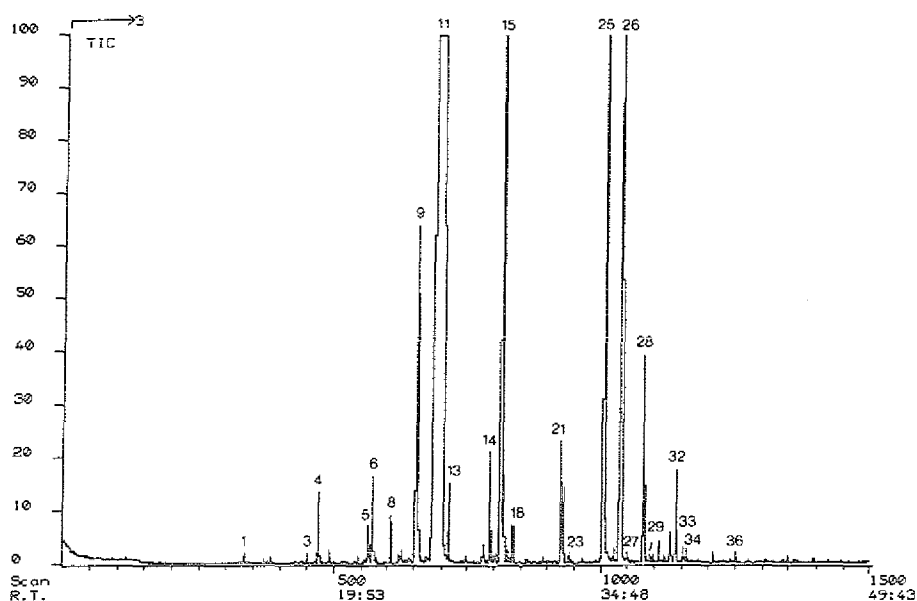


Abb. 4.1.3.21: Totalionenstromchromatogramm (TIC) der verseiften Wachsester

(1: Undecancarbonsäuremethylester, 3: Dodecarbonsäuremethylester, 4: 3-Methoxyundecancarbonsäuremethylester, 5: Hexadecan, 6: Tridecarbonsäuremethylester, 8: β -Trimethylsiloxundecancarbonsäuremethylester, 9: Heptadecen, 11: Heptadecan, 13: 3-Methoxytridecarbonsäuremethylester, 14: Pentadecancarbonsäuremethylester, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 18: β -Trimethylsiloxypentadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: 3-Methoxypentadecancarbonsäuremethylester, 25: Heptadecancarbonsäuremethylester, 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxypentadecancarbonsäuremethylester, 28: Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 29: Heptadecanoltrimethylsilylether, 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 33: 3-Methoxyheptadecancarbonsäuremethylester, 34: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 36: β -Trimethylsiloxyheptadecancarbonsäuremethylester).

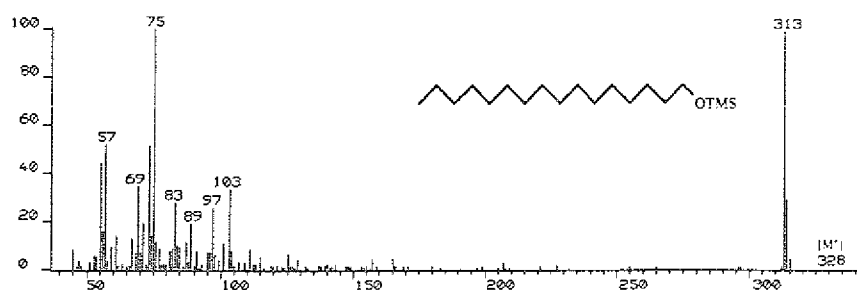


Abb. 4.1.3.22: Massenspektrum von Heptadecanol als TMS-Ether.

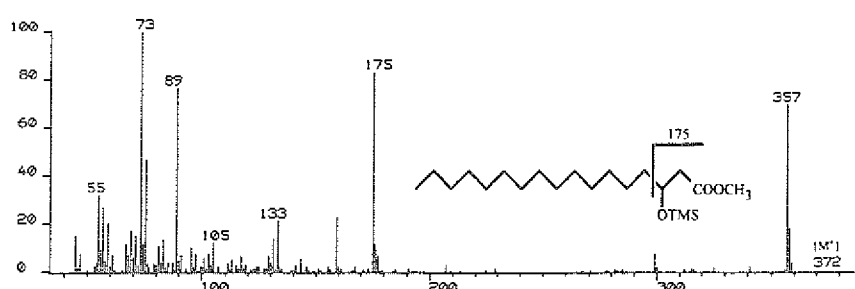
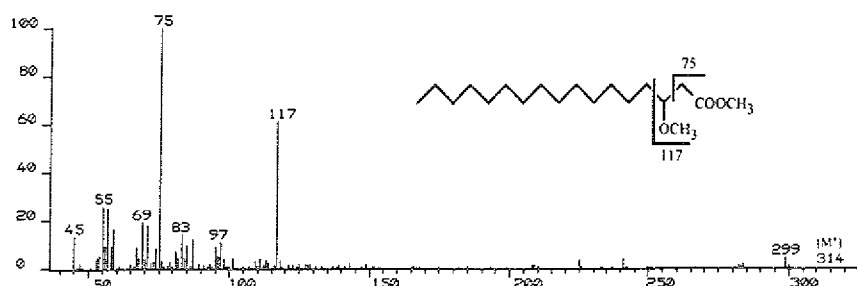
Abb. 4.1.3.23: Massenspektrum von β -Hydroxyheptadecanocarbonsäure als Methylester-TMS-ether.

Abb. 4.1.3.25: Massenspektrum von 3-Methoxyheptadecanocarbonsäure als Methylester.

Kohlenstoff- zahl	M^+	M-15	Schlüssel- fragment
11	230	215	117
13	258	243	117
15	286	271	117
17	314	299	117

Abb. 4.1.3.26: Wichtigste Ionen in den Massenspektren der ungeradzahligen (C_{11} - C_{17}) 3-Methoxycarbon-säuren als Methylester.

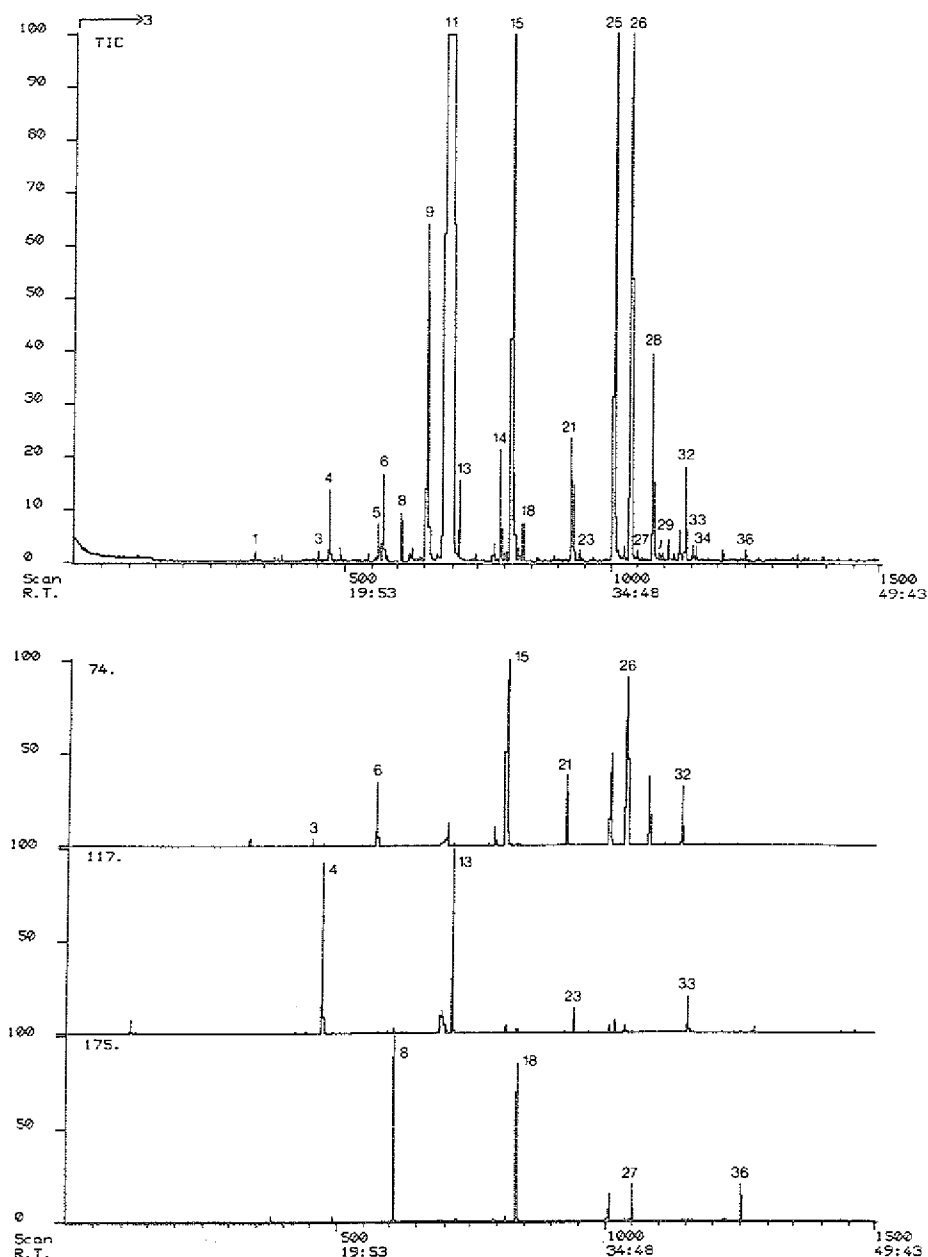


Abb. 4.1.3.24: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74), für 3-Methoxycarbonsäuren als Methylester (m/z 117) und für β -Hydroxycarbonsäuren als Methylester-TMS-ether (m/z 175)

(1: Undecancarbonsäuremethylester, 3: Dodeancarbonsäuremethylester, 4: 3-Methoxyundecancarbonsäuremethylester, 5: Hexadecan, 6: Trideancarbonsäuremethylester, 8: β -Trimethylsiloxyundecancarbonsäuremethylester, 9: Heptadecen, 11: Heptadecan, 13: 3-Methoxytrideancarbonsäuremethylester, 14: Pentadecancarbonsäuremethylester, 15: Pentadecancarbonsäuremethylester, 18: β -Trimethylsiloxytrideancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: 3-Methoxypentadecancarbonsäuremethylester, 25: Heptadecancarbonsäuremethylester, 26: Heptadecancarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxy-pentadecancarbonsäuremethylester, 28: Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 29: Heptadecanoltrimethylsilylether, 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 33: 3-Methoxyheptadecancarbonsäuremethylester, 34: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 36: β -Trimethylsiloxyheptadecancarbonsäuremethylester).

4.2 *n*-Heneicosan

4.2.1 Versuchsbedingungen

Es wurden zwei Versuchsreihen (A und B) zum Abbau von *n*-Heneicosan (approx. 99 %) der Firma Sigma durchgeführt.

Versuchsreihe A bestand aus sieben parallelen Ansätzen mit je 20 mg Heneicosan auf 100 ml Mineralmedium der unter 4.1.1 (siehe Seite 40) angegebenen Zusammensetzung. Die Kulturen mit *Acinetobacter junii* wurden bei Raumtemperatur (20 °C) inkubiert. Die erste Probe wurde nach fünf Tagen genommen, die darauffolgenden jeweils im Abstand von zwei Tagen, so daß sich diese Versuchsreihe über einen Zeitraum von insgesamt achtzehn Tagen erstreckte.

Versuchsreihe B umfaßte zwei parallele Ansätze mit ebenfalls 20 mg Heneicosan auf 100 ml Mineralmedium. Die Inkubationstemperatur war wegen der schlechten Löslichkeit bzw. Suspendierbarkeit des Heneicosans auf 30 °C erhöht worden. Die Probennahme erfolgte nach dreißig Tagen und nach dreiundsiebzig Tagen.

Das *n*-Heneicosan enthält nach massenspektrometrischen Daten geringe Anteile von Alkanen, vor allem von *n*-C₁₇, *n*-C₁₈ und *n*-C₁₉, sowie vier Isomere von C₂₁-Ketonen.

Die Probenaufbereitung und die Analyse der Proben erfolgten wie unter 4.1.2 (siehe Seite 41) und 4.1.3 (siehe Seite 42) beschrieben.

4.2.2 Ergebnisse

Versuchsreihe A

Innerhalb dieser Versuchsreihe war bei der längsten Versuchsdauer (17 Tage) selbst im verseiften Extrakt nur wenig Umsatz zu verzeichnen (Abb. 4.2.2.1). Es wurden in relativ geringer Konzentration zahlreiche stärker abgebaute Verbindungen, insbesondere Säuren, Hydroxysäuren und Alkohole, nachgewiesen.

Die gesättigten ungeradzahligen Säuren bilden eine homologe Reihe, die von C_{9:0} über

$C_{11:0}$, $C_{13:0}$, $C_{15:0}$ und $C_{17:0}$ bis zu $C_{19:0}$ reicht. Außerdem treten als einfach ungesättigte Säuren die $C_{17:1}$ - und die $C_{19:1}$ -Säure auf.

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Hydroxycarbonsäuren. Von diesen konnten jedoch nur die α -Hydroxy- $C_{10:0}$ -Säure und die β -Hydroxy- $C_{12:0}$ -Säure identifiziert werden, die anderen Spektren ließen keine exakte Bestimmung zu.

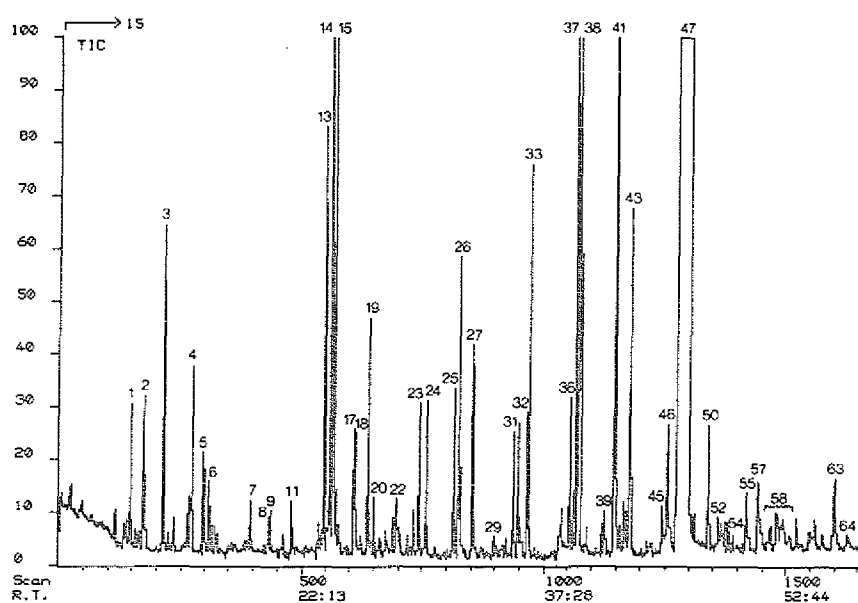


Abb. 4.2.2.1: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe A nach 17 Tagen

(1: 3-Methoxyheptancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester + Kontamination (Benzothiazol), 3: 6-Trimethylsiloxyheptancarbonsäuremethylester, 4: Trimethylsiloxycarbonsäuremethylester?, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: Trimethylsiloxycarbonsäuremethylester?, 7: Trimethylsiloxycarbonsäuremethylester? (homolog zu 6), 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: Kontamination (Phthalsäuredimethylester), 11: unbekannt (m/z 245,201,106,89,73,59,45 BP), 13: Kontamination (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 14: Kontamination: (p-Toluolsulfonsäureethylester aus Diazomethanherstellung), 15: Dodecancarbonsäuremethylester, 17: α -Trimethylsiloxydodecancarbonsäuremethylester, 18: unbekannt (m/z 278,263,215,73 BP), 19: Kontamination (2-(Methylthio)-benzothiazol), 20: Dodecanoltrimethylsilylether, 22: Tridecancarbonsäuremethylester, 23: unbekannt (m/z 350,262,73 BP), 24: Kontamination (p-Toluolsulfonsäure-N-ethylmethylanilid aus Diazomethanherstellung), 25: n -Heptadecan, 26: Tetradecancarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxydodecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecanoltrimethylsilylether, 31: n -Octadecan, 32: Pentadecancarbonsäuremethylester, 33: Kontamination (Phthalat), 36: n -Nonadecan, 37: Hexadecancarbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 39: Hexadecanoltrimethylsilylether, 41: Heptadecancarbonsäuremethylester, 43: Heptadecancarbonsäuremethylester, 45: n -Heneicosen, 46: Octadecancarbonsäuremethylester, 47: n -Heneicosan, 50: Octadecanoltrimethylsilylether, 52: Nonadecancarbonsäuremethylester, 54: Nonadecancarbonsäuremethylester, 55: Trimethylsiloxycarbonsäuremethylester, 57: unbekannt (m/z 155,141,127,113,85,71,57 BP), 58: Heneicosanone, 63: Heneicosenoltrimethylsilylether, 64: Heneicosanoltrimethylsilylether).

Da neben diesen geradzahligen Hydroxycarbonsäuren auch geradzahlige Alkohole vorkommen, stellt sich die Frage, ob wegen der schlechten Löslichkeit des Heneicosans eventuell ein anderer Abbauweg eingeschlagen wurde (α -Oxidation?) oder ob es sich bei

diesen Verbindungen doch nur um Kontaminationen handelt.

Versuchsreihe B

Nach 30 Tagen

Freier Extrakt

Im freien Extrakt lassen sich nur $C_{17:0}$ - und $C_{15:0}$ -Säure und $C_{21:1}$ -Alken als Abbauprodukte nachweisen und auch sie nur in sehr geringer Konzentration (Abb. 4.2.2.2.).

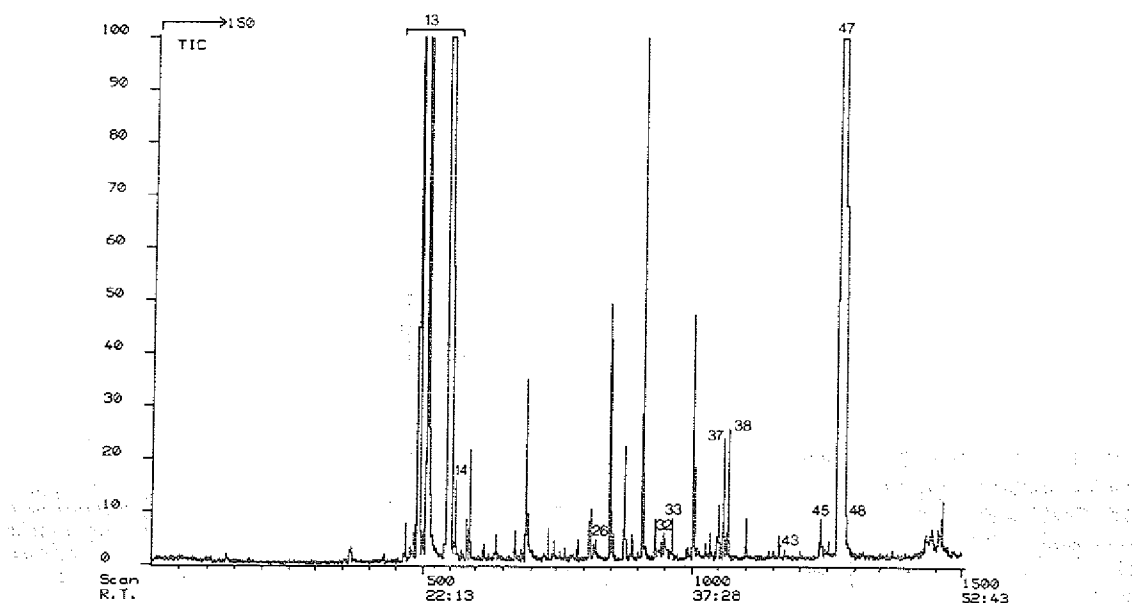


Abb. 4.2.2.2: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des freien Extrakts des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe B nach 30 Tagen

(13: Kontamination (u.a. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 14: Kontamination (p-Toluolsulfonsäureethylester aus Diazomethanherstellung), 26: Tetradecanocarbonsäuremethylester, 32: Pentadecanocarbonsäuremethylester, 33: Kontamination (Phthalat), 37: Hexadecanocarbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 43: Heptadecanocarbonsäuremethylester, 45: *n*-Heneicosen, 47: *n*-Heneicosan, 48: Octadecanocarbonsäuremethylester).

Verseifter Extrakt

Im Gegensatz zum freien Extrakt enthält der verseifte ein etwas breiteres Spektrum an Metaboliten (Abb. 4.2.2.3). So ließ sich neben den normalen Fettsäuren eine Reihe von Säuren verzweigter Alkane nachweisen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß es sich bei diesen *iso*-Säuren um Bakterieninhaltsstoffe handelt und nicht um Abbauprodukte des Heneicosans. Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es zumindest keine Anhaltspunkte für die Bildung von *iso*-Säuren während des Degradationsprozesses. Ihre massenspektrometrische Fragmentierung unterscheidet sich nicht von der der normalen Fettsäuren. Sie haben allerdings wegen ihrer Kettenverzweigung bei gleicher Kohlenstoffzahl kürzere Retentionszeiten als die *n*-Carbonsäuren.

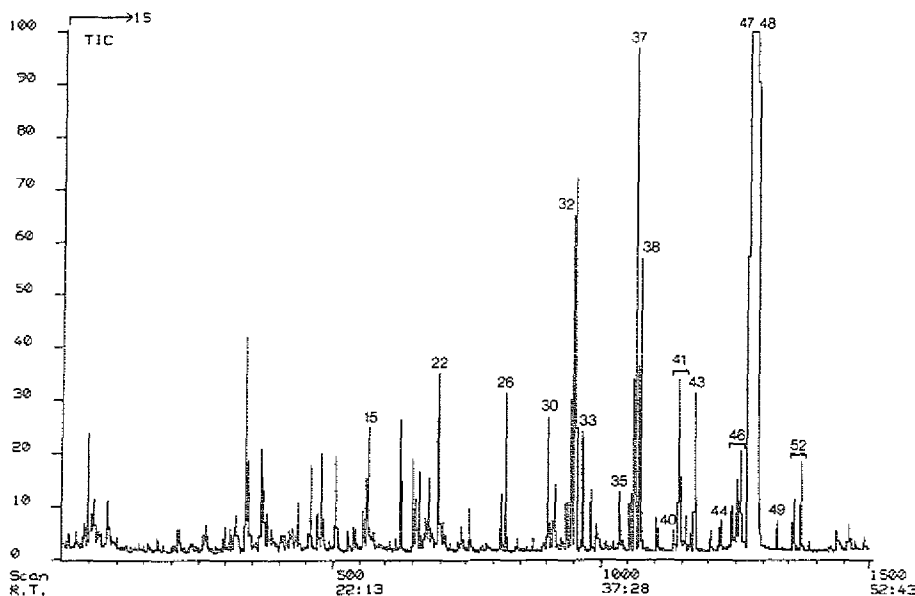


Abb. 4.2.2.3: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe B nach 30 Tagen

(15: Dodecancarbonsäuremethylester, 22: Tridecancarbonsäuremethylester + Kontamination (N-Methyltoluolsulfonamid), 26: Tetradecancarbonsäuremethylester, 30: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 32: Pentadecancarbonsäuremethylester, 33: Kontamination (Phthalat), 35: Hexadecancarbonsäuremethylester, 37: Hexadecancarbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 40: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 41: Heptadecancarbonsäuremethylester, 43: Heptadecancarbonsäuremethylester, 44: *iso*-Octadecancarbonsäuremethylester, 46: Octadecancarbonsäuremethylester, 47: *n*-Heneicosan, 48: Octadecancarbonsäuremethylester, 49: *iso*-Nonadecancarbonsäuremethylester, 52: Nonadecancarbonsäuremethylester).

Nach 73 Tagen

Freier Extrakt

Das Totalionenstromchromatogramm des freien Extrakts (Abb. 4.2.2.4) zeigt recht deutlich, daß nach dreiundsiebzig Tagen nur noch sehr wenig Heneicosan vorhanden war. Abbauprodukte ließen sich allerdings kaum nachweisen. Daher ist zu vermuten, daß nur ein kleiner Teil des Heneicosans mikrobiell abgebaut wurde und die Konzentration der entstandenen Metaboliten infolgedessen unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Der größere Teil des Substrats wurde wahrscheinlich von den Wachsester adsorbiert oder eingeschlossen und somit weiterem Abbau entzogen. Dadurch ließe sich zumindest der recht hohe Gehalt an n -C₂₁-Alkan bei der Aufarbeitung und Analyse der Wachsester erklären.

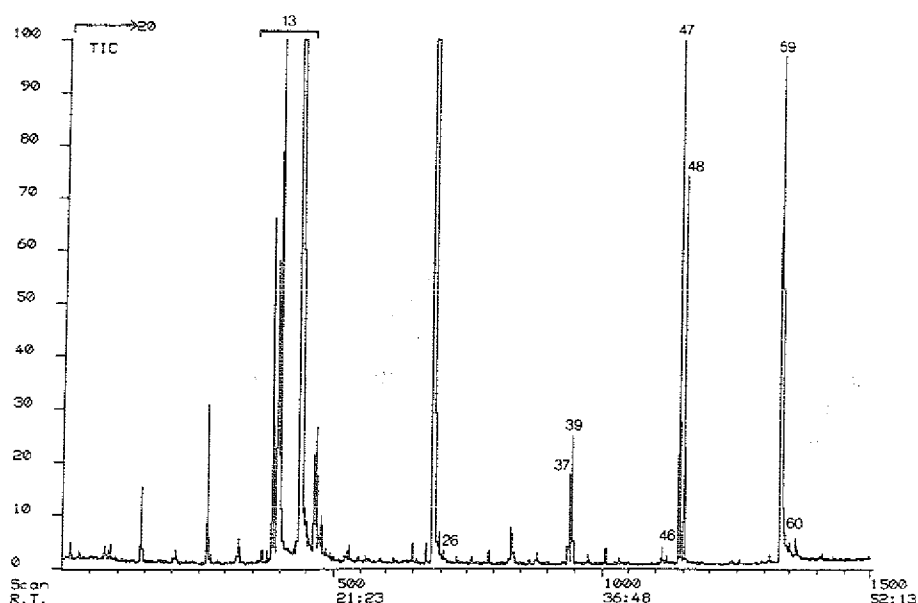


Abb. 4.2.2.4: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des freien Extrakts des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe B nach 73 Tagen

(13: Kontamination (u.a. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 26: Tetradecan-carbonsäuremethylester, 37: Hexadecan-carbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 46: Octadecan-carbonsäuremethylester, 47: n -Heneicosan, 48: Octadecan-carbonsäuremethylester, 59: Eicosen-carbonsäuremethylester, 60: Eicosan-carbonsäuremethylester).

Verseifter Extrakt

Auch im verseiften Extrakt lassen sich kaum Abbauprodukte finden (Abb. 4.2.2.5).

Obleich der Totalionenstrom den Eindruck vermittelt, es habe ein weitgehender Abbau des Substrats stattgefunden, ist dies vermutlich aus den zuvor diskutierten Gründen auch hier nicht der Fall.

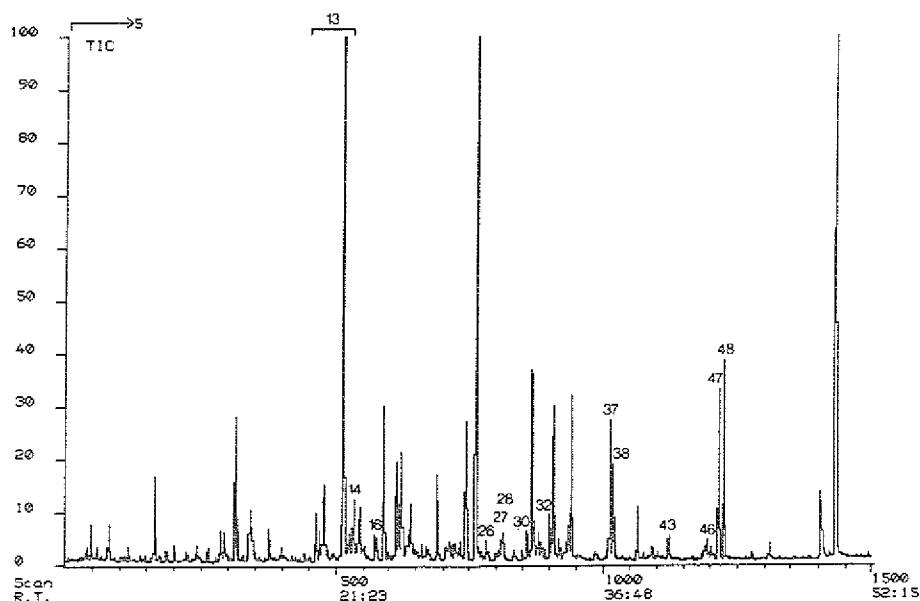


Abb. 4.2.2.5: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe B nach 73 Tagen

(13: Kontamination (u.a. 2,6 Di-*tert*-butyl-4-methylphenol aus Ether), 14: Kontamination (p-Toluolsulfonsäureethylester aus Diazomethanherstellung), 16: β -Trimethylsiloxydecancarbonsäuremethylester, 26: Tetradeccancarbonsäuremethylester, 27: β -Trimethylsiloxydodeccancarbonsäuremethylester, 28: α -Trimethylsiloxydodeccancarbonsäuremethylester, 30: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 32: Pentadecancarbonsäuremethylester, 37: Hexadecancarbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 43: Heptadecancarbonsäuremethylester, 46: Octadecancarbonsäuremethylester, 47: *n*-Heneicosan, 48: Octadecancarbonsäuremethylester).

Wachsester

Die Analysenergebnisse der verseiften Wachsester sprechen dafür, daß das Heneicosan auch nach dreiundsiebzig Tagen nur in sehr begrenztem Umfang von den Mikroorganismen veratmet wurde. Das eingesetzte Substrat ist noch immer so reichlich vorhanden, daß die Konzentrationen der Degradationsprodukte lediglich in der Größenordnung der Verunreinigungen der Reinsubstanz liegen.

Es sei nochmals daran erinnert, daß *n*-Alkane und Ketone als Kontaminationen des Heneicosans eingeschleppt wurden.

Angeichts der Tatsache, daß es sich bei den *iso*-Säuren wohl weniger um Abbau-
produkte, sondern vielmehr um durch Hydrolyse freigesetzte Bakterieninhaltsstoffe
handelt, bleiben als Metaboliten neben den unbekannten Verbindungen letztlich nur die
n-Alkansäuren.

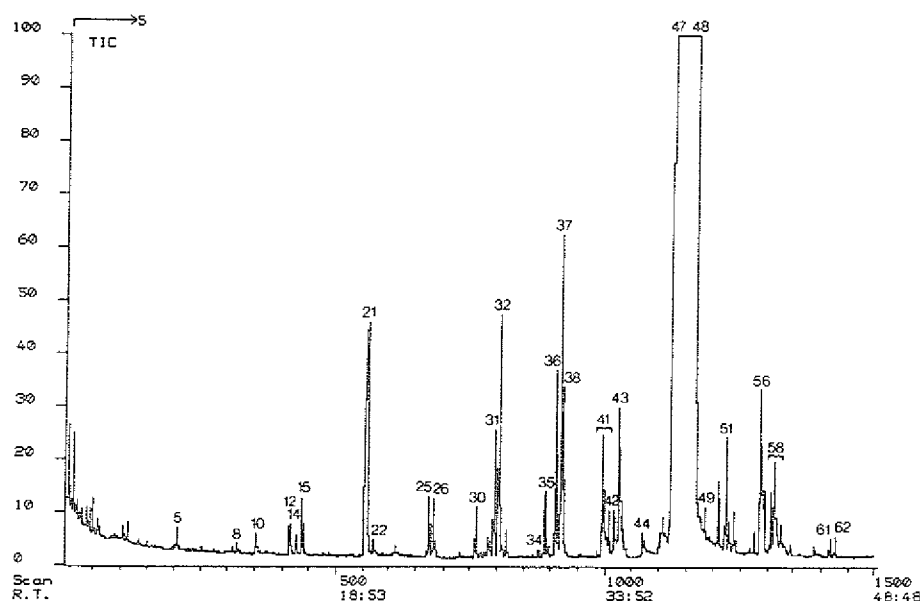


Abb. 4.2.2.6: Totalionenstromchromatogramm (TIC) der verseiften Wachsester des Heneicosan-Abbaus aus der Versuchsreihe B

(5: Decanocarbonsäuremethylester, 8: Undecanocarbonsäuremethylester, 10: unbekannt (m/z 153,103 BP,74,71,69), 12: Kontamination (2,4-Di-*tert*-butylphenol), 14: Kontamination (*p*-Toluolsulfonsäureethylester aus Diazomethanherstellung), 15: Dodecanocarbonsäuremethylester, 21: Kontamination (*p*-Toluolsulfonsäure-*N*-methyramid aus Diazomethanherstellung), 22: Tridecanocarbonsäuremethylester, 25: *n*-Heptadecan, 26: Tetradecanocarbonsäuremethylester, 30: *iso*-Pentadecanocarbonsäuremethylester, 31: *n*-Octadecan, 32: Pentadecanocarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Hexadecanocarbonsäuremethylester, 35: Hexadecanocarbonsäuremethylester, 36: *n*-Nonadecan, 37: Hexadecanocarbonsäuremethylester, 38: Kontamination (Phthalat), 41: Heptadecanocarbonsäuremethylester, 42: *n*-Eicosan, 43: Heptadecanocarbonsäuremethylester, 44: *iso*-Octadecanocarbonsäuremethylester, 47: *n*-Heneicosan, 48: Octadecanocarbonsäuremethylester, 49: *iso*-Nonadecanocarbonsäuremethylester, 51: unbekannt (m/z 278,111,97,83,69,55 BP), 53: *iso*-Docosan, 54: Nonadecanocarbonsäuremethylester, 56: *n*-Docosan, 58: Heneicosanone, 61: *n*-Tricosan, 62: Heneicosanocarbonsäuremethylester).

4.3 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan (Phytan)

4.3.1 Versuchsbedingungen

Informationen über das Biodegradationsverhalten von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan puriss. der Firma Roth sollten zwei Versuchsreihen geben. Für beide Experimente wurden Kulturen von *Acinetobacter junii* verwendet und bei 30 °C inkubiert. Unterschiede bestanden lediglich hinsichtlich der Dosierung der Reinsubstanz und der Probennahmeintervalle.

Das für die Experimente verwendete 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan war geringfügig verunreinigt mit Pristan und Norpristan, Isomeren von Phyten und Phytadien, einem verzweigten C₂₀-Alkan, einem C₂₁-Isoprenoid und einer unbekannten Verbindung (Abb. 4.3.1.1).

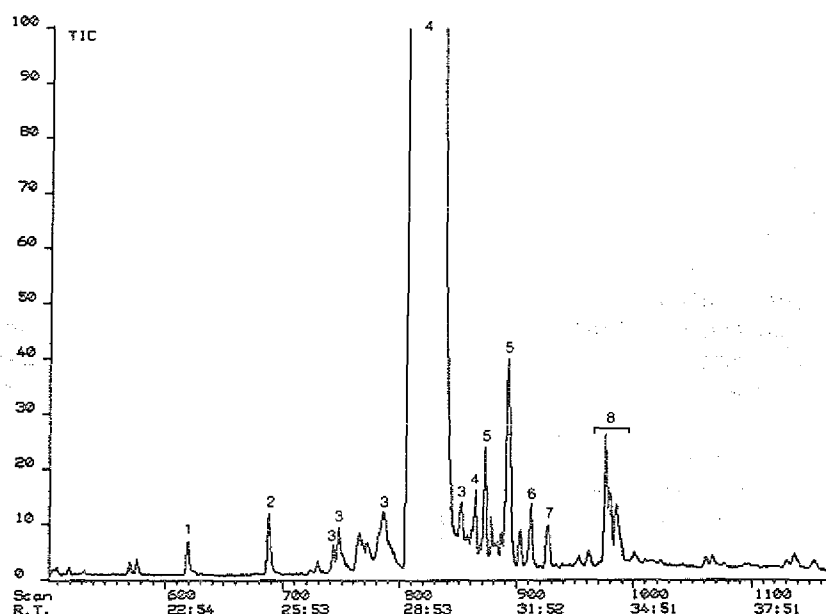


Abb. 4.3.1.1: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des für die Experimente verwendeten 2,6,10,14-Tetramethylhexadecans

(1: 2,6,10-Trimethylpentadecan, 2: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan, 3: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecen (mehrere Isomere), 4: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 5: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecadien (mehrere Isomere), 6: verzweigtes Eicosan, 7: 2,6,10,14-Tetramethylheptadecan, 8: unbekannt ($M^+ = 280$)).

Versuchsreihe A enthielt drei parallele Ansätze mit je 20 µl Phytan auf 100 ml Mineralmedium der in Kap. 4.1.1 (siehe Seite 40) beschriebenen Zusammensetzung. Die Probennahme erfolgte nach 10 Tagen, nach 25 Tagen und nach 53 Tagen.

Zur Versuchsreihe B gehörten sieben parallele Ansätze mit je 60 µl Phytan auf 300 ml

Mineralmedium, die im 24 Stunden-Rhythmus aufgearbeitet wurden. Die Zugabe eines Standards (Squalan) vor der Extraktion ermöglichte die Quantifizierung der neu gebildeten Stoffwechselprodukte.

Probenaufbereitung und Analyse der Proben wie unter 4.1.2 (siehe Seite 41) und 4.1.3 (siehe Seite 42) erläutert.

4.3.2 Ergebnisse

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß im folgenden zwei unterschiedliche Nomenklaturen zur Benennung der sauerstoffhaltigen Metaboliten verwendet werden, einerseits die international gebräuchliche systematische IUPAC-Nomenklatur und andererseits Bezeichnungen auf der Basis des Phytolgerüsts mit vorgegebener Kohlenstoffnumerierung (Abb. 4.3.2.1), deren Verwendung wegen der Einfachheit und wegen der einheitlicheren Beziehung zu einer Stammverbindung (hier Phytol) gelegentlich von Vorteil ist.

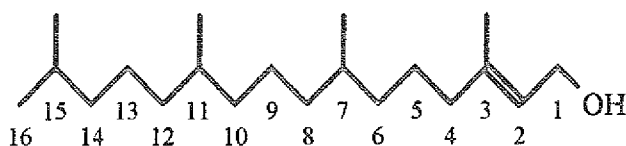


Abb. 4.3.2.1: Strukturformel von Phytol (3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-ol).

Diese "Phytol-Numerierung", bei der das Kohlenstoffatom mit der Hydroxygruppe die Nummer 1 bekommt, wird auch auf Phytan und seine Derivate übertragen. Man spricht von den Alkoholen als den Phytanolen und gibt zur weiteren Differenzierung lediglich an, welches Kohlenstoffatom die OH-Gruppe trägt, wobei die Kohlenstoffatome in der Kette entsprechend der Phytol-Numerierung ihre Positionsbezeichnung beibehalten.

Bei den Carbonsäuren, den Phytansäuren, lassen sich, je nachdem ob die Oxidation am α - oder ω -ständigen Ende des Moleküls (wiederum vom Phytol aus betrachtet) stattgefunden hat, Phytan- und ω -Phytansäure unterscheiden.

Versuchsreihe A

Nach 10 Tagen

Freier Extrakt

Obgleich das Totalionenstromchromatogramm des freien Extrakts ein relativ komplexes Muster zeigt (Abb. 4.3.2.2), läßt sich nach einer Degradationsdauer von zehn Tagen nur ein einziges Abbauprodukt nachweisen, die 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-carbonsäure, auch ω -Phytansäure genannt. Charakteristisch für ihre Massenspektren sind der Basispeak der Masse m/z 88, der durch Bindungsspaltung zwischen den Bindungen an C-2 und C-3 (nach IUPAC-Nomenklatur; C-14 und C-15 nach Phytol-Bezeichnung) entsteht, ein Fragmentation der Masse m/z 101 und das Molekölion der Masse 326 (Abb. 4.3.2.3).

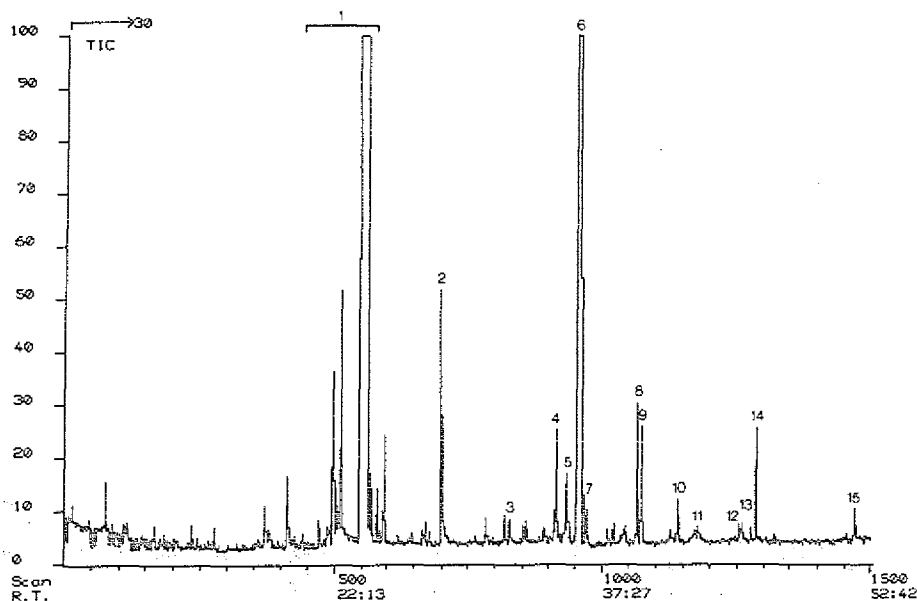


Abb. 4.3.2.2: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des freien Extrakts des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus nach 10 Tagen

(1: Kontamination (Phenole aus Ether), 2: Kontamination (p-Toluolsulfonsäure-N-methylamid aus Diazomethanherstellung), 3: Tetradecan-carbonsäuremethylester, 4: unbekannt (M^+ 268, 253, 57 BP), 5: Kontamination (Phosphatester), 6: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 7: Kontamination (Phthalat), 8: Hexadecan-carbonsäuremethylester, 9: Kontamination (Phthalat), 10: Phytanon ?, 11: Heptadecan-carbonsäuremethylester, 12: Octadecan-carbonsäuremethylester, 13: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-carbonsäuremethylester, 14: Octadecan-carbonsäuremethylester, 15: Eicosan-carbonsäuremethylester).

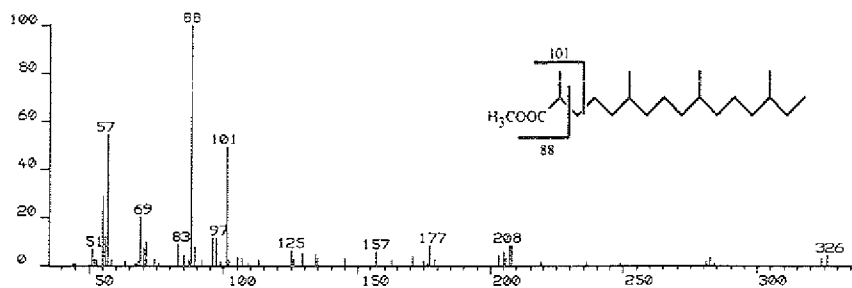


Abb. 4.3.2.3: Massenspektrum von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure (ω -Phytansäure) als Methyl ester.

Verseifter Extrakt

Der verseifte Extrakt (Abb. 4.3.2.4) enthält keine nachweisbaren Mengen an ω -Phytansäure, sondern die durch Oxidation am entgegengesetzten Ende des Moleküls generierte Phytansäure mit Methylgruppen an den Positionen C-3, C-7, C-11 und C-15. Ihr Massenspektrum (Abb. 4.2.3.5) unterscheidet sich von dem der ω -Phytansäure durch den Basispeak der Masse m/z 101, der durch Bindungsspaltung zwischen den Bindungen an C-3 und C-4 entsteht (in diesem Fall decken sich IUPAC- und Phytol-Nomenklatur) und ein charakteristisches Fragmentation der Masse m/z 74. Das Molekülion der Masse m/z 326 bleibt erhalten. Daneben tritt infolge oxidativer Olefinbildung die einfach ungesättigte Phytensäure auf.

Auch im niedrigmolekularen Bereich sind Isoprenoidsäuren zu beobachten, können infolge fehlender Molekülionen allerdings nicht exakt identifiziert werden. Aufgrund der Retentionszeiten liegt die Vermutung nahe, daß es sich um *isoprenoid*-C₁₆-, -C₁₇- und -C₁₈-Säure handelt.

Die Oxidation einer endständigen Methylgruppe führte zur Bildung von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol (Phytan-1-ol), das im Massenspektrum am Basispeak der Masse m/z 103 und an den Fragmentationen der Massen m/z 73,75,83,97,111 und 355 zu erkennen ist (Abb. 4.3.2.6.). Das Molekülion (m/z 370) fehlt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß im verseiften Extrakt nach zehn Tagen mikrobieller Aktivität zwar ein Abbau stattgefunden hat, die Konzentrationen der Metaboliten aber überaus gering sind (siehe Abb. 4.3.2.3).

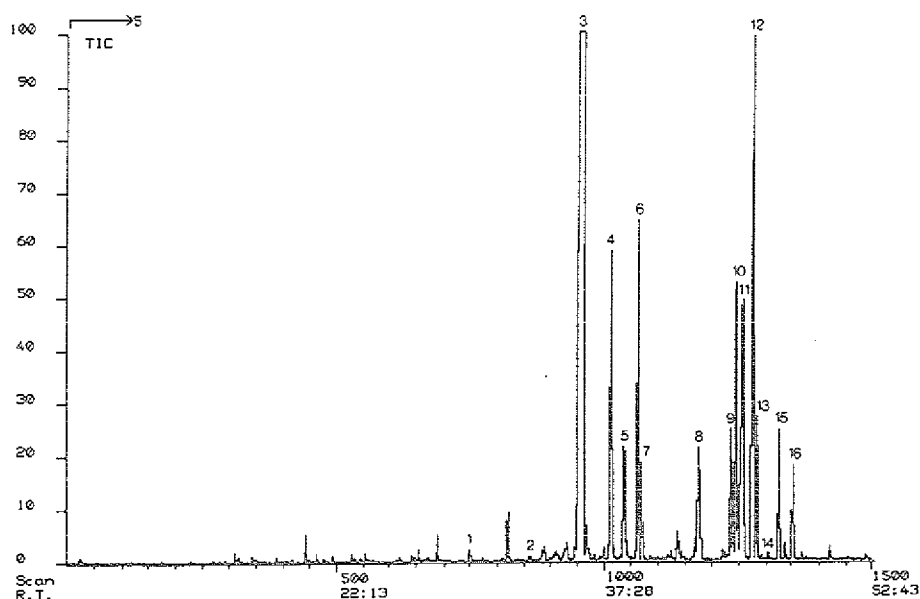


Abb. 4.3.2.4: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus nach 10 Tagen

(1: *isoprenoid*-Carbonsäuremethylester, 2: *isoprenoid*-Carbonsäuremethylester, 3: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 4: *isoprenoid*-Carbonsäuremethylester, 5: unbekannt (282,250,128,69,57 BP), 6: Hexadecan-carbonsäuremethylester, 7: Kontamination (Phthalat), 8: Heptadecan-carbonsäuremethylester, 9: *n*-Heneicosen?, 10: unbekannt (126,111,69,57 BP), 11: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-carbonsäuremethylester, 12: *n*-Heneicosan, 13: Octadecan-carbonsäuremethylester, 14: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol-TMS-ether, 15: *iso*-Nonadecan-carbonsäuremethylester, 16: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-carbonsäuremethylester?).

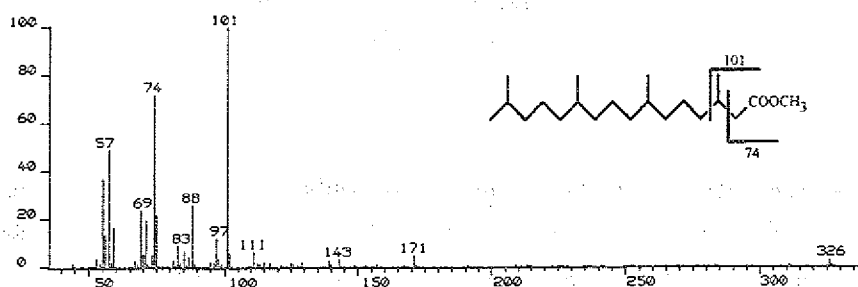


Abb. 4.3.2.5: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-carbonsäure (Phytansäure) als Methylester.

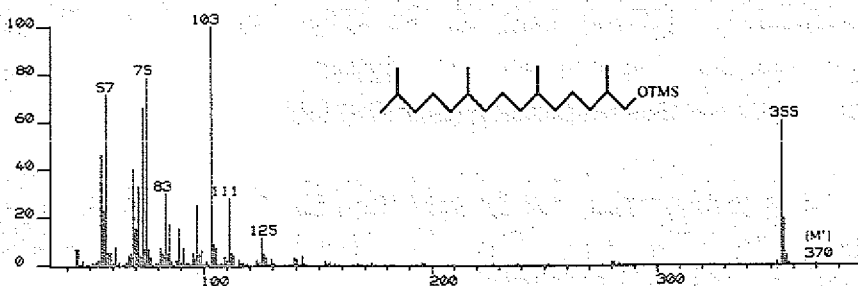


Abb. 4.3.2.6: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol als TMS-Ether.

Nach 25 Tagen

Während das Totalionenstromchromatogramm des freien Extrakts nach fünfundzwanzig Tagen fast exakt dasselbe Bild bietet wie nach zehn Tagen, weist der verseifte Extrakt eine Vielzahl neuer Verbindungen auf, die jedoch nicht identifiziert werden konnten.

Nach 53 Tagen

Freier Extrakt

Obwohl nach 53 Tagen im freien Extrakt noch Substrat vorhanden war, ließen sich keinerlei Abbauprodukte nachweisen.

Verseifter Extrakt

Das Totalionenstromchromatogramm des verseiften Extrakts (Abb. 4.3.2.7) erweckt den Anschein, es habe eine weitgehende Degradation stattgefunden. Die Konzentration des Substrats ist beträchtlich zurückgegangen, und es haben sich Stoffwechselprodukte in nachweisbarer Menge gebildet. Als Metaboliten traten ω -Phytansäure, Phytensäure und Phytan-1-ol auf, allerdings nur in sehr geringer Konzentration. Dominierende Verbindung in dieser Probe ist die 12-Hydroxy- $C_{18:0}$ -Säure. Die Herkunft dieser Säure ist nicht geklärt, es könnte sich aber um einen Bakterieninhaltsstoff handeln.

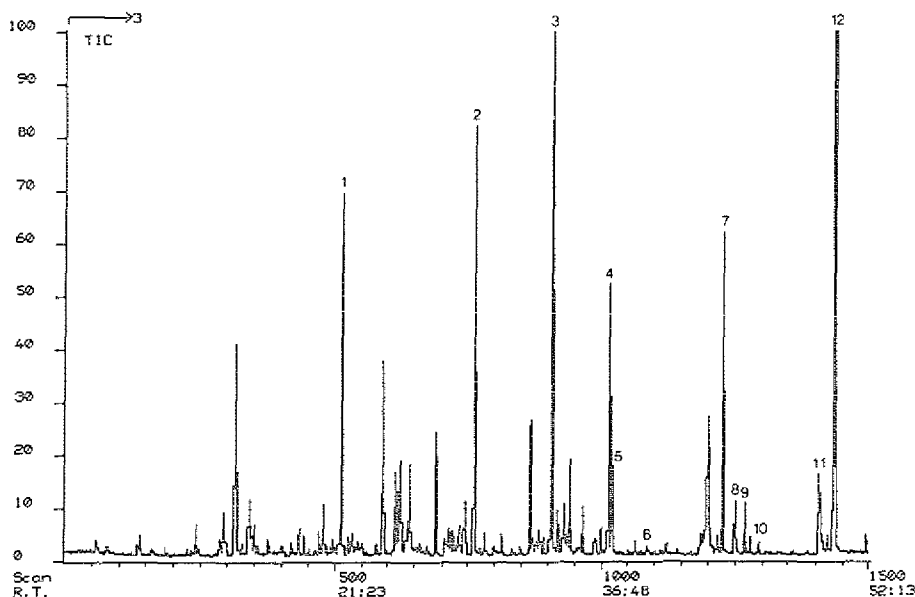


Abb: 4.3.2.7: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus nach 53 Tagen

(1: Kontamination (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 2: Kontamination (wie 1, aber silyliert), 3: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 4: Hexadecanocarbonsäuremethylester, 5: Kontamination (Phthalat), 6: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecanocarbonsäuremethylester, 7: Octadecanocarbonsäuremethylester, 8: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol-TMS-ether, 9: *iso*-Nonadecanocarbonsäuremethylester, 10: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecanocarbonsäuremethylester, 11: Eicosanocarbonsäuremethylester, 12: 12-Trimethylsiloxyoctadecanocarbonsäuremethylester).

Wachsester

In Analogie zu den Experimenten mit *n*-Heptadecan und *n*-Heneicosan ließ sich auch bei der mikrobiellen Degradation des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecans die Bildung fester Reaktionsprodukte in Form von Wachsestern beobachten.

Unverseifte Wachsester: Wie aus dem Totalionenstromchromatogramm der massenspektrometrischen Analyse zu entnehmen ist (Abb. 4.3.2.8), stellt das nicht umgesetzte Substrat als dominierende Komponente einen beträchtlichen Anteil des unverseiften Wachsester-Aggregats dar. Höhermolekulare Bestandteile, die zweifelsohne während des Abbaus generiert wurden, sind diverse Isomere des *isoprenoid*-C_{20:0}-Carbonsäure-*isoprenoid*-C_{20:0}-Alkohol-Esters (Abb. 4.3.2.9) und der *isoprenoid*-C_{20:1}-Carbonsäure-*isoprenoid*-C_{20:0}-Alkohol-Ester (Abb. 4.3.2.10). Zwei weitere Verbindungen, die ebenfalls durch mikrobielle Aktivität entstanden sein dürften, wurden vorbehaltlich als *isopre*-

noid-C_{16:2}-Carbonsäure-*isoprenoid-C_{20:0}*-Alkohol-Ester und *isoprenoid-C_{17:0}*-Carbonsäure-*isoprenoid-C_{20:0}*-Alkohol-Ester bestimmt, da aufgrund der Massenspektren nicht eindeutig festzustellen ist, ob es sich auch tatsächlich um *isoprenoid*-Verbindungen handelt. Der Nachweis isoprenoider Carbonsäuren als Bestandteil der verseiften Wachsester dürfte diese Bestimmung allerdings bestätigen. Die Identifizierung der Wachsester wurde erleichtert durch Massenspektren von Vergleichsverbindungen, die von der Arbeitsgruppe J.W. de Leeuw (TU Delft) synthetisiert worden waren. Als Bildungsmechanismus wird eine Verkürzung der Kohlenstoffkette des Säuremoleküls um drei bzw. vier Kohlenstoffatome am ω - bzw. α -ständigen Ende des Moleküls in Betracht gezogen.

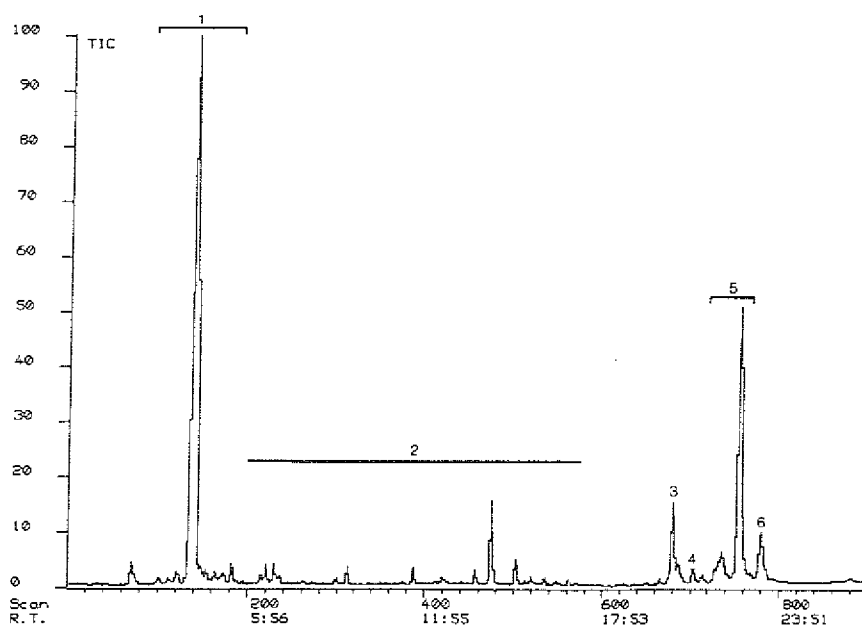


Abb. 4.3.2.8: Totalionenstromchromatogramm (TIC) der unverseiften Wachsester des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus

(1: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan und seine Verunreinigungen, 2: Kontaminationen aus Injektor, 3: *isoprenoid*-Hexadecadiencarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylester, 4: *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylester, 5: *isoprenoid*-Eicosancarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylester (diverse Isomere), 6: *isoprenoid*-Eicosencarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylester).



Abb. 4.3.2.9: Massenspektrum des Wachsesters aus *C_{20:0}*-Carbonsäure und *C_{20:0}*-Alkohol.

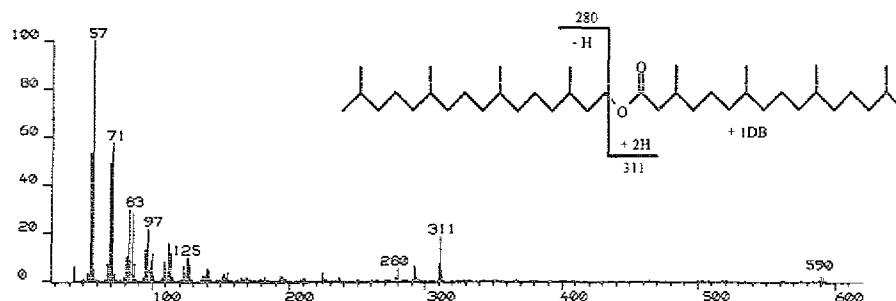


Abb. 4.3.2.10: Massenspektrum des Wachsesters aus $C_{20:1}$ -Carbonsäure und $C_{20:0}$ -Alkohol

Verseifte Wachsester: Durch Hydrolyse gelang es, *isoprenoide* Alkohole und Carbonsäuren aus den Wachsestern freizusetzen. Entsprechend der Hauptkomponente der unverseiften Wachsester, dem *isoprenoid*-Eicosancarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylester, konnten 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäure und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol als dominierende Verbindungen nachgewiesen werden (Abb. 4.3.2.11).

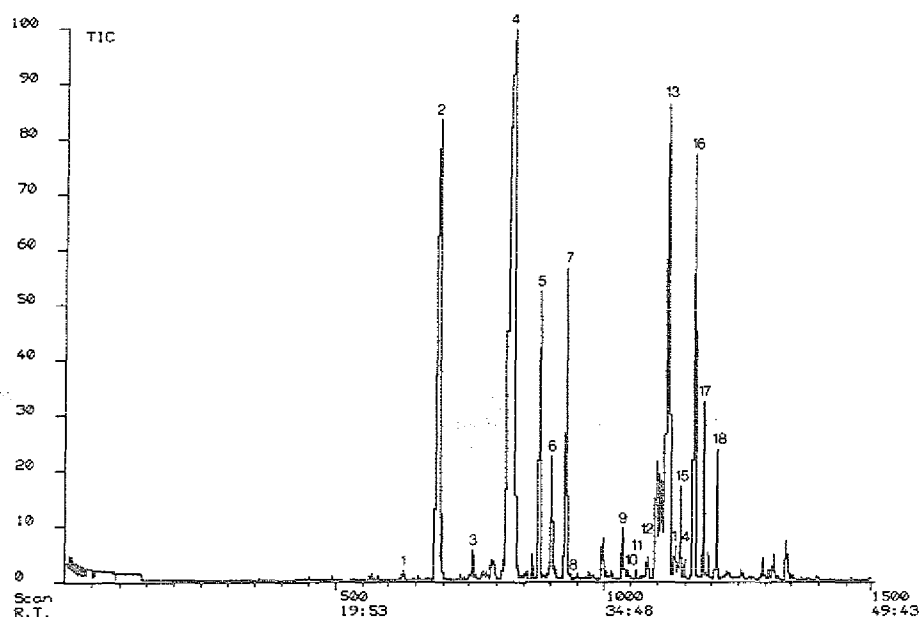


Abb. 4.3.2.11: Totalionenstromchromatogramm (TIC) der verseiften Wachsester des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus

(1: *isoprenoid*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 2: *n*-Heptadecan, 3: *isoprenoid*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 4: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 5: *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 6: *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäuremethylester (?), 7: Hexadecancarbonsäuremethylester, 8: *isoprenoid*-Octadecanol-TMS-ether, 9: Heptadecancarbonsäuremethylester, 10: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-6-ol-TMS-ether, 11: *isoprenoid*-Nonadecanol-TMS-ether, 12: Eicosancarbonsäuremethylester, 13: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 14: Eicosanol-TMS-ether (verzweigt), 15: Octadecancarbonsäuremethylester, 16: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol-TMS-ether, 17: Carbonsäuremethylester (?), 18: Carbonsäuremethylester (verzweigt, 101 BP).

In relativ hoher Konzentration liegt daneben auch die *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäure vor, die den Säureanteil des *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäure-*isoprenoid*-Eicosanylesters repräsentiert. Darüber hinaus lassen sich weitere *isoprenoid*-Carbonsäuren beobachten, z.B. *isoprenoid*-Pentadecancarbonsäure, *isoprenoid*-Hexadecancarbonsäure und *isoprenoid*-Heptadecancarbonsäure. Mit *isoprenoid*-Octadecanol und *isoprenoid*-Nonadecanol gibt es zwar auch bei den *isoprenoid*-Alkoholen noch weitere Verbindungen, ihre Konzentrationen sind jedoch, gemessen an der des Phytan-1-ol, extrem gering.

Versuchsreihe B

In dieser Versuchsreihe konnten sowohl im freien als auch im verseiften Extrakt während der gesamten Dauer des Experiments (bis zu 168 Stunden) stets die gleichen Abbauprodukte nachgewiesen werden. Neben 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure (ω -Phytansäure), die nur in sehr geringer Konzentration vorlag, waren dies ausschließlich Alkohole. Durch bevorzugte Hydroxylierung an den Verzweigungsstellen des Moleküls kam es zur Bildung tertiärer Alkohole, die als dominierende Verbindungen im Totalionenstromchromatogramm deutlich hervortreten (Abb. 4.3.2.12). Es sind dies 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2-ol (Phytan-15-ol), 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-6-ol (Phytan-10-ol), 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-3-ol (Phytan-3-ol) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-7-ol (Phytan-7-ol). Eine beträchtliche Konzentration erreicht auch das 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol (Phytan-1-ol) das durch Oxidation einer terminalen Methylgruppe gebildet wird und mit zunehmender Biodegradation dann eine Umwandlung zur Phytansäure erfährt. Infolge der Hydroxylierung an C-14 und C-2 (Phytol-Nomenklatur) wurden darüber hinaus mit 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-3-ol (Phytan-14-ol) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-2-ol (Phytan-2-ol) auch sekundäre Alkohole gebildet. Ihre Konzentrationen sind allerdings gering, und diese Verbindungen treten im Totalionenstromchromatogramm lediglich als schlecht separierte Schultern in Erscheinung. Da theoretisch jedes der Kohlenstoffatome eine Hydroxygruppe tragen kann, besteht Anlaß zu der Vermutung, es könnten noch weitere Phytanol-Isomere existieren. Da entsprechende Signale im Totalionenstrom fehlen, ist es möglich, daß diese Verbindungen mit anderen koeluierten und wegen ihrer geringen Konzentrationen in den Massenspektren neben den Hauptkomponenten nicht erkannt wurden.

Phytenol-Isomere, d.h. Alkohole mit einer funktionellen Gruppe und einem Unsätti-

gungsgrad, treten zwar ebenfalls in allen Proben auf, die Position von Hydroxygruppe und Doppelbindung konnte aus den Massenspektren jedoch nicht abgeleitet werden. Sie zeichnen sich generell durch relativ geringe Konzentrationen aus und gehören somit nicht zu den Hauptstoffwechselprodukten.

Im Zuge der Degradation wurden nicht nur einwertige, sondern auch zweiwertige Alkohole gebildet, die Phytandiole. Nach massenspektrometrischen Daten handelt es sich bei diesen Verbindungen um 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2,6-diol (Phytan-10,15-diol) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-11,15-diol (Phytan-3,7-diol). Ebenso wie bei den Phytanolen hat die Hydroxylierung auch bei den Diolen bevorzugt an den tertiären Kohlenstoffatomen der Methylverzweigungen stattgefunden. Obgleich nur diese beiden Substanzen nachgewiesen werden konnten, ist in Analogie zu den Beobachtungen bei den Phytanolen nicht auszuschließen, daß noch weitere Isomere vorhanden sind.

Im Bereich der Scanzahlen 1480-1550, auf dem vergrößerten Ausschnitt der Abb. 4.3.2.13 recht gut zu erkennen, finden sich zwei Peaks, die vermutlich Phytantriole repräsentieren. Aus den Massenspektren läßt sich dies nicht eindeutig herleiten. Die Vermutung stützt sich daher auf einen Retentionszeitvergleich mit einem Standard von Phytan-1,2,3-triol, mit dem die in den Abbauprodukten nachgewiesenen Phytantriole hinsichtlich der Stellung der Hydroxygruppen nach einem Vergleich der Massenspektren aber nicht identisch sind.

Die Massenspektren aller zuvor erwähnten Verbindungen mit Ausnahme der Phytenole und der vermuteten Phytantriole sind den Abb. 4.3.2.14-4.3.2.23 zu entnehmen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich die Palette der Stoffwechselprodukte im freien und verseiften Extrakt nicht unterscheidet und überdies auch während des gesamten Experiments unverändert bleibt. Aus diesem Grund erschien es ausreichend, exemplarisch nur ein Totalionenstromchromatogramm abzubilden und den Bereich der Phytanole und -diole vergrößert hervorzuheben. Unterschiede bestehen lediglich hinsichtlich der Konzentrationen der einzelnen Verbindungen.

Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte mittels eines bereits vor der Extraktion zugegebenen Standards (Squalan). Dabei ist zu beachten, daß nur sauber getrennte Peaks ausgewertet werden konnten und die sekundären Phytanole (Phytan-2-ol, Phytan-14-ol) daher in der Tabelle nicht erscheinen. Auf eine Quantifizierung der Phytenole im freien Extrakt wurde aufgrund zu geringer Konzentration verzichtet. Große Konzentrationsabweichungen bei den nach 60 Stunden aus dem freien Extrakt und nach 72 Stunden

aus dem verseiften Extrakt aufgearbeiteten Proben deuten auf Fehler bei der Standardzugabe hin. Diese Proben werden daher in der Tabelle ebenfalls nicht berücksichtigt. Außerdem besteht ein krasses Mißverhältnis zwischen der Standardmenge und den zu quantifizierenden Substanzen, da zu Beginn des Experiments nicht abzuschätzen war, welche und vor allem wie viele Verbindungen sich bilden würden. Infolgedessen ist das Verhältnis der einzelnen Werte untereinander wohl richtig, die absoluten Zahlen sind hingegen mit einer größeren Unsicherheit behaftet. Die Ergebnisse für die beiden Fraktionen sind in Tab. 4.3.2.1 zusammengestellt.

Generell liegen die Konzentrationen aller Verbindungen im verseiften Extrakt wesentlich höher. Dies ist umso bemerkenswerter, als es wegen der sterischen Hinderung ungleich schwieriger ist, einen tertiären Alkohol zu verestern als einen primären. Da diese tertiären Alkohole erst weiter oxidiert werden können, nachdem zuvor C-C Bindungen aufgebrochen wurden, eine Reaktion, die aus chemischer Sicht nur sehr schwer möglich ist, markieren sie zumindest einen vorläufigen Endpunkt des auf Hydroxylierung basierenden Degradationsprozesses.

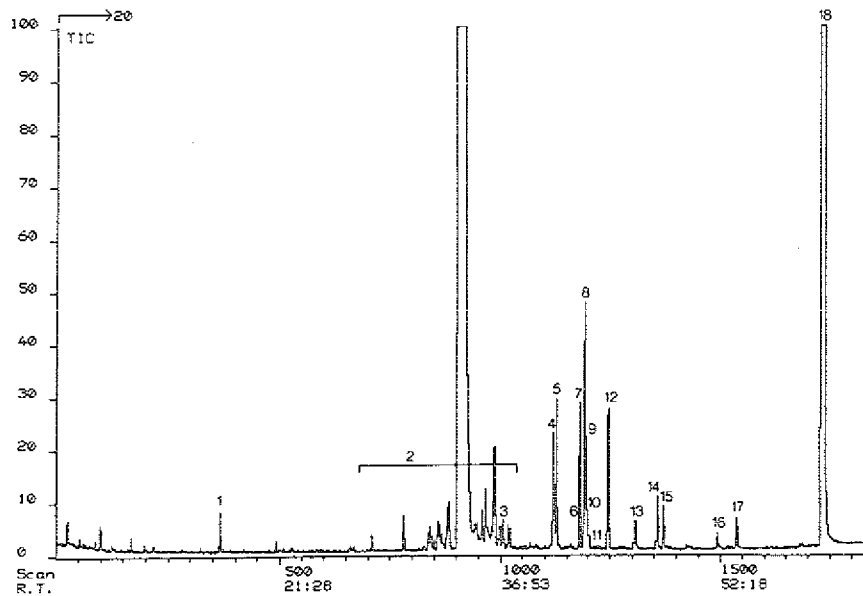


Abb. 4.3.2.12: Totalionenstromchromatogramm (TIC) des verseiften Extrakts des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus nach 96 Stunden

(1: 2,6,10-Trimethyldodecan, 2: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan und seine Verunreinigungen, 3: Hexadecancarbonsäuremethylester, 4: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-7-ol-TMS-ether, 5: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-6-ol-TMS-ether, 6: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-3-ol-TMS-ether, 7: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-3-ol-TMS-ether, 8: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2-ol-TMS-ether, 9: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-2-ol-TMS-ether, 10: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 11: Octadecancarbonsäuremethylester, 12: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol-TMS-ether, 13: Phytanol-TMS-ether, 14: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-3,7-di-TMS-ether, 15: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2,6-di-TMS-ether, 16: Phytanol-TMS-ether (?), 17: Phytanol-TMS-ether (?), 18: 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltricosan (Standard).

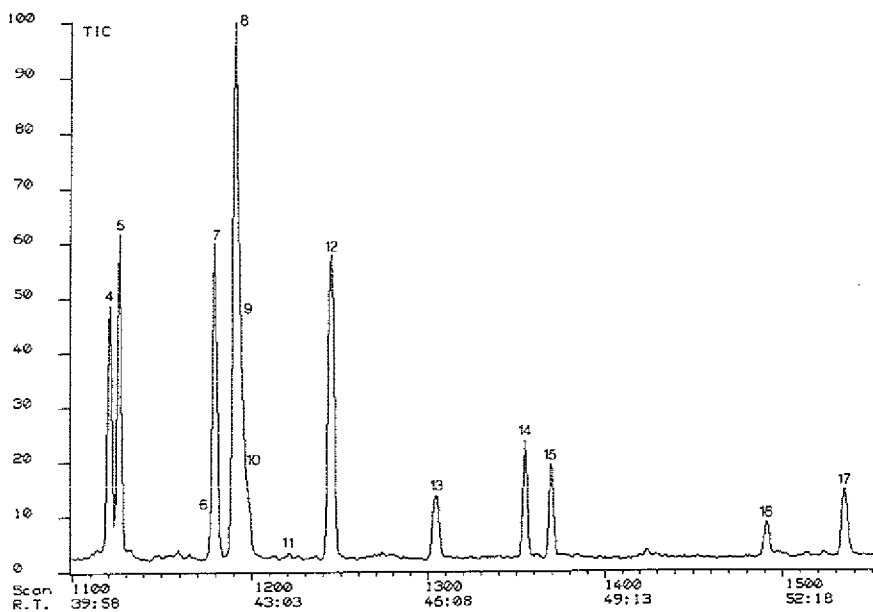


Abb. 4.3.2.13: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 4.3.2.12 (Peakidentifizierung siehe Abb. 4.3.2.12).

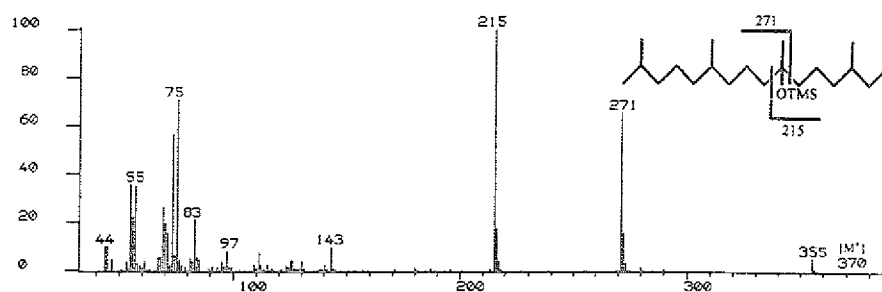


Abb. 4.3.2.14: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-7-ol als TMS-Ether.

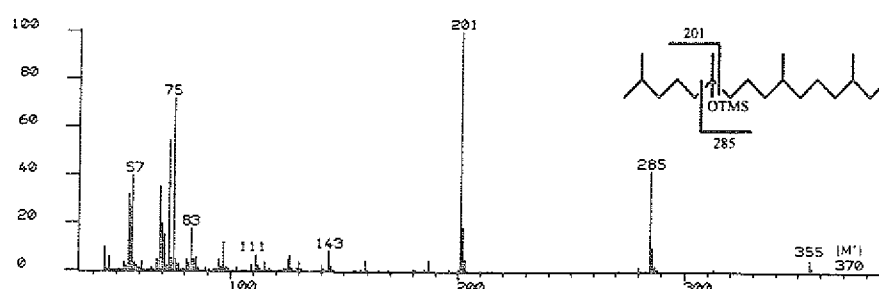


Abb. 4.3.2.15: Massenspektrum von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-6-ol als TMS-Ether.

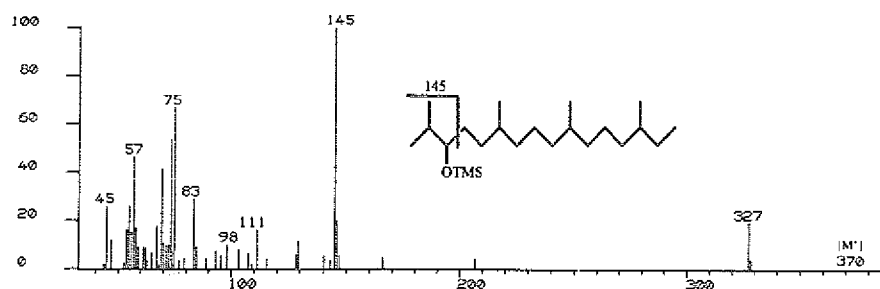


Abb. 4.3.2.16: Massenspektrum von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-3-ol als TMS-Ether.

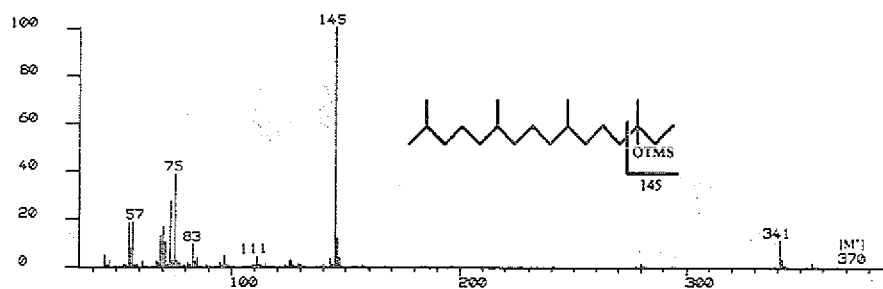


Abb. 4.3.2.17: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-3-ol als TMS-Ether.

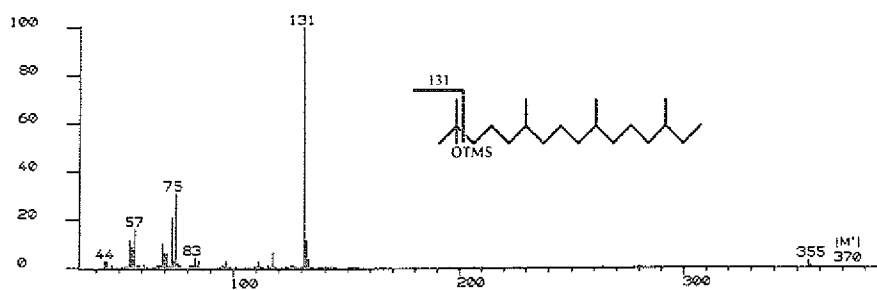


Abb. 4.3.2.18: Massenspektrum von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2-ol als TMS-Ether.

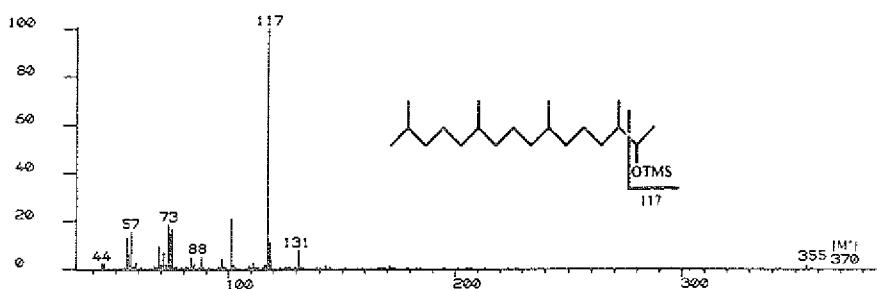


Abb. 4.3.2.19: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-2-ol als TMS-Ether.

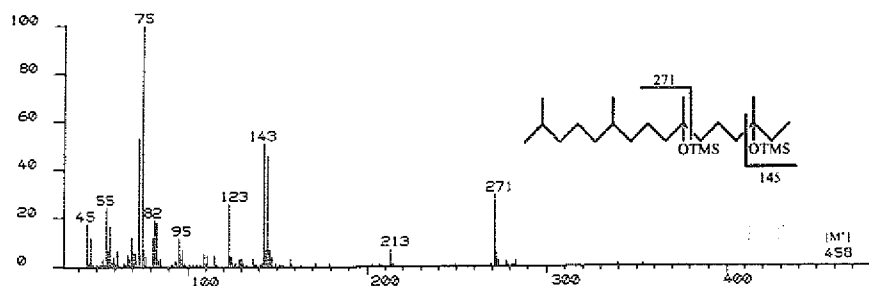


Abb. 4.3.2.20: Massenspektrum von 3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-3,7-diol als Di-TMS-ether.

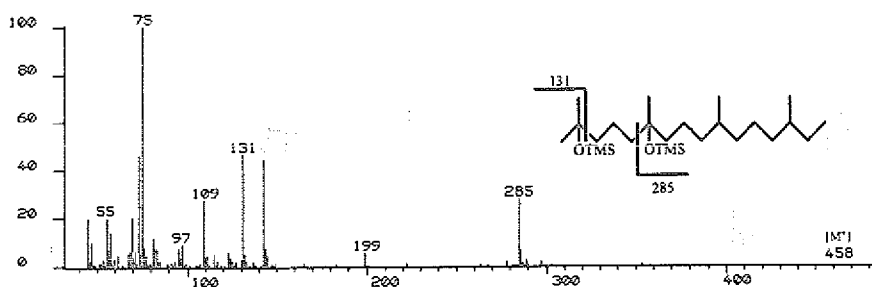


Abb. 4.3.2.21: Massenspektrum von 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-2,6-diol als Di-TMS-ether.

Freier Extrakt

	24	48	72	96	14	168	Stunden
Phytan-7-ol	2.5	1.3	1.5	1.4	1.0	0.8	μg
Phytan-11-ol	2.8	1.5	1.7	1.4	1.0	1.0	
Phytan-3-ol	2.6	2.1	2.7	2.0	2.0	1.3	
Phytan-15-ol	5.3	4.3	4.7	4.5	3.1	2.4	
Phytan-1-ol	3.8	3.0	2.1	1.1	2.8	-	
Phytan-3,7-diol	1.0	0.9	1.7	1.3	1.2	1.1	
Phytan-11,15-diol	1.2	0.8	1.7	1.3	1.3	0.9	

Tab. 4.3.2.1: Quantifizierung der Phytanole und -dirole im freien Extrakt des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus.

Verseifter Extrakt

	24	48	72	96	120	168	Stunden
Phytan-7-ol	11.0	10.3	13.0	11.0	11.8	5.4	μg
Phytan-11-ol	11.4	11.0	14.6	14.0	11.1	6.2	
Phytan-3-ol	11.3	9.8	13.0	13.9	12.1	6.8	
Phytan-15-ol	17.6	19.3	20.1	23.4	20.3	10.3	
Phytan-1-ol	4.8	9.5	5.6	13.1	2.2	3.0	
Phytenol (Isomere)	2.1	2.0	2.6	2.7	1.6	1.6	
Phytan-3,7-diol	3.1	3.2	4.8	5.0	3.4	2.5	
Phytan-11,15-diol	2.8	3.1	4.6	4.0	4.0	2.6	

Tab. 4.3.2.2: Quantifizierung der Phytanole und -dirole im verseiften Extrakt des 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-Abbaus.

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Batch-Kulturen zum mikrobiellen Abbau von Reinsubstanzen

Es hat sich gezeigt, daß selbst die Experimente mit einfachen Verbindungen wie den *n*-Alkanen zu relativ komplexen Stoffgemischen während des Abbaus führen, die sich nicht nur aus Degradationsprodukten und mikrobiell nicht verwerteten Resten des Substrats zusammensetzen, sondern darüber hinaus auch Bakterieninhaltsstoffe und Kontaminationen aufweisen.

Die als Substrat verwendeten geradkettigen Substanzen *n*-Heptadecan und *n*-Heneicosan lassen sich relativ leicht abbauen. Dabei sind nicht nur in wäßrigem Medium lösliche (oder emulgierte) freie und gebundene Metaboliten nachweisbar, sondern auch feste Reaktionsprodukte in Form von Wachsestern.

In allen Versuchen kamen Mikroorganismen der Species *Acinetobacter junii* zum Einsatz, die aus einem mineralölkontaminierten Boden isoliert worden waren.

Bei den Experimenten mit *n*-Heptadecan dominiert im freien Extrakt während der gesamten Versuchsdauer das *n*-C_{17:1}-Olefin, es ist nach 53 Tagen sogar das einzige analytisch erfaßbare Oxidationsprodukt. *n*-C_{17:0}-Carbonsäure und *n*-C_{15:0}-Carbonsäure treten demgegenüber aufgrund erheblich geringerer Relativkonzentrationen deutlich zurück.

Der verseifte Extrakt enthält ebenfalls nur geringe Mengen an Metaboliten. Dies sind bis zu einer Reaktionszeit von fünfundzwanzig Tagen nur das *n*-C_{17:1}-Alken und die *n*-C_{17:0}-Carbonsäure, nach 53 Tagen kommen die *n*-C_{15:0}-Carbonsäure und 2-Methylcarbonsäuren hinzu. Nach fast sechs Monaten mikrobieller Aktivität haben sich außerdem *n*-C_{17:1}-Carbonsäure und Methyl-C_{17:0}-Carbonsäure sowie eine homologe Reihe von β -Hydroxycarbonsäuren gebildet.

In Anbetracht der sehr geringen Konzentrationen an Metaboliten sowohl im freien als auch im verseiften Extrakt stellt sich die Frage, ob das Substrat tatsächlich schon so weitgehend veratmet worden ist, daß niedrigmolekulare Carbonsäuren entstanden sind, die sich der GC/MS-Analytik entziehen, bzw. eine Mineralisierung zu CO₂ und H₂O stattgefunden hat. Nach Untersuchungen von Atlas et al. (1981) an *n*-Hexadecan können allenfalls 20-30 % der insgesamt biodegradierten Kohlenwasserstoffe mineralisiert werden. Ein Einbau der umgewandelten Substanz in die schon nach kurzer Versuchsdauer generierten Wachsester und, wie aufgrund der geringen Löslichkeit zu vermuten ist, noch höher vernetzte Strukturen ist daher gleichfalls denkbar.

Bestandteile der unverseiften Wachsester sind neben dominierenden niedermolekularen Komponenten wie dem $C_{17:1}$ -Olefin, der freien n - $C_{15:0}$ - und n - $C_{17:0}$ -Carbonsäure sowie der freien n - $C_{17:1}$ -Carbonsäure, die aufgrund ihrer Lipophilie an den Wachsestern adsorbiert bzw. in ihnen okkludiert sind, auch einige höhermolekulare Verbindungen, die zweifellos aus der mikrobiellen Degradation des n -Heptadecans stammen. Dies sind $C_{15:0}$ -Carbonsäure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester, $C_{17:0}$ -Carbonsäure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester und $C_{17:1}$ -Carbonsäure- $C_{17:0}$ -Alkohol-Ester. Ferner gehören dazu einige Substanzen, die durch 40-50 u höhere Massen als C_{17} -Alkohol- C_{17} -Säure-Ester charakterisiert sind. Diese könnten noch Substituenten tragen wie z.B. -OH, -OCH₃, doch war eine Strukturaufklärung allein anhand der Massenspektren nicht möglich.

Entsprechend der Kohlenstoffzahl-Verteilung der unverseiften Wachsester wurden durch Hydrolyse n - $C_{17:0}$ - und n - $C_{17:1}$ -Carbonsäuren sowie n - $C_{15:0}$ -Carbonsäure in annähernd gleichen relativ hohen Konzentrationen als Hauptkomponenten der verseiften Wachsester freigesetzt. Der Alkohol-Teil weist demgegenüber nur eine sehr geringe Konzentration auf. Die homologe Reihe von ungeradzahligen β -Hydroxycarbonsäuren mit $C_{11:0}$, $C_{13:0}$, $C_{15:0}$ und $C_{17:0}$ -Säure ist als Folge weitergehender Oxidation zu deuten. Dabei erfolgte, ausgehend von der $C_{17:0}$ -Säure, dann jeweils eine schrittweise Verkürzung der Kette um zwei Kohlenstoffatome. 3-Methoxycarbonsäuren, ebenfalls eine homologe Reihe mit $C_{11:0}$, $C_{13:0}$, $C_{15:0}$ und $C_{17:0}$ -Säure, könnten eventuell während der Veresterung der β -Hydroxycarbonsäuren entstanden sein und wären dann natürlich keine "echten" Stoffwechselprodukte. Gleichwohl ist nicht auszuschließen, daß dieser Prozeß auch in den Organismen selbst stattfindet. In geringer Konzentration ließen sich ferner Methyl- $C_{17:0}$ -Carbonsäure und 2-Methyl- $C_{17:1}$ -Carbonsäure beobachten.

Ogleich keine Quantifizierung der Stoffwechselprodukte vorgenommen wurde, drängt sich der Eindruck auf, daß nicht nur eine große Menge des eingesetzten Substrats, sondern auch ein erheblicher Anteil der gebildeten Metaboliten bereits nach kurzer Versuchsdauer in diese Wachsester eingebaut wurden. Dadurch wurden sie dem System zumindest zeitweise entzogen und blieben somit vor weiterem Abbau geschützt.

Die Bildung von Wachsestern als Oxidationsprodukten mikrobieller Degradation von n -Alkanen wurde erstmals von Stewart et al. (1959) publiziert. Sie hatten bei Abbauversuchen von n -Hexadecan mit Kulturen von *Acinetobacter* HO1-N einen $C_{16:0}$ -Carbonsäure- $C_{16:0}$ -Alkohol-Ester nachweisen können. Stewart & Kallio (1959) arbeiteten unter den gleichen Bedingungen mit n -Octadecan, um herauszufinden, ob bei diesem Substrat vergleichbare Reaktionen ablaufen würden. Es bildeten sich ebenfalls Wachsester. Diese bestanden aber nicht nur aus $C_{18:0}$ -Carbonsäure- $C_{18:0}$ -Alkohol-Ester, sondern enthielten

in gleicher Konzentration auch C_{16:0}-Carbonsäure-C_{18:0}-Alkohol-Ester. Die Veresterung der kürzerkettigen Säure kann demnach erst im Anschluß an eine wohl durch β -Oxidation bedingte Verkürzung der zunächst generierten C_{18:0}-Carbonsäure um zwei Kohlenstoffatome erfolgt sein. Nach ihren Beobachtungen sollte der Prozeß der Wachsbildung extrazellulär erfolgen.

Die Kondensation von Alkoholen und Carbonsäuren kann durch ein nicht ausgewogenes Nährstoffangebot im Kulturmedium bedingt sein, wenn zwar verwertbare Kohlenstoffquellen im Überschuß vorhanden sind, das Wachstum der Mikroorganismen durch das Fehlen eines essentiellen Nährstoffs jedoch limitiert ist. Unzureichende Sauerstoffversorgung kommt als Ursache ebenso in Betracht.

Der Abbau des *n*-Heneicosans erfolgte in zwei Versuchsreihen. Bei unveränderter Konzentration des Substrats wurden die Kulturen einerseits bei Raumtemperatur (20 °C) (Versuchsreihe A) und, um eine bessere Löslichkeit des *n*-Heneicosans zu erzielen, andererseits bei 30 °C (Versuchsreihe B) inkubiert. Unterschiede bestehen auch hinsichtlich der Probennahmeintervalle.

Innerhalb der bei niedriger Temperatur gefahrenen Versuchsreihe A läßt sich auch bei längerer Abbaupzeit (siebzehn Tage) im verseiften Extrakt nur wenig Umsatz verzeichnen. In relativ geringer Konzentration wurden zahlreiche stärker degradierte Verbindungen nachgewiesen, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren und Alkohole.

Als geradkettige *n*-Carbonsäuren traten die *n*-Nonadecancarbonsäure und durch sequentielle β -Oxidation aus dieser entstandene niedermolekulare Homologe bis hinunter zur *n*-Nonancarbonsäure auf. Daneben konnten *n*-Nonadecen- und *n*-Heptadecancarbonsäuren als einfach ungesättigte Verbindungen nachgewiesen werden.

Es hatte sich ferner eine Vielzahl von Hydroxycarbonsäuren gebildet. Infolge unzureichender Qualität der Massenspektren konnten von diesen nur α -Hydroxy-C_{10:0}-Säure und β -Hydroxy-C_{12:0}-Säure identifiziert werden.

Der Nachweis dieser geradzahigen Hydroxycarbonsäuren ist bemerkenswert. Als "klassischer" Abbaupfad während des Degradationsprozesses von *n*-Alkanen generierter Carbonsäuren gilt im allgemeinen die β -Oxidation, die zu einer Verkürzung der Kohlenstoffkette um eine C₂-Einheit führt. Infolgedessen kann sich aus der durch Oxidation eines ungeradzahigen *n*-Alkans, wie dem *n*-Heneicosan, entstandenen Carbonsäure bei fortschreitendem Abbau durch β -Oxidation auch nur eine homologe Reihe ungeradzah-

liger Säuren bilden. Durch diesen Mechanismus läßt sich das Vorhandensein der geradzahligen Hydroxycarbonsäuren demnach nicht erklären. Wurden sie vielleicht als Kontaminationen eingeschleppt? Obgleich diese Möglichkeit nicht vollständig außer acht gelassen werden darf, gibt es Hinweise darauf, daß es sich tatsächlich um Stoffwechselprodukte handeln könnte. Durch Kettenverlängerung mit nachfolgender α -Oxidation einerseits und de novo-Synthese andererseits ist es sehr wohl möglich, geradzahlige Säuren als Metaboliten während des Abbaus zu erhalten, obwohl ein ungeradzahliges *n*-Alkan als Substrat eingesetzt wurde (Boulton & Ratledge 1984). Inwieweit ein Zusammenhang dieser Prozesse mit der Kohlenstoffzahl der *n*-Alkane bzw. der daraus resultierenden Löslichkeit in wäßrigem Medium besteht, bleibt ungeklärt.

Der nach annähernd einem Monat aufgearbeitete freie Extrakt der Versuchsreihe B enthält nur ein einziges Abbauprodukt, das *n*-C_{21:1}-Alken. Diese oxidative Olefinbildung hatte auch bei *n*-Heptadecan stattgefunden. Im verseiften Extrakt hingegen konnten neben normalen Fettsäuren auch Säuren verzweigter Alkane bestimmt werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es allerdings keine Anhaltspunkte für die Bildung von *iso*-Säuren während des Degradationsprozesses, so daß es sich bei diesen Verbindungen wohl um Bakterieninhaltsstoffe handeln dürfte.

Obgleich nach mehr als zwei Monaten (dreiundsiebzig Tagen) nur noch sehr wenig *n*-Heneicosan vorhanden war, ließen sich sowohl im freien als auch im verseiften Extrakt fast überhaupt keine Abbauprodukte nachweisen. Vermutlich wurde das *n*-Heneicosan nur in so geringer Menge mikrobiell umgesetzt, daß die Konzentrationen der entstandenen Metaboliten unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Dadurch ließe sich auch der relativ hohe Gehalt der Wachsester an *n*-C₂₁-Alkan erklären. Dies ist sicher auch eine Folge der auch bei 30 °C geringen Wasserlöslichkeit des *n*-Heneicosans, die zu einer bevorzugten lipophilen Anlagerung an die gebildeten Wachsester führt.

Die Analysenergebnisse der verseiften Wachsester weisen darauf hin, daß das *n*-Heneicosan trotz der relativ langen Abbauzeit von mehr als zwei Monaten nur in sehr geringem Maße von den Mikroorganismen verwertet wurde. Das eingesetzte Substrat ist die bei weitem dominierende Komponente, während die Konzentrationen der Stoffwechselprodukte, ausschließlich Carbonsäuren, nur in der Größenordnung der Verunreinigungen der Reinsubstanz liegen.

Isoprenoide lassen sich ebenfalls degradieren, jedoch erheblich langsamer als *n*-Alkane. So ist die Abbaurate von Pristan beispielsweise nur halb so groß wie die von *n*-Hexadecan (Atlas et al. 1981). Exemplarisch wird in der Literatur oft das bereits im Zusammen-

hang mit den mikrobiologischen Aspekten der Biodegradation erläuterte Abbauschema für Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) (siehe Seite 25) vorgestellt. Danach entwickeln sich aus Pristansäure durch ω -Oxidation mit anschließender sequentieller β -Oxidation einerseits und β -Oxidation andererseits die Abbaupfade für Mono- und Dicarbonsäuren, deren weitere Degradation ausschließlich durch Kettenverkürzung erfolgen soll. Alternative Abbaupfade existieren nach diesem Schema nicht. Nakajima et al. (1974, 1985) konnten zusätzlich Pristylpristanat und Pristaldehyd nachweisen.

Eine vergleichbare Darstellung für Phytan (2,6,10,14-Tetramethylhexadecan) gibt es in der Literatur nicht. Als Oxidationsprodukte werden 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan-1-ol und 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure genannt (Nakajima et al. 1985).

Nach den experimentellen Daten dieser Arbeit findet analog dazu auch bei Phytan eine Oxidation der endständigen Methylgruppen statt. Im Unterschied zu Pristan ist das Phytanmolekül allerdings asymmetrisch gebaut, so daß durch Oxidation am α - bzw. ω -ständigen Ende mit 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäure (Phytansäure) und 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure (ω -Phytansäure) zwei Isomere entstehen. Mit fortschreitendem Abbau ist auch bei diesen Säuren eine Kettenverkürzung möglich. Neben den gesättigten Phytan-Carbonsäuren tritt bei mikrobiellem Abbau auch die einfach ungesättigte Phytan-Carbonsäure auf. Diese oxidative Olefinbildung wurde bereits bei den Degradationsexperimenten mit *n*-Alkanen beobachtet. Während die Carbonsäuren bei Versuchsdauern bis zu einer Woche nur sehr geringe Konzentrationen erreichen, sind sie bei längeren Reaktionszeiten die wichtigsten Metaboliten in den Extrakten.

Hydroxylierung und Bildung von Phytanolen und Phytenolen, Phytandiolen und -trienolen (?) charakterisieren einen anderen Degradationsmechanismus, der in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

Als dominierende Metaboliten treten dabei vor allem solche Verbindungen auf, bei denen die Hydroxylierung an den Verzweigungsstellen des Moleküls erfolgt ist. Dies sind Phytan-3-ol, Phytan-7-ol, Phytan-11-ol und Phytan-15-ol. Eine Ausnahme bildet das terminal oxidierte Phytan-1-ol, das ebenfalls beträchtliche Konzentration aufweist. Hydroxygruppen konnten darüber hinaus auch an C-3 und C-15 des Kohlenstoffskeletts nachgewiesen werden. Diese sekundären Alkohole, Phytan-2-ol und Phytan-14-ol, liegen im Vergleich zu den tertiären Alkoholen allerdings nur in sehr geringen Relativkonzentrationen vor und lassen sich daher im Totalionenstromchromatogramm der massenspektrometrischen Analyse nicht als deutlich getrennte Peaks erkennen. Da theoretisch jedes der Kohlenstoffatome eine Hydroxygruppe tragen kann, ist zu vermuten, daß noch wei-

tere Phytanol-Isomere gebildet wurden, die sich aufgrund zu geringer Konzentrationen und möglicher Koelution mit anderen Verbindungen jedoch der analytischen Erfassung entziehen.

Neben den gesättigten einwertigen Phytanolen eluieren auch einfach ungesättigte Phytanole. Eine genauere Differenzierung der verschiedenen Isomere ist aufgrund der massenspektrometrischen Daten jedoch nicht möglich. Geringe Konzentrationen verleihen diesen Metaboliten nur eine untergeordnete Bedeutung beim mikrobiellen Abbau des Phytans.

Die bevorzugte Hydroxylierung an den tertiären Kohlenstoffatomen der Methylverzweigungen gilt nicht nur für die Phytanole, sondern in gleicher Weise auch für die Alkohole mit zwei funktionellen Gruppen, die Phytandiole. Als Stoffwechselprodukte konnten Phytan-3,7-diol und Phytan-11,15-diol bestimmt werden. In Analogie zu den Beobachtungen bei den Phytanolen ist auch bei den Phytandiolen das Vorhandensein weiterer Isomere nicht auszuschließen.

Ein Retentionszeitvergleich mit einem Phytantriol-Standard deutet die Möglichkeit an, daß sich zusätzlich noch dreiwertige Alkohole während des Degradationsprozesses gebildet haben könnten. Die Massenspektren sind leider nicht von ausreichender Qualität, um die Identifizierung der Substanzen zu gestatten.

Der Abbauweg zu den Hydroxyverbindungen erweist sich insbesondere für die tertiären Alkohole als Sackgasse, da für die bei den sekundären Phytanolen als nächsten Schritt noch mögliche Ketonbildung keine freien Valenzen zur Verfügung stehen und für weitere Reaktionen zunächst C-C Bindungen aufgebrochen werden müßten.

Im Unterschied zu den sekundären und tertiären Alkoholen, die nur bei den Experimenten mit Laufzeiten von bis zu einer Woche nachweisbar waren, wurde das Phytan-1-ol als primärer Alkohol während der gesamten Zeit gebildet. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da Phytan-1-ol das erste Reaktionsprodukt terminaler Oxidation darstellt.

Wachsester traten als feste Reaktionsprodukte nach mehr als einer Woche Reaktionszeit auf. Erwartungsgemäß stellt das nicht umgesetzte Substrat die dominierende Komponente im Totalionenstromchromatogramm dar. Die Kohlenstoffzahl-Verteilung des Säureteils der homologen und isomeren Wachsester reichte von C_{16} bis C_{20} und schloß mit *isoprenoid*- $C_{16,2}$ -Carbonsäure und *isoprenoid*- $C_{20,1}$ -Carbonsäure auch ungesättigte Säuren ein. Der Alkoholteil war dagegen immer eine C_{20} -Einheit. Die aus den Massenspek-

ten in einigen Fällen nur ungenügend ablesbare Kohlenstoffzahl-Verteilung der *isoprenoiden* Säure- und Alkohol-Einheiten konnte durch Hydrolyse der Ester und GC/MS-Analyse der Produkte verifiziert werden.

In allen Versuchsreihen konnten im verseiften Extrakt erheblich mehr Abbauprodukte nachgewiesen werden als im freien Extrakt. Dies bedeutet, daß ein wesentlicher Teil der Metaboliten in gebundener Form vorliegt und erst durch Hydrolyse freigesetzt werden kann. Dadurch sind sie dem vollständigen Abbau zumindest vorübergehend entzogen.

Es ist damit zu rechnen, daß vergleichbare Reaktionen auch im Boden nach einem Mineralölschadensfall ablaufen. Die Untersuchung fossiler Kohlenwasserstoffe und ihrer Umwandlungsprodukte in Böden hat die Anreicherung von Metaboliten in gebundener Form bestätigt (Schramedei 1991). Wegen ihres hohen Molekulargewichtes und ihrer geringen Löslichkeit könnte insbesondere den Wachsester eine große Bedeutung als persistenten Metaboliten in Böden zukommen. Durch Bindung an Huminstoffe erhöht sich die Persistenz von Metaboliten des unvollständigen Kohlenwasserstoff-Abbaus in Böden noch zusätzlich.

5 Mikrobieller Abbau von Dieselöl

Für die Experimente zum mikrobiellen Abbau von Dieselöl wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt, die sich insbesondere hinsichtlich der Substratzufuhr unterscheiden. Es waren dies die Batch-Kultur und die kontinuierliche Kultur. Bei den Ansätzen in Batch-Kultur wird das Substrat nur zu Beginn des Experiments zugegeben, während in kontinuierlicher Kultur während der gesamten Versuchsdauer ständig frisches Reaktionsmedium zugeführt wird. Um den Flüssigkeitsstand im Reaktor auf gleichem Niveau zu halten, wird gleichzeitig eine entsprechende Menge Produktlösung entnommen. Im Gegensatz zu den sich im Laufe des Experiments verändernden Versuchsbedingungen der Batch-Kultur können diese in kontinuierlicher Kultur konstant gehalten werden. Die Bedingungen der Batch-Kultur entsprechen daher sicher eher den natürlichen Gegebenheiten im Boden nach einem Mineralölschadensfall. Andererseits könnte das kontinuierliche System aufgrund der permanenten Substratzufuhr eventuell die Möglichkeit bieten, leicht oxidierbare oder nur in geringer Konzentration gebildete Metaboliten zu erfassen. Um Studien über den sukzessiven Abbau von Dieselöl zu betreiben, ist es jedoch auf keinen Fall geeignet.

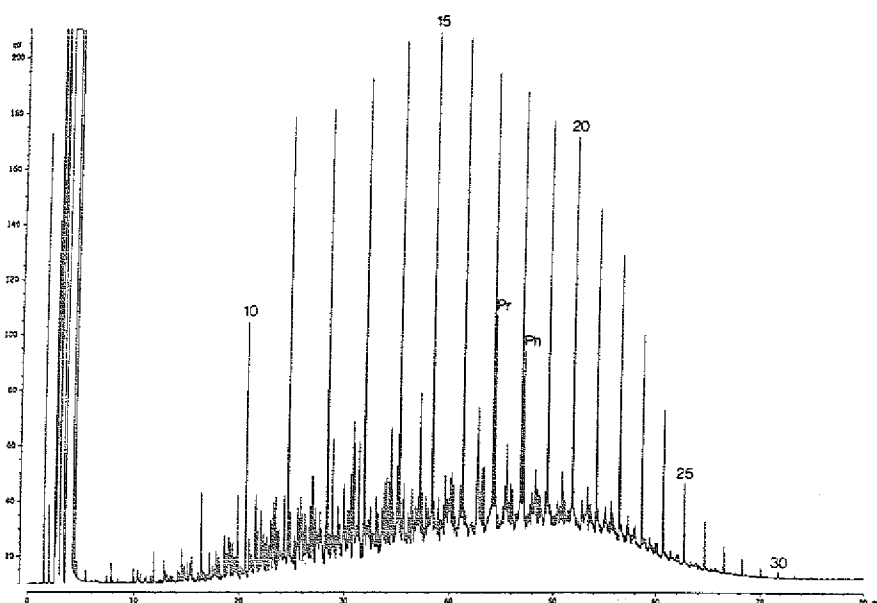


Abb. 5.1: Gaschromatogramm des als Substrat verwendeten Dieselöls.

Abb. 5.1 zeigt ein Gaschromatogramm des bei den Versuchen eingesetzten Dieselöls. Es enthält nach flüssigkeitschromatographischer Auftrennung (Radke et al. 1980) annähernd 70 % gesättigte Kohlenwasserstoffe im Bereich von $n\text{-C}_9$ bis $n\text{-C}_{35}$ mit einem Maximum bei C_{15} . Aromatische Kohlenwasserstoffe haben einen Anteil von etwa 28 %, He-

terokomponenten sind mit 2 % nur von untergeordneter Bedeutung. Durch Abdampfverluste bei der Entfernung des Lösungsmittels und der Fraktionierung können die tatsächlichen Mengenverhältnisse im Dieselöl geringfügig von den genannten Werten abweichen.

In der Aromatenfraktion des Öls dominieren Isomere von C_1 - C_4 methylsubstituierten Naphthalinen sowie Phenanthren und isomere Methyl- und Dimethylphenanthrene. Die Naphthaline zeigen bei massenspektrometrischer Analyse charakteristische Molekülionen der Massen m/z 142, 156, 170 und 184 (Abb. 5.2), die Phenanthrene sind durch Molekülionen der Massen m/z 178, 192 und 206 gekennzeichnet (Abb. 5.3).

Die Carbonsäure-Verteilung der Heterofraktion, abgebildet ist das charakteristische Fragmentation für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (Abb. 5.4), deckt einen Bereich von n - C_{11} bis n - C_{28} ab. Sie zeichnet sich durch eine deutliche Bevorzugung der geradkettigen Homologen aus. Als dominierende Verbindung erscheint die n - $C_{16:0}$ -Carbonsäure.

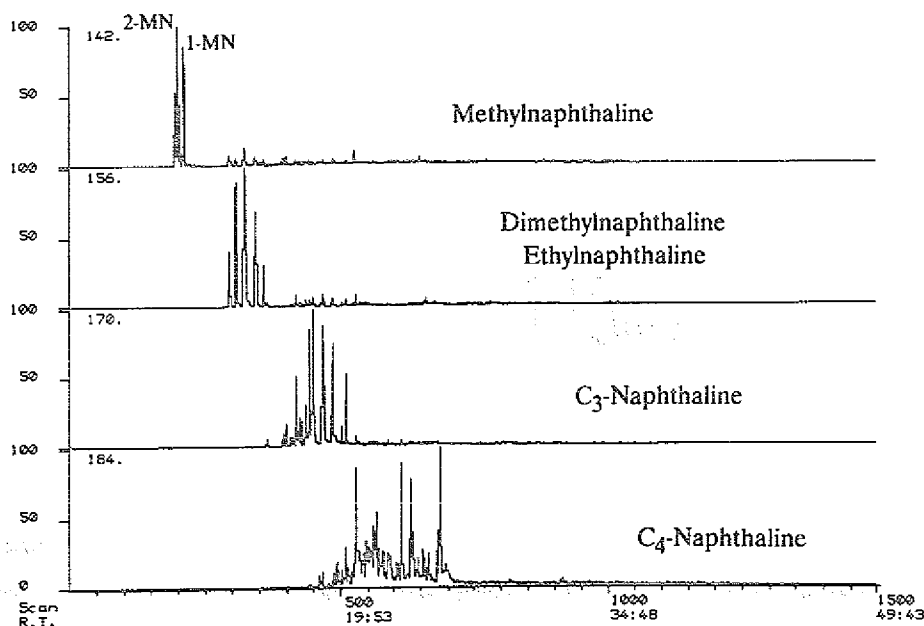


Abb. 5.2: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülionen der C_1 - C_4 alkylsubstituierten Naphthaline des Dieselöls.

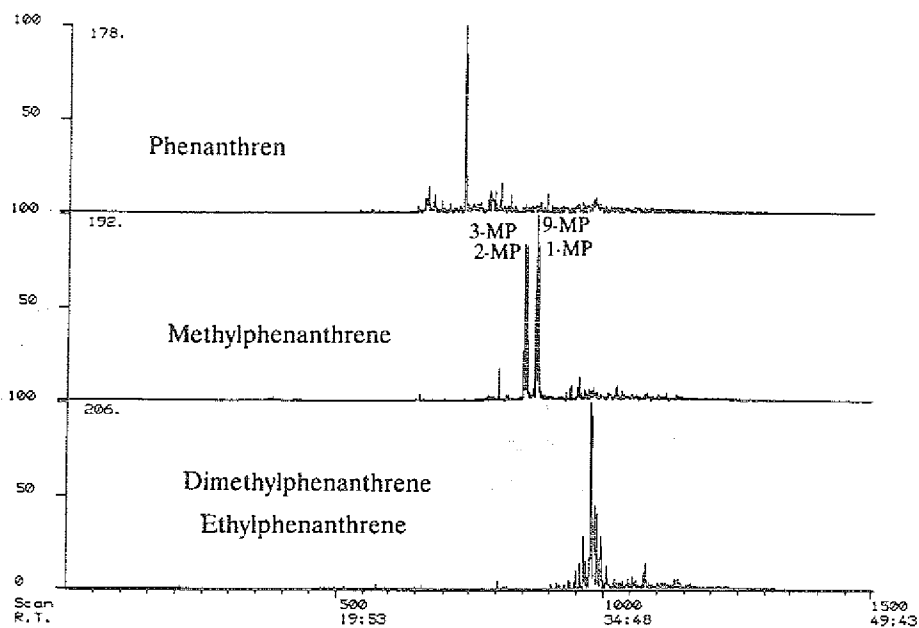


Abb. 5.3: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülionen des Phenanthrens und der C_1 - C_2 alkylsubstituierten Phenanthrene des Dieselöls.

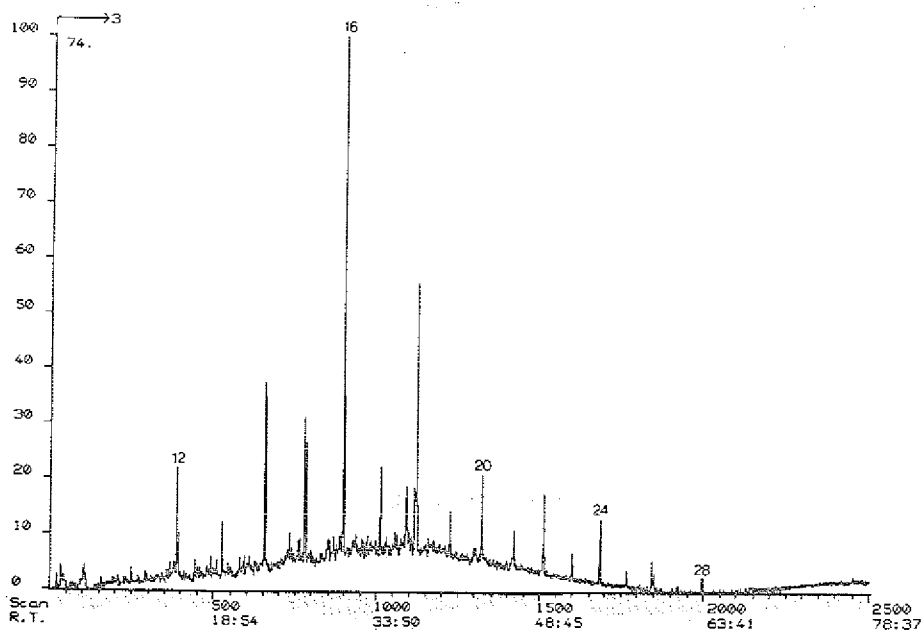


Abb. 5.4: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) des Dieselöls.

5.1 Batch-Kultur

5.1.1 Versuchsbedingungen

Zur Analyse der beim Abbau von Dieselöl in Batch-Kultur gebildeten Metaboliten wurden fünf parallele Ansätze in einer Konzentration von jeweils 100 μ l Dieselöl auf 300 ml Kulturmedium gefahren. Die Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und auf einem Schütteltisch während des gesamten Experiments in ständiger Bewegung gehalten. Mit *Acinetobacter junii* kamen Bakterien derselben Spezies zum Einsatz, die auch für die Versuche mit den Reinsubstanzen verwendet worden waren. Die Erlenmeyer-Kolben wurden nur durch einen sterilen Wattestopfen verschlossen, der einen Gasaustausch mit der umgebenden Raumluft ermöglichte. Die Versuchsdurchführung erfolgte ebenso wie die der Reinsubstanzen bei Dauerlicht. Die Probennahme (jeweils Aufarbeitung eines Ansatzes) fand zunächst in kürzeren, dann in längeren Intervallen statt (nach 2 Tagen, 5 Tagen, 9 Tagen, 16 Tagen und 29 Tagen).

5.1.2 Probenaufbereitung und Durchführung der Analysen

Die Aufarbeitung der fünf Ansätze und die Untersuchung der gewonnenen Fraktionen erfolgte, wie dies für die Versuche mit den Reinsubstanzen beschrieben wurde. Einzelheiten hierzu sind Kap. 4.1.2 (siehe Seite 41) und Kap. 4.1.3 (siehe Seite 42) zu entnehmen. Feste Reaktionsprodukte in Form von Wachsestern hatten sich nicht gebildet, so daß es lediglich in wäßrigem Medium lösliche oder emulgierte freie und gebundene Metaboliten zu extrahieren galt.

5.1.3 Ergebnisse

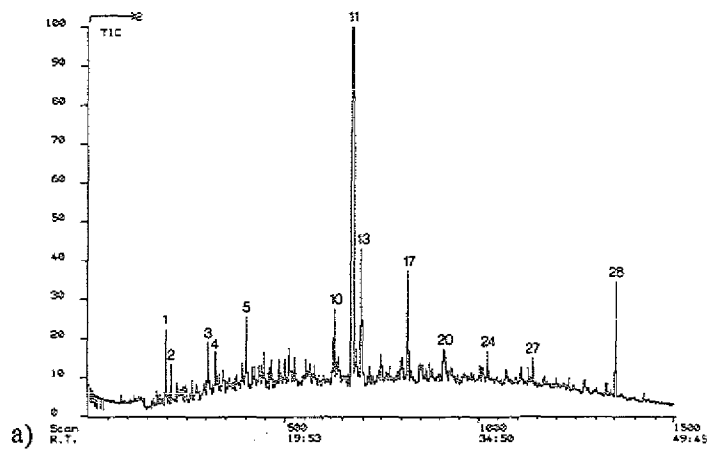
Freier Extrakt

In Abb. 5.1.3.1 sind die Totalionenstromchromatogramme der nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen (a), neun Tagen (b) und neunundzwanzig Tagen (c) gewonnenen Extrakte aus dem Dieselöl-Abbau in Batch-Kultur zusammengestellt. Aufgrund der sehr

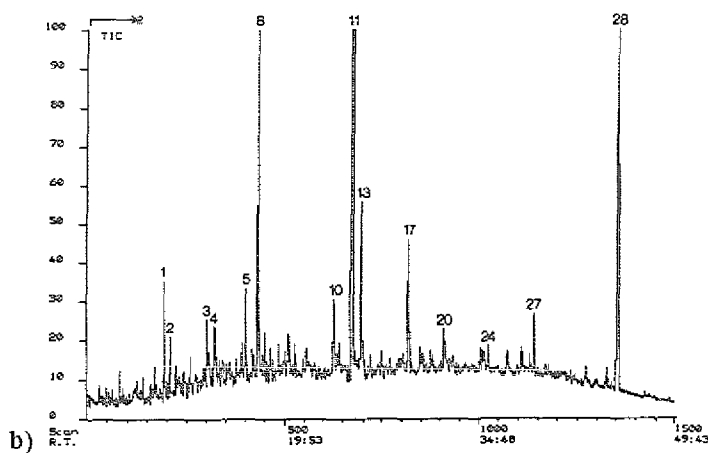
hohen Konzentrationen des 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenols, einer Verunreinigung (Stabilisator) des zur Extraktion verwendeten Diethylethers, erscheinen die Konzentrationen der übrigen Substanzen vergleichsweise niedriger als sie es tatsächlich sind.

Schon nach zwei Tagen mikrobieller Aktivität konnten die *n*-Alkane als die dominierenden Bestandteile des Dieselöls gaschromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden. Offensichtlich hatten die Mikroorganismen sie innerhalb dieser kurzen Zeit vollständig verwertet. Die resistenteren Isoprenoide zeichneten sich durch reduzierte Konzentrationen aus, also waren auch sie mikrobiell degradiert, bildeten jedoch nach wie vor eine homologe Reihe von C_{15} - C_{22} mit Pristan und Phytan als den beiden Hauptkomponenten. Von den aromatischen Verbindungen ließen sich im Totalionenstromchromatogramm (Abb. 5.1.3.1a) nur Methyl- und Dimethylnaphthaline bestimmen, Tri- und Tetramethylnaphthaline sowie Phenanthrene konnten allerdings mit Hilfe der Massenchromatogramme der entsprechenden Molekülonen dargestellt werden (Abb. 5.1.3.2 und Abb. 5.1.3.3). Danach fanden sich weder bei den Naphthalinen noch bei den Phenanthrenen Anzeichen einer Biodegradation. Stoffwechselprodukte ließen sich im freien Extrakt nicht nachweisen. Bei den Carbonsäuren (Abb. 5.1.3.4) handelt es sich aufgrund der geradzahligen Bevorzugung ($C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säure) wohl eher um Kontaminationen oder Bakterieninhaltsstoffe. Die relativ große Menge an 12-Hydroxy- $C_{18:0}$ -Carbonsäure stammt wahrscheinlich aus den Bakterien selbst.

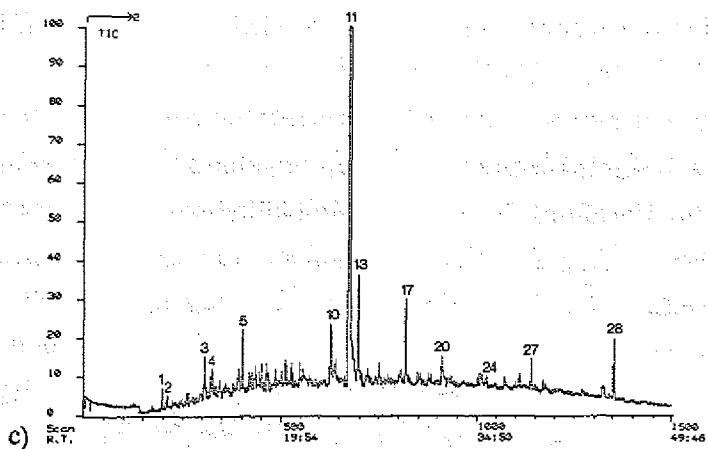
Wie aus den Totalionenstromchromatogrammen b und c zu ersehen ist, trat auch bei längerer Versuchsdauer keine durchgreifende Änderung hinsichtlich der Qualität und Quantität der Reaktionsprodukte ein. Es war lediglich eine leichte Veränderung bei den Naphthalinen zu verzeichnen. Das Wesentliche ist eine Konzentrationsabnahme der Methylnaphthaline im Verhältnis zu den höher alkylierten Naphthalinen, wobei gleichzeitig das früher eluierte 2-Methyl-Isomer bevorzugt abgebaut wird (Abnahme des 2-Methyl-/1-Methylnaphthalin-Verhältnisses in den Molekülmassenchromatogrammen m/z 142 von 1.3 auf 0.9; Abb. 5.1.3.2). Die Verteilungsmuster der C_2 - C_4 Alkylnaphthaline blieben ebenso wie die relativen Konzentrationen der Homologen zueinander im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert. Die Phenanthrene blieben gänzlich unverändert. Stoffwechselprodukte waren nicht nachweisbar, die Carbonsäureverteilung bot noch immer das gleiche Bild (Abb. 5.1.3.5) wie nach zwei Tagen. Ein Nachweis aromatischer Säuren gelang während der gesamten Zeit nicht; sie waren im freien Extrakt offensichtlich nicht oder in analytisch nicht erfaßbaren Konzentrationen vorhanden.



a)



b)



c)

Abb. 5.1.3.1: Totalionenstromchromatogramme der freien Extrakte des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen (a), nach 9 Tagen (b) und nach 29 Tagen (c)
 (1: 2-Methylnaphthalin, 2: 1-Methylnaphthalin, 3: 2,6,10-Trimethyldodecan, 4: Dimethylnaphthalin, 5: 2,6,10-Trimethyltridecan, 8: Kontamination (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol aus Ether), 10: 2,6,10-Trimethylpentadecan, 11: Kontamination (wie 8, aber silyliert), 13: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan, 17: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 20: 2,6,10,14-Tetramethylheptadecan, 24: 2,6,10,14-Tetramethyloctadecan, 27: Octadecan-carbonsäuremethylester, 28: 12-Trimethylsiloxyoctadecan-carbonsäuremethylester).

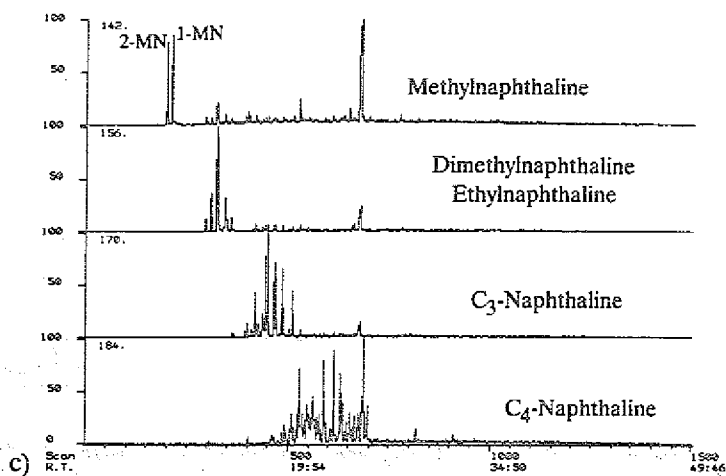
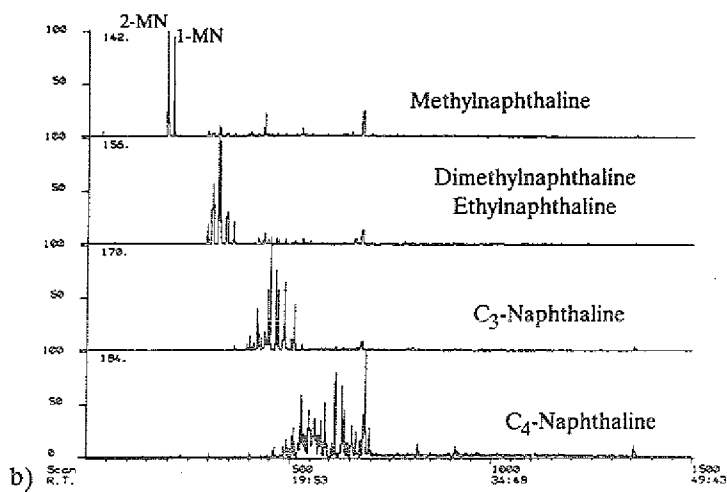
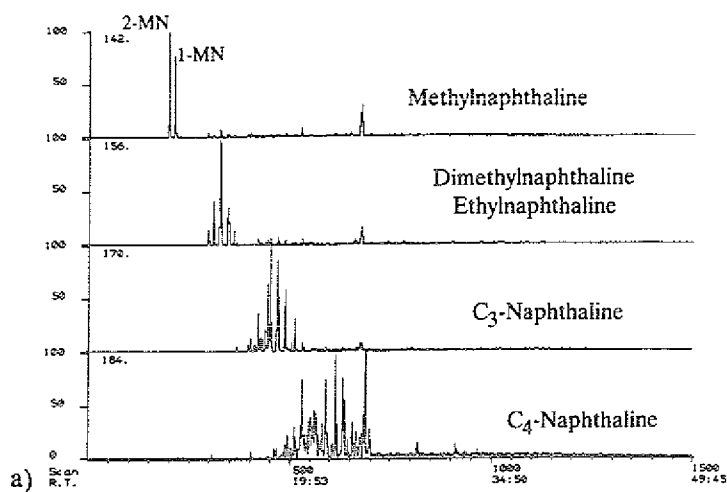


Abb. 5.1.3.2: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülfractionen der C₁-C₄ alkylsubstituierten Naphthaline des freien Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen (a), nach 9 Tagen (b) und nach 29 Tagen (c).

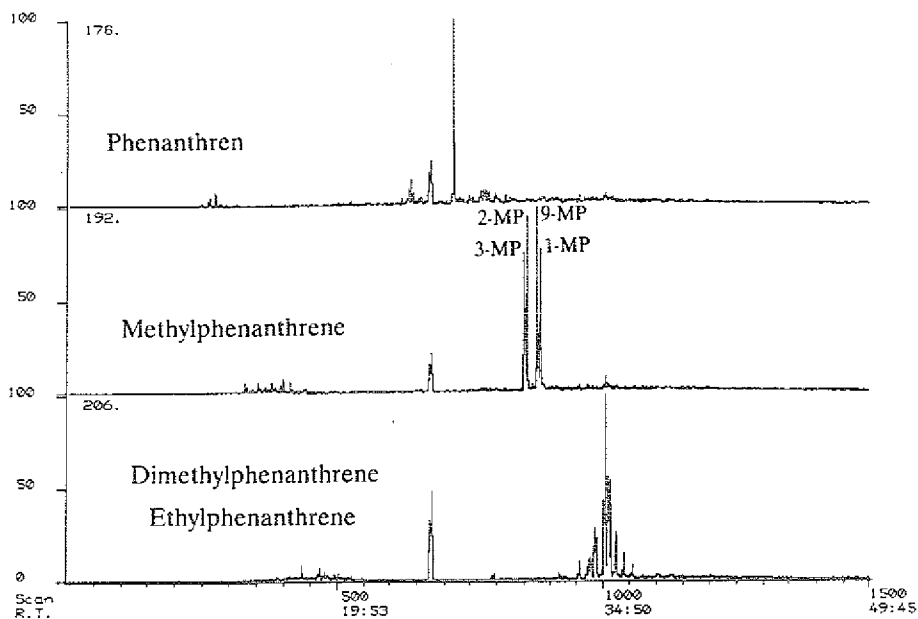


Abb. 5.1.3.3: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülonen des Phenanthrens und der C₁-C₂ alkylsubstituierten Phenanthrene des freien Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen.

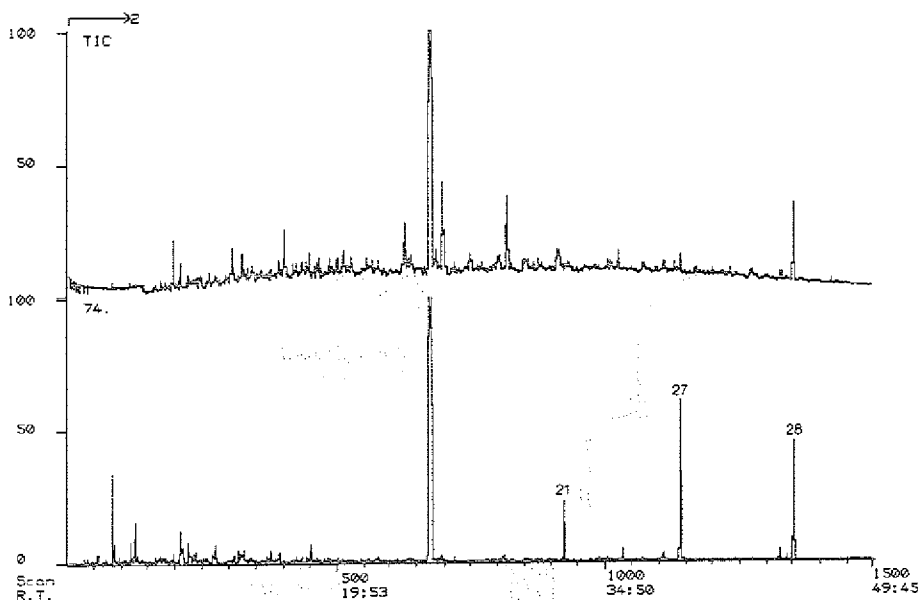


Abb. 5.1.3.4: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) des freien Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen.

(21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 27: Octadecancarbonsäuremethylester, 28: 12-Trimethylsiloxy-octadecancarbonsäuremethylester).

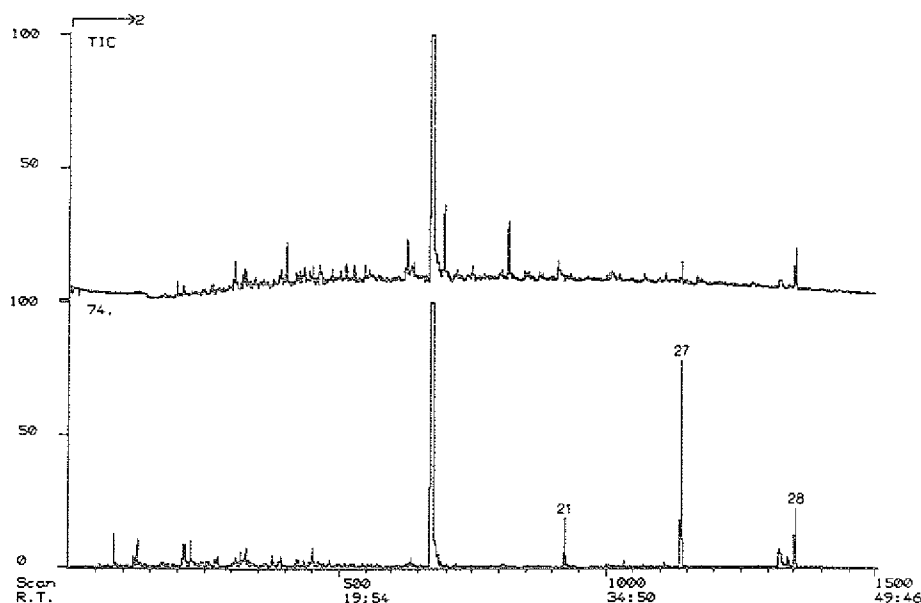


Abb. 5.1.3.5: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) des freien Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 29 Tagen

(21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 27: Octadecancarbonsäuremethylester, 28: 12-Trimethylsiloxy-octadecancarbonsäuremethylester).

Verseifter Extrakt

Die Kohlenwasserstoffverteilung im verseiften Extrakt zeigt erwartungsgemäß die gleiche Verteilung wie im freien Extrakt, da vor der Verseifung keine Abtrennung der freien Verbindungen vorgenommen wurde und die Kohlenwasserstoffe nicht in gebundener Form vorliegen (Abb. 5.1.3.7).

Die Carbonsäuren wiesen nach zwei Tagen mikrobieller Aktivität Kettenlängen zwischen 12 und 18 Kohlenstoffatomen auf und waren mit den einfach ungesättigten Homologen $C_{16:1}$, $C_{17:1}$ und $C_{18:1}$ -Carbonsäure ebenfalls vertreten (Abb. 5.1.3.8). Als bei weitem dominierende Verbindungen des Massenchromatogramms sind die $C_{16:0}$ - und $C_{17:0}$ -Carbonsäure zu nennen. Diese Verteilung spiegelt zwar nicht die der *n*-Alkane des Ausgangsöls über den gesamten Kohlenstoffzahlenbereich wider, läßt sich jedoch insbesondere aufgrund der Tatsache, daß neben geradzahligem auch ungeradzahligem Carbonsäuren auftreten, eindeutig als durch mikrobielle Degradation entstanden betrachten. Stark erhöhte Gehalte an $C_{12:0}$ - und $C_{18:0}$ -Carbonsäure bewirkten eine quantitative Modifizierung der Säureverteilung nach 29 Tagen (Abb. 5.1.3.9). Die Bildung aromatischer Carbonsäuren konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

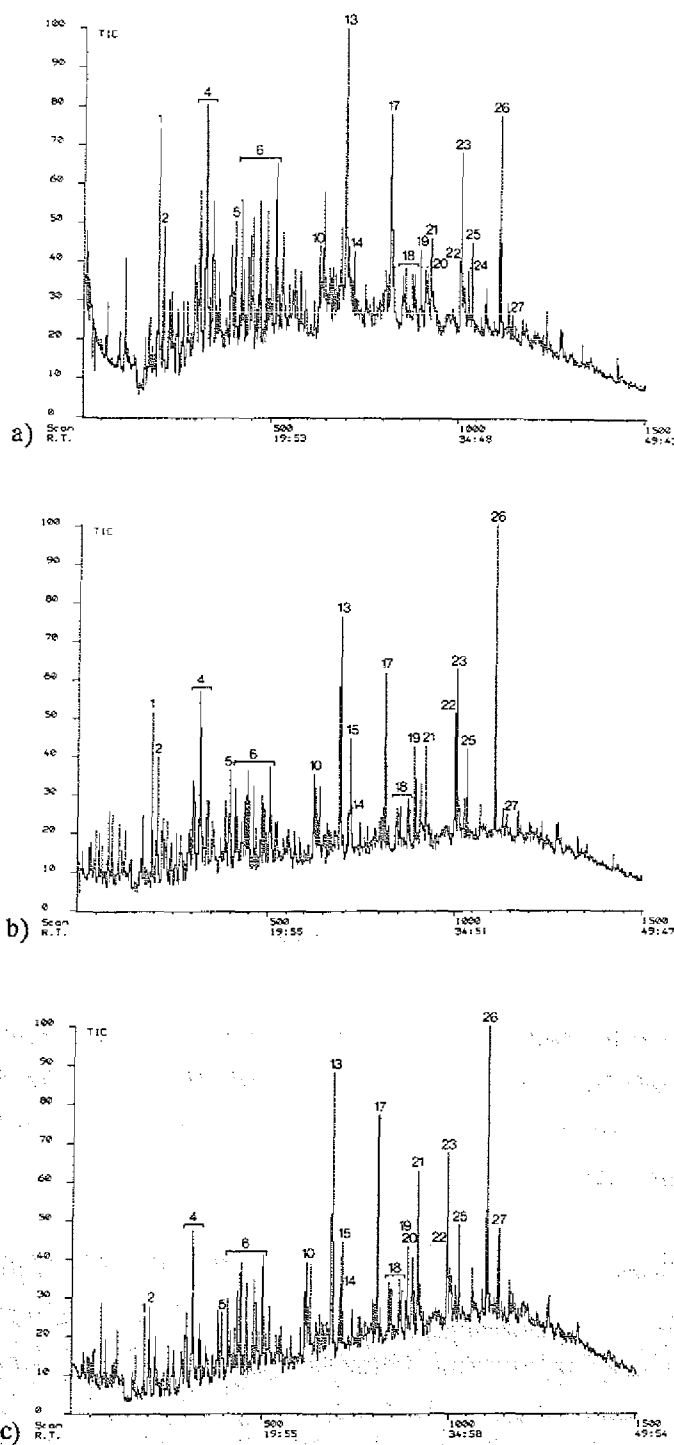


Abb. 5.1.3.6: Totalionenstromchromatogramme der verseiften Extrakte des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen (a), nach 9 Tagen (b) und nach 29 Tagen (c) (1: 2-Methylnaphthalin, 2: 1-Methylnaphthalin, 4: Dimethylnaphthaline, 5: 2,6,10-Trimethyltridecan, 6: Trimethylnaphthaline, 10: 2,6,10-Trimethylpentadecan, 13: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan, 14: Phenanthren, 15: β -Trimethylsiloxydodecancarbonsäuremethylester, 17: 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan, 18: Methylphenanthrene, 19: Hexadecancarbonsäuremethylester, 20: 2,6,10,14-Tetramethylheptadecan, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 22: Dimethylphenanthrene, 23: Heptadecancarbonsäuremethylester, 24: 2,6,10,14-Tetramethyloctadecan, 25: Heptadecancarbonsäuremethylester, 26: Octadecancarbonsäuremethylester, 27: Octadecancarbonsäuremethylester).

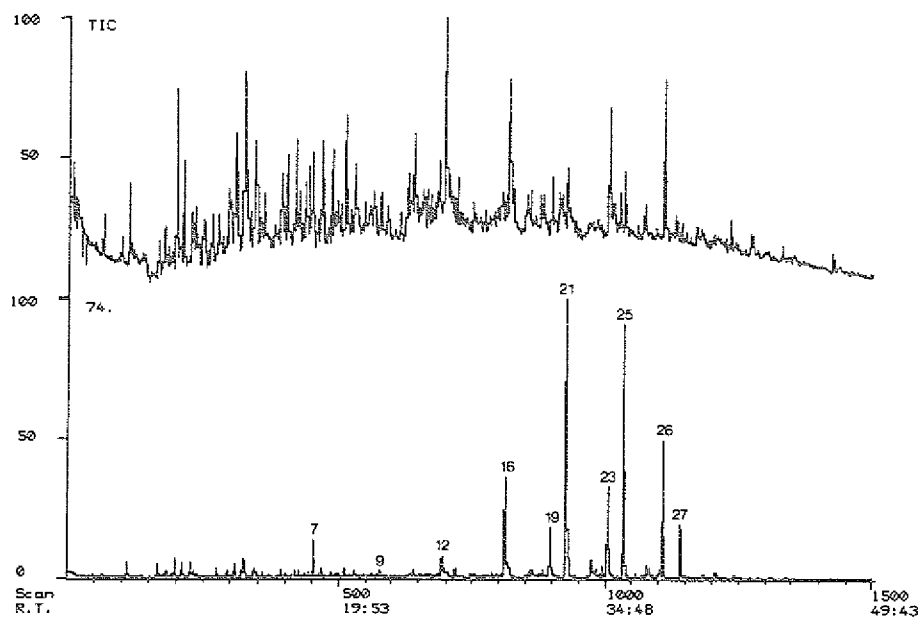


Abb. 5.1.3.7: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) des verseiften Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 2 Tagen

(7: Dodecancarbonsäuremethylester, 9: Tridecancarbonsäuremethylester, 12: Tetradecancarbonsäuremethylester, 16: Pentadecancarbonsäuremethylester, 19: Hexadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: Heptadecancarbonsäuremethylester, 25: Heptadecancarbonsäuremethylester, 26: Octadecancarbonsäuremethylester, 27: Octadecancarbonsäuremethylester).

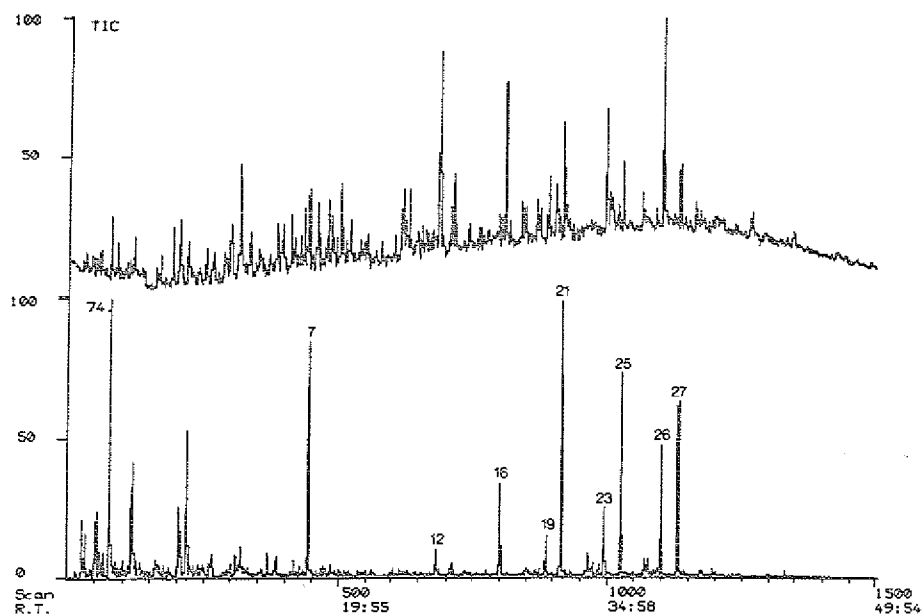


Abb. 5.1.3.8: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) des verseiften Extrakts des Dieselöl-Abbaus nach 29 Tagen

(7: Dodecancarbonsäuremethylester, 12: Tetradecancarbonsäuremethylester, 16: Pentadecancarbonsäuremethylester, 19: Hexadecancarbonsäuremethylester, 21: Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: Heptadecancarbonsäuremethylester, 25: Heptadecancarbonsäuremethylester, 26: Octadecancarbonsäuremethylester, 27: Octadecancarbonsäuremethylester).

5.2 Kontinuierliche Kultur

5.2.1 Versuchsbedingungen

Für den Dieselölabbau unter kontinuierlichen Bedingungen wurde ein zweistufiges Kultursystem mit chemostatischer Betriebsführung eingerichtet. Es bestand aus zwei Bioreaktoren (Reaktor I: $V=3,5$ l und Reaktor II: $V=20$ l), einem Emulgationsgefäß und zwei Vorratsbehältern, einem für das Dieselöl und einem für das Mineralmedium zur Versorgung der Mikroorganismen mit essentiellen Nährstoffen (Abb. 5.2.1.1).

Das Kulturmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

NH_4NO_3	0,40 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,04 g
Spurenelementlösung	1 ml
Fe(II)-EDTA-Lösung	1 ml
H_2O entionisiert	ad 1000 ml.

Die Spurenelementlösung enthielt:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 mg
H_2O entionisiert	ad 1000 ml.

Die Fe(II)-EDTA-Lösung bestand aus:

Titriplex III	9,30 g/l
FeSO_4	6,95 g/l
H_2O entionisiert	ad 1000 ml.

Das C:N-Verhältnis wurde auf 100:10 eingestellt.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde kontinuierlich frisches Reaktionsmedium zugeführt und, um den Flüssigkeitsstand in den beiden Reaktoren stets auf gleichem Ni-

veau zu halten, eine entsprechende Menge Produktlösung entnommen. Spezielle Einbauten und ein hochtourig laufender Rührer (1200 U/min) sollten eine gleichmäßige Vermischung von Öl- und Wasserphase im Emulgationsgefäß bewirken und dadurch eine bessere Verfügbarkeit des Substrats für die Bakterien gewährleisten. Um die Stabilität der Emulsion zu erhöhen, wurden zusätzlich die durch mikrobielle Aktivität während des Degradationsprozesses gebildeten oberflächenaktiven Substanzen in das Emulgationsgefäß zurückgeleitet. Ihre Abtrennung erfolgte mittels einer dem Reaktor II vorgeschalteten Filtereinheit (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$). pH-Controller hielten den pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M NaOH in beiden Reaktoren im neutralen Bereich bei pH 7. Die Bioreaktoren wurden mit Luft begast, so daß der Abbau in aerobem Milieu stattfand.

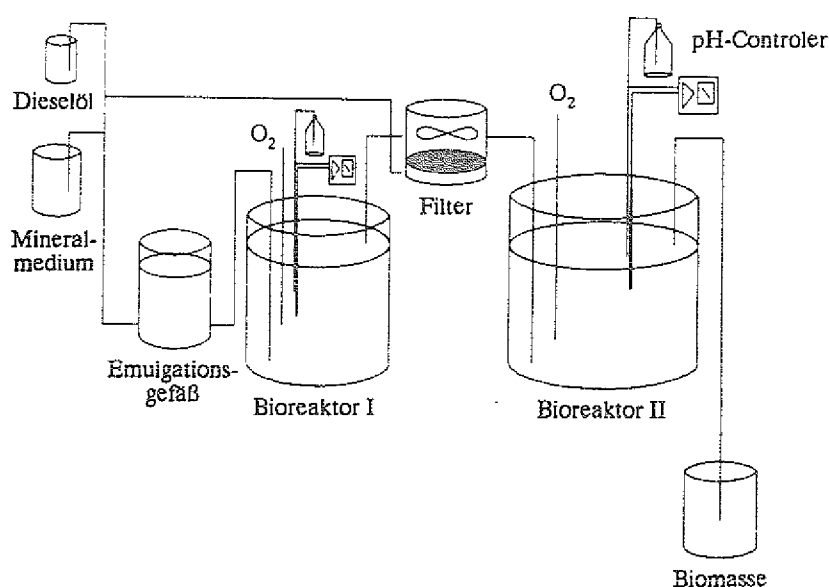


Abb. 5.2.1.1: Zweistufiges Kultursystem zur Züchtung dieselölabbauender Mikroorganismen (nach Rohns 1992).

Variable Größen der Versuchsdurchführung waren die Konzentrationen des Dieselöls, die Belüftungsrate der beiden Reaktoren und die Verweilzeit des Mediums in den Reaktionsgefäßen. So differierten beispielsweise die Konzentrationen zwischen 4 g/l und 7 g/l, betrugen die mittleren Verweilzeiten zu Beginn des Experiments zunächst 16 Stunden für Bioreaktor I und 93 Stunden für Bioreaktor II und wurden später auf 12 Stunden für Bioreaktor I und 70 Stunden für Bioreaktor II verkürzt. Detaillierte Angaben bezüglich spezieller Probennahmetermine finden sich in Rohns (1992).

Sowohl bei den Versuchen mit Reinsubstanzen als auch beim Dieselölabbau in Batch-Kultur waren nur Mikroorganismen der Spezies *Acinetobacter junii* eingesetzt worden.

Für den Dieselölabbau in kontinuierlicher Kultur wurde dagegen eine Mischpopulation ausgewählt, die neben *Acinetobacter junii* *Flavobacterium indologenes*, *Pseudomonas diminuta*, *Aeromonas* sp. oder *Shewanella spec.*, *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans* und eine nicht identifizierte Spezies enthielt.

Diese Versuchsführung war seitens des Instituts für Biotechnologie 3 der KFA Jülich darauf ausgerichtet, durch Optimierung möglichst vieler Parameter eine hohe Biomasseproduktion zu erreichen, d.h. in kurzer Zeit eine große Zahl an dieselölabbauenden Mikroorganismen zu züchten. Aufgrund der ständigen Substratzufuhr und der sich im Verlauf des Experiments mehrfach ändernden Degradationsbedingungen konnten jedoch keine Studien zum sukzessiven Abbau von Dieselöl betrieben werden. Eine Massenbilanz erschien infolgedessen wenig sinnvoll.

5.2.2 Probenaufbereitung

Entsprechend der Versuchsanordnung im zweistufigen Kultursystem gehören zu einer Beprobung jeweils eine Probe aus dem Bioreaktor I (kürzere Verweilzeit) und eine aus dem Bioreaktor II (längere Verweilzeit). Feste Reaktionsprodukte in Form von Wachsesteinen ließen sich im Reaktionsmedium optisch nicht erkennen, so daß ebenso wie bei den Batch-Ansätzen nur in wäßrigem Medium lösliche oder emulgierte freie und gebundene Metaboliten zu extrahieren waren. Die Aufarbeitung der Proben wurde in gleicher Weise vorgenommen, wie für die Versuche mit den Reinsubstanzen in Kap. 4.1.2 (siehe Seite 41) beschrieben. Die isolierten Extrakte wurden wegen der Komplexität der Gemische zusätzlich mittels der von Radke et al. (1980) entwickelten Methode der Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie in die Fraktionen der gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffe und der Heterokomponenten aufgetrennt.

5.2.3 Bedingungen für die instrumentelle Analytik

Die Identifizierung der aus dem Reaktionsmedium isolierten Stoffwechselprodukte erfolgte ebenso wie bei den anderen Experimenten ausschließlich aufgrund von GC/MS-Daten. Einzelionenerfassung war allerdings auch bei dieser Versuchsreihe nicht möglich,

vielmehr mußten stets komplette Massenspektren aufgenommen werden. Zur Auswertung der Produktverteilung diente neben der Anfertigung von Massenchromatogrammen ausgewählter Schlüsselfragmente und Molekütionen die Interpretation von Massenspektren. Abweichend von den in Kap. 4.1.3 (siehe Seite 42) beschriebenen Aufnahmeparametern wurde für die Messungen der Proben aus dem zweistufigen Kultursystem jedoch ein anderes Temperaturprogramm gewählt:

Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 4160

Quarzkapillarsäule: CP-Sil 5 CB

Länge: 50 m

Innendurchmesser: 0,25 mm

Außendurchmesser: 0,39 mm

Belegungsdicke: 0,25 μm

Trägergas: Helium

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 60 °C

Aufheizrate: 3 °C/min

Endtemperatur: 300 °C

Haltezeit: 4 min

Kaltaufgabesystem Gerstel

Temperaturprogramm

Aufgabetemperatur: -40 °C

Haltezeit: 120 s

Aufheizrate: 10 °C/s

Haltezeittemperatur: 350 °C

Haltezeit: 300 s

Splitlos

Massenspektrometer VG 7070E mit Kratos DS 90 on-line-Datensystem

Ionisierungsenergie: 70 eV

Quellentemperatur: 220 °C

Massenbereich: m/z 45-900

Zykluszeit: 2,3 s/Dekade

Zur Quantifizierung der gesättigten Kohlenwasserstoffe wurden gaschromatographische Aufnahmen herangezogen, bei denen der Isoprenoidkohlenwasserstoff Squalan als Referenz

renzsubstanz verwendet worden war. Die analytischen Bedingungen sind nachfolgend zusammengestellt:

Gaschromatograph Hewlett Packard 5710 A

Quarzkapillarsäule: FS SE-54-CB

Länge: 25 m

Außendurchmesser: 0.46 mm

Innendurchmesser: 0.32 mm

Belegungsdicke: 0.12 μm

Träger- und Brenngase: Helium, Wasserstoff, synth. Luft, Argon

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 80 °C

Aufheizrate: 4 °C/min

Endtemperatur: 300 °C

Haltezeit: 32 min

Kaltaufgabesystem Gerstel

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 30 °C

Aufheizrate: 5 °C/s

Endtemperatur: 300 °C

Haltezeit: 120 s

Split: 320 ml/min

5.2.4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war nicht vorgesehen, die komplexen Änderungen, die aus den während des Experiments zum Teil beträchtlich variierenden Versuchsbedingungen resultierten, im einzelnen zu verfolgen. Es ging vielmehr darum, verschiedene Biodegradationszustände zu studieren. Dazu war zunächst eine Bewertung der Öle hinsichtlich ihres Biodegradationsgrades auf der Basis der *n*-Alkan-Verteilungen vorgesehen. Zusätzlich sollte der Versuch einer Korrelation zwischen unterschiedlichen Ab-

baustadien und der Verteilung der aromatischen Kohlenwasserstoffe einerseits sowie der neugebildeten Metaboliten, insbesondere Carbonsäuren und Alkohole, andererseits unternommen werden.

Gesättigte Kohlenwasserstoffe

Die Abbildungen 5.2.4.1b-i zeigen gaschromatographische Aufnahmen der *n*-Alkan-Verteilungen der freien Extrakte des Dieselölabbau aus den Bioreaktoren I und II im Vergleich zu der des Ausgangsöls (Abb. 5.2.4.1a). Die Absolutkonzentrationen der *n*-Alkane aus den unterschiedlich degradierten Ölen sind in Tab. 5.2.4.1 zusammengestellt.

Bei den in zeitlicher Sequenz angeordneten Gaschromatogrammen der Proben aus dem Bioreaktor I (Abb. 5.2.4.1b, d, f und h) bot sich folgendes Bild: Die Extrakte zeichneten sich durch eine nahezu identische *n*-Alkan-Verteilung aus, die sich von der des Dieselöls nur durch leicht erniedrigte Relativkonzentrationen der Verbindungen mit weniger als 15 Kohlenstoffatomen unterschied. Diese Abweichung ist vermutlich eine Folge der Abdampfverluste bei der Entfernung des Lösungsmittels und der Fraktionierung der Extrakte. Das Verteilungsmuster der *n*-Alkane deutet darauf hin, daß kein selektiver Abbau von Verbindungen mit bestimmten Kohlenstoffzahlen oder innerhalb eines bestimmten Kohlenstoffzahlbereiches stattgefunden hat, sondern die aliphatischen Verbindungen im quantifizierten Bereich von *n*-C₁₅ bis *n*-C₃₂ in allen Proben offensichtlich in gleichem Maße mikrobiell verwertet wurden. Wie aus dem Verhältnis der Konzentrationen der Isoprenoide Pristan und Phytan zu denen der aliphatischen Kohlenwasserstoffe *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈ in Relation zu dem Verhältnis der Konzentrationen dieser Verbindungen im Ausgangsöl zu entnehmen ist, hat in allen Fällen ein nicht unbeträchtlicher Abbau stattgefunden. Den Absolutkonzentrationen zufolge (Tab. 5.2.4.1) nahm die Degradation, gemessen an der Summe der *n*-Alkane, in den ersten drei Proben deutlich zu. Im Extrakt vom 16.1.90 betrug die Summe der *n*-Alkane nur noch 9 % des Wertes, der für das als Substrat verwendete Dieselöl errechnet wurde. Die Konzentrationen der Isoprenoide zeigten eine gegenläufige Tendenz, so daß abnehmenden Gehalten an *n*-Alkanen zunehmende Gehalte an Isoprenoiden gegenüberstanden. Ihr Anteil vergrößerte sich von anfangs 13 %, bezogen auf die Menge an *n*-Alkanen insgesamt, auf 27 % in den Extrakten vom 6.11.89 und 13.12.89 und ging dann geringfügig zurück auf 23 % im Extrakt vom 16.1.90. Der Extrakt vom 6.6.90 wies erheblich höhere Gehalte an *n*-Alkanen auf als die drei zuvor beschriebenen.

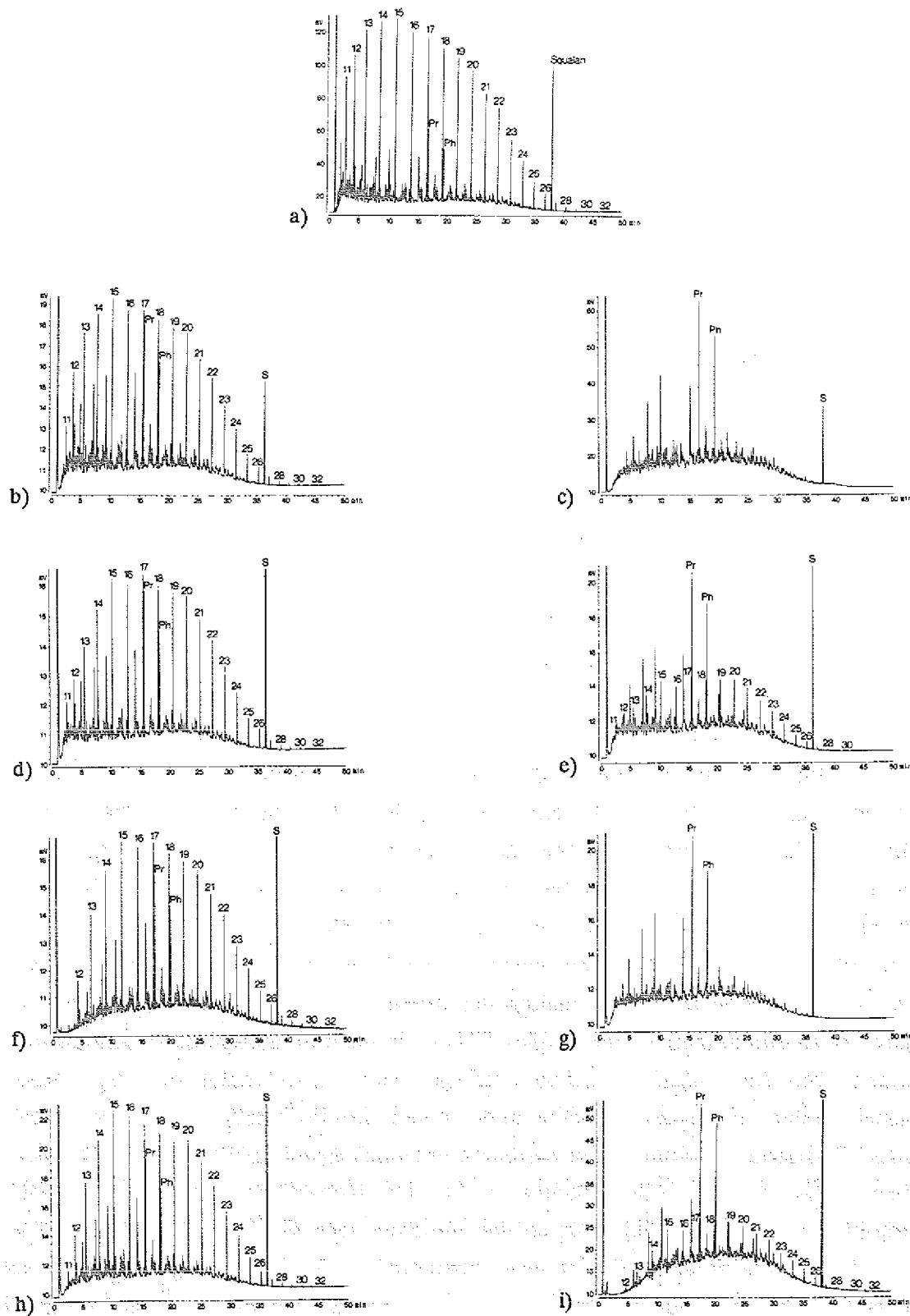


Abb. 5.2.4.1: Gaschromatogramme der gesättigten Kohlenwasserstoffe des freien Extrakts des Ausgangsöls (a) und der freien Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem (b und c: Extrakte vom 6.11.89, d und e: Extrakte vom 13.12.89, f und g: Extrakte vom 16.1.90, h und i: Extrakte vom 6.6.90).

Probennahme	11.05.1989	06.11.1989		13.12.1989		16.01.1990		06.06.1990	
Probe	Ausgangsöl	Bioreaktor I	Bioreaktor II	Bioreaktor I	Bioreaktor II	Bioreaktor I	Bioreaktor II	Bioreaktor I	Bioreaktor II
n-Alkane	Konzentration in Mikrogramm / Gramm Öl								
15	9275,4	6915,3	-	1147,5	1583,5	793,4	-	7998,5	1478,5
16	9228,9	7134,2	-	1193,4	1927,4	841,5	-	8527,9	1321,4
17	9175,8	6762,3	-	1229,6	1718,8	812,7	-	8347,7	1453,8
18	8612,1	6984,7	-	1231,2	1982,9	806,2	-	8220,7	1216,0
19	8141,4	6963,5	-	1169,0	1796,4	731,3	-	7602,3	1328,0
20	7460,6	5661,5	-	1066,8	1636,5	683,5	-	6880,8	1089,9
21	6545,7	5131,5	-	952,2	1568,2	619,9	-	6000,1	958,4
22	5296,4	4160,9	-	757,2	1172,4	487,5	-	4903,4	791,1
23	3880,9	3207,8	-	615,6	990,9	363,4	-	3538,0	583,8
24	2772,3	2392,9	-	424,0	716,7	276,0	-	2663,2	592,6
25	1661,1	1353,0	-	259,8	421,3	154,7	-	1699,7	566,4
26	957,6	826,7	-	175,2	285,8	104,2	-	1100,8	325,7
27	537,6	376,8	-	78,1	-	45,8	-	533,5	158,1
28	292,7	227,3	-	47,0	-	26,1	-	306,9	68,2
29	185,0	133,7	-	-	-	14,4	-	195,6	57,2
30	108,9	-	-	-	-	-	-	-	56,7
31	73,8	-	-	-	-	-	-	-	35,6
32	58,8	-	-	-	-	-	-	-	27,1
Summe n-Alkane	74256,7	58232,1	-	10346,6	15800,8	6760,5	-	68519,1	12108,4
Pristan	5528,6	8696,8	-	1553,2	7035,8	849,1	-	8405,3	6019,5
Phytan	4460,9	7296,8	-	1262,3	6283,8	700,7	-	6986,4	5505,8

Tab. 5.2.4.1: Konzentrationen der gesättigten Kohlenwasserstoffe des freien Extrakts des Ausgangsöls und der freien Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem.

Die Gaschromatogramme der entsprechenden Extrakte aus dem Bioreaktor II sind im rechten Teil der Abb. 5.2.4.1 dargestellt. Aufgrund der erheblich längeren Verweilzeit des Reaktionsmediums in diesem Reaktor wiesen die Extrakte, verglichen mit denen des Reaktors I, generell einen wesentlich höheren Biodegradationsgrad auf. In den Extrakten vom 6.11.89 und 16.1.90 war der Abbau bereits so weit fortgeschritten, daß sich bei der gaschromatographischen Analyse überhaupt keine *n*-Alkane mehr nachweisen ließen und die Isoprenoidkohlenwasserstoffe Pristan und Phytan die beiden Hauptkomponenten bildeten. Charakteristische Gaschromatogramme eines mäßig starken Abbaus von Dieselöl zeigen die Abb. 5.2.4.1e und i. In beiden Proben waren die Gehalte an *n*-Alkanen im Vergleich zu Pristan und Phytan zwar stark zurückgegangen, das typische Fingerabdruckmuster des Dieselöls ließ sich aber dennoch erkennen.

Zusammenfassend läßt sich anmerken, daß bei dieser Versuchsdurchführung infolge der mehrfach abgewandelten Versuchsbedingungen erwartungsgemäß kein eindeutiger Trend im Sinne einer gerichteten Entwicklung der *n*-Alkan-Verteilung festgestellt werden konnte.

Da vor der Verseifung keine Abtrennung der Kohlenwasserstoffe erfolgte, unterschieden sich die verseiften Extrakte aufgrund der großen Dominanz der *n*-Alkane nicht von den freien und werden daher hier nicht abgebildet.

Aromatische Kohlenwasserstoffe

Um den Einfluß der Biodegradation auf die aromatischen Kohlenwasserstoffe zu studieren, wurden alkylsubstituierte Naphthaline und Phenanthrene untersucht. Zur Auswertung der Produktverteilung diente neben der Anfertigung von Massenchromatogrammen ausgewählter Molekülonen die Interpretation von Massenspektren.

Die Massenchromatogramme der für alkylsubstituierte Naphthaline relevanten Molekülonen für die freien Extrakte des Dieselölabbaus aus den Bioreaktoren I und II sind in zeitlicher Sequenz in Abb. 5.2.4.2 zusammengestellt. Die entsprechenden Spuren des Ausgangsöls sind auf Seite 91 abgebildet.

Bei den Extrakten aus dem Bioreaktor I (Abb. 5.2.4.2a, c, e und g) ließ sich im Verlauf

des Experiments folgendes beobachten: Während sich die Naphthalin-Verteilung des Extrakts vom 6.11.89 von der des Ausgangsöls nicht unterschied, zeigte die des Extrakts vom 13.12.89 eine recht drastische Veränderung bei den Methylnaphthalinen. Das 2-Methylnaphthalin war bereits völlig verschwunden und die Konzentration des 1-Methylnaphthalins erheblich zurückgegangen. Auch bei Dimethylnaphthalinen und Ethylnaphthalinen konnte eine deutliche Abnahme der Relativkonzentrationen verzeichnet werden. Die höher alkylierten Verbindungen verhielten sich hingegen beständig. Im Gegensatz dazu war sowohl der Extrakt vom 16.1.90 als auch der Extrakt vom 6.6.90 (Abb. 5.2.4.2g) durch eine generelle Konzentrationsabnahme aller untersuchten Verbindungen charakterisiert. Gleichzeitig verloren die Methylnaphthaline ihre Dominanz. Dadurch eluierte, insbesondere an der für Dimethylnaphthaline und Ethylnaphthaline typischen Spur des Moleküls (m/z 156) gut zu erkennen, eine Vielzahl neuer Verbindungen, deren Relativkonzentrationen größer geworden waren. Der Extrakt vom 6.6.90 wies darüber hinaus ein anderes Isomerenverhältnis von 2-Methylnaphthalin zu 1-Methylnaphthalin auf als der Extrakt vom 6.11.89.

Die Naphthaline der Extrakte aus dem Bioreaktor II (Abb. 5.2.4.2b, d, f und h) waren demgegenüber wesentlich stärker durch mikrobielle Aktivität geprägt. So ließen sich bereits im Extrakt vom 6.11.89 (Abb. 5.2.4.2b) überhaupt keine Methylnaphthaline mehr nachweisen, und die Degradation hatte sogar Dimethylnaphthaline, Ethylnaphthaline und einen Teil der C_3 -Naphthaline erfaßt. Die C_4 -Naphthaline präsentierten sich dagegen unverändert. Diese Tendenz verstärkte sich mit zunehmender Versuchsdauer. Obgleich sich das Verteilungsmuster der hochalkylierten C_4 -Naphthaline nicht veränderte, gingen die Relativkonzentrationen stark zurück. Die Massenchromatogramme des Extrakts vom 6.6.90 gaben deutliche Hinweise darauf, daß sowohl Dimethylnaphthaline und Ethylnaphthaline als auch C_3 - und C_4 -Naphthaline nur noch in sehr kleinen Konzentrationen vorlagen. Ebenso wie bei den Extrakten aus dem Bioreaktor I vergrößerten sich dadurch auch hier die Relativkonzentrationen solcher Verbindungen, die vorher aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht in Erscheinung getreten waren.

Die Massenchromatogramme der für Phenanthren und alkylierte Phenanthrene charakteristischen Molekülen der freien Extrakte des Dieselölabbau aus den Bioreaktoren I und II finden sich in Abb. 5.2.4.3. Bezüglich der entsprechenden Darstellung dieser Spuren des Ausgangsöls wird auf Seite 92 verwiesen.

Die Verteilung der Phenanthrene blieb in den Extrakten aus dem Bioreaktor I während der gesamten Versuchsdauer unverändert.

Bioreaktor I

Bioreaktor II

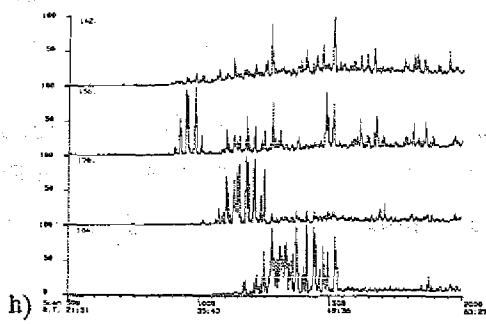
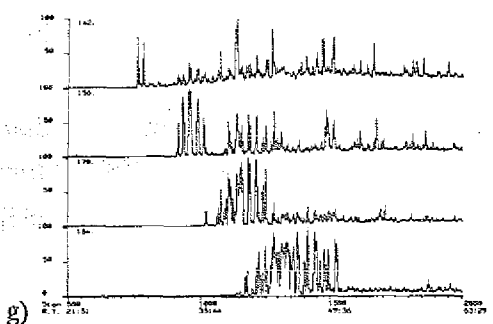
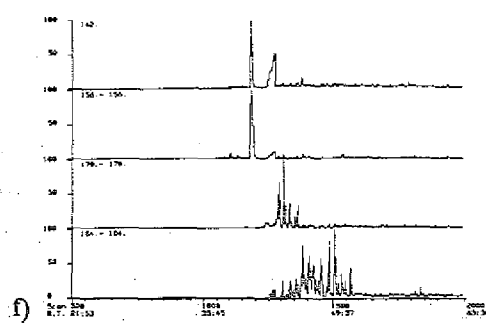
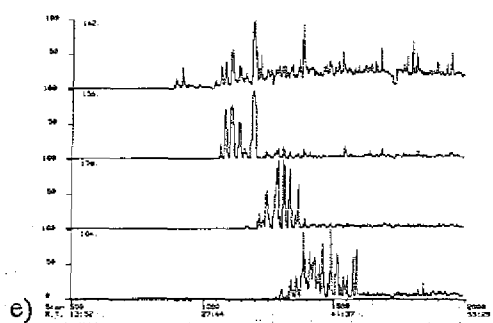
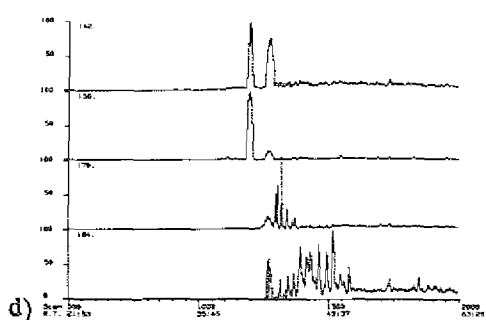
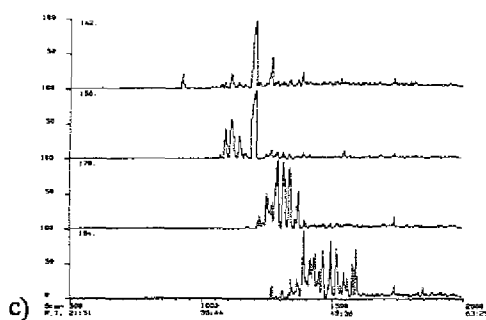
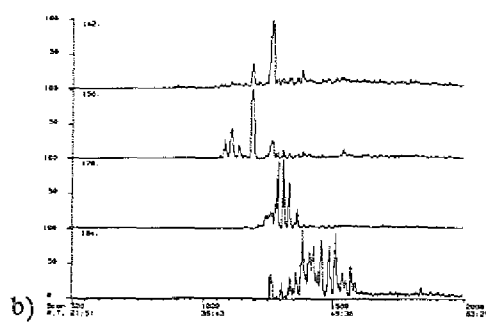
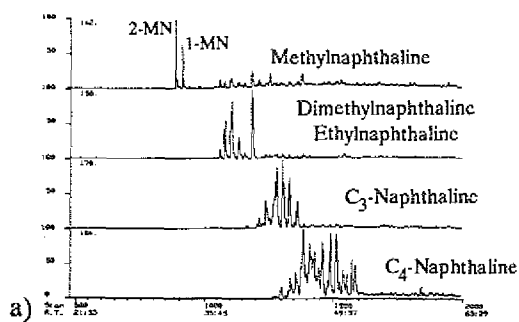


Abb. 5.2.4.2: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülonen der alkylsubstituierten Naphthaline der freien Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem (a und b: Extrakte vom 6.11.89, c und d: Extrakte vom 13.12.89, e und f: Extrakte vom 16.1.90, g und h: Extrakte vom 6.6.90).

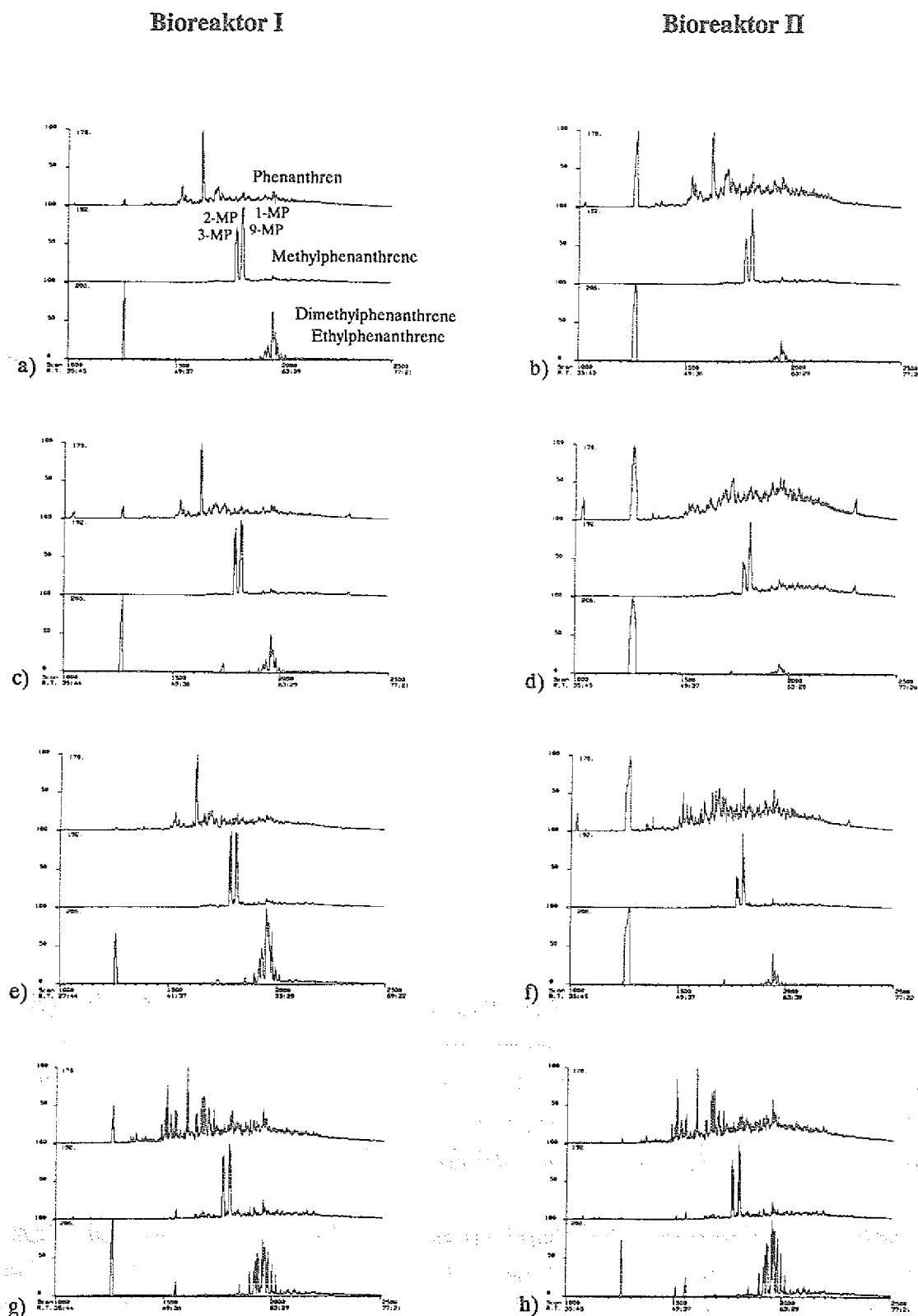


Abb. 5.2.4.3: Massenchromatogramme der charakteristischen Moleküllionen des Phenanthrens und der alkylsubstituierten Phenanthrene der freien Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem (a und b: Extrakte vom 6.11.89, c und d: Extrakte vom 13.12.90, e und f: Extrakte vom 16.1.90, g und h: Extrakte vom 6.6.90).

Im Gegensatz dazu ließen sich bei den Phenanthrenen der Extrakte aus dem Bioreaktor II in gleicher Weise wie bei den Naphthalinen deutliche Anzeichen mikrobieller Verwertung wahrnehmen. Die Produktverteilung des Extrakts vom 6.11.89 (Abb. 5.2.2.3b) hatte sich zwar, verglichen mit der des Ausgangsöls, nicht verändert, aufgrund der Relativkonzentrationen läßt sich jedoch belegen, daß sowohl die Konzentration des Phenanthrens als auch die Konzentrationen der Methylphenanthrene merklich abgenommen haben. Die Darstellung der Methylphenanthrene dieses Extrakts ist insofern nicht präzise, als nicht alle Isomere chromatographisch voneinander getrennt worden waren. Bei längerer Versuchsdauer (Abb. 5.2.4.3c) fehlte das Phenanthren dann völlig, und die Konzentrationen der Methylphenanthrene erschienen deutlich reduziert. Der Extrakt vom 6.6.90 enthielt wieder Phenanthren, im Vergleich zu den Begleitsubstanzen allerdings etwas weniger als das Ausgangsöl, die Methylphenanthrene zeigten sich unverändert. Diese Verteilung läßt sich darauf zurückführen, daß erst relativ kurz vor der Probennahme neues Substrat in erhöhter Konzentration zugegeben wurde. Die Entwicklung bei den Dimethylphenanthrenen ist wegen des komplexeren Isomerenmusters (Radke 1987) nicht so einfach zu verfolgen, es hat aber den Anschein, als ob sie durch die Biodegradation weniger beeinflußt worden wären als Phenanthrene und Methylphenanthrene.

Carbonsäuren

Freier Extrakt

Freie Fettsäuren waren nahezu in allen Extrakten in großer Menge vorhanden (Abb. 5.2.4.4). Im Vergleich zu den Experimenten mit Reinsubstanzen und dem Dieselölabbau in Batch-Kultur ließen sich unter den Bedingungen des zweistufigen Kultursystems erheblich komplexere Verteilungsmuster beobachten, vermutlich infolge des guten Nährstoffangebots für die Mikroben und der ständigen Zufuhr neuen Substrats.

Die Massenchromatogramme des charakteristischen Fragmentions für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) der Extrakte aus dem Reaktor I sind in zeitlicher Reihenfolge in der linken Hälfte, die der Extrakte aus dem Reaktor II in der rechten Hälfte der Abbildung angeordnet.

Demnach bestand bei den Extrakten aus dem Bioreaktor I während des gesamten Expe-

riments keine Korrelation zwischen Carbonsäuren und *n*-Alkanen. Obgleich beim Abbau der *n*-Alkane keine Bevorzugung bestimmter Kohlenstoffzahlen oder eines Kohlenstoffzahlbereichs festgestellt werden konnte und die *n*-Alkan-Verteilungen infolgedessen nahezu konstant blieben, spiegelten die Verteilungen der Carbonsäuren dies nicht wider. In den ersten beiden zeitlich aufeinander folgenden Extrakten (Abb. 5.2.4.4a und c) waren in relativ engem Bereich Carbonsäuren nachweisbar, wobei Verbindungen mit 15 bis 18 Kohlenstoffatomen dominierten. Der Extrakt vom 16.1.90 (Abb. 5.2.4.4e) zeichnete sich durch eine wesentlich komplexere Carbonsäureverteilung aus. Die gesättigten Säuren ließen sich in relativ hoher Konzentration bis C₂₂ nachweisen. Im vorderen Bereich des Massenchromatogramms trat eine Vielzahl neuer Verbindungen auf, die infolge fehlender Molekülionen allerdings nicht identifiziert werden konnten. Aufgrund des Fragmentierungsmusters dürfte es sich um aliphatische Carbonsäuren handeln, einige von ihnen möglicherweise auch verzweigt. Die Säureverteilung des Extrakts vom 6.6.90 (Abb. 5.2.4.4g) unterschied sich von der zuvor beschriebenen insbesondere durch eine Konzentrationsabnahme der Verbindungen mit höherer Retentionszeit und erinnerte insgesamt an die beiden ersten Proben.

Erwartungsgemäß boten die Säureverteilungen der Extrakte aus dem Bioreaktor II aufgrund der längeren Abbauphase komplexere Muster. Beispiele starker mikrobieller Abbautätigkeit zeigen die Abb. 5.2.4.4.d und f. Es hatte sich ein breites Spektrum an Carbonsäuren gebildet, das einen großen Kohlenstoffzahlbereich überstrich und zusätzlich ein unaufgelöstes komplexes Gemisch umfaßte. Obgleich auch bei diesen Proben infolge fehlender Molekülionen die exakte Identifizierung der Verbindungen mit niedriger Retentionszeit nicht möglich war, dürften diese Metaboliten 7 bis 8 Kohlenstoffatome enthalten. Die Fragmentierungsmuster deuten darauf hin, daß diese Verbindungen als aliphatische, möglicherweise auch verzweigte Carbonsäuren anzusprechen sind. Daneben konnte eine *isoprenoid*-C_{16:1}-Carbonsäure nachgewiesen werden. Im oberen Scanzahlbereich waren mit C_{15:1}- und C_{16:1}-Carbonsäure, zwei Isomeren von C_{17:1}-Carbonsäure und C_{18:1}-Carbonsäure im Gegensatz zum unteren einfach ungesättigte Carbonsäuren stark vertreten. Die ungesättigten Carbonsäuren, die bei den Reinsubstanzversuchen beobachtet wurden, sind daher sicherlich keine Artefakte oder Kontaminationen. Darüber hinaus eluierten im Massenchromatogramm des Extrakts vom 16.1.90 (Abb. 5.2.4.4f) im Retentionszeitbereich der C_{18:0}-Carbonsäure einige nicht identifizierte Substanzen. Aufgrund der Retentionszeit ist zu vermuten, daß es sich dabei um verzweigte oder auch *isoprenoide* Carbonsäuren handelt. Die Säureverteilung des Extrakts vom 6.6.90 hatte demgegenüber wieder ein recht einfaches Muster, das zusammen mit der relativ hohen Konzentration an *n*-Alkanen und nur leicht angegriffenen Aromaten als Merkmal niedrigen Biodegradationsgrades gewertet wurde.

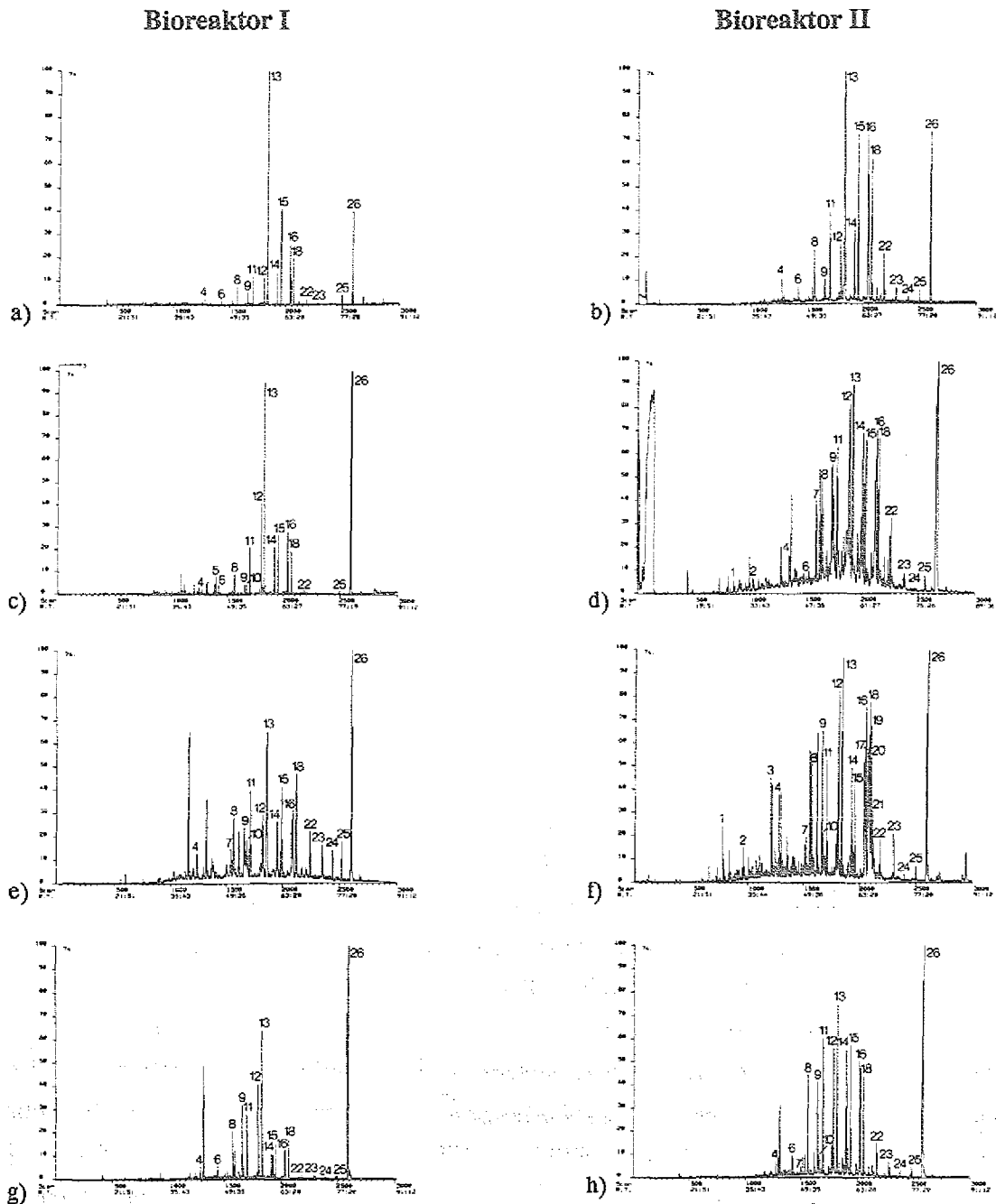


Abb. 5.2.4.4: Massenchromatogramme des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) der Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem (a und b: Extrakte vom 6.11.89, c und d: Extrakte vom 13.12.89, e und f: Extrakte vom 16.1.90, g und h: Extrakte vom 6.6.90)

(1-3: Carbonsäuremethylester, 4: Dodecancarbonsäuremethylester, 5: Tridecancarbonsäuremethylester, 6: Tridecancarbonsäuremethylester, 7: *isoprenoid*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 8: Tetradecancarbonsäuremethylester, 9: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 10: Pentadecancarbonsäuremethylester, 11: Pentadecancarbonsäuremethylester, 12: Hexadecancarbonsäuremethylester, 13: Hexadecancarbonsäuremethylester, 14: Heptadecancarbonsäuremethylester (zwei Isomere), 15: Heptadecancarbonsäuremethylester, 16: Octadecancarbonsäuremethylester, 17: Carbonsäuremethylester, 18: Octadecancarbonsäuremethylester, 19: Carbonsäuremethylester, 20: Carbonsäuremethylester, 21: Carbonsäuremethylester, 22: Nonadecancarbonsäuremethylester, 23: Eicosancarbonsäuremethylester, 24: Heneicosancarbonsäuremethylester, 25: Docosancarbonsäuremethylester, 26: Tricosancarbonsäuremethylester (Standard)).

Verseifter Extrakt

Die verseiften Extrakte (Abb. 5.2.4.5) enthielten, gemessen an dem internen Standard, generell erheblich höhere Gehalte an Carbonsäuren als die unverseiften Extrakte. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da durch die Hydrolyse eine Freisetzung der als Ester gebundenen Säuren erzielt werden sollte und sich in den verseiften Proben daher beide Säurefraktionen addieren. Die Unterschiede zwischen freiem und verseiftem Extrakt traten allerdings nicht so deutlich hervor wie bei den Versuchen mit Reinsubstanzen. Auch dies läßt sich vermutlich durch die ständige Substratzufuhr erklären. Die Produktverteilung hatte sich gegenüber dem freien Extrakt nicht verändert, es waren keine neuen Verbindungen hinzugekommen.

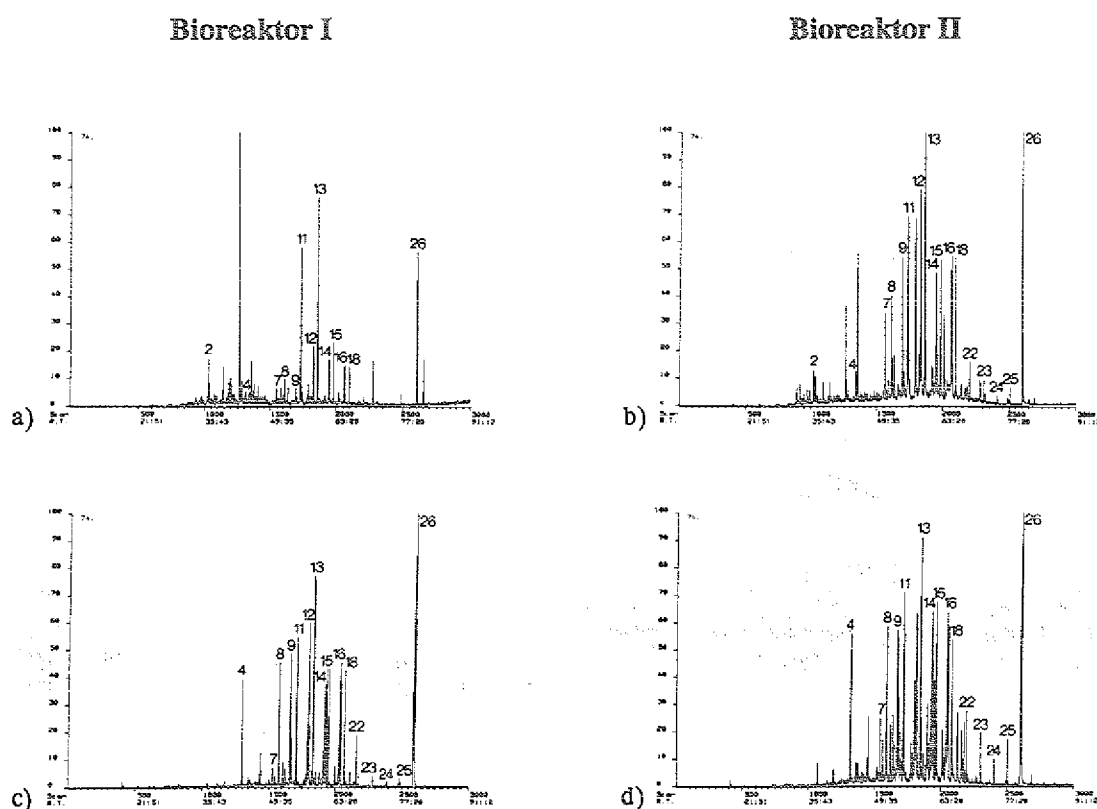


Abb. 5.2.4.5: Massenchromatogramme des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) der verseiften Extrakte aus den Bioreaktoren I und II des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem (a und b: Extrakte vom 13.12.89, c und d: Extrakte vom 6.6.90) (Peakidentifizierung siehe Abb. 5.2.4.4.).

Hydroxycarbonsäuren

Hydroxycarbonsäuren ließen sich nur im verseiften Extrakt nachweisen und nur in den beiden Proben vom 6.6.90 (Abb. 5.2.4.6). Diese waren durch relativ hohe Konzentrationen an gesättigten Kohlenwasserstoffen, geringe Biodegradationseffekte bei den aromatischen Kohlenwasserstoffen und mäßig differenzierte Carbonsäure-Verteilungen charakterisiert, hatten also insgesamt nur wenig Veränderung durch mikrobielle Verwertung erfahren. Möglicherweise ist die Bildung der Hydroxycarbonsäuren nur auf ein sehr frühes Biodegradationsstadium beschränkt. Beide Extrakte zeichneten sich durch eine nahezu identische Säure-Verteilung aus. Diese umfaßte neben β -Hydroxycarbonsäuren mit β -Hydroxy- $C_{12:0}$ -Carbonsäure als größter Komponente auch zwei Verbindungen, die aufgrund der massenspektrometrischen Fragmentierung als Methyl- β -hydroxy- $C_{12:0}$ -Carbonsäure und Methyl- β -hydroxy- $C_{14:0}$ -Carbonsäure identifiziert wurden. Eine Verifizierung durch Vergleichsspektren war nicht möglich.

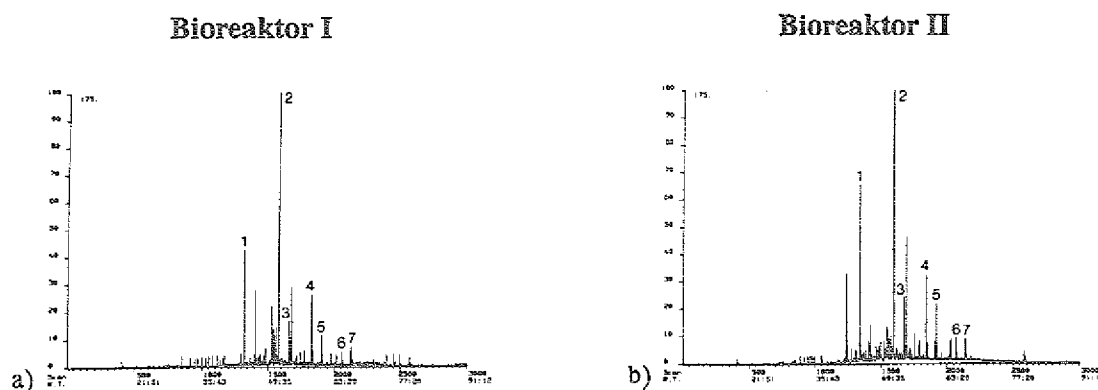


Abb. 5.2.4.6: Massenchromatogramme des charakteristischen Fragmentations für β -Hydroxycarbonsäuren als β -Trimethylsiloxycarbonsäuren der verseiften Extrakte vom 6.6.90 aus den Bioreaktoren I (a) und II (b) des Dieselöl-Abbaus im zweistufigen Kultursystem

(1: β -Trimethylsiloxydecancarbonsäuremethylester, 2: β -Trimethylsiloxydodecarbonsäuremethylester, 3: Methyl- β -trimethylsiloxydodecarbonsäuremethylester, 4: β -Trimethylsiloxytetradecancarbonsäuremethylester, 5: Methyl- β -trimethylsiloxytetradecancarbonsäuremethylester, 6: β -Trimethylsiloxyhexadecancarbonsäuremethylester, 7: β -Trimethylsiloxyheptadecancarbonsäuremethylester.

Aromatische Carbonsäuren

Ogleich bei den aromatischen Kohlenwasserstoffen, nicht nur bei den Naphthalinen, sondern auch bei den Phenanthrenen, zum Teil recht weitgehender Abbau stattgefunden hatte, war der Nachweis von Stoffwechselprodukten in Form aromatischer Carbonsäuren nur in einigen Fällen möglich. Während Naphthalincarbonsäuren immerhin in vier Proben auftraten, vor allem in den freien Extrakten aus dem Bioreaktor I, schienen sich Phenanthrencarbonsäuren offensichtlich während des gesamten Experiments nicht oder zumindest nicht in nachweisbarer Konzentration gebildet zu haben.

Naphthalincarbonsäuren

Naphthalincarbonsäuren konnten erstmals im freien Extrakt aus dem Bioreaktor I vom 13.12.89 aufgrund von Massenspektren identifiziert werden. Durch Oxidation der Methylgruppe von 2-Methylnaphthalin und 1-Methylnaphthalin waren die korrespondierenden Naphthalincarbonsäuren entstanden. Entsprechend der Verteilung der Methylnaphthaline in der charakteristischen Spur m/z 142 der Abb. 5.2.4.2 (siehe Seite 110), stellte die 2-Naphthalincarbonsäure die Hauptkomponente (Abb. 5.2.4.7, Spur m/z 186). Das Massenspektrum einer Naphthalincarbonsäure zeigt die Abb. 5.2.4.8. Charakteristische Peaks sind neben dem Molekülion m/z 186 die Fragmentationen der Massen m/z 155 und m/z 127, die durch Abspaltung der Methoxygruppe und des Carbonylrestes entstehen.

Methylnaphthalincarbonsäuren ließen sich in dieser Probe ebenfalls nachweisen, allerdings in deutlich geringerer Intensität als die Naphthalincarbonsäuren. Methylnaphthalincarbonsäuren werden aus Dimethylnaphthalinen durch Oxidation einer der beiden Methylgruppen gebildet, ihr Molekülion erhöht sich infolgedessen verglichen mit dem der Naphthalincarbonsäuren um 14 Masseneinheiten auf m/z 200 (Abb. 5.2.4.7). Da die massenspektrometrische Fragmentierung beider Spezies in gleicher Weise erfolgt, ergeben sich Fragmentationen der Massen m/z 169 und m/z 141 (Abb. 5.2.4.9). Die verschiedenen Isomere unterscheiden sich hinsichtlich der Intensitäten dieser drei Peaks.

Möglicherweise haben sich auch Spuren von Naphthalindicarbonsäuren gebildet. Die Spektren sind jedoch nicht so gut, als daß eine eindeutige Verifizierung möglich gewesen wäre.

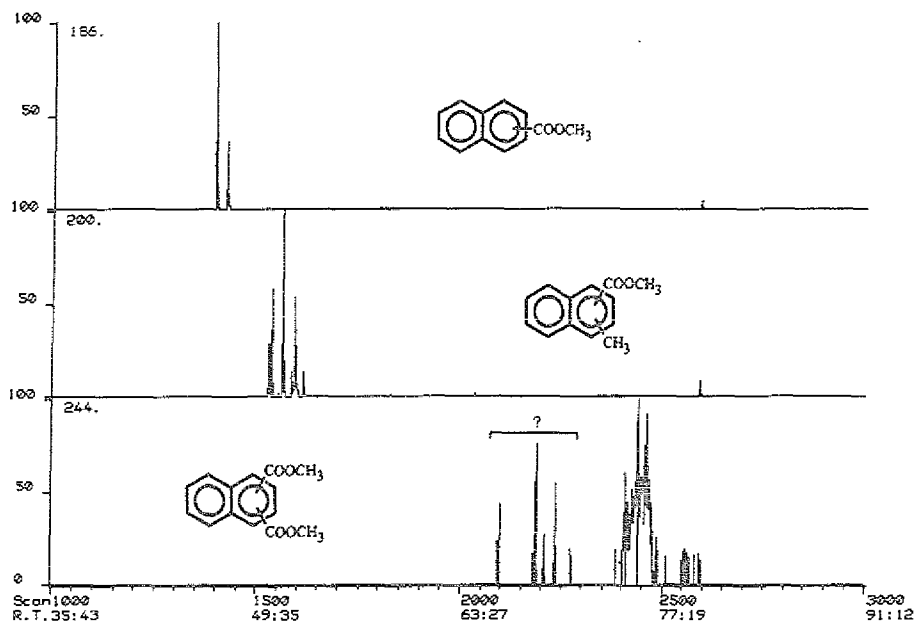


Abb. 5.2.4.7: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülonen für Naphthalincarbonsäuren (m/z 186), Methylnaphthalincarbonsäuren (m/z 200) und Naphthalindicarbonsäuren (m/z 244) als Methylester des freien Extrakts aus dem Bioreaktor I vom 13.12.89.

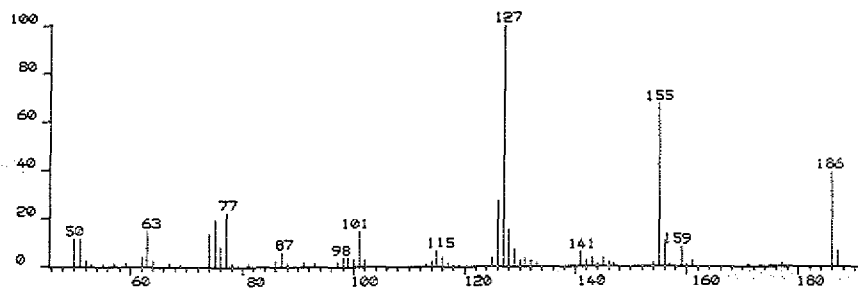


Abb. 5.2.4.8: Massenspektrum von Naphthalincarbonsäure als Methylester.

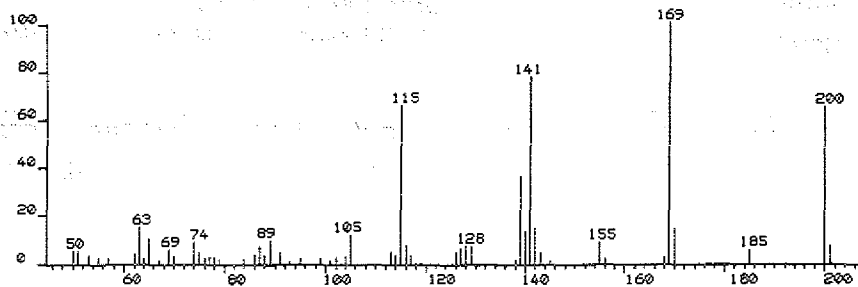


Abb. 5.2.4.9: Massenspektrum von Methylnaphthalincarbonsäure als Methylester.

Die Massenchromatogramme der entsprechenden Spuren des freien Extrakts aus dem Bioreaktor I vom 16.1.90 (Abb. 5.2.4.10) sind demgegenüber durch eine starke Überlagerung von anderen Substanzen gekennzeichnet. Die Interpretation der Massenspektren gestattete jedoch eine eindeutige Identifizierung. Demnach waren sowohl Naphthalin- als auch Methylnaphthalincarbonsäuren vertreten. Bei den Methylnaphthalincarbonsäuren wurden neun Isomere bestimmt. Es darf vermutet werden, daß noch weitere Isomere existieren, die aufgrund der starken Überlagerung möglicherweise mit anderen Verbindungen koeluieren und deshalb in den Massenspektren nicht erkannt wurden. Naphthalindicarbonsäuren konnten auch in dieser Probe nicht eindeutig nachgewiesen werden.

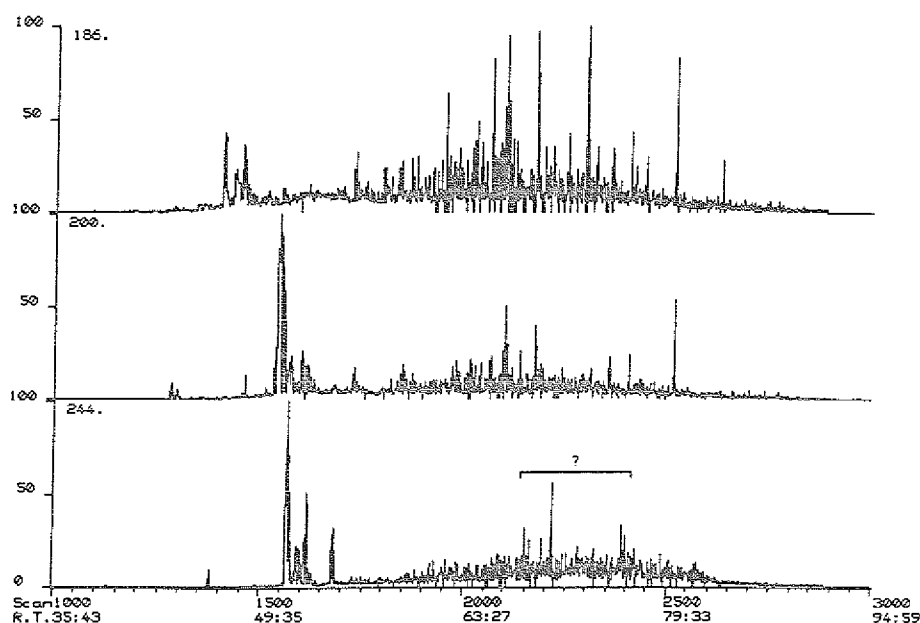


Abb. 5.2.4.10: Massenchromatogramme der charakteristischen Molekülionen für Naphthalincarbonsäuren (m/z 186), Methylnaphthalincarbonsäuren (m/z 200) und Naphthalindicarbonsäuren (m/z 244) als Methylester des freien Extrakts aus dem Bioreaktor I vom 16.1.90.

Mehrere Isomere von Methylnaphthalincarbonsäuren wurden in relativ geringen Konzentrationen auch in den freien und den verseiften Extrakten aus den Bioreaktoren I und II vom 6.6.90 gefunden.

Alkohole

Alkohole ließen sich in allen untersuchten Proben nicht nachweisen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse der Abbauprobversuche mit Dieselöl

Molekulare Aspekte der mikrobiellen Degradation von Dieselöl wurden an zwei verschiedenen Systemen studiert.

Beim Dieselölabbau in Batch-Kultur mit *Acinetobacter junii* konnten bereits nach zwei Tagen bakterieller Aktivität bei Temperaturen von 30 °C im freien Extrakt gaschromatographisch keine *n*-Alkane mehr nachgewiesen werden, obwohl der Anteil der gesättigten Kohlenwasserstoffe annähernd 70 % des Ausgangsöls betrug. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Isoprenoide erheblich resistenter. Erniedrigte Konzentrationen wiesen zwar auch bei ihnen auf mikrobielle Verwertung, dennoch bildeten sie eine homologe Reihe von C₁₅-C₂₂ mit Pristan und Phytan als dominierenden Verbindungen. Die aromatischen Kohlenwasserstoffe, sowohl Naphthaline als auch Phenanthrene, waren völlig unverändert. Stoffwechselprodukte konnten nicht beobachtet werden.

Dieses Bild änderte sich auch bei längerer Versuchsdauer, die letzte Probennahme erfolgte nach neunundzwanzig Tagen, nur geringfügig durch eine Konzentrationsabnahme der Methylnaphthaline im Verhältnis zu den höher alkylierten Naphthalinen, wobei das 2-Methylisomer bevorzugt abgebaut wurde.

Da die Kohlenwasserstoffe nicht in gebundener Form vorliegen, unterschied sich die Verteilung der Kohlenwasserstoffe der verseiften Extrakte nicht von derjenigen der freien Extrakte.

Im verseiften Extrakt befanden sich dagegen schon nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen Stoffwechselprodukte in Form aliphatischer Carbonsäuren, die aufgrund ihrer Verteilung eindeutig dem Dieselöl zugeordnet werden können. Sie konzentrierten sich im Kohlenstoffzahlenbereich von *n*-C_{12:0} bis *n*-C_{18:0} und umfaßten mit C_{16:1}, C_{17:1} und C_{18:1}-Carbonsäure auch einfach ungesättigte Homologe. Als Verbindungen größter Relativkonzentrationen traten C_{16:0} und C_{17:0}-Carbonsäure im Massenchromatogramm hervor. Obgleich das Carbonsäure-Muster nicht so weit mit dem der *n*-Alkane des Ausgangsöls korrelierte, daß eine sowohl bezüglich des Spektrums der Verbindungen als auch der Relativkonzentrationen derselben untereinander adäquate Verteilung entstanden wäre, handelt es sich bei diesen Substanzen zweifellos um Metaboliten der mikrobiellen Degradation des Dieselöls. Stark erhöhte Gehalte an C_{12:0}- und C_{18:0}-Carbonsäure bewirkten eine quantitative Modifizierung dieser Säureverteilung nach 29 Tagen.

Aromatische Carbonsäuren ließen sich während des Dieselölabbaus in Batch-Kultur zu

keinem Zeitpunkt nachweisen.

Auf unterschiedliche Degradationsabfolgen von *n*-Alkanen und Aromaten in natürlich biodegradierten Lagerstättenölen wurde bereits in Kap. 3.1 hingewiesen (siehe Seite 15). Diskrepanzen ergaben sich ebenso bei Laborversuchen zur künstlichen Alteration von Ölen in wäßrigem Medium. Fedorak & Westlake (1981) verwendeten drei verschiedene Mikrobenassoziationen und variierten die Versorgung mit Stickstoff und Phosphor, denen limitierende Funktion zugeschrieben wurde (Atlas & Bartha 1972). In vergleichbarer Versuchsanordnung, allerdings bei Temperaturen von nur 8 °C, erzielten sie nach siebenundzwanzig Tagen folgende Resultate: Bei reichlicher Gabe von Stickstoff und Phosphor wurden sowohl *n*-Alkane als auch Aromaten von allen Bakterien relativ stark angegriffen. Wurden hingegen wenig Nährstoffe zugeführt, zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit von der jeweiligen Mikroorganismenvergesellschaftung. So hatte der Abbau in zwei Ansätzen die Aromaten erheblich stärker erfaßt als die gesättigten Kohlenwasserstoffe, während sich im dritten Ansatz eine zwar nur mäßige Degradation verzeichnen ließ, die jedoch *n*-Alkane und Aromaten gleichermaßen beeinflusste. Nach Ergebnissen von Jones et al. (1983) soll bei Laborexperimenten sogar ein Abbau von Aromaten stattgefunden haben, ohne daß die *n*-Alkane Anzeichen einer Biodegradation hätten erkennen lassen.

Es ist seit langem bekannt, daß sich unter gleichen Degradationsbedingungen mit unterschiedlichen Mikroorganismen-Spezies zum Teil extrem differierende Resultate erzielen lassen (u.a. Walker & Colwell 1974, 1976). Der Einfluß der Temperatur erwies sich dabei als nicht unerheblich.

In neuerer Zeit prüften Freidieker & Strechel (1988) neun kommerziell erhältliche Mischkulturen, die üblicherweise für die Reinigung stark organisch belasteter Abwässer eingesetzt werden, und eine Belebtschlammkultur aus einem Klärwerk auf ihre Fähigkeit zur Verwertung von Dieselöl als einziger Kohlenstoffquelle bei Reaktionszeiten bis zu einunddreißig Tagen und Temperaturen von 20 °C. Schwerpunkte dieser Arbeit sind allerdings nicht chemische, sondern mikrobiologische Fragestellungen. So wurden Konzentrationsänderungen der *n*-Alkane und der Gesamtmenge an Kohlenwasserstoffen mit biologischen Parametern korreliert wie beispielsweise der Biomasse, der Lebendzellzahl und dem Ertragskoeffizienten (Verhältnis von Biomasseertrag zu abgebauter Substratmenge). Untersuchungen zur Koloniemorphologie sollten darüber hinaus Änderungen der Artenvielfalt der Mischpopulationen erfassen. In Abhängigkeit von Substratmenge und Population setzten Wachstum und Abbau zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlicher Intensität ein. Dabei waren hohe Lebendzellzahlen und hoher Biomasse-

seertrag durchaus nicht immer mit großer Abbauleistung verknüpft. Neben *n*-Alkanverteilungen, die der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen vergleichbar sind, traten andere auf, die infolge relativ gleichmäßiger Degradation aller Verbindungen das typische *n*-Alkanverteilungsmuster des Dieselöls noch deutlich erkennen ließen. Während bei niedriger Ölkonzentration offensichtlich kein Selektionsdruck auf die Organismen bestand, verringerte sich die Artenvielfalt bei höherer Konzentration erheblich. Parallel dazu gewannen *Pseudomonas*-Spezies zunehmend an Bedeutung.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Reinsubstanzen konnten beim Dieselölabbau in Batch-Kultur keine festen Reaktionsprodukte beobachtet werden. Ob es sich bei der von Freidieker & Strechel (1988) erwähnten Flocken- und Wachsbildung eventuell um einen vergleichbaren Prozeß handeln könnte, ist aufgrund der vorliegenden Informationen nicht eindeutig zu klären. Die von Fischer (1990) als "oilballs" bezeichneten kugelförmigen Agglomerate aus der Anfangsphase der Degradation von Motorenöl dürften wohl Micellen gewesen sein, Zusammenballungen von Natrium- und Kaliumsalzen bereits als Stoffwechselprodukte gebildeter Fettsäuren.

Der Abbau im zweistufigen Kultursystem wurde seitens des Instituts für Biotechnologie 3 der KFA Jülich unter dem Gesichtspunkt eines möglichst hohen Biomasseertrags betrieben, d.h. durch Optimierung wachstumssteuernder Parameter sollte möglichst rasch eine große Zahl dieselölabbauender Bakterien gezüchtet werden. Wegen der im Laufe des Experiments zum Teil beträchtlich variierenden Versuchsbedingungen und der ständigen Substratzufuhr war diese Versuchsführung nur sehr bedingt geeignet, Erkenntnisse über sukzessive Degradation von Dieselöl zu gewinnen. Stattdessen wurden unterschiedliche Abbaustadien beleuchtet und anhand der Verteilungsmuster von gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen und während des Abbaus daraus gebildeter Metaboliten wie Carbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren und Naphthalincarbonsäuren charakterisiert.

In allen Extrakten aus dem Bioreaktor I ließ sich trotz unterschiedlich starker Degradation, gemessen an der Summe der *n*-Alkane und dem Verhältnis der Konzentrationen von Pristan und Phytan zu *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈, eine nahezu identische *n*-Alkanverteilung in den Gaschromatogrammen beobachten. Die geringen Konzentrationen der Verbindungen mit weniger als fünfzehn Kohlenstoffatomen sind vermutlich eine Folge der Abdampfverluste bei der Entfernung des Lösungsmittels und der Fraktionierung der Extrakte. Selektiver Abbau bestimmter *n*-Alkane kann demnach nicht stattgefunden haben. Vielmehr scheinen die aliphatischen Kohlenwasserstoffe im quantifizierten Bereich von *n*-C₁₅ bis *n*-C₃₂ in der gesamten Probensequenz in gleichem Maße von den Mikroorganismen verwertet worden zu sein.

Freie Carbonsäuren eluierten in allen Extrakten aus dem Bioreaktor I in relativ breitem Spektrum. Aufgrund der guten Nährstoffversorgung und der kontinuierlichen Zufuhr frischen Substrats zeigten sich bei dieser Versuchsdurchführung generell wesentlich komplexere Verteilungsmuster als bei den Versuchen mit Reinsubstanzen und dem Dieselölabbau in Batch-Kultur. Erstaunlicherweise bestand zu keinem Zeitpunkt eine exakte Korrelation zwischen *n*-Alkanen und Carbonsäuren. Obgleich die Degradation der *n*-Alkane alle Verbindungen in gleichem Maße erfaßte, boten die Carbonsäuren kein korrespondierendes Bild. So deckten sie weder den gesamten Kohlenstoffzahlenbereich ab noch gab es Übereinstimmungen bezüglich der Relativkonzentrationen der einzelnen Verbindungen zueinander, verglichen mit denen der entsprechenden *n*-Alkane. Den gesättigten Kohlenwasserstoffen des Dieselöls im Bereich von *n*-C₉ bis *n*-C₃₅ mit einem Maximum bei C₁₅ stand eine Säureverteilung von *n*-C_{12:0} bis *n*-C_{22:0} mit einem Maximum bei C_{16:0} gegenüber. Bei den aufgrund der massenspektrometrischen Fragmentierung als Carbonsäuremethylester bezeichneten Verbindungen der Abb. 5.2.4.4 (siehe Seite 114) handelt es sich möglicherweise um die niedrigmolekularen Homologen, eine Annahme, die zwar wegen fehlender Molekülionen nicht verifiziert werden konnte, aufgrund der Retentionszeiten aber sehr wahrscheinlich ist. Die Konzentrationen der noch erfaßten höhermolekularen Carbonsäuren waren überaus gering, so daß das Fehlen entsprechender Signale bei noch höheren Retentionszeiten eventuell nur als Folge noch geringerer und damit unter den gewählten analytischen Bedingungen nicht mehr detektierbarer Konzentrationen verstanden werden könnte. Die Ursache der Konzentrationsunterschiede blieb dagegen ungeklärt. Vielleicht spielt in diesem Zusammenhang die Funktion der Fettsäuren als Emulgatoren zur Herabsetzung der Grenzflächenspannung und Verbesserung des Öl/Wasser-Kontakts eine Rolle.

Die Carbonsäurekonzentrationen lagen in den verseiften Extrakten aus dem Bioreaktor I generell höher als in den unverseiften. Da vor der Hydrolyse keine Abtrennung der freien Säuren vorgenommen wurde, enthielten die verseiften Extrakte nicht nur gebundene, sondern auch freie Carbonsäuren. Gravierende Unterschiede hinsichtlich der Vielfalt der Stoffwechselprodukte dieser beiden Säurefraktionen ergaben sich nicht. Dies stand in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen der Versuche mit Reinsubstanzen, hatten sich doch bei ihnen relativ große qualitative und quantitative Unterschiede gezeigt. Möglicherweise ist auch die relativ einheitliche Säureverteilung der freien und verseiften Extrakte aus dem Dieselölabbau im zweistufigen Kultursystem eine Folge der guten Versorgung mit Nährstoffen und Substrat.

Neben den Fettsäuren hatten sich, wie aus den Analysenergebnissen des verseiften Extrakts vom 6.6.90 zu entnehmen war, auch folgende β -Hydroxycarbonsäuren gebildet: β -

Hydroxy-C_{12:0}-Carbonsäure, Methyl- β -Hydroxy-C_{12:0}-Carbonsäure und Methyl- β -Hydroxy-C_{14:0}-Carbonsäure.

Die Naphthaline verhielten sich im Gegensatz zu den *n*-Alkanen erheblich differenzierter. Im Extrakt vom 6.11.89 noch unverändert, hatte fortschreitende Degradation zum Verschwinden des 2-Methylnaphthalins im Extrakt vom 13.12.89 geführt. Gleichzeitig machte sich eine deutliche Reduktion der Relativkonzentrationen von Dimethyl- und Ethylnaphthalinen bemerkbar, während die höher alkylierten C₃- und C₄-Verbindungen intakt geblieben waren. Bei längerer Versuchsdauer war eine generelle Konzentrationsabnahme aller Verbindungen, auch der höher substituierten, zu verzeichnen. Infolgedessen gab es bei den Extrakten vom 16.1.90 und 6.6.90, insbesondere im Bereich der Dimethylnaphthaline und Ethylnaphthaline, eine große Zahl neuer Verbindungen, die aufgrund zu geringer Relativkonzentrationen vorher im Massenchromatogramm nicht sichtbar waren. Darüber hinaus bestand in der letzten Probe eine Abweichung des Isomerenverhältnisses von 2-Methylnaphthalin zu 1-Methylnaphthalin, verglichen mit dem des Ausgangsöls und der Extrakte vom 6.11.89 und 16.1.90.

Bei den Phenanthrenen ließen sich in den Extrakten aus dem Bioreaktor I keinerlei Anzeichen einer Biodegradation erkennen.

Im Zuge der mikrobiellen Verwertung der aromatischen Kohlenwasserstoffe, speziell der Naphthaline, waren, ausgehend von Methyl- und Dimethylnaphthalinen, durch Oxidation sowohl Naphthalin- als auch Methylnaphthalincarbonsäuren mit zahlreichen Isomeren entstanden. Der Nachweis gelang vor allem in den freien Extrakten aus dem Bioreaktor I vom 13.12.89 und 16.1.90, geringere Mengen fanden sich im freien und im verseiften Extrakt vom 6.6.90. Möglicherweise haben sich auch Spuren von Naphthalindicarbonsäuren gebildet, die Spektren gestatteten allerdings keine eindeutige Verifizierung.

Die Bildung der aromatischen Carbonsäuren war Anhaltspunkt dafür, daß, obgleich bei dieser Versuchsführung sicherlich eine Degradation der aromatischen Kohlenwasserstoffe durch Auswaschung möglich gewesen wäre, ein mikrobieller Abbau stattgefunden hat und dieser in gleicher Weise wie bei den *n*-Alkanen durch Oxidation von Methylgruppen begann. Die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe des Dieselöls sind zum größten Teil mehrfach substituiert, insbesondere durch Methyl- und Ethylgruppen.

Die *n*-Alkanverteilungen der Extrakte aus dem Bioreaktor II ließen, wie aufgrund der längeren Reaktionszeit zu erwarten, generell ein höheres Abbaustadium erkennen als die entsprechenden Extrakte aus dem Bioreaktor I. Obgleich in den Extrakten vom 13.12.89

und 6.6.90 noch das komplette Spektrum an *n*-Alkanen eluierte, deuteten die stark erhöhten Gehalte an Pristan und Phytan und die an Fläche zunehmenden unaufgelösten komplexen Gemische auf stärkere Biodegradation. Erstaunlicherweise hatten sich ebenso wie bei den Proben aus dem Bioreaktor I auch hier die Konzentrationen aller Verbindungen in gleichem Maße reduziert, so daß trotz des fortgeschritteneren Abbaus das typische *n*-Alkanmuster des Dieselöls erhalten blieb. Im Gegensatz dazu standen die Gaschromatogramme der Extrakte vom 6.22.89 und 16.1.90, in denen außer Pristan und Phytan keine gesättigten Kohlenwasserstoffe mehr identifiziert werden konnten.

Die Carbonsäureverteilungen der Extrakte aus dem Bioreaktor II ließen sich aufgrund der komplexen Muster und der Ausbildung von unaufgelösten komplexen Gemischen schon auf den ersten Blick als Säurefraktionen stärker biodegradiertter Öle erkennen. Sie zeichneten sich, verglichen mit den Extrakten aus dem Bioreaktor I, durch ein etwas breiteres Spektrum an Verbindungen aus, das einen größeren Anteil niedermolekularer Säuren einschloß und durch erheblich höhere Relativkonzentrationen aller Verbindungen gekennzeichnet war. Die auch in den Extrakten aus dem Bioreaktor I vorhandene, hier jedoch ausgeprägtere Präsenz von ungesättigten Carbonsäuren im oberen Scanzahlbereich gibt einen Hinweis darauf, daß diese auch bei den Experimenten mit Reinsubstanzen nachgewiesenen Verbindungen sicherlich keine Artefakte oder Kontaminationen, sondern Stoffwechselprodukte darstellen.

Zu den verseiften Extrakten bestanden nur geringfügige Unterschiede, die sich insbesondere in leicht erhöhten Relativkonzentrationen äußerten.

Hydroxycarbonsäuren wurden auch in dieser Probensequenz nur im verseiften Extrakt vom 6.6.90 gefunden. Die Verteilung in den beiden Extrakten stimmte völlig überein.

Entsprechend der stärkeren Degradation der *n*-Alkane waren auch die Naphthaline der Extrakte aus dem Bioreaktor II stärker angegriffen. In den Massenchromatogrammen des Extrakts vom 6.11.89 fehlten die Methylnaphthaline völlig, und auch Dimethylnaphthaline, Ethylnaphthaline und ein Teil der C₃-Naphthaline zeigten, im Gegensatz zu den C₄-Naphthalinen, Anzeichen einer Biodegradation. Die Degradationserscheinungen wurden mit zunehmender Versuchsdauer ausgeprägter und erfaßten auch die höhersubstituierten Verbindungen. Dies äußerte sich allerdings nur in einer Abnahme der Relativkonzentrationen bei unverändertem Verteilungsmuster. Im Extrakt vom 6.6.90 waren bei komplettem Verlust der Methylnaphthaline die Konzentrationen aller Substanzen so weit zurückgegangen, daß, ebenso wie im Extrakt aus dem Bioreaktor I, zahlreiche Verbindungen, die vorher aufgrund zu geringer Konzentrationen im Untergrund verschwanden,

den, deutlich separierte Peaks bildeten.

Die Phenanthrene hatten sich in allen Extrakten aus dem Bioreaktor I als sehr stabil erwiesen. Die Extrakte aus dem Bioreaktor II ließen hingegen Veränderungen erkennen, die von leicht erniedrigten Relativkonzentrationen des Phenanthrens und der Methylphenanthrene bis zu vollständigem Verlust des Phenanthrens bei längerer Versuchsdauer reichten. Die Entwicklung bei den Dimethylphenanthrenen war wegen des komplexen Isomerenmusters nicht so einfach zu verfolgen, es hat aber den Anschein, als ob sie durch die Biodegradation in wesentlich geringerem Maße beeinflußt worden seien als Phenanthrene und Methylphenanthrene.

Trotz der Degradation der Naphthaline ließen sich nur Spuren von Methylnaphthalin-carbonsäuren in einer einzigen Probe aus dem Bioreaktor II nachweisen, bei dieser dann allerdings sowohl im freien als auch im verseiften Extrakt.

6 Mikrobieller Abbau von Rohölen in der Lagerstätte

Ziel der Untersuchung von Rohölen war es, positive Indikatoren für einen beginnenden mikrobiellen Abbau von Lagerstättenölen zu finden, wo dies mit anderen Parametern nicht eindeutig möglich ist. Dazu wurden mehrere Serien von Erdölen aus verschiedenen Erdölprovinzen auf Stoffwechselprodukte bakterieller Aktivität, insbesondere Carbon-säuren und Alkohole, analysiert. Die Öle der einzelnen Serien (Nigeria, Kongo, Powder River-Becken (Montana), Santa Maria-Becken (Kalifornien), Venezuela, Viking-Graben (Nordsee) und Broistedt-Gifhorner Trog (Norddeutschland)) stammen jeweils aus dem-selben Muttergestein, sind jedoch unterschiedlich stark biodegradiert, um Differenzen der Metabolitenverteilungen in Abhängigkeit von der Intensität der mikrobiellen Verwertung erfassen zu können.

Auf der Basis von Gesamtölanalysen, die vor allem die Verteilung aliphatischer Kohlenwasserstoffe widerspiegeln, und Biomarker-Verteilungen wurde zunächst eine Korrelation der untersuchten Öle mit der von Moldowan et al. (1992) publizierten zehnstufigen Biodegradationsskala (Abb. 6.1) vorgenommen.

BIODEGRADATION RANKING SUMMARY*		
Extent	Ranking	Indicator (Definition)
Light	1	Lower homologs of <i>n</i> -paraffins depleted
Light	2	General depletion of <i>n</i> -paraffins
Light	3	Only traces of <i>n</i> -paraffins remain
Moderate	4	No <i>n</i> -paraffins, acyclic isoprenoids intact
Moderate	5	Acyclic isoprenoids absent
Heavy	6	Steranes partly degraded
Heavy	7	Steranes degraded, diasteranes intact
Very Heavy	8	Hopanes partly degraded
Very Heavy	9	Hopanes absent, diasteranes attacked
Severe	10	C ₂₆ -C ₂₉ aromatic steroids attacked

*In cases where 25-desmethylhopanes are formed, hopane degradation may occur as early as Ranking 6, that is, simultaneously with or possibly before sterane degradation, but after removal of acyclic isoprenoids. No 25-desmethylhopanes were observed in this study.

Abb. 6.1: Biodegradations-Klassifizierung nach Moldowan et al. (1992).

6.1 Probenaufbereitung

Da sowohl freie als auch in Form von Estern gebundene Carbonsäuren und Alkohole nachgewiesen werden sollten, wurden unterschiedliche Methoden der Probenaufbereitung gewählt.

Die Abtrennung der freien Carbonsäuren erfolgte flüssigkeitschromatographisch. Dazu wurden jeweils 2 g Öl auf eine mit 2 % KOH Suprapur (Merck) versetztem Kieselgel belegte Säule von 12 cm Länge und 2,7 cm Durchmesser aufgebracht. Neutrale und basische Verbindungen wurden mit 240 ml destilliertem Dichlormethan (mit 1 % Methanol) von der Säule gewaschen. Die Säuren wurden mit 60 ml destilliertem Dichlormethan, das mit 2 % Ameisensäure Suprapur (Merck) versetzt war, eluiert und das Eluat zur Entfernung der Ameisensäure mit 50 ml pentadestilliertem H₂O ausgeschüttelt. Zweimaliges Rückausschütteln der wäßrigen Phase mit jeweils 30 ml destilliertem Dichlormethan sollte die Ausbeute an organischen Säuren erhöhen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na₂SO₄ zur Analyse (Merck) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Extrakt mit Diazomethan bzw. Silyl 991 (BSTFA-TCMS 99:1) (Macherey-Nagel) verestert und silyliert.

Zur Freisetzung der gebundenen Carbonsäuren wurden die 240 ml des Dichlormethan-Eluats am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Extrakt mit 1,8 g KOH Suprapur (Merck) in 30 ml destilliertem Methanol und 15 ml destilliertem Toluol zwei Stunden am Rückfluß unter Stickstoffatmosphäre verseift. Anschließendes zweimaliges Ausschütteln mit 0,6 g NaCl Suprapur (Merck) in 30 ml pentadestilliertem H₂O diente zur Trennung von organischer und wäßriger Phase. Nach dem Entfernen der Neutralstoffe aus der wäßrigen Phase durch Ausschütteln mit Cyclohexan Uvasol (Merck) (2 x 50 ml) und Ansäuern mit HCl Suprapur (Merck), um die Carboxylationen in die korrespondierenden freien Carbonsäuren zu überführen, konnten diese mit Dichlormethan extrahiert werden. Extraktion, Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgten wie zuvor beschrieben.

Cyclohexan- und Toluolphasen mit den Neutralstoffen wurden mit Na₂SO₄ zur Analyse (Merck) getrocknet, das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Alkohole wurden aus dieser Fraktion durch Flüssigkeitschromatographie an Kieselgel mit destilliertem Dichlormethan (mit 1 % Methanol) abgetrennt. Das Elutionsvolumen war zuvor mit Standardsubstanzen bestimmt worden.

Die zur Abtrennung der Säure- und Alkohol-Fractionen benutzten Methoden wurden unter Verwendung von Boscan-Öl (Venezuela) entwickelt, das in größerer Menge zur

Verfügung stand. Die Verseifung erfolgte in Anlehnung an eine von Behar & Albrecht (1984) beschriebene Vorgehensweise, allerdings wurden statt der angegebenen 20 g Rohöl nur 2 g eingesetzt und diese nicht vollständig verseift, sondern nur der nach Abtrennung der freien Carbonsäuren verbleibende organische Rest, und dies nicht in drei Schritten, sondern in einem einzigen. Da Behar & Albrecht (1984) unter anderem auch mit Boscan-Öl gearbeitet hatten, bot sich die Gelegenheit der Überprüfung, ob mit kleineren Mengen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind und ob die Verteilungsmuster der freien und gebundenen Carbonsäuren in ihrer Gesamtheit mit dem durch Verseifung der gesamten Probe entstandenen Säuremuster zu korrelieren sind.

Da die Alkohole im Vergleich zu den Carbonsäuren im allgemeinen nur in geringen Konzentrationen vorliegen, wurden sie bevorzugt aus solchen Proben abgetrennt, die sich durch relativ hohe Gehalte an Carbonsäuren auszeichneten.

6.2 Bedingungen für die instrumentelle Analytik

Die Gesamtölanalysen wurden unter folgenden analytischen Bedingungen durchgeführt:

Gaschromatograph Hewlett Packard 5710A

Quarzkapillarsäule: FS SE-54-CB

Länge: 25 m

Innendurchmesser: 0,25 mm

Außendurchmesser: 0,38 mm

Belegungsdichte: 0,26 μm

Träger- und Brenngase: Helium, Wasserstoff, synth. Luft, Argon

Temperaturprogramm

Starttemperatur: -30 °C

Aufheizrate: 4 °C/min

Endtemperatur: 300 °C

Haltezeit: 32 min

Kaltaufgabesystem Gerstel

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 30 °C

Aufheizrate: 5 °C/s

Endtemperatur: 300 °C

Haltezeit: 120 s

Split: 310 ml/min

Die Analyse der Biomarker-Verteilungen stützt sich auf Massenfragmentogramme ausgewählter charakteristischer Einzelionen für Sterane und Hopane. Die Aufnahmeparameter wurden folgendermaßen gewählt:

Gaschromatograph Finnigan

Quarzkapillarsäule: CP-Sil 5 CB

Länge: 50 m

Innendurchmesser: 0,25 mm

Außendurchmesser: 0,39 mm

Belegungsdicke: 0,25 μm

Trärgas: Helium

Temperaturprogramm:

Starttemperatur: 110 °C

Aufheizrate: 3 °C/min

Endtemperatur: 320 °C

Haltezeit: 20 min

Split: 1:5

Massenspektrometer Finnigan MAT Quadrupol 5100

Ionisierungsenergie: 70 eV

Quellentemperatur: 160 °C

Massenbereich: 43-650

Zykluszeit: 1s/Dekade

Auch die Identifizierung der Carbonsäuren und Alkohole erfolgte ausschließlich aufgrund von GC/MS-Daten. Einzelionenerfassung war hier allerdings nicht möglich, es mußten stets komplette Massenspektren aufgenommen werden. Zur Auswertung der Produktverteilung wurden darüber hinaus Massenchromatogramme ausgewählter Schlüsselfragmente angefertigt. Da diese Messungen eine hohe Auflösung erforderten, kam ein anderes GC/MS-System zum Einsatz.

Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 4160

Quarzkapillarsäule: CP-Sil 5 CB

Länge: 50 m

Innendurchmesser: 0,25 mm

Außendurchmesser: 0,39 mm

Belegungsdicke: 0,25 μm

Trärgas: Helium

Temperaturprogramm

Starttemperatur: 110 °C

Haltezeit: 4 min

Aufheizrate: 3 °C/min
Endtemperatur: 310 °C
Haltezeit: 28 min

Kaltaufgabesystem Gerstel

Temperaturprogramm
Aufgabtemperatur: -40 °C
Haltezeit: 30 s
Aufheizrate: 10 °C/s
Endtemperatur: 350 °C
Haltezeit: 90 s

Splitlos

Massenspektrometer VG 7070E mit Kratos DS 90 on line-Datensystem

Ionisierungsenergie: 70 eV
Quellentemperatur: 220 °C
Massenbereich: m/z 45-900
Zykluszeit: 2,3 s/Dekade

6.3 Ergebnisse

Im folgenden werden die geologischen Gegebenheiten der verschiedenen Lagerstätten skizziert, die untersuchten Öle charakterisiert und Carbonsäure- und Alkoholverteilungen diskutiert.

6.3.1 Nigeria

Informationen über die genaue Herkunft der freundlicherweise von Shell International überlassenen beiden Nigeria-Öle liegen nicht vor. Es ist lediglich bekannt, daß beide aus demselben Muttergestein stammen. Die Teufen wurden mit 5867 Fuß für das biodegradierte Öl bzw. 9581 Fuß für das nicht biodegradierte angegeben.

In Abbildung 6.3.1.1 ist das Gaschromatogramm des nicht biodegradierten Nigeria-Öls dargestellt. Es enthielt in erster Linie *n*-Alkane, die in breiter Verteilung einen Kohlenstoffzahlbereich von *n*-C₆ bis *n*-C₃₇ abdeckten mit einem Maximum bei *n*-C₁₁. Die Biomarker waren nicht angegriffen.

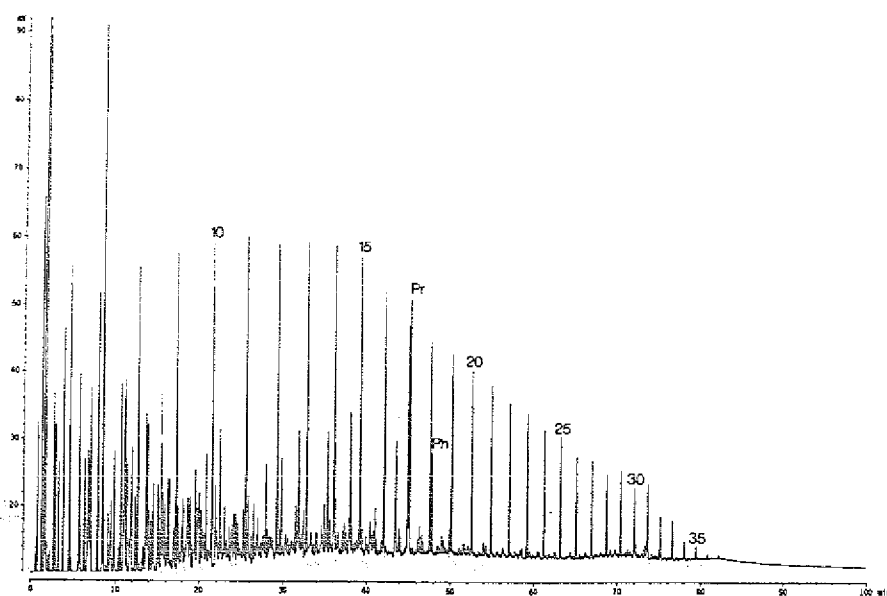


Abb. 6.3.1.1: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des nicht biodegradierten Nigeria-Öls (Pr: Pristan, Ph: Phytan).

Demgegenüber zeigte das zweite Öl deutliche Anzeichen von Biodegradation (Abb. 6.3.1.2). Das Gaschromatogramm wurde in erster Linie durch ein unaufgelöstes komplexes Gemisch geprägt. *n*-Alkane ließen sich im niedrigmolekularen Bereich nicht mehr nachweisen und traten im höhermolekularen Bereich nur noch in so geringen Relativkonzentrationen auf, daß daneben die Hopane im Gaschromatogramm deutlich sichtbar wurden. Dadurch erhöhten sich gleichzeitig die Relativkonzentrationen der Isoprenoide Norpristan, Pristan und Phytan, so daß sie die wichtigsten Einzelkomponenten des Öls bildeten. Trotz des offensichtlichen Abbaus der Kohlenwasserstoffe blieben die Biomarker völlig unverändert. Dieses Öl war demnach nur als leicht biodegradiert (Stufe 3) im Sinne der Klassifizierung von Moldowan et al. (1992) einzustufen.

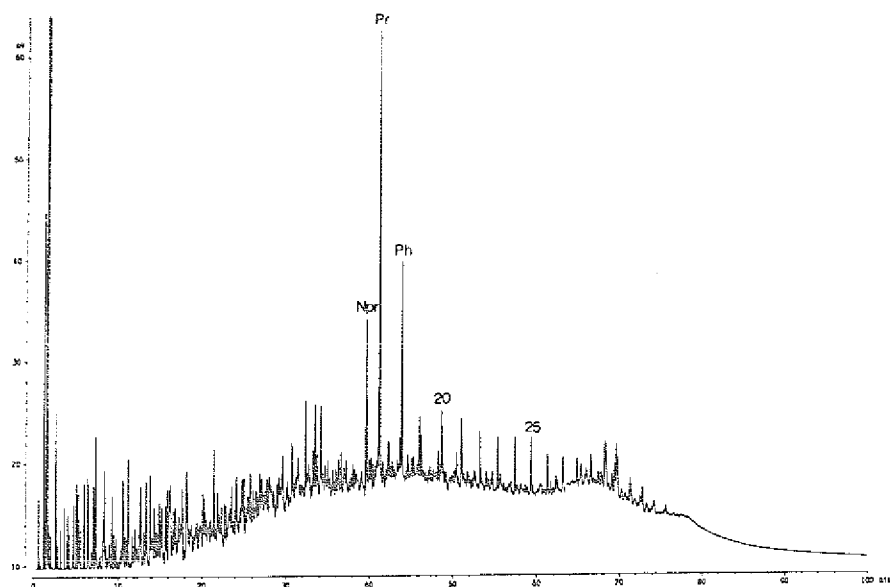


Abb. 6.3.1.2: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Nigeria-Öls (Biodegradations-Stufe 3)
(Npr: Norpristan, Pr: Pristan, Ph: Phytan).

Freie Carbonsäuren

Die Säureverteilung der freien aliphatischen Monocarbonsäuren des nicht degradierten Öls ist dem Massenchromatogramm der für ihre Methylester charakteristischen Spur des Fragmentions m/z 74 zu entnehmen (Abb. 6.3.1.3). Diese spiegelt die Kohlenstoffzahl-Verteilung der *n*-Alkane recht genau wider und ist erwartungsgemäß durch geringe Kon-

zentrationen der Substanzen charakterisiert. Verglichen mit den Konzentrationen der dominierenden $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säuren erreichten die anderen Verbindungen allerdings nur so geringe Relativkonzentrationen, daß sogar Signale von Hopancarbonsäuren in dieser Spur erkennbar wurden.

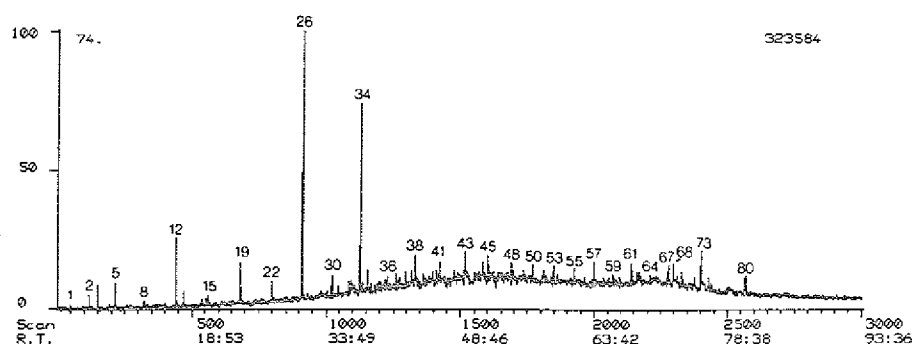


Abb. 6.3.1.3: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (freie Säuren des nicht biodegradierten Nigeria-Öls)
 (1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 12: Dodecancarbonsäuremethylester, 15: Tridecancarbonsäuremethylester, 19: Tetradecancarbonsäuremethylester, 22: Pentadecancarbonsäuremethylester, 26: Hexadecancarbonsäuremethylester, 30: Heptadecancarbonsäuremethylester, 34: Octadecancarbonsäuremethylester, 36: Nonadecancarbonsäuremethylester, 38: Eicosancarbonsäuremethylester, 41: Heneicosancarbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 48: Tetracosancarbonsäuremethylester, 50: Pentacosancarbonsäuremethylester, 53: Hexacosancarbonsäuremethylester, 55: Heptacosancarbonsäuremethylester, 57: Octacosancarbonsäuremethylester, 59: Nonacosancarbonsäuremethylester, 61: Triacontancarbonsäuremethylester, 64: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 67: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 68: $17\alpha,21\beta$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 73: $17\alpha,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester, 80: $17\beta,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester).

Daneben ließen sich in dieser Probe tricyclische und, obgleich die Hopane nicht degradiert erschienen, auch pentacyclische Carbonsäuren nachweisen. Charakteristisch für diese beiden Substanzklassen ist ein Fragmentation der Masse m/z 191 (Abb. 6.3.1.4). Die tricyclischen Terpensäuren waren mit je zwei Isomeren von C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Säure vertreten (Abb. 6.3.1.5-6.3.1.7). Bei den Hopancarbonsäuren, deren Verteilung zahlreiche Homologe und Isomere zwischen C_{30} und C_{33} umfaßte, dominierten die Verbindungen mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration (Abb. 6.3.1.8-6.3.1.10).

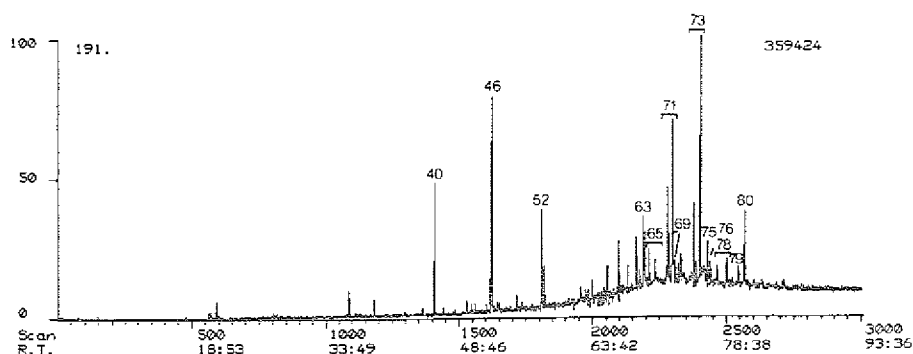


Abb. 6.3.1.4: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für tricyclische und pentacyclische Terpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des nicht biodegradierten Nigeria-Öls) (40: tricyclischer- C_{21} -Carbonsäuremethylester, 46: tricyclischer- C_{24} -Carbonsäuremethylester, 52: tricyclischer- C_{26} -Carbonsäuremethylester, 63: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 65: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 68: $17\alpha,21\beta$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 69: $17\beta,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 71: $17\beta,21\alpha$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 73: $17\alpha,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester, 75: $17\beta,21\beta$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 76: $17\beta,21\alpha$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester, 78: $17\alpha,21\beta$ -trihomo-Hopancarbonsäuremethylester, 79: $17\beta,21\alpha$ -trihomo-Hopancarbonsäuremethylester, 80: $17\beta,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester).

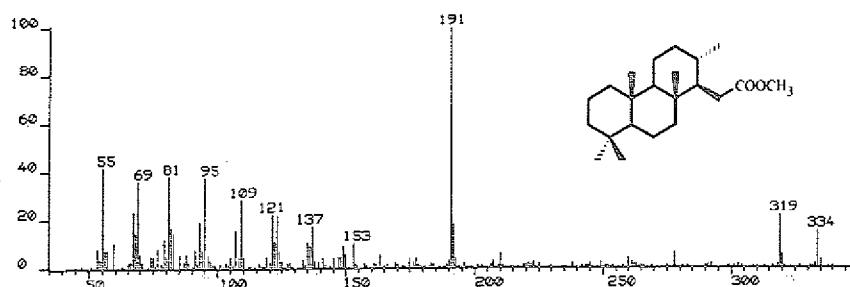


Abb. 6.3.1.5: Massenspektrum von tricyclischer C_{21} -Terpansäure als Methylester.

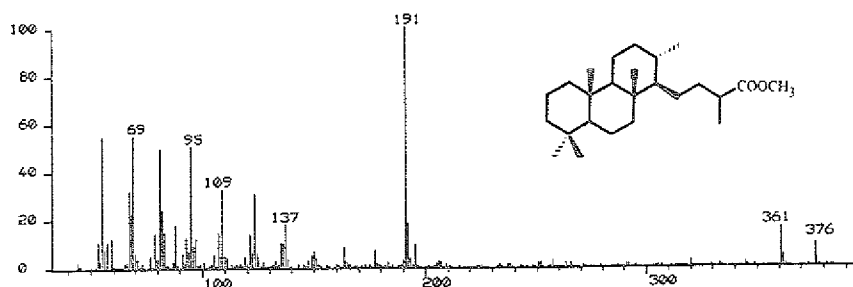


Abb. 6.3.1.6: Massenspektrum von tricyclischer C_{24} -Terpansäure als Methylester.

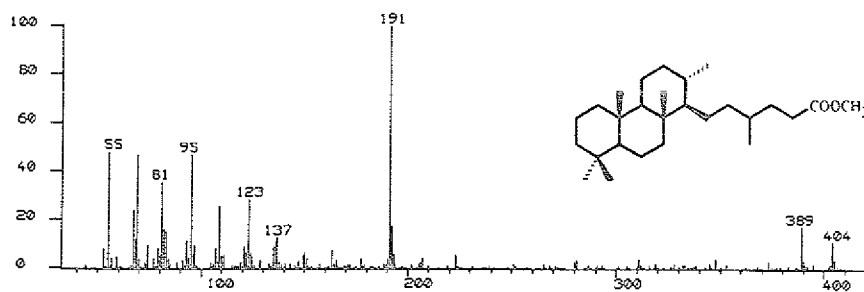


Abb. 6.3.1.7: Massenspektrum von tricyclischer C_{26} -Terpansäure als Methylester.



Abb. 6.3.1.8: Massenspektrum von 17 α ,21 β -dihomo-Hopancarbonsäure als Methylester.

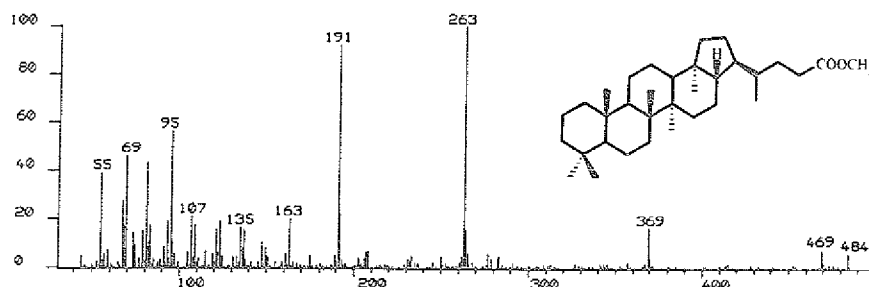


Abb. 6.3.1.9: Massenspektrum von 17 β ,21 α -dihomo-Hopancarbonsäure als Methylester.

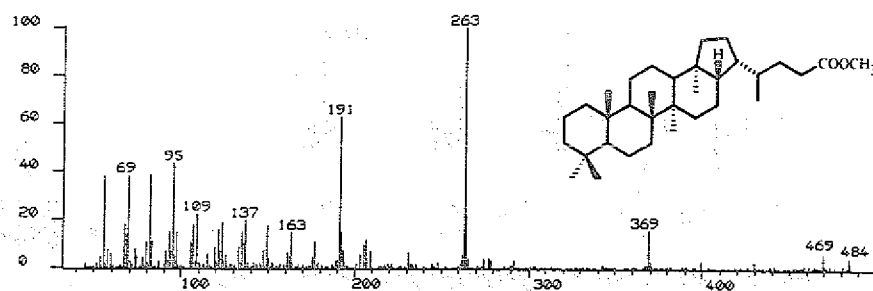


Abb. 6.3.1.10: Massenspektrum von 17 β ,21 β -dihomo-Hopancarbonsäure als Methylester.

Die biodegradierte Ölprobe zeigte eine breite Säureverteilung freier geradkettiger Alkansäuren, die Verbindungen von $C_{8:0}$ - bis $C_{34:0}$ -Säure umfaßte (Abb. 6.3.1.11). Diese Verteilung ist insofern interessant, als ihr Maximum im höhermolekularen Bereich zwischen $C_{19:0}$ - und $C_{34:0}$ -Carbonsäure liegt, also dem Bereich, in dem bei der gaschromatographischen Analyse des Gesamtöls noch *n*-Alkane nachgewiesen werden konnten. Dabei hatten die geradzahigen Homologen etwas höhere Konzentrationen als die ungeradzahigen. In dem entsprechenden Kohlenstoffzahl-Bereich eluierte auch eine homologe Reihe von 2-Methylcarbonsäuren, die jedoch kein deutliches Maximum aufwies. Mit 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Carbonsäure, 5,9,13-Trimethyl- $C_{14:0}$ -Carbonsäure, 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15:0}$ -Carbonsäure (Pristansäure) und 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Carbonsäure (Phytansäure) konnten darüber hinaus *isoprenoid*-Carbonsäuren identifiziert werden. In gleicher Weise, wie Pristan und Phytan im Gaschromatogramm des Gesamtöls dominierten, wird die Säureverteilung der freien Carbonsäuren durch Pristansäure und Phytansäure als den beiden Hauptkomponenten geprägt. Die Verteilung der Hopancarbonsäuren (Abb. 6.3.1.12) unterscheidet sich von der des nicht biodegradierten Öls insbesondere durch das weitgehende Fehlen von C_{32} -Verbindungen und höheren Homologen. Ein deutlich höherer Gehalt an C_{30} -Hopancarbonsäure mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration sowie Differenzen hinsichtlich des R/S-Isomerenverhältnisses der C_{30} - und C_{31} -Hopansäuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration kamen hinzu.

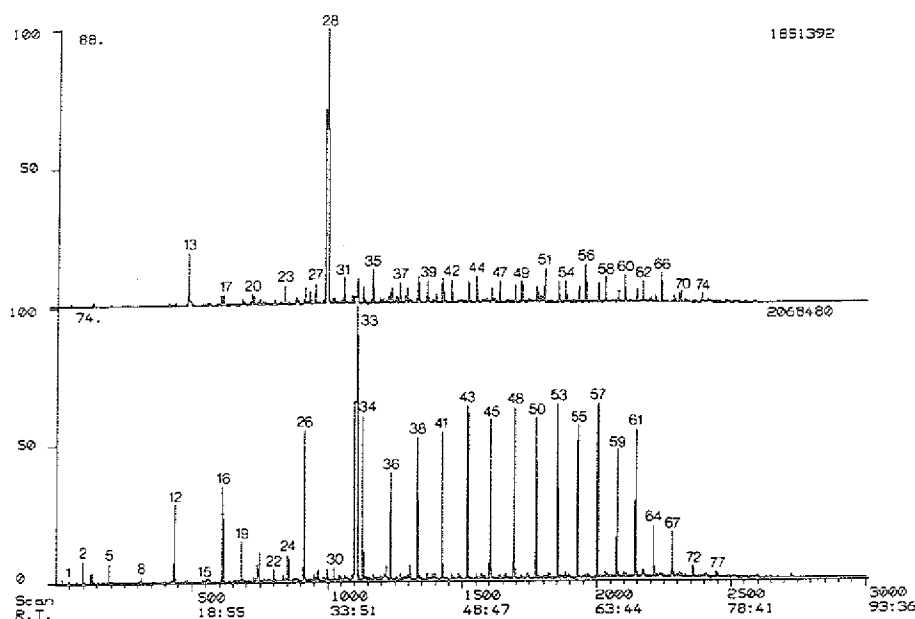


Abb. 6.3.1.11: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht biodegradierten Nigeria-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(1: Octanecarbonsäuremethylester, 2: Nonanecarbonsäuremethylester, 5: Decanecarbonsäuremethylester, 8: Undecanecarbonsäuremethylester, 12: Dodecanecarbonsäuremethylester, 13: 2-Methyldodecanecarbonsäure-

remethylester, 15: Tridecancarbonsäuremethylester, 16: 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäuremethylester, 17: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 19: Tetradecancarbonsäuremethylester, 20: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 22: Pentadecancarbonsäuremethylester, 23: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 24: 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäuremethylester, 26: Hexadecancarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 28: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 30: Heptadecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 33: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 34: Octadecancarbonsäuremethylester, 35: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 36: Nonadecancarbonsäuremethylester, 37: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 38: Eicosancarbonsäuremethylester, 39: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 41: Heneicosancarbonsäuremethylester, 42: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 47: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 48: Tetracosancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 50: Pentacosancarbonsäuremethylester, 51: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 53: Hexacosancarbonsäuremethylester, 54: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 55: Heptacosancarbonsäuremethylester, 56: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 57: Octacosancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 59: Nonacosancarbonsäuremethylester, 60: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 61: Triacotancarbonsäuremethylester, 62: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 64: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 66: 2-Methylhentriacontancarbonsäuremethylester, 67: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methyldotriacontancarbonsäuremethylester, 72: Tritriacontancarbonsäuremethylester, 74: 2-Methyltritriacontancarbonsäuremethylester, 77: Tetratriacontancarbonsäuremethylester).

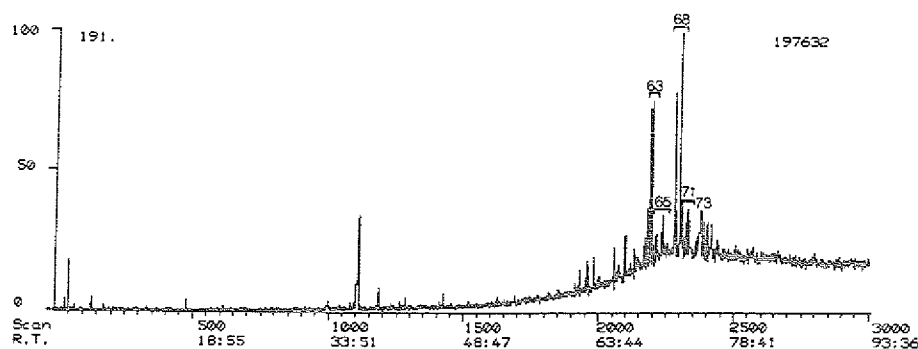


Abb. 6.3.1.12: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für pentacyclische Triterpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des leicht biodegradierten Nigeria-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(63: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 65: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 68: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 71: $17\beta,21\alpha$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 73: $17\alpha,21\beta$ -*di-homo*-Hopancarbonsäuremethylester).

Gebundene Säuren

Bei den gebundenen Säuren des nicht degradierten Öls bot sich ein völlig anderes Bild. Die geradkettigen Carbonsäuren blieben im wesentlichen auf den Bereich zwischen n -

C_{8:0}- und *n*-C_{18:0}-Säure beschränkt (Abb. 6.3.1.13), erreichten jedoch erheblich höhere Relativkonzentrationen als die entsprechenden freien Säuren. Darüber hinaus eluierte eine homologe Reihe von Carbonsäuren, die aufgrund des Fragmentierungsmusters und der relativen Retentionszeiten als methylverzweigte Carbonsäuren (*iso*-Säuren) identifiziert wurden. Das Fragmentation der Masse m/z 88, dessen Massenchromatogramm im oberen Teil der Abbildung zu sehen ist, stammt von einer anderen Spezies methylverzweigter Carbonsäuren, den 2-Methylcarbonsäuren. Während das die Methylgruppe tragende Kohlenstoffatom bei diesen dem Carboxylrest unmittelbar benachbart ist, sich also in C-2 Position befindet, liegt es bei den *iso*-Säuren am entgegengesetzten Ende des Moleküls, in der Position ω -1.

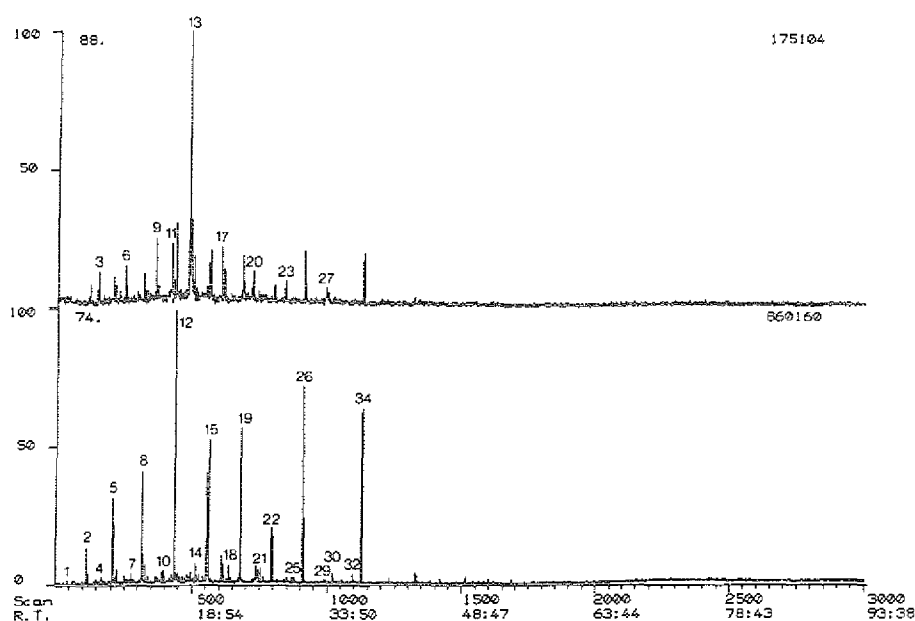


Abb. 6.3.1.13: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren und *iso*-Carbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des nicht biodegradierten Nigeria-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 3: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 4: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 7: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 11: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 12: Dodecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 14: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 15: Tridecancarbonsäuremethylester, 17: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 18: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 19: Tetradecancarbonsäuremethylester, 20: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 21: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 22: Pentadecancarbonsäuremethylester, 23: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 25: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 26: Hexadecancarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 29: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 30: Heptadecancarbonsäuremethylester, 32: Octadecancarbonsäuremethylester, 34: Octadecancarbonsäuremethylester).

Als gebundene Säuren des leicht biodegradierten Öls konnten neben *n*-Alkansäuren nur

2-Methylsäuren bestimmt werden, deren Verteilungen (Abb. 6.3.1.14) im wesentlichen der des nicht degradierten Öls entsprachen. Darüber hinaus eluierte in dieser Fraktion eine Vielzahl im einzelnen nicht strukturaufgeklärter Phenole, die als Ligninbestandteile aus terrestrischem organischem Material freigesetzt wurden.

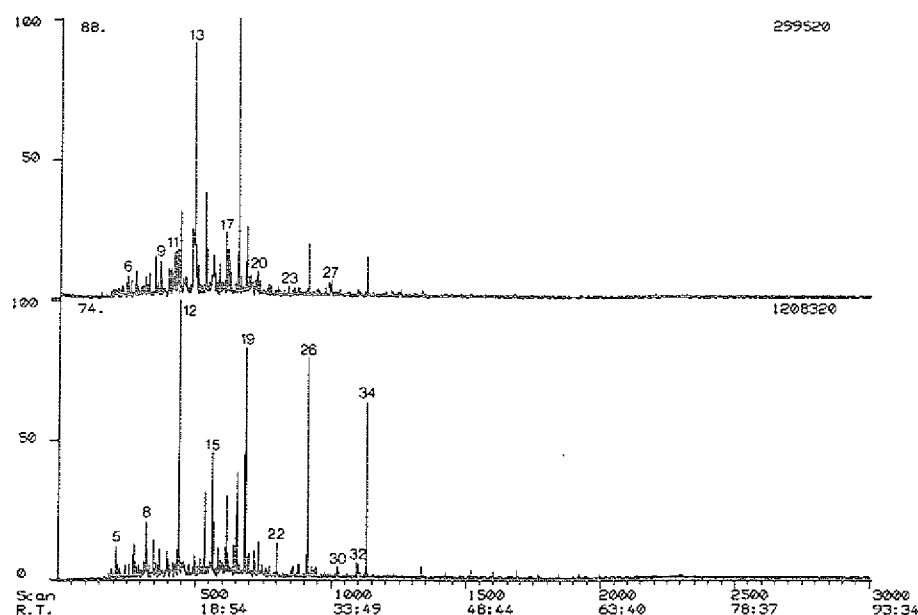


Abb. 6.3.1.14: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des leicht biodegradierten Nigeria-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(5: Decanocarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecanocarbonsäuremethylester, 8: Undecanocarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecanocarbonsäuremethylester, 11: 2,6-Dimethylundecanocarbonsäuremethylester, 12: Dodecanocarbonsäuremethylester, 13: 2-Methyldodecanocarbonsäuremethylester, 15: Tridecanocarbonsäuremethylester, 17: 2-Methyltridecanocarbonsäuremethylester, 19: Tetradecanocarbonsäuremethylester, 20: 2-Methyltetradecanocarbonsäuremethylester, 22: Pentadecanocarbonsäuremethylester, 23: 2-Methylpentadecanocarbonsäuremethylester, 26: Hexadecanocarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylhexadecanocarbonsäuremethylester, 30: Heptadecanocarbonsäuremethylester, 32: Octadecanocarbonsäuremethylester, 34: Octadecanocarbonsäuremethylester).

6.3.2 Kongo

Die drei Öle dieser Probenreihe stammen aus der Bohrung Youbi M1, die Elf Aquitaine im offshore-Bereich vor der Küste Kongos niedergebracht hat. Das in einer Teufe von 950-989 m in der Sendji-Formation der Unterkreide (Alb) erbohrte Öl zeigte Anzeichen leichter Biodegradation der Stufe 1. Mit geringerer Teufe verstärkte sich die Intensität des mikrobiellen Abbaus. So zeigte das Öl aus der oberkretazischen Tchala Formation (Cenoman) in einer Teufe von 843-870 m Biodegradations-Stufe 2-3, während das Öl bei 715-775 m die Stufe 5-6 erreichte, die mäßiger bis starker Degradation entspricht.

Ein nicht biodegradiertes Öl stand bei diesen Proben nicht zur Verfügung. Das am wenigsten durch mikrobielle Aktivität veränderte Öl (Abb. 6.3.2.1) war durch einen Verlust der kurzkettigen *n*-Alkane charakterisiert und mußte demnach schon als leicht biodegradiert (Stufe 1) klassifiziert werden. Insgesamt bildeten die *n*-Alkane eine breite Verteilung, die bis zu *n*-C₃₇ reichte und ein Maximum bei *n*-C₁₄/C₁₅ aufwies. Sterane und Hopane waren völlig intakt. Trotz der nur leichten Degradation besaß dieses Öl ein unaufgelöstes komplexes Gemisch von beträchtlicher Konzentration.

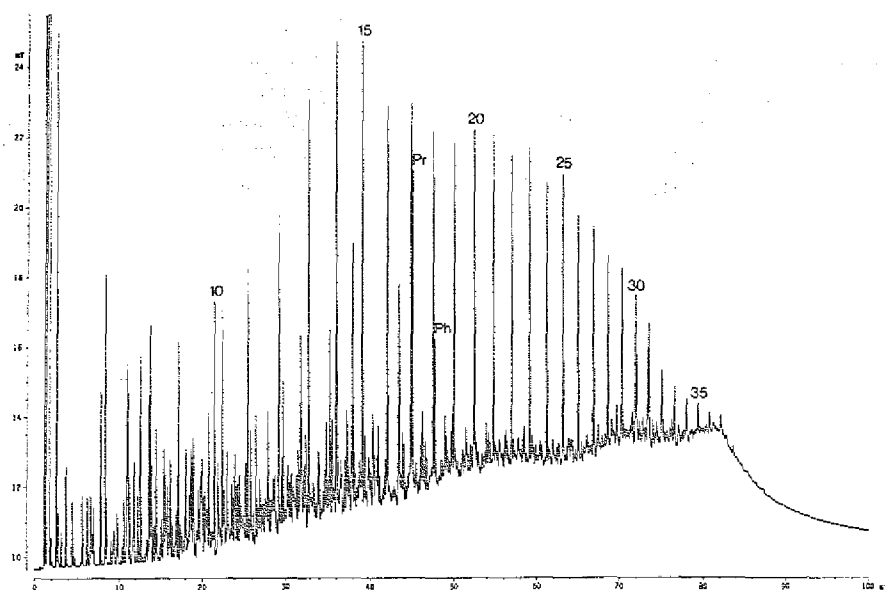


Abb. 6.3.2.1: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Kongo-Öls (Biodegradations-Stufe 1).

Im Zuge fortschreitender Degradation hatte sich die Konzentration des unaufgelösten komplexen Gemisches weiter erhöht bei gleichzeitiger drastischer Konzentrationsabnahme der zuvor als Einzelkomponenten aufgelösten Kohlenwasserstoffe im gesamten

Elutionsbereich (Abb. 6.3.2.2). Dies betraf natürlich auch die *n*-Alkane, die im niedermolekularen Bereich nur noch in Spuren nachzuweisen waren, insgesamt aber dennoch eine ziemlich vollständige homologe Reihe bildeten. Auch in diesem Öl zeigten die Biomarker keinerlei Anzeichen einer Degradation. Diese Merkmalskombination wurde ebenfalls noch mit leichter Biodegradation korreliert (Stufe 2-3).

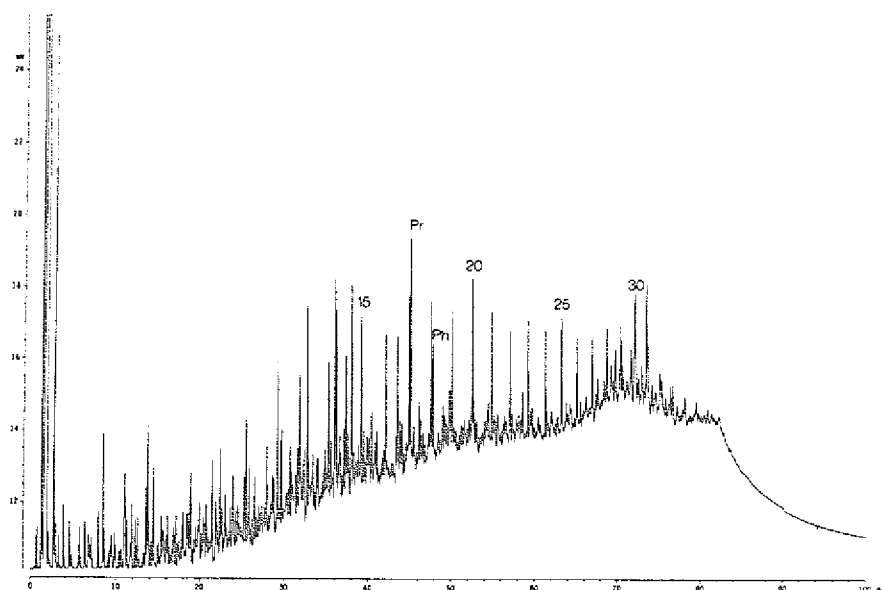


Abb. 6.3.2.2: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Kongo-Öls (Biodegradations-Stufe 2-3).

Das dritte Öl zeigte bei der gaschromatographischen Analyse fast nur noch ein unaufgelöstes komplexes Gemisch (Abb. 6.3.2.3). Obgleich sich die Sterane nur relativ schlecht auswerten ließen, lag der Verdacht nahe, daß sich in ihrer Verteilung bereits beginnende Degradation abzeichnete. Die Hopane waren hingegen nicht angegriffen. Demzufolge war dieses Öl als mäßig bis stark degradiert (Stufe 5-6) anzusprechen.

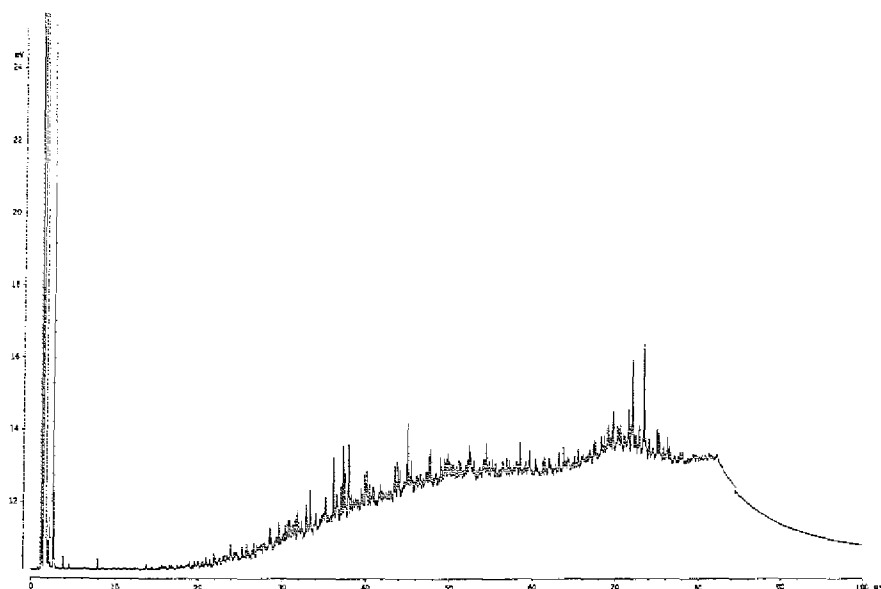


Abb. 6.3.2.3: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des mäßig bis stark biodegradierten Kongo-Öls (Biodegradations-Stufe 5-6).

Freie Säuren

Bei den freien Säuren des leicht mikrobiell veränderten Öls (Biodegradations-Stufe 1) dominierten aliphatische Monocarbonsäuren mit einer Kettenlänge bis zu 32 Kohlenstoffatomen (Abb. 6.3.2.4). Mit Ausnahme von n -C_{17:1}- und n -C_{18:1}-Carbonsäure handelte es sich ausschließlich um gesättigte Verbindungen. Die im niedermolekularen Bereich recht deutlich ausgeprägte Bevorzugung der geradzahligen Homologen verlor sich mit zunehmender Kettenlänge. In der Spur des für diese Säuren charakteristischen Fragmentions m/z 74 zeigten sich darüber hinaus Signale von 3-Methyl-C_{19:0}-Carbonsäure und 12-Hydroxy-C_{18:0}-Carbonsäure. 2-Methylcarbonsäuren, deren Verteilung aus dem Massenchromatogramm des Ions m/z 88 abzulesen ist, bildeten eine den n -Fettsäuren vergleichbare homologe Reihe. Die Relativkonzentrationen dieser verzweigten Säuren lagen jedoch wesentlich niedriger. Als einziger Vertreter mehrfach verzweigter Carbonsäuren konnte 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäure (Pristansäure) nachgewiesen werden. Tricyclische und pentacyclische Carbonsäuren waren in dieser Probe nur von untergeordneter Bedeutung (Abb. 6.3.2.5).

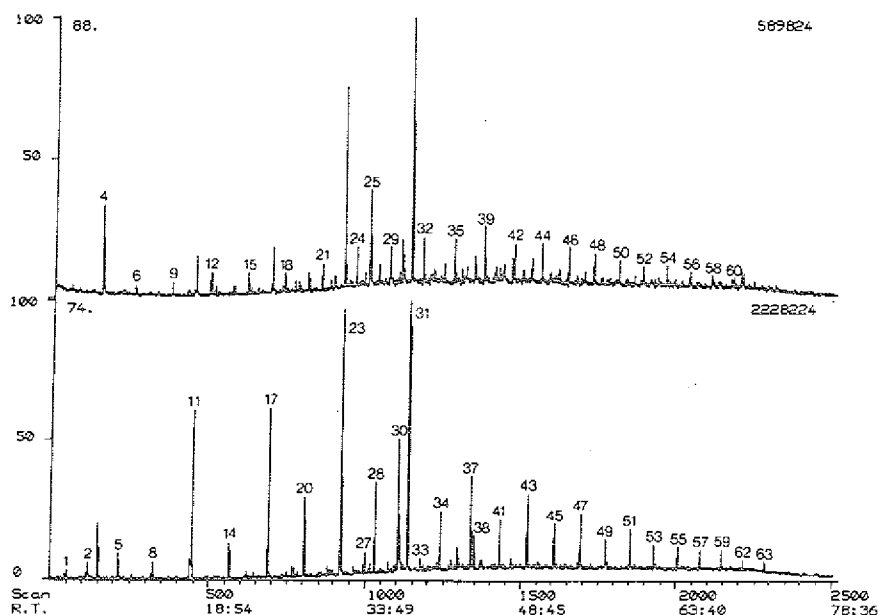


Abb. 6.3.2.4: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 1)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 11: Dodecarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldodecarbonsäuremethylester, 14: Tridecarbonsäuremethylester, 15: 2-Methyltridecarbonsäuremethylester, 17: Tetradecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 20: Pentadecancarbonsäuremethylester, 21: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 23: Hexadecancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 25: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 27: Heptadecancarbonsäuremethylester, 28: Heptadecancarbonsäuremethylester, 29: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 30: Octadecancarbonsäuremethylester, 31: Octadecancarbonsäuremethylester, 32: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 33: 3-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 34: Nonadecancarbonsäuremethylester, 35: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 37: Eicosancarbonsäuremethylester, 38: 12-Trimethylsiloxyoctadecancarbonsäuremethylester, 39: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 41: Heneicosancarbonsäuremethylester, 42: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 46: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 47: Tetracosancarbonsäuremethylester, 48: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 49: Pentacosancarbonsäuremethylester, 50: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 51: Hexacosancarbonsäuremethylester, 52: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 53: Heptacosancarbonsäuremethylester, 54: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 55: Octacosancarbonsäuremethylester, 56: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 57: Nonacosancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 59: Triacontancarbonsäuremethylester, 60: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 62: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 63: Dotriacontancarbonsäuremethylester).

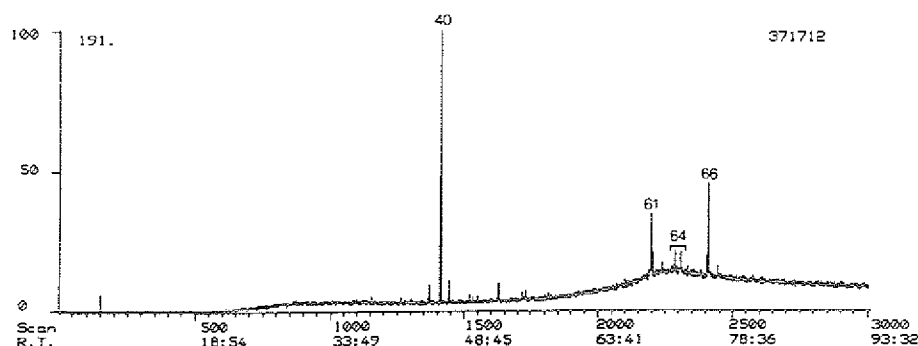


Abb. 6.3.2.5: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für tricyclische und pentacyclische Terpensäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des leicht biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 1)

(40: tricyclischer C_{21} -Carbonsäuremethylester, 61: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 64: $17\alpha,21\beta$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 66: $17\alpha,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester).

Die Fettsäure-Verteilung des leicht degradierten Öls der Biodegradations-Stufe 2-3 war mit der zuvor beschriebenen des leicht biodegradierten Öls der Biodegradations-Stufe 1 nahezu identisch (Abb. 6.3.2.6). Unterschiede bestanden lediglich hinsichtlich der erheblich niedrigeren Konzentrationen aller Verbindungen und der Bildung eines unaufgelösten komplexen Gemisches. Die Bevorzugung der geradzahligen Homologe blieb erhalten. Verzweigte Carbonsäuren traten mit Ausnahme von Pristansäure nicht auf. Tricyclische und pentacyclische Säuren boten wiederum dasselbe Bild wie in der leichter degradierten Probe, d.h. eine tricyclische Terpensäure mit 21 Kohlenstoffatomen in relativ hoher Konzentration und Isomere von C_{30} -, C_{31} - und C_{32} -Hopancarbonsäure mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration.

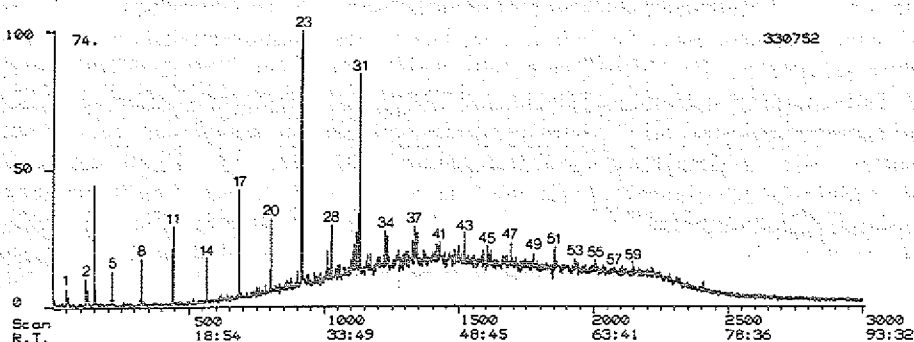


Abb. 6.3.2.6: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (freie Säuren des leicht biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 2-3)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 11: Dodecarbonsäuremethylester, 14: Tridecarbonsäuremethylester, 17: Tetradeccarbonsäuremethylester, 20: Pentadeccarbonsäuremethylester, 23: Hexadeccarbonsäuremethylester, 28: Heptadeccarbonsäuremethylester, 31: Octadeccarbonsäuremethylester, 34: Nonadeccarbonsäuremethylester, 37: Eicosancarbonsäuremethylester, 41: Heneicosancarbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 47:

Tetracosancarbonsäuremethylester, 49: Pentacosancarbonsäuremethylester, 51: Hexacosancarbonsäuremethylester, 53: Heptacosancarbonsäuremethylester, 55: Octacosancarbonsäuremethylester, 57: Nonacosancarbonsäuremethylester, 59: Triacontancarbonsäuremethylester).

Im Zuge der stärkeren Degradation des Öls war es zu gravierenden Änderungen bei den freien Säuren gekommen. Das unaufgelöste komplexe Gemisch im Massenchromatogramm des Ions m/z 74 hatte an Konzentration zugenommen, und die Konzentrationen der Fettsäuren waren drastisch zurückgegangen (Abb. 6.3.2.7). Dadurch kam es insbesondere im höhermolekularen Bereich zu einem so ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnis, daß die Zuordnung der längerkettigen Homologe $C_{20:0}$ - $C_{26:0}$ nur aufgrund der relativen Retentionszeiten vorgenommen werden konnte. Verzweigte Carbonsäuren ließen sich nicht nachweisen. Tricyclische und pentacyclische Carbonsäuren präsentierten sich in erheblich größerer Konzentration als in der leicht degradierten Probe der Biodegradations-Stufe 2-3 bei unveränderter Verteilung.

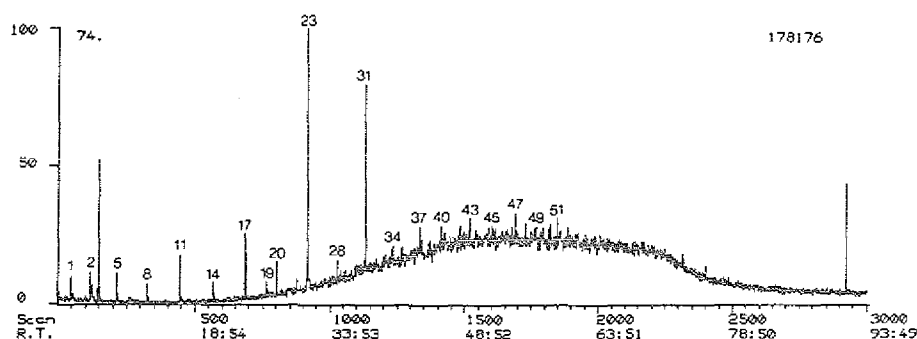


Abb. 6.3.2.7: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (freie Säuren des mäßig bis stark biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 5-6)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 11: Dodecancarbonsäuremethylester, 14: Tridecancarbonsäuremethylester, 17: Tetradecancarbonsäuremethylester, 19: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 20: Pentadecancarbonsäuremethylester, 23: Hexadecancarbonsäuremethylester, 28: Heptadecancarbonsäuremethylester, 31: Octadecancarbonsäuremethylester, 34: Nonadecancarbonsäuremethylester, 37: Eicosancarbonsäuremethylester, 40: tricyclischer C_{21} -Carbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 47: Tetracosancarbonsäuremethylester, 49: Pentacosancarbonsäuremethylester, 51: Hexacosancarbonsäuremethylester).

Gebundene Säuren

Fettsäuren und 2-Methylcarbonsäuren bestimmten auch die Fraktion der gebundenen

Säuren des leicht degradierten Öls der Biodegradations-Stufe 1, blieben aber auf einen sehr viel kleineren Kohlenstoffzahl-Bereich beschränkt (Abb. 6.3.2.8). So wurden Fettsäuren nur bis zu einer Kettenlänge von maximal 18 Kohlenstoffatomen identifiziert, und die Reihe der 2-Methylcarbonsäuren endet sogar bereits bei 2-Methyl- $C_{15:0}$ -Carbonsäure. Daneben eluierte eine Substanzklasse, die bei den freien Säuren nicht hatte beobachtet werden können, die der *iso*-Säuren. Diese einfach verzweigten Säuren wiesen zwischen 11 und 16 Kohlenstoffatome auf. Hopancarbonsäuren fehlten völlig, und die tricyclischen Säuren waren nur durch die C_{21} -Säure vertreten.

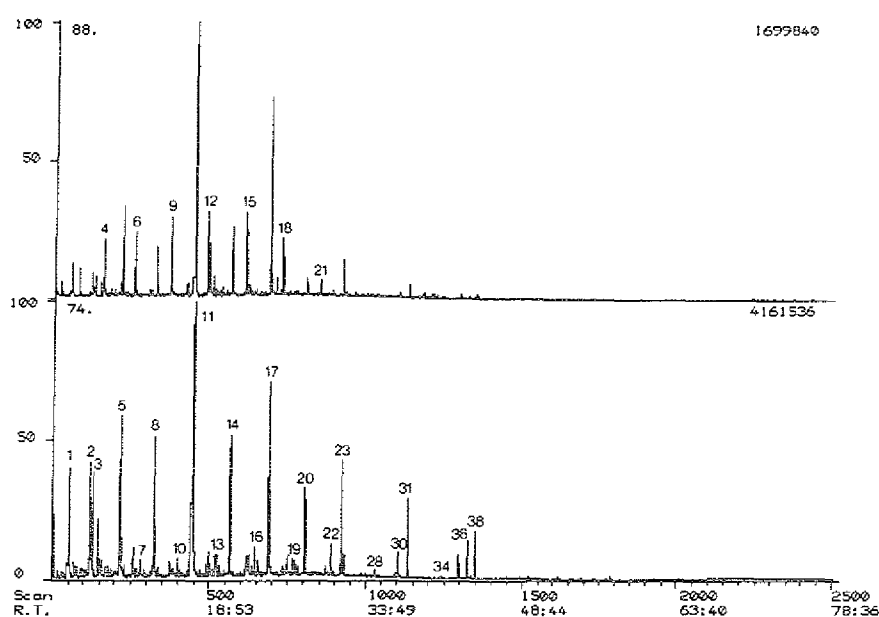


Abb. 6.3.2.8: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentionen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren und *iso*-Säuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des leicht biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 1)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 3: 3,7-Dimethyloctancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 7: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 11: Dodecancarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 13: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 14: Tridecancarbonsäuremethylester, 15: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 16: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 17: Tetradecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 19: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 20: Pentadecancarbonsäuremethylester, 21: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 22: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: Hexadecancarbonsäuremethylester, 28: Heptadecancarbonsäuremethylester, 30: Octadecancarbonsäuremethylester, 31: Octadecancarbonsäuremethylester, 34: Nonadecancarbonsäuremethylester, 36: 12-Trimethylsiloxyoctadecancarbonsäuremethylester, 38: 12-Trimethylsiloxyoctadecancarbonsäuremethylester).

Die Analysenergebnisse des leicht degradierten Öls der Biodegradations-Stufe 2-3 zeigten eine große Übereinstimmung mit denen des leicht degradierten Öls der Biodegradations-Stufe 1 in bezug auf die Substanzklassen bei den gebundenen Säuren und die Ver-

teilungsmuster innerhalb derselben (Abb. 6.3.2.9). Geradkettige und 2-methylverzweigte Carbonsäuren herrschten vor, neben denen *iso*-Säuren und C_{21} -tricyclische Terpensäure beinahe verschwanden. Insgesamt ließ sich eine beträchtliche Konzentrationserhöhung aller identifizierten Verbindungen verzeichnen.

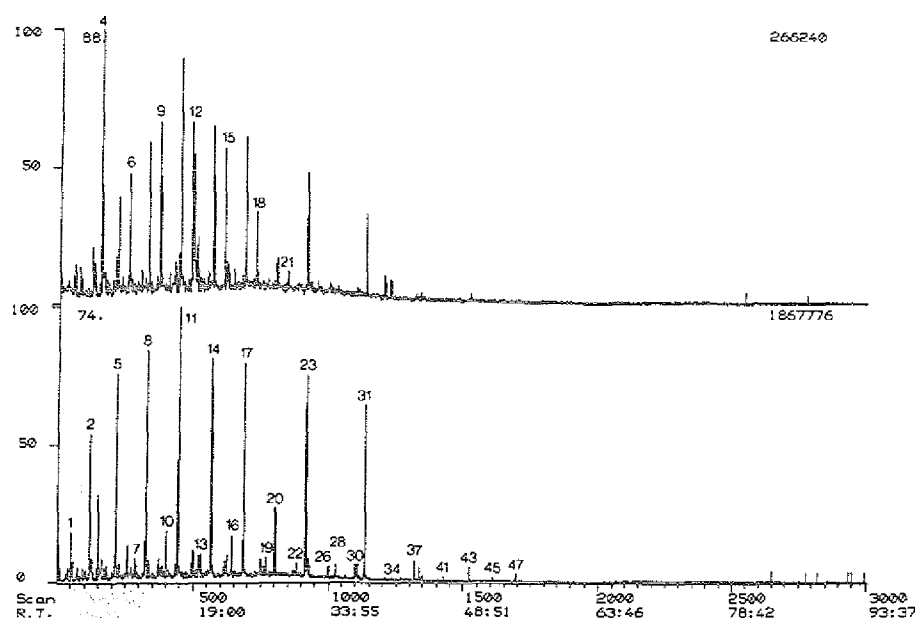


Abb. 6.3.2.9: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren und *iso*-Säuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des leicht biodegradierten Kongo-Öls, Biodegradations-Stufe 2-3) (1: Octancarbonsäuremethylester, 2: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 7: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 11: Dodecancarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 13: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 14: Tridecancarbonsäuremethylester, 15: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 16: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 17: Tetradecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 19: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 20: Pentadecancarbonsäuremethylester, 21: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 22: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 23: Hexadecancarbonsäuremethylester, 26: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 28: Heptadecancarbonsäuremethylester, 30: Octadecancarbonsäuremethylester, 31: Octadecancarbonsäuremethylester, 34: Nonadecancarbonsäuremethylester, 37: Eicosancarbonsäuremethylester, 41: Heneicosancarbonsäuremethylester, 43: Docosancarbonsäuremethylester, 45: Tricosancarbonsäuremethylester, 47: Tetracosancarbonsäuremethylester).

Die stärkere Degradation hatte keine weiteren Veränderungen hinsichtlich der Stoffwechselprodukte selbst bewirkt, jedoch zu einer Erniedrigung der Relativkonzentrationen aller Verbindungen im mäßig bis stark degradierten Öl dieser Probenserie geführt.

6.3.3 Powder River-Becken (Montana)

Die analysierten Proben stammen aus dem Bell Creek-Ölfeld, das im Südosten Montanas an der nordöstlichen Flanke des Powder River-Beckens liegt und als gutes Beispiel für ein Ölfeld in einer stratigraphischen Fallenstruktur gilt. Abbildung 6.3.3.1 zeigt die geologische Situation in einem Profilschnitt. Eingeschaltet zwischen die beiden mächtigen Schieferfolgen des Skull Creek Shale im Liegenden und des Mowry Shale im Hangenden als unterkretazische Transgressionsbildungen mit hohem Gehalt an organischem Material, finden sich verschiedene Sandsteinkörper, die während einer Regressionsphase gebildet wurden, so auch im Bereich der Lokation Bell Creek.

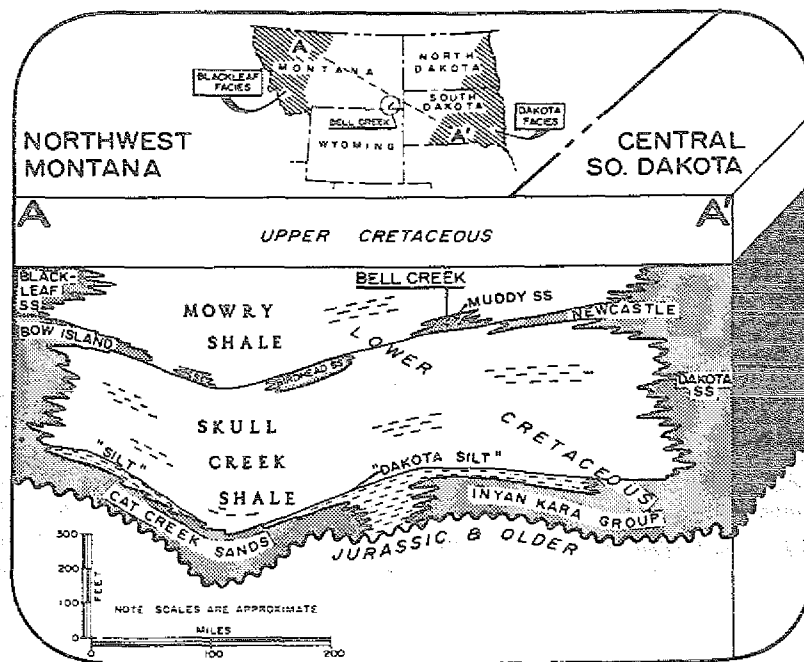


Abb 6.3.3.1: Profilschnitt von NW-Montana nach SE-Dakota (McGregor & Biggs 1970).

Abbildung 6.3.3.2 gibt eine Vorstellung über die paläogeographische Situation zur Zeit der Ablagerung des Sandsteins in Bell Creek. Als Ablagerungsmilieu wird ein küstennaher Flachwasserbereich im Einflußgebiet zweier unterschiedlicher Faziesräume postuliert.

Die Teufen für die drei von Amoco zur Verfügung gestellten Ölproben sind nicht bekannt.

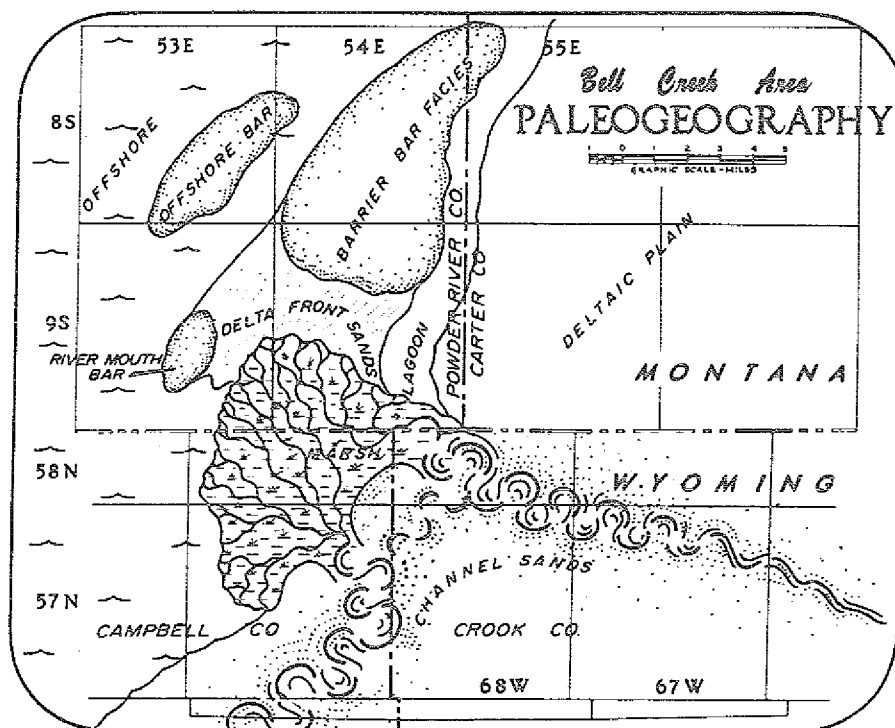


Abb. 6.3.3.2: Paläogeographische Skizze des Bell Creek Gebietes (McGregor & Biggs 1970).

Aufgrund des Gaschromatogramms des als nicht degradiert deklarierten Öls (Abb. 6.3.3.3) ließ sich nicht eindeutig entscheiden, ob es Anteile verschiedener Migrationsphasen enthielt oder doch bereits eine leichte Degradation einiger Verbindungen im Bereich der längerkettigen *n*-Alkane stattgefunden hatte. Die Biomarker gaben allerdings keinen Hinweis darauf, daß ein Gemisch verschiedener Öle vorliegen könnte, so daß es sich vermutlich doch um ein leicht degradiertes Öl (Stufe 1) handelt.

Abbildung 6.3.3.4 zeigt ein weiteres Öl dieser Probenreihe. Es war durch folgende Merkmalskombination gekennzeichnet: Völliger Verlust der kurzkettigen *n*-Alkane bis zu n -C₁₆ bei nahezu intakter Verteilung der längerkettigen Homologe, Konzentrationsabnahme jedoch auch bei diesen und dadurch Erhöhung der Relativkonzentrationen von Isoprenoiden, Alicyclen und Aromaten und Biomarker-Verteilung ohne Anzeichen von Degradation. Dieses Öl hatte wohl nur eine leichte Degradation erfahren (Stufe 2-3).

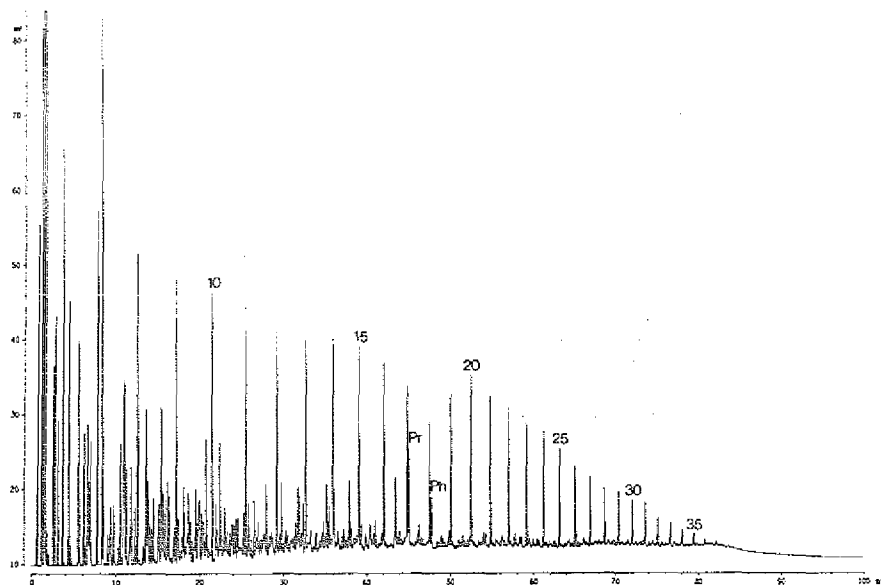


Abb. 6.3.3.3: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Bell Creek-Öls (Biodegradations-Stufe 1).

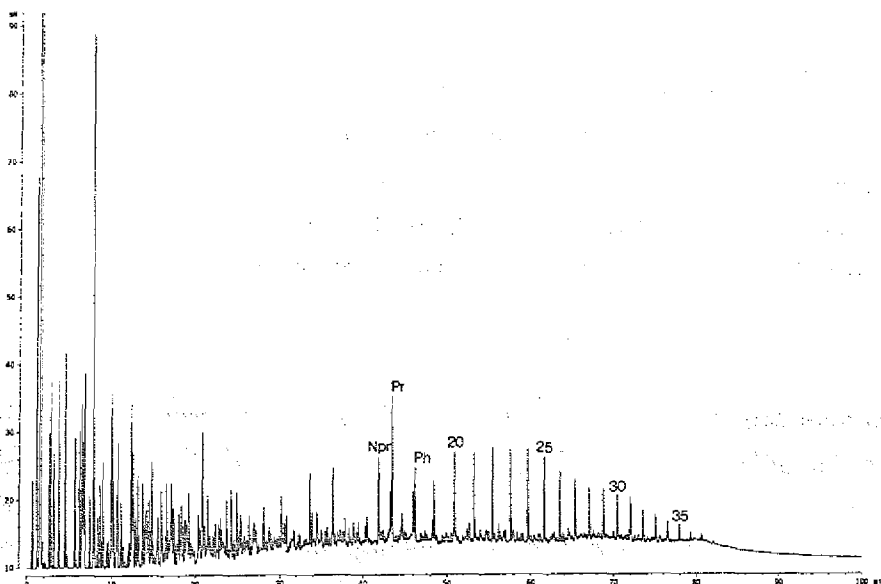


Abb. 6.3.3.4: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Bell Creek-Öls (Biodegradations-Stufe 2-3).

Da auch die Biomarker des in Abbildung 6.3.3.5 dargestellten dritten Öls unverändert geblieben waren, ließ sich dieses trotz vollständig fehlender *n*-Alkane und einer leichten Konzentrationszunahme des unaufgelösten komplexen Gemisches nur als mäßig degradiert einstufen (Stufe 4). Als dominierende Verbindungen traten die Isoprenoide, insbesondere Norpristan, Pristan und Phytan, hervor.

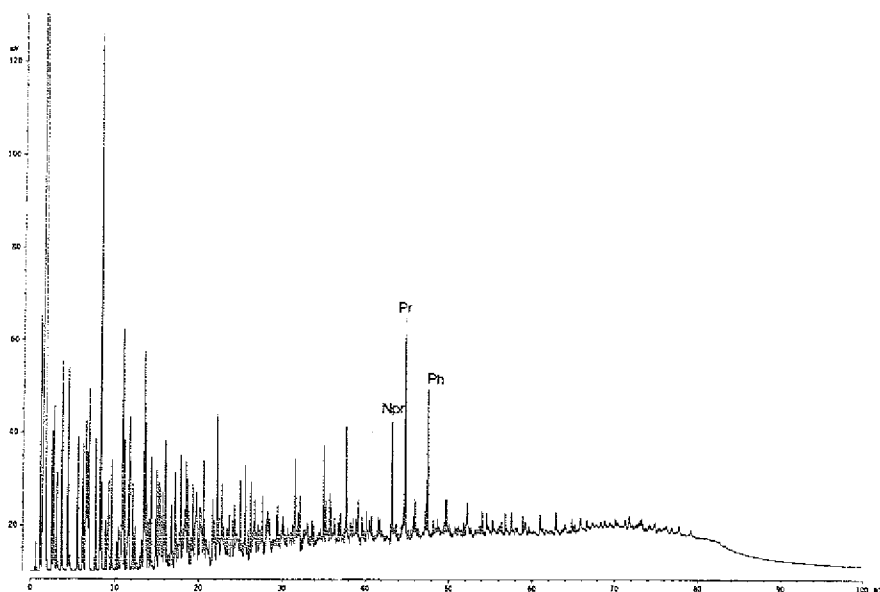


Abb 6.3.3.5: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des mäßig biodegradierten Bell Creek-Öls (Biodegradations-Stufe 4).

Freie Säuren

Die Fraktion der freien Säuren des leicht biodegradierten Öls der Biodegradations-Stufe 1 setzte sich aus geradkettigen, einfach und mehrfach verzweigten und pentacyclischen Carbonsäuren zusammen. Die geradkettigen Säuren eluierten in breiter Verteilung zwischen $C_{8:0}$ - und $C_{32:0}$ -Säure und zeigten eine Bevorzugung der geradzahligen Homologen (Abb. 6.3.3.6). Das Maximum ihrer Verteilung lag bei $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säure, daneben erreichten jedoch auch $C_{12:0}$ - und $C_{14:0}$ -Säure deutlich höhere Konzentrationen als die übrigen Verbindungen. Ungesättigte Säuren ließen sich mit Ausnahme von $C_{18:1}$ -Säure nicht nachweisen. Bei den einfach verzweigten Säuren handelte es sich um 2-Methylcarbonsäuren, die eine den n -Alkansäuren hinsichtlich des Elutionsbereichs entsprechende homologe Reihe bildeten. Ihre Konzentrationen differierten allerdings beträchtlich, da sowohl der Gehalt an 2-Methylcarbonsäuren insgesamt als auch die Konzentrationen der einzelnen Homologe erheblich niedriger lagen. Überdies zeigte ihre Verteilung kein ausgeprägtes Maximum. Mehrfach verzweigte Säuren waren nur durch Pristan- und Phytansäure vertreten. Die pentacyclischen Carbonsäuren wiesen die geringsten Konzentrationen der in dieser Fraktion identifizierten Substanzklassen auf. Es konnten Isomere von C_{30} -, C_{31} - und C_{32} -Hopancarbonsäuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration sowie

C₃₀- und C₃₁-Säuren mit 17 β ,21 β -Konfiguration bestimmt werden (Abb. 6.3.3.7). Dominiierende Verbindungen waren die Isomere der C₃₁-Hopancarbonsäuren mit 17 α ,21 β -Konfiguration.

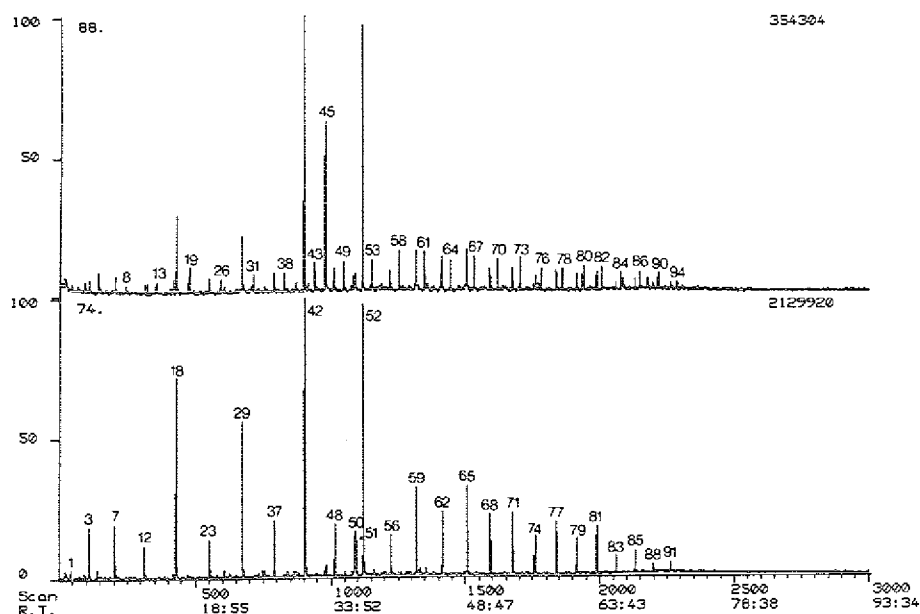


Abb. 6.3.3.6: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht biodegradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 1)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 18: Dodecancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 23: Tridecancarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 45: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 51: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 56: Nonadecancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 59: Eicosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 62: Heneicosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 65: Docosancarbonsäuremethylester, 67: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 68: Tricosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 71: Tetracosancarbonsäuremethylester, 73: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 74: Pentacosancarbonsäuremethylester, 76: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 77: Hexacosancarbonsäuremethylester, 78: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 79: Heptacosancarbonsäuremethylester, 80: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 81: Octacosancarbonsäuremethylester, 82: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 83: Nonacosancarbonsäuremethylester, 84: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 85: Triacontancarbonsäuremethylester, 86: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 88: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 90: 2-Methylhentriacontancarbonsäuremethylester, 91: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 94: 2-Methyldotriacontancarbonsäuremethylester.

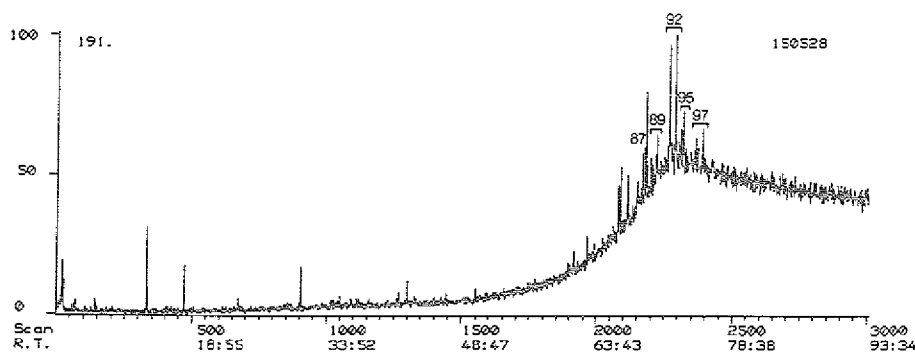


Abb. 6.3.3.7: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für pentacyclische Terpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des leicht biodegradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 1)

(87: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 89: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 92: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 95: $17\beta,21\alpha$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 97: $17\alpha,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester).

Fettsäuren, 2-Methylsäuren, *isoprenoid*-Säuren und Hopancarbonsäuren bildeten auch das Säurespektrum des zwar etwas stärker, aber immer noch leicht biodegradierten Öls der Biodegradations-Stufe 2-3. Im Vergleich zu der weniger biodegradierten Probe erreichten diese Substanzklassen hier jedoch generell wesentlich höhere Konzentrationen. Unterschiede ergaben sich außerdem hinsichtlich der Elutionsbereiche von Fettsäuren und 2-Methylcarbonsäuren. So konnten die geradkettigen Säuren nur bis zu einer Kettenlänge von 28 Kohlenstoffatomen und die 2-Methylsäuren nur bis zu 2-Methyl- $C_{24:0}$ -Säure nachgewiesen werden (Abb. 6.3.3.8). Während die Fettsäureverteilungen hinsichtlich der Relativkonzentrationen der einzelnen Verbindungen zueinander bis zu n - $C_{18:0}$ -Säure in beiden Ölen weitgehend übereinstimmten, traten die längerkettigen Säuren in dieser Probe nur in sehr geringen Konzentrationen auf. Die Gehalte an Pristan- und Phytansäure hatten sich in Relation zu denen der n -Alkansäuren ebenfalls vermindert. Im Zuge der Degradation präsentierten die Hopancarbonsäuren nun ein wesentlich komplexeres Verteilungsmuster von homologen und isomeren Säuren im Bereich von C_{30} bis C_{34} (Abb. 6.3.3.9). Es dominierten C_{30} -, C_{31} - und C_{32} -Hopansäuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration sowie die C_{32} -Säuren mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration. Sie zeichneten sich durch ein anderes R/S-Isomerenverhältnis aus als in der zuvor beschriebenen Probe.

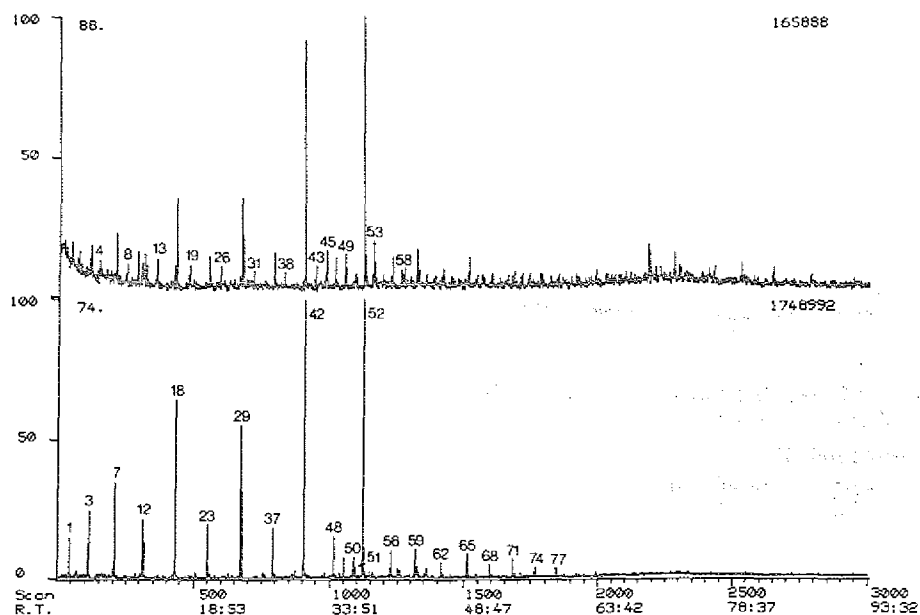


Abb. 6.3.3.8: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht degradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 2-3)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 18: Dodecarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodecarbonsäuremethylester, 23: Tridecarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltridecarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 45: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 51: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 56: Nonadecancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 59: Eicosancarbonsäuremethylester, 62: Heneicosancarbonsäuremethylester, 65: Docosancarbonsäuremethylester, 68: Tricosancarbonsäuremethylester, 71: Tetracosancarbonsäuremethylester, 74: Pentacosancarbonsäuremethylester, 77: Hexacosancarbonsäuremethylester).

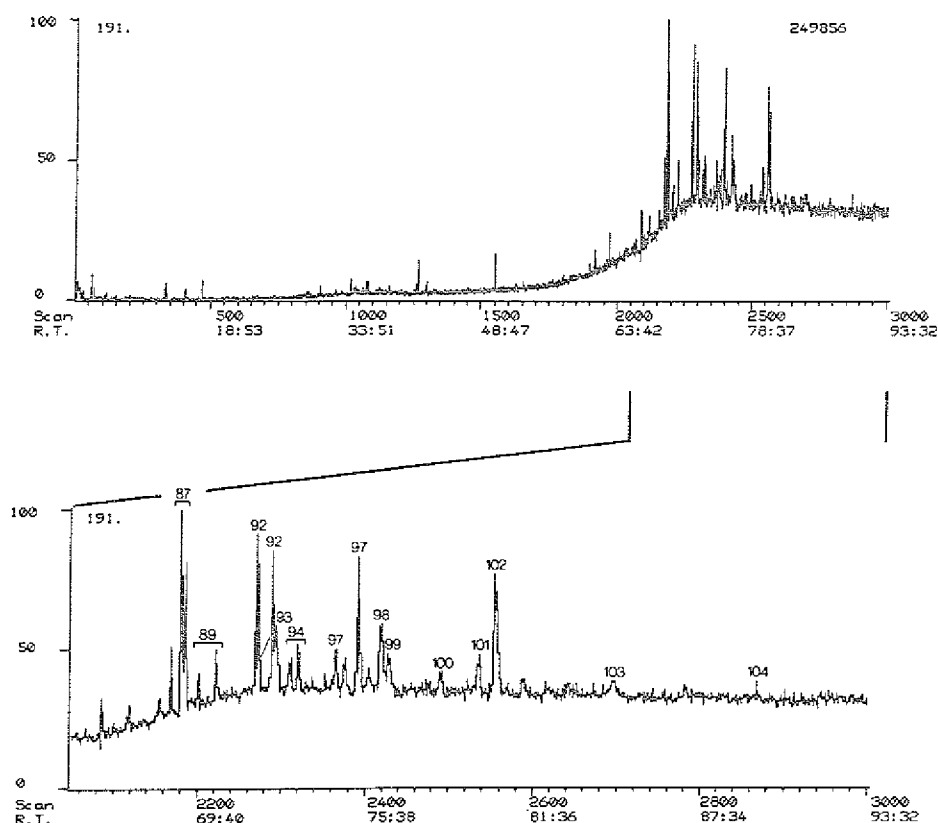


Abb. 6.3.3.9: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für pentacyclische Terpensäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des leicht degradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 2-3).

(87: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 89: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 92: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 93: $17\beta,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 95: $17\beta,21\alpha$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 97: $17\alpha,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 98: $17\beta,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 99: $17\beta,21\alpha$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 100: $17\alpha,21\beta$ -*trihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 101: $17\beta,21\alpha$ -*trihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 102: $17\beta,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 103: $17\beta,21\beta$ -*trihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 104: $17\beta,21\beta$ -*tetrahomo*-Hopancarbonsäuremethylester).

Auch das mäßig degradierte Öl der Biodegradations-Stufe 4 enthielt *n*-Alkansäuren sowie einfach und mehrfach verzweigte Carbonsäuren. Hopancarbonsäuren konnten dagegen nicht beobachtet werden. Die in Abbildung 6.3.3.10 anhand der beiden Massenchromatogramme dargestellten Säureverteilungen zeigten relativ komplexe Muster und schlossen einen ähnlich großen Kohlenstoffzahl-Bereich ein wie in der leicht biodegradierten Probe der Biodegradations-Stufe 1, wiesen jedoch erheblich geringere Gehalte auf. Geradkettige Säuren eluierten bis zu einer Kettenlänge von 33 Kohlenstoffatomen mit einem breiten Maximum im Bereich von $C_{12:0}$ - bis $C_{18:0}$ -Säure. Bei den einfach verzweigten Säuren ließen sich mehrere Spezies unterscheiden. Standards standen nicht zur Verfügung, so daß die genauen Positionen der Methylverzweigungen nicht bekannt sind. Da ein Teil der Substanzen bei der massenspektrometrischen Analyse ein Fragmention

der Masse m/z 74 ergab, kann sich der Methylsubstituent dieser Verbindungen nicht direkt neben der Säuregruppe befinden, sonst wäre eine Fragmentation der Masse m/z 88 aufgetreten. Aufgrund der Massenspektren und aufgrund eines Retentionszeitvergleiches mit Arbeiten von Boon et al. (1975, 1978) und Derenne et al. (1991) wurde im niedermolekularen Bereich neben *iso*-C_{12:0}-, *iso*-C_{13:0}-, *iso*-C_{14:0}- und *iso*-C_{15:0}-Säure auch eine *anteiso*-C_{15:0}-Säure bestimmt, d.h. die Substituenten hatten die Positionen ω -1 bzw. ω -2. Einige Verbindungen im höhermolekularen Bereich zeigten neben dem Basispeak der Masse m/z 74 eine Fragmentation der Masse m/z 101. In diesem Fall könnte es sich um 3-Methylcarbonsäuren gehandelt haben. Ebenso wie in der leicht degradierten Probe konnte eine homologe Reihe von 2-Methylcarbonsäuren nachgewiesen werden, deren Verteilung aus dem Massenchromatogramm des charakteristischen Fragments m/z 88 zu ersehen ist. Die Verbindungen höherer Konzentration lagen im kurzkettigen Bereich mit einem Maximum bei 2-Methyl-C_{13:0}-Säure. Neben diesen 2-Methylcarbonsäuren, die sich durch einen Basispeak der Masse m/z 88 und ein Fragmentation der Masse 101 auszeichnen, schien eine zweite Reihe homologer Verbindungen zu existieren. In einigen Fällen hatten die Massen m/z 88 und m/z 101 annähernd gleiche Intensität. Wegen des Fehlens der Molekulationen war eine eindeutige Identifizierung nicht möglich. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Substanzen um mehrfach verzweigte 2-Methylcarbonsäuren. Der eindeutige Nachweis isoprenoider Säuren gelang mit 2,6-Dimethylundecancarbonsäure, 3,7-Dimethylundecancarbonsäure, 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäure, 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäure, 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäure, 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäure (Pristansäure) und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäure (Phytansäure).

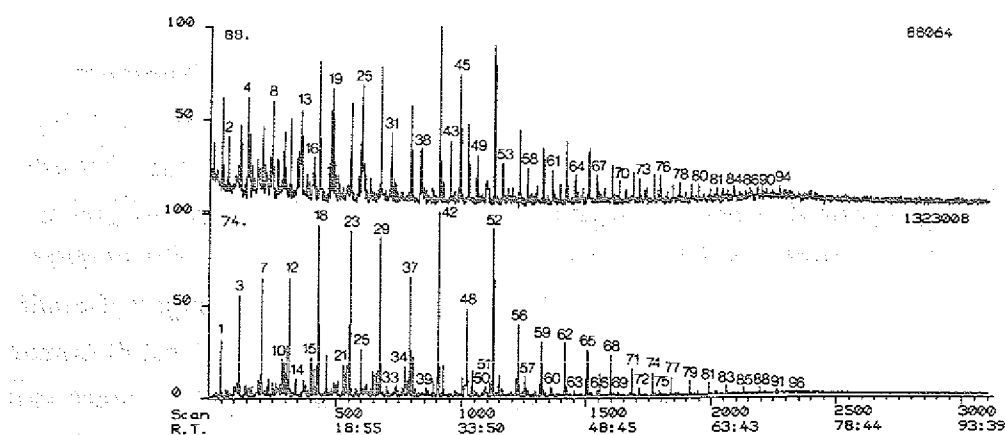


Abb. 6.3.3.10: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des mäßig degradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 4)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 14: 3,7-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 16: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 18: Dodecancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 21: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 23: Tridecancarbonsäuremethylester, 25: 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 33: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 39: 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäuremethylester, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 45: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 51: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 56: Nonadecancarbonsäuremethylester, 57: 3-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 59: Eicosancarbonsäuremethylester, 60: 3-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 62: Heneicosancarbonsäuremethylester, 63: 3-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 65: Docosancarbonsäuremethylester, 66: 3-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 67: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 68: Tricosancarbonsäuremethylester, 69: 3-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 71: Tetracosancarbonsäuremethylester, 72: 3-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 73: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 74: Pentacosancarbonsäuremethylester, 75: 3-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 76: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 77: Hexacosancarbonsäuremethylester, 78: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 79: Heptacosancarbonsäuremethylester, 80: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 81: Octacosancarbonsäuremethylester, 82: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 83: Nonacosancarbonsäuremethylester, 84: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 85: Triacontancarbonsäuremethylester, 86: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 88: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 90: 2-Methylhentriacontancarbonsäuremethylester, 91: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 94: 2-Methyldotriacontancarbonsäuremethylester, 96: Tritriacontancarbonsäuremethylester).

Gebundene Säuren

Die Säureverteilung der gebundenen Säurefraktion des leicht degradierten Bell Creek-Öls der Biodegradations-Stufe 1 ist aus Abbildung 6.3.3.11 zu entnehmen. Fettsäuren erreichten eine Kettenlänge von 26 Kohlenstoffatomen bei deutlicher Bevorzugung der geradzahligen Homologe. Ihre Konzentrationen waren - verglichen mit denen der freien Säuren - erheblich niedriger. Ungesättigte Säuren wurden mit Ausnahme von $C_{18:1}$ -Carbonsäure nicht beobachtet. In der Spur der Masse m/z 74 eluierten daneben homologe *iso*-Säuren, die von *iso*- $C_{10:0}$ bis *iso*- $C_{17:0}$ nachgewiesen werden konnten, sowie mit 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Säure, 3,7,11-Trimethyl- $C_{13:0}$ -Säure und Spuren von 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Säure einige *isoprenoid*-Carbonsäuren. Das Massenchromatogramm des für 2-Methylsäuren charakteristischen Fragmentations der Masse m/z 88 zeigte eine Verteilung, die auf einen kleinen Kohlenstoffzahl-Bereich beschränkt war und nur Verbin-

dungen von 2-Methyl-C_{9:0}-Säure bis 2-Methyl-C_{16:0}-Säure umfaßte mit einem Maximum bei 2-Methyl-C_{12:0}-Säure. In sehr geringer Konzentration trat auch 2,6,10,14-Tetramethyl-C_{15:0}-Carbonsäure auf.

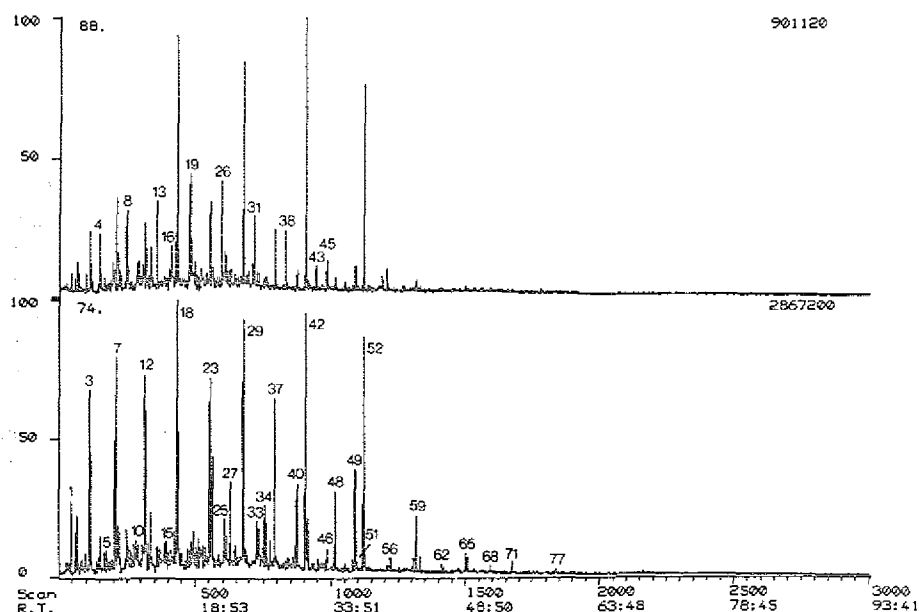


Abb. 6.3.3.11: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des leicht degradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 1).

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 16: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 18: Dodecancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 23: Tridecancarbonsäuremethylester, 25: 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 27: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 33: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 40: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 45: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 46: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 51: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 56: Nonadecancarbonsäuremethylester, 59: Eicosancarbonsäuremethylester, 62: Heneicosancarbonsäuremethylester, 65: Docosancarbonsäuremethylester, 68: Tricosancarbonsäuremethylester, 71: Tetracosancarbonsäuremethylester, 77: Hexacosancarbonsäuremethylester).

Das Säurespektrum der leicht degradierten Probe der Biodegradations-Stufe 2-3 (Abb. 6.3.3.12) unterschied sich, abgesehen von Konzentrationsänderungen, nur wenig von dem zuvor beschriebenen. Die Gehalte an *iso*-Säuren waren im Vergleich zu denen der Fettsäuren stark zurückgegangen und die *isoprenoid*-Säuren bis auf 2,6-Dimethyl-C_{10:0}-

Säure, 2,6-Dimethyl- $C_{11:0}$ -Säure, 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Säure und Spuren von 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Säure nicht mehr nachweisbar.

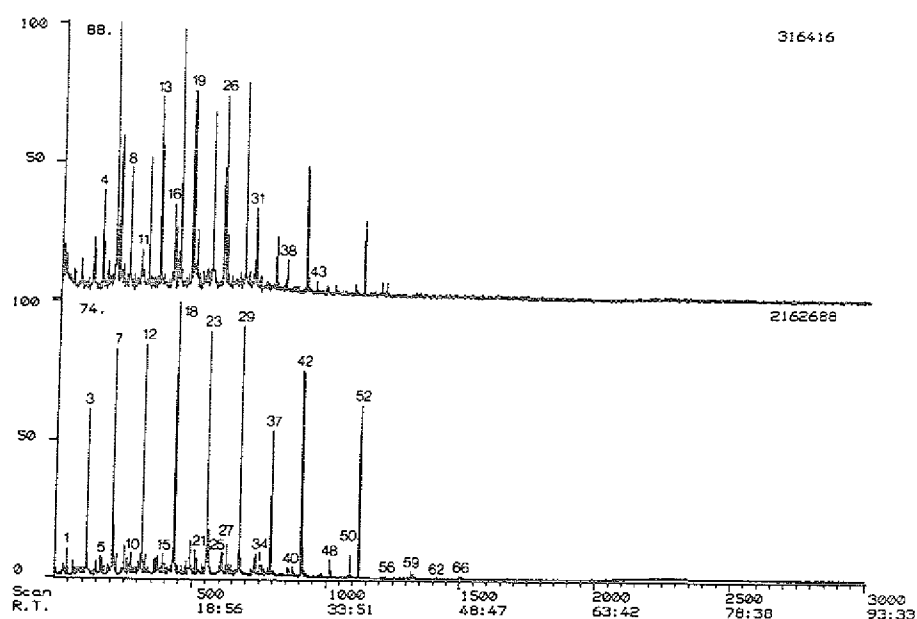


Abb. 6.3.3.12: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentionen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des leicht biodegradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 2-3)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 11: 2,6-Dimethyldecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Dodeancarbonsäuremethylester, 16: 2,6-Dimethyldodeancarbonsäuremethylester, 18: Dodeancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodeancarbonsäuremethylester, 21: *iso*-Trideancarbonsäuremethylester, 23: Trideancarbonsäuremethylester, 25: 3,7,11-Trimethyldodeancarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltrideancarbonsäuremethylester, 27: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 40: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 56: Nonadecancarbonsäuremethylester, 59: Eicosancarbonsäuremethylester, 62: Heneicosancarbonsäuremethylester, 65: Docosancarbonsäuremethylester).

Das mäßig degradierte Öl zeigte im Massenchromatogramm der Spur m/z 88 fast exakt das gleiche Bild wie in der etwas weniger stark biodegradierten Probe, es war lediglich zu Konzentrationserhöhungen gekommen (Abb 6.3.3.13). Bei den n -Carbonsäuren waren die Gehalte der Verbindungen mit mehr als 15 Kohlenstoffatomen deutlich zurückgegangen, obgleich sich die Konzentrationen auch dieser Verbindungen insgesamt erhöht hatten. Ebenso wie bei den freien Säuren traten *anteiso*-Säuren auf.

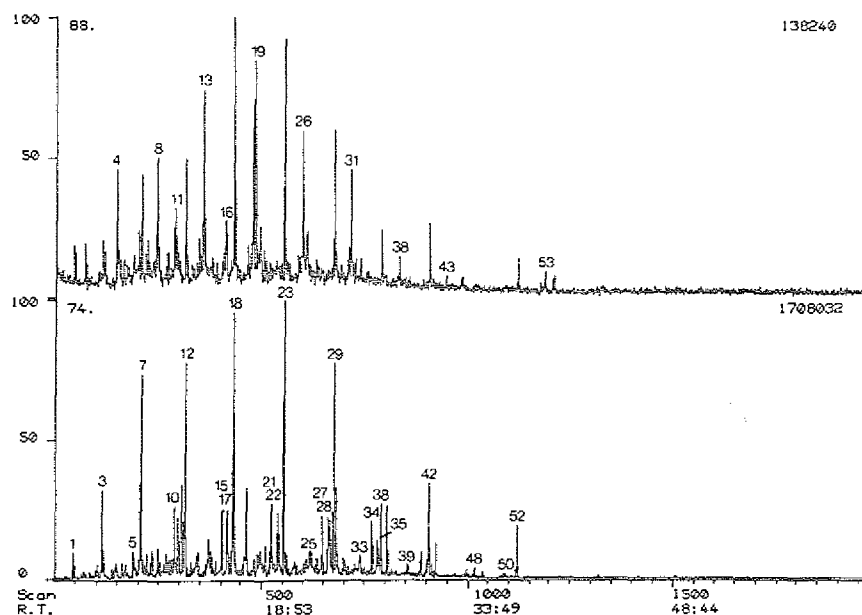


Abb. 6.3.3.13: Massenchromatogramm der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des mäßig degradierten Bell Creek-Öls, Biodegradations-Stufe 4)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 11: 2,6-Dimethyldecancarbonsäuremethylester, 12: Undecancarbonsäuremethylester, 13: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 16: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 17: *anteiso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 18: Dodecancarbonsäuremethylester, 19: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 21: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 22: *anteiso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 23: Tridecancarbonsäuremethylester, 25: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 26: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 27: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 28: *anteiso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 29: Tetradecancarbonsäuremethylester, 31: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 33: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 35: *anteiso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 37: Pentadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 39: 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäure, 42: Hexadecancarbonsäuremethylester, 43: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 48: Heptadecancarbonsäuremethylester, 50: Octadecancarbonsäuremethylester, 52: Octadecancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester).

Alkohole

In der Probensequenz der Bell Creek-Öle ließen sich in allen Proben auch Alkohole nachweisen. Es waren dies zum einen gesättigte geradkettige Verbindungen mit Kettenlängen zwischen 10 und 18 Kohlenstoffatomen. Da ausschließlich geradzahlige Homologe identifiziert wurden, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen wohl eher um Kontaminationen als um Stoffwechselprodukte mikrobieller Aktivität handelt. Zum an-

deren eluierte eine Vielzahl von Substanzen, die aufgrund von Massenspektren als hydratisierte polycyclische Aromaten bestimmt wurden. Diese umfaßten sowohl Phenanthrene und Fluorene als auch Chrysen. Rückschlüsse auf die genaue Position der OH-Gruppe am Kohlenstoffgerüst gestatteten die Spektren allerdings nicht. Erwartungsgemäß bot die am stärksten mikrobiell veränderte Probe auch die differenzierteste Alkohol-Verteilung. Abbildung 6.3.3.14 zeigt das Massenchromatogramm eines der beiden charakteristischen Fragmentationen für Alkohole (m/z 75). Als dominierende Komponenten traten in dieser Probe hydratisiertes Phenanthren (Abb. 6.3.3.15) und hydratisierte isomere Methyl-Phenanthrene (Abb. 6.3.3.16) auf. Die Konzentrationen der Alkohole waren jedoch generell erheblich niedriger als die der Carbonsäuren, so daß sich selbst die sicher nachweisbaren Alkohole durch sehr geringe Absolutgehalte auszeichneten. In Relation zu den Derivaten des Phenanthrens und der Methylphenanthrene wiesen sowohl die hydratisierten Dimethylphenanthrene (Abb. 6.3.3.17) als auch die Isomere der höher kondensierten hydratisierten Aromaten, Methylfluoren (Abb. 6.3.3.18), Dimethylfluoren (Abb. 6.3.3.19) und Chrysen (Abb. 6.3.3.20), nur geringe Konzentrationen auf.

Ogleich dieses Öl eine relativ hohe Konzentration an Phytan enthielt, wurden keine Phytanole gefunden. Nach den Ergebnissen der Versuche mit Reinsubstanzen wäre dies durchaus zu erwarten gewesen.

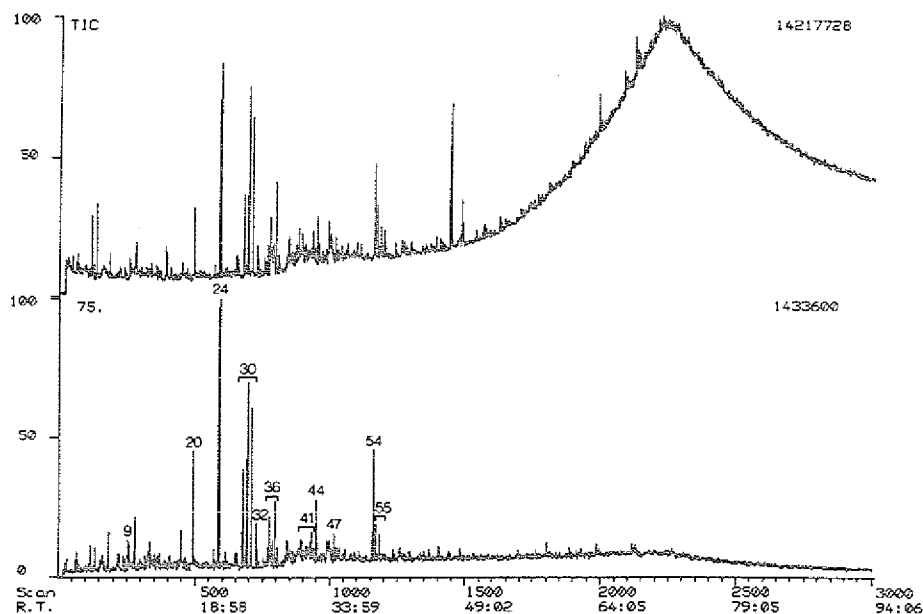


Abb 6.3.3.14: Totalionenstromchromatogramm (TIC) und Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für Alkohole (m/z 75) des mäßig degradierten Bell Creek-Öls (Biodegradations-Stufe 4)

(9: Decanoltrimethylsilylether, 20: Dodecanoltrimethylsilylether, 24: Hydroxydihydrophenanthrentrimethylsilylether, 30: Hydroxydihydromethylphenanthrentrimethylsilylether, 32: Tetradecanoltrimethylsilylether, 36: Hydroxydihydrodimethylphenanthrentrimethylsilylether, 41: Hydroxydihydromethylfluorentrimethylsilylether, 44: Hexadecanoltrimethylsilylether, 47: Hydroxydihydrodimethylfluorentrimethylsilylether, 54: Octadecanoltrimethylsilylether, 55: Hydroxydihydrochrysentrimethylsilylether).

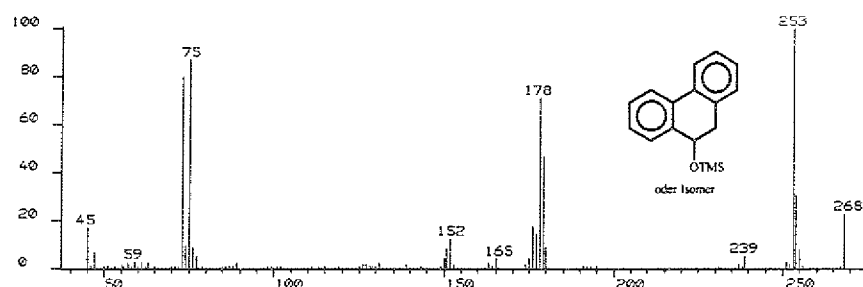


Abb. 6.4.4.15: Massenspektrum von hydratisiertem Phenanthren als TMS-Ether.

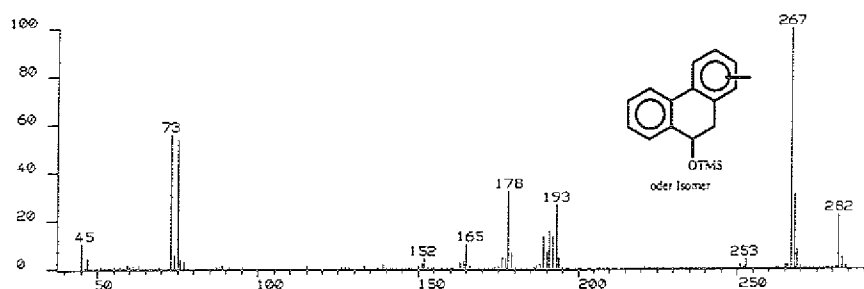


Abb. 6.3.3.16: Massenspektrum von hydratisiertem Methyl-Phenanthren als TMS-Ether.

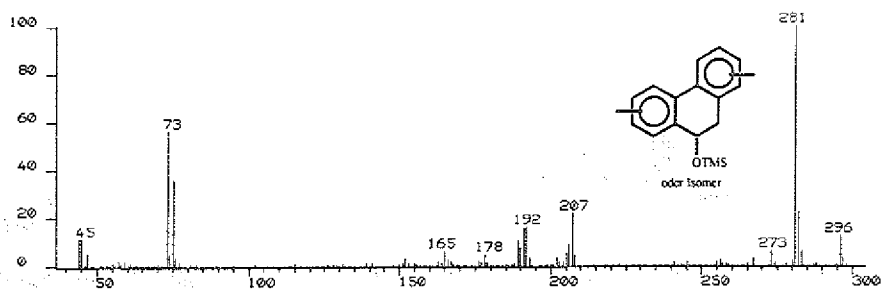


Abb. 6.3.3.17: Massenspektrum von hydratisiertem Dimethyl-Phenanthren als TMS-Ether.

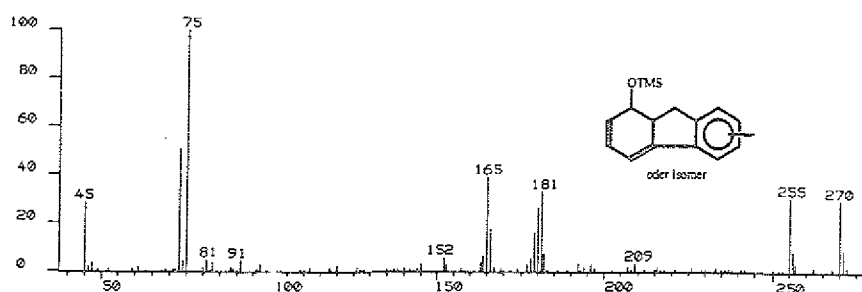


Abb. 6.3.3.18: Massenspektrum von hydratisiertem Methyl-Fluoren als TMS-Ether.

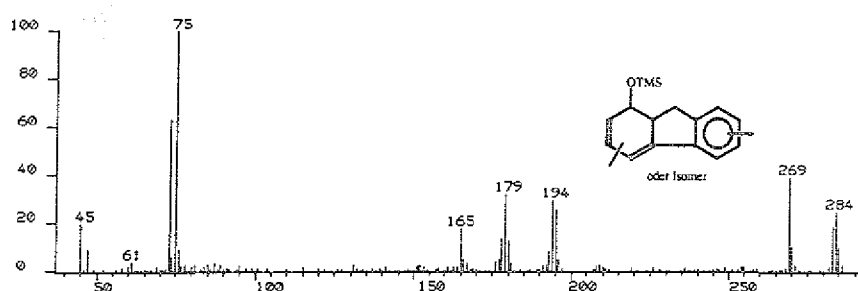


Abb. 6.3.3.19: Massenspektrum von hydratisiertem Dimethyl-Fluoren als TMS-Ether.

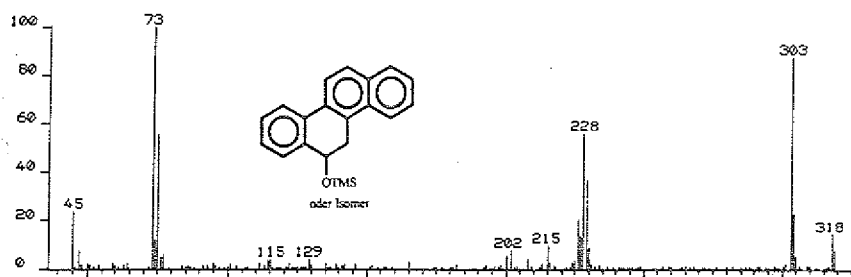


Abb. 6.3.3.20: Massenspektrum von hydratisiertem Chrysen als TMS-Ether.

6.3.4 Santa Maria-Becken (Kalifornien)

Die im Rahmen der Cooperative Monterey Organic Geochemistry Study (Isaacs 1992) zur Verfügung gestellten Öle stammen aus dem landwärtigen Teil des in der kalifornischen Küstenebene gelegenen Santa Maria-Beckens, in dem sich eine Vielzahl von Erdölfeldern befindet (Abb. 6.3.4.1).

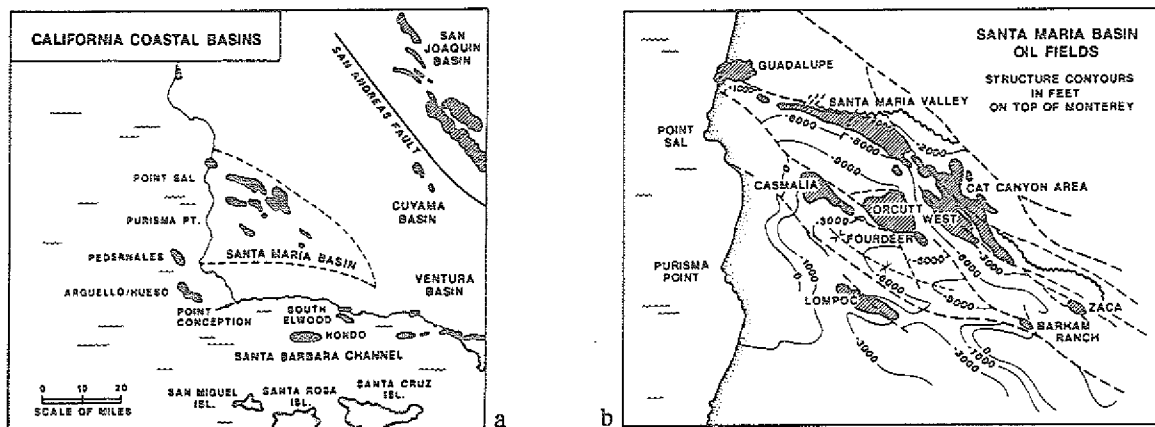


Abb. 6.3.4.1: Kalifornische Küstenbecken und ihre Ölfelder (a), Santa Maria-Becken mit den Ölfeldern im onshore-Bereich (b) (nach Orr 1986).

Die Probenserie besteht aus drei Ölen, einem nicht biodegradierten und zwei mäßig biodegradierten. Das nicht biodegradierte Öl wurde im Four Deer-Ölfeld aus der Bohrung Berwood Flores 1 gefördert. Die Teufe beträgt 5998 Fuß. Die beiden mäßig biodegradierten Öle A und B kommen aus dem Orcutt-Feld, einem der größten dieses Gebiets. Das Öl A wurde aus der Bohrung Union Newlove 73 in einer Teufe von 3853 Fuß gewonnen und das Öl B aus der Bohrung Union Squires 4 in einer Teufe von 3140 Fuß. Als Muttergestein beider Ölfelder gilt die miozäne Monterey-Formation. Sowohl das Four Deer-Feld als auch das Orcutt-Feld repräsentieren Ölfelder in einer Antiklinalstruktur (Isaacs 1992). Die geologische Situation des Orcutt-Feldes ist aus dem N-S Profil durch den zentralen Teil des Santa Maria-Beckens zu erkennen (Abb. 6.3.4.2).

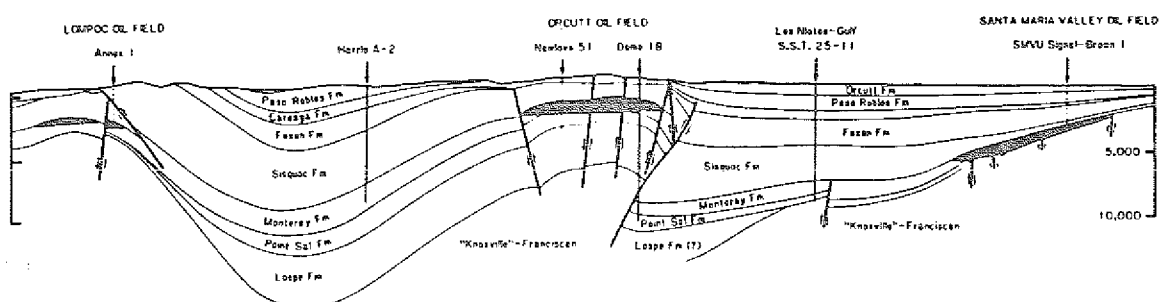


Abb. 6.3.4.2: Profil (N-S) durch den zentralen Bereich des Santa Maria-Beckens (nach Isaacs 1992).

Nähere Einzelheiten zur Geologie des Santa Maria-Beckens und der verschiedenen Ölfelder, aber auch zur Erdölförderung finden sich in California Division of Oil and Gas (1991) und Isaacs (1992).

In Abbildung 6.3.4.3 ist das Gaschromatogramm des nicht biodegradierten Öls dargestellt. Es zeichnete sich durch eine sehr breite *n*-Alkan-Verteilung aus, die Verbindungen mit bis zu 37 Kohlenstoffatomen enthielt. Wie aus dem Verhältnis der Konzentrationen von Pristan und Phytan zu *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈ hervorging, waren die Gehalte der einzelnen *n*-Alkane jedoch nicht besonders hoch. Infolgedessen waren auch die Konzentrationen der aromatischen Verbindungen gering und nicht so hoch, wie es auf den ersten Blick erscheinen mag. Die Biomarker waren nicht angegriffen.

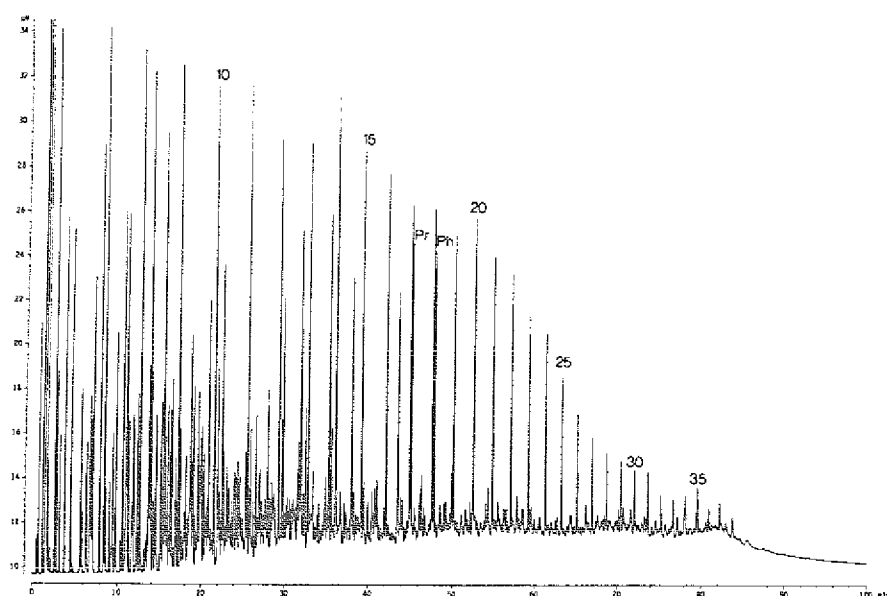


Abb. 6.3.4.3: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des nicht biodegradierten Monterey-Öls.

Eines der mäßig degradierten Öle (Stufe 5) enthielt fast ausschließlich kurzkettige *n*-Alkane und Aromaten in einem entsprechenden Retentionszeitbereich (Abb. 6.3.4.4). Isoprenoide waren nur noch in Spuren vorhanden. Die Biomarker zeigten keinerlei Veränderungen, die als Abbau hätten bezeichnet werden können.

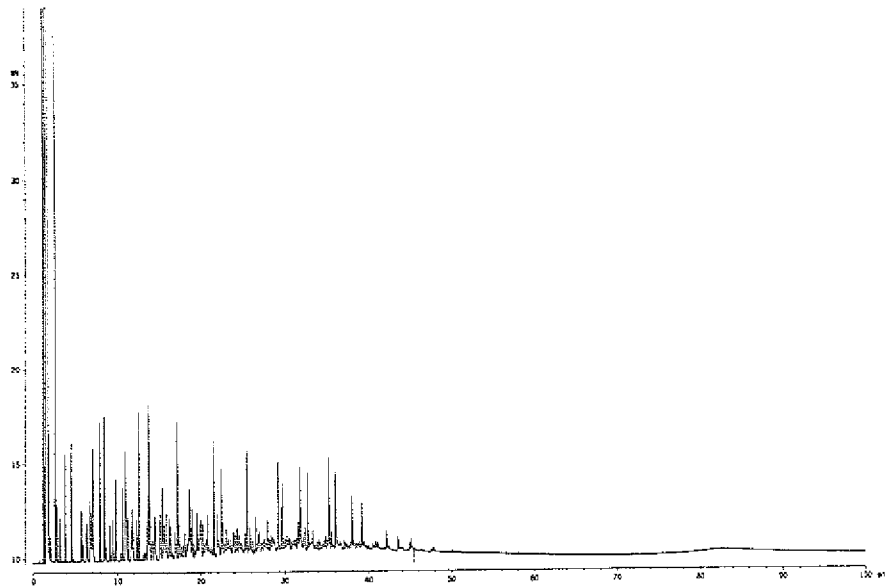


Abb. 6.3.4.4: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des mäßig biodegradierten Monterey-Öls A (Biodegradations-Stufe 5).

Es waren wohl im wesentlichen aromatische Verbindungen und Isoprenoide, die bei der gaschromatographischen Analyse des dritten Öls im Chromatogramm erkennbar waren (Abb. 6.3.4.5). *n*-Alkane fehlten völlig. Auch in diesem Öl hatten die Biomarker eine normale Verteilung. Die Biodegradationsstufe war ebenfalls mit 5 anzugeben.

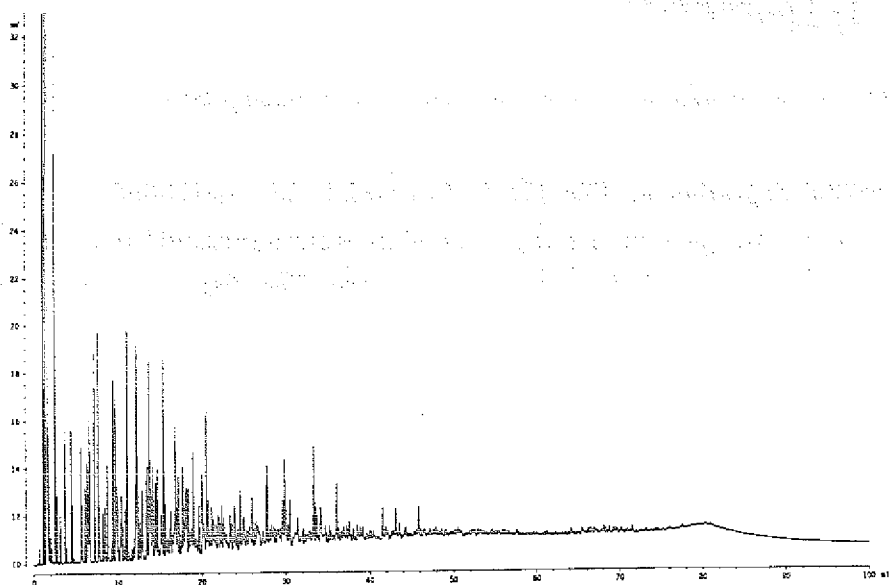


Abb. 6.3.4.5: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des mäßig biodegradierten Monterey-Öls B (Biodegradations-Stufe 5).

Freie Carbonsäuren

Das Säurespektrum des nicht biodegradierten Öls bestand aus geradkettigen, einfach und mehrfach verzweigten sowie tricyclischen Carbonsäuren. Die geradkettigen Säuren eluierten in breiter Verteilung zwischen $C_{8:0}$ -Säure und $C_{30:0}$ -Säure und zeigten ein Maximum bei $C_{16:0}$ -Säure (Abb. 6.3.4.6). Dabei erreichten die geradzahligten Homologe generell höhere Konzentrationen als die ungeradzahligten. Ungesättigte Verbindungen konnten mit Ausnahme von $C_{18:1}$ -Säure nicht beobachtet werden. Einfach verzweigte 2-Methylcarbonsäuren bildeten eine den *n*-Fettsäuren hinsichtlich des Elutionsbereichs vergleichbare homologe Reihe, deren Gesamtkonzentration jedoch erheblich niedriger lag. Ein ausgeprägtes Maximum wies diese Verteilung nicht auf. Mit 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15:0}$ -Carbonsäure und 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Carbonsäure konnten daneben auch mehrfach verzweigte *isoprenoid*-Carbonsäuren nachgewiesen werden. Die tricyclischen Terpansäuren waren durch Isomere von C_{21} - und C_{24} -Säure vertreten.

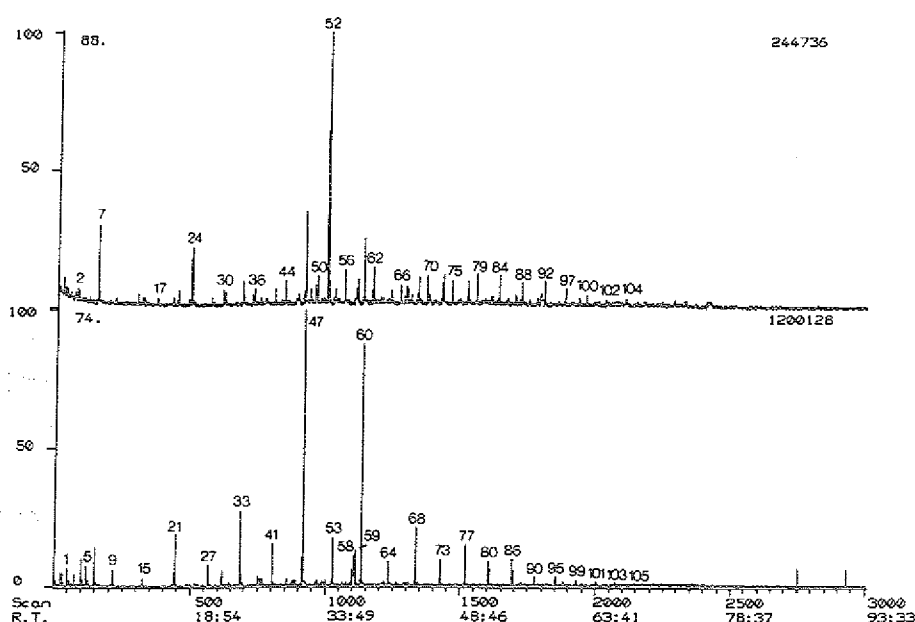


Abb. 6.3.4.6: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des nicht biodegradierten Monterey-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 5: Nonancarbonsäuremethylester, 7: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 9: Decancarbonsäuremethylester, 15: Undecancarbonsäuremethylester, 17: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 21: Dodeancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methyldodeancarbonsäuremethylester, 27: Trideancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methyltrideancarbonsäuremethylester, 33: Tetradeancarbonsäuremethylester, 36: 2-Methyltetradeancarbonsäuremethylester, 41: Pentadeancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methylpentadeancarbonsäuremethylester, 47: Hexadeancarbonsäuremethylester, 50: 2-Methylhexadeancarbonsäuremethylester, 52: 2,6,10,14-Tetramethylpentadeancarbonsäuremethylester, 53: Heptadeancarbonsäuremethylester, 56: 2-Methylheptadeancarbonsäuremethylester, 58: Octadeancarbonsäuremethylester, 59: 3,7,11,15-Tetramethylhexadeancarbonsäuremethylester, 60: Octadeancarbonsäuremethylester, 62: 2-Methyloctadeancarbonsäure-

methylester, 64: Nonadecancarbonsäuremethylester, 66: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 68: Eicosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 73: Heneicosancarbonsäuremethylester, 75: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 77: Docosancarbonsäuremethylester, 79: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 80: Tricosancarbonsäuremethylester, 84: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 86: Tetracosancarbonsäuremethylester, 88: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 90: Pentacosancarbonsäuremethylester, 92: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 95: Hexacosancarbonsäuremethylester, 97: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 99: Heptacosancarbonsäuremethylester, 100: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 101: Octacosancarbonsäuremethylester, 102: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 103: Nonacosancarbonsäuremethylester, 104: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 105: Triacontancarbonsäuremethylester).

Die Säureverteilung des mäßig degradierten Öls A wurde sehr stark von methylverzweigten Carbonsäuren geprägt, die zum Teil erheblich höhere Konzentrationen erreichten als die geradkettigen Säuren (Abb. 6.3.4.7). Daneben konnten *isoprenoid*-Carbonsäuren sowie tricyclische und pentacyclische Terpensäuren nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der geradkettigen Säuren waren im Vergleich zur unbiodegradierten Ölprobe bei nahezu unveränderter Verteilung deutlich zurückgegangen und lagen nur noch in der Größenordnung der 2-Methylcarbonsäuren. Diese präsentierten sich fast unverändert und wiesen nur geringfügig niedrigere Konzentrationen auf. Bei den einfach verzweigten Säuren ließen sich darüber hinaus mehrere Spezies unterscheiden, deren Verteilung aus dem Massenchromatogramm des Fragmentions der Masse m/z 74 zu ersehen ist. Standards standen nicht zur Verfügung, so daß die Identifizierung dieser Substanzen ausschließlich aufgrund der Fragmentierungsmuster und der relativen Retentionszeiten vorgenommen wurde. Als dominierende Verbindungen traten 3-Methylcarbonsäuren auf, die eine homologe Reihe von 3-Methyl- $C_{10:0}$ -Carbonsäure bis 3-Methyl- $C_{26:0}$ -Carbonsäure bildeten. Daneben eluierten einige Substanzen, die sich durch einen Basispeak der Masse m/z 74 und ein Fragmention der Masse m/z 115 auszeichneten. Sie wurden als 4-Methylcarbonsäuren bestimmt, waren auf den Bereich zwischen 4-Methyl- $C_{11:0}$ -Carbonsäure und 4-Methyl- $C_{17:0}$ -Carbonsäure beschränkt und wiesen nur geringe Gehalte auf. In höherer Konzentration ließ sich eine Reihe homologer Verbindungen beobachten, die ebenso wie die 3-Methylcarbonsäuren fast den gesamten Elutionsbereich abdeckten und bei der massenspektrometrischen Fragmentierung neben dem Basispeak der Masse m/z 74 ein um 14 u höheres Fragmention als das für 4-Methylcarbonsäuren charakteristische ergaben. Vermutlich handelt es sich dabei um 5-Methylcarbonsäuren. Der eindeutige Nachweis *isoprenoider* Carbonsäuren gelang mit 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Carbonsäure, 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15:0}$ -Carbonsäure und 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Carbonsäure. Bei den cyclischen Säuren war es im Laufe der Biodegradation ebenfalls zu Veränderungen gekommen. Im Gegensatz zum nicht biodegradierten Öl konnten in dieser Probe sowohl tricyclische als auch pentacyclische Terpancarbonsäuren nachgewiesen werden. Charakteristisch für diese beiden Substanzklassen ist ein Fragmention der Masse m/z 191

(Abb. 6.3.4.8). Die tricyclischen Säuren waren mit je zwei Isomeren von C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Säure vertreten. Von diesen erreichten die C_{21} - und C_{24} -Säuren relativ hohe Konzentrationen, die erheblich über denen der Hopancarbonsäuren lagen. Die C_{26} -Isomere wiesen im Gegensatz dazu nur geringe Konzentrationen auf. Bei den Hopancarbonsäuren wurden Isomere von C_{30} -, C_{31} - und C_{32} -Carbonsäure mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration nachgewiesen.

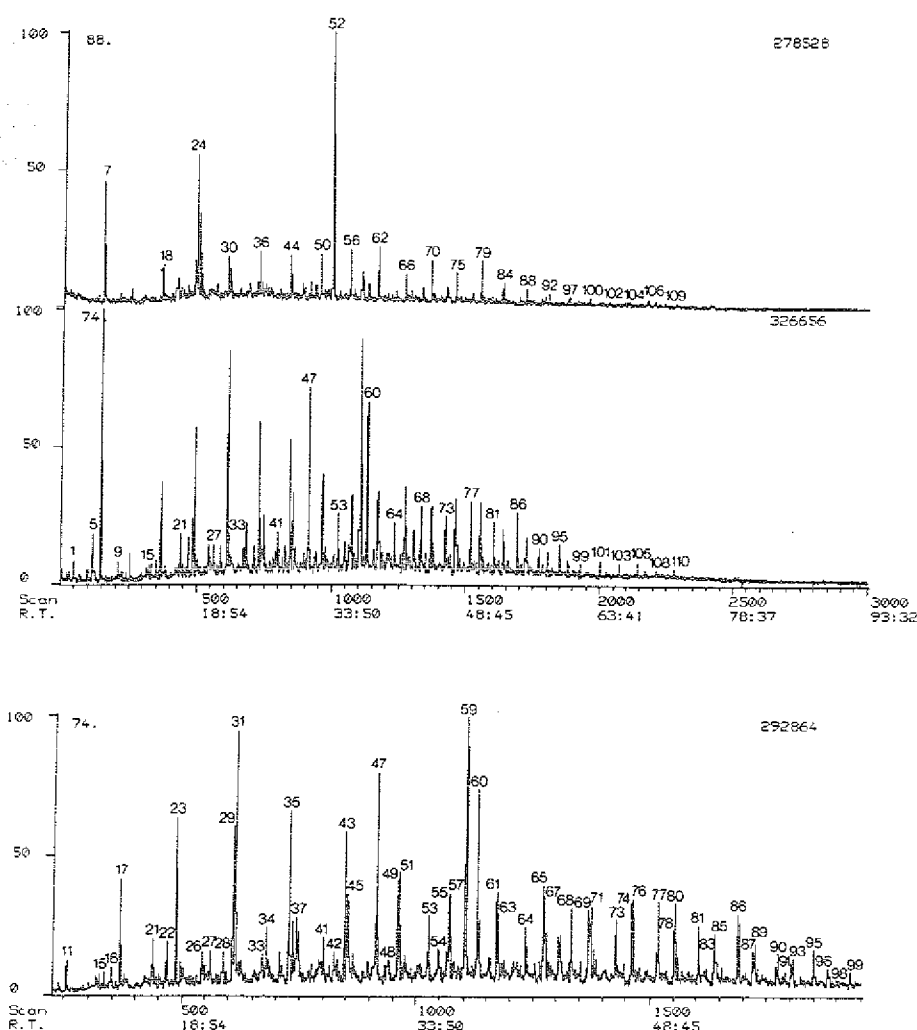


Abb. 6.3.4.7: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) mit vergrößertem Ausschnitt (freie Säuren des mäßig biodegradierten Monterey-Öls A, Biodegradations-Stufe 5)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 5: Nonancarbonsäuremethylester, 7: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 9: Decancarbonsäuremethylester, 11: 3-Methyldecancarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 15: Undecancarbonsäuremethylester, 16: 4-Methylundecancarbonsäuremethylester, 17: 3-Methylundecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 21: Dodecancarbonsäuremethylester, 22: 4-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 23: 3-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 26: *anteiso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 27: Tridecancarbonsäuremethylester, 28: 4-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 29: 3-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 31: 3,7,11-Trimethyl-

dodecancarbonsäuremethylester, 33: Tetradecancarbonsäuremethylester, 34: 4-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 35: 3-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 36: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 37: 5-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 41: Pentadecancarbonsäuremethylester, 42: 4-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 43: 3-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 45: 5-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 47: Hexadecancarbonsäuremethylester, 48: 4-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 49: 3-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 50: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 51: 5-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 52: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 53: Heptadecancarbonsäuremethylester, 54: 4-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 55: 3-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 56: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 57: 5-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 59: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 60: Octadecancarbonsäuremethylester, 61: 3-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 62: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 63: 5-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 64: Nonadecancarbonsäuremethylester, 65: 3-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 66: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 67: 5-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 68: Eicosancarbonsäuremethylester, 69: 3-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 71: 5-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 73: Heneicosancarbonsäuremethylester, 74: 3-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 75: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 76: 5-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 77: Docosancarbonsäuremethylester, 78: 3-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 79: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 80: 5-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 81: Tricosancarbonsäuremethylester, 83: 3-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 84: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 85: 5-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 86: Tetracosancarbonsäuremethylester, 87: 3-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 88: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 89: 5-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 90: Pentacosancarbonsäuremethylester, 91: 3-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 92: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 93: 5-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 95: Hexacosancarbonsäuremethylester, 96: 3-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 97: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 98: 5-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 99: Heptacosancarbonsäuremethylester, 100: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 101: Octacosancarbonsäuremethylester, 102: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 103: Nonacosancarbonsäuremethylester, 104: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 105: Triacontanocarbonsäuremethylester, 106: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 108: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 109: 2-Methylhentriacontancarbonsäuremethylester, 110: Dotriacontancarbonsäuremethylester).

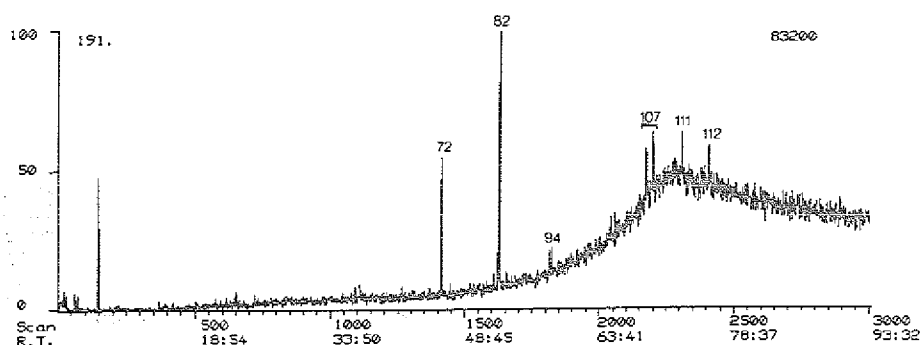


Abb. 6.3.4.8: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für tricyclische und pentacyclische Terpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des mäßig biodegradierten Monterey-Öls A, Biodegradations-Stufe 5)

(72: tricyclischer C_{21} -Carbonsäuremethylester, 82: tricyclischer C_{24} -Carbonsäuremethylester, 94: tricyclischer C_{26} -Carbonsäuremethylester, 107: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 111: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 112: $17\alpha,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester).

In der Säurefraktion des mäßig degradierten Öls B der Biodegradations-Stufe 5 konnten nur *n*-Carbonsäuren und Terpansäuren nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der Fettsäuren waren so stark zurückgegangen, daß sich außer C_{16:0}- und C_{18:0}-Carbonsäure keine weiteren Substanzen identifizieren ließen. Bei den Terpansäuren eluierten sowohl tricyclische als auch pentacyclische Verbindungen. Im Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions der Masse *m/z* 191 dominierten die Isomere der tricyclischen C₂₄-Säure. Daneben ließen sich Isomere der tricyclischen C₂₁- und C₂₆-Säure sowie der C₃₀-Hopancarbonsäure mit 17 α ,21 β -Konfiguration beobachten.

Gebundene Carbonsäuren

Trotz zunehmender Biodegradation innerhalb der Probensequenz dieser vier Öle, die mit einer zunehmenden Komplexität bei den freien Säuren korrelierte, waren die gebundenen Säuren in allen vier Proben nahezu identisch. Das Säurespektrum umfaßte neben geradkettigen auch einfach und mehrfach verzweigte Carbonsäuren. Differenzen bestanden lediglich hinsichtlich der Relativkonzentrationen der Substanzen.

Das nicht biodegradierte Öl enthielt eine homologe Reihe geradkettiger Säuren, die von C_{8:0}-Säure bis C_{24:0}-Säure reichte und sich durch erhöhte Relativkonzentrationen der geradzahigen Verbindungen auszeichnete (Abb. 6.3.4.9). Die Verteilung zeigte kein ausgeprägtes Maximum, vielmehr wiesen alle Verbindungen im Bereich zwischen C_{8:0}-Carbonsäure und C_{18:0}-Carbonsäure mit Ausnahme von C_{17:0}-Carbonsäure relativ hohe Konzentrationen auf. Einfach verzweigte Säuren waren durch *iso*- und *anteiso*-Säuren sowie durch 2-Methylcarbonsäuren vertreten. *Iso*- und *anteiso*-Säuren ergeben bei der massenspektrometrischen Fragmentierung ein Fragmention der Masse *m/z* 74, ihre Verteilung ist demzufolge aus dem Massenchromatogramm dieses Ions zu entnehmen. Während die *iso*-Carbonsäuren von *iso*-C_{9:0}-Carbonsäure bis *iso*-C_{16:0}-Carbonsäure nachgewiesen werden konnten, ließen sich bei den *anteiso*-Carbonsäuren nur die ungeradzahigen Homologe identifizieren. Die Verteilung der 2-Methylcarbonsäuren ist aus dem Massenchromatogramm der Masse *m/z* 88 (Abb. 6.3.4.9) zu ersehen. Sie eluierten mit zahlreichen Homologen zwischen 2-Methyl-C_{8:0}-Carbonsäure und 2-Methyl-C_{15:0}-Carbonsäure, das Maximum lag bei 2-Methyl-C_{12:0}-Carbonsäure. Daneben konnten *isoprenoid*-Carbonsäuren beobachtet werden, die, abgesehen von Pristan- und Phytansäure, beträchtliche Konzentrationen erreichten.

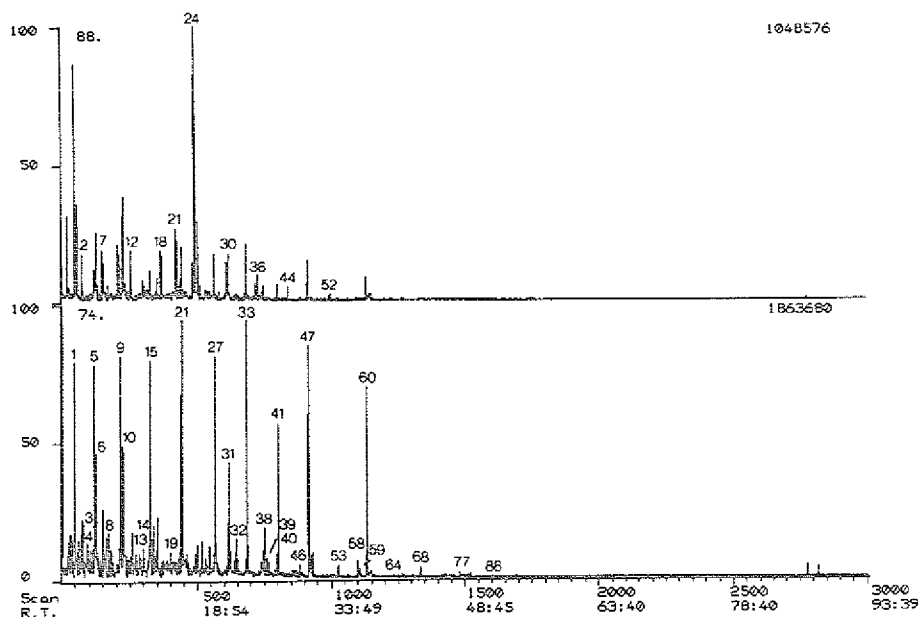


Abb. 6.3.4.9: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des nicht biodegradierten Monterey-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 3: *iso*-Nonancarbonsäuremethylester, 4: *anteiso*-Nonancarbonsäuremethylester, 5: Nonancarbonsäuremethylester, 6: 3,7-Dimethyloctancarbonsäuremethylester, 7: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 8: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 9: Decancarbonsäuremethylester, 10: 3,7-Dimethylnonancarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 13: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 14: *anteiso*-Undecancarbonsäuremethylester, 15: Undecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 19: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 20: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 21: Dodecancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 25: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 26: *anteiso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 27: Tridecancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 31: 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäuremethylester, 32: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 33: Tetradecancarbonsäuremethylester, 36: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 38: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 39: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 40: *anteiso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 41: Pentadecancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 46: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 47: Hexadecancarbonsäuremethylester, 52: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 53: Heptadecancarbonsäuremethylester, 58: Octadecancarbonsäuremethylester, 59: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 60: Octadecancarbonsäuremethylester, 64: Nonadecancarbonsäuremethylester, 68: Eicosancarbonsäuremethylester, 77: Docosancarbonsäuremethylester, 86: Tetracosancarbonsäuremethylester).

Mit steigender Degradationsintensität war dann ein starker Konzentrationsrückgang zu verzeichnen, der die beiden Proben der Degradations-Stufe 5 in gleichem Maße erfaßte und sich insbesondere im niedermolekularen Bereich auswirkte. Gleichzeitig verloren die geradzahligen *n*-Alkansäuren ihre Dominanz (Abb. 6.3.4.10). Die Verteilung der 2-Methylcarbonsäuren war demgegenüber konstant geblieben.

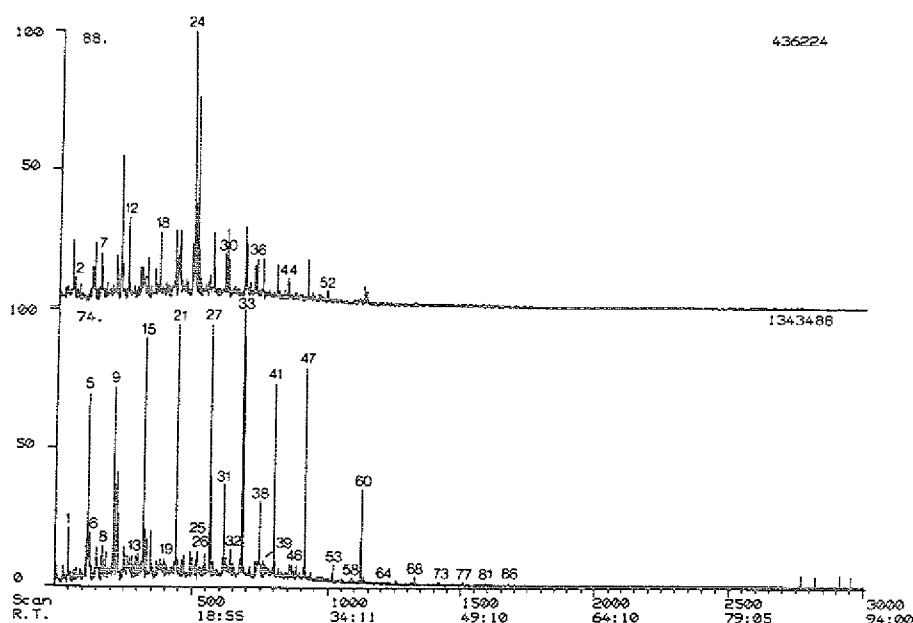


Abb. 6.3.4.10: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des mäßig biodegradierten Monterey-Öls B, Biodegradations-Stufe 5)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 5: Nonancarbonsäuremethylester, 6: 3,7-Dimethyloctancarbonsäuremethylester, 7: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 8: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 9: Decancarbonsäuremethylester, 10: 3,7-Dimethylnonancarbonsäuremethylester, 12: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 13: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 15: Undecancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 19: *iso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 21: Dodecancarbonsäuremethylester, 24: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 25: *iso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 26: *anteiso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 27: Tridecancarbonsäuremethylester, 30: 2-Methyltridecancarbonsäuremethylester, 31: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 32: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 33: Tetradecancarbonsäuremethylester, 36: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 38: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 39: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 41: Pentadecancarbonsäuremethylester, 44: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 46: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 47: Hexadecancarbonsäuremethylester, 52: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 53: Heptadecancarbonsäuremethylester, 58: Octadecancarbonsäuremethylester, 60: Octadecancarbonsäuremethylester, 66: Nonadecancarbonsäuremethylester, 68: Eicosancarbonsäuremethylester, 73: Heneicosancarbonsäuremethylester, 77: Docosancarbonsäuremethylester, 81: Tricosancarbonsäuremethylester, 86: Tetracosancarbonsäuremethylester).

Alkohole

In allen vier Ölen war es nicht möglich, Alkohole anhand der charakteristischen Spur m/z 75 nachzuweisen. Durch Anfertigung von Massenchromatogrammen ausgewählter Fragmentationen der in den Bell Creek-Ölen gefundenen Verbindungen gelang es jedoch, auch in dieser Probenreihe "hydratisierte" Aromaten zu identifizieren. Wie aus den in Ab-

bildung 6.3.4.11 dargestellten Massenchromatogrammen zu entnehmen ist, handelte es sich um hydratisiertes Phenanthren, Isomere von hydratisierten Methyl- und Dimethylphenanthrenen, Isomere von hydratisierten Methyl- und Dimethylfluorenen und hydratisiertem Chrysen. Im Gegensatz zu den Bell Creek-Ölen konnte bei diesen Proben keine Veränderung der Alkoholfraktion in Abhängigkeit von der Biodegradationsintensität festgestellt werden. Möglicherweise ist dies ein Anzeichen dafür, daß die hier analysierten Öle alle biodegradiert sind, auch das als nicht biodegradiert eingestufte.

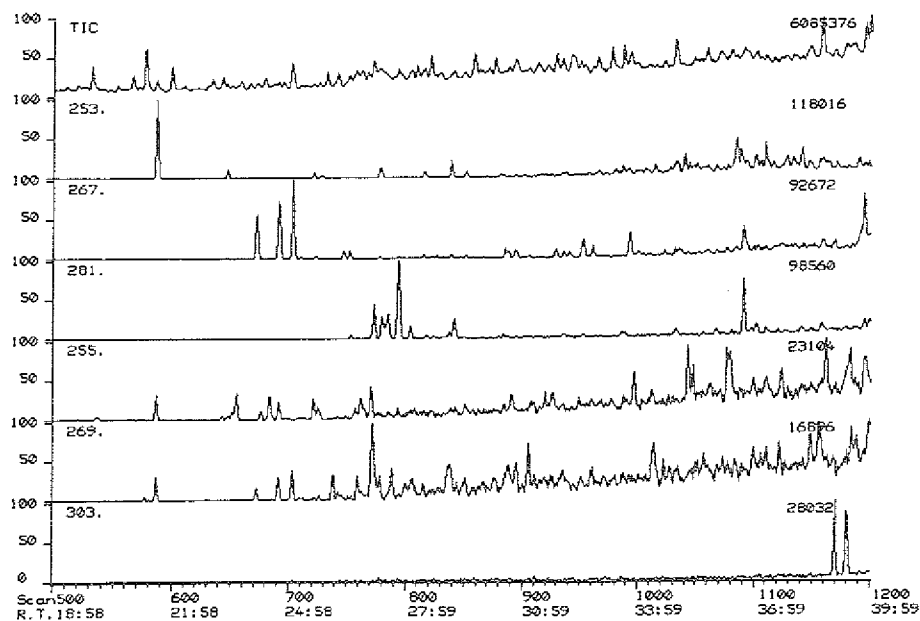


Abb. 6.3.4.11: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für hydratisiertes Phenanthren (m/z 253), hydratisierte Methylphenanthrene (m/z 267), hydratisierte Dimethylphenanthrene (m/z 281), hydratisierte Methylfluorene (m/z 255), hydratisierte Dimethylfluorene (m/z 269) und hydratisierte Chrysene (m/z 303).

Ebenso wie bei den Bell Creek-Ölen wurden auch in diesen Proben keine Phytanole gefunden, obwohl Phytan in relativ großer Konzentration vorhanden war und die Bildung von Phytanolen nach den Ergebnissen der Versuche mit Reinsubstanzen ohne weiteres möglich gewesen wäre.

6.3.5 Viking-Graben (Nordsee)

Die drei untersuchten Öle stammen aus dem Viking-Graben, dem neben dem Zentral-Graben größten produktiven Becken der nördlichen Nordsee (Abb. 6.3.5.1).

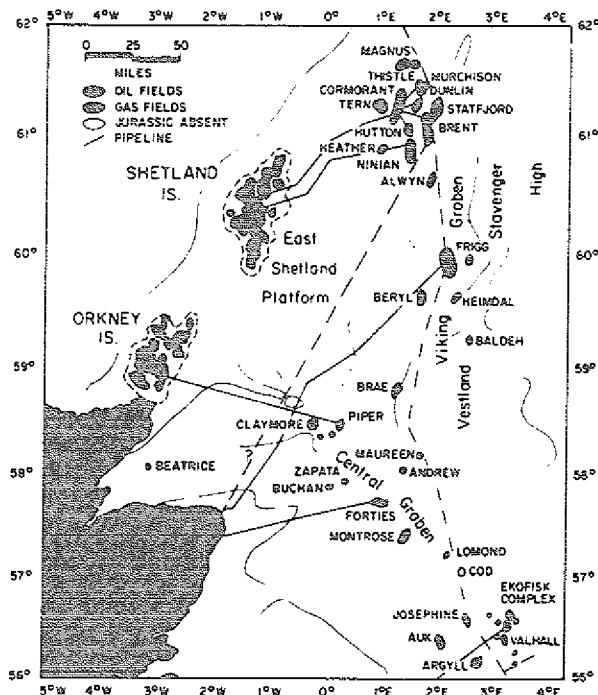


Abb. 6.3.5.1: Erdölprovinzen in der nördlichen Nordsee (Williams 1978).

Das nicht biodegradierte Öl wurde im Statfjord-Ölfeld aus einem Teufenbereich von 2489-2493 m gefördert. Das Alter des Reservoirgesteins wurde als mittelljurassisch (Bathonien) bestimmt. Das leicht biodegradierte Öl ist einem Teufenbereich von 1778-1792 m zuzuordnen, weitere Bohrungsangaben liegen nicht vor. Informationen über das stark biodegradierte Öl fehlen völlig.

Die Abbildung 6.3.5.2 zeigt das Gesamtöl-Gaschromatogramm eines nicht biodegradierten Öls, das in erster Linie aus geradkettigen gesättigten Kohlenwasserstoffen bestand, die eine Kettenlänge von 35 Kohlenstoffatomen erreichten. Das Maximum der Verteilung lag im Bereich von $n\text{-C}_7$ und $n\text{-C}_8$, wurde jedoch nicht von aliphatischen, sondern vermutlich von aromatischen Verbindungen gebildet. Das Verhältnis der Konzentrationen der *isoprenoid*-Kohlenwasserstoffe Pristan und Phytan zu $n\text{-C}_{17}$ und $n\text{-C}_{18}$ gab einen zusätzlichen Hinweis darauf, daß dieses Öl nicht biodegradiert ist. Die Biomarker besaßen eine normale Verteilung.

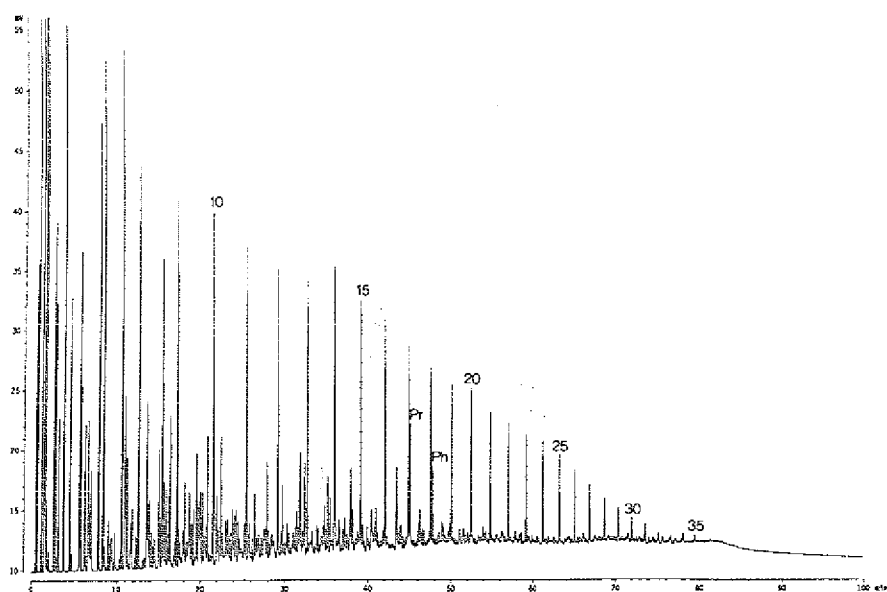


Abb. 6.3.5.2: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des nicht biodegradierten Nordsee-Öls.

Infolge des mikrobiellen Abbaus hatte die Konzentration der *n*-Alkane so weit abgenommen, daß sie gegenüber den verzweigten, den cyclischen und aromatischen Verbindungen ihre dominierende Position verloren (Abb. 6.3.5.3). Weitere Anzeichen einer Biodegradation waren die hohen Gehalte an Isoprenoiden und die Bildung eines unaufgelösten komplexen Gemisches. Da die Biomarker keinerlei Veränderung erfahren hatten, wurde dieses Öl nur als leicht biodegradiert eingestuft (Stufe 3).

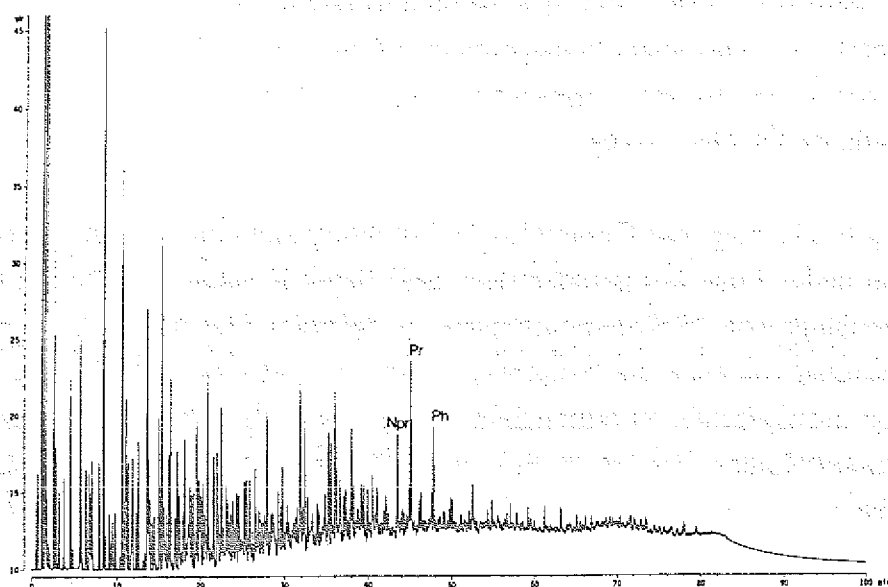


Abb. 6.3.5.3: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Nordsee-Öls (Biodegradations-Stufe 3).

Das dritte Öl dieser Probensequenz bestand nur noch aus einem unaufgelösten komplexen Gemisch, die Identifizierung einzelner Substanzen war nicht mehr möglich (Abb. 6.3.5.4). Bei den Biomarkern ließ sich eine beginnende Degradation der Sterane verzeichnen, während sich die Hopane in unveränderter Verteilung präsentierten. In dieser Probe war der Abbau schon so weit fortgeschritten, daß ein Stadium starker Biodegradation (Stufe 6) erreicht wurde.

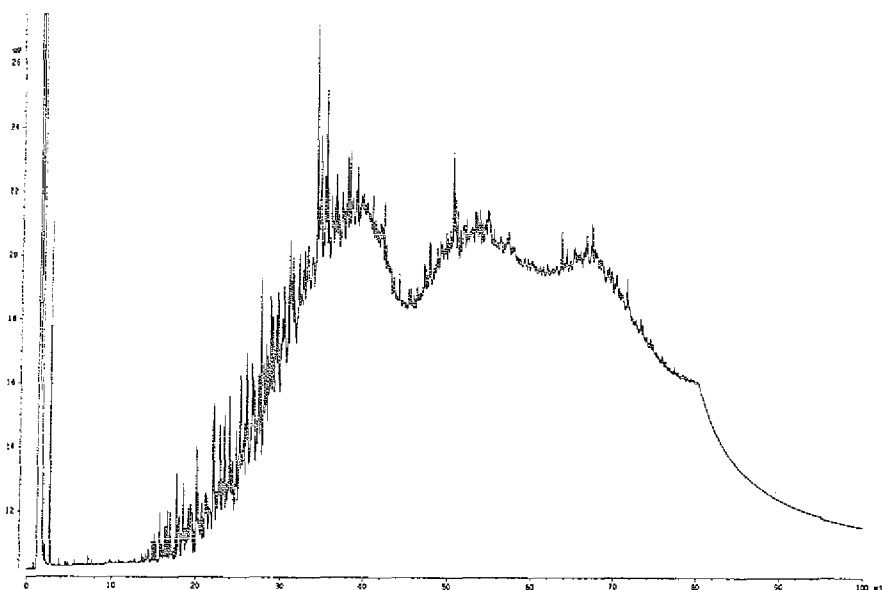


Abb. 6.3.5.4: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des stark biodegradierten Nordsee-Öls (Biodegradations-Stufe 6).

Freie Säuren

Das nicht biodegradierte Nordsee-Öl enthielt nicht nur geradkettige, sondern auch verzweigte und pentacyclische Carbonsäuren. Die breite *n*-Alkan-Verteilung war mit einer homologen Reihe geradkettiger, ausschließlich gesättigter Säuren korreliert, die zwar einen entsprechenden Kohlenstoffzahl-Bereich abdeckte, hinsichtlich der Konzentrationen der einzelnen Verbindungen zueinander jedoch keine Übereinstimmung zeigte (Abb. 6.3.5.5). Geradzahlige Homologe lagen generell in höheren Konzentrationen vor als die ungeradzahligen und stellten mit $C_{12:0}$, $C_{16:0}$ und $C_{18:0}$ -Säure die Hauptkomponenten. Daneben eluierten einfach verzweigte 2-Methylcarbonsäuren in vergleichbarer breiter Verteilung, die jedoch kein Maximum und insgesamt erheblich niedrigere Rela-

tivkonzentrationen als die entsprechenden *n*-Fettsäuren aufwies. Mehrfach verzweigte *isoprenoid*-Carbonsäuren waren nur durch Pristan- und Phytansäure vertreten, deren Gehalte in der Größenordnung der längeren geradkettigen Säuren lagen. Im Gegensatz zu geradkettigen und verzweigten Carbonsäuren kamen pentacyclische Säuren nur in extrem geringen Konzentrationen vor. Als wichtigste Verbindungen erschienen C_{30} - C_{32} Säuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration (Abb. 6.3.5.6).

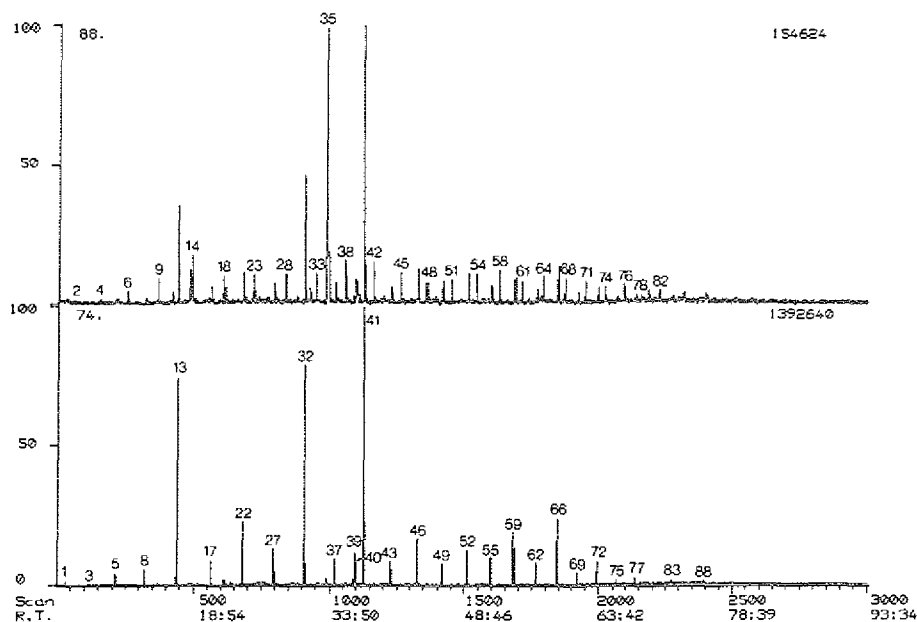


Abb. 6.3.5.5: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des nicht biodegradierten Nordsee-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecanocarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecanocarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodecanocarbonsäuremethylester, 17: Tridecanocarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltridecanocarbonsäuremethylester, 22: Tetradecancarbonsäuremethylester, 23: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 27: Pentadecancarbonsäuremethylester, 28: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 32: Hexadecancarbonsäuremethylester, 33: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 35: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 37: Heptadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 40: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 41: Octadecancarbonsäuremethylester, 42: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 45: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 48: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 49: Heneicosancarbonsäuremethylester, 51: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 52: Docosancarbonsäuremethylester, 54: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 55: Tricosancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 59: Tetracosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 62: Pentacosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 66: Hexacosancarbonsäuremethylester, 68: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 69: Heptacosancarbonsäuremethylester, 71: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 72: Octacosancarbonsäuremethylester, 74: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 75: Nonacosancarbonsäuremethylester, 76: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 77: Triacontancarbonsäuremethylester, 83: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 88: Tetratriacontancarbonsäuremethylester).

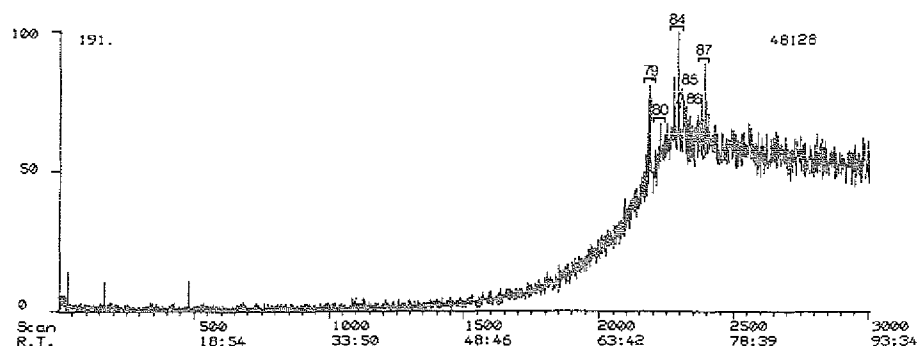


Abb. 6.3.5.6: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für pentacyclische Terpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des nicht biodegradierten Nordsee Öls)
(79: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 80: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 84: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 85: $17\beta,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 86: $17\beta,21\alpha$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 87: $17\alpha,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester).

Das leicht degradierte Öl zeigte nicht nur mehr Substanzklassen als das nicht biodegradierte, sondern hatte zudem einen höheren Säuregehalt. Auch in dieser Probe dominierten die *n*-Carbonsäuren (Abb. 6.3.5.7). Bei nahezu identischem Verteilungsmuster wiesen sie jedoch deutlich höhere Relativkonzentrationen auf als im nicht biodegradierten Öl. Daneben eluierte eine Vielzahl verzweigter Verbindungen. Dies waren zum einen einfach verzweigte *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren, bei denen sich die Methylverzweigung am ω -ständigen Ende des Moleküls an den Positionen $\omega-1$ bzw. $\omega-2$ befindet, so daß sie daher bei der massenspektrometrischen Fragmentierung ebenso wie die *n*-Carbonsäuren einen Basispeak der Masse m/z 74 ergeben. Im Gegensatz zu diesen konnten *iso*- und *anteiso*-Säuren nicht im gesamten Elutionsbereich nachgewiesen werden, sondern waren auf den Kohlenstoffzahl-Bereich zwischen C_{12} und C_{19} beschränkt. Um einfach verzweigte Säuren handelt es sich auch bei den 2-Methylcarbonsäuren. Da bei diesen die beiden Kohlenstoffatome, die Methylgruppe und Säurerest tragen, unmittelbar benachbart sind, entsteht durch Bindungsspaltung zwischen den Bindungen an C-2 und C-3 ein Basispeak der Masse m/z 88. Das Massenchromatogramm dieses für 2-Methylcarbonsäuren charakteristischen Ions ist ebenfalls in Abbildung 6.3.5.7 dargestellt. Die Verteilung bot insgesamt ein differenzierteres Bild als in der nicht biodegradierten Probe. Es gibt vermutlich mehrere Serien dieser Säuren, deren Strukturunterschiede aus den Massenspektren jedoch nicht abzuleiten sind. So traten neben den auch im nicht biodegradierten Öl nachgewiesenen Säuren, für die neben dem Basispeak m/z 88 ein Fragmention der Masse m/z 101 charakteristisch ist, auch solche Verbindungen auf, die nur den Basispeak, aber kein weiteres charakteristisches Fragmention zeigten. Zum anderen konnte neben 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäure und 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäure eine Reihe mehrfach verzweigter *isoprenoid*-Säuren identifiziert werden, die vor allem im höhermolekularen Bereich den *n*-Carbonsäuren vergleichbare Konzentra-

tionen erreichten. Auch bei den cyclischen Säuren war es im Zuge der Biodegradation zu Veränderungen gekommen. Die Hopancarbonsäuren hatten an Konzentration erheblich zugenommen und deckten mit allen drei Isomerenreihen einen größeren Elutionsbereich ab als im nicht biodegradierten Öl (Abb. 6.3.5.8). C_{30} - C_{32} Hopancarbonsäuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration hatten ihre dominierende Position behalten, in beträchtlicher Konzentration kam die C_{32} Hopancarbonsäure mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration hinzu. Außerdem traten in dieser Probe tricyclische Terpancarbonsäuren auf. Es konnten Isomere von C_{24} - und C_{26} -Säure nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der C_{24} -Isomere waren annähernd gleich hoch und lagen erheblich über denen der Hopancarbonsäuren. Die C_{26} -Isomere wiesen im Gegensatz dazu große Konzentrationsunterschiede auf, waren den Hopansäuren konzentrationsmäßig aber dennoch vergleichbar.

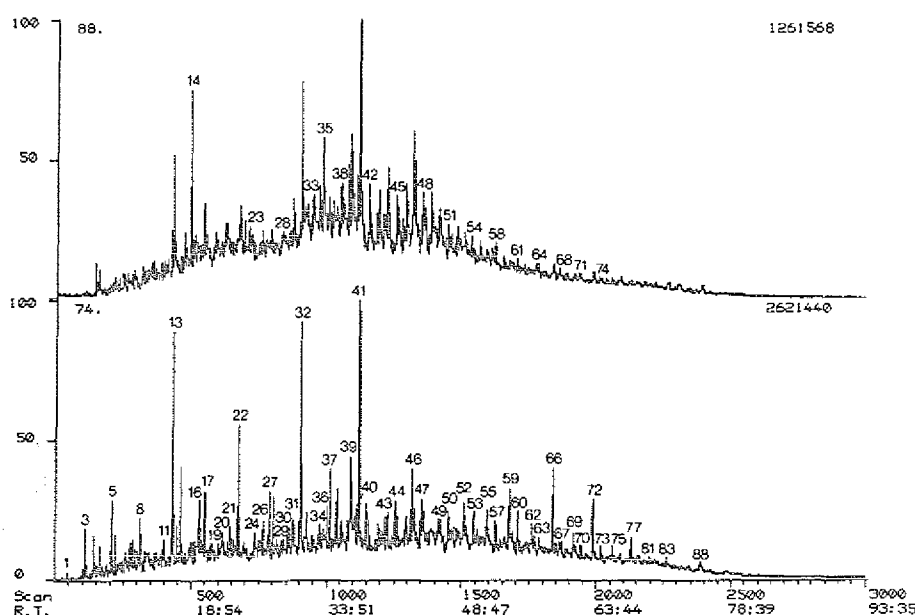


Abb. 6.3.5.7: Massenchromatogramm der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren und *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht biodegradierten Nordsee-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 11: *anteiso*-Dodecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecancarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodecancarbonsäuremethylester, 16: *anteiso*-Tridecancarbonsäuremethylester, 17: Tridecancarbonsäuremethylester, 19: 3,7,11-Trimethyldodecancarbonsäuremethylester, 20: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 21: *anteiso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 22: Tetradecancarbonsäuremethylester, 23: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 24: 3,7,11-Trimethyltridecancarbonsäuremethylester, 26: *anteiso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 27: Pentadecancarbonsäuremethylester, 28: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 29: 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäuremethylester, 30: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 31: *anteiso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 32: Hexadecancarbonsäuremethylester, 33: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 35: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 36: *anteiso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 37: Heptadecancarbonsäuremethylester, 38: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 39: Octadecancarbonsäuremethylester, 40: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 41: Octadecancarbonsäuremethylester, 42:

2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 44: 3-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 45: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 47: 3-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 48: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 49: Heneicosancarbonsäuremethylester, 50: 3-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 51: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 52: Docosancarbonsäuremethylester, 53: 3-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 54: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 55: Tricosancarbonsäuremethylester, 57: 3-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 58: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 59: Tetracosancarbonsäuremethylester, 60: 3-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 62: Pentacosancarbonsäuremethylester, 63: 3-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 66: Hexacosancarbonsäuremethylester, 67: 3-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 68: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 69: Heptacosancarbonsäuremethylester, 70: 3-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 71: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 72: Octacosancarbonsäuremethylester, 73: 3-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 74: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 75: Nonacosancarbonsäuremethylester, 77: Triacontanocarbonsäuremethylester, 81: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 83: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 88: Tetratriacontancarbonsäuremethylester).

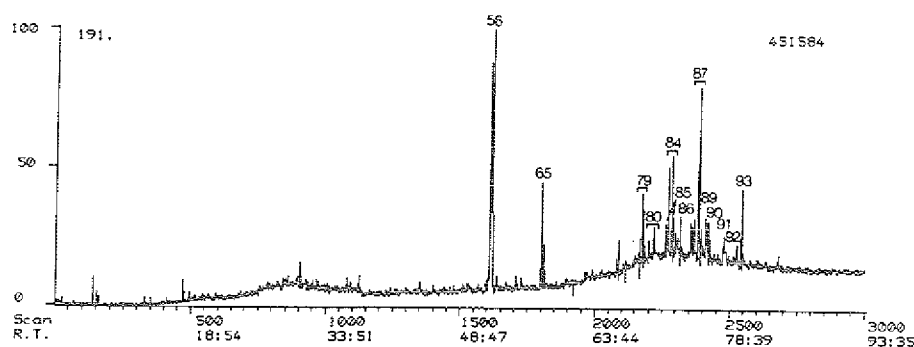


Abb. 6.3.5.8: Massenchromatogramm der charakteristischen Fragmentionen für tricyclische und pentacyclische Terpancarbonsäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des leicht degradierten Nordsee-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(56: tricyclischer C_{24} -Carbonsäuremethylester, 65: tricyclischer C_{26} -Carbonsäuremethylester, 79: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 80: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 84: $17\alpha,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 85: $17\beta,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 86: $17\beta,21\alpha$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 87: $17\alpha,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 89: $17\beta,21\beta$ -*homo*-Hopancarbonsäuremethylester, 90: $17\beta,21\alpha$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 91: $17\alpha,21\beta$ -*trihomo*-Hopancarbonsäuremethylester, 93: $17\beta,21\beta$ -*dihomo*-Hopancarbonsäuremethylester).

In der Säurefraktion des stark degradierten Öls dieser Probensequenz ließen sich nur geradkettige und tricyclische Carbonsäuren nachweisen. Die Fettsäuren deckten einen Kohlenstoffzahl-Bereich von $C_{8:0}$ bis $C_{18:0}$ ab (Abb. 6.3.5.9). Mit Ausnahme der $C_{9:0}$ -Fettsäure eluierten allerdings nur die geradzahigen Homologe. Die höchsten Konzentrationen erreichten $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säure. Die Verteilung der tricyclischen Säuren umfaßte Isomere der C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Säure. Von diesen wiesen C_{21} - und C_{24} -Säure annähernd gleich hohe Gehalte auf, während den C_{26} -Säuren nur sehr kleine Signale im Chromatogramm entsprachen. Verglichen mit den Konzentrationen der $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säure waren jedoch auch die Konzentrationen der C_{21} - und C_{24} -Terpensäuren relativ niedrig.

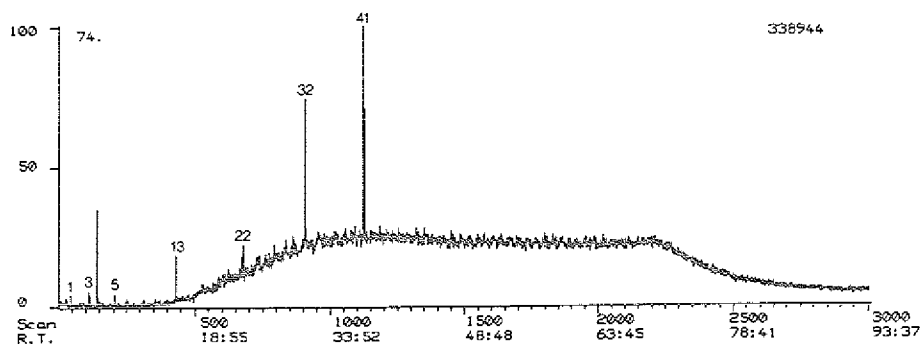


Abb. 6.3.5.9: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentions für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (freie Säuren des stark biodegradierten Nordsee-Öls, Biodegradations-Stufe 6)

(1: Octanocarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 13: Dodecanocarbonsäuremethylester, 22: Tetradecancarbonsäuremethylester, 32: Hexadecancarbonsäuremethylester, 41: Octadecancarbonsäuremethylester).

Gebundene Säuren

Ebenso wie bei den freien Säuren dominierten auch bei den gebundenen Säuren des nicht biodegradierten Öls geradkettige und 2-methylverzweigte Carbonsäuren (Abb. 6.3.5.10). Beide Substanzklassen waren allerdings auf einen kleineren Kohlenstoffzahl-Bereich beschränkt als bei den freien Säuren. So ließen sich die Fettsäuren nur bis zur $C_{24:0}$ -Säure nachweisen, die 2-Methylcarbonsäuren sogar nur bis zur 2-Methyl- $C_{16:0}$ -Säure. Unterschiede bestanden bei den geradkettigen Säuren darüber hinaus hinsichtlich der Konzentrationen der einzelnen Verbindungen und ihrer Relation zueinander. $C_{12:0}$ -, $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säure waren zwar auch in dieser Fraktion die größten Komponenten geblieben, doch hatten sich die Konzentrationen fast aller anderen Substanzen erheblich erhöht. Die 2-Methylsäuren bildeten eine homologe Reihe von 2-Methyl- $C_{9:0}$ bis 2-Methyl- $C_{16:0}$ mit einem Maximum bei 2-Methyl- $C_{12:0}$. Wie bereits in anderen Ölproben beobachtet, eluierten auch hier im niedermolekularen Bereich einige *iso*-Säuren (*iso*- $C_{11:0}$ bis *iso*- $C_{17:0}$). Neben den einfach verzweigten Carbonsäuren traten mit 2,6-Dimethyl- $C_{10:0}$ -Säure und 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Säure auch mehrfach verzweigte in geringen Konzentrationen auf.

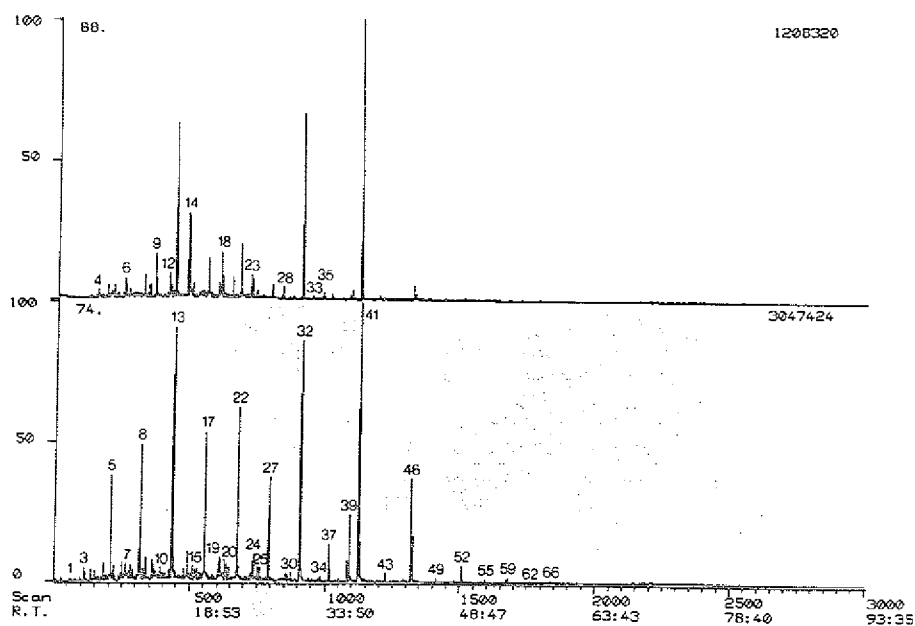


Abb. 6.3.5.10: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren und *iso*-Säuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des nicht biodegradierten Nordsee-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 3: Nonancarbonsäuremethylester, 4: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 5: Decancarbonsäuremethylester, 6: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 7: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 8: Undecancarbonsäuremethylester, 9: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 10: *iso*-Dodecarbonsäuremethylester, 12: 2,6-Dimethylundecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodecarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Tridecarbonsäuremethylester, 17: Tridecarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltridecarbonsäuremethylester, 19: 3,7,11-Trimethyldodecarbonsäuremethylester, 20: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 22: Tetradecancarbonsäuremethylester, 23: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 25: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 27: Pentadecancarbonsäuremethylester, 28: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 30: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 32: Hexadecancarbonsäuremethylester, 33: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 34: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 37: Heptadecancarbonsäuremethylester, 39: Octadecancarbonsäuremethylester, 41: Octadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 49: Heneicosancarbonsäuremethylester, 52: Docosancarbonsäuremethylester, 55: Tricosancarbonsäuremethylester, 59: Tetracosancarbonsäuremethylester, 62: Pentacosancarbonsäuremethylester, 66: Hexacosancarbonsäuremethylester).

Die relativ komplexe Säureverteilung der freien Säuren des leicht mikrobiell veränderten Öls hatte bei den gebundenen Säuren keine Entsprechung. Vielmehr bot sich dort fast exakt dasselbe Bild wie bei der entsprechenden Fraktion des zuvor beschriebenen nicht biodegradierten Öls. Lediglich bei den 2-Methylcarbonsäuren zeigten sich kleinere Differenzen, die homologe Reihe endete bereits bei 2-Methyl- $C_{13:0}$ -Säure.

Auch stärkere Degradation hatte keine gravierenden Änderungen der Fettsäureverteilung zur Folge. Der Nachweis der verzweigten Säuren, die in den beiden anderen Proben beobachtet wurden, wie einfach verzweigte *iso*- oder 2-Methyl-Carbonsäuren und mehrfach verzweigte *isoprenoid*-Carbonsäuren, gelang jedoch nicht.

6.3.6 Broistedt-Gifhorner Trog (Norddeutschland)

Die drei analysierten Öle stammen aus dem nordwestlichen Teil des Broistedt-Gifhorner Troges, einem Gebiet, das vor allem durch Salztektunik geprägt ist. So liegen denn auch die meisten Ölfelder unmittelbar an Salzstöcken oder stehen mit diesen in engem Zusammenhang (Abb. 6.3.6.1).

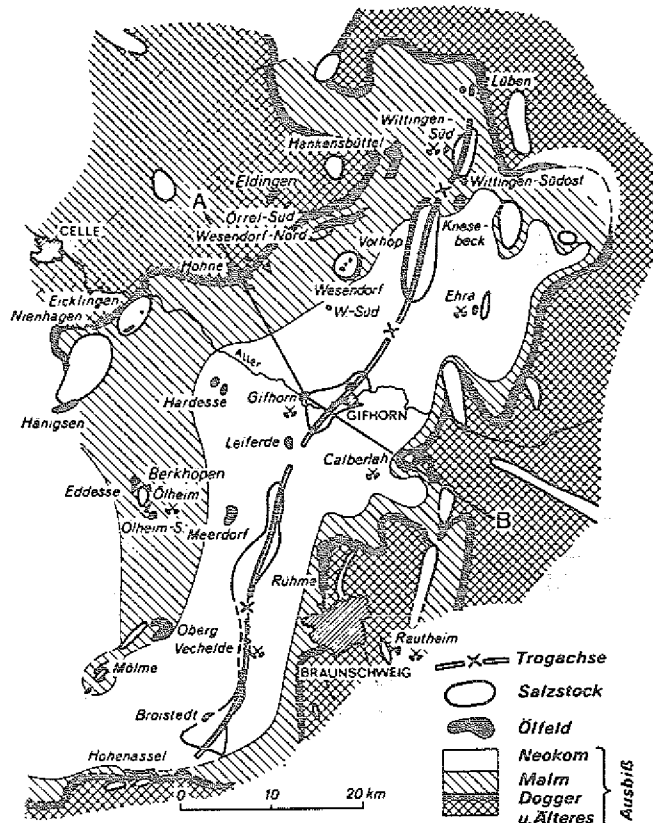


Abb. 6.3.6.1: Übersichtskarte für den Broistedt-Gifhorner Trog und seine Erdöllagerstätten; Quartär, Tertiär und Oberkreide, an den Rändern auch Alb, abgedeckt (Boigk 1981).

Als Speichergesteine fungieren in erster Linie die Sandsteine des Dogger β (Aalenien), Lias α (Hettangien) und des Rhätkeupers, aber auch Sandsteine des Valangin und des Wealden (Boigk 1981). Detaillierte Angaben über die Erdölmutter- und Speichergesteine und die Teufen dieser Öle liegen nicht vor, es sind lediglich die Ölfelder bekannt, in denen sie erbohrt wurden. Das nicht biodegradierte Öl wurde in der Bohrung Vorhop 36 gefördert, das leicht degradierte Öl der Biodegradations-Stufe 2 in Hankensbüttel Süd 27 und das leicht biodegradierte Öl der Biodegradation-Stufe 3 in Oerrel Süd 27.

Abbildung 6.3.6.2 zeigt das Gaschromatogramm des nicht biodegradierten Öls dieser Probensequenz. Hauptbestandteile waren gesättigte Kohlenwasserstoffe, deren Verteilung sowohl niedermolekulare als auch hochmolekulare Verbindungen mit bis zu 37

Kohlenstoffatomen umfaßte und ein Maximum bei $n\text{-C}_7$ aufwies. Die Konzentrationen der *isoprenoid*-Kohlenwasserstoffe Pristan und Phytan waren verglichen mit denen von $n\text{-C}_{17}$ und $n\text{-C}_{18}$ nicht annähernd halb so groß, ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß dieses Öl nicht mikrobiell verändert wurde. Bei den Biomarkern gab es keine Degradationserscheinungen.

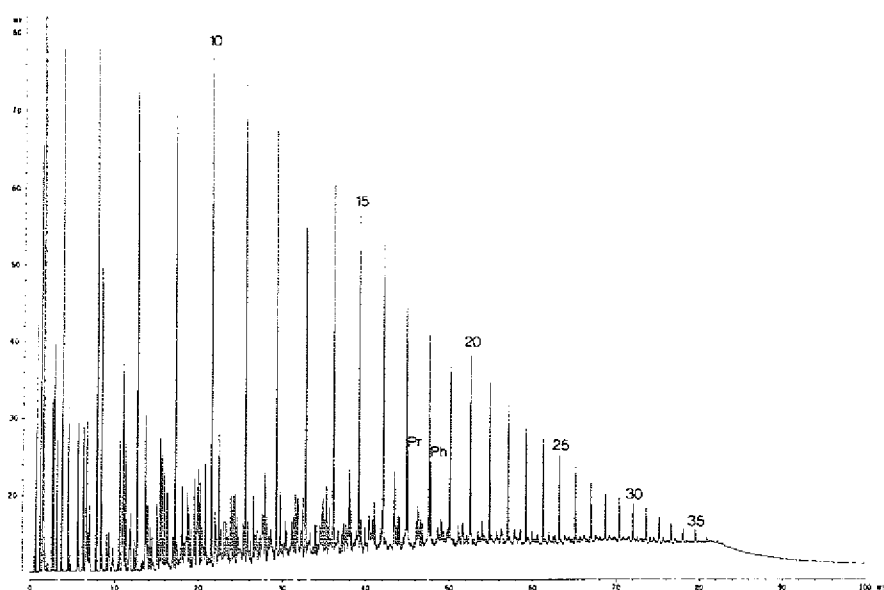


Abb. 6.3.6.2 Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des nicht biodegradierten Norddeutschland-Öls.

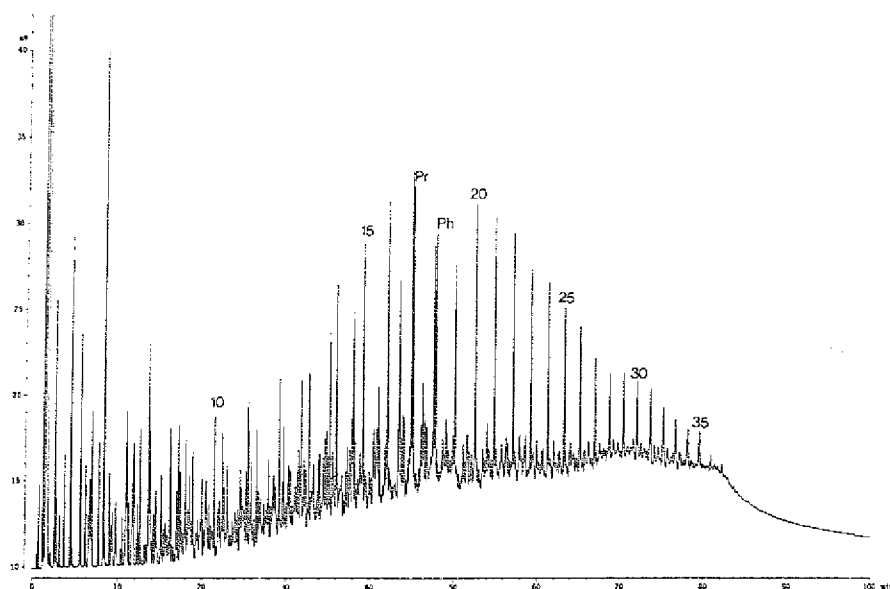


Abb. 6.3.6.3: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Norddeutschland-Öls (Biodegradations-Stufe 2).

Das leicht degradierte Öl (Stufe 2) zeichnete sich demgegenüber durch eine Konzentra-

tionsabnahme der *n*-Alkane aus, die sich am stärksten im niedermolekularen Bereich auswirkte (Abb. 6.3.6.3). Ihre Konzentrationen lagen hier nur noch in ähnlicher Größenordnung wie die der Aromaten. Dadurch verschob sich das Maximum der Verteilung in den Bereich der längerkettigen *n*-Alkane zu *n*-C₁₇. Weitere Anzeichen einer Degradation waren das stark veränderte Verhältnis der Relativkonzentrationen von Pristan und Phytan zu *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈ sowie die Ausbildung eines unaufgelösten komplexen Gemisches. Auch in dieser Probe waren die Biomarker völlig intakt.

Im Gaschromatogramm des dritten Öls dominierte ein unaufgelöstes komplexes Gemisch (Abb. 6.3.6.4). *n*-Alkane ließen sich mit Ausnahme des Bereichs von C₂₀-C₂₅ nicht mehr nachweisen und auch hier nur in sehr geringer Konzentration. Im höhermolekularen Bereich waren die *n*-Alkane völlig verschwunden, so daß sich das Verteilungsmuster der isomeren und homologen Hopane deutlich abzeichnete. Zu den dominierenden Verbindungen zählten die Isoprenoide, die mit Norpristan, Pristan und Phytan relativ hohe Konzentrationen erreichten. Daneben eluierten alicyclische und aromatische Verbindungen. Die Biomarker waren unverändert. Auch dieses Öl konnte noch als leicht degradiert klassifiziert werden (Stufe 3).

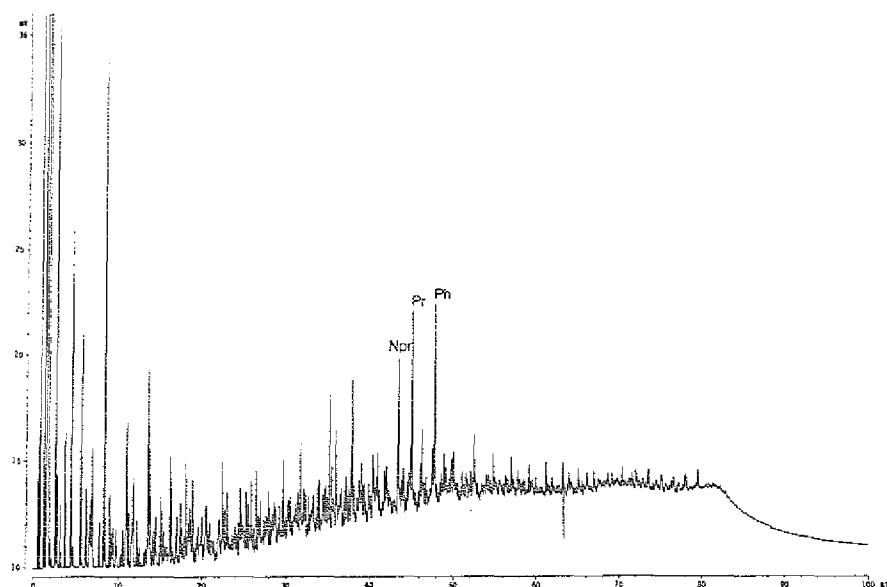


Abb. 6.3.6.4: Gaschromatogramm der Gesamtölmessung des leicht biodegradierten Norddeutschland Öls (Biodegradations-Stufe 3).

Freie Säuren

Das Säurespektrum der freien Säuren des nicht biodegradierten Norddeutschland-Öls setzte sich aus geradkettigen *n*-Carbonsäuren, einfach verzweigten 2-Methylcarbonsäuren, *isoprenoid*-Carbonsäuren und Hopancarbonsäuren zusammen. Die Substanzklasse mit der höchsten Gesamtkonzentration war die der *n*-Carbonsäuren. Sie bildeten eine homologe Reihe, deren breite Verteilung die der *n*-Alkane nachzeichnete und einen Bereich zwischen $C_{8,0}$ -Carbonsäure und $C_{32,0}$ -Carbonsäure abdeckte (Abb. 6.3.6.5). Die geradzahigen Homologe wiesen generell höhere Konzentrationen auf als die ungeradzahigen und stellten mit $C_{16,0}$ - und $C_{18,0}$ -Carbonsäure die dominierenden Einzelkomponenten. 2-Methylcarbonsäuren eluierten in vergleichbar breiter Verteilung zwischen 2-Methyl- $C_{8,0}$ -Carbonsäure und 2-Methyl- $C_{32,0}$ -Carbonsäure mit einem Maximum bei 2-Methyl- $C_{13,0}$ -Carbonsäure. Die Gesamtkonzentration der 2-Methylcarbonsäuren lag erheblich unter der der *n*-Alkansäuren. Als Hauptkomponente der sich durch ein Fragmentation der Masse m/z 88 auszeichnenden Verbindungen konnte 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15,0}$ -Carbonsäure (Pristansäure) identifiziert werden. In entsprechender Konzentration konnte als weitere *isoprenoid*-Carbonsäure daneben auch 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16,0}$ -Carbonsäure (Phytansäure) bestimmt werden. Hopancarbonsäuren waren durch Isomere von C_{30} -, C_{31} - und C_{32} -Carbonsäuren vertreten (Abb. 6.3.6.6). Die höchsten Konzentrationen erreichten C_{31} - und C_{32} -Carbonsäuren mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration.

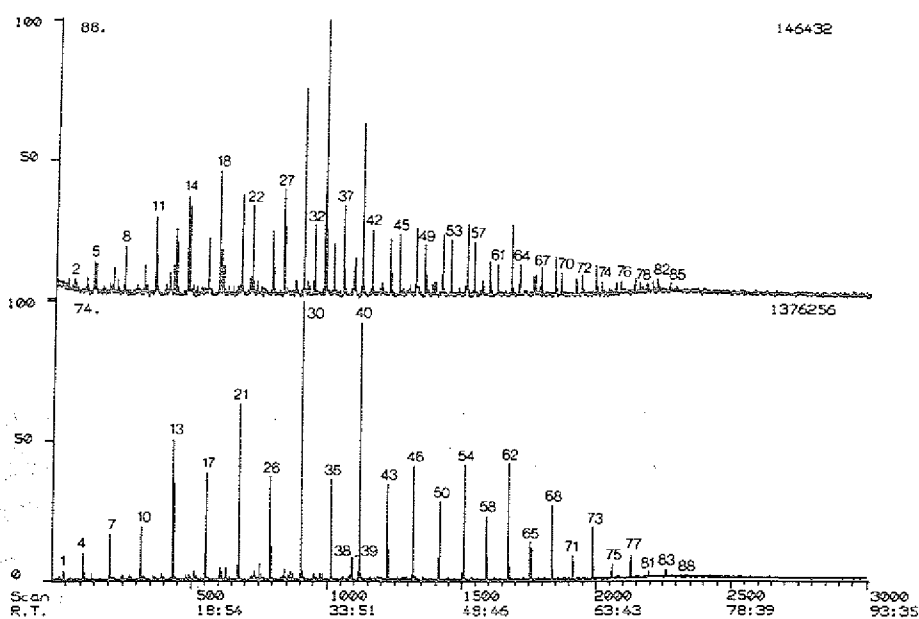


Abb. 6.3.6.5: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des nicht biodegradierten Norddeutschland-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 4: Nonancarbonsäuremethylester, 5: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecan-

carbonsäuremethylester, 10: Undecancarbonsäuremethylester, 11: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodecarbonsäuremethylester, 17: Tridecarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltridecarbonsäuremethylester, 21: Tetradecancarbonsäuremethylester, 22: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 26: Pentadecancarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 30: Hexadecancarbonsäuremethylester, 32: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 35: Heptadecancarbonsäuremethylester, 38: Octadecancarbonsäuremethylester, 39: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 40: Octadecancarbonsäuremethylester, 42: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 45: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 50: Heneicosancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 54: Docosancarbonsäuremethylester, 57: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 58: Tricosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 62: Tetracosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 65: Pentacosancarbonsäuremethylester, 67: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 68: Hexacosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 71: Heptacosancarbonsäuremethylester, 72: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 73: Octacosancarbonsäuremethylester, 74: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 75: Nonacosancarbonsäuremethylester, 76: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 77: Triacosancarbonsäuremethylester, 78: 2-Methyltriacosancarbonsäuremethylester, 81: Hentriacosancarbonsäuremethylester, 82: 2-Methylhentriacosancarbonsäuremethylester, 83: Dotriacosancarbonsäuremethylester, 85: 2-Methyldotriacosancarbonsäuremethylester, 88: Tritriacosancarbonsäuremethylester).

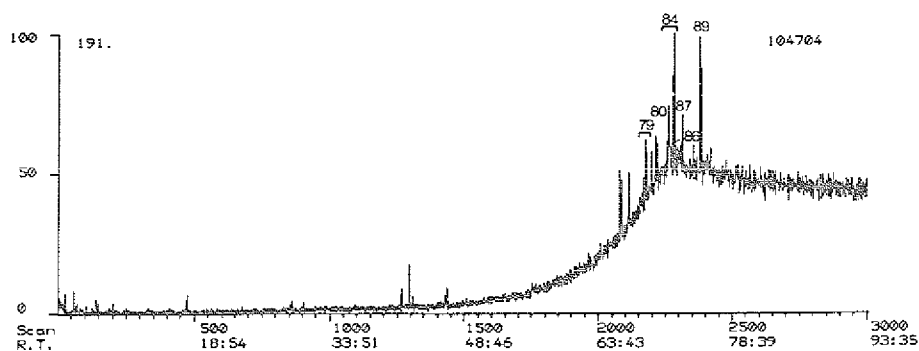


Abb. 6.3.6.6: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für pentacyclische Terpensäuren als Methylester (m/z 191) (freie Säuren des nicht biodegradierten Norddeutschland-Öls) (79: $17\alpha,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 80: $17\beta,21\alpha$ -Hopancarbonsäuremethylester, 84: $17\alpha,21\beta$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 86: $17\beta,21\beta$ -Hopancarbonsäuremethylester, 87: $17\beta,21\alpha$ -homo-Hopancarbonsäuremethylester, 89: $17\alpha,21\beta$ -dihomo-Hopancarbonsäuremethylester).

Die freien Säuren des leicht biodegradierten Öls der Biodegradations-Stufe 2 unterscheiden sich von denen des zuvor beschriebenen Öls vor allem hinsichtlich der Relativkonzentrationen der verschiedenen Substanzklassen bzw. der Verbindungen innerhalb derselben. So war zwar die Gesamtkonzentration der n -Carbonsäuren nahezu unverändert geblieben, es ließ sich jedoch ein genereller Konzentrationsrückgang im kurzkettigen Bereich verzeichnen, der mit einer Anreicherung der länger-kettigen Verbindungen zwischen $C_{20:0}$ -Carbonsäure und $C_{32:0}$ -Carbonsäure einherging (Abb. 6.3.6.7). Die Dominanz von $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Carbonsäure blieb unangetastet. Die Gesamtkonzentration der 2-Methylcarbonsäuren hatte sich erheblich reduziert, das Verteilungsmuster war je-

doch sowohl hinsichtlich des Elutionsbereichs als auch hinsichtlich der Relativkonzentrationen der einzelnen Verbindungen zueinander erhalten geblieben. Im Gegensatz dazu hatte bei den Hopancarbonsäuren eine Konzentrationserhöhung stattgefunden. Infolgedessen konnten im höhermolekularen Bereich einige zusätzliche Verbindungen bestimmt werden, die vorher aufgrund eines ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht abgetrennt worden waren. Es handelt sich um $17\beta,21\beta$ - C_{31} -Hopancarbonsäure, $17\beta,21\alpha$ - C_{32} -Hopancarbonsäure und $17\beta,21\beta$ - C_{32} -Hopancarbonsäure. Dominierende Einzelkomponente der Hopansäureverteilung war die C_{32} -Carbonsäure mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration.

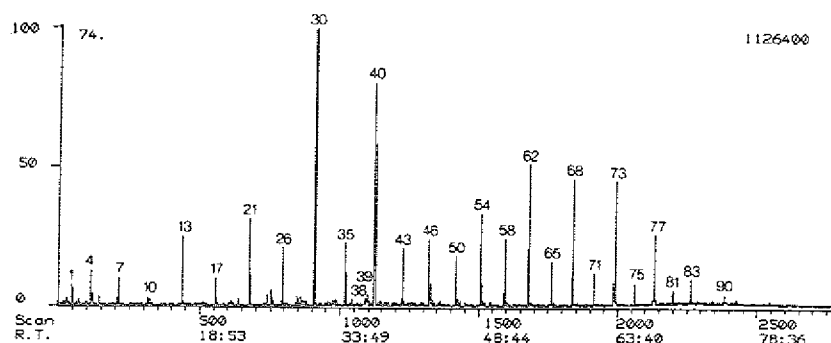


Abb. 6.3.6.7: Massenchromatogramm des charakteristischen Fragmentations für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) (freie Säuren des leicht biodegradierten Norddeutschland-Öls, Biodegradations-Stufe 2)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 4: Nonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 10: Undecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecancarbonsäuremethylester, 17: Tridecancarbonsäuremethylester, 21: Tetradecancarbonsäuremethylester, 26: Pentadecancarbonsäuremethylester, 30: Hexadecancarbonsäuremethylester, 35: Heptadecancarbonsäuremethylester, 38: Octadecancarbonsäuremethylester, 39: 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäuremethylester, 40: Octadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 50: Heneicosancarbonsäuremethylester, 54: Docosancarbonsäuremethylester, 58: Tricosancarbonsäuremethylester, 62: Tetracosancarbonsäuremethylester, 65: Pentacosancarbonsäuremethylester, 68: Hexacosancarbonsäuremethylester, 71: Heptacosancarbonsäuremethylester, 73: Octacosancarbonsäuremethylester, 75: Nonacosancarbonsäuremethylester, 77: Triacontancarbonsäuremethylester, 81: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 83: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 90: Tetratriacontancarbonsäuremethylester).

Neben den in den beiden bisher vorgestellten Säurefraktionen identifizierten Substanzklassen konnten in dem am stärksten degradierten Öl dieser Probensequenz, das nach der Klassifizierung von Moldowan et al. (1992) aber noch als leicht biodegradiert einzustufen ist (Stufe 3), auch 3-Methylcarbonsäuren und 4-Methylcarbonsäuren nachgewiesen werden. Die geradkettigen n -Alkansäuren eluierten auch in dieser Ölprobe noch in breiter Verteilung zwischen $C_{8:0}$ -Carbonsäure und $C_{34:0}$ -Carbonsäure (Abb. 6.3.6.8). Der bereits im leicht degradierten Öl der Biodegradations-Stufe 2 erkennbare Trend zur Anreicherung der längerkettigen Verbindungen hatte sich mit zunehmender Degradation verstärkt, die Dominanz der geradzahlgigen Homologe war erhalten geblieben. Im Massenchromatogramm des Fragmentations m/z 74 ist darüber hinaus die Verteilung der

3-Methylcarbonsäuren und 4-Methylcarbonsäuren dargestellt. Bei der massenspektrometrischen Fragmentierung zeigen die 3-Methylcarbonsäuren neben dem Basispeak der Masse m/z 74 ein Fragmentation der Masse m/z 101, während für 4-Methylcarbonsäuren die Kombination der Massen m/z 74 und m/z 115 charakteristisch ist. Homologe der 3-Methylcarbonsäuren traten nicht im gesamten Elutionsbereich auf, sondern konnten in sehr geringen Konzentrationen mit einiger Sicherheit nur im Bereich zwischen 3-Methyl- $C_{20:0}$ -Carbonsäure und 3-Methyl- $C_{26:0}$ -Carbonsäure nachgewiesen werden. Die 4-Methylcarbonsäuren besaßen ebenfalls nur geringe Konzentrationen. Sie waren auf den Bereich zwischen 4-Methyl- $C_{16:0}$ -Carbonsäure und 4-Methyl- $C_{23:0}$ -Carbonsäure beschränkt. Beide Massenchromatogramme der Abbildung 6.3.6.8 wiesen ein unaufgelöstes komplexes Gemisch auf, wobei das des für 2-Methylcarbonsäuren charakteristischen Fragmentations der Masse m/z 88 in der Relativverteilung stärker ausgeprägt war. Die Verteilung der 2-Methylcarbonsäuren hatte sich verglichen mit den beiden anderen Ölproben nicht verändert. Es war, ebenso wie bei den geradkettigen Säuren, lediglich eine generelle Konzentrationsabnahme aller Verbindungen erfolgt, die auch die Hopancarbonsäuren erfaßte. Die Verteilung der homologen und isomeren Hopancarbonsäuren bot im Gegensatz dazu das gleiche Bild wie in der etwas leichter degradierten Probe der Biodegradations-Stufe 2.

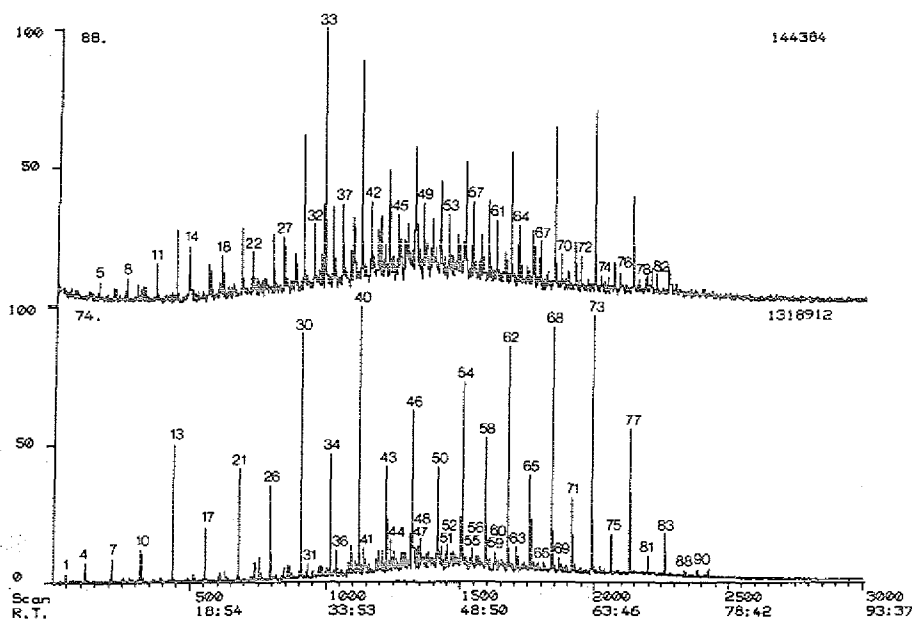


Abb. 6.3.6.8: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (freie Säuren des leicht biodegradierten Norddeutschland-Öls, Biodegradations-Stufe 3)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 4: Nonancarbonsäuremethylester, 5: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 10: Undecancarbonsäuremethylester, 11: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 13: Dodecarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodecarbonsäuremethylester, 17: Tridecarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltridecarbonsäuremethylester, 21: Tetradecarbonsäuremethylester, 22: 2-Methyltetradecarbonsäureme-

thylester, 26: Pentadecancarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 30: Hexadecancarbonsäuremethylester, 31: 4-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 32: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 34: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 35: Heptadecancarbonsäuremethylester, 36: 4-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 37: 2-Methylheptadecancarbonsäuremethylester, 40: Octadecancarbonsäuremethylester, 41: 4-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 42: 2-Methyloctadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 44: 4-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 45: 2-Methylnonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 47: 4-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 48: 3-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 49: 2-Methyleicosancarbonsäuremethylester, 50: Heneicosancarbonsäuremethylester, 51: 4-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 52: 3-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 53: 2-Methylheneicosancarbonsäuremethylester, 54: Docosancarbonsäuremethylester, 55: 4-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 56: 3-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 57: 2-Methyldocosancarbonsäuremethylester, 58: Tricosancarbonsäuremethylester, 59: 4-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 60: 3-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 61: 2-Methyltricosancarbonsäuremethylester, 62: Tetracosancarbonsäuremethylester, 63: 3-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 64: 2-Methyltetracosancarbonsäuremethylester, 65: Pentacosancarbonsäuremethylester, 66: 3-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 67: 2-Methylpentacosancarbonsäuremethylester, 68: Hexacosancarbonsäuremethylester, 69: 3-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 70: 2-Methylhexacosancarbonsäuremethylester, 71: Heptacosancarbonsäuremethylester, 72: 2-Methylheptacosancarbonsäuremethylester, 73: Octacosancarbonsäuremethylester, 74: 2-Methyloctacosancarbonsäuremethylester, 75: Nonacosancarbonsäuremethylester, 76: 2-Methylnonacosancarbonsäuremethylester, 77: Triacontancarbonsäuremethylester, 78: 2-Methyltriacontancarbonsäuremethylester, 81: Hentriacontancarbonsäuremethylester, 82: 2-Methylhentriacontancarbonsäuremethylester, 83: Dotriacontancarbonsäuremethylester, 88: Tritriacontancarbonsäuremethylester, 90: Tetratriacontancarbonsäuremethylester).

Gebundene Säuren

Bei den gebundenen Säuren konnte ebenso wie in anderen Probenreihen beobachtet werden, daß sich die unterschiedliche Biodegradationsintensität nicht auf das Spektrum der Verbindungen auswirkte, sondern lediglich zu Konzentrationsänderungen führte. Auf den eingeschränkten Kohlenstoffzahl-Bereich bei den gebundenen Säuren im Vergleich zu den freien Säuren ist ebenfalls bereits an anderer Stelle hingewiesen worden.

Das nicht biodegradierte Öl enthielt vor allem geradkettige *n*-Carbonsäuren, die bis zur C_{34:0}-Carbonsäure nachgewiesen werden konnten und ein Maximum bei C_{12:0}-Carbonsäure zeigten (Abb. 6.3.6.9). Daneben eluierte eine entsprechende Reihe homologer 2-Methylcarbonsäuren, allerdings in erheblich geringer Konzentration, die die Fettsäureverteilung im kurzkettigen Bereich hinsichtlich der Relativkonzentrationen der einzelnen Verbindungen zueinander widerspiegelte. Die einfach verzweigten Säuren waren außerdem hinaus durch *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren vertreten. Während die *iso*-Säuren in homologer Verteilung bis zu *iso*-C_{17:0}-Carbonsäure auftraten, konnten von den *anteiso*-

Säuren nur *anteiso*-C_{13:0}-Carbonsäure und *anteiso*-C_{15:0}-Carbonsäure identifiziert werden. *isoprenoid*-Carbonsäuren waren durch 2,6-Dimethyl-C_{11:0}-Carbonsäure, 3,7,11-Trimethyl-C_{12:0}-Carbonsäure, 3,7,11-Trimethyl-C_{13:0}-Carbonsäure, 5,9,13-Trimethyl-C_{14:0}-Carbonsäure und 2,6,10,14-Tetramethyl-C_{16:0}-Carbonsäure vertreten.

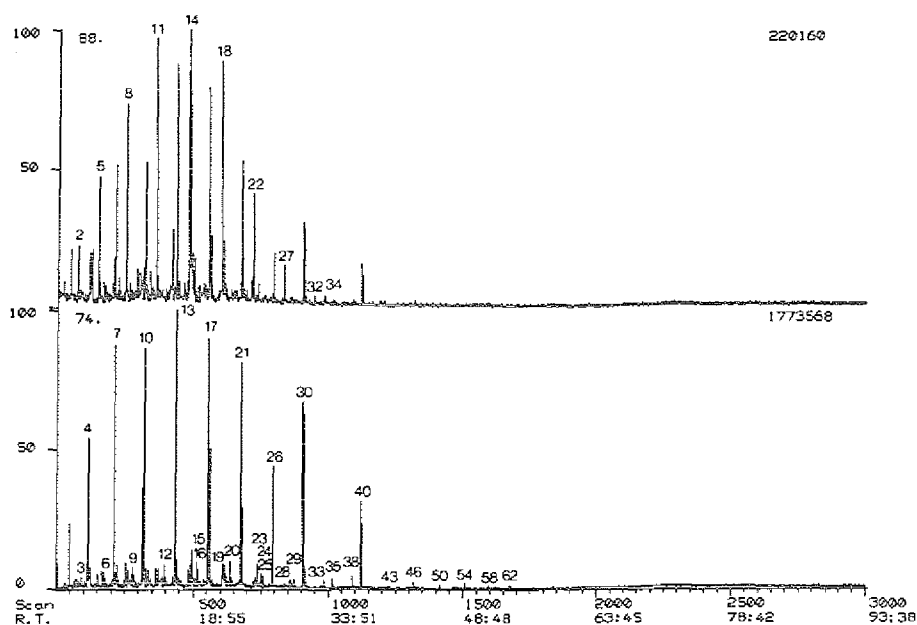


Abb. 6.3.6.9: Massenchromatogramme der charakteristischen Fragmentationen für gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren als Methylester (m/z 74) und für 2-Methylcarbonsäuren als Methylester (m/z 88) (gebundene Säuren des nicht biodegradierten Norddeutschland-Öls)

(1: Octancarbonsäuremethylester, 2: 2-Methyloctancarbonsäuremethylester, 3: *iso*-Nonancarbonsäuremethylester, 4: Nonancarbonsäuremethylester, 5: 2-Methylnonancarbonsäuremethylester, 6: *iso*-Decancarbonsäuremethylester, 7: Decancarbonsäuremethylester, 8: 2-Methyldecancarbonsäuremethylester, 9: *iso*-Undecancarbonsäuremethylester, 10: Undecancarbonsäuremethylester, 11: 2-Methylundecancarbonsäuremethylester, 12: *iso*-Dodeccancarbonsäuremethylester, 13: Dodeccancarbonsäuremethylester, 14: 2-Methyldodeccancarbonsäuremethylester, 15: *iso*-Trideccancarbonsäuremethylester, 16: *anteiso*-Trideccancarbonsäuremethylester, 17: Trideccancarbonsäuremethylester, 18: 2-Methyltrideccancarbonsäuremethylester, 19: 3,7,11-Trimethyldodeccancarbonsäuremethylester, 20: *iso*-Tetradecancarbonsäuremethylester, 21: Tetradecancarbonsäuremethylester, 22: 2-Methyltetradecancarbonsäuremethylester, 23: 3,7,11-Trimethyltrideccancarbonsäuremethylester, 24: *iso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 25: *anteiso*-Pentadecancarbonsäuremethylester, 26: Pentadecancarbonsäuremethylester, 27: 2-Methylpentadecancarbonsäuremethylester, 28: 5,9,13-Trimethyltetradecancarbonsäuremethylester, 29: *iso*-Hexadecancarbonsäuremethylester, 30: Hexadecancarbonsäuremethylester, 32: 2-Methylhexadecancarbonsäuremethylester, 33: *iso*-Heptadecancarbonsäuremethylester, 34: 2,6,10,14-Tetramethylpentadecancarbonsäuremethylester, 35: Heptadecancarbonsäuremethylester, 38: Octadecancarbonsäuremethylester, 40: Octadecancarbonsäuremethylester, 43: Nonadecancarbonsäuremethylester, 46: Eicosancarbonsäuremethylester, 50: Heneicosancarbonsäuremethylester, 54: Docosancarbonsäuremethylester, 58: Tricosancarbonsäuremethylester, 62: Tetracosancarbonsäuremethylester).

Die 2-Methylcarbonsäuren des leicht degradierten Öls der Biodegradations-Stufe 2 zeigten im Vergleich zum nicht biodegradierten Öl eine leicht erhöhte Gesamtkonzentration, während die Konzentrationen aller anderen Verbindungen zurückgegangen waren.

Stärkere Degradation äußerte sich dann in einer starken Konzentrationsabnahme der 2-Methylcarbonsäuren, die Konzentrationen der übrigen Verbindungen blieben dagegen konstant.

6.4 Diskussion der Ergebnisse zum mikrobiellen Abbau von Rohölen in der Lagerstätte

Zum Studium des mikrobiellen Abbaus von Rohölen in der Lagerstätte wurden mehrere Serien von Erdölen aus verschiedenen Erdölprovinzen auf Stoffwechselprodukte bakterieller Aktivität, insbesondere Carbonsäuren und Alkohole, analysiert. Die Auswahl der Probenserien war darauf angelegt, jeweils nicht biodegradierte Öle mit einem oder mehreren, zum Teil unterschiedlich stark biodegradierten Ölen aus demselben Muttergestein zu vergleichen.

Es konnte ein relativ breites Spektrum an Carbonsäuren nachgewiesen werden, das neben geradkettigen Säuren auch verschiedene Spezies einfach methylverzweigter Säuren und mehrfach verzweigte *isoprenoid*-Säuren sowie tricyclische und pentacyclische Säuren umfaßte.

Bei den freien Säuren der nicht degradierten Öle dominierten gesättigte *n*-Carbonsäuren, deren Kohlenstoffzahl-Verteilungen die der *n*-Alkane recht genau widerspiegeln. Dabei wiesen die geradzahigen Homologe generell höhere Konzentrationen auf als die ungeradzahigen. Als wichtigste Einzelkomponenten traten $C_{16:0}$ -Carbonsäure und $C_{18:0}$ -Carbonsäure hervor. Ungesättigte Verbindungen konnten mit Ausnahme der $C_{18:1}$ -Säure nicht beobachtet werden. Hier handelt es sich ebenso wie bei einem Teil der $C_{16:0}$ - und $C_{18:0}$ -Säuren mit einiger Sicherheit um einen direkten Eintrag aus der Biomasse der kohlenwasserstoffabbauenden Mikroorganismen. Ferner wurden einfach verzweigte 2-Methylcarbonsäuren identifiziert. Diese bildeten eine den *n*-Carbonsäuren hinsichtlich des Kohlenstoffzahl-Bereichs vergleichbare homologe Reihe, zeichneten sich jedoch durch eine erheblich geringere Gesamtkonzentration aus. Mit 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15:0}$ -Carbonsäure (Pristansäure) und 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Carbonsäure (Phytansäure) konnten daneben auch mehrfach verzweigte *isoprenoid*-Carbonsäuren bestimmt werden, die - entsprechend der Relativanteile der Isoprenoide in den Kohlenwasserstoff-Fractionen - zum Teil beträchtliche Konzentrationen erreichten. Die tricyclischen Terpansäuren waren durch Isomere von C_{21} - C_{24} - und C_{26} -Säure vertreten. Bei den pentacyclischen Terpansäuren, deren Verteilung zahlreiche Homologe und Isomere zwischen C_{30} und C_{33} umfaßte, dominierten die Verbindungen mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration. Sowohl tricyclische als auch pentacyclische Säuren besaßen nur sehr geringe Konzentrationen.

Während die geradkettigen Carbonsäuren auch in allen Ölen nachgewiesen werden konnten, die aufgrund der Kohlenwasserstoff-Verteilungen als nicht biodegradiert einge-

stuft worden waren, trifft dies für die übrigen Substanzklassen nicht zu. So wurden beispielsweise im Nigeria-Öl keine verzweigten Säuren, im Monterey-Öl keine Hopansäuren und im Nordsee-Öl keine tricyclischen Terpensäuren gefunden.

In vielen Fällen ließ sich eine Korrelation zwischen steigender Biodegradationsintensität und zunehmender Komplexität der Säureverteilungen, insbesondere die Zunahme an verzweigten und cyclischen Säuren, verzeichnen, ohne daß jedoch zwischen nicht biodegradierten und leicht biodegradierten Ölen ein "Verteilungssprung" im Sinne einer gravierenden Änderung des Carbonsäurespektrums aufgetreten wäre. Vielmehr ließ sich innerhalb der einzelnen Probenserien meist eine relativ kontinuierliche Entwicklung verfolgen. Diese Beobachtung gibt Anlaß zu der Vermutung, daß als nicht biodegradiert deklarierte Öle (z.B. Monterey, Norddeutschland) doch schon in der Lagerstätte leicht biodegradiert wurden. Dort, wo Reservoirteufe und damit -temperatur dies nicht zulassen, weil die Mikroorganismen unter diesen Bedingungen nicht existieren können, hat möglicherweise während des Förderprozesses oder bei der Lagerung mikrobieller Abbau in geringem Maße stattgefunden, so daß es sich bei den in diesen Ölen nachgewiesenen Säuren wohl nicht um originäre Säuren handelt. Zudem wären diese unter den Bedingungen der Katagenese bei Temperaturen zwischen 50 °C und 150 °C (Tissot & Welte 1984) vermutlich ohnehin nicht stabil.

Auffallend sind die große Menge und die Diversität der einfach verzweigten Methylcarbonsäuren in den leicht bis mäßig degradierten Ölen. Neben den auch in den nicht degradierten Ölen nachgewiesenen 2-Methylcarbonsäuren konnten in den stärker mikrobiell verwerteten Ölproben zahlreiche Homologe von 3-, 4- und 5-Methylcarbonsäuren identifiziert werden, die zum Teil erheblich höhere Konzentrationen erreichten als die geradkettigen Säuren. Der Anteil der Methylcarbonsäuren an der gesamten Säurekonzentration liegt erheblich höher als der Anteil der methylverzweigten Alkane an der Gesamtkonzentration der Kohlenwasserstoffe. Alkane werden beim Abbau generell schneller vollständig oxidiert, während sich die verzweigten Kohlenwasserstoffe nur schlecht metabolisieren lassen; dadurch erfolgt eine Anreicherung der methylverzweigten Säuren. Daß es sich um Bakterieninhaltsstoffe handelt, ist eher unwahrscheinlich.

Als weitere Spezies methylverzweigter Säuren eluierten *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren, die vor allem auf den niedermolekularen Bereich beschränkt waren. Aufgrund geringer Konzentrationen kommt diesen Verbindungen nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

Die *isoprenoid*-Carbonsäuren waren in diesen Ölproben nicht nur durch Pristan- und Phytansäure vertreten, sondern auch durch eine Reihe kürzerkettiger Säuren, die aller-

dings meist nur geringe Gehalte aufwiesen. Die Gehalte an Pristan- und Phytansäure lagen dagegen oft recht hoch. Dies kann im Kontext mit den anderen nachgewiesenen Säuren als Beweis dafür angesehen werden, daß es sich bei den Säuren tatsächlich um unvollständig metabolisierte Kohlenwasserstoffe der Erdöle handelt, in denen Pristan und Phytan die bei weitem bedeutendsten Isoprenoide sind.

isoprenoid-Carbonsäuren waren erstmals von Cason & Graham (1965) aus einem kalifornischen Öl isoliert worden. Dabei handelte es sich um 2,6,10-Trimethyl- $C_{11:0}$ -Säure, 3,7,11-Trimethyl- $C_{12:0}$ -Säure, 2,6,10,14-Tetramethyl- $C_{15:0}$ -Säure (Pristansäure) und 3,7,11,15-Tetramethyl- $C_{16:0}$ -Säure (Phytansäure). Später gelang es, Vertreter dieser Substanzklasse auch in Sedimenten nachzuweisen. Gegenstand zahlreicher Untersuchungen waren in diesem Zusammenhang die Carbonsäuren des eozänen Green River Shale aus Colorado (Eglinton et al. 1966, Haug et al. 1967, Murphy et al. 1969, Douglas et al. 1971, Maxwell et al. 1973, Kawamura et al. 1986). Es konnten sowohl kurzkettenartige Verbindungen (2,6-Dimethyl- $C_{7:0}$ -Carbonsäure, 3,7-Dimethyl- $C_{8:0}$ -Carbonsäure) als auch höhere Homologe im Kohlenstoffzahl-Bereich zwischen C_{14} und C_{22} bestimmt werden. Das Säurespektrum des triassischen Serpiano-Ölschiefers aus der Schweiz umfaßte Verbindungen mit 11 bis 20 Kohlenstoffatomen (Douglas et al. 1971). Rezent es marines Material enthielt nach Blumer & Cooper (1967) neben Pristan- und Phytansäure größere Mengen an 4,8,12-Trimethyl- $C_{13:0}$ -Carbonsäure. Aus marinen Sedimenten der Antarktis wurden C_{15} - C_{17} und C_{19} - C_{23} *isoprenoid*-Säuren beschrieben, von denen allerdings nur Pristan- und Phytansäure höhere Konzentrationen aufwiesen (Venkatesan 1988). Bei den gebundenen *isoprenoid*-Carbonsäuren traten Verbindungen zwischen C_{15} und C_{21} auf, bei den durch Pyrolyse freigesetzten Säuren waren es Verbindungen zwischen C_{14} und C_{21} , jedoch keine *isoprenoid*- $C_{18:0}$ -Säure (Kawamura et al. 1986).

Die Herkunft der *isoprenoid*-Carbonsäuren in rezenten Sedimenten scheint noch immer nicht vollständig geklärt zu sein. Maxwell et al. (1973) folgerten aufgrund ihrer Analyseergebnisse: "Thus the stereochemical data for the acids with carbon numbers less than C_{21} conform best to a phytol origin. In this case, however, the stereochemical approach, like the gross carbon skeleton approach, cannot easily distinguish between a biochemical (i.e. conversion to isoprenoid acids in organisms prior to deposition) or geochemical (i.e. conversion to the acids after deposition via biochemical and/or geochemical reactions) origin. The evidence available, however (Blumer & Cooper, 1967) indicates that the isoprenoid acids in ancient sediments are mainly postdepositional products." Biolipide wie Vitamin K und α -Tocopherol besitzen eine Phytol-Seitenkette mit derselben stereochemischen Konfiguration wie die der Phytol-Seitenkette des Chlorophylls. Da diese Verbindungen in der Natur jedoch bei weitem nicht so häufig auftreten wie das Chlorophyll,

sind sie nach Auffassung von Maxwell et al. (1973) als Vorläufer der *isoprenoid*-Carbonsäuren mit weniger als 21 Kohlenstoffatomen nur von untergeordneter Bedeutung. Die längerkettigen Homologe könnten nach Seifert (1975) durch Degradation hochmolekularer, häufig vorkommender Isoprenoide tierischer und pflanzlicher Herkunft entstanden sein, wie beispielsweise der Betulaphenole (C_{30} - C_{45}), des Solanesols (C_{45}) oder des Bactoprenols (C_{55}). Derenne et al. (1991) vertreten die Ansicht, daß neben der Degradation isoprenoider Biolipide auch die selektive Erhaltung als Ester in Biomakromolekülen gebundener isoprenoider Säuren möglich sei. In keinem Fall wurde jedoch eine Säureverteilung beschrieben, die der der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Öle im entferntesten ähnelte, so daß eine Erhaltung über den Katagenesebereich hinweg und eine nachfolgend selektive Anreicherung als Folge des Kohlenwasserstoff-Abbaus durch Biodegradation ausgeschlossen werden kann.

Die Terpancarbonsäuren boten in den leicht bis mäßig biodegradierten Ölen ein recht differenziertes Bild.

Der Nachweis tricyclischer Terpansäuren gelang nicht in allen Proben, wie die Analyseergebnisse der Öle aus Nigeria, aus dem Bell Creek-Ölfeld und aus Norddeutschland belegen. In den übrigen Ölen waren sie ebenso wie in den nicht degradierten Proben mit Isomeren von C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Säure vertreten und erreichten zum Teil relativ hohe Konzentrationen, die erheblich über denen der Hopancarbonsäure lagen.

Diese Substanzklasse wurde bereits von Seifert (1974) erwähnt, genaue Struktur und Stereochemie der Verbindungen waren damals jedoch noch nicht bekannt. Cyr & Strausz (1983) wiesen in Ölsanden aus Alberta eine homologe Reihe tricyclischer Säuren im Kohlenstoffzahl-Bereich zwischen C_{20} und C_{26} nach. Aus der Fraktion der gebundenen Säuren dieses Materials isolierten sie Isomere von tricyclischer C_{21} - und C_{24} -Carbonsäure sowie eine tricyclische C_{20} -Carbonsäure (Cyr & Strausz 1984). Als dominierende Verbindungen präsentierten sich die C_{21} -Säuren. Zur vollständigen Identifizierung der C_{20} -Säure synthetisierten Kaufman et al. (1988) die vermutete Struktur.

Das Auftreten der tricyclischen Säuren ist aus dem Grunde interessant, weil die Herkunft der tricyclischen Kohlenwasserstoffe in Ölen und Sedimenten mit reifem organischem Material bislang noch nicht geklärt ist, denn im Diagenesestadium wurden bisher weder die tricyclischen Kohlenwasserstoffe noch funktionalisierte Vorläufer gefunden. Die tricyclischen Kohlenwasserstoffe werden offensichtlich erst während der Katagenese gebildet. Ekweozor & Strausz (1982) vermuten, daß dabei die Decarboxylierung von Säuren während Diagenese und Katagenese eine Rolle spielt. Dies ist jedoch eher unwahr-

scheinlich, da die Kohlenwasserstoffe aus einem erheblich größeren Kohlenstoffzahl-Bereich bekannt sind als die Säuren; es müssen daher noch andere Prozesse stattfinden. Am wahrscheinlichsten ist die thermokatalytische Freisetzung aus makromolekularen Vorläuferverbindungen. Es stellt sich die Frage, warum in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Ölen bei den freien Säuren nur Isomere von tricyclischer C_{21} , C_{24} - und C_{26} -Carbonsäure und bei den gebundenen Säuren nur in dem leicht biodegradierten Kongo-Öl eine C_{21} -Säure nachgewiesen werden konnten. Ist diese Verteilung möglicherweise in erster Linie darauf zurückzuführen, daß zwar noch weitere Homologe eluierten, wegen zu geringer Konzentrationen jedoch analytisch nicht erfaßt wurden? Oder ist sie Ausdruck einer ganz spezifischen Spaltung bestimmter Moleküle? Nach den hier vorliegenden Ergebnissen sollte als Bildungsmechanismus der Säuren in erster Linie eine spezifische Oxidation an den Verzweigungsstellen der unbekannten Vorläuferverbindungen in Betracht gezogen werden, die im Zuge der Biodegradation mit der Biomasse der Mikroorganismen in die Öle eingebracht wurden.

Pentacyclische Terpansäuren ließen sich in allen Ölen in der Fraktion der freien Säuren nachweisen. Mit zunehmender Degradation präsentierten sie komplexere Verteilungsmuster homologer und isomerer Säuren im Bereich von C_{30} bis C_{34} und zeichneten sich durch höhere Konzentrationen aus.

Unklarheiten bestehen bezüglich der relativen Konzentrationen der Stereoisomere in den Hopansäureverteilungen. Da sowohl Verbindungen mit $17\alpha,21\beta$ - und $17\beta,21\alpha$ -Konfiguration als auch mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration bestimmt wurden, stellt sich auch bei diesen Säuren die Frage ihrer Herkunft. Die Kohlenwasserstoffe des Erdöls besitzen zum größten Teil die $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration, während Verbindungen mit $17\beta,21\alpha$ -Konfiguration nur eine sehr untergeordnete Bedeutung haben. Verbindungen mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration fehlen völlig, da sie thermisch nicht stabil sind. Infolgedessen können die Hopancarbonsäuren mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration nicht durch Oxidation eines Erdölkohlenwasserstoffs generiert worden sein, sondern sind wohl als überarbeitete Vorläuferverbindungen (z.B. Oxidation von Bakteriohopantetrol aus der Biomasse abgestorbener Organismen, die an der Biodegradation beteiligt waren) anzusehen. Die Säuren mit $17\alpha,21\beta$ - und $17\beta,21\alpha$ -Konfiguration können dagegen als Metaboliten bei der mikrobiellen Degradation der entsprechenden Hopane gebildet worden sein. Eine abschließende Klärung dieser Frage ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, wahrscheinlich spielen beide Prozesse eine Rolle.

Die stärker degradierten Öle besaßen nur geringe Konzentrationen an Säuren, und diese bestanden fast ausschließlich aus unverzweigten Fettsäuren. Diese Beobachtung deckt

sich mit den Ergebnissen der Laborexperimente. Auch dort ging die stärkere Biodegradation mit der vollständigen Umwandlung der einmal funktionalisierten Alkane einher.

Das Säurespektrum der gebundenen Säuren in den untersuchten Ölen setzte sich aus geradkettigen *n*-Carbonsäuren und einer Vielzahl verzweigter Säuren zusammen, die als *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren, 2-Methylcarbonsäuren und *isoprenoid*-Carbonsäuren identifiziert wurden. Im leicht degradierten Kongo-Öl konnte außerdem eine tricyclische C₂₁-Carbonsäure nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise blieben die Säuren in nahezu allen Proben unabhängig von der Biodegradationsintensität auf den niedermolekularen Bereich beschränkt und wiesen selbst zwischen den verschiedenen Probenreihen nur geringe Unterschiede auf. Leichte Degradation war oftmals mit einem Konzentrationsanstieg der Säuren verbunden, während sich bei mäßigem bis starkem Abbau meist ein recht deutlicher Konzentrationsrückgang verzeichnen ließ. Die Relation zwischen freien und gebundenen Säuren zeigte dagegen keinen eindeutigen Trend, da die gebundenen Säuren teils höhere, teils niedrigere Gehalte aufwiesen als die freien Säuren. Warum gerade diese kurzkettigen Verbindungen in großer Menge in höhermolekulare Bestandteile der degradierten Öle eingebaut wurden, ist nicht klar. Möglicherweise handelt es sich um einen spezifischen Einbau in die eigene Zellstruktur oder eine zellinterne Speicherung durch die erdölabbauenden Bakterien.

Das weitgehende Fehlen von Alkoholen läßt sich wieder durch die rasche Weiteroxidation einmal oxidierten Kohlenwasserstoffe zu Säuren erklären, wie es auch in den Laborexperimenten beobachtet wurde.

Das Auftreten von "hydratisierten" Aromaten ist wohl der erste eindeutige molekulare Hinweis auf den Aromatenabbau in Ölen. Es wurden hydratisiertes Phenanthren, hydratisierte Methyl- und Dimethylphenanthrene, hydratisierte Methyl- und Dimethylfluorene sowie hydratisierte Chrysene nachgewiesen. Dieser Aspekt kann im Augenblick nicht vertieft werden, da diese Verbindungen erst gegen Ende der Arbeit entdeckt wurden und ihre Bedeutung und ihr weiteres Schicksal durch zusätzliche Untersuchungen geklärt werden müssen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Umwandlung von organischem Material durch Mikroorganismen ist einer der bedeutendsten biochemischen Prozesse auf der Erde. Ein Ausschnitt aus der Vielfalt der damit verbundenen Reaktionen ist die bakterielle Oxidation von Kohlenwasserstoffen, die sich in flach versenkten Erdöllagerstätten und in Ölaustritten an der Erdoberfläche ebenso abspielt wie nach dem Einbringen von Erdöl- oder Raffinerieprodukten in das Erdreich durch den Menschen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand einerseits darin, positive Indikatoren für einen beginnenden mikrobiellen Abbau von Lagerstättenölen zu finden, wo dies mit anderen Parametern nicht eindeutig möglich ist. Andererseits wurde versucht, Grundlagen zum Verständnis der molekularen Vorgänge beim bakteriellen Kohlenwasserstoffabbau und damit für die Gewinnung verbesserter Kriterien zur Beurteilung des Erfolgs biologischer Sanierungsverfahren für mineralölverseuchtes Erdreich zu erarbeiten.

Dazu wurde eine Reihe experimenteller Untersuchungen durchgeführt, die sowohl Abbauxperimente mit definierten Einzelverbindungen (*n*-Heptadecan, *n*-Heneicosan und 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan (Phytan)) als auch mit Dieselöl als raffiniertem, im Vergleich zu einem Rohöl verhältnismäßig einfachem Kohlenwasserstoffgemisch umfaßte.

Wie im Zusammenhang mit den mikrobiologischen Aspekten der Biodegradation erwähnt, ist die Wasserlöslichkeit des Substrats von entscheidendem Einfluß auf die Abbauleistung der Mikroorganismen. Die geradkettigen Substanzen *n*-Heptadecan und *n*-Heneicosan ließen sich durch fortschreitende Oxidation von einem Ende der Kette her relativ leicht abbauen. Im Zuge der Degradation wurden nicht nur in wäßrigem Medium lösliche (oder emulgierte) freie und gebundene Metaboliten, sondern auch feste Reaktionsprodukte in Form von Wachsestern gebildet. Obgleich keine Quantifizierung der Stoffwechselprodukte durchgeführt wurde, zeigen die Analysenergebnisse deutlich, daß nicht nur ein erheblicher Anteil der gebildeten Metaboliten, sondern auch eine große Menge des eingesetzten Substrats bereits nach kurzer Versuchsdauer in diese Wachsester eingebaut wurde und somit zumindest vorübergehend dem weiteren Abbau entzogen war.

Auch bei Phytan, einem *isoprenoid*-Kohlenwasserstoff, findet eine Oxidation der endständigen Methylgruppen statt. Da das Molekül asymmetrisch gebaut ist, entstehen durch Oxidation am α - bzw. ω -ständigen Ende die beiden Isomere 3,7,11,15-Tetramethylhexadecancarbonsäure (Phytansäure) und 2,6,10,14-Tetramethylhexadecancarbonsäure (ω -Phytansäure). Hydroxylierung und Bildung von Phytanolen und Phytenolen,

Phytandiolen und möglicherweise Phytantriolen charakterisieren einen anderen, in der Literatur bisher noch nicht beschriebenen Oxidationsweg. Als dominierende Metaboliten traten dabei mit Phytan-3-ol, Phytan-7-ol, Phytan-11-ol und Phytan-15-ol vor allem solche Verbindungen auf, bei denen die Hydroxylierung an den Verzweigungsstellen des Moleküls erfolgte. Einen vergleichbar hohen Anteil erreichte auch das Phytan-1-ol, das als erstes Reaktionsprodukt der terminalen Oxidation während der gesamten Versuchsdauer gebildet wurde. Das Spektrum an Abbauprodukten umfaßte daneben Phytan-2-ol und Phytan-14-ol, die allerdings nur sehr geringe Konzentrationen aufwiesen. Da theoretisch jedes der Kohlenstoffatome eine Hydroxygruppe tragen kann, ist zu vermuten, daß noch weitere Phytanol-Isomere gebildet wurden, die sich aufgrund zu geringer Konzentrationen und möglicher Koelution mit anderen Verbindungen jedoch der analytischen Erfassung entzogen. Einfach ungesättigte Phytenole waren aufgrund der sehr geringen Konzentrationen nur von untergeordneter Bedeutung.

Die bevorzugte Hydroxylierung an den tertiären Kohlenstoffatomen der Methylverzweigungen gilt nicht nur für die Phytanole, sondern in gleicher Weise auch für die Alkohole mit zwei funktionellen Gruppen, die Phytandiole. Als Stoffwechselprodukte konnten Phytan-3,7-diol und Phytan-11,15-diol identifiziert werden. In Analogie zu den Beobachtungen bei den Phytanolen ist auch bei den Phytandiolen das Vorhandensein weiterer Isomere nicht auszuschließen. Ein Retentionszeitvergleich mit einem Phytantriol-Standard deutet die Möglichkeit an, daß sich zusätzlich noch dreiwertige Alkohole während des Degradationsprozesses gebildet haben könnten. Die Massenspektren gestatteten jedoch keine eindeutige Identifizierung dieser Substanzen.

Ebenso wie bei den Experimenten mit *n*-Heptadecan und *n*-Heneicosan traten auch in dieser Versuchsreihe Wachsester als feste Reaktionsprodukte auf. Generell konnten im verseiften Extrakt erheblich mehr Degradationsprodukte nachgewiesen werden als im freien Extrakt. Offensichtlich lag ein großer Teil der Metaboliten in gebundener Form vor und wurde erst durch die Hydrolyse freigesetzt.

Molekulare Aspekte der mikrobiellen Degradation von Dieselöl wurden an zwei verschiedenen Systemen studiert. Beim Dieselöl-Abbau in Batch-Kultur ließen sich bereits nach einer Versuchsdauer von zwei Tagen gaschromatographisch keine *n*-Alkane mehr nachweisen, obwohl ihr Anteil an der Zusammensetzung des Ausgangsöl annähernd 70 % betrug. Die Isoprenoide wiesen Anzeichen geringer mikrobieller Verwertung auf, während sich die wichtigsten aromatischen Kohlenwasserstoffe, sowohl die Naphthaline als auch die Phenanthrene, weitestgehend unverändert präsentierten. Auch nach neunundzwanzig Tagen ließ sich lediglich eine geringfügige Konzentrationsabnahme der

Methylnaphthaline im Verhältnis zu den höher alkylierten Naphthalinen verzeichnen. Aromatische Carbonsäuren traten jedoch zu keinem Zeitpunkt auf.

Der Abbau im zweistufigen Kultursystem wurde seitens des Instituts für Biotechnologie 3 des Forschungszentrums Jülich unter dem Gesichtspunkt eines möglichst hohen Biomasseertrages betrieben, d.h. durch Optimierung wachstumssteuernder Parameter sollte möglichst rasch eine große Zahl dieselölabbauender Bakterien gezüchtet werden. Wegen der im Laufe des Experiments zum Teil beträchtlich variierenden Versuchsbedingungen und der ständigen Substratzufuhr war diese Versuchsführung nur bedingt geeignet, Erkenntnisse über sukzessive Degradation von Dieselöl zu gewinnen.

Überraschenderweise änderte sich mit zunehmender Versuchsdauer in allen Extrakten aus dem Bioreaktor I trotz unterschiedlich starker Degradation das Muster der *n*-Alkanverteilung nur sehr wenig. Dies deutet darauf hin, daß die Bakterien alle Verbindungen im quantifizierten Bereich zwischen C_{15} und C_{32} ohne jegliche Bevorzugung verwerten konnten. Freie Carbonsäuren traten in allen Extrakten aus dem Bioreaktor I auf und zeigten wesentlich komplexere Verteilungsmuster als bei den Versuchen mit Reinsubstanzen und dem Dieselölabbau in Batch-Kultur. Die Kohlenstoffzahl-Verteilung der *n*-Alkane korrelierte jedoch mit der der Carbonsäuren zu keinem Zeitpunkt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des mikrobiellen Abbaus von Reinsubstanzen unterschieden sich die Carbonsäureverteilungen der verseiften Extrakten aus dem Bioreaktor I nur geringfügig von denen der freien Extrakte. Möglicherweise sind diese relativ einheitlichen *n*-Alkan- und Carbonsäureverteilungen auf die gute Versorgung der Mikroorganismen mit Nährstoffen und Substrat zurückzuführen. Bei längerer Versuchsdauer zeigten auch die Naphthaline Anzeichen eines mikrobiellen Abbaus, der sich von den einfach methylierten Derivaten bis zu den höher alkylierten C_3 - und C_4 -Verbindungen nachweisen ließ. Durch Oxidation der Alkylgruppen waren dabei aromatische Carbonsäuren, insbesondere Naphthalin- und Methylnaphthalincarbonsäuren mit zahlreichen Isomeren entstanden.

Die *n*-Alkanverteilungen der Extrakte aus dem Bioreaktor II ließen zwar, wie aufgrund der längeren Reaktionszeit zu erwarten, generell ein weiter fortgeschrittenes Abbaustadium erkennen als die entsprechenden Extrakte aus dem Bioreaktor I, zeigten jedoch noch immer das typische *n*-Alkanmuster des Dieselöls. Stärkere Degradation, die zur Ausbildung von unaufgelösten komplexen Gemischen führte, kennzeichnete auch die Carbonsäureverteilungen der freien Extrakte aus dem Bioreaktor II. Die Anwesenheit von ungesättigten Carbonsäuren im oberen Molekulargewichtsbereich gibt einen Hinweis darauf, daß diese auch bei den Experimenten mit Reinsubstanzen nachgewiesenen Verbindungen keine Artefakte oder Kontaminationen, sondern Stoffwechselprodukte

darstellen. Die Carbonsäuren der verseiften Extrakte unterschieden sich von den zuvor beschriebenen in erster Linie durch leicht erhöhte Relativkonzentrationen. Hydroxycarbonsäuren ließen sich ebenso wie in den Extrakten aus dem Bioreaktor I auch in den Extrakten aus dem Bioreaktor II nur im verseifbaren Anteil nachweisen. Entsprechend der stärkeren Degradation der *n*-Alkane waren auch die Naphthaline der Extrakte aus dem Bioreaktor II stärker angegriffen, die Methylnaphthaline fehlten vollständig. Naphthalincarbonsäuren wurden in dieser Probensequenz jedoch nur in Spuren gefunden. Die Phenanthrene hatten sich in allen Extrakten aus dem Bioreaktor I als sehr stabil erwiesen. Die Extrakte aus dem Bioreaktor II ließen hingegen Veränderungen erkennen, die von leicht erniedrigten Relativkonzentrationen des Phenanthrens und der Methylphenanthrene bis zu vollständigem Verlust des Phenanthrens bei längerer Versuchsdauer reichten. Die Entwicklung bei den Dimethylphenanthrenen war wegen des komplexen Isomerenmusters nicht so einfach zu verfolgen, es hat aber den Anschein, als ob sie durch die Biodegradation in wesentlich geringerem Maße beeinflußt worden seien als Phenanthrene und Methylphenanthrene.

Aufgrund der Versuchsergebnisse erscheint es wenig sinnvoll, den Sanierungserfolg mineralölkontaminierter Böden ausschließlich durch eine Bestimmung der Gehalte an Kohlenwasserstoffen nach DIN 38409 H-18 zu belegen, wie dies immer wieder geschieht. Diese Methode dient nur der summarischen Erfassung der reinen Kohlenwasserstoffe, deren Konzentrationen allein keine umfassenden Aussagen hinsichtlich der Toxizität und der ökologischen Bedenklichkeit gestatten. Streng genommen gilt diese Methode ohnehin nur für Wasserproben, wird in letzter Zeit jedoch auch in zunehmendem Maße für die Untersuchung von Böden herangezogen und scheint sogar in den Diskussionen über die Festlegung von Schadstoff-Grenzwerten eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen.

Nach flüssigkeitschromatographischer Auftrennung enthält das verwendete Dieselöl annähernd 70 % gesättigte Kohlenwasserstoffe, zum größten Teil *n*-Alkane im Bereich von C₉ bis C₃₅ mit einem Maximum bei C₁₅, 28 % aromatische Kohlenwasserstoffe und 2 % Heterokomponenten. Die Werte für leichtes Heizöl dürften in vergleichbarer Größenordnung liegen. Obgleich der Anteil der *n*-Alkane demzufolge sehr hoch ist, wird ihre Toxizität zum gegenwärtigen Zeitpunkt eher als gering eingestuft. Die leichtflüchtigen Komponenten entweichen relativ rasch in die Atmosphäre, während die zurückbleibenden Substanzen in Abhängigkeit von zahlreichen milieubedingten Faktoren durch autochthone Mikroorganismen mehr oder weniger schnell abgebaut bzw. umgewandelt werden. Diese enzymatisch gesteuerten Prozesse sind, chemisch betrachtet, oxidative Reaktionen. Weder die *n*-Alkane noch die durch mikrobielle Degradation aus ihnen entstandenen Stoffwechselprodukte wie Alkohole, Aldehyde oder Carbonsäuren erscheinen

aus toxikologischer Sicht besonders gefährlich. Dies kann von den aromatischen Kohlenwasserstoffen allerdings nicht behauptet werden. Ihnen wird vielfach eine carcinogene Wirkung zugeschrieben.

Die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe des Dieselöls sind im allgemeinen mehrfach durch aliphatische Gruppen substituiert, unsubstituierte Verbindungen treten nur selten auf. Infolgedessen ähnelt das Abbauverhalten dieser aromatischen Kohlenwasserstoffe dem der *n*-Alkane, da zunächst eine Oxidation der Alkylreste erfolgt. Die dabei entstehenden Verbindungen sind vermutlich nicht besonders toxisch. Es ist aber auch bekannt, daß durch die Oxidation der aromatischen Kerne bei den unsubstituierten Verbindungen Epoxide als intermediäre Produkte gebildet werden, die als stark toxisch gelten.

Die Anwendung der DIN 38409 H-18 ermöglicht nur, die Konzentrationsabnahme der ursprünglich in den Boden eingebrachten Stoffe zu verfolgen, während die zum Teil erheblich toxischeren, bei den Aromaten auch wasserlöslichen Abbauprodukte überhaupt nicht erfaßt werden. Zu einer vollständigen Aufnahme des gesamten Schadensbildes gehört daher auch die Analyse von Kohlenwasserstoff-Metaboliten mit polaren Substituenten.

Bei den Laborversuchen zum mikrobiellen Abbau von Reinsubstanzen hatte sich gezeigt, daß ein wesentlicher Teil der Metaboliten in gebundener Form vorliegt und dadurch dem vollständigen Abbau zumindest vorübergehend entzogen ist. Die Untersuchung natürlicher fossiler Kohlenwasserstoffe und ihrer Umwandlungsprodukte in Böden hat die Anreicherung von Metaboliten in gebundener Form bestätigt (Schramedei 1991). Durch die Bindung an Huminstoffe erhöht sich die Persistenz von Metaboliten des unvollständigen Kohlenwasserstoff-Abbaus in Böden noch zusätzlich. So ließ sich nach Jager et al. (1988) bei einer Heizölzumischung von etwa 2,5 % zu einem nicht näher definierten Boden eine toxische Beeinflussung des Pflanzenbewuchses verzeichnen, wobei sich das Ausmaß des Schadens jedoch mit zunehmendem Humusgehalt verringerte. Es empfiehlt sich daher, auch die gebundenen Metaboliten in die Untersuchung mit einzubeziehen, da ohne die exakte Identifizierung dieser Verbindungen keine Aussagen darüber möglich sind, ob sie als unbedenklich eingestuft werden können oder eventuell doch ein Gefährdungspotential besitzen.

Ein allgemeingültiges Abbauschema für Mineralöl existiert nicht. Nach Beobachtungen an natürlich in Lagerstätten degradierten Ölen ist jedoch anzunehmen, daß in den meisten Fällen ein teerartiger Rückstand gebildet wird, den die Mikroorganismen nur noch

schwer verwerten können. Die Mobilität dieses makromolekularen Komplexes ist wohl gering.

In diesem Zusammenhang spielt der große Themenkomplex der mikrobiologischen Sanierung mineralölkontaminierter Böden unter Einsatz speziell gezüchteter Mikroorganismen, die über definierte Abbaufähigkeiten verfügen sollen und zusätzlich zur autochthonen Mikroorganismenvergesellschaftung in den Boden eingebracht werden, eine wichtige Rolle. Die Diskussion über Nutzen und Schaden dieser Sanierungsmethode hält auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch an. So vertreten Stroh & Biener (1988) die Ansicht, daß es oftmals durchaus möglich sei, durch Beseitigung von aktivitätshemmenden Faktoren wie beispielsweise Mineralstoff- und Sauerstofflimitierungen die Abbauleistung der standorteigenen Mikroorganismen erheblich zu erhöhen. Sie halten dies und nicht die Zugabe adaptierter Biomasse für die entscheidende Voraussetzung, die für Erfolg oder Mißerfolg einer mikrobiologischen Bodensanierung verantwortlich ist. Schwefer & Weirich (1988) sind ebenfalls der Auffassung, daß bei ausreichender Versorgung der autochthonen Mikroorganismen auf den Einsatz allochthoner Kulturen verzichtet werden kann, die in der Regel ohnehin nicht optimal an die gegebenen Milieubedingungen angepaßt seien und deren Überlebenschancen nicht eindeutig hätten nachgewiesen werden können. Gleichzeitig berichten sie, daß in den USA gute Erfolge bei der Behandlung von Bohrschlämmen erzielt werden konnten, nachdem sich die Organismen in einer relativ langen Adaptationszeit an die neuen Milieubedingungen angepaßt hatten. Schübler (1988) hält eine Zugabe spezieller Bakterienpopulationen dann für geboten, wenn die Verunreinigung des Bodens erst vor so kurzer Zeit erfolgt ist, daß vermutlich noch keine Adaptation der standorteigenen Organismen stattgefunden hat oder die Schadstoffkonzentration im toxischen Bereich liegt. Von großer Bedeutung für die Bewertung der Degradationsfähigkeit speziell gezüchteter Kulturen ist deren physiologischer Zustand, da durch ungünstige Bedingungen während der Biomasseproduktion, aber auch während der Konservierung, der Lagerung und Reaktivierung bestimmte Eigenschaften verloren gehen können (Rittich 1992).

Ein Beispiel ihrer Leistungsfähigkeit geben Mikroorganismen bei dem natürlichen Abbau von Kohlenwasserstoffen in Erdöllagerstätten, der erhebliche Ausmaße annehmen kann. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher mehrere Serien von Erdölen aus verschiedenen Erdölprovinzen (Nigeria, Kongo, Powder River-Becken (Montana), Santa Maria-Becken (Kalifornien), Venezuela, Viking-Graben (Nordsee) und Broistedt-Gifhorner Trog (Norddeutschland)) auf Stoffwechselprodukte mikrobieller Aktivität, insbesondere freie und gebundene Carbonsäuren und Alkohole, untersucht. Um Unterschiede der Metabolitenverteilungen in Abhängigkeit von der Intensität der mikrobiellen Ver-

wertung der Kohlenwasserstoffe erfassen zu können, wurden die Öle der einzelnen Serien so ausgewählt, daß sie aus demselben Muttergestein stammten, jedoch unterschiedlich stark biodegradiert waren.

Die freien Säuren umfaßten ein recht breites Spektrum an Verbindungen, das sich aus geradkettigen, einfach und mehrfach verzweigten Säuren sowie tricyclischen und pentacyclischen Säuren zusammensetzte. In den nicht degradierten Ölen dominierten die geradkettigen Säuren, deren Verteilung die der *n*-Alkane nachzeichnete. Dabei erreichten die geradzahligen Homologe generell höhere Konzentrationen als die ungeradzahligen. Als wichtigste Einzelkomponenten traten in den Massenchromatogrammen $C_{16:0}$ -Carbonsäure und $C_{18:0}$ -Carbonsäure auf. Die verzweigten Säuren waren durch eine homologe Reihe von 2-Methylcarbonsäuren sowie Pristan- und Phytansäure vertreten. Bei den tricyclischen Terpansäuren konnten Isomere von C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Säure nachgewiesen werden. Pentacyclische Terpansäuren eluierten mit zahlreichen Homologen und Isomeren im Kohlenstoffzahl-Bereich zwischen C_{30} und C_{33} , es dominierten die Verbindungen mit $17\alpha,21\beta$ -Konfiguration. Das komplette Säurespektrum konnte nicht in allen Ölen beobachtet werden, gelegentlich fehlte die eine oder andere Substanzklasse. Die *n*-Carbonsäuren waren jedoch in allen Proben vertreten.

Steigende Biodegradationsintensität ging in vielen Fällen mit einer zunehmenden Komplexität der Säureverteilungen einher, ohne daß sich jedoch zwischen nicht und leicht degradierten Ölen gravierende Änderungen des Säurespektrums hätten verzeichnen lassen. Vielmehr ließ sich innerhalb der einzelnen Probenserien meist eine relativ kontinuierliche Entwicklung verfolgen. Diese Beobachtung gibt Anlaß zu der Vermutung, daß aufgrund der Gesamtölmessungen und der Biomarkerverteilungen als nicht degradiert eingestufte Öle doch schon in der Lagerstätte oder, wo dies aufgrund der Reservoirteufe nicht möglich ist, während des Förderprozesses oder der Lagerung leicht biodegradiert wurden. Die in diesen Ölen nachgewiesenen Säuren sind daher nicht als originäre Säuren zu betrachten. Außerdem erscheint es recht unwahrscheinlich, daß diese Verbindungen unter den Druck- und Temperaturbedingungen der Katagenese hätten stabil bleiben können.

Leichte Degradation kann zu Säureverteilungen führen, wie sie auch in stark degradierten Ölen auftreten. Diese bestehen meist nur aus unverzweigten Fettsäuren, die nicht selten eine Bevorzugung der geradzahligen Homologen zeigen und nur den niedermolekularen Bereich umfassen.

Leichte bis mäßige Degradation war bei den untersuchten Probenserien oftmals durch

das Vorkommen methylverzweigter Carbonsäuren gekennzeichnet, die mit zahlreichen Homologen auftraten und als Indikatoren dieser Biodegradations-Stufe geeignet erscheinen. Neben den auch in den nicht degradierten Ölen nachgewiesenen 2-Methylcarbonsäuren handelt es sich dabei um 3-, 4- und 5-Methylcarbonsäuren. Diese Verbindungen wiesen aufgrund der schlechteren Metabolisierbarkeit der verzweigten Kohlenwasserstoffe und der dadurch bedingten relativen Anreicherung ihrer Abbauprodukte zum Teil erheblich höhere Konzentrationen auf als die geradkettigen Säuren. In wesentlich geringerer Konzentration eluierten daneben auch *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren, die ebenfalls als Indikatoren für leichte bis mäßige Biodegradation geeignet erscheinen.

Die Herkunft der Terpancarbonsäuren konnte nicht eindeutig geklärt werden, weder die der tricyclischen noch die der pentacyclischen Säuren. Möglicherweise sind sie nicht als Abbauprodukte von Kohlenwasserstoffen, sondern als mikrobiell überarbeitete Vorläuferverbindungen aus der Biomasse abgestorbener erdölabbauender Bakterien zu verstehen. Damit läßt sich auch erklären, warum bei den tricyclischen Säuren mit C_{21} -, C_{24} - und C_{26} -Carbonsäure nur so wenige Spezies nachgewiesen werden konnten. Bei den Hopancarbonsäuren, deren Verteilungen relativ komplexe Muster homologer und isomerer Verbindungen im Kohlenstoffzahl-Bereich zwischen C_{30} und C_{34} aufwiesen, wurden sowohl Säuren mit $17\alpha,21\beta$ - und $17\beta,21\alpha$ -Konfiguration als auch mit $17\beta,21\beta$ -Konfiguration identifiziert. Letztere sind mit Sicherheit nicht durch Oxidation eines Erdölkohlenwasserstoffes entstanden, da Hopane dieser Konfiguration thermisch nicht stabil sind und im Erdöl nicht auftreten.

Im Gegensatz zu den freien Säuren blieben die gebundenen Säuren in nahezu allen Proben unabhängig von der Biodegradationsintensität auf den niedermolekularen Bereich beschränkt und wiesen selbst zwischen den verschiedenen Probenserien nur geringe Unterschiede auf. Das Säurespektrum war ein wenig begrenzter als in den freien Säuren und enthielt neben geradkettigen Carbonsäuren eine Vielzahl verzweigter Säuren, wie *iso*- und *anteiso*-Carbonsäuren, 2-Methylcarbonsäuren und *isoprenoid*-Carbonsäuren. Im leicht degradierten Kongo-Öl konnte außerdem eine tricyclische C_{21} -Carbonsäure nachgewiesen werden. Leichte Degradation war in vielen Fällen mit einem Konzentrationsanstieg verbunden, während sich bei mäßigem bis starken Abbau meist ein recht deutlicher Konzentrationsrückgang verzeichnen ließ. Das Verhältnis der Gesamtkonzentrationen an freien und gebundenen Säuren bot ein uneinheitliches Bild, da die freien Säuren sowohl höhere als auch niedrigere Gehalte aufwiesen als die gebundenen Säuren.

Alkohole fehlten in den analysierten Ölen bis auf wenige geradkettige Spezies, da sie relativ rasch zu Säuren weiteroxidiert werden, wie es auch in den Laborexperimenten zum

mikrobiellen Abbau von Reinsubstanzen beobachtet wurde. Trotz relativ hoher Gehalte an Phytan konnten keine Phytanole nachgewiesen werden, obwohl dies nach den Versuchsergebnissen durchaus zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise ist dies aber auch eine Frage der Konzentration, so daß der Nachweis von Phytanolen bei stärkerer Anreicherung eventuell doch möglich ist.

Schließlich wurden in den biodegradierten Ölen "hydratisierte" Aromaten gefunden, die wohl als erster eindeutiger molekularer Hinweis auf den Aromatenabbau in Ölen gewertet werden dürfen. Die nachgewiesenen Verbindungen umfaßten hydratisiertes Phenanthren, hydratisierte Methyl- und Dimethylphenanthrene, hydratisierte Methyl- und Dimethylfluorene sowie hydratisierte Chrysene. In gleicher Weise wie die Methylcarbonsäuren sind diese Verbindungen als Indikatoren leichter bis mäßiger Biodegradation zu verwenden. Die vielfältigen Aspekte dieser Substanzen können im Augenblick nicht näher beleuchtet werden, hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

LITERATURVERZEICHNIS

- Appel, D., Haas, D., Horchler, D. & van Straaten, L. (1987) Grundsätze für die Bewertung von Verdachtsflächen. *Schriftenreihe des Bundesverbandes Deutscher Geologen Heft 2*, Bonn.
- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180-209.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. (1972) Biodegradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechn. Bioeng.* 14, 309-318.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. (1973) Fate and effects of polluting petroleum in the marine environment. *Residue Rev.* 49, 49-85.
- Atlas, R.M., Boehm, P.D. & Calder, J.A. (1981) Chemical and biological weathering of oil, from the Amoco Cadiz spillage, within the littoral zone. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 12, 589-608.
- Bachofen, R. (1982) The production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38, 47-49.
- Bartha, R. & Atlas, R.M. (1987) Transport and transformation of petroleum: biological processes. In *Long-Term Environmental Effects of Offshore Oil and Gas Development* (eds. Boesch, D.F. & Rabalais, N.N.) Elsevier Applied Science, London, 287-341.
- Battermann, G. (1988) Praktische Erfahrungen bei hydraulischen Sanierungsmaßnahmen. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 1021-1043.
- Battermann, G. & Werner, P. (1984) Beseitigung einer Untergrundkontamination mit Kohlenwasserstoffen durch mikrobiellen Abbau. *gwf-wasser/abwasser* 125, 366-373.
- Beerstecher, E. (1954) *Petroleum Microbiology*. Elsevier Press, New York.
- Behar, F.H. & Albrecht, P. (1984) Correlations between carboxylic acids and hydrocarbons in several crude oils. Alteration by biodegradation. *Org. Geochem.* 6, 597-604.
- Berry, D.F., Francis, A.F. & Bollag, J.-M. (1987) Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51, 43-59.
- Boigk, H. (1981) *Erdöl und Erdgas in der Bundesrepublik Deutschland*. Enke Verlag, Stuttgart.
- Blumer, M. & Cooper, W.J. (1967) Isoprenoid acids in recent sediments. *Science* 158, 1463-1464.
- Boon, J.J., de Leeuw, J.W. & Schenck, P.A. (1975) Organic geochemistry of Walvis Bay diatomaceous ooze-I. Occurrence and significance of the fatty acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 39, 1559-1565.
- Boon, J.J., Liefkens, W., Rijpstra, W.I.C., Baas, M. & de Leeuw, J.W. (1978) Fatty acids of *Desulfovibrio desulfuricans* as marker molecules in sedimentary environments. In *Environmental biogeochemistry and geomicrobiology 1*, (ed. Krumbein, W.E.), Ann Arbor Science Publ., 355-372.

Boulton, C.A. & Ratledge, C. (1984) The physiology of hydrocarbon-utilizing micro-organisms. In *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology 9* (ed. Wiseman, A.), Ellis Horwood, Chichester, 11-77.

Britton, L.N. (1984) Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Organic Compounds (Microbiology Series 13)* (ed. Gibson, D.T.), Marcel Dekker, New York and Basel, 89-129.

Brooks, P.W., Fowler, M.G. & Macqueen, R.W. (1988) Biological marker and conventional organic geochemistry of oil sands/heavy oils, Western Canada Basin. *Org. Geochem.* 12, 519-538.

Bühler, M. & Schindler, J. (1984) Aliphatic hydrocarbons. In *Biotechnology 6a: Biotransformations* (ed. Kieslich, K.), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 329-385.

Büning-Pfaue, H. & Rehm, H.-J. (1972) Aldehydgewinnung aus der "batch"-Fermentation von *Pseudomonas aeruginosa* beim Abbau von Decanol. *Arch. Microbiol.* 86, 231-240.

Bundesminister des Innern (Hrsg.) Bodenschutzkonzeption der Bundesregierung. Bundestagsdrucksache 10/2977 vom 7. März 1985.

Bundestagsdrucksache 11/4104 vom 1.3.1989: Antwort der Bundesregierung auf die Große Anfrage "Altlasten".

California Division of Oil and Gas (1991) California oil and gas fields, vol. II. California Department of Conservation Division of Oil and Gas, Publication TR 12, 3rd edition.

Cason, J. & Graham, D.W. (1965) Isolation of isoprenoid acids from a California petroleum. *Tetrahedron* 21, 471-483.

Cerniglia, C.E. (1981) Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae. In *Reviews in Biochemical Toxicology 3* (eds. Hodgson, E., Bend, J.R. & Philpot, R.M.), Elsevier, New York, 321-361.

Chosson, P., Lanau, C., Connan, J. & Dessort, D. (1991) Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature* 351, 640-642.

Chosson, P., Connan, J., Dessort, D. & Lanau, C. (1992) In vitro biodegradation of steranes and terpanes: a clue to understanding geological situations. In *Biological Markers in Sediments and Petroleum* (eds. Moldowan, J.M., Albrecht, P. & Philp, R.P.), Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 320-349.

Connan, J. (1984) Biodegradation of crude oils in reservoirs. *Advances in Petroleum Geochemistry 1*, Academic Press, London, 299-335.

Connan, J. (1987) Biodegradation of crude oils in reservoirs. *Proc. Inst. Petr. 1: Microb. Probl. Offshore Oil Ind.*, London, 49-55.

Connan, J. & Restlé, A. (1984) La biodégradation des hydrocarbures dans les réservoirs. *Bull. Centres Rech. Explor.-Prod. Elf-Aquitaine* 8, 291-302.

Cyr, T.D. & Strausz, O.P. (1982) The structures of tricyclic terpenoid carboxylic acids and their parent alkanes in the Alberta oil sands. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1028-1030.

Cyr, T.D. & Strausz, O.P. (1984) Bound carboxylic acids in the Alberta oil sands. *Org. Geochem.* 7, 127-140.

Dalyan, U., Harder, H. & Höpner, Th. (1990a) Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part II. pH values. *Erdöl und Kohle* 43, 337-342.

Dalyan, U., Harder, H. & Höpner, Th. (1990b) Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part III. Temperature. *Erdöl und Kohle* 43, 435-437.

Davis, J.B. (1967) *Petroleum Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, London, New York.

Demaison, G.J. (1977) Tar sands and supergiant oil fields. *AAPG Bulletin* 61, 1950-1961.

Derenne, S., Largeau, C. & Casadevall, E. (1991) Occurrence of tightly bound isoprenoid acids in an algal, resistant biomacromolecule: possible geochemical implications. *Org. Geochem.* 17, 597-602.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, DIN 38409 Teil 18, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H), Bestimmung von Kohlenwasserstoffen (H 18), Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1981.

Douglas, A.G., Blumer, M., Eglinton, G. & Douraghi-Zadeh, K. (1971) Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of naturally-occurring acyclic isoprenoid carboxylic acids. *Tetrahedron* 27, 1071-1092.

Eglinton, G., Douglas, A.G., Maxwell, J.R., Ramsay, J.N. & Stållberg-Stenhagen, S. (1966) Occurrence of isoprenoid fatty acids in the Green River Shale. *Science* 153, 1133-1135.

Eglinton, G. & Hamilton, R.J. (1967) Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322-1335.

Ehresmann, J. & Stroh, D. (1988) Entwicklung der Dichtwandtechnik - gezeigt am Ausführungsbeispiel der SAD Gerolsheim. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.) EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 999-1012.

Ekweozor, C.M. & Strausz, O.P. (1982) 18,19-Bisnor-13 β H,14 α H-cheilanthane: a novel degraded tricyclic sesterterpenoid-type hydrocarbon from the Athabasca oil sands. *Tetrahedron Lett.* 23, 2711-2714.

Enseling, A. & Krings, W. (1988) Verfestigung kontaminierter Böden und Ablagerung auf der Deponie. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 1013-1020.

Fedorak, P.M. & Westlake, D.W.S. (1981) Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by capillary gas chromatography. *Can J. Microbiol.* 27, 432-443.

Fischer, D. (1990) Mikrobielle Verwertung von frischem und gebrauchtem Motorenöl unter aeroben und nitratreduzierenden Bedingungen. *Schriftenreihe der Sektion Angewandte Mikrobiologie und Hygiene, Universität des Saarlandes, Medizinische Fakultät, Heft 5*, Homburg/Saar.

Föste, W. (1990) *Altlasten*. Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main.

Franzius, V. (1989) Stand und Entwicklung von Bodensanierungsverfahren. *Umwelttechnik Berlin, Sonderheft 3*, 5-6.

Freidieker, D. & Strechel, S. (1988) Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Dieselöl durch selektierte und autochthone Mischkulturen. In *Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Kohlenwasserstoffen, Veröffentlichungen aus dem Fachgebiet Hygiene der Technischen Universität Berlin und dem Institut für Hygiene der Freien Universität Berlin 2*, Berlin, 21-123.

Fuhs, G.W. (1961) Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen. *Arch. Mikrobiol.* 39, 374-422.

Gläser, E. & Beiting, E. (1988) Einsatz einer mobilen Verbrennungsanlage bei der Sanierung einer PCB-haltigen Bauschuttdeponie. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 823-844.

Golwer, A. & Wallhäußer, K.H. (1985) Mikrobiologische und chemische Untersuchungen bei Unfällen mit Mineralölprodukten. *Erdöl und Kohle* 38, 70-80.

Goodwin, N.S., Park, P.J.D. & Rawlinson, A.P. (1983) Crude oil biodegradation under simulated and natural conditions. In *Advances in Organic Geochemistry 1981* (ed. Bjoroy, M. et al.), Wiley, Chichester, 650-658.

Harder, H. & Höpner, Th. (1991) Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part V. Moisture. *Erdöl und Kohle* 44, 329-332.

Harder, H., Kürzel-Seidel, B. & Höpner, Th. (1991) Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part IV. Special aspects of nutrient demand. *Erdöl und Kohle* 44, 59-62.

Haug, P., Schnoes, H.K. & Burlingame, A.L. (1967) Isoprenoid and dicarboxylic acids isolated from Colorado Green River Shale (Eocene). *Science* 158, 772-773.

Henke, G.A. (1989) Optimierte biologische Bodensanierung kontaminierter Standorte. *WLB Wasser Luft Boden* 3, 54-55.

Higgins, I.J. & Gilbert, P.D. (1978) The biodegradation of hydrocarbons. In *The Oil Industry and Microbial Ecosystems, Proceedings of the Meeting 1977* (eds. Chater, K.W.A. & Somerville, H.J.), Heyden, London, 80-117.

Hilker, J. (1989) Beurteilung des Sanierungserfolgs einer biologischen Bodenreinigung. *WLB Wasser Luft Boden* 5, 58-61.

Holland, K.J. & Straßer, H. (1993) Bewertung von Altlasten hinsichtlich der Flächennutzung und Raumplanung. In *Handbuch der Altlastensanierung* (Hrsg. Franzius, V., Stegmann, R., Wolf, K. & Brandt, E.), R. von Decker's Verlag, G. Schenck, Heidelberg, Kap. 4.1.7.

Howell, V.J., Connan, J. & Aldridge, A.K. (1984) Tentative identification of demethylated tricyclic terpanes in nonbiodegraded and slightly biodegraded crude oils from the Los Llanos Basin, Colombia. *Org. Geochem.* 6, 83-92.

Hunt, J.M. (1979) *Petroleum Geochemistry and Geology*. Freeman, San Francisco.

Isaacs, C.M. (1992) Preliminary petroleum geology background and well data for oil

- samples in the Cooperative Monterey Organic Geochemistry Study, Santa Maria and Santa Barbara-Ventura basins, California. *U.S. Geological Survey Open-File Report 92-539F*.
- Jäger, J., Messerschmidt, K. & Tiebel, Ch. (1988) Kompostierung kontaminierter Böden. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 727-737.
- Jiang, Z., Fowler, M.G., Lewis, C.A. & Philp, R.P. (1990) Polycyclic alkanes in a biodegraded oil from the Kelamayi oilfield, northwestern China. *Org. Geochem.* 15, 35-46.
- Jones, D.M., Douglas, A.G., Parkes, R.J., Taylor, J., Giger, W. & Schaffner, C. (1983) The recognition of biodegraded petroleum-derived aromatic hydrocarbons in recent marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 103-108.
- Kaufman, T.S., Gonzalez-Sierra, M. & Ruveda, E.A. (1988) Synthesis of an Alberta oil sand bitumen C₂₀ tricyclic carboxylic acid bearing a novel diterpenoid skeleton. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2323-2327.
- Kawamura, K., Tannenbaum, E., Huizinga, B.J. & Kaplan, I.R. (1986) Long-chain carboxylic acids in pyrolysates of Green River kerogen. *Org. Geochem.* 10, 1059-1065.
- Kolattukudy, P.E. (ed.) (1976) *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
- Kommunalverband Ruhrgebiet (Hrsg.) (1989) Erfassung möglicher Bodenverunreinigungen auf Altstandorten. *Arbeitshefte Ruhrgebiet A 039*, Essen.
- Lotter, S., Stegmann, R. & Heerenklage, J. (1990) Grundlegende Untersuchungen zur Optimierung der biologischen Reinigung kontaminierter Böden. In *Altlastensanierung '90, 3. Int. KfK/TNO-Kongress über Altlastensanierung* (Hrsg. Arendt, F. Hinsenveld, M. & van den Brink, W.J.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1071-1078.
- Malins, D.C. (ed.) (1977) *Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms. Vol. I. Nature and Fate of Petroleum*, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Markovetz, A.J. (1971) Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 1, Cleveland, 225-237.
- Maxwell, J.R., Cox, R.E., Eglinton, G., Pillinger, C.T., Ackman, R.G. & Hooper, S.N. (1973) Stereochemical studies of acyclic isoprenoid compounds. II-The role of chlorophyll in the derivation of isoprenoid-type acids in a lacustrine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 37, 297-313.
- McAuliffe, C.D. (1980) The multiple gas-phase equilibration method and its application to environmental studies. In *Petroleum in the Marine Environment (Advances in Chemistry Series 185)* (eds. Petrakis, L. & Weiss, F.T.), American Chemical Society, Washington D.C., 193-218.
- McGill, W.B., Rowell, M.J. & Westlake, D.W.S. (1981) Biochemistry, ecology, and microbiology of petroleum components in soil. In *Soil Biochemistry* 5 (eds. Paul, E.A. & Ladd, J.N.), Marcel Dekker, New York and Basel, 229-296.
- McGregor, A.A. & Biggs, C.A. (1970) Bell Creek Field, Montana: a rich stratigraphic

trap. *AAPG Memoir* 14, 128-146.

Mc Kenna, E.J. (1972) Microbial metabolism of normal and branched chain alkanes. In *Degradation of Synthetic Organic Molecules in the Biosphere, Proceedings of a Conference, San Francisco, California June 12-13, 1971*, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 73-97.

McKirdy, D.M., Aldridge, A.K. & Ypma, P.M.J. (1983) A geochemical comparison of some crude oils from pre-ordovician carbonate rocks. In *Advances in Organic Geochemistry 1981* (ed. Bjoroy, M. et al.), Wiley, Chichester, 99-107.

Milner, C.W.D., Rogers, M.A. & Evans, C.R. (1977) Petroleum transformations in reservoirs. *J. Geochem. Explor.* 7, 101-153.

Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten des Landes Nordrhein-Westfalen (Hrsg.) (1985) Hinweise zur Ermittlung von Altlasten - Erfassung, Erstbewertung, Untersuchung und Beurteilung von Altablagerungen und gefahrverdächtigen Altstandorten-.

Moldowan, J.M., Lee, C.Y., Sundararaman, P., Salvatori, T., Alajbeg, A., Gjukic, B., Demaison, G.J., Slougui, N.-E. & Watt, D.S. (1992) Source correlation and maturity assessment of select oils and rocks from the Central Adriatic Basin (Italy and Yugoslavia). In *Biological Markers in Sediments and Petroleum* (eds. Moldowan, J.M., Albrecht, P. & Philp, R.P.), Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 370-401.

Murphy, R.C., Djuricic, M.V., Markey, S. & Biemann, K. (1969) Acidic components of Green River Shale identified by a gas chromatography-mass spectrometry-computer system. *Science* 165, 695-697.

Nakajima, K., Sato, A., Misono, T., Iida, T. & Nagayasu, K. (1974) Microbial oxidation of the isoprenoid alkane pristane. *Agric. Biol. Chem.* 38, 1859-1865.

Nakajima, K., Sato, A., Takahara, Y. & Iida, T. (1985) Microbial oxidation of isoprenoid alkanes, phytane, norpristane and farnesane. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1993-2002.

Orr, W.L. (1986) Kerogen/asphaltene/sulphur relationships in sulfur-rich Monterey oils. *Org. Geochem.* 10, 499-516.

Palmer, S. (1984) Effects of water washing on C₁₅₊ hydrocarbon fraction of crude oils from Northwest Palawan, Philippines. *AAPG Bulletin* 68, 137-149.

Perry, J.J. (1979) Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 43, 59-72.

Perry, J.J. (1984) Microbial metabolism of cyclic alkanes. In *Petroleum Microbiology* (ed. Atlas, R.M.), Macmillan, New York, 61-97.

Peters, K.E. & Moldowan, J.M. (1991) Effects of source, thermal maturity, and biodegradation on the distribution and isomerization of homohopanes in petroleum. *Org. Geochem.* 17, 47-61.

Pfaender, F.K. & Buckley III, E.N. (1984) Effects of petroleum on microbial communities. In *Petroleum Microbiology* (ed. Atlas, R.M.), Macmillan, New York, 507-536.

Philippi, G.T. (1977) On the depth, time and mechanism of origin of the heavy to medium-gravity naphthenic crude oils. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41, 33-52.

- Philp, R.P. & Gilbert, T.D. (1980) Application of computerized gas chromatography-mass spectrometry to oil exploration in Australia. *APEA Journal* 20, 221-228.
- Pirnik, M.P. (1977) Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 5, Cleveland, 413-422.
- Püttmann, W. (1988) Analytik des mikrobiellen Abbaus von Mineralölen in kontaminierten Böden. In *Altlastensanierung '88, 2. Int. TNO/BMFT-Kongress über Altlastensanierung* (Hrsg. Wolf, K., van den Brink, W.J. & Colon, F.J.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 189-200.
- Radke, M. (1987) Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. *Advances in Petroleum Geochemistry* 2, Academic Press, London, 141-207.
- Radke, M., Willsch, H. & Welte, D.H. (1980) Preparative hydrocarbon group type determination by automated medium pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.* 52, 406-411.
- Rat von Sachverständigen für Umweltfragen (1989) Sondergutachten "Altlasten", Metzler-Poeschel, Stuttgart.
- Ratledge, C. (1978) Degradation of aliphatic hydrocarbons. In *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons 1* (ed. Watkinson, R.J.), Applied Science Publishers, London, 1-46.
- Raymond, R.L., Jamison, V.W. & Hudson, J.O. (1971) Hydrocarbon cooxidation in microbial systems. *Lipids* 6, 453-457.
- Reed, W.E. (1977) Molecular compositions of weathered petroleum and comparison with its possible source. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41, 237-247.
- Rehm, H.J. (1988) Mikrobiologie und Biochemie der Kohlenwasserstoffe. In *Angewandte Mikrobiologie der Kohlenwasserstoffe in Industrie und Umwelt* (Hrsg. Bartz, W.J.), expert verlag, Ehningen, 1-17.
- Rehm, H.J. & Reiff, I. (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. In *Reactors and Reactions (Advances in Biochemical Engineering 19)*, Springer Verlag, Berlin, 175-215.
- Requejo, A.G. & Halpern, H.I. (1989) An unusual hopane biodegradation sequence in tar sands from the Pt Arena (Monterey) Formation. *Nature* 342, 670-673.
- Ribbons, D.W. & Eaton, R.W. (1982) Chemical transformations of aromatic hydrocarbons that support the growth of microorganisms. In *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants* (ed. Chakrabarty, A.M.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 59-84.
- Ripper, P. (1990) Sanierung des Altölraffineriestandortes Pintsch-Öl Hanau. Stand der Sanierungsarbeiten und der Pilotversuche. In *Neuer Stand der Sanierungstechniken von Altlasten* (Hrsg. Lühr, H.-P.), IWS-Schriftenreihe 10, Erich Schmidt Verlag, Berlin, 147-165.
- Ripper, P. & Riss, A. (1988) Standortssituation und Sanierungskonzepte beim kontaminierten Wohngebiet Pionierpark Mülheim am Main. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin 485-504.

- Ripper, P. & Früchtenicht, H. (1989) Umweltschadensfall Pintsch-Öl Hanau: Erste Sanierungsschritte eingeleitet. *WLB Wasser Luft Boden* 4, 60-63.
- Ripper, P., Früchtenicht, H. & Scharpff, H.-J. (1988) Umweltschadensfall Pintsch-Öl Hanau. *wlb wasser luft betrieb* 6, 60-63.
- Rittich, S. (1992) Untersuchungen zum aeroben Abbau phenolischer Verbindungen durch Bakterien unter Berücksichtigung ökologisch und physiologisch relevanter Faktoren. Dissertation RWTH Aachen.
- Rohns, H.-P. (1992) Kontinuierliche Produktion mineralölabbauender Mikroorganismen zum Einsatz in biotechnologischen Sanierungen kontaminierter Standorte. Dissertation RWTH Aachen.
- Rowland, S.J. Alexander, R., Kagi, R.I., Jones, D.M. & Douglas, A.G. (1986) Microbial degradation of aromatic components of crude oils: a comparison of laboratory and field observations. *Org. Geochem.* 9, 153-161.
- Rubinstein, J. (1977) The origin of the oil sand bitumens of Alberta: a chemical and a microbiological simulation study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41, 1341-1353.
- Rudat, D. (1988) Systeme zur Zwischenlagerung von kontaminiertem Material aus Altlasten. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 951-972.
- Rullkötter, J. & Wendisch, D. (1982) Microbial alteration of 17 α (H)-hopanes in Madagascar asphalts: removal of C-10 methyl group and ring opening. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46, 1545-1553.
- Schäfer-Ridder, M. (1979) Carcinogenese durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 27, 4-6.
- Schaefer, R.G. & Leythaeuser (1979) Analysis of trace amounts of hydrocarbons (C_2 - C_8) from rock and crude oil samples and its application in petroleum geochemistry. In *Advances in Organic Geochemistry 1979* (eds. Douglas, A.G. & Maxwell, J.R.), Pergamon Press, Oxford.
- Schink, B. (1989) Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen. *Erdöl und Kohle* 42, 116-118.
- Schlegel, H.G. (1985) Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schramedei, R. (1991) Quantitative und qualitative Analyse von fossilen Kohlenwasserstoffen und ihren Umwandlungsprodukten in Böden aus Posidonienschiefer (Ith-Hils-Mulde). Dissertation Universität Köln.
- Schübler, H. (1986) Mineralöl biochemisch zersetzt. *Umwelt* 4, 292-296.
- Schübler, H. (1988) Mikrobiologische Sanierung kontaminierter Böden und Grundwässer. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.) EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 701-712.
- Schübler, H. & Webb, L. Erfahrungen mit der biologischen Aufbereitung von mineralölbelastetem Erdreich und Grundwasser. *Korresp. Abwasser* 3, 236-241.
- Schwefer, H.-J. & Weirich, G. (1988) Biologische in situ-Sanierungsverfahren - Anwen-

- dungsbeispiele aus Europa und USA. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 675-684.
- Schwennicke, A. & Lange, N. (1990) Praktische Erfahrungen beim Abbau der oberen Abdeckung der Deponie Georgswerder. *WLB Wasser Luft Boden 4*, 64-67.
- Seifert, W.K. (1975) Carboxylic acids in petroleum and sediments. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 32*, Springer Verlag, Wien, New York, 1-49.
- Seifert, W.K. & Moldowan, J.M. (1979) The effect of biodegradation on steranes and terpanes in crude oils. *Geochim. Cosmochim. Acta 43*, 111-126.
- Seifert, W.K., Moldowan, J.M. & Demaison, G.J. (1984) Source correlation of biodegraded oils. *Org. Geochem. 6*, 633-643.
- Singer, M.E. & Finnerty, W.R. (1984) Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In *Petroleum Microbiology* (ed. Atlas, R.M.), Macmillan, New York, 1-59.
- Snowdon, L.R. & Powell, T.G. (1979) Families of crude oils and condensates in the Beaufort-Mackenzie Basin. *Bull. Can. Pet. Geol. 27*, 139-162.
- Spillmann, P. (Hrsg.) (1986) Wasser- und Stoffhaushalt von Abfalldeponien und deren Wirkungen auf Gewässer. *DFG-Forschungsbericht*, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida.
- Stegmann, R. (1990) Reinigung kontaminierter Böden - Sonderforschungsbereich 188 der DFG. In *Altlastensanierung '90. 3. Int. KfK/TNO-Kongress über Altlastensanierung* (Hrsg. Arendt, F., Hinsenveld, M. & van den Brink, W.J.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 985-986.
- Stewart, J.E. & Kallio, R.E. (1959) Bacterial hydrocarbon oxidation. II. Ester formation from alkanes. *J. Bacteriol. 78*, 726-730.
- Stewart, J.E., Kallio, R.E., Stevenson, D.P., Jones, A.C. & Schissler, D.O. (1959) Bacterial hydrocarbon oxidation. I. Oxidation of n-hexadecane by a gram-negative coccus. *J. Bacteriol. 78*, 441-448.
- Stroh, D. & Biener, E. (1988) Sanierungstechniken für Altlasten. In *Altlasten 2* (Hrsg. Thomé-Kozmiensky, K.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin, 603-618.
- Stroh, D., Niemeyer, T. & Viedt, H. (1990) Erfahrungen mit der biologischen Bodensanierung. In *Altlastensanierung '90. 3. Int. KfK/TNO-Kongress über Altlastensanierung*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1051-1062.
- Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Derenne, S. & Largeau, C. (1989) A reappraisal of kerogen formation. *Geochim. Cosmochim. Acta 53*, 3103-3106.
- Teschner, M. & Wehner, H. (1985) Chromatographic investigations on biodegraded oils. *Chromatographia 20*, 407-416.
- Tissot, B.P. & Welte, D.H. (1984) Petroleum Formation And Occurrence. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 2nd edition.
- Tornabene, T.G. (1982) Microorganisms as hydrocarbon producers. *Experientia 38*, 43-46.

Trudgill, P.W. (1984) Microbial degradation of the alicyclic ring. In *Microbial Degradation of Organic Compounds (Microbiology Series 13)* (ed. Gibson, D.T.), Marcel Dekker, New York and Basel, 131-180.

Umweltbundesamt (Hrsg.) (1986) Branchentypische Inventarisierung von Bodenkontaminationen- ein erster Schritt zur Gefährdungsabschätzung für ehemalige Betriebsge-
lände. *Umweltbundesamt-Texte 31/86*, Berlin.

Umweltbundesamt (Hrsg.) (1989) Daten zur Umwelt 1988/89. Erich Schmidt Verlag, Berlin.

Umweltbundesamt (Hrsg.) (1990) Beurteilung und Behandlung von Mineralölschadens-
fällen im Hinblick auf den Grundwasserschutz. *LTWS 24*, Berlin.

Venkatesan, M.I. (1988) Organic geochemistry of marine sediments in Antarctic region: marine lipids in McMurdo Sound. *Org. Geochem. 12*, 13-27.

Volkman, J.K. et al. (1983) Demethylated hopanes in crude oils and their applications in petroleum geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta 47*, 785-794.

VROM NL (Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Nederlande) (1988) Leidraad Bodensanering, Deel II, Technisch-Inhoudelijk deel, Afl. 4. Sdu uitgeverij, 's-Gravenhage. Deutsche Übersetzung im Auftrag des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Bonn 1989: Leitfaden zur Bodensanie-
rung in den Niederlanden, Teil II.

Walker, J.D. & Colwell, R.R. (1974) Microbial degradation of model petroleum at low temperatures. *Microb. Ecol. 1*, 63-95.

Wardroper, A.M.K., Hoffmann, C.F., Maxwell, J.R., Barwise, A.J.G., Goodwin, N.S. & Park, P.J.D. (1984) Crude oil biodegradation under simulated and natural conditions- II. Aromatic steroid hydrocarbons. *Org. Geochem. 6*, 605-617.

Webb, C.L.F. (1990) Biologische Sanierung ölverschmutzter Böden am Beispiel eines Rohöl-Leitungsschadens. *Erdöl Erdgas Kohle 11*, 453-455.

Weete, J.D. (1980) Liquid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. Plenum Press, New York.

Wehner, H., Teschner, M. & Bosecker, K. (1986) Chemical reactions and stability of biomarkers and stable isotope ratios during in vitro biodegradation of petroleum. *Org. Geochem. 10*, 463-471.

Wieczorek, B. (1991) Erkundung und Sanierung von Altlasten. *Umwelt 10*, 427-429.

Williams, J.J. (1978) What is petroleum exploration? In *A guide to North Sea oil and gas technology, Proceedings of the Institute of Petroleum 1977 Annual Conference London*, Heyden & Son, London, 3-10.

Williams, J.A., Bjoroy, M., Dolcater, D.L. & Winters, J.C. (1986) Biodegradation in South Texas Eocene oils - effects on aromatics and biomarkers. *Org. Geochem. 10*, 451-461.

Wolf, K. (1986) The Hamburg-Georgswerder dumping ground, situation problems and administrative arrangements for producing a rehabilitation plan. In *Contaminated Soil. 1. Int. TNO Conference on Contaminated Soil* (Hrsg. Assink, J.W. & van den Brink, W.J.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 723-728.

Würdemann, S., Harder, H. & Höpner, Th. (1990) Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. A systematic examination of physical and chemical conditions. Part I.

Grain size, surface area and soiltype. *Erdöl und Kohle* 43, 217-224.

Yi, Z.H. & Rehm, H.J. (1982) Degradation pathways from n-tridecane to α,ω -tridecanedioic acid in a mutant of *Candida tropicalis*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15, 144-146.

Young, L.Y. (1984) Anaerobic degradation of aromatic compounds. In *Microbial Degradation of Organic Compounds* (ed. Gibson, D.T.), Marcel Dekker, New York and Basel, 487-523.

Zajic, J.E. & Mahomedy, A.Y. (1984) Biosurfactants: Intermediates in the biosynthesis of amphipathic molecules in microbes. In *Petroleum Microbiology* (ed. Atlas, R.M.), Macmillan, New York, 221-297.

10/10/2023

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Erdöl und Organische Geochemie des Forschungszentrums Jülich.

Dem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. D.H. Welte, danke ich für die Möglichkeit, die Experimente in seinem Hause durchführen zu können und sein Interesse an den Versuchsergebnissen.

Für die wissenschaftliche Betreuung zeichnet Herr Prof. Dr. J. Rullkötter verantwortlich. Durch zahlreiche Anregungen und Diskussionen unterstützte er den Fortgang der Arbeit und trug so maßgeblich zu ihrem Gelingen bei. Ihm bin ich daher ganz besonders zu Dank verpflichtet.

Das Korreferat übernahm Frau Prof. Dr. M. Wolf (RWTH Aachen), der ich an dieser Stelle ebenfalls herzlich danken möchte.

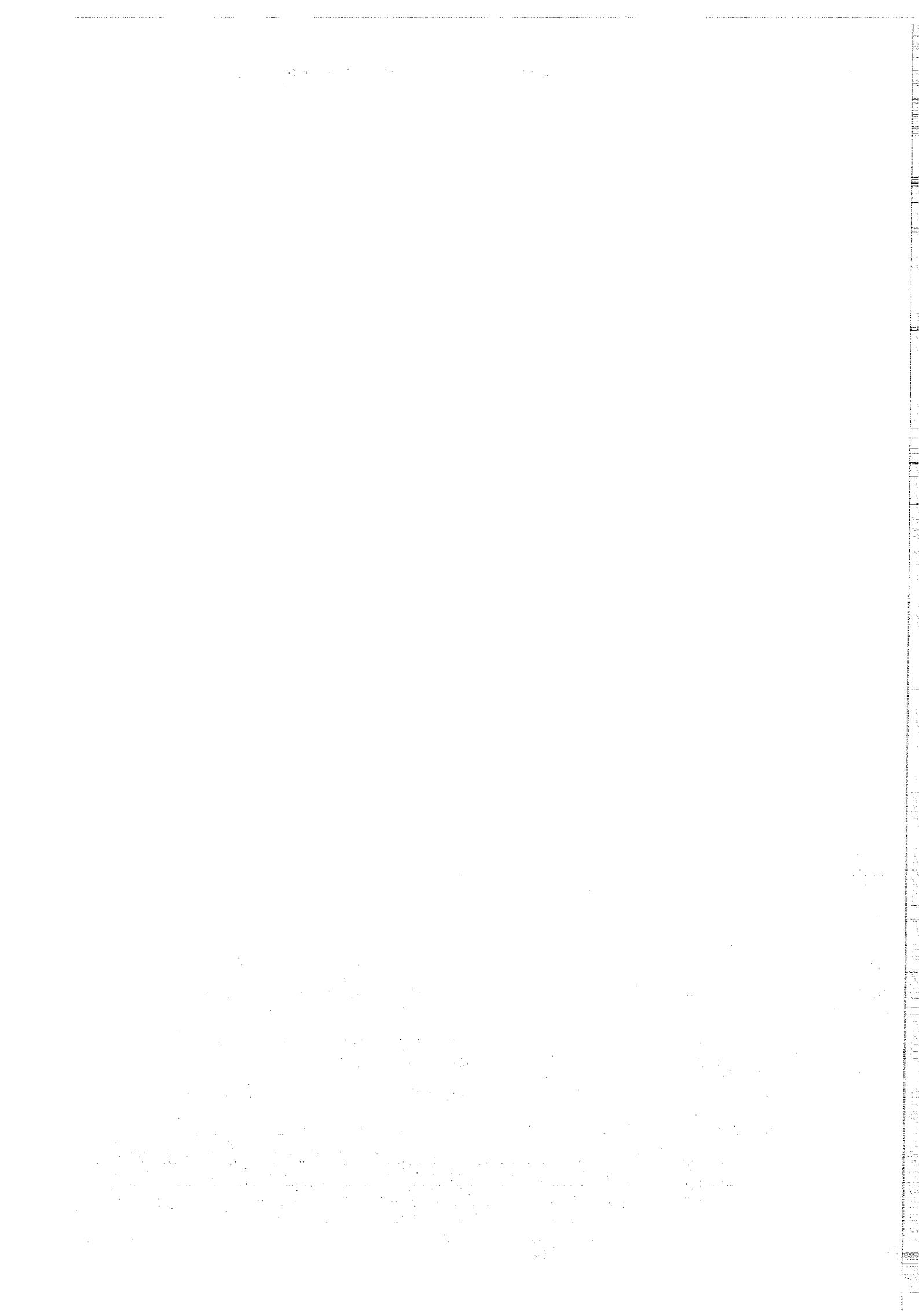
Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. J. Connan (Elf-Aquitaine, Pau), Frau Dr. C.M. Isaacs (United States Geological Survey, Menlo Park), Herrn Dr. M.D. Lewan (vormals Amoco Production Co., Tulsa), Herrn Dr. H. Wehner (Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover) und dem Norwegischen Erdöl-Direktorat (Oslo) für die Bereitstellung von Ölproben.

Ein Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie III des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Meine Ansprechpartner dort waren die Herren Dr. L. Webb und Dr. H.-P. Rohns, die mir Probenmaterial zur Verfügung stellten und mir den Zugang zu der mikrobiologischen Fachliteratur erleichterten.

Bei der Strukturaufklärung der Wachsester war mir Dr. J.W. de Leeuw (vormals Technische Universität Delft) behilflich.

Zeitweise hatte ich das Vergnügen, mir mit Dr. T.M. Peakman ein Labor teilen zu dürfen. Ich danke ihm für die Hinweise und Ratschläge während der Laborarbeiten und die überaus angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Den technischen Mitarbeitern, die mir hilfreich zur Seite standen, möchte ich ebenfalls meinen Dank abstaten, insbesondere Frau Kammer, Herrn Disko, Herrn Harms, Herrn Lüdtke und Herrn Keller.



Jül-2832

Oktober 1993

ISSN 0944-2952