

Diplomarbeit

Vorgelegt zur Erlangung eines Diploms der Biologie
an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum



Analyse der extrahierbaren und nicht extrahierbaren Rückstände
von Sulfadiazin und seinen Metaboliten
drei Jahre nach Applikation von Schweinegülle auf Lysimetern
sowie die Remobilisierung der nicht extrahierbaren Rückstände
durch Maisrhizosphärentätigkeit.

Von

Wibke Schulte-Hunsbeck

angefertigt in Physische Geographie / Bodenkunde / Bodenökologie
der Fakultät für Geowissenschaften

Bochum, im September. 2009

Referent: **Prof. Dr. Bernd Marschner**

Korreferent: **Prof. Dr. Dominik Begerow**



**Diese Diplomarbeit entstand in freundlicher Zusammenarbeit mit der
Forschungszentrum Jülich GmbH, einem Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren.**

Institut Agrosphäre
ICG 4
Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich
(Gebäude 16.6)

Leiter des Instituts:
Prof. Dr. Harry Vereecken

Ansprechpartner vor Ort:
Dr. Joost Groeneweg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Diplomarbeit handelt es sich um vier in den Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Betreuer der Arbeit war:

Prof. Dr. Bernd Marschner

Als Korreferenten schlage ich vor:

Prof. Dr. Dominik Begerow

Bochum, den

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Dr. Joost Groeneweg vom Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre IV: Agrosphäre (ICG-4) am Forschungszentrum Jülich für die freundliche und engagierte Betreuung.

Zunächst danke Herrn Prof. Dr. Harry Vereecken, dem Leiter des Instituts: Agrosphäre für die Durchführung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Referent Prof. Dr. Bernd Marschner, der jederzeit bereit war auf meine Fragen und Probleme einzugehen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Begerow, dem Leiter der AG Geobotanik im Lehrstuhl Botanik der Universität Bochum, für die Übernahme der Ko-Referenz sowie die jederzeit gewährte wohlwollende Unterstützung

Dem Laborteam Biospec, namentlich Frau Dr. Diana Hofmann, Stephan Köppchen, danke für die wertvolle Unterstützung in analytischen Fragen und die schnelle Messung der umfangreichen Proben

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des ICG-4 für die gute Zusammenarbeit allen voran Martina Krause, Ulrike Langen und Anke Langen für die tatkräftige und geduldige Hilfe. Ohne diese geduldige Mithilfe im 'Hintergrund' wäre vieles sonst nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Stephan Sittig der mit bei vielen Formulierungen dieser Diplomarbeit hilfreich zur Seite stand.

Über allem bin ich natürlich meiner Familie zum Dank verpflichtet, ohne die dieses Studium nie möglich gewesen wäre. Ihre moralische und finanzielle Unterstützung ermöglichten dieses Studium

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder, für seine moralische Unterstützung, aber auch dafür, dass er mir stets mit einem guten Rat, in der nicht immer leichten Zeit des Entstehens dieser Arbeit, helfen konnte.

Schließlich möchte ich bei Allen die nicht namentlich genannt sind oder bei denen ich es versäumt habe mich persönlich zu bedanken, hiermit sei ein besonders herzliches Dankeschön ausgesprochen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	13
1.1	Sulfadiazin	15
1.2	Literaturübersicht.....	16
1.2.1	Stofftransport im Boden	16
1.2.2	Sorption im Boden	19
1.2.3	Nicht extrahierbare Rückstände	24
1.2.4	Transport SDZ Aufnahme in die Pflanze	25
1.2.5	Abbau von SDZ im Boden	26
1.2.6	Abbau von SDZ Photochemisch	27
1.2.7	Abbau von SDZ in Säugetieren	28
1.3	Zielsetzung	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Beschreibung der Versuchsböden	31
2.2	Lysimeter	33
2.2.1	Versuchslysimeter	35
2.2.2	Historie und Ausgangszustand der Versuchslysimeter	36
2.3	Charakterisierung der Testsubstanz	37
2.4	Methoden	38
2.4.1	Probenentnahme Boden	38
2.4.2	Aufbereitung der Bodenproben.....	39
2.5	Begleitparameter	40
2.5.1	pH-Wert-Bestimmung	40
2.5.2	Bodenfeuchtebestimmung	40
2.6	Bodenextraktion	41

2.7	Festphasenextraktion	43
2.8	Pflanzenversuch	45
2.8.1	Versuchsaufbau	45
2.8.2	Probenentnahme Pflanzen	47
2.9	Analytische Methoden	48
2.9.1	Oxidizer	48
2.9.2	LSC-Messung	50
2.9.3	LC-MS/MS	51
2.10	Auswertung	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Lysimeterversuche	56
3.1.1	0,5 m ² -Lysimeterversuche	56
3.1.2	1 m ² -Lysimeter	68
3.2	Pflanzenversuch	74
4	Diskussion	83
4.1	Lysimeter	83
4.1.1	Begleitparameter	83
4.1.2	Bilanzierung des SDZ in den Lysimetern	85
4.1.3	Sequentieller Extraktion und Metaboliten Analyse	90
4.1.4	Sorption von SDZ	94
4.2	Pflanzenversuch	97
4.2.1	Begleitparameter	97
4.2.2	Remobilisierung sequestriertes SDZ durch Rhizosphärentätigkeit	98
4.3	Zusammenfassung	100
5	Literaturverzeichnis	101
6	Anhang A	106

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einträge von Arzneimitteln und deren Rückständen in die Umwelt (Cyrotux, 2005).	14
Abb. 2: Protonierung und Dissoziation von Austauschern (H^+ :Säure, B^- :Base).	19
Abb. 3: Sorption von Kationen an ein Oxid- oder Tonmineraloberfläche mit variabler Ladung.....	21
Abb. 4: Lineare-Sorption und nicht lineare Sorption nach Freundlich.	23
Abb. 5: Protonierung und Deprotonierung von SDZ (Halling-Sørensen, 2000).	23
Abb. 6: Abhängigkeit von SDZ vom pH-Wert (Sukul et al., 2008).	24
Abb. 7: Abbau von ^{14}C -SDZ durch Biotransformation, (* = Stelle der ^{14}C -Makierung) (Lamshöft et al., 2007).....	28
Abb. 8: Übersicht der Feldstandorte: Merzenhausen (Mer) und Kaldenkirchen (Kal) in NRW.	32
Abb. 9: Schematische Zeichnung der Freilandlysimeteranlage des ICG-4 mit einem versenkten eckigen 1 m ² -Bodenmonolithen (Pütz,1993).	34
Abb. 10: spaltenweise Entnahme der Bodenproben der 0,5 m ² -Lysimeter mit Metalplatte (Tribenuron Methyl Enviromental Fate (2002))	35
Abb. 11: ^{14}C markiertes Sulfadiazin (^{14}C -SDZ) (* = Stelle der ^{14}C -Makierung)	37
Abb. 12: Flussdiagramm der Arbeitsschritte der Bodenproben Bearbeitung.	39
Abb. 13: Versuchsaufbau des Pflanzversuches, (Ansicht: Maispflanzen in Kick/Brauckmann-Gefäße unter der Pflanzenanzuchtbank).....	46
Abb. 14: Beispielchromatogram des LC-MS/MS (grau hinterlegte Flächen gesuchter Substanz).	52
Abb. 15: Gemittelte pH-Werte ($CaCl_2$) der Bodenproben aus den 0,5 m ² -Lysimetern A1 (Kal) und B1 (Mer).	57
Abb. 16: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) bis in einer Tiefe von 0-30 cm, gegen die Zeit aufgetragen. (Die Linie markiert die applizierte (A_{eq}) SDZ von 0,50 mmol.)	58
Abb. 17: (links) schichtweise Verteilung bis in einer Tiefe von 30 cm der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) (Hellgrau) an den Entnahmezeitpunkten (Tag 4, 29, 120, 218, 1022)	60
Abb. 18: (rechts) schichtweise Verteilung bis in einer Tiefe von 30 cm der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) (Dunkelgrau) an den Entnahmezeitpunkten (Tag 4, 29, 120, 218, 1022)	60
Abb. 19: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm, gegen die Zeit aufgetragen.	62
Abb. 20: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm, gegen die Zeit aufgetragen.....	63

Abb. 21: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in Prozent [%] aus der sequentiellen Extraktion, aus Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen von Tag 29 (links) und Tag 1022 (rechts).....	64
Abb. 22: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in Prozent [%] aus der sequentiellen Extraktion, aus Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen von Tag 29 (links) und Tag 1022 (rechts).....	64
Abb. 23: Übersicht über der erfolgreichen Messungen der Metabolitenanalyse aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) aus Bodenproben.....	66
Abb. 24: mittlere pH-Werte (CaCl_2) aus Bodenproben des Lysimeter A2 (Kal) (rechts, Hellgrau) und B2 (Mer) (links, Dunkelgrau), gegen die Tiefe [cm].....	68
Abb. 25: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (links, Hellgrau) und B2 (Mer) (rechts, Dunkelgrau) bis in einer Tiefe von 30 cm.....	69
Abb. 26: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (rechts, Hellgrau) und B2 (Mer) (links, Dunkelgrau) bis in einer Tiefe von 30-100 cm.....	70
Abb. 27: Mittelwerte der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (links) und B2 (Mer) (rechts) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen.....	72
Abb. 28: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) insgesamt (NER und extrahierbar in den Schichten 0-30 cm).....	72
Abb. 29: (links) Wurzelballen einer Maispflanze.....	74
Abb. 30: (rechts) gereinigte Maiswurzeln.....	74
Abb. 31: (rechts):mittlere pH-Werte (CaCl_2) des Pflanzenversuches aus Boden A2 (Kal) (Hellgrau) und B2 (Mer) (Dunkelgrau).....	75
Abb. 32: Verteilung der Summe der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] in den Bodenproben von Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).....	77
Abb. 33: Verteilung zwischen der Summe der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] in den Bodenproben von Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer) und 1 m-Lysimeterversuch.....	78
Abb. 34: Vergleich der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Pflanzenversuchs-Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).....	79
Abb. 35: Vergleich der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) mit Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).....	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakterisierung von SDZ (Sukul und Spiteller, 2006).	16
Tab. 2: Arten von präferenziellen Fluss (Burkhardt, 2003).....	17
Tab. 3: Charakterisierung der beiden Hauptmetaboliten 4-OH-SDZ und Acetyl-SDZ	29
Tab. 4: Physiko-chemische Eigenschaften der beiden Böden von Kal und Mer (LUFA, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität-Bonn, 2002).	31
Tab. 5: Historie der Lysimeter A1, B1, A2 und B2 in der Übersicht	36
Tab. 6: Schematischer Ablauf der Sequentiellen Extraktion nach Förster et al.(2009).....	42
Tab. 7: Arbeitsschritte bei der Aufreinigung der CaCl ₂ -Extrakte mittels SPE.....	44
Tab. 8: Bepflanzungs-Ansätze in Kick/Brauckmann-Gefäße (X = Bepflanzt).	45
Tab. 9: LC-MS/MS Einstellungen in Anlehnung an Sukul et al. (2007).....	53
Tab. 10: Dichte der verwendeten Extrakte (ρ_{Extrakt}) in [g cm ³⁻¹]	55
Tab. 11: Molares Gewicht (M) der Metaboliten in [mg mmol ⁻¹].....	55
Tab. 12: Volumen in [m ³] der Bodenschichten der Lysimeter A1, B1 und A2, B2.....	55
Tab. 13: Bodenfeuchte (Feuchtmasse-%) in den ersten beiden Bodenschichten (0-5 und 5-10 cm) der 0,5 m ² -Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer).....	57
Tab. 14: Summen der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm	61
Tab. 15: Übersicht der Konzentration SDZ [mmol g ⁻¹] aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) aus Bodenproben.	67
Tab. 16: Bodenfeuchte der Bodenproben	69
Tab. 17: Mittelwerte der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben der Lysimetern A1 (Kal) und B2 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm.....	71
Tab. 18: Übersicht der Konzentration SDZ [mmol g ⁻¹] aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) aus Bodenproben.	73
Tab. 19: Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol] in Bodenproben aus 1 m ² -Lysimeterversuch und Pflanzversuch.	76

Tab. 20: Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] des sequentiellen Extraktion aus Bodenproben aus Lysimeterversuch und Pflanzversuch A2 (Kal) und B2 (Mer).....	81
Tab. 21: Konzentration von SDZ und seinen Metaboliten [mmol g^{-1}] der Aceto.+H ₂ O-Extraktion in Bodenproben aus Lysimeterversuch und Pflanzversuch A2 (Kal) und B2 (Mer).....	82
Tab. 22: Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm an dem Probenentnahmetag 29, 120, 218, 1022.....	106
Tab. 23: Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm an dem Probenentnahmetag 29, 120, 218, 1022.....	107

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	
4-OH-SDZ	4-Hydroxysulfadiazin
APG	Aktivität pro Gram Boden [Bq g ⁻¹]
A _{eq}	Äquivalentmenge [mmol]
Aceto.	Acetonitril
Acety-SDZ	N-Acetyl-Sulfadiazin
BBA	Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln und Pflanzenschutzgeräten
C _{eq}	Äquivalentkonzentration [mmol g ⁻¹]
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FZJ	Forschungszentrum Jülich
GLP	Good-Laboratory-Praxis
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ICG-4	Institut Agrosphäre
Kal	Kaldenkirchen
K/B	Kick/Brauckmann-Gefäße
k _{oc}	Sorbtionskoeffizient (n= Freundlich für org. Kohlenstoff)
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LSC	Liquid Scintillation Counter
Mer	Merzenhausen
MRSA	multiresistenten <i>Staphylococcus aureus</i> Stämmen
MS	Massenspektrometer
NER	Nicht extrahierbare Rückstände
PKs	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s
ρ	Dichte [g cm ⁻³]
SDZ	Sulfadiazin
SOP	Standardarbeitsanweisung
SPE	Solid-phase-extraction, Festphasenextraktion
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wk _{max}	Maximale Wasserhaltekapazität [%]

1 Einleitung

Antibiotika (griech. *antibios*: gegen das Leben gerichtet) werden sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin zum Hemmen bzw. zur Bakteriolyse pathogener Mikroorganismen verwendet und wirken schon in geringen Konzentrationen bakteriostatisch. In der Veterinärmedizin werden Antibiotika nicht nur bei bestehenden bakteriellen Erkrankungen verabreicht, sondern auch zur therapeutischen Behandlung und auch präventiv eingesetzt. Sie kommen in der Viehzucht als Futtermittelbeigabe prophylaktisch zum Einsatz und führen zu einem geringeren Ausschuss an Tieren und somit zur Ertragssteigerung (Röder et al., 2007).

So lag beispielsweise der Gesamtverbrauch von Antibiotika in ganz Deutschland im Jahr 2005 bei 1100 Tonnen - davon allein 785 Tonnen in der Veterinärmedizin, Tendenz steigend (Gemap, 2008). Die an die Tiere verabreichten Antibiotika verbleiben nur zu einem geringen Teil im Organismus. Ein Großteil der Antibiotika und deren Umwandlungsprodukte werden wieder ausgeschieden. Die Ausscheidungsprodukte werden in der Landwirtschaft als organischer Dünger genutzt. Mit ihnen gelangt ein Teil der Antibiotika bzw. Antibiotikarückstände als Wirtschafts-Dünger, Gülle und Stallmist, unabsichtlich auf die Felder und somit in den Boden (Burghardt et al., 2005). Von dort aus können sie über die Bodenpassage durch Niederschläge ins Grundwasser bzw. naheliegende Gewässer ausgeschwemmt werden (Sacher et al., 2001).

Nach Eintrag in den Wasserkreislauf können Antibiotika und deren Rückstände in weitere Umweltkreisläufe gelangen, bis sie schließlich in pflanzlichen oder tierischen Lebensmitteln und damit in die Nahrungskette wiederfinden (Dolliver et al., 2007; BfR, 2003) (siehe Abbildung 1).

Wie genau Verbleib von Antibiotika in der Umwelt ist jedoch erst wenig verstanden und bedarf intensiver Forschung (Stoob et al., 2005; Rechenberg, 2009). Durch die antibakterielle Wirkung der Antibiotika besteht die Gefahr, dass sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden ändern kann.

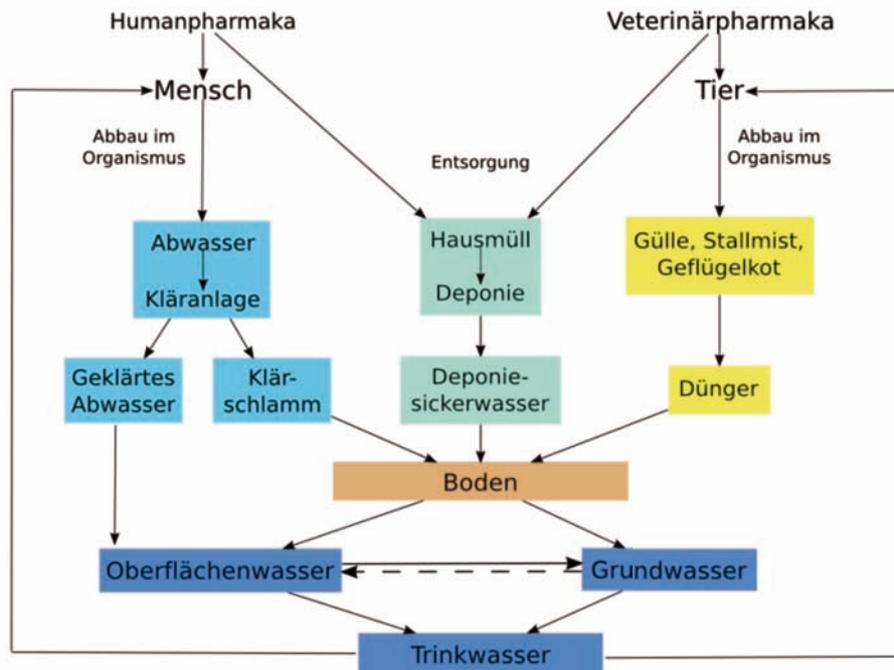


Abb. 1: Einträge von Arzneimitteln und deren Rückständen in die Umwelt (Cyrotux, 2005).

Desweiteren besteht die Gefahr das Antibiotika-Resistenzgene sich unter Bodenmikroorganismen ausbreiten (Röder et al., 2007). Die Verbreitung von Resistenzen geschieht überwiegend über Gentransfer (Angulo et al., 2004). Zum Gentransfer zählt die Aufnahme von Plasmiden (Konjugation), der Transfer von Wirts-DNA über Bakteriophagen (Transduktion) oder die Aufnahme freier DNA (Transformation) (Gräfe, 1992).

Eine Ausbreitung könnte zur Folge haben, dass Resistenzen in menschlichen Krankheitserregern auftreten könnten. Dies wurde bereits bei, aus der Umwelt stammenden Mikroorganismen beobachtet (Angulo et al., 2004). Diese Entdeckung ist besorgniserregend, da es zu einer Multiresistenz der Mikroorganismen kommen kann. In der Humanmedizin hat man bereits weltweit mit der Problematik von multiresistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (MRSA) zu kämpfen (Germap, 2008).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stufte das Problem der Resistenzbildung, -verbreitung, und -übertragung als gravierend ein und sieht dringenden Handlungsbedarf (WHO/EMC/BAC/98.6). Damit die Resistenzausbreitung in Zukunft nicht verschlimmert wird, wurde europaweit eine Richtlinie (2004/28/EG) geschaffen. Diese sieht die Schaffung eines Gemeinschaftskodex, zur Vermeidung der unnötigen Nutzung von Arzneimitteln vor. Desweiteren wurde das Zusetzen von leistungsfördernden Mitteln zum Futter verboten (FuttMV, BGB1 I 2005).

Aufgrund dieser Problematik wurde die DFG-Forschergruppe FOR 566: „Veterinary medicines in soils: Basic research for risk analysis“ gegründet. Im Fokus der Forschergruppe stehen der Verbleib von Antibiotika und seiner Metaboliten im Boden sowie die Auswirkungen der Ausbringung von Antibiotika in die Umwelt. Ein Teilprojekt beinhaltet Untersuchungen zur Mobilität und zum Transport von Antibiotika in Bodensäulen und Lysimetern.

1.1 Sulfadiazin

Eine der meist eingesetzten Antibiotika-Gruppen in der Veterinärmedizin sind die der Sulfonamide. Die Einsatzmenge von Sulfonamiden in der modernen Massentierhaltung lag im Jahr 2005 in Deutschland bei ca. 97,5 Tonnen (Röder et al., 2007). Erstmals beschrieb Gerhard Domagk 1932 die antibakterielle Wirkung von Sulfonamiden. Sulfonamide wirken auf Bakterien bakteriostatisch, da sie deren Folsäureproduktion hemmen. Die Folsäure ist ein wichtiger Baustein in der DNA-, RNA- und Eiweißsynthese von Bakterien (Löscher et al., 1994). Neben dieser kompetitiven Hemmung wirken sie überdies als Inhibitor gegenüber dem Enzym *Dihydropteroinsäure-Synthetase*, welches die Anknüpfung der p-Aminobenzoessäure an das Pteridingerüst katalysiert (onmeda, 2009).

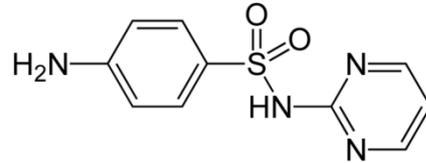
Die meisten Sulfonamide besitzen, anders als andere Antibiotika, eine hohe Mobilität (Thiele-Bruhn et al., 2004). Sie können im Grundwasser (Hamscher et al., 2002), in Seen (Alder et al., 2001), in Flüssen (Kolpin et al., 2002) und sogar im Trinkwasser nachgewiesen werden (Röder et al., 2007). Aus diesem Grund wird der Eintrag in den Boden als besonders kritisch angesehen (Höper et al., 2002; Lamshöft et al., 2007).

Ein Antibiotikum aus der Gruppe der Sulfonamide ist das Sulfadiazin (SDZ).

SDZ besteht aus einem Pyrimidinring und einem Anilinring (siehe Tabelle1). Durch seine Struktur ist es ein polares Molekül wodurch es im Boden stärker gebunden wird als andere Sulfonamide (Höper et al., 2002; Lamshöft et al., 2007). Das SDZ wird in der Humanmedizin hauptsächlich zur Bekämpfung von Darm- und Harnwegserkrankungen, die durch *E.coli*, *Salmonella*, *Pneumocystis* und *Schigella* verursacht werden, eingesetzt. In der Veterinärmedizin wird SDZ als Breitbandantibiotikum bei Atemwegs-, Magen- Darm- und Harnwegserkrankungen eingesetzt (onmeda, 2009).

Tab. 1: Charakterisierung von SDZ (Sukul und Spiteller, 2006).

Sulfadiazin	SDZ
Chem. Bezeichnung	4-Amino-N-(2-pyrimidinyl)benzenesulfonamid
CAS Nr.	68-35-9
Summenformel	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Molargewicht	250,28 g mol ⁻¹
Löslichkeit	77 mg l ⁻¹ (in Wasser, 25°C)
pK _s	6,50 ± 0,30 ; 1,57 ± 0,10
K _{oc}	2,18 (pH 1); 20,0 (pH 4); 4,95 bei pH 7; 1 bei pH 8,10



1.2 Literaturübersicht

Um den Transport von SDZ im Boden verstehen zu können, wird im Folgenden auf den Transport und die Mechanismen der Sorption im Boden im Allgemeinen und auf Abbau- Transport- und Sorptions-Prozesse von SDZ im Speziellen eingegangen.

Durch das Ausbringen von Stallmist, Gülle und Klärschlamm gelangt das SDZ auf die Felder/Äcker. In Gülle konnten SDZ-Konzentration von 0,3 mg kg⁻¹ bis zu 198 mg kg⁻¹ nachgewiesen werden. Im Boden wurden Konzentrationen von bis zu 20 µg kg⁻¹ gemessen (Höper et al., 2002).

1.2.1 Stofftransport im Boden

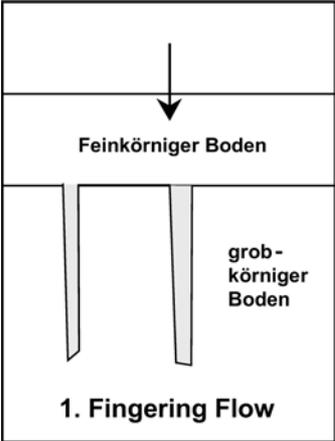
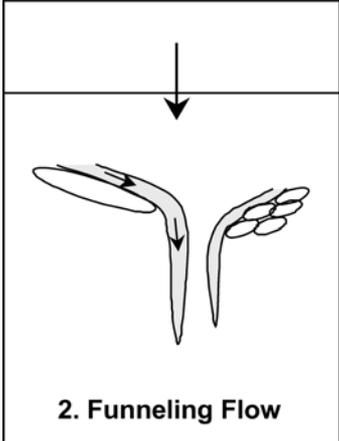
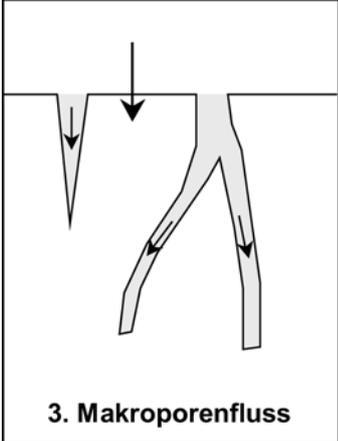
Der Boden ist ein poröser Körper, bestehend aus drei Phasen: Feststoff, Wasser und Luft. Er setzt sich zusammen aus einer Matrix aus Mineralien, organischen Substanzen (Wurzeln, Bakterien, Humus) und dem Porenraum. Der Porenraum ist mit gasförmiger Phase (Bodenluft) und wässriger Phase (Bodenlösung) gefüllt (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Der Transport von gelösten Stoffen im Boden erfolgt sowohl über die Bodenlösung als auch über die Gasphase. Dabei ist eine Verteilung der gelösten Stoffe durch Diffusion, Dispersion und Konvektion möglich. Durch die große Formenvielfalt von Böden kommt es nicht zu gleichmäßigen Wasserbewegungen und Stofftransporten.

Eine schnelle Wasserbewegung ist in den Makroporen möglich. Dieses Phänomen wird als präferenzieller Fluss bezeichnet (Flury et al.1994; Larsson und Jarvis, 1999). Beim präferenziellen Fluss werden gelöste Stoffe schneller und tiefer in den Boden gespült als es bei der Konvektion der Fall wäre. Diese Ereignisse sind schwer vorherzusagen. Dabei können drei Hauptarten von präferenziellem Fließen unterschieden werden, siehe Tabelle 2.

Um den Transport von gelösten Stoffen zu beschreiben ist es wichtig die physikalisch-strukturellen Eigenschaften von Böden zu kennen (Hartge und Stewart, 1995). Die physikalisch-strukturellen Eigenschaften beschreiben die Bodenstruktur, den Stofftransport sowie die Porenverteilung. Sie beeinflussen die Tiefenverlagerung und Versickerung von gelösten Stoffen im Bodenwasser und sind für jeden Boden unterschiedlich.

Die Zusammensetzung der Bodenlösung wird aber auch durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmt. Bedeutend ist dabei die Abgabe und Anreicherung von gelösten Stoffen an die Bodenmatrix (Sorption).

Tab. 2: Arten von präferenziellen Fluss (Burkhardt, 2003).

Fingering Flow	Funneling Flow	Makroporenfluss
<p>Entstehung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • hydrophobe Substanzen im Boden • geschichtete Böden, nach Feintextur folgt eine Grobtextur. 	<p>Entstehung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • wechsel zwischen zweischichten unterschiedlicher Körnung (Einlagerungen/Linsen) 	<p>Entstehung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Biogen, durch Bodenfauna und abgestorbene Wurzeln • Geogen durch Kryoturbation
fingerrförmig	säulenförmig	vielfältige Gestalt
 <p>1. Fingering Flow</p>	 <p>2. Funneling Flow</p>	 <p>3. Makroporenfluss</p>

SDZ Transport im Boden

Transportstudien mit SDZ zeigten, dass es zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, wenn SDZ mit Wasser oder mit Gülle appliziert wurde. Wird SDZ zusammen mit Gülle aufgetragen, so zeigte sich bei den Untersuchungen von Burkhardt et al. (2005), Kay et al. (2005) und Blackwell et al. (2007), dass Gülle den Oberflächenablauf von SDZ begünstigt. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass Gülle aufgrund ihres Feststoffanteils die feinen Bodenporen verschließt und so das SDZ schneller abläuft als andere Antibiotika (Burkhardt et al., 2005). Dabei spielt die Bodenart keine Rolle, es konnte sowohl bei Lehmböden (Blackwell et al., 2007) als auch bei Sandböden (Kay et al., 2005) ein schneller Oberflächenabfluss beobachtet werden. Bei Applikation von SDZ mit Gülle gelangt SDZ unter anderem über den präferenziellen Fluss in den Boden, dies zeigten Untersuchungen von Burkhardt (2007).

1.2.2 Sorption im Boden

Die Sorption beschreibt die Anlagerung (Absorption) und die Abgabe (Desorption) von gasförmigen oder gelösten Stoffen an die Oberfläche eines Sorbenten. Es können sowohl neutrale Moleküle, z.B. Wasser und organische Moleküle, aber auch geladene Atome und Moleküle sorbiert werden (Stahr et al, 2008).

Die Sorptionskapazität hängt dabei von der Größe und der Oberflächenladung der sorbierenden Oberfläche ab. Die Größe der sorbierenden Oberfläche ist die Summe aller Grenzflächen (fest-flüssig, fest-gasförmig) und wird als spezifische Oberfläche bezeichnet (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Sie hängt von der Teilchengröße der Bodentextur ab. Je kleiner die Korngrößen, desto größer ist die spezifische Oberfläche. Zudem verfügen Tonminerale neben der äußeren Oberfläche (Basis- und Seitenfläche) über eine innere Oberfläche (Zwischenschichtraum). Besonders die aufweitbaren Dreischicht-Tonminerale (Smectite, Vermiculite) besitzen eine hohe Gesamtoberfläche.

Desweiteren besitzen organische Bestandteile im Boden z. B. durch den Prozess der Humifizierung gebildete Huminstoffe eine spezifische polymeren Oberfläche (Scheffer und Schachtschabel, 2002).

Bei der Oberflächenladung der Sorbenten wird zwischen variabler und permanenter Ladung unterschieden. Permanente Ladungen werden von Tonmineralen ausgebildet. Variable Ladungen sind vom pH-Wert abhängig und erfolgen durch die Dissoziation bzw. Protonierung der funktionellen Gruppen des Austauschers, siehe Abbildung 2. Als Austauscher fungieren Tonminerale, Huminstoffe und pedogene Oxide- Hydroxide. Bei den Tonmineralen kann die Hydroxy-Gruppe(-OH) von den Silizium-Tetraedern (Si-OH) und den Aluminium-Oktaedern (Al-OH) ausgetauscht werden. Der Austauschprozess bei den pedogenen Oxiden (Al^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{4+} und Si^{4+}) und Hydroxiden (Al^4 , Fe, Mn und Si) wird über deren Oberfläche hervorgerufen, welche vorwiegend aus Hydroxy-Gruppen besteht. Bei den Huminstoffen sind die Carboxyl- und phenolische Hydroxy-Gruppen für den Austausch verantwortlich (Stahr et al., 2008).

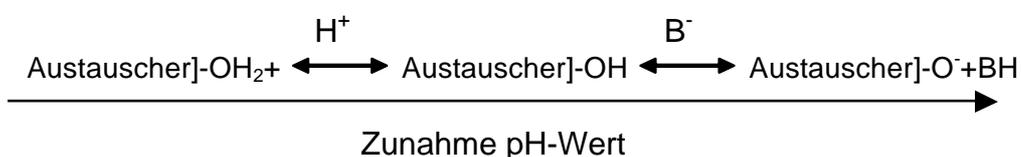


Abb. 2: Protonierung und Dissoziation von Austauschern (H^+ :Säure, B^- :Base).

Der pH-Wert spielt bei ladungsabhängigen Austauschern eine wichtige Rolle. Bei einem hohen pH-Wert, d.h. hoher negativer Ladung, können nur positive Ladungen (Kationen) sorbiert werden. Dagegen werden bei einem niedrigerem pH-Wert nur Anionen sorbiert. Bei Austauschern mit permanenter Ladung wird durch isomorphen Ersatz, z.B. bei dreischichtigen Tonmineralen, Si^{4+} durch Al^{3+} in den Tetraedern und Al^{3+} durch Mg^{2+} in den Oktaedern ausgetauscht, wobei eine permanent negative Überschussladung entsteht (Stahr et al., 2008).

Sorptionsmechanismen

Bei einer Sorption kann eine Reihe von Mechanismen verantwortlich sein. Beim Ionen- und Ligandenaustausch kommt es zur Ausbildung elektrostatischer oder kovalenter Bindungen. Dabei können die elektrostatischen Bindungen sowohl Dipol-, Van-der-Waals- oder Wasserstoffbrückenbindungen sein.

Ionenaustausch

Beim Ionenaustausch lagern sich Ionen zum Ausgleich der Oberflächenladung an den Austauscher an. So binden sich Kationen aus der Bodenlösung zum Beispiel an die negativ geladenen Tonminerale. Die Bindung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkung, die durch zunehmenden Abstand zur Oberfläche abnimmt. Ab einem bestimmten Abstand gibt es ein Gleichgewicht in der Bodenlösung so entsteht eine diffuse Doppelschicht. Die Ionen die direkt an der Austauschoberfläche liegen, liegen voll dehydratisiert vor, während die weiter Entfernten nur leicht dehydratisiert sind (Stahr et al., 2008). Die Eintauschstärke, d.h. die Fähigkeit eines Ions aus der Bodenlösung einzuwechseln um gegen ein Ion des Austauschbelags ausgetauscht zu werden, hängt von der Wertigkeit (Anziehungskraft) und der Größe des Ions ab. Ionen die groß sind und eine höhere Anziehung haben werden bevorzugt ausgetauscht.

Ligandenaustausch

Ein weiterer Mechanismus der Sorption ist der Ligandenaustausch. Hier wird zwischen außersphärischen- und innersphärischen Komplexen unterschieden, siehe Abbildung 3. Die außersphärischen Komplexe entsprechen den Ionen der diffusen Doppelschicht wie beim Ionenaustausch. Es findet eine unspezifische Sorption statt, dabei spielt nicht etwa die Wertigkeit und die Größe des Ions eine Rolle, sondern

vielmehr dessen Konzentration. Je höher dabei der Anteil eines Ions in der Bodenlösung ist, desto höher ist auch sein Anteil am Ionenbelag (Schroeder und Blum, 1992).

Der innersphärische Komplex des SDZ beruht auf der Ausbildung von Komplexverbindungen und stellt die spezifische Sorption da. Dabei fungiert das Molekül, beziehungsweise das Ion, der Bodenlösung als Ligand und verdrängt einen, um das Zentralatom des Metallion koordinierten, Liganden. Durch Ausbildung von kovalenten Bindungen der Liganden weisen diese innersphärischen Komplexe eine hohe Stabilität auf (Scheffer und Schachtschabel, 2002).

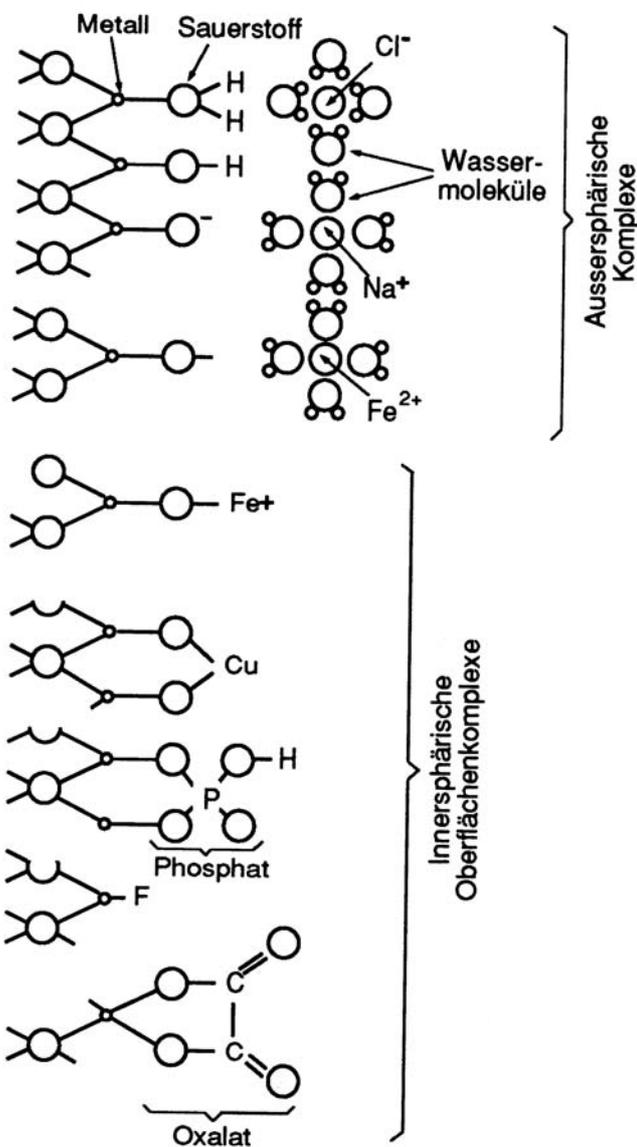


Abb. 3: Sorption von Kationen an ein Oxid- oder Tonmineraloberfläche mit variabler Ladung (Sigg & Stumm 1994 Aquatische Chemie, Teubner, Stuttgart).

Sorption von SDZ

Die Sorption von polaren Stoffen wie SDZ im Boden noch ist nicht gut verstanden im Gegensatz zu dem Sorptionsverhalten von unpolaren Molekülen zu denen zum Beispiel ein Großteil der Pestizide gehören. Im Gegensatz zu Antibiotika müssen vor der Zulassung von Pestiziden Aufzeichnungen zu dem Verbleib und damit der Persistenz, sowie zum Abbau derselben, vorgelegt werden. Dies wird durch Lysimeterversuche belegt die in den BBA-Richtlinien vorgeschrieben sind. Dadurch ist über den Verbleib und die Sorption von Pestiziden weit mehr bekannt. Anders als die Pestizide, werden Antibiotika unabsichtlich auf die Felder aufgetragen und sind erst in den letzten Jahren in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Da die meisten Pestizide im Gegensatz zu SDZ eine unpolare Struktur besitzen, werden sie anders als das SDZ im Boden sorbiert (Sukul et al., 2008).

Bei den meisten organischen Kohlenwasserstoffen (nicht nur Pestizide) findet eine lineare Sorption statt, siehe Abbildung 4. Bei der Sorption der Sulfonamide, speziell bei SDZ, findet aufgrund der polaren Struktur eine nicht lineare Sorption statt, die am besten mit der Freundlich-Gleichung beschrieben werden kann, siehe Abb. S2. Bei der Freundlich Sorption findet eine Sorption des SDZ im Laufe der Zeit statt. Dabei wird immer weniger SDZ von der Bodenmatrix sorbiert.

In aktuelleren Untersuchungen wurde eine reversible und sowohl irreversible Sorption des SDZ an die Bodenmatrix gefunden (Unold et al., 2009).

Bei einer reversiblen Sorption finden Umkehrprozesse statt. Das SDZ kann, wenn die Umweltbedingungen es erlauben, von der Bodenmatrix desorbiert werden und so wieder in der Bodenlösung als gelöst und damit bioverfügbar vorliegen.

Bei der irreversiblen Sorption findet keine Umwandlung statt. Wenn SDZ irreversibel sorbiert wurde liegt es als sog. **Nicht extrahierbaren Rückständen (NER)** vor. Es wird nicht mehr Desorbiert und liegt demnach auch nicht bioverfügbar in der Bodenlösung vor (Kahle und Stamm, 2002).

Da SDZ einen sehr polaren Aufbau besitzt, spielt der pH-Wert in der Bodenlösung eine große Rolle. Allgemein wird die kationische Form als erstes sorbiert, danach die neutrale Form. Die anionische Form wird am schlechtesten sorbiert. Die kationische Form wird hauptsächlich über Ionenaustausch, genauer dem Kationenaustausch sorbiert, siehe Abbildung 5(Kahle und Stamm, 2007).

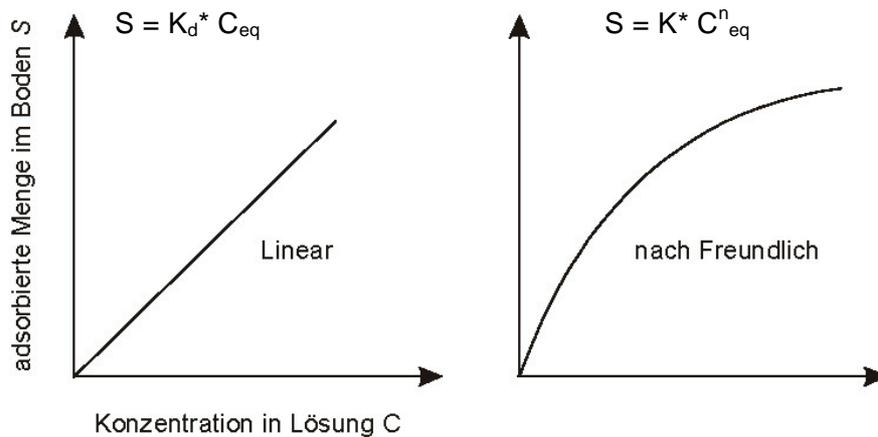


Abb. 4: Lineare-Sorption und nicht lineare Sorption nach Freundlich. (S= Beladung des Sorbents (Masse Sorbat bezogen auf Masse Sorbent), C_{eq} = Konzentration des Sorbats in Lösung, K_d = linearer Koeffizient, K_d -Wert, K = Freundlich-Koeffizient, n = Freundlich-Exponent)

Bei der neutralen Form der Sulfonamide gibt es hingegen mehrere Möglichkeiten der Sorption. Die Bindung an die Tonmineraloberfläche erfolgt über Kationen- und Wasserstoffbrückenbindungen. Eine weitere Möglichkeit ist der Austausch über eine Komplexierung. Dabei werden Kationen über die Pyrimidin- und Sulfon-Gruppe (SO_2) zum Austauscher übertragen (Thiele-Bruhn et al., 2004; Kahle und Stamm, 2007). Außerdem kann die neutrale Form an aromatische Ringe von organischen Substanzen über Hydroxy-Bindungen oder Van-der-Waals-Bindungen sorbiert werden (Kahle und Stamm, 2007).

Die Sorption von anionischen Sulfonamiden erfolgt nach dem Ionenaustauschprinzip (Thiele-Bruhn et al., 2004). Eine Sorption an organischen Substanzen, wie bei den neutralen Sulfonamiden, kann auch zutreffen. Aufgrund der Protonierung und Deprotonierung des Anilinringes sind die Eigenschaften von SDZ stark vom pH-Wert abhängig (Abbildung 6). SDZ ist schwer löslich im Wasser, im stark saurem oder im basischen Milieu jedoch wird es zu einem Salz. Dieses ist gut wasserlöslich (Halling-Sørensen, 2000).

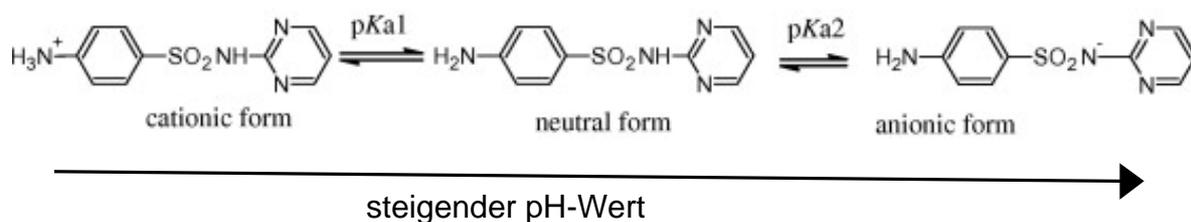
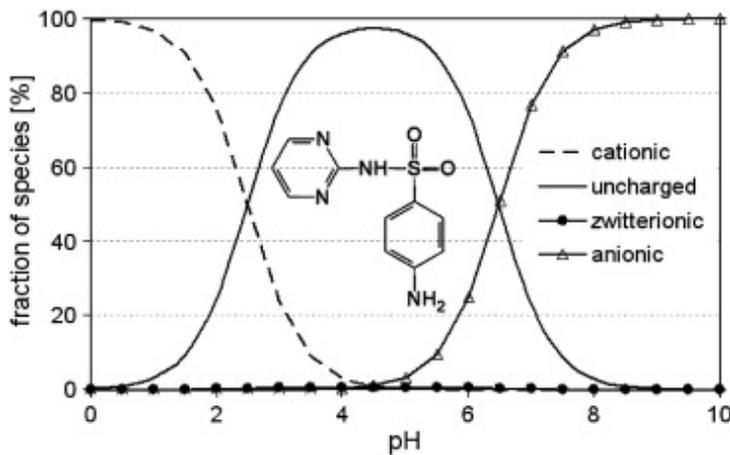


Abb. 5: Protonierung und Deprotonierung von SDZ (Halling-Sørensen, 2000).

In Abbildung 6 ist die Protonierung von SDZ in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. In einem sauren Milieu befindet es sich vorwiegend in der kationischen Form, während es in einem basischem Milieu in der anionischen Form aufzufinden ist



in einem sauren Milieu befindet es sich vorwiegend in der kationischen Form, während es in einem basischem Milieu in der anionischen Form aufzufinden ist (Sukul et al., 2008; Burkhardt et al., 2005). Dieses Verhalten ist wichtig für Sorption und Desorption von SDZ im Boden.

Abb. 6: Abhängigkeit von SDZ vom pH-Wert (Sukul et al., 2008).

1.2.3 Nicht extrahierbare Rückstände

Nicht extrahierbaren Rückständen (NER) bezeichnet die Fraktion des SDZ und seiner Metaboliten, die selbst durch stärkere Extraktionen wie Hochdruck, Aufschluss mit Mikrowelle oder ASE nicht mehr aus der Bodenmatrix gelöst werden können. Die nicht extrahierbaren Rückstände entziehen sich einer konventionellen Rückstandsanalytik, da diese Fraktion einen besonders festen Bindungszustand mit der Bodenmatrix eingeht (Kreuzig und Höltge, 2005). Je nach Extraktions-Methode und Lösungsmittel kann diese Fraktion variieren (Förster et al., 2008). Die NER binden an Fulvo-, Huminsäuren, huminen und anorganische Bestandteile der Bodenmatrix. Die Bindung der NER findet über eine innerspärische Komplexierung statt, dabei werden Metallionen gegen SDZ und seine Metaboliten ausgetauscht (Kahle und Stamm, 2007). Die so durch kovalente Bindung entstandenen Komplexe sind schwer extrahierbar.

Die NER bevorzugen in absteigender Reihenfolge: Fulvosäuren > Huminsäuren > Huminen > anorganischen Bestandteile (Sukul et al., 2008). Hierbei fungieren phenolische und carboxylische Gruppen, N-heterocyclische Komponenten und Abbauprodukte der organischen Substanz als bevorzugte Bindungspartner der Sulfonamide, da diese eine Bindung über die Amino-Gruppe aufbauen (Thiele-Bruhn et al., 2004). Es ist daher aus der Sicht des Boden- und Gewässerschutzes wichtig zu erfahren, wie hoch der Anteil der nicht extrahierbaren Rückstände im Boden ist,

um die Höhe der Gesamtrückstände im Boden abschätzen zu können (Henkelmann, 2003)

1.2.4 Transport SDZ Aufnahme in die Pflanze

Nach Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika aus Böden über die Wurzel in Pflanzen, ist die Mobilität der Antibiotika im Bodenwasser und der unterschiedlichen Transferfaktoren bei den verschiedenen Pflanzenarten, wie Blatt-, Wurzelgemüse und Getreide mitentscheidend (Trapp, 2004). Grundlagenuntersuchungen zur Phytoremediation lassen u.a. Einflüsse der Protolyseeigenschaften von Bodenmatrix und organischer Kontaminante erkennen (Briggs et al., 1987; Schnoor et al., 1995). So werden schwache organische Säuren bevorzugt aus sauren Böden und schwache Basen bevorzugt aus alkalischen Böden aufgenommen. Für SDZ, ist es über eine kationische und anionische Form verfügt, grundsätzlich eine Aufnahme von Pflanzen über die Wurzel zu erwarten. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, die sich mit der Pflanzenaufnahme mit SDZ befassen. Dabei wurden sowohl in homogenen (Hydrokultur) und heterogenen (Boden) Phasen Versuche durchgeführt. Es konnte eine spurenweise Aufnahme von SDZ beobachtet werden (Langhammer et al., 1989; Grote et al., 2006).

Noch relativ unerforscht ist der Einfluss von Pilzen und Bakterien auf organische Fremdstoffe in der Rhizosphäre.

1.2.5 Abbau von SDZ im Boden

Die Erforschung des Abbaus von SDZ und dessen Mechanismen im Boden steckt noch in den Anfängen. Aus diesem Grund kann keine genaue Aussage gemacht werden, ob biotische oder abiotische Faktoren am Abbau von SDZ beteiligt sind.

Abbauuntersuchungen wurden sowohl von Kreuzig und Höltge (2005) als auch von Förster et al. (2008) durchgeführt.

In früheren Untersuchungen wurde von einem hohen Abbaupotential des SDZ ausgegangen (Boxall et al., 2004; Jörgensen und Halling-Sørensen, 2000). Jedoch wurde durch genauere Analyse und der Markierung von SDZ mit dem ^{14}C -Isotops bewiesen, dass es zu einer Bindung des SDZ in der NER Fraktion kommt. Durch das Wiederfinden mittels ^{14}C -Detektion konnten wichtige Erkenntnisse über den Abbau von SDZ gewonnen werden.

So konnte in den Versuchen von Kreuzig et al. (2008) nach Applikation von ^{14}C -markierten SDZ (^{14}C -SDZ) in Gülle bereits drei Tagen nach Applikation auf den Boden nachgewiesen werden, dass 90% des applizierten SDZ als nicht extrahierbare Rückstände (NER) im Boden verbleiben. Untersuchungen von Halling-Sørensen et al. (2003) zeigten hingegen, dass sich SDZ im Bodenwasser nachweisen lässt und nicht für immer als NER gebunden wird.

Bei Abbauprobieren von Kreuzig und Höltge (2005) wurde biologisch aktiver und inaktiver Boden verwendet. Es wurde der Frage nachgegangen, ob es eine Unterscheidung von biotischen und abiotischen Abbau gibt.

Im biologisch aktiveren Boden wurde eine höhere Konzentration zweier nicht näher klassifizierter SDZ- Metaboliten als im biologisch inaktiven Boden gefunden. Auch Accinelli et al. (2007) fand bei seinen Untersuchungen einen größeren Einfluss der Mikroorganismen. In seinen Versuchen wurden Böden mit geringer und hoher bakterieller Aktivität verglichen. Durch das aufbringen der Gülle wird die Aktivität der Mikroorganismen angeregt, jedoch hat dies keinen Einfluss auf das Abbauverhalten von SDZ. Amelung et al. (1999) bewiesen, dass nach 10 Wochen fast der gesamte Nährstoffgehalt der Gülle umgewandelt wurde. Jedoch konnte fast das gesamte applizierte ^{14}C markierte SDZ im Boden nachgewiesen werden. Somit regt die Nährstoffzugabe die Aktivität der Mikroorganismen an, hat aber keinen Einfluss auf die Abbaubarkeit von SDZ (Amelung et al., 1999). Weitere Untersuchungen von Kreuzig und Höltge (2005) zeigten, dass eine vollständige Mineralisierung des SDZ

zu Kohlendioxid auszuschließen ist. Es wurde nur ein Anteil von 2% der insgesamt aufgegebenen Menge als $^{14}\text{CO}_2$ veranschlagt. Das zeigt, dass SDZ nur sehr langsam im Boden abgebaut werden kann. In aktuellen Untersuchungen konnten Aussagen über die Abbauprodukte gemacht werden, dabei wurden 4-OH-SDZ, Formyl-SDZ und 4-(2-minopyrimidinyl-1(2H))Anilin identifiziert (u. a.: Sukul et al., 2008).

1.2.6 Abbau von SDZ Photochemisch

Der Abbau von SDZ durch Sonnenlicht (UV-Strahlung) ist ein rein abiotischer Abbaumechanismus. Der photolytische Abbau wurde unter anderem von Sukul et al. (2008) und Wollters und Steffens (2005) untersucht. Wird SDZ mit Gülle aufgetragen, ist es der UV-Strahlung länger ausgesetzt. In Böden ist dieser Abbauweg von SDZ nur eingeschränkt möglich. Der photochemische Abbau hängt stark vom pH-Wert ab und somit von den umgebenden Komponenten. Beim photochemischen Abbau dominiert die indirekte Photolyse (Wollters und Steffens, 2005). Durch Lichtquanten angeregte Komponenten, können diese Anregung an das SDZ weitergeben und es so zum Abbau anregen. Durch photosensitive Stoffe kann eine Steigerung des Photoabbaus hervorgerufen werden beispielsweise durch Wasserstoffperoxid, Huminsäuren, Fulvosäuren und Aceton (Sukul et al. 2008).

1.2.7 Abbau von SDZ in Säugetieren

Bei der Biotransformation von SDZ in Schweinen kommt es zu einer 96%igen Ausscheidung des verabreichten ^{14}C markiertem SDZ. Dies bedeutet, dass lediglich 4% vom Tier aufgenommen werden. Die Biotransformation von SDZ in Schweinen wurde von Lamshöft et al. (2007) ausführlich untersucht. Es wurde radioaktiv markiertes SDZ (^{14}C -SDZ) vier Tage lang an Schweine verfüttert und ihre Ausscheidungen (Gülle) über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Verabreichung täglich gesammelt. Die gesammelten Gülleproben wurden auf SDZ und seine Metabolite analysiert.

Das SDZ wurde zu 44% neben den Hauptmetaboliten ausgeschieden. Als Hauptmetaboliten wurden Acetyl-SDZ (21%) und 4-OH-SDZ (26%) gefunden. Weitere Nebenmetaboliten waren N-Formyl-Sulfadiazin (0,1%) und N-Acetyl-4-Sulfadiazin (1,8%). Die maximale Ausscheidung fand am sechsten Tag nach der Verabreichung statt. Bei der Verteilung der Aktivität innerhalb der Gülle wurde 80% in der Festsubstanz und 20% in der Flüssigphase gefunden.

Die Abbildung 7 zeigt die Produkte des SDZ-Abbaus in Schweinen.

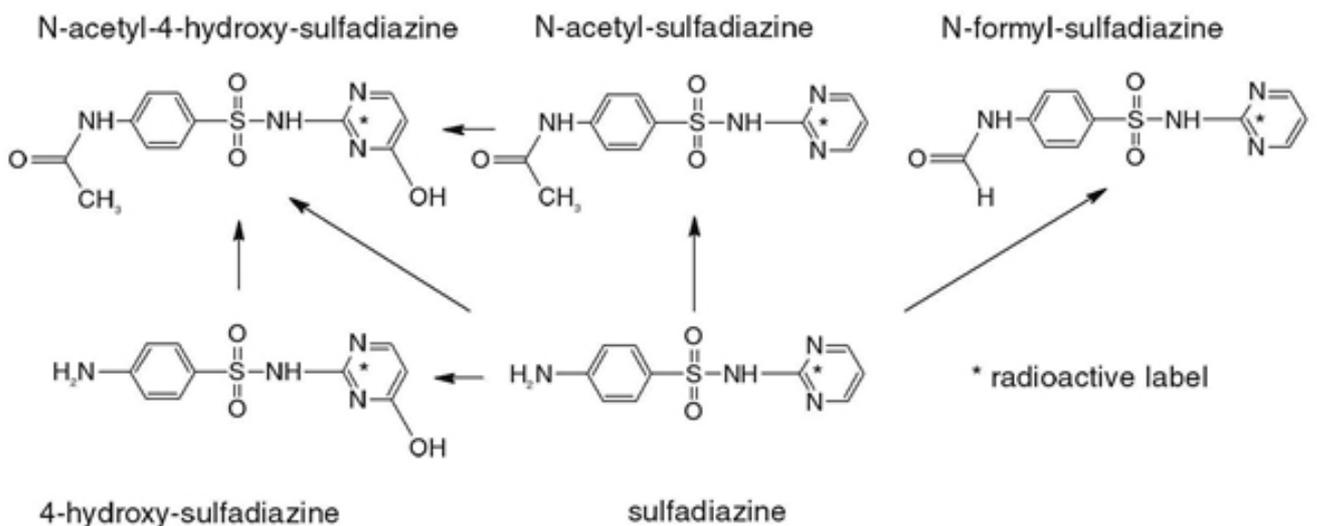
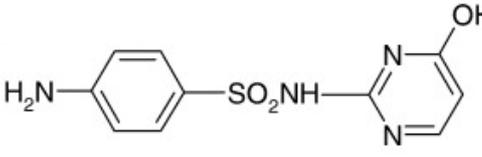
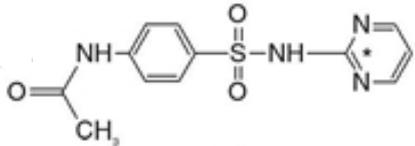


Abb. 7: Abbau von ^{14}C -SDZ durch Biotransformation, (* = Stelle der ^{14}C -Makierung) (Lamshöft et al., 2007).

Der Abbau verläuft allgemein im Säugetier in zwei Phasen. In der ersten Phase werden durch Enzyme wie z.B. Monooxygenase und Reductase die funktionellen Gruppen abgespalten oder wie bei der Hydrolase funktionelle Gruppen angehängen (-OH). In der zweiten Phase wird der so entstandene Metabolit mit einem körpereigenen, wasserlöslichen Stoff gekoppelt. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit des abzubauenen Stoffes erhöht und er kann somit leichter ausgeschieden werden. Das Ausscheiden von SDZ geschieht hauptsächlich über die Niere und nur in geringem Maß über Leber und Darm (Sukul und Spiteller; 2006). SDZ wird in Galle aus Metaboliten wieder Vollständig in SDZ Form umgewandelt (Langhammer, 1989).

Tab. 3: Charakterisierung der beiden Hauptmetaboliten 4-OH-SDZ und Acetyl-SDZ

	4-Hydroxysulfadiazin (4-OH-SDZ)	N-Acetyl-Sulfadiazin (Acetyl-SDZ)
Summenformel	$C_{10}H_{11}N_4O_3S$	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$
Molargewicht	267,27g/mol	310,32g/mol
		

1.3 Zielsetzung

Als Ziel dieser Arbeit sollten Erkenntnisse hinsichtlich Persistenz, Verbleib und möglicher Aufnahme von SDZ in Pflanzen gewonnen werden, um dadurch einen Beitrag zur Abschätzung der Umweltgefährdung durch SDZ leisten zu können.

Für ein besseres Verständnis vom Transportverhalten von SDZ, wurde 2005 ein Lysimeterversuch gestartet. Bei den Lysimeter unter Freilandbedingungen mit ¹⁴C-markierter SDZ-haltiger Gülle beschickt wurden. Die Lysimeter wurden, in Anlehnung an die BBA-Richtlinien, für Lysimeter-Untersuchungen zum Verbleib von Pestiziden, über drei Grundwasserneubildungsperioden ruhen gelassen. Neben einer Auswertung dieser Studie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Remobilisierungsversuche durch Bepflanzung der Böden aus den Lysimetern mit *Zea mays* (L.) unternommen.

Die vorliegende Arbeit stellt bezogen auf die Gesamtuntersuchungen, der von SDZ ausgehenden Umweltrisiken, nur einen sehr kleinen Teil dar.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollten dabei folgende Problemstellungen bearbeitet werden: Zunächst als grundlegende Fragestellung, wie hoch der in den Lysimetern gefundene Anteil an SDZ nach einem Zeitraum von drei Jahren ist. Dabei sollte außerdem die Verteilung des extrahierbaren SDZ und seiner Metaboliten sowie die Verteilung der NER ermittelt werden. Desweiteren sollten Bepflanzungsversuche der Lysimeterböden zeigen, inwieweit SDZ mobilisiert und in die Pflanze aufgenommen werden kann. Zuletzt sollte ermittelt werden, ob eine Umverteilung des SDZ- Metaboliten- und NER-Verhältnis durch Rhizosphärentätigkeit am Beispiel von *Zea mays* stattfindet.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Versuchsböden

Für die vorliegende Arbeit wurden eine Parabraunerde aus Jülich-Merzenhausen (Mer) und eine Braunerde aus Kaldenkirchen-Hülst (Kal) verwendet. Diese Bodentypen sind im gemäßigten humiden Klima Deutschlands weit verbreitet und typisch für die Niederrheinische Bucht. Die Parabraunerden und Braunerden sind Böden der Löss- und Moränenlandschaften und stellen im Allgemeinen ertragreiche Ackerstandorte dar (Mückenhausen, 1977). Die Lage der Feldstandorte und die jeweiligen schematischen Darstellung des Bodentyps, ist aus Abbildung 8. Ersichtlich.

Der Ackerstandort Mer liegt auf der Rurscholle und ist eine Parabraunerde welche aus Schwemmlöß aus dem Pleistozän/Holozän entstand. Die physiko-chemischen Eigenschaften der Parabraunerde aus Mer mit einem 80%igen Schluff-Anteil sind in Tabelle 4. Dargestellt.

Der zweite Boden stammt aus Kal einem Ackerstandort im Venloer Graben welcher zur Schwalm-Nette-Platte gehört. Im geologischen Querprofil stehen Pleistozäne Flugsande unterhalb der mächtigen Reuverton-Schicht an (Mückenhausen, 1977). Die Kal Braunerde besitzt mit 73% einen hohen Sandanteil. Die Physiko-chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 4 aufgeführt

Tab. 4: Physiko-chemische Eigenschaften der beiden Böden von Kal und Mer (LUFÄ, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität-Bonn, 2002).

	Braunerde (Kal)	Parabraunerde (Mer)
pH (CaCl ₂)	5,35	7,00
Wk_{\max} [%]	27,42	45,80
C [%]	0,99	0,92
Sand, total [%]	73,3	3,3
Schluff, total [%]	23,1	80,6
Lehm [%]	3,6	16,1
Dichte ρ_B [g cm ⁻³]	1,46	1,57
Humus [%]	1,7	2,1

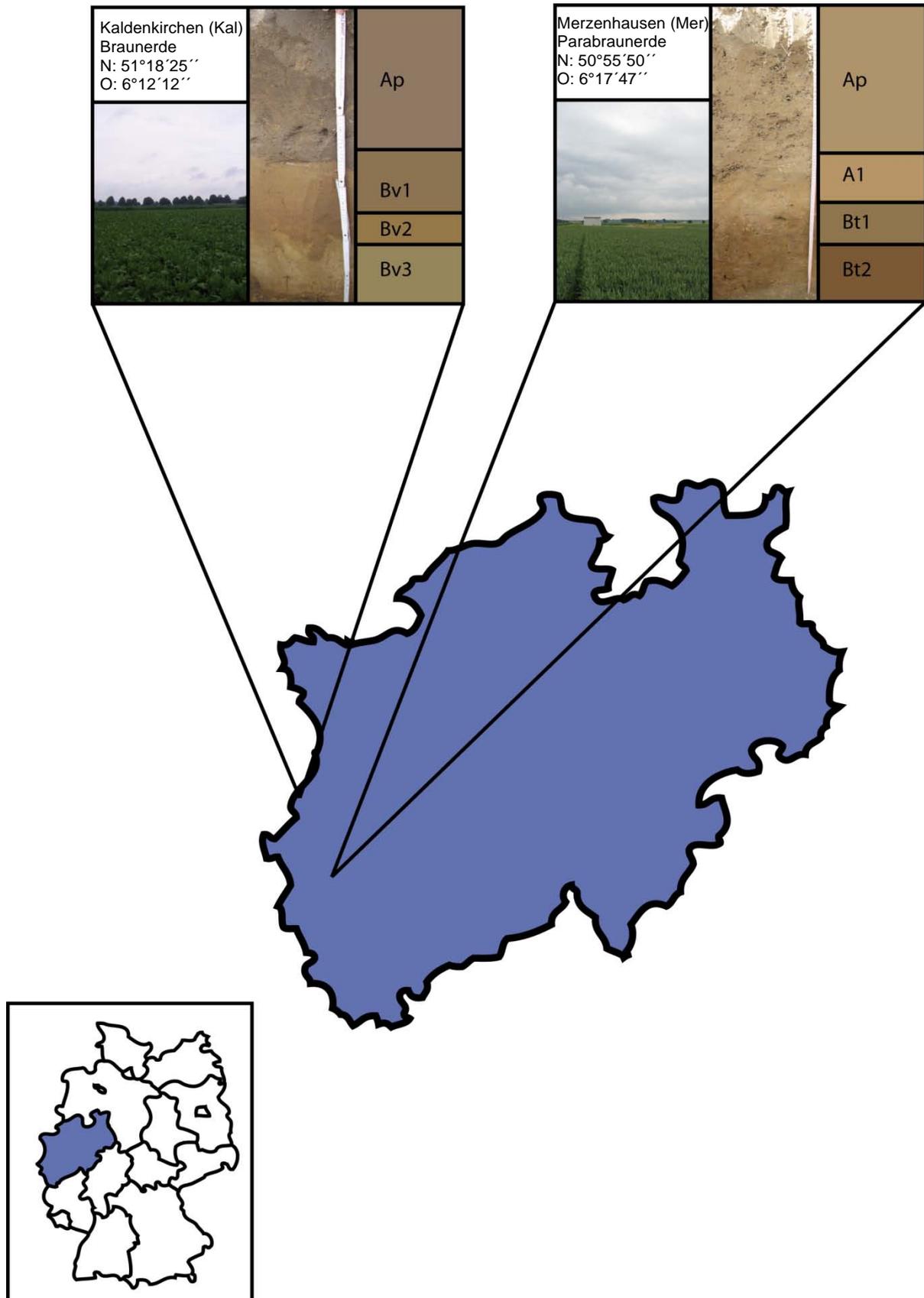


Abb. 8: Übersicht der Feldstandorte: Merzenhausen (Mer) und Kaldenkirchen (Kal) in NRW.

2.2 Lysimeter

Ein Lysimeter, wie sie im Forschungszentrum Jülich in Gebrauch sind, ist ein Edelstahlbehälter, der mit einem gestörten oder ungestörten Bodenmonolithen befüllt wird. Das Befüllen eines Lysimeters erfolgt nach einem speziellen Stechverfahren (Steffens et al., 1992; Pütz, 1993). Ein so gefüllter Lysimeter repräsentiert einen natürlich strukturierten Bodenausschnitt, der sowohl hinsichtlich der bodenphysikalischen Parameter, als auch der bodenchemischen und bodenbiologischen Parameter den natürlichen Feldstandort wiedergibt. Bei einem Lysimeter handelt es sich um ein Bindeglied zwischen Labor- und Feldforschung (ECPA, 1993; Leake, 1991). Allerdings ergaben vergleichende Messungen zum Wassergehalt der realen Feldsituation und im Lysimetermaßstab eine bedingte Übereinstimmung (Pütz, 1993).

Der Boden mit seiner großen räumlichen Variabilität hinsichtlich chemischer und physikalischer Parameter stellt eine sehr komplexe Matrix dar. Der Einsatz von markierten Umweltchemikalien (^{14}C -Isotopen) erlaubt die Analyse der gesamten Rückstände in die verschiedenen Bodenschichten und im Perkolat und erlaubt somit die Erststellung einer Massenbilanz zum Verbleib der Chemikalie. In Freilandversuchen ist der Einsatz von markierten Umweltchemikalien nur eingeschränkt möglich.

Nach dem Befüllen der Behälter im Feld werden die Lysimeter in eine Freiland-Lysimeteranlage gebracht. Zur Analyse und Kontrolle werden sie wie in Abbildung 9 gezeigt eingebettet. Zur Vermeidung von Randeffekten ist ein Lysimeter von einer Kontrollparzelle umgeben.

Eine Lysimeteranlage ist so gebaut, dass kein Sickerwasseranstau oder Unterdruckanschluss an der unteren Grenzfläche vorkommen kann. Ein so präparierter Lysimeter erlaubt unter den gegebenen klimatischen Bedingungen eine systematische Analyse des Verbleibs von Umweltchemikalien.

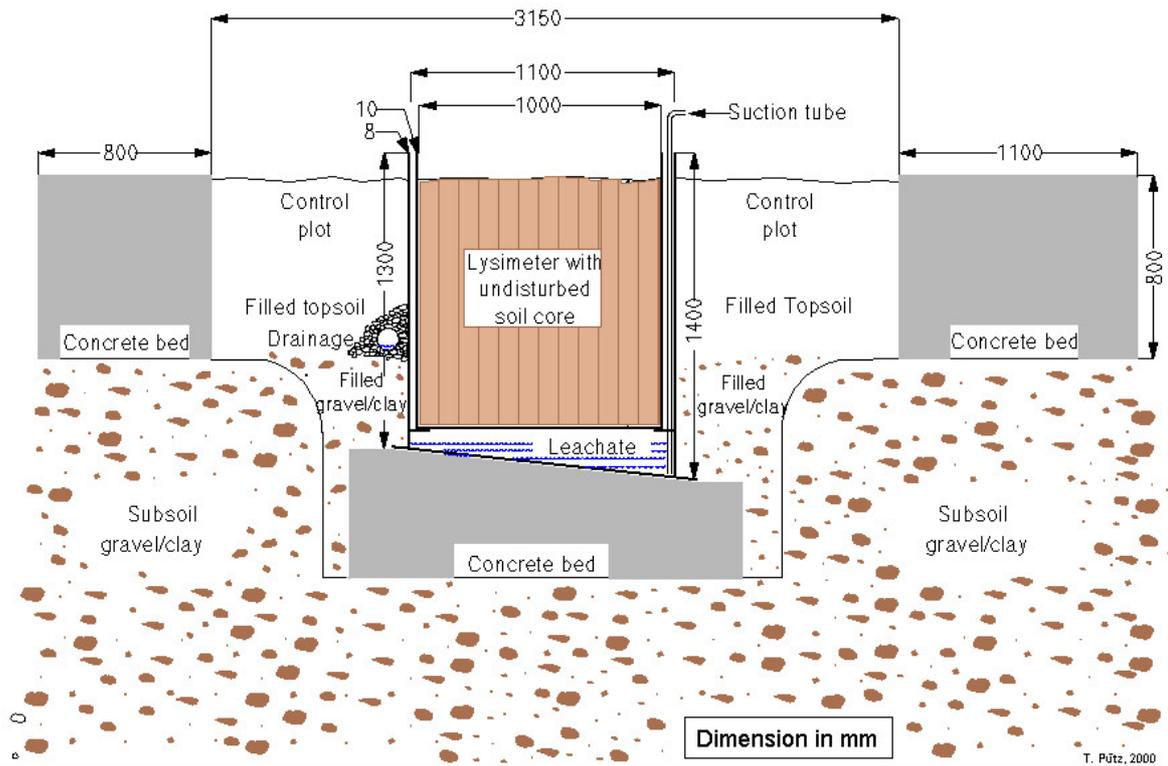


Abb. 9: Schematische Zeichnung der Freilandlysimeteranlage des ICG-4 mit einem versenkten eckigen 1 m²-Bodenmonolithen (Pütz,1993).

2.2.1 Versuchslysimeter

Die für diese Arbeit verwendeten Lysimeter standen in der Freiland-Lysimeteranlage des FZJ, ICG-4, Agrosphäre. Die Lysimeteranlage ist Teil des Isotopenlabors.

In dieser Arbeit wurden die Lysimeter mit den internen Bezeichnungen L202 (A1) und L203 (B1), sowie L214 (A2) und L222 (B2) verwendet. Alle Lysimeter hatten eine Profiltiefe von 110 cm. Die Lysimeter A1 und B1 hatten eine Nutzfläche von ca. 0,5 m² (A1 und B1; b= 60 cm; l= 80 cm) bzw. 1 m² (A2 und B2; A2: b= 1 m, l= 1 m; B2= Ø 1,13 cm). Die Lysimeter B1 und B2 wurden mit Parabraunerde aus Mer monolithisch befüllt, A1 und A2 wurden in Kal gestochen.

Der Versuch begann am 14.11.2005 mit der Applikation der radioaktiven Gülle. Auf die 1 m² Lysimeter (A2 und B2) wurden 2857 g der radioaktiven Gülle appliziert. Diese enthielt ca. 100 MBq umgerechnet wurden pro Lysimeter eine Äquivalentmenge (A_{eq}) von 1 mmol aufgetragen. Davon waren 0,05 mmol ¹⁴C-markiert, siehe Abschnitt 2.3. Auf die 0,5 m² Lysimeter (A1 und B1) wurde die Hälfte an Radioaktivität appliziert, somit die Hälfte an A_{eq} SDZ (0,5 mmol).

Die Gülle wurde mit einem Elektroquirl durchmischt und mit Bechergläsern gleichmäßig über die Bodenoberfläche verteilt. Anschließend wurde die Gülle mit einem Dreizack 3-5 cm in den Boden eingearbeitet (Daten FZJ, Groeneweg, pers.Mitteilung).

Die 0,5 m²-Lysimeter wurden an den Tagen: 4, 29, 120 und 218 spaltenweise bis in einer Tiefe von 30 cm durch Mitarbeiter des FZJ beprobt und die Proben bei -20°C eingefroren. Der Ablauf der spaltenweisen Beprobung ist in Abb. 10 gezeigt.

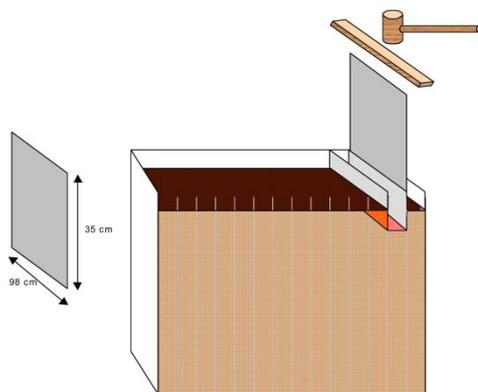


Abb. 10: spaltenweise Entnahme der Bodenproben der 0,5 m²-Lysimeter mit Metalplatte (Tribenuron Methyl Environmental Fate (2002))

2.2.2 Historie und Ausgangszustand der Versuchslysimeter

Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über den Studienverlauf sowie die notwendigen Bearbeitungsmaßnahmen. Die Lysimeter wurden nach Einbringung in die Lysimeteranlage einige Jahre ruhen gelassen. In dieser Zeit wurde eine ackerbauliche Nutzung simuliert um feldgleiche Bedingungen zu erhalten. Um eine bessere Vergleichbarkeit von Transportuntersuchungen an Bodensäulen mit Lysimetern zu gewährleisten ist es notwendig mögliche nicht vorhersagbare Wechselwirkungen zu verringern. Dazu gehören das Abtöten der makroskopischen Bodenfauna um Bioturbation auszuschließen und das Freihalten der Lysimeter von jeglicher Bepflanzung. Da es durch Rhizosphärentätigkeit zu einer Beeinträchtigung des Transportes von SDZ im Lysimeter kommt.

Vor Applikation wurde sämtliche makroskopische Bodenfauna abgetötet, in dem die Lysimeter für mehrere Wochen überflutet und so stehen gelassen wurden. Durch das Überfluten des Lysimeters wurde der Makrofauna der Sauerstoff entzogen und somit abgetötet. Die Mikroorganismen (Bakterien) hingegen konnten diesen Zeitabschnitt überdauern in dem sie in der Überdauerungsphase als Bakteriensporen verweilten. Nach dem Abpumpen des Wassers und trocknen des Bodens wurde der Versuch am 14.11.2005 gestartet.

Tab. 5: Historie der Lysimeter A1, B1, A2 und B2 in der Übersicht

Datum	Maßnahme
14.11.2005	Applikation der Gülle auf A1, B1, A2, B2
18.11.2005	1. spaltenweise Entnahme A1 und B1
13.12.2005	2. spaltenweise Entnahme A1 und B1
14.03.2006	3. spaltenweise Entnahme A1 und B1
20.06.2006	4. spaltenweise Entnahme A1 und B1
10.09.2008	Endgültige Entnahme A1 und B1
28.10.2008	schichtweise Entnahme A2
11.11.2008	schichtweise Entnahme B2

2.3 Charakterisierung der Testsubstanz

Die für diesen Versuch verwendete Gülle aus den Fütterungsversuchen, wie von Lamshöft et al. (2007) Abschnitt 1.2.7 beschrieben wurde. Das eingesetzte ^{14}C -SDZ mit 99%iger Reinheit hatte eine spezifische Aktivität von $8,6 \text{ MBq mg}^{-1}$ und wurde von der Bayer AG, Wuppertal hergestellt. Das SDZ wurde am 2C-Atom des Anilinrings radioaktiv markiert (^{14}C -SDZ), siehe Abbildung 11. Das ^{14}C markierte SDZ wurde mit unmarkiertem SDZ in einem Verhältnis von 1:20 (w/w) vermischt. Das unmarkierte SDZ wurde von Fluka, Seelze geliefert.

Es wurde radioaktiv markiertes SDZ (^{14}C -SDZ) an zwei Schweine verfüttert. Parallel dazu wurde unmarkiertes SDZ an zwei weitere Schweine, innerhalb von 4 Tagen, oral verabreicht. Die Tiere, die ^{14}C -SDZ bekamen, erhielten eine Gesamtdosis von 540 mg d^{-1} ($928,8 \text{ MBq}$). Dies entspricht $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Körpergewicht. Die Tiere, die unmarkiertes SDZ bekamen, erhielten eine Gesamtdosis von $570 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Körpergewicht. Die über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich gesammelten Gülleproben wurden mittels ^{14}C -Detektion analysiert.

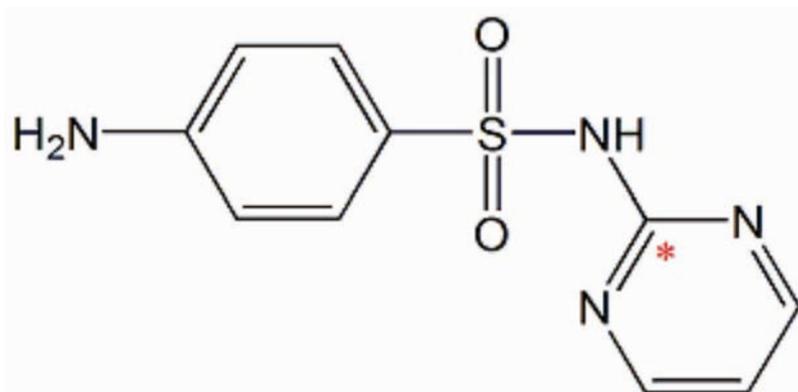


Abb. 11: ^{14}C markiertes Sulfadiazin (^{14}C -SDZ) (* = Stelle der ^{14}C -Markierung) (Lamshöft et al. 2007)

2.4 Methoden

Alle praktischen Arbeiten wurden im Isotopenlabor des Institutes ICG-4 Agrosphäre durchgeführt. Das Institut ICG-4 Agrosphäre ist eine zertifizierte Prüfeinrichtung zur Durchführung von Studien zum Verbleib von Pflanzenschutzmitteln nach Good-Laboratory-Praxis (GLP). Demnach sind Arbeitsvorgänge in Standardarbeitsanweisung (SOP) vorgeschrieben. Die für die Versuche verwendeten SOP sind im Anhang A.

2.4.1 Probenentnahme Boden

Bei der schichtweisen Entnahme des Bodens wurde die das Lysimeter umgebende Kontrollparzelle mit Folien und Brettern abgedeckt, so dass eine Kontamination ausgeschlossen wurde (SOP 06/01-01 und SOP 06/01-09).

Nach der Entfernung der Pflanzen auf der Oberfläche des Lysimeters wurden die ersten 30 cm in vier Schichten beprobt. Ab einer Tiefe von 30 cm wurde die Beprobung mittels Bohrstock bis in eine Tiefe von 1 m fortgesetzt.

Die Entnahme des Bodens bis 30 cm

Das Lysimeter wurde in vier Schichten beprobt: 0-5 cm, 5-10 cm, 10-20 cm und 20-30 cm. Zur Entnahme der Bodenschichten wurden Schüttgutschaufel, Maurerkelle, Wasserwaage und Zollstock verwendet.

Jede Bodenschicht wurde in einen separaten und ausreichend großen Behälter gefüllt z.B. Transportkiste 120 l, deren Tara-Gewicht bekannt ist. Der Boden wurde mit einem Handrührgerät (Collomix RSU) gemischt und gewogen.

Zusätzlich wurden ca. 2 kg des Bodens, aufgeteilt in 10 x 200 g Einzelproben, in einer Sammelprobe zusammengefasst. Aus dieser wurden 500 g für weitere Untersuchungen entnommen (und in eine PE-Tüte abgefüllt). Als Rückstellprobe wurden die verbleibenden 1,5 kg bei -20°C eingefroren.

Entnahme des Bodens ab 30 cm Tiefe

Die Bodenproben der verbleibenden 80 cm wurden mit einem Humax Handbohrer ($\varnothing=5$ cm) gewonnen. Dafür wurden jeweils fünf Proben pro Lysimeter entnommen. Dabei erfolgte eine Aufteilung in Schritten von 10 cm. Proben aus gleicher Tiefenstufe wurde miteinander vermischt. Durchführung in Anlehnung SOP 05/03-02.

2.4.2 Aufbereitung der Bodenproben

Für die folgenden Analysen wurde der Boden auf 2 mm gesiebt und in PE-Tüten umgefüllt. Anschließend wurde beim feldfeuchten Boden der pH-Wert und die Bodenfeuchte bestimmt. Für die weiteren Analysen wurde der Boden bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurden ca. 200 g mit einer Planetenmühle (Retsch PM4) homogenisiert (15 min bei 250 U*min⁻¹; Förster et al., 2009).

Bei der Planetenmühle wird durch Zentrifugalkraft das Mahlgut (Bodenprobe) mit den Mahlkugeln (fünf Stück) an die Mahlbecherwand gedrückt und so durch Reibung zerkleinert. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte ist in Abbildung 12 zu sehen.

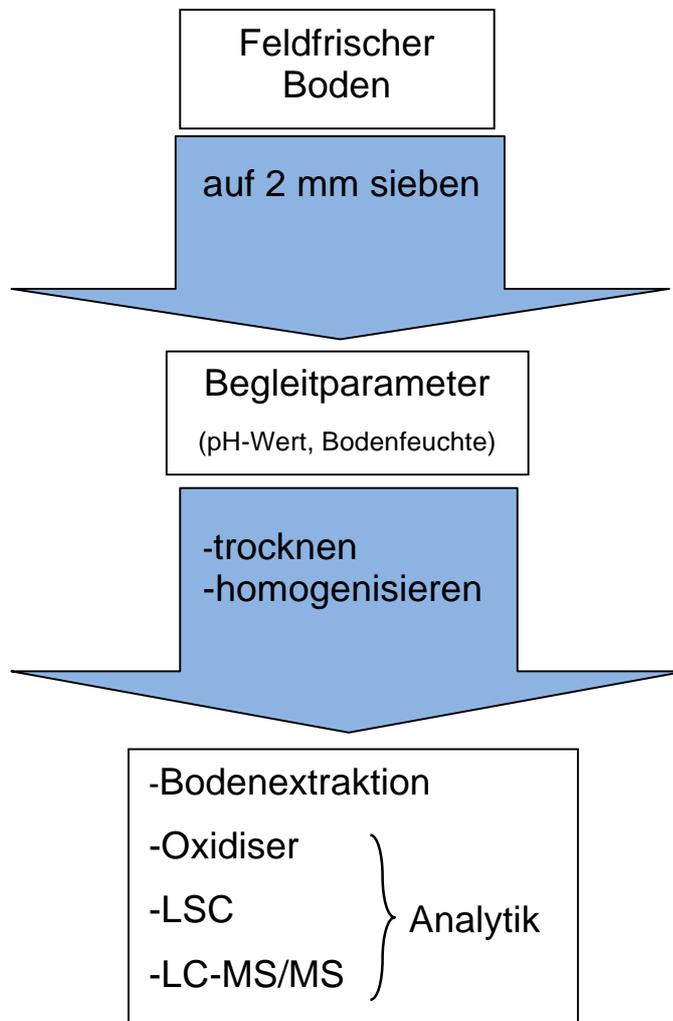


Abb. 12: Flussdiagramm der Arbeitsschritte der Bodenproben Bearbeitung.

2.5 Begleitparameter

2.5.1 pH-Wert-Bestimmung

Der pH-Wert wird in Anlehnung an die DIN ISO 10390 ermittelt. Der pH-Wert wird in einer Suspension aus Boden und Calciumchloridlösung (0,01 M) nach einer Stunde Einwirkzeit unter gelegentlichem Mischen mit einem pH-Meter bestimmt.

Das pH-Meter wird vor Gebrauch mit den Standard-Pufferlösungen pH 4 und pH 7 geeicht (Blume et al. 2000).

Analysebedingungen

Pro Bodenschicht wurden drei Wiederholungen durchgeführt.

- pH-Meter: Mettler Toledo 1120X
- Einwaage: 10 g lufttrockener Boden
- Reagenz: 25 ml 0,01 M Calciumchloridlösung

2.5.2 Bodenfeuchtebestimmung

Die Bodenfeuchte stellt eine der einfachsten Kenngrößen zur Beschreibung der Wasserverhältnisse eines Bodens dar. Die Bodenfeuchte wird nicht direkt gemessen sondern indirekt, d.h. gravimetrisch, über den Umweg des Gewichtes. Der feldfrische und feuchte Boden wird eingewogen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Bodenfeuchtebestimmung wird in Anlehnung an die DIN ISO 11465 (1996-12) durchgeführt. Die Bodenfeuchte wird in Bezug auf die Feuchtmasse des Bodens in Masse-% angegeben.

Analysebedingungen

Pro Bodenschicht wurden drei Wiederholungen durchgeführt.

- Trockenwaage: Mettler Toledo HB43-S Halogen
- Einwaage: 0,3 g-2 g Boden

2.6 Bodenextraktion

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen erfolgte eine sequenzielle Extraktion nach Förster et al. (2009). Dabei wird der Boden in drei aufeinander folgenden Schritten extrahiert. Die ersten beiden Schritte sind Schüttelextraktionen, der dritte Schritt ist ein Druckaufschlussverfahren mittels Mikrowellenofen. Eine Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Geräte ist im Anhang A zu finden.

Im ersten Schritt, der Extraktion mit einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung, werden die mobilen, wasserlöslichen und schwach adsorbierten SDZ und Metaboliten freigesetzt.

Der zweite Schritt ist die Extraktion mit Methanol (Me-OH). Dabei werden die leicht nachlieferbaren SDZ und Metaboliten, die z.B. durch eine Änderung des pH-Wertes mobil werden können, gewonnen.

Anschließend erfolgt eine harsche Acetonitril-Wasser-Extraktion (Aceto.- H_2O), bei der die schwer extrahierbaren und fest an die Bodenmatrix gebundenen SDZ und Metaboliten freigesetzt werden. Der Versuchsablauf ist in Tabelle 6 aufgezeigt.

Es wurden pro Bodenschicht drei Wiederholungen durchgeführt. Die Gesamtradioaktivität der Extrakte wurde mittels LSC (*liquid scintillation counting*) bestimmt. Alle Extrakte wurden dunkel bei 3°C für weitere Metaboliten-Untersuchungen mittels LC-MS/MS (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) aufbewahrt. Zur Aufbereitung der CaCl_2 -Extrakte für das LC-MS/MS wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt.

Analysebedingungen

Pro Bodenschicht wurden drei Wiederholungen durchgeführt.

- Überkopfschüttler: Rotoshake RS12 bei 20 U min^{-1}
- Mikrowellenofen: MLS-Ethos1600, 15 min bei 150°C
- Zentrifugen: *: Allegra 6KR, 30 min bei 900*g
**: J2-21 HS, 30 min bei 40.000*g
- Dekantierung: Überstand in 25ml Packard-Glas-Vials
- Waage: Präzisionswaage Mettler Toledo PE 24

Tab. 6: Schematischer Ablauf der Sequentiellen Extraktion nach Förster et al.(2009).

Einwaage:	10 g Boden in Zentrifugengefäße
CaCl ₂ -Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> -Reagenz: 25 ml, 0,01 M CaCl₂-Lösung -24 h Überkopfschütteln -zentrifugieren* -dekantieren -wiegen des Überstandes -1 ml im LSC messen (Scintillator:10 ml Ultima Gold)
Me-OH-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> -Reagenz: 25 ml, Methanol -4 h Überkopfschütteln -zentrifugieren* -dekantieren -wiegen des Überstandes -2 ml im LSC messen (Scintillator:10 ml Instagel)
Aceto.-H ₂ O-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> -Mikrowellenaufschluss -Reagenz: 50 ml 1:4 (v:v) Acetonitril: Wasser →20 ml aus Boden-Lösungsmittel-Suspension entnehmen -zentrifugieren** -dekantieren -wiegen des Überstandes -1 ml im LSC messen (Scintillator:10 ml Instagel) → restlicher Extrakt -zentrifugieren* -dekantieren -wiegen des Überstandes -Überstand verwerfen
Boden in Zentrifugengläschen trocknen für spätere Veraschung im Oxidizer	

*: Allegra 6KR, 30 min bei 900*g

** : J2-21 HS, 30 min bei 40.000*g

2.7 Festphasenextraktion

Da Salze die Genauigkeit des LC-MS/MS-Messungen herabsetzen (Ionenkompression) werden die CaCl_2 - Extrakte aufgereinigt. Zur Aufreinigung sowie Anreicherung erfolgt eine Festphasenextraktion (engl.: **solid-phase-extraction**, SPE). Bei einer SPE handelt es sich um eine mit einer Festphase (Sorbent) gefüllte Säule, über die das Anlylat, eine Flüssigphase, gezogen wird. Das Anlylat geht Wechselwirkungen mit dem Sorbent ein und verbleibt in der Säule. Salze und Lösungsmittel hingegen passieren ungehindert (Macherey-Nagel, 1998).

Aufgrund der Gestalt des SDZ und seiner Metaboliten, und deren Abhängigkeit vom pH-Wert, ist eine Einstellung der Konditionierungs-Reagenzien sowie der Probe auf pH 2 notwendig. Dies erhöht die Wiederfindungsrate. Ein besonders langsames Durchlaufen der Probe verbessert diese ebenfalls (Grote et al., 2005; Stoop et al., 2005).

Vor Gebrauch der Säule wird das Sorbent konditioniert. In Tabelle 7 ist der Versuchsablauf dargestellt.

Im letzten Arbeitsschritt wurde die Säule mit Methanol beschickt. Dabei löste sich das Anlylat und wurde zusammen mit dem Methanol ausgespült. Das Spülwasser und das Methanol wurden nicht angesäuert (Grote, 2005; Macherey-Nagel, 1998).

Aufgrund der polaren Gestalt von SDZ und seinen Metaboliten, ist es schwer alle Metaboliten aus der Säule zu eluieren. Mit der hier verwendeten Verfahrensmethodik konnte die Metaboliten nicht zu 100% eluiert werden. Es konnte keine genaue Aussage getroffen werden zu wie viel Prozent der jeweilige Metabolit in der Säule verbleib. Bei der Analyse der Metaboliten mittels LC-MS/MS ist somit für die CaCl_2 -Extrakte nur eine qualitative Aussage möglich.

Tab. 7: Arbeitsschritte bei der Aufreinigung der CaCl₂-Extrakte mittels SPE.

Schritt	Volumen	Reagenz	
1	3 ml	Methanol	} Angesäuert auf pH2
2	3 ml	5:95 Methanol:dest.Wasser	
3	3 ml	dest. Wasser	
4	X*	CaCl ₂ - Extrakt	
5	20 ml	dest. Wasser	
6	Kartusche trocknen 15min		
7	3 ml	Methanol	

*: Das CaCl₂- Extrakt wurde vor dem Auftragen auf die Säule gepoolt, 1 ml entnommen und im LSC vermessen. Der Rest wurde gewogen und zentrifugiert (30 min bei 40.000*g; J2-21HS). Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen.

Analysebedingungen

- SPE-Säule: Oasis HLB 6 cc-200 mg (Waters Oasis)
- Vakuumpumpe: Vacumbrand
- SPE-Aufsatz: SPE-24G
- Säure zum Ansäuern: 200 µl Ameisensäure

2.8 Pflanzenversuch

Für die Untersuchung der Remobilisierung des SDZ und seiner Metaboliten durch Rhizosphärentätigkeit wurde der Boden der Lysimeter A2 Kal (Braunerde) und B2 Mer (Parabraunerde) aus den Tiefen 0-5 cm und 5-10 cm verwendet. Es wurden vier Ansätze mit drei Wiederholungen durchgeführt, sowie eine 0-Probe (Kontrolle) zu jedem Ansatz, wie in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tab. 8: Bepflanzungs-Ansätze in Kick/Brauckmann-Gefäße (X = Bepflanzt).

	A2 Kal		B2 Mer	
	Braunerde		Parabraunerde	
Ansatz	1	2	3	4
Tiefe [cm]	0-5	5-10	0-5	5-10
	X	X	X	X
	X	X	X	X
	X	X	X	X
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle

2.8.1 Versuchsaufbau

Vor Beginn des Versuches wurden die Kick/Brauckmann-Gefäße beschriftet und das jeweilige Tara-Gewicht notiert.

Die Bodenfeuchte der einzelnen Bodenschichten wurde auf 25% $W_{k_{max}}$ eingestellt, dazu wurde diese vor Versuchsbeginn ermittelt und der Boden ggf. befeuchtet. In jedes Kick/Brauckmann-Gefäß wurden mit ca. 8 kg Boden befüllt, das Endgewicht wurde notiert. In die Kick/Brauckmann-Gefäße wurde in einer Tiefe von ca. 20 cm 0,2 g des Volldüngers Blaukorn als Wurzeldünger eingebracht (Compo, 2009).

Nach Zugabe des restlichen Bodens wurde das Maiskorn 10 cm in den Boden gedrückt. Um ein Austrocknen der Kick/Brauckmann-Gefäße zu vermeiden, wurden sie mit Alufolie abgedeckt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Bodenfeuchte kontrolliert und gegebenenfalls die fehlende Menge Wasser zugegeben.

Die Maispflanzen wurden in eine Pflanzenanzuchtbank mit einer Beleuchtungsdauer von 24 h, Beleuchtungsintensität 250 W pro Tag und konstanter Temperatur von 19°C aufgezogen. Ein Aufbau des Versuches ist in Abbildung 13.



Abb. 13: Versuchsaufbau des Pflanzversuches, (Ansicht: Maispflanzen in Kick/Brauckmann-Gefäße unter der Pflanzenanzuchtbank)

Material

- Kick/Brauckmann-Gefäße: 16 St. ($\varnothing=22$ cm)
- Volldünger: ca. 3 g Blaukorn (ENTEC, COMPO)
- Maiskörner: 12 St. PR39K13 (Early Star, Baiano)
- Waage: Mettler Toledo G5002-2
- Trockenwaage: Mettler Toledo HB43-S Halogen
- Sonstiges: Alufolie, Messbecher, Handschaufel, Zollstock

2.8.2 Probenentnahme Pflanzen

Der Versuch wurde nach ca. 80 Tagen beendet. Es wurden das Gesamtgewicht des Versuchsaufbaus, das Gewicht der Kick/Brauckmann-Gefäße, der oberirdischen (Stängel und Blätter) und unterirdischen Pflanzenteile sowie das Gewicht des Bodens notiert. Das Freilegen der Rhizosphäre geschah erst grob durch Zerdrücken der Bodenkrumen mit den Fingern. Das Trennen des Bodens von den restlichen Klein- und Fein-Wurzeln geschah durch Siebung (<2 mm). Die Wurzeln wurden unter fließendem Wasser mit einer Nagelbürste gereinigt und abgewaschen bis kein Boden an der Wurzel anhaftete. Anschließend wurden sie mit einem Papiertuch abgetrocknet und gewogen. Die Wurzeln und das oberirdische Pflanzenmaterial wurden für die weiteren Analysen mit einer Schere zu ca. 2 cm große Stücken zerkleinert und in separaten PE-Tüten gesammelt. Das gesamte Pflanzenmaterial wurde bei -20°C eingefroren.

Vor dem Veraschen des Pflanzenmaterials wurden ca. 5 g pro Tüte entnommen und bis zur Gewichtskonstanz in einem Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Des Weiteren wurde mit dem Boden, wie oben beschrieben, eine sequenzielle Extraktion nach Förster et al. (2009) durchgeführt, sowie der pH-Wert ermittelt.

Die Probenentnahme ist angelehnt an SOP 06/01-09.

Material

Waage:	Mettler Toledo G5002-2
Sonstiges:	PE-Tüten, Messbecher, Handschaufel, Zollstock, Sieb (<2 mm), Pflanzwannen, Nagelbürste

2.9 Analytische Methoden

Der Boden wurde vor und nach der sequentiellen Extraktion nach Förster et al. (2009) in dem Oxidizer verascht. Dies diente der Bestimmung der Gesamtradioaktivität des Bodens vor und nach der sequenziellen Extraktion, und somit zusätzlich der Quantifizierung der nicht extrahierbaren Rückstände (NER).

Die einzelnen Extrakte wurden mit dem LSC auf deren Gesamtradioaktivität gemessen. Die Analyse der Konzentrationen von SDZ und seinen Metaboliten erfolgt mittels LC-MS/MS.

2.9.1 Oxidizer

Bei dem Veraschen von radioaktiven Bodenproben mittels Oxidizer wird der in einer Bodenprobe enthaltene Kohlenstoff in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre zu CO_2 oxidiert. Das freigesetzte (radioaktive) CO_2 wird mittels N_2 -Gasstrom in eine Absorptions-Szintillatorlösung überführt und anschließend im LSC vermessen.

Der verwendete Robox-192 (Zinsser Analytic GmbH) ist ein kombiniertes System aus Verbrennungsgerät (Biological Oxidizer, OX 500 R.J. Harvey Instrument) und Roboter. Es können bis zu 192 Proben automatisch verascht werden. Die Proben werden in Porzellanschiffchen mit einem Edelstahlöffel in das Verbrennungsrohr hinein geschoben und verbrannt. Die Verbrennungsgase werden über ein Schlauchsystem in ein mit Isopropanol gefülltes Glasfläschchen geleitet. Der so gewaschenen Gasstrom wird über ein Teflonschlauch weitergeleitet und in ein mit CO_2 -Absorptions-Szintillatorlösung gefülltes 20 ml Plastik-LSC-Vial überführt (SOP 07/06-07).

Um eine korrekte Veraschung zu gewährleisten, muss die Wiederfindungsrate der Methode ermittelt werden. Aus diesem Grund werden vor der Veraschung der Proben sechs Celluloseslids mit einem Standard, einer Lösung bekannter ^{14}C -Konzentration, verascht. Nach dem Durchlauf der Proben werden sechs weitere Celluloseslids mit dem Standard verascht, zusätzlich werden nach jeder Veraschung sechs Celluloseslids ohne Standard verascht. Sie sind der sogenannte Blank. Erst nach der Veraschung der Blanks wird der Standard in die Vials zugegeben. Um die Wiederfindung der Methode zu bestimmen werden die gefundenen Aktivitäten aus

den veraschten Standards, vor und nach den Proben, mit denen der Blanks verglichen. Mit der Wiederfindungsrate werden die Werte der Proben korrigiert. Sie sollte größer als 90% sein und muss bei jeder Veraschung neu ermittelt werden (SOP 07/06-07).

Analysebedingungen

- Einwaage pro Schiffchen: 0,5 g Bodenprobe
- Gasdurchfluß Oxidizer: 350 ml min⁻¹ für N₂ und O₂ jeweils bei 0,5 bar
- Temp. Verbrennungsrohr: ca. 900°C
- Szintillator-Lösung: Oxysolve (Zinner Analytic)
- Volumen Szintillator-Lösung: 15 ml

2.9.2 LSC-Messung

Bei der Liquid Scintillation Counting-Messung (LSC-Messung) wird die Aktivität von β -Strahlern (z.B. ^{14}C) in Lösung gemessen. Die Aktivität wird beispielsweise in Becquerel (Bq) angegeben. Diese gibt die Anzahl der pro Zeiteinheit zerfallenden Atomkerne an. Beim LSC wird die Aktivität nicht direkt gemessen, sondern vielmehr das Maß der Anregung der zur Fluoreszenz befähigten organische Molekülen in der Szintillatorlösung (Stolz, 2003). Die durch den β -Zerfall freigesetzte Energie regt die aromatischen Lösemittelmoleküle an, welche dadurch zur Fluoreszenz gebracht werden, wodurch Photonen emittiert werden. Die Photonen treffen auf die Photokathode des Photomultipliers, in dem das Lichtsignal in ein elektrisches Signal überführt wird. Die so entstandenen Spannungsimpulse werden an einen Analog-Digital-Wandler und einen Vielkanalanalysator weitergegeben. Die so ermittelte Energie ist zur ursprünglichen Energie proportional und ebenso wie die Zerfallsenergie charakteristisch für jedes Nuklid (Kessler, 1989).

Analysebedingungen

- Probenvolumen: 1 ml bei CaCl_2 - und MLS-Extraktionslösung
2 ml bei MeOH- Extraktionslösung
- Szintillator: Bei CaCl_2 -Extraktionslösung: Ultima Gold (Perkin Elmer)
Bei MeOH- und MLS-Extraktionslösung: Insta-Gel Plus (Perkin Elmer)
- Szintillatormenge: 10 ml
- LSC-Gerät: 2500 TR (Packard)
- Nachweisgrenze: 0,400 Bq

2.9.3 LC-MS/MS

Das liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ist eine Kombination aus High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) gekoppelt mit zwei Massenspektrometern (MS). Mit dem LC-MS/MS ist eine Quantifizierung von Stoffen aus einer Lösung mit stark belasteter Matrix möglich. Die Nachweisgrenze kann im nmol l^{-1} -Bereich liegen.

Diese Nachweisgrenze ist jedoch stark von der chemischen Struktur und damit von der Ionisierbarkeit der Verbindung abhängig. Matrixeffekte, zum Beispiel chemische Effekte sind ebenfalls mitentscheidend für die Höhe der Nachweisgrenze. Bei der LC-MS/MS wird die Probenlösung zuerst durch eine HPLC geschickt.

Bei einer HPLC wird die Probe mit einem Laufmittel (mobile Phase) durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt. Die in der Probe befindlichen Substanzen (Analyt, Lösungsmittel, Matrix) gehen mit der stationären Phase unterschiedlich starke Wechselwirkungen ein. Einige Substanzen gehen nur eine geringe Bindung mit der stationären Phase ein und werden so schneller freigelassen als Substanzen die hohen Wechselwirkungen unterliegen. So entstehen die spezifischen Retentionszeiten der verschiedenen Substanzen (Welsch, 2002).

Das MS misst das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von Teilchen und besteht aus drei Teilen: Ionenquelle, Analysator und Detektor. Im MS wird der Analyt ionisiert (hier ESI-Ionenquelle). Befreit von den Lösungsmittelmolekülen gelangen die entstandenen Analytionen durch ein Trägergas (N_2) in den MS-Analysator.

Dort werden die Ionen durch elektrische Felder ihrem m/z -Verhältnis nach getrennt und im Detektor registriert.

Das Besondere bei einem LC-MS/MS ist, dass nach dem ersten Analysator eine Kollisionszelle (q) zwischengesetzt wird. In der Kollisionszelle werden die Ionen durch Inertgas (hier Argon) gestoppt. Dabei zerfallen die Ionen (Precurer-Ionen) in zwei oder mehrere kleinere charakteristische Tochter-Ionen. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurden nur die charakteristischen Übergänge von Precursus-Ionen, zu Tochter-Ionen aufgenommen. In Abbildung 14 und Tabelle 9 ist ein Chromatogram des LC-MS/MS sowie die Masseübergänge (m/z) der Precurer- und Tochter-Ionen der zu untersuchenden Substanzen, SDZ, Acetyl-SDZ, 4-OH-SDZ dargestellt (Sukul et al. 2007).

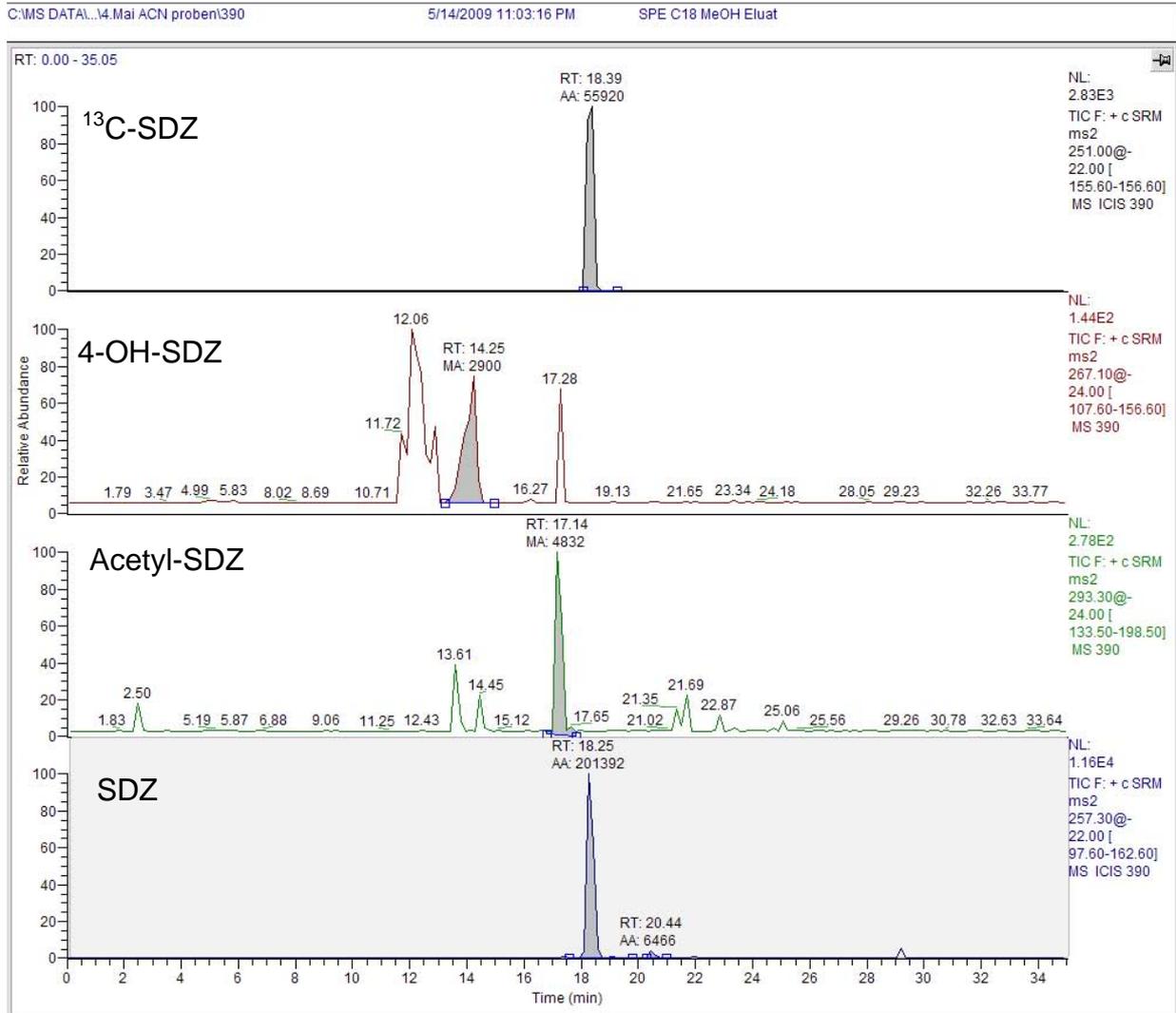


Abb. 14: Beispieltchromatogram des LC-MS/MS (grau hinterlegte Flächen gesuchter Substanz).

Tab. 9: LC-MS/MS Einstellungen in Anlehnung an Sukul et al. (2007).

	Precurcer	Tochterion 1	Tochterion 2	Kollision- Energie	Retentionszeit
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	CE-Tochterion 2	min
SDZ	251,1	92,1	156,1	34	18,25
4-OH-SDZ	267,1	108,1	156,1	26	13,75
Acetyl-SDZ	293,3	198	134	24	17,14
¹³ C-SDZ (interner STD)	257,3	162,1	98,1	22	18,39

Analysebedingungen

- HPLC: Agilent 1100 Serie
- MSMS: TSQ Quantum Thermo Modell 2002; Thermo-Fisher USA
- Nachweisgrenze: MRM: 0,001 µg*ml⁻¹
- HPLC-Pumpe: (binär) K-500, Knauer, Berlin
- Säule: RP18 Synergi Fusion polar
(L=150 mm, Ø=3 mm, Korngröße= 3 µm)
(Phenomenex, Torrance, Kalifornien USA)
- Vorsäule: RP18, 5 mm
- Flussrate: 0,2 ml min⁻¹
- Transferkapillare: 200°C
- Spray Voltage: 4000 Volt
- Gas: N₂ sheat; 25, Aux 5 (dimensionslos)
- Aux Gas: 5 ml
- Injektionsmenge: 10 µl Probe mit 1:10 (v:v) internen STD
- Quelle: ESI (+) positiver Mode

Verwendete Chemikalien

- HPLC Eluenten: 1.) Acetonitril Biosolve LCMS
2.) 2 mM Ammoniumacetat in Millipore Wasser
- Kollisionsgas: Argon 5.0, 1,5 m Torr
- Sheatgas: Stickstoff (N₂) Linde Tank 99,5% Reinheit

2.10 Auswertung

Für die Bearbeitung, Darstellung, Verwaltung sowie die statistische Auswertung der Daten, wurde das Programm Excel 2003 verwendet.

Die Daten der Gesamtradioaktivität wurden in die Äquivalentmenge (A_{eq} [mmol]) des SDZ und seiner Metaboliten umgerechnet um eine eingängige Darstellung zu ermöglichen. Dabei wurden die Daten des LSC, die in [$Bq\ ml^{-1}$] Probe (Extrakt), angegeben. Die Umrechnung der LSC-Daten zu A_{eq} SDZ erfolgte wie folgt:

Die LSC-Daten wurden zu erste in APG (Aktivität pro Gramm) in [$Bq\ g^{-1}$] Boden umgerechnet:

$$APG = \frac{(LSC_Daten[Bq/ml]) * (Extrakt[g])}{(\rho_{Extrakt}[g/ml]) * (Einwaage_{Boden}[g])} = [Bq/g]$$

Um auf A_{eq} SDZ zu kommen muss die spezifische Aktivität ($A_{(0)}$) sowie die molare Masse von ^{14}C -SDZ ($M^{14}C$ -SDZ) mit einbezogen werden:

$$A_{eq} = \frac{(APG[Bq/g]) * (\rho_{Boden}[g/cm]) * (Vol_{Bodenschicht}[cm])}{(A_{(0)}^{14}C-SDZ[Bq/mg]) * (M^{14}C-SDZ[mg/mmol])} * 21 * 1000 = [mmol]$$

Bei der Metabolitenanalyse werden die Daten in Äquivalentkonzentration (c_{eq}) in [$mmol\ g^{-1}$] angegeben. Die Rohdaten des LC-MS/MS [$\mu g\ g^{-1}$] werden wie folgt konvertiert: Beispiel c_{SDZ}

$$c_{SDZ} = \frac{(Lc-MS/MS[?g/ml]) * (Extrakt[g])}{(Einwaage_{Boden}[g]) * (\rho_{Extrakt}[g/ml]) * (M-SDZ[mg/mmol])} = [mmol/g]$$

Für die Berechnung wichtigen Parametern sind in den folgenden Tabellen (10, 11, 12) zu entnehmen. Die Dichte (ρ_{Boden}) für die Braunerde aus Kal beträgt $1,46\ g*cm^{3-1}$, die für die Parabraunerde aus Mer $1,57g*cm^{3-1}$. Die spezifische Aktivität ($A_{(0)}$) von ^{14}C -SDZ beträgt $8.600.000\ [Bq\ mg^{-1}]$. Das Mischungsverhältnis von ^{14}C -SDZ zu unmarkiertem SDZ lag bei 1:20 (w:w), siehe Abschnitt 2.3.

Tab. 10: Dichte der verwendeten Extrakte (ρ_{Extrakt}) in $[\text{g cm}^{-3}]$

	CaCl ₂ M 0,01	Me-OH	Aceto.+H ₂ O 1:4
Dichte (ρ_{Extrakt}) [g cm ⁻³]	1,00	0,79	0,96

Tab. 11: Molares Gewicht (M) der Metaboliten in $[\text{mg mmol}^{-1}]$

	¹⁴ C-SDZ	SDZ	4-OH-SDZ	Acetyl-SDZ
M [mg mmol ⁻¹]	252280	250280	267270	310320

Tab. 12: Volumen in $[\text{m}^3]$ der Bodenschichten der Lysimeter A1, B1 und A2, B2.

Bodenschicht [cm]	0,5 m ² Lysimeter		1 m ² -Lysimeter	
	(A1, B1)	(A2, B2)	(A1, B1)	(A2, B2)
	[m ³]	[m ³]	[m ³]	[m ³]
0-5	0,025	0,05	0,025	0,05
5-10	0,025	0,05	0,025	0,05
10-20	0,05	0,10	0,05	0,10
20-30	0,05	0,10	0,05	0,10

3 Ergebnisse

3.1 Lysimeterversuche

Die Beschreibung der Ergebnisse gliedert sich in zwei Abschnitte: 0,5m²- und 1m²-Lysimeterversuch. In jedem Abschnitt wird auf die Begleitparameter, die Verteilung der Äquivalentmenge von SDZ (A_{eq} SDZ) und die sequenzielle Analyse nach Förster et al. (2009) eingegangen. Desweiteren werden die Ergebnisse der SDZ-Metabolitenanalyse mittels LC-MS/MS behandelt.

Mittels LC-MS/MS wurde der unmarkierte SDZ-Anteil analysiert, der in einem Verhältnis von markiert:unmarkiert 1:20 (w/w) in Boden vorliegt.

3.1.1 0,5 m²-Lysimeterversuche

Die 0,5 m²-Lysimeter aus Kal (A1) und Mer (B1) wurden nach der Applikation des SDZ zu fünf Zeiten schichtweise beprobt (Abschnitt 2.2.1-2, Tabelle 5).

Der Boden von Tag 4 (18.11.2005) stand nicht zur Analyse der Begleitparameter sowie zur sequenziellen Analyse zur Verfügung. Die Gesamtradioaktivitätsmessung von Tag 4 wurde von einem Mitarbeiter des FZJ durchgeführt. Von dem Boden des Tages 29 konnten die oberen zwei Schichten (0-5 cm und 5-10 cm) für die oben erwähnten Analysen verwendet werden. Die Messdaten und deren Umrechnung, sowie die einzelnen Standardabweichungen und Varianzenkoeffizienten befinden sich im Anhang B (CD-ROM). Weitere Tabellen der Ergebnisse befinden sich im Anhang A.

Begleitparameter

Die Bodenfeuchte bezogen auf die Feuchtemasse des Bodens, wurde in den ersten beiden Bodenschichten gemessen und ist als Mittelwert in Tabelle 13 dargestellt. Der Boden aus B1 (Mer) besaß an den angegebenen Messzeitpunkten eine fast doppelt so große Bodenfeuchte als der Boden aus A1 (Kal).

Tab. 13: Bodenfeuchte (Feuchtmasse-%) in den ersten beiden Bodenschichten (0-5 und 5-10 cm) der 0,5 m²-Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer)

	Tag 29 13.12.2005	Tag 120 14.03.2006	Tag 218 20.06.2006	Tag 1022 10.09.2008
A1 (Kal) [%]	12	12	12	8
B1 (Mer) [%]	24	25	22	18

Die pH-Werte sind in Abbildung 15 dargestellt. Der pH-Wert wird als Mittelwert aus den oberen beiden Bodenschichten (0-5 und 5-10 cm) dargestellt. Bei A1 lag er am Tag 29 im mäßig saureren Bereich von 5,9 und sank im Verlauf des Experiments stetig auf 4,8 (stark sauer). Bei B1 war eine ähnliche Versauerung zu erkennen. Anfangs lag der pH-Wert im schwach alkalischen Bereich 7,2 (Tag 29) und sank auf 6,2 (schwach sauer) am Tag 1022.

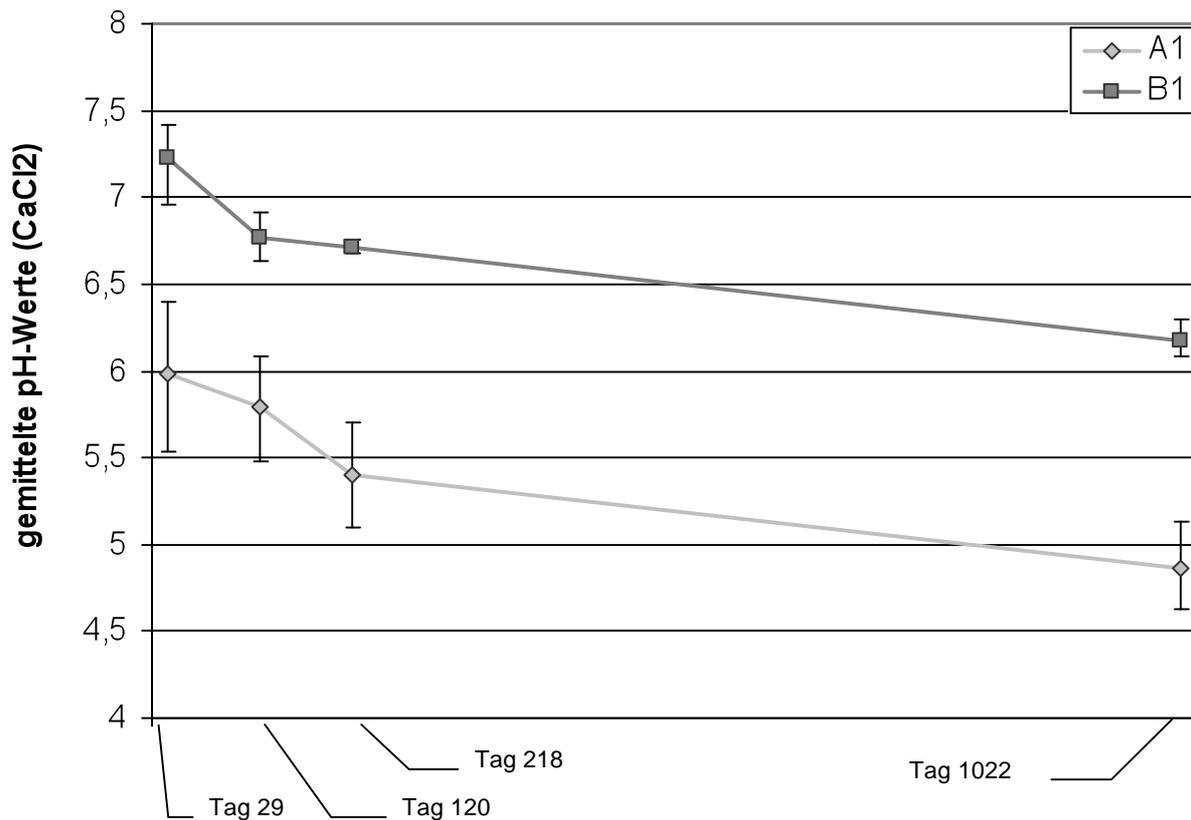


Abb. 15: Gemittelte pH-Werte (CaCl₂) der Bodenproben aus den 0,5 m²-Lysimetern A1 (Kal) und B1 (Mer).

Verteilung des SDZ

Die Abbildung 16 zeigt die Verteilung der Äquivalenzmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] bezogen auf die gesamte beprobte Tiefe von 30 cm, für alle Probenentnahmetage der Lysimeter A1 und A2. Vor Beginn des Versuches wurde eine A_{eq} von ca. 0,50 mmol SDZ aufgetragen. Der Mittelwert der gemessenen A_{eq} von SDZ bis in eine Beprobungstiefe von 30 cm war bei beiden Lysimetern 0,60 mmol.

Die Verteilung der A_{eq} SDZ im Lysimeter A1 (Hellgrau) ist mit durchschnittlich 0,56 mmol konstant, einziger Ausreißer ist Tag 218 mit 0,78 mmol. Bei der Verteilung von A_{eq} SDZ im Lysimeter B1 (Dunkelgrau) war keine Tendenz zu erkennen. Das Maximum von B1 lag mit 0,99 mmol am Tag 218, das Minimum lag am Tag 1022 bei 0,53 mmol.

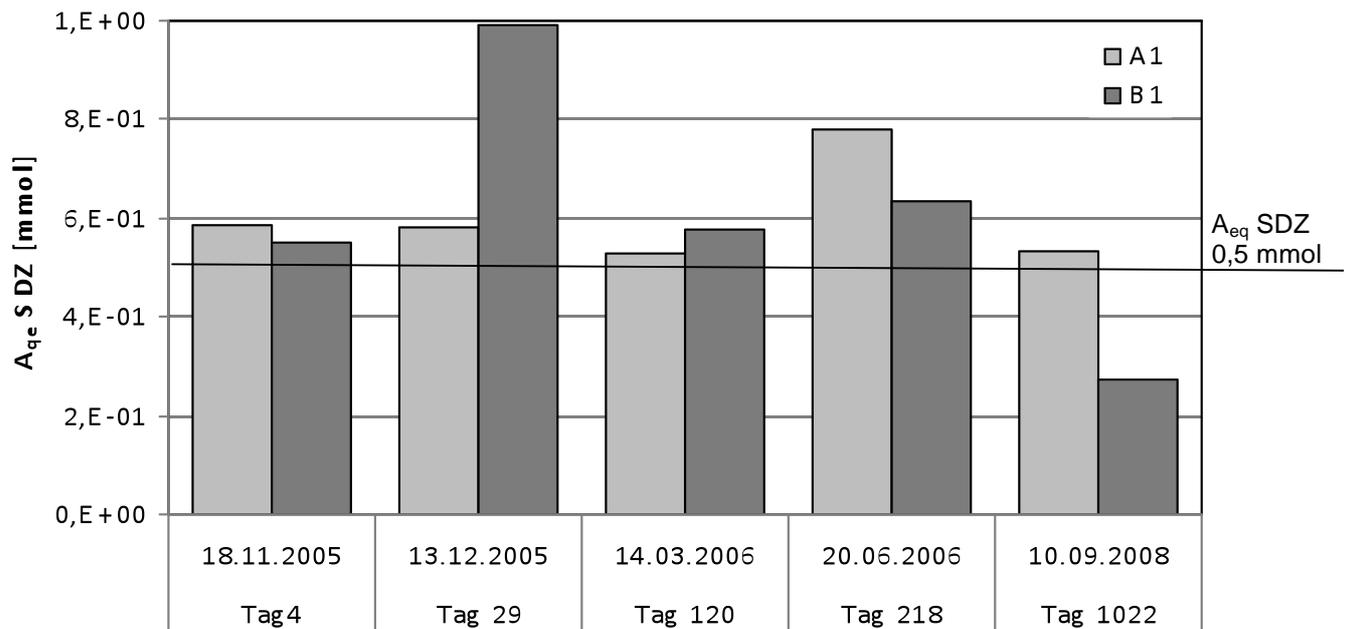


Abb. 16: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) bis in einer Tiefe von 0-30 cm, gegen die Zeit aufgetragen. (Die Linie markiert die applizierte (A_{eq}) SDZ von 0,50 mmol.)

Um einen Einblick in die Verteilung der A_{eq} von SDZ über die Tiefe zu bekommen sind in den Abbildungen 17 und 18 die A_{eq} SDZ in Prozent bezogen auf die einzelnen Schichten dargestellt. Aus den Diagrammen wird deutlich, dass es bei längerem Verbleib von SDZ und Metaboliten im Boden, zu einer Verlagerung in die tieferen Bodenschichten kommt. Dabei fällt auf, dass sich in A1 (Kal) das SDZ in den beiden mittleren Bodenschichten (5-10 cm und 10-20 cm) ansammelte. Bei B1 (Mer) hingegen verblieb die A_{eq} SDZ ausschließlich in den oberen Bodenschichten.

Bei der ersten Probeentnahme am Tag 4 waren bei beiden Lysimetern ca. 85% (A1: 0,49 mmol; B1: 0,47 mmol) der gemessenen A_{eq} SDZ in der obere Bodenschicht (0-5 cm) wiederzufinden. Die verbleibenden ca. 15% befanden sich in der zweiten Schicht in 5-10 cm. Bei der Betrachtung der Daten der letzten Probeentnahme am Tag 1022, war eine Verlagerung in die tieferen Schichten zu beobachten. Bei A1 verblieben 22% (0,12 mmol) in der ersten Schicht 0-5 cm, 28% (0,15 mmol) in der Zweiten und 40% (0,22 mmol) in der Dritten.

Bei B1 war die Verteilung anders: 44% (0,12 mmol) des A_{eq} SDZ befanden sich in der ersten Schicht, 37% (0,10 mmol) in der Zweiten und 15% (0,04 mmol) in der Dritten.

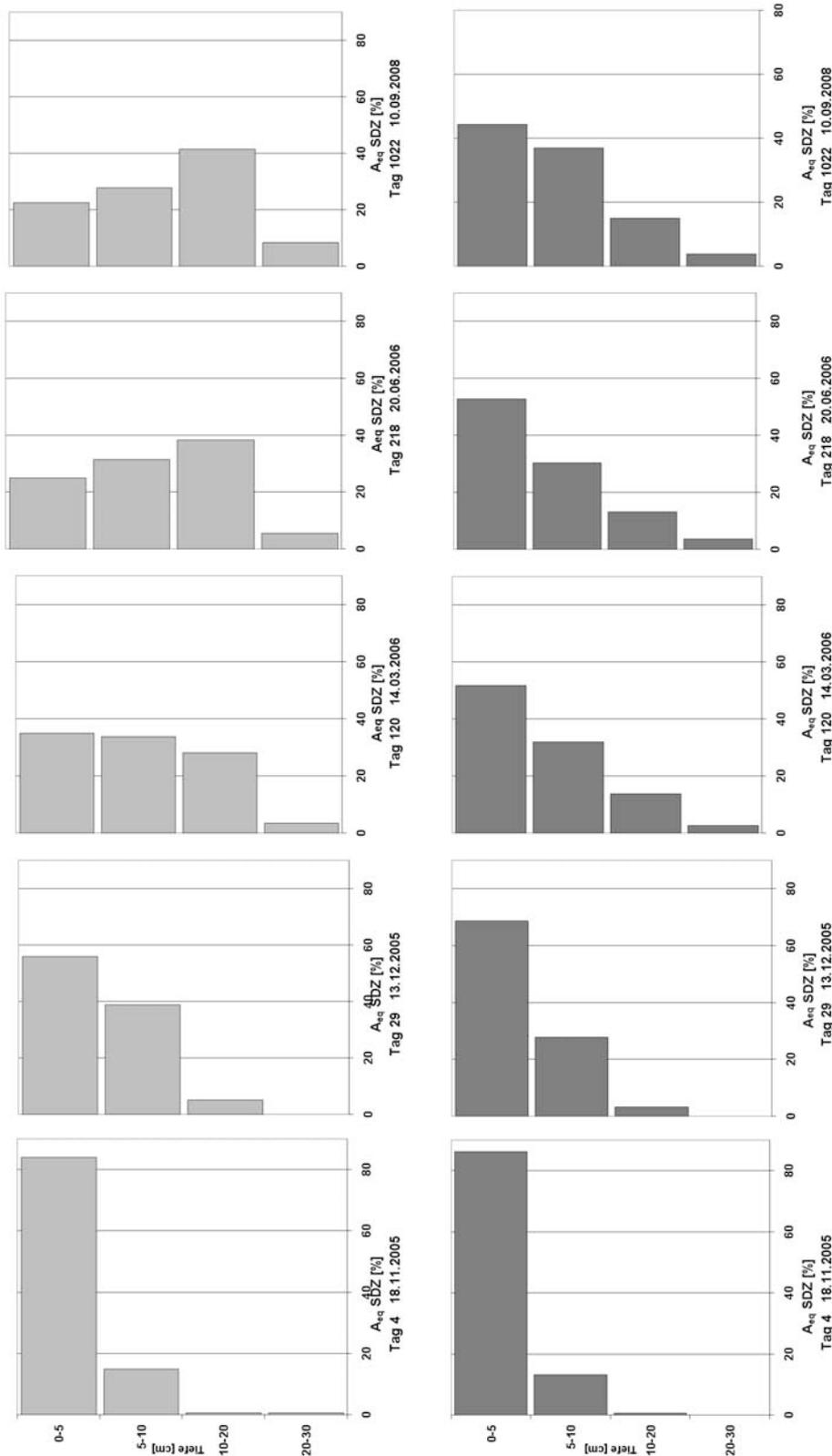


Abb. 17: (links) schichtweise Verteilung bis in einer Tiefe von 30 cm der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) (Hellgrau) an den Entnahmezzeitpunkten (Tag 4, 29, 120, 218, 1022)

Abb. 18: (rechts) schichtweise Verteilung bis in einer Tiefe von 30 cm der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) (Dunkelgrau) an den Entnahmezzeitpunkten (Tag 4, 29, 120, 218, 1022)

Sequentielle Extraktion

Die Ergebnisse der sequentiellen Extraktion sind in der Tabelle 14 sowie in den Abbildungen 19 und 20 als Summen der einzelnen Mittelwerte der Probeentnahmetage bis in eine Beprobungstiefe von 30 cm dargestellt. Die Wiederfindungsrate, bezogen auf die Messung der Gesamtradioaktivität, lag bei A1 bei 98,6% und bei B1 bei 100,8%. Die Ergebnisse sind als Äquivalentkonzentrationen (A_{eq}) SDZ in [mmol] angegeben. Es wurden die Summen der einzelnen Mittelwerte der Extraktionsschritte (CaCl₂, Me-OH, Aceto. +H₂O) der Bodenschichten sowie die NER aufgetragen. Aufgrund der geringen Ausbeuten in den Me-OH-Extrakten sind zur besseren Darstellbarkeit in den folgenden Abbildungen die CaCl₂- und Me-OH- Extraktionen als „Schüttelextraktion“ zusammengefasst. Alle Zahlenwerte sind in Tabelle 22 und 23 im Anhang A aufgeführt.

Tab. 14: Summen der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm

		A_{eq} SDZ [mmol]							
		Tag 29		Tag 120		Tag 218		Tag 1022	
Extraktion		[mmol]	%	[mmol]	%	[mmol]	%	[mmol]	%
A1	NER	0,25	45	0,25	45	0,36	49	0,34	63
	Aceto.+H ₂ O	0,19	35	0,23	42	0,30	42	0,16	30
	Schüttelextraktionen	0,11	21	0,07	13	0,07	9	0,04	7
B1	NER	0,42	54	0,33	52	0,40	61	0,19	70
	Aceto.+H ₂ O	0,27	34	0,25	38	0,21	31	0,05	20
	Schüttelextraktionen	0,10	12	0,06	9	0,05	8	0,03	10

Insgesamt konnte auch hier 0,6 mmol A_{eq} SDZ in jedem Lysimeter gefunden werden. Bei beiden Lysimetern war im Laufe der Zeit eine geringer werdende Konzentration der extrahierbaren Fraktion (Schüttelextraktion und Aceto. +H₂O-Extraktion) festzustellen. Der Anteil der NER nimmt im Laufe der Zeit zu. Mit der CaCl₂-Extraktion konnten 9% bei A1 und 8% bei B1 extrahiert werden. Bei der Extraktion mit Me-OH waren es 3% bei A1 und 2% bei B1. Der Hauptanteil an der Extrahierbaren-Fraktion wurde mit der Aceto. +H₂O-Extraktion extrahiert, A1: 37%; B1: 31%).

So konnte bei Lysimeter A1 zu Beginn (Tag 29) ein NER-Anteil von 45% errechnet werden. Am Tag 1022 waren es 64%. Der extrahierbare Anteil nahm im Verlauf des Versuches ab, am Tag 29 und 120 55% am Tag 218 50% und am Tag 1022 35%.

Bei dem Lysimeter B1 betrug der Anteil des NER am Tag 29 54% und stieg auf 71% am Tag 1022. Der Anteil des extrahierbaren A_{eq} SDZ sank von 46% am Tag 29 auf 30% am Tag 1022. Insgesamt lag der NER- Anteil bei Lysimeter A1 ca. 10% höher als bei B1.

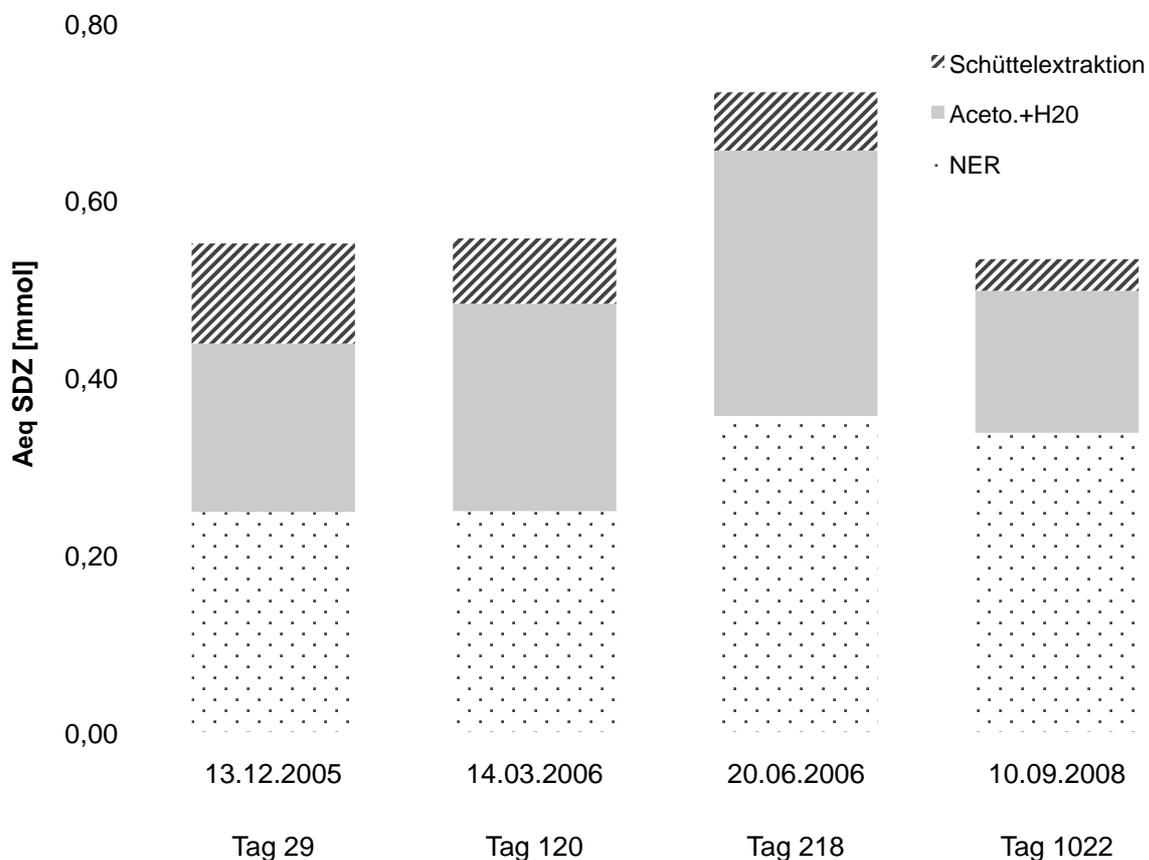


Abb. 19: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm, gegen die Zeit aufgetragen.

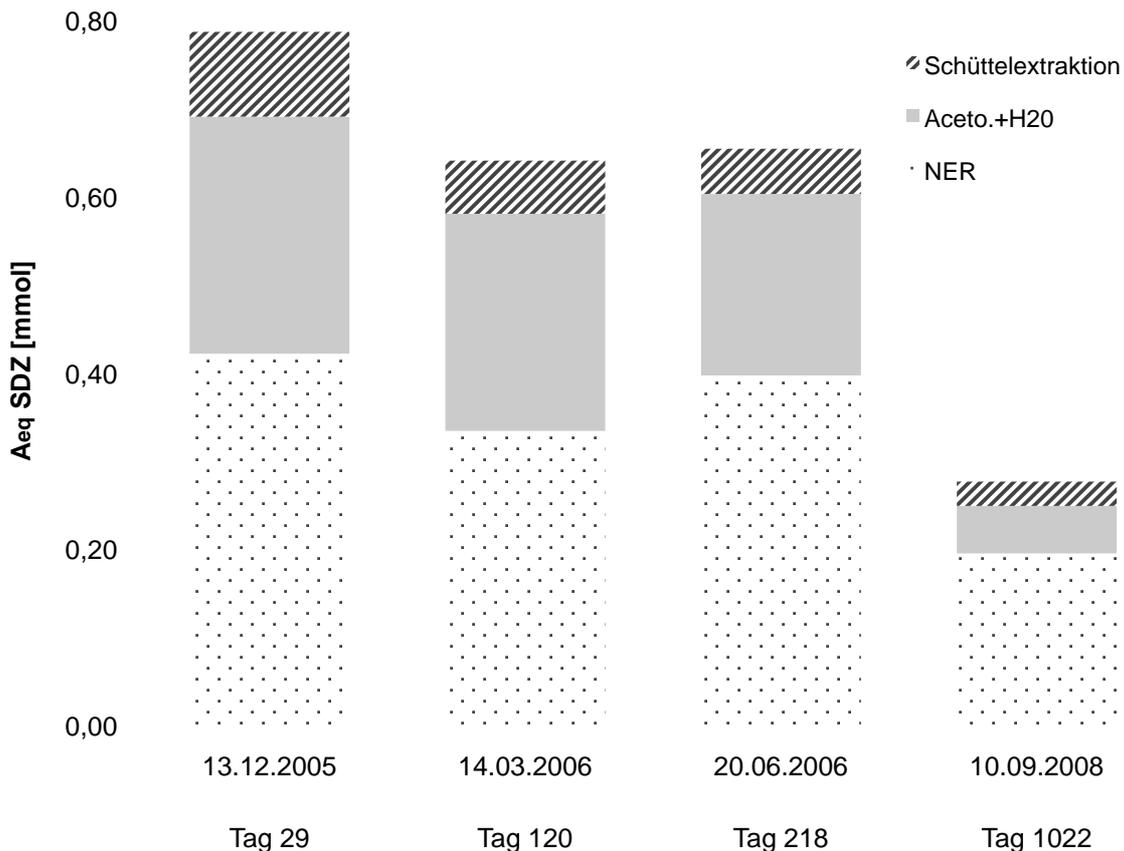


Abb. 20: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm, gegen die Zeit aufgetragen.

In den Abbildungen 19 und 20 ist die Verteilung der A_{eq} SDZ der sequentiellen Extraktion bezogen auf die Mittelwerte der einzelnen Extraktionen und NER der Bodenschichten in Prozent dargestellt. In den Abbildungen ist die Verteilung an den Tagen 29 und 1022 von A1 und B1 dargestellt.

Bei Lysimeter A1, Abbildung 21, wurde am Tag 29 die maximal extrahierbare A_{eq} SDZ von 0,31 mmol gemessen. Davon waren 0,25 mmol in der oberen Bodenschicht. Der NER-Anteil lag insgesamt bei 0,25 mmol, davon wurden in der oberen Bodenschicht (0-5 cm) 0,22 mmol gemessen. Am Tag 1022 wurde der Haupt-Anteil des A_{eq} SDZ, 0,22 mmol in der mittleren Bodenschicht (10-20 cm) gefunden. Das sind 40% der an diesem Tag gefundenen A_{eq} SDZ. In den beiden oberen Schichten (0-5, 5-10 cm) war der NER-Anteil und der Extrahierbare-Anteil gleich bei 20% (NER) bzw. 5% (extrahierbar). Bei der Verteilung in der Schicht 10-20 cm lag von der gesamt gefundenen A_{eq} SDZ von 25% als NER und 15% als extrahierbare A_{eq} SDZ vor.

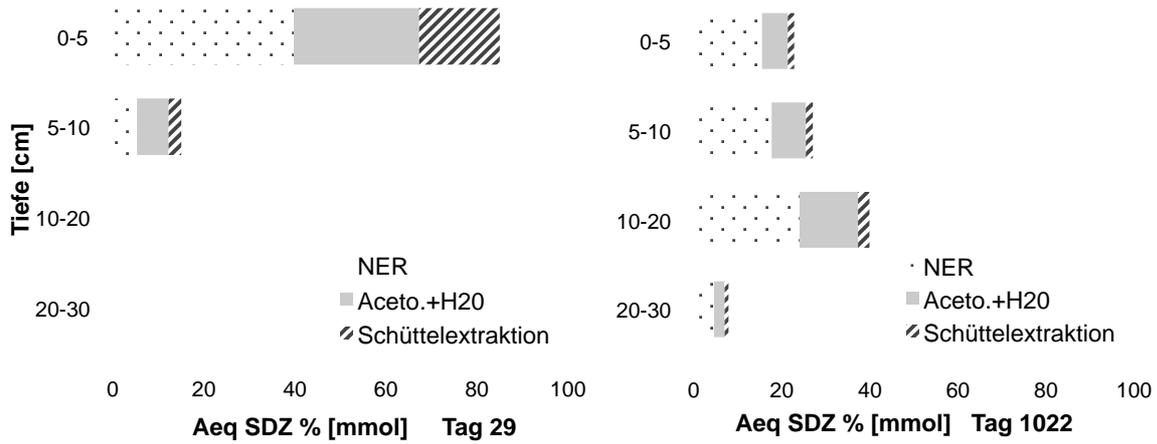


Abb. 21: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in Prozent [%] aus der sequentiellen Extraktion, aus Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen von Tag 29 (links) und Tag 1022 (rechts).

Bei Lysimeter B1, Abbildung 22, konnte am Tag 29 in der oberen Bodenschicht 0-5 cm 52% insgesamt A_{eq} SDZ 0,79 mmol gefunden werden. Der NER-Anteil wurde mit 0,42 mmol gemessen, der extrahierbare Anteil mit 0,37 mmol. Am Tag 1022 konnten insgesamt in allen Bodenschichten nur 0,27 mmol gefunden werden. Dabei lag der Hauptanteil in der oberen Schicht mit 44% (0,12 mmol) davon waren 70% (0,19 mmol) NER und 30% (0,09 mmol) extrahierbar. Die Tabelle mit allen Zahlenwerten, sowie diese der Tage 120 und 218 befinden sich im Anhang A.

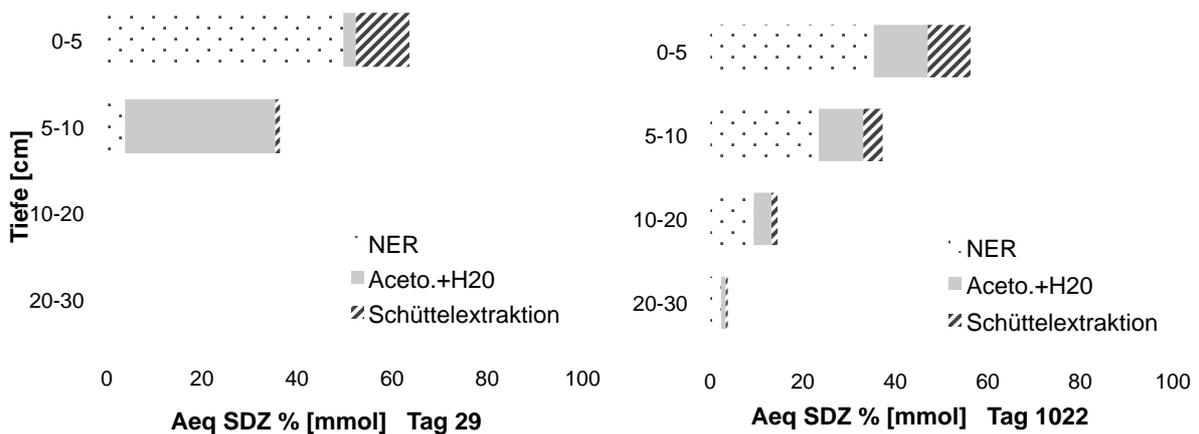


Abb. 22: Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in Prozent [%] aus der sequentiellen Extraktion, aus Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen von Tag 29 (links) und Tag 1022 (rechts).

Metaboliten-Analyse

Für die CaCl_2 -Extraktion kann aufgrund der Aufreinigung mittels SPE und der damit zusammenhängenden Fehlerquellen keine Aussage über die Quantität sondern nur über die Qualität getroffen werden (Abschnitt 2.7). Die Extrakte des Lysimeters A1 von Tag 29 in der Tiefe 0-5 cm, sowie die des Tages 218 für die Tiefen 5-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, konnten nicht gemessen werden. Die Proben wurden bei der Aufbereitung mittels SPE zerstört. Bei dem Lysimeter B1 konnte das Extrakt des Tages 29 in der Tiefe von 5-10 cm nicht gemessen werden. Insgesamt konnte nur bei den in Tabelle 15 mit einem „X“ markierten Proben SDZ eine erfolgreiche Analyse durchgeführt werden. Die aus der Me-OH- und Aceto. + H_2O -Extraktion gewonnenen Extrakte konnten alle gemessen werden.

Insgesamt konnten $n=99$ Messungen für die Lysimeter A1 und B1 ausgewertet werden. Diese entfielen auf SDZ und seinen Metaboliten wie folgt: $n=57$, SDZ; $n=15$, Acetyl-SDZ und $n=27$ 4-OH-SDZ. Auf die CaCl_2 -Extraktion entfielen $n=15$, SDZ, $n=9$ 4-OH-SDZ und $n=9$ Acetyl-SDZ. Auf die Me-OH-Extraktion entfielen $n=15$ SDZ, $n=2$ Acetyl-SDZ. In der Me-OH-Extraktion war die Konzentration von 4-OH-SDZ zu gering um nachgewiesen werden zu können. In der Aceto.+ H_2O -Extraktion konnte $n=27$ mal SDZ Acetyl-SDZ $n=4$ und 4-OH-SDZ $n=18$ mal nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung von Abbildung 23, in der die Anzahl der Messungen an einem Probenentnahmetag in Prozent aufgetragen wurde, ist die Abnahme von Acetyl-SDZ zu beobachten. Bei der Betrachtung der Verteilung für den Lysimeter A1 fällt auf, dass der 4-OH-SDZ-Anteil am Tag 29 mit 19% im Verlauf des Versuches immer geringer wird. Am Tag 1022 konnten 9% 4-OH-SDZ ($n=3$) ermittelt werden. Die Häufigkeit von Acetyl-SDZ nimmt ebenfalls im Laufe des Versuches ab: von Tag 29 31% zu Tag 218 3%. Am Probenentnahmetag 1022 konnte kein Acetyl-SDZ nachgewiesen werden.

Im Lysimeter A1 wurde $n=58$ SDZ nachgewiesen, dabei konnte in der CaCl_2 -Extraktion $n=17$ für SDZ und jeweils $n=5$ für Acetyl- und 4-OH-SDZ quantitativ nachgewiesen werden. In der Me-OH-Extraktion konnten Aussage über $n=9$ für SDZ und $n=2$ für Acetyl-SDZ getroffen werden. Das 4-OH-SDZ konnte nicht nachgewiesen werden. Für die Aceto.+ H_2O -Extraktion konnten $n=14$ SDZ, $n=13$ 4-OH-SDZ und $n=3$ Acetyl-SDZ qualitativ nachgewiesen werden. Das Maximum von allen Messungen von A1 mit $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mmol g}^{-1}$, konnte am Tag 29 in den Tiefen 0-10 cm, durch Aceto.+ H_2O , extrahiert werden.

Im Lysimeter B2 konnten insgesamt n= 41 Berechnungen erhoben werden. Dabei konnten in der CaCl₂-Extraktion n=8 SDZ und jeweils n=4 Acetyl-, 4-OH-SDZ quantitativ ermittelt werden. Auf die Me-OH-Extraktion entfielen n= 6 SDZ-Messungen. Die Metaboliten 4-OH-SDZ und Acetyl-SDZ konnten nicht ermittelt werden. Bei der Extraktion mit Aceto. +H₂O konnten in n= 13 SDZ, n= 5 4-OH-SDZ und in n= 1 Acetyl-SDZ nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Verteilung der Messpunkte von B1 fällt auf, dass 4-OH-SDZ erst am Tag 120 mit 9% nachgewiesen werden konnte. Am Tag 218 konnten 13% der Messpunkte als 4-OH-SDZ verzeichnet werden. Die Anzahl der Acetyl-SDZ Messpunkte nimmt im Laufe des Versuches ab. Dabei blieb es an den Tagen 29, 120, 218 konstant bei 6% der Messpunkte.

An allen Probenentnahmetag von A1 und B1 konnte SDZ nachgewiesen werden. In beiden Lysimetern nimmt im Laufe der Zeit die Anzahl der Messungen von Acetyl-SDZ stetig ab. Am Ende des Versuches konnte nur noch SDZ und 4-OH-SDZ in messbaren Konzentrationen im Boden der Lysimeter A1 und B2 gefunden werden.

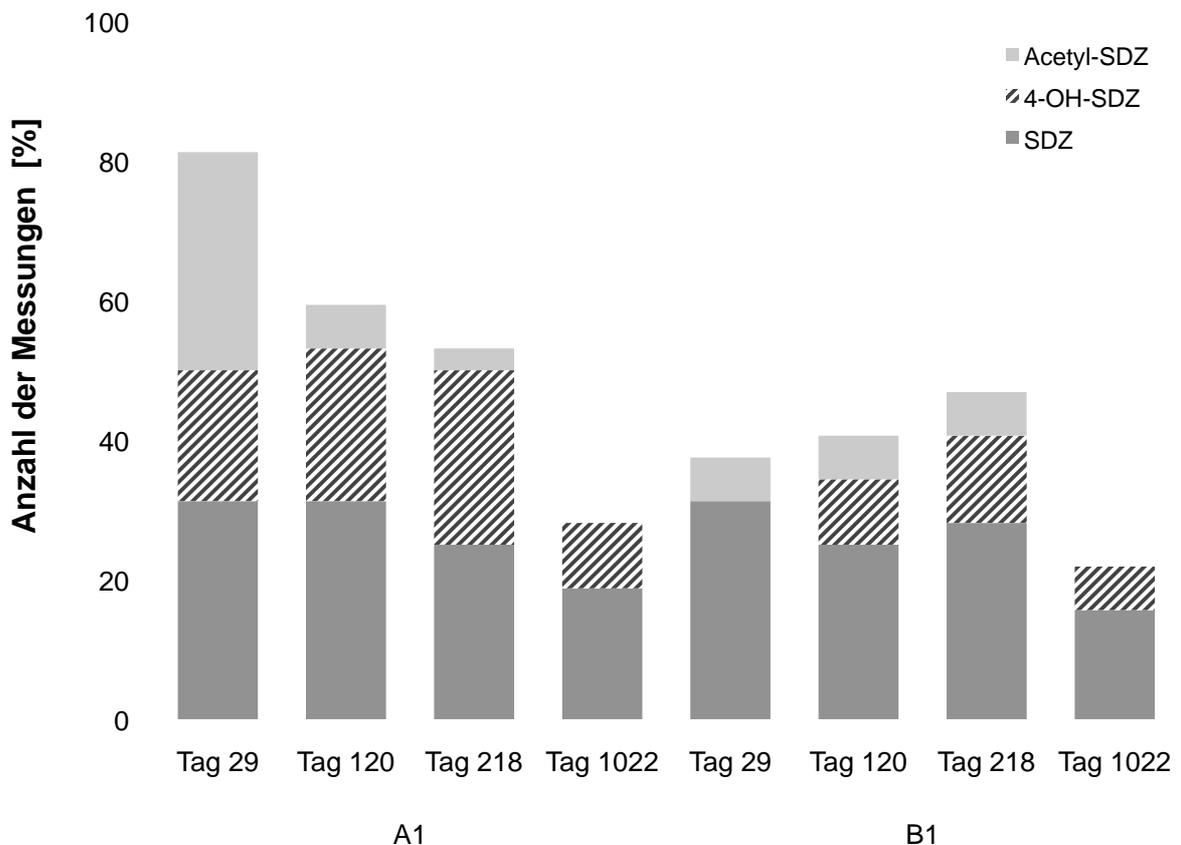


Abb. 23: Übersicht über der erfolgreichen Messungen der Metabolitenanalyse aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) aus Bodenproben.

Tab. 15: Übersicht der Konzentration SDZ [mmol g⁻¹] aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A1 (Kal) und B1 (Mer) aus Bodenproben.

Zeit	Tiefe [cm]	CaCl ₂ -Extraktion (qualitativ)			Me-OH-Extraktion [mmol g ⁻¹]		Aceto.+H ₂ O-Extraktion [mmol g ⁻¹]			
		SDZ	4-OH- SDZ	Acetyl- SDZ	SDZ	Acetyl- SDZ	SDZ	4-OH- SDZ	Acetyl- SDZ	
A1	Tag				66,2*10 ⁻⁸	1,1*10 ⁻⁸	2,9*10 ⁻⁶	1,7*10 ⁻⁵	1,8*10 ⁻⁸	
	29	0-5	X	X	X	49,4*10 ⁻⁸	1,0*10 ⁻⁸	1,5*10 ⁻⁶	1,7*10 ⁻⁶	1,7*10 ⁻⁸
		5-10	X	X	X					
		0-5	X	X	X	11,0*10 ⁻⁸		1,5*10 ⁻⁸	1,7*10 ⁻⁷	1,7*10 ⁻⁸
	Tag	5-10	X	X	X	34,1*10 ⁻⁸		1,1*10 ⁻⁸	1,7*10 ⁻⁶	
	120	10-20	X	X	X	26,5*10 ⁻⁸		8,2*10 ⁻⁸	1,7*10 ⁻⁷	
		20-30				1,4*10 ⁻⁸		1,9*10 ⁻⁸	8,7*10 ⁻⁷	
		0-5	X	X	X	7,4*10 ⁻⁸		1,2*10 ⁻⁶	2,3*10 ⁻⁷	
	Tag	5-10				8,7*10 ⁻⁸		1,2*10 ⁻⁶	1,7*10 ⁻⁷	
	218	10-20				1,3*10 ⁻⁸		5,7*10 ⁻⁷	1,4*10 ⁻⁷	
		20-30						2,6*10 ⁻⁸	5,1*10 ⁻⁸	
		0-5						8,8*10 ⁻⁸		
	Tag	5-10	X					1,2*10 ⁻⁷	7,5*10 ⁻⁸	
	1022	10-20	X					8,7*10 ⁻⁸	3,6*10 ⁻⁷	
		20-30						2,3*10 ⁻⁸	1,4*10 ⁻⁷	
	0-5				7,6*10 ⁻⁸		6,4*10 ⁻⁶		3,7*10 ⁻⁸	
Tag	5-10	X			1,8*10 ⁻⁸		3,7*10 ⁻⁷			
	0-5	X	X	X	3,0*10 ⁻⁸		1,8*10 ⁻⁶			
Tag	5-10	X	X	X	1,5*10 ⁻⁸		7,2*10 ⁻⁷			
120	10-20						1,1*10 ⁻⁷			
	20-30						1,2*10 ⁻⁸	7,7*10 ⁻⁷		
	0-5	X	X	X	19,5*10 ⁻⁸		2,6*10 ⁻⁶			
Tag	5-10	X	X	X	4,8*10 ⁻⁸		5,7*10 ⁻⁷	2,6*10 ⁻⁷		
218	10-20	X					1,1*10 ⁻⁷	1,1*10 ⁻⁷		
	20-30						5,7*10 ⁻⁹			
	0-5	X					9,7*10 ⁻⁹			
Tag	5-10	X					9,8*10 ⁻⁸	2,2*10 ⁻⁷		
1022	10-20						1,4*10 ⁻⁸	4,1*10 ⁻⁸		
	20-30									

3.1.2 1 m²-Lysimeter

Die 1 m²-Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) wurden nach der Applikation am 14.12.2005 bis zur endgültigen Beprobung (A2, 28.10.2008; B2, 11.11.2008) ungestört ruhen gelassen.

Begleitparameter

Die Messungen der pH-Werte in den Bodenproben aus den Lysimetern A2 aus Kal und B2 aus Mer ergaben, dass der mittlere pH-Wert von A2 bezogen auf die gesamte Beprobungstiefe von 30 cm im stark sauren Bereich von 4,7 lag. Der Boden aus B2 hingegen wies einen schwach sauren pH von 6,4 auf, Abbildung 24. In den Abbildungen ist die Verteilung der Mittelwerte der einzelnen Bodenschichten angegeben. Die pH-Werte von B2 waren relativ konstant und schwankten in allen vier Bodenschichten um den Wert 6,4.

Der Boden aus A2 zeigte eine andere Verteilung des pH-Wertes. In der obersten Bodenschicht 0-5 cm lag er bei 4,7 und sank dann in Schicht 5-10 cm und 10-20 cm auf 4,3, 4,5 ab um in der unteren Schicht 20-30 cm auf 5,4 zu steigen.

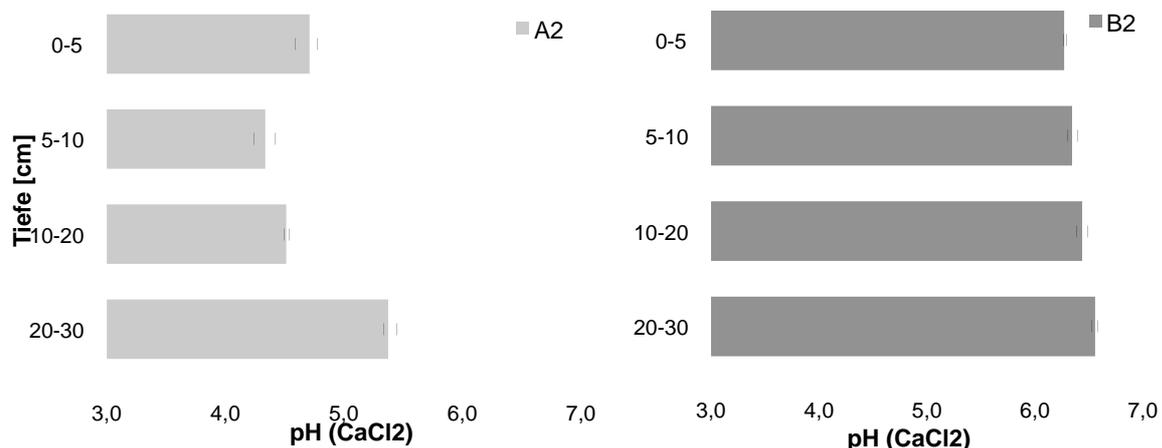


Abb. 24: mittlere pH-Werte (CaCl₂) aus Bodenproben des Lysimeter A2 (Kal) (rechts, Hellgrau) und B2 (Mer) (links, Dunkelgrau), gegen die Tiefe [cm].

Tab. 16: Bodenfeuchte der Bodenproben aus A2 (Kal) und B2 (Mer) in Masse-% der feuchten Probe.

Tiefe [cm]	Lysimeter	
	A2 (Kal)	B2 (Mer)
0-5	7	21
5-10	9	21
10-20	10	23
20-30	10	22

Die Mittelwerte der Messdaten der Bodenfeuchte der Bodenschichten befinden sich in der Tabelle 16. Der Boden aus B2 (Mer) besaß eine doppelt so große Bodenfeuchte als der Boden aus A2 (Kal) in den einzelnen Bodenschichten.

Verteilung des SDZ

In den Lysimetern A2 und B2 wurde insgesamt eine Äquivalenzmenge (A_{eq}) SDZ von ca. 1 mmol aufgetragen. In Abbildung 25 für A2 und B2 wurden die Mittelwerte der A_{eq} SDZ schichtweise bis in einer Bodentiefe von 30 cm dargestellt. In Abbildung 26 sind die Mittelwerte der verbleibenden Tiefen aufgetragen.

Insgesamt betrachtet wurde bei A2 0,9 mmol gefunden, davon 0,83 mmol in den Bodenschichten 0-30 cm. Bei B2 wurden insgesamt 0,52 mmol gefunden, davon in den oberen Bodenschicht (0-30 cm) 0,48 mmol. Im Perkolat wurden bei A2 kumulativ über drei Jahren $9,7 \cdot 10^{-3}$ mmol A_{eq} SDZ bestimmt und im Perkolat von Lysimeter B2 ca. $4,8 \cdot 10^{-3}$ mmol (Daten FZJ, Groeneweg, pers.Mitteilung).

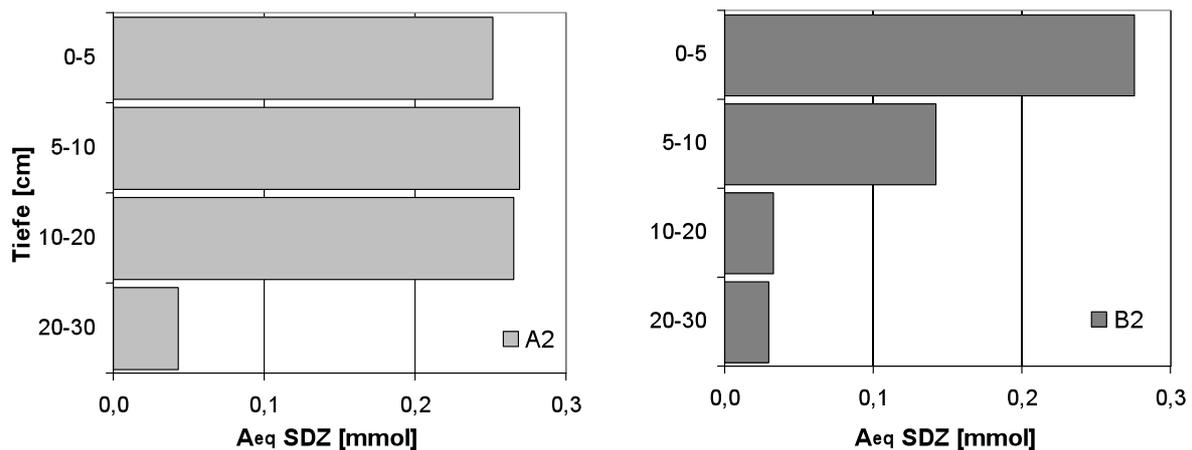


Abb. 25: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (links, Hellgrau) und B2 (Mer) (rechts, Dunkelgrau) bis in einer Tiefe von 30 cm.

Im Lysimeter A2, Abbildung 25, glich die Gesamt-Verteilung A_{eq} SDZ der des Lysimeters A1 (Abbildung 17, links). Die maximale A_{eq} SDZ befand sich in den Schichten 5-10 cm und 10-20 cm, 0,23 mmol und 0,36 mmol. Das Minimum lag auch hier in der untersten Schicht, 20-30 cm mit 0,05 mmol. Die Verteilung im Lysimeter B2, Abbildung 25 (rechts), ähnelt ebenfalls der Verteilung von B1 (Abbildung 18, rechts). Das Maximum lag hier in der ersten Schicht, 0-5 cm, mit 0,34 mmol. Das Minimum lag in der untersten Schicht, mit einer A_{eq} SDZ, von 0,04 mmol.

Bei der Betrachtung der tieferen Bodenschichten (30-100 cm), Abbildung 26 für A2 (links) und für B2 (rechts), nahm bei beiden Lysimetern die A_{eq} SDZ mit der Tiefe ab. Die A_{eq} SDZ bei A2 90-100 cm, sowie bei B2 80-90 cm lag unter der Nachweisgrenze.

Beim Lysimeter A2 wurde eine fluktuierende Verteilung gefunden. In der Schicht 50-60 cm mit $1,1 \cdot 10^{-2}$ mmol konnte eine höhere A_{eq} SDZ nachgewiesen werden als in den Schichten 30-40 cm und 60-70 cm, $0,9 \cdot 10^{-2}$ mmol und $0,7 \cdot 10^{-2}$ mmol.

Bei B2 konnte ein kontinuierliches Abnehmen der A_{eq} SDZ in der Tiefe beobachtet werden. Die Tabelle mit allen Zahlenwerten für alle Bodentiefen, befindet sich im Anhang A.

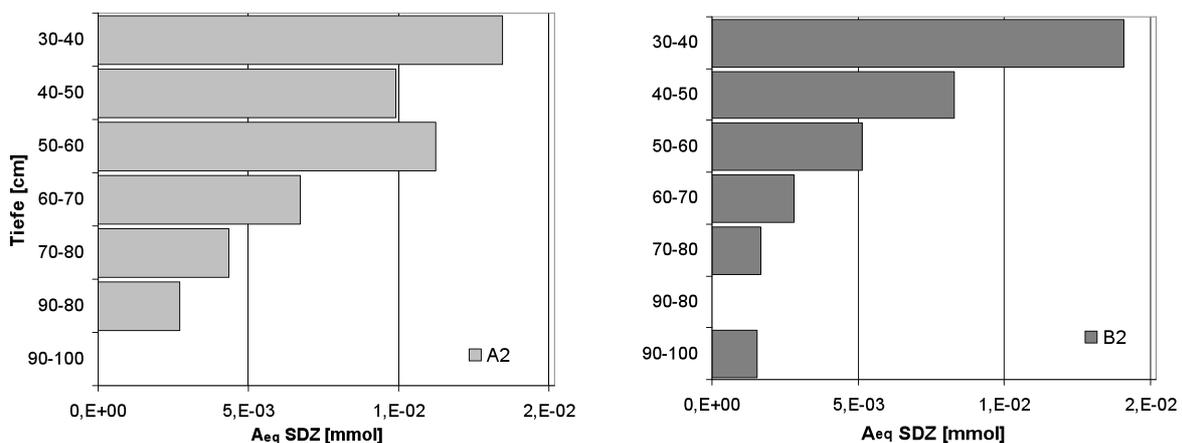


Abb. 26: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (rechts, Hellgrau) und B2 (Mer) (links, Dunkelgrau) bis in einer Tiefe von 30-100 cm.

Sequentielle Analyse

Die in der sequentiellen Extraktion heraus gelösten Äquivalentmengen (A_{eq}) von SDZ sind in Abbildung 27 für A2 (links) und für B2 (rechts) schichtweise dargestellt. Dabei wurden die einzelnen Extraktionen und die NER gegen die Bodentiefe aufgetragen. Die $CaCl_2$ - und Me-OH-Fraktion wurden, aufgrund der niedrigeren Extraktionsmenge von 5% der Gesamtextraktion, summiert aufgetragen. Die Wiederfindungsrate der ^{14}C -Bestimmung des SDZ für A2 lag bei 88% und für B2 bei 82%. Die insgesamt gefundene A_{eq} SDZ beträgt 0,83 mmol bei A2 und 0,48 mmol bei B2. Die NER-Anteil davon lag bei A2 bei 78% (0,64 mmol) und bei B2 82% (0,39 mmol). Insgesamt konnten 22% für A2 (0,19 mmol) und 18% für B2 (0,09 mmol) extrahiert werden.

Bei A2 lag die maximal gefundene A_{eq} SDZ mit 0,27 mmol in Schicht 5-10 cm davon sind 34% (0,23 mmol) NER. Am meisten extrahiert werden konnte in der Schicht 10-20cm. Es wurden dort 0,27 mmol A_{eq} SDZ gefunden von denen 0,07 mmol extrahiert werden konnten.

In Lysimeter B2 lag das Maximum der NER sowie der extrahierbaren A_{eq} SDZ in der obersten Schicht, 0-5 cm. Dabei wurden 48% der gesamt gefundenen A_{eq} SDZ (0,48 mmol) als NER-Anteil (0,23 mmol) in der obersten Schicht gefunden. Das Minimum an extrahierbarem A_{eq} SDZ lag in der Bodenschicht 20-30 cm, dort konnten 2% extrahiert werden.

Tab. 17: Mittelwerte der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben der Lysimetern A1 (Kal) und B2 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm.

	Bodentiefe [cm]	NER		Aceto.+H ₂ O-Extraktion		Schüttel-Extraktion	
		[mmol]	%	[mmol]	%	[mmol]	%
A2	0-5	0,19	23	$5,56 \cdot 10^{-2}$	7	$7,19 \cdot 10^{-3}$	1
	5-10	0,23	27	$2,68 \cdot 10^{-2}$	3	$1,58 \cdot 10^{-2}$	2
	10-20	0,20	24	$5,24 \cdot 10^{-2}$	6	$1,52 \cdot 10^{-2}$	2
	20-30	$3,00 \cdot 10^{-2}$	4	$9,32 \cdot 10^{-3}$	1	$3,50 \cdot 10^{-3}$	0
B2	0-5	0,23	48	$3,58 \cdot 10^{-2}$	7	$1,03 \cdot 10^{-2}$	2
	5-10	0,12	25	$1,72 \cdot 10^{-2}$	4	$7,10 \cdot 10^{-3}$	1
	10-20	$2,44 \cdot 10^{-2}$	5	$4,74 \cdot 10^{-3}$	1	$3,30 \cdot 10^{-3}$	1
	20-30	$2,12 \cdot 10^{-2}$	4	$5,19 \cdot 10^{-3}$	1	$2,98 \cdot 10^{-3}$	1

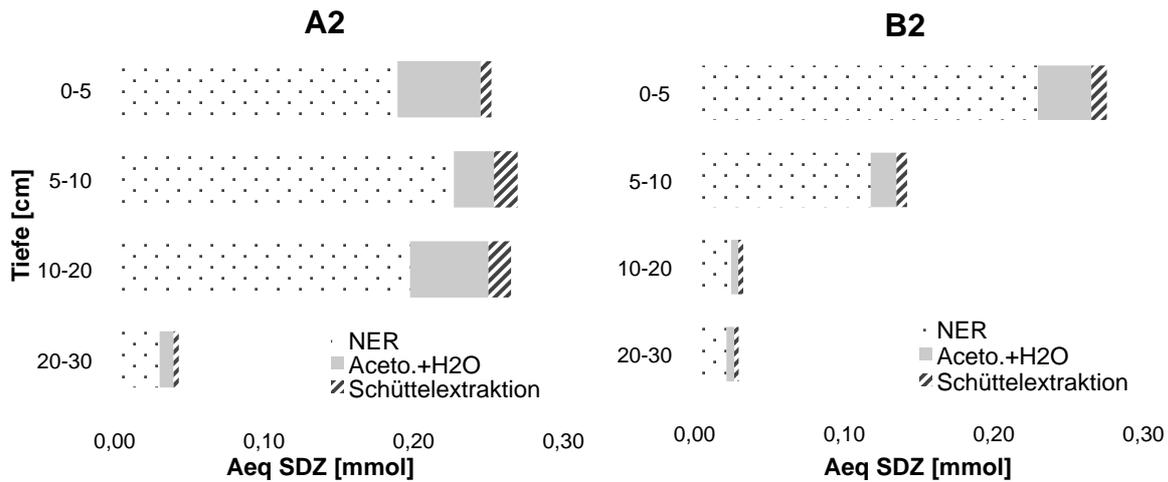


Abb. 27: Mittelwerte der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) (links) und B2 (Mer) (rechts) bis in die Tiefe von 30 cm, schichtweise aufgetragen.

Eine Gegenüberstellung der in den Lysimetern A2 und B2 gefundenen Äquivalenzmenge (A_{eq}) an SDZ ist in Abbildung 28 dargestellt. Es wurden die gesamt A_{eq} an SDZ unterteilt in extrahierbare-, NER- und Reste- Fraktion, der oberen Bodenschichten (0-30 cm), dargestellt. Die Reste-Fraktion besteht aus den gemittelten A_{eq} SDZ Werten aus den unteren Bodenschichten (30-100 cm) und der A_{eq} SDZ die in dem Perkolat gefunden wurde. Insgesamt wurde ein A_{eq} von ca. 1 mmol SDZ appliziert.

Bei der Betrachtung der direkten Gegenüberstellung wird deutlich, dass der Lysimeter B2 mit insgesamt 38% (0,62 mmol) weniger A_{eq} SDZ besaß als A2 mit 1,02 mmol. Bei A2 konnten extrahierbare A_{eq} SDZ 0,21 mmol gefunden werden sowie 0,74 mmol NER. Der Rest betrug $58,4 \cdot 10^{-3}$ mmol.

Der Lysimeter B2 bestand aus 0,10 mmol extrahierbare A_{eq} SDZ sowie 0,48 mmol NER und $38,4 \cdot 10^{-3}$ mmol Rest.

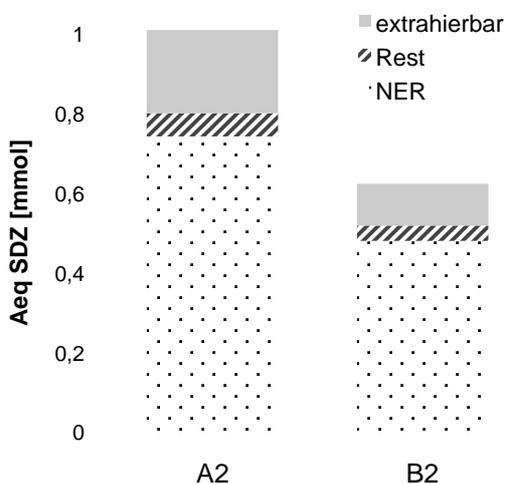


Abb. 28: Verteilung der Summe der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] in den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) insgesamt (NER und extrahierbar in den Schichten 0-30 cm).

Metaboliten-Analyse

Die Metaboliten-Analyse der CaCl₂-Extraktion und der Me-OH-Extraktion ergaben, dass sich in dem Lysimeter B2 kein SDZ sowie keines seiner Metaboliten befand. Im Lysimeter A2 konnte in den CaCl₂-Extrakten SDZ in den drei oberen Schichten (0-20 cm) nachgewiesen werden, siehe Tabelle 18. Acetyl-SDZ wurde in der ersten Schicht gemessen. Auch in den Me-OH-Extrakten von B2 konnte kein SDZ nachgewiesen werden. In A2 konnte in 0-5 cm ($4,2 \cdot 10^{-8}$ mmol g⁻¹) und 5-10 cm ($1,6 \cdot 10^{-8}$ mmol g⁻¹) SDZ gemessen werden.

Die Ergebnisse der Aceto.+H₂O-Extraktion sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

Da die Nachweisgrenze des LC-MS/MS $0,001 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ beträgt, ist die niedrigste messbare Konzentration ist für SDZ $10,0 \cdot 10^{-9}$ mmol g⁻¹, für 4-OH-SDZ $9,4 \cdot 10^{-9}$ mmol g⁻¹ für Acetyl-SDZ $8,1 \cdot 10^{-9}$ mmol g⁻¹.

Tab. 18: Übersicht der Konzentration SDZ [mmol g⁻¹] aus den Extrakten der sequentiellen Extraktion von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) aus Bodenproben.

	Bodentiefe [cm]	CaCl ₂ - Extraktion		Me-OH- Extraktion	Aceto.+H ₂ O- Extraktion
		SDZ	Acetyl-SDZ	SDZ	[mmol g ⁻¹]
A2	0-5	X	X	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$
	5-10	X		$1,6 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$
	10-20	X			$5,2 \cdot 10^{-8}$
	20-30				
B2	0-5				$1,1 \cdot 10^{-7}$
	5-10				$6,5 \cdot 10^{-8}$
	10-20				$2,2 \cdot 10^{-7}$
	20-30				

3.2 Pflanzenversuch

In diesem Teil werden die Resultate des Pflanzenversuches wiedergegeben. Alle für die Berechnung verwendeten Daten sind in Anhang C auf der beiliegenden CD-Rom aufgeführt.

Der Beginn des Versuches war am 06.02.2009. Alle 12 Maispflanzen keimten und wurden am 24.-26.04.2009 beprobt. Eine Übersicht des Versuches befindet sich in Abschnitt 2,8 Tabelle 8. Die Maiskörner die in der A2 Bodenschicht 0-5 cm, Topf 1 und 2, sowie der A2 Schicht 5-10 cm, Topf 2 ausgesät worden waren keimten 14 Tage später. Nach insgesamt 80 Tagen in denen der Mais wachsen konnte war die gesamte Bodenmatrix durchwurzelt, siehe Abbildung 29. Die Abbildung 30 zeigt vom Boden gereinigte Maiswurzeln. Dieser Abschnitt ist in, Verteilung der SDZ, sequentiellen Extraktion und der Metaboliten-Analyse unterteilt.

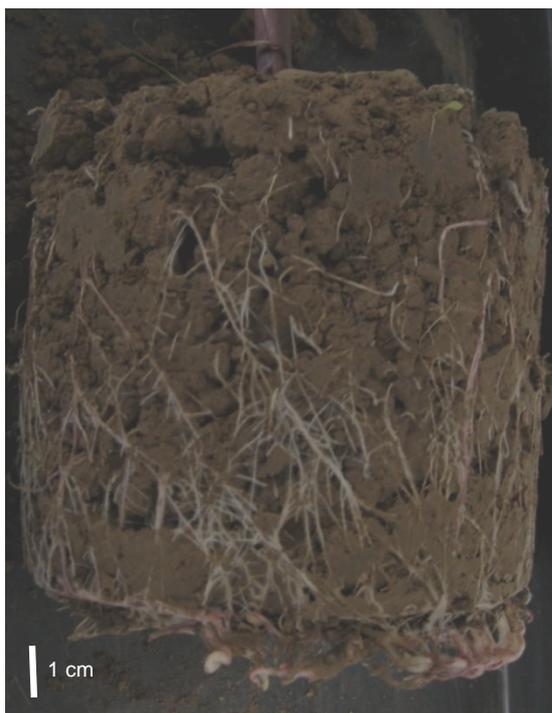


Abb. 29: (links) Wurzelballen einer Maispflanze.
Abb. 30: (rechts) gereinigte Maiswurzeln.

Begleitparameter

Die Bodenfeuchte wurde konstant bei 25% W_{kmax} gehalten. Der pH-Wert ist als Mittelwert in der Abbildung 28 aufgetragen. Im A2 Boden wurde ein stark saurer pH-Wert von insgesamt 4,7 gemessen. Bei B2 war es ein schwach saurer pH-Wert von 6,7.

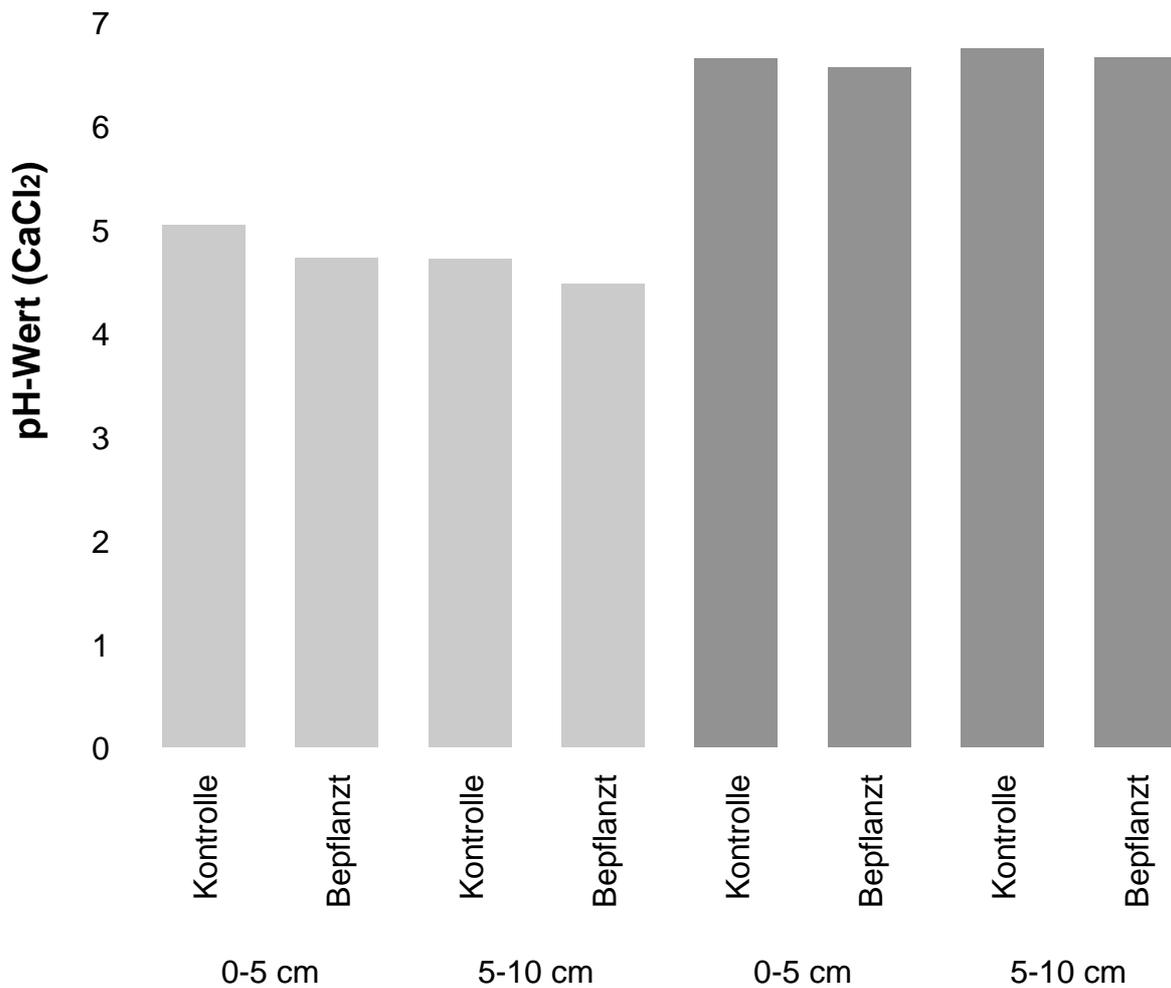


Abb. 31: (rechts): mittlere pH-Werte (CaCl₂) des Pflanzenversuches aus Boden A2 (Kal) (Hellgrau) und B2 (Mer) (Dunkelgrau).

Verteilung des SDZ

Es wurde die Gesamt-Äquivalentkonzentration (c_{eq}) [mmol g^{-1}] von SDZ der Pflanzenteile (Stängel, Blatt und Wurzel) sowie der des Bodens bestimmt. Die c_{eq} SDZ der Pflanzenteile, Stängel und Blätter war im Frischgewicht unter der Nachweisgrenze. Die Wurzeln besaßen eine Konzentration von durchschnittlich $27,0 \cdot 10^{-9} \text{ mmol g}^{-1}$ in der Feuchtmasse. In Tabelle 19 sind die Mittelwerte zu finden. Bei der Betrachtung der c_{eq} an SDZ im Boden ist kein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen Kontrolle (nicht bepflanzt) zu durchwurzeltem Boden zu erkennen, siehe Abbildung 32. Die statistische Auswertung, bei der ein t-Test durchgeführt wurde, ergab bei dem Vergleich von Kontrolle zu durchwurzeltem Boden, dass es bei Boden aus A2 und B2, mit 94%iger Wahrscheinlichkeit keinen signifikanten Unterschied gibt.

Tab. 19: Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol] in Bodenproben aus 1 m^2 -Lysimeterversuch und Pflanzversuch.

Ansatz	Boden		Pflanzversuch		1 m^2 -Lysimeterversuch
	tiefe [cm]	Kontrolle [mmol g^{-1}]	bepflanzt [mmol g^{-1}]	Wurzel in Feuchtmasse [mmol g^{-1}]	vorher [mmol g^{-1}]
A 2	0-5	$29,9 \cdot 10^{-7}$	$29,4 \cdot 10^{-7}$	$35,0 \cdot 10^{-9}$	$34,5 \cdot 10^{-7}$
	5-10	$43,9 \cdot 10^{-7}$	$45,4 \cdot 10^{-7}$	$35,0 \cdot 10^{-9}$	$36,9 \cdot 10^{-7}$
B 2	0-5	$43,7 \cdot 10^{-7}$	$43,9 \cdot 10^{-7}$	$24,7 \cdot 10^{-9}$	$35,1 \cdot 10^{-7}$
	5-10	$23,7 \cdot 10^{-7}$	$23,3 \cdot 10^{-7}$	$14,0 \cdot 10^{-9}$	$18,1 \cdot 10^{-7}$

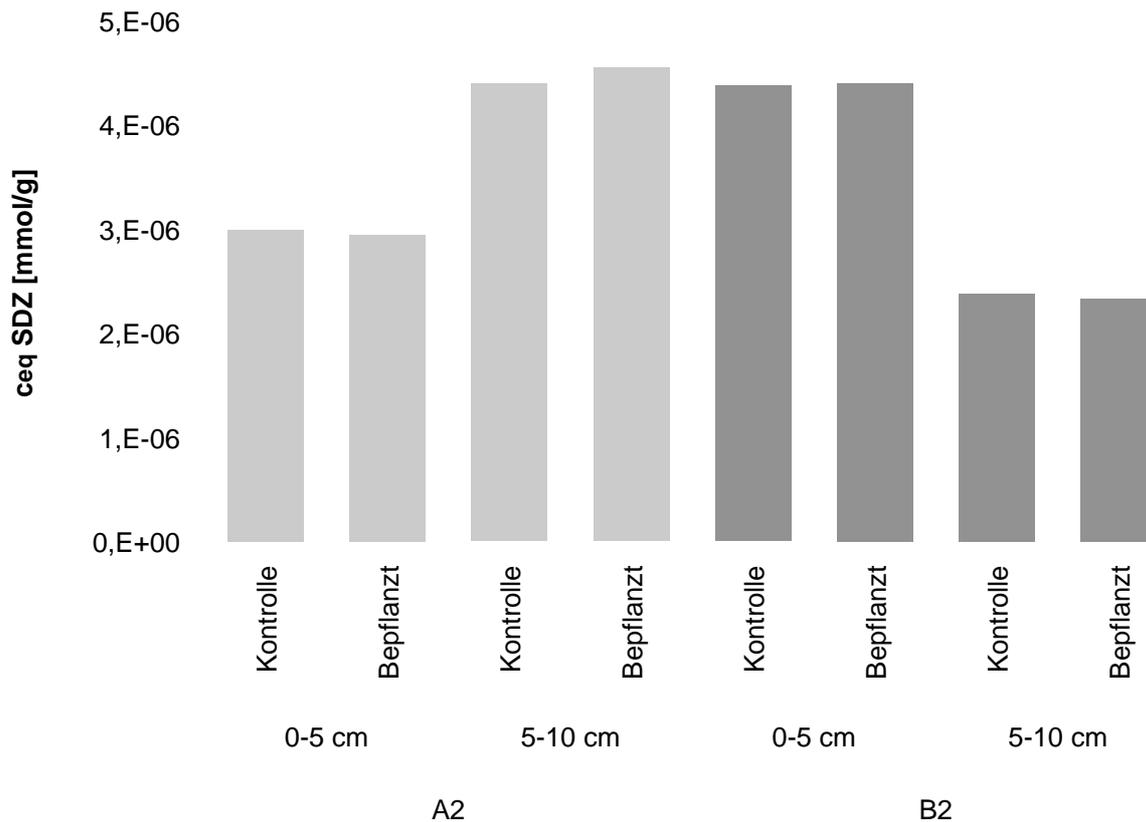


Abb. 32: Verteilung der Summe der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g⁻¹] in den Bodenproben von Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).

Der durchwurzelte Boden von A2 0-5 cm besitzt eine c_{eq} SDZ von $29,4 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹, die Kontrolle $29,9 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹. In dem Ansatz mit dem Boden von A2 aus der Bodentiefe 5-10 cm wurden bei der Kontrolle $43,9 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹ und in dem bepflanzten Boden $45,4 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹ c_{eq} SDZ gefunden.

Bei dem Ansatz von B2 mit dem Boden aus der 0-5 cm Schicht wurde eine c_{eq} SDZ von $43,7 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹ für die Kontrolle und $43,9 \cdot 10^{-7}$ mmol g⁻¹ für den bepflanzten Boden gemessen.

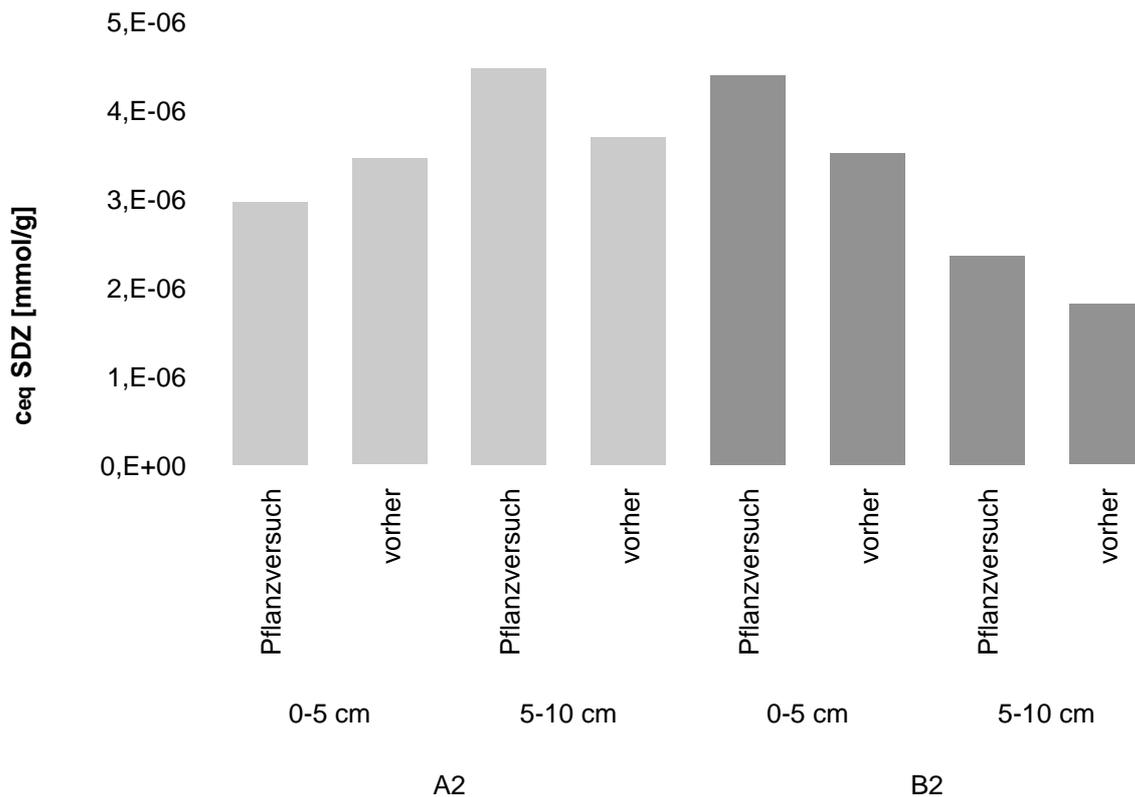


Abb. 33: Verteilung zwischen der Summe der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] in den Bodenproben von Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer) und 1 m-Lysimeterversuch.

Die Tatsache, dass kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des c_{eq} SDZ gefunden wurde erlaubt den direkten Vergleich von bepflanzttem Boden mit den Resultaten des 1 m²-Lysimeterversuches. In Abbildung 33 wurden die c_{eq} SDZ Daten der Kontrollen und des bepflanzttem Bodens summiert und gegen die c_{eq} SDZ des 1 m²-Lysimeterversuches (vor Beginn des Pflanzversuches) aufgetragen. Die Verteilung der c_{eq} SDZ zeigte bei Berechnung des t-Tests keine Unterschiede zwischen den Resultaten vor und nach der Bepflanzung. Der t-Test ergab beim Vergleich von bepflanztter und der Ursprungs-Situation für A2 jeweils (0-5 cm und 5-10 cm) eine 98%ige Wahrscheinlichkeit einer Abhängigkeit der Werte. Für B2 waren es 94% für Bodenschicht 0-5 cm und 5-10 cm. Die Konzentrationen sind aus der Tabelle 19 ersichtlich.

Sequentielle Extraktion

Die Wiederfindung der ^{14}C -Markierung lag bei 93%. Die statistische Auswertung mittels t-Tests in dem ein Vergleich von Kontrolle und durchwurzeltem Boden stattfand ergab, dass es mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit, in den Daten von Ansatz A2 keinen Unterschied zwischen bepflanzten Boden und Kontrolle gibt. Bei den Tests für B2 ergab sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 85% kein Unterschied der Daten. Die Resultate der sequentiellen Extraktion sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Extraktions-Schritte CaCl_2 - und Me-OH wurden summiert und als Schüttelextraktion aufgetragen. Die Zahlen-Werte für die c_{eq} SDZ der sequentiellen Extraktion sind in Tabelle 20 zu finden. Es wurden insgesamt im Ansatz A2 0-5 cm $13,9 \cdot 10^{-6} \text{ mmol g}^{-1}$ an c_{eq} SDZ gefunden. Diese verteilten sich auf den Ansatz 0-5 auf 14% als NER- und 6% waren der extrahierbaren Fraktion zuzumessen.

In dem Ansätzen von B2 wurden insgesamt $12,5 \cdot 10^{-6} \text{ mmol g}^{-1} c_{\text{eq}}$ SDZ gefunden, Kontrolle und Bepflanzt. Diese verteilten sich auf den Ansatz B2 0-5 cm 25% als NER und 8% auf die extrahierbare Fraktion. Für Ansatz 5-10 cm fallen 12% auf den NER-Anteil und 5% auf den extrahierbaren Anteil.

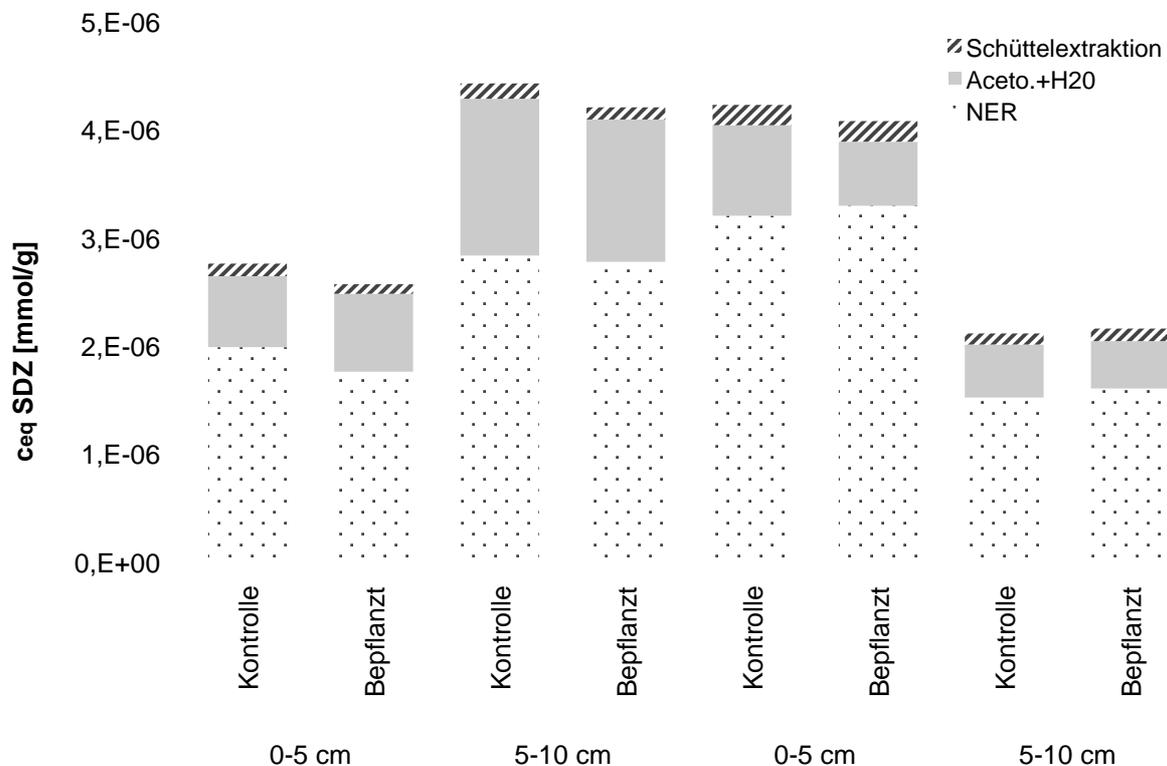


Abb. 34: Vergleich der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Pflanzenversuchs-Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).

Da kein signifikanter Unterschied zwischen bepflanzttem Boden und der Kontrolle gefunden wurde, können die Resultate der sequentiellen Extraktion dieser beiden Böden mit denen der sequentiellen Extraktion des 1 m²-Lysimeterversuchs A2 und B2, welche die Bedingungen vor dem Pflanzversuch repräsentieren, verglichen werden. Dieser Vergleich ist in Abbildung 35 dargestellt.

Im Durchschnitt konnten vor Beginn des Pflanzenversuches, bei A2 in den beiden oberen Bodenschichten 0-10 cm ein Anteil von 80% NER und 20% extrahierbaren c_{eq} SDZ gemessen werden. Im Pflanzversuch konnte insgesamt ein 67%iger Anteil als NER und 32%iger Anteil an extrahierbaren c_{eq} SDZ zugeordnet werden.

Bei dem Ansatz von B2 wurden vor der Bepflanzung des Bodens, 83% als NER und 17% als extrahierbare Fraktion bemessen. Bei dem bepflanztten Boden liegt ein Verhältnis von 75% NER zu 25% extrahierbarer Fraktion vor.

Die statistische Auswertung ergab für alle Daten, dass sie abhängig von einander sind und somit als gleich gewertet werden konnten. Die Resultate der t-Tests befinden sich im Anhang C auf der CD-ROM.

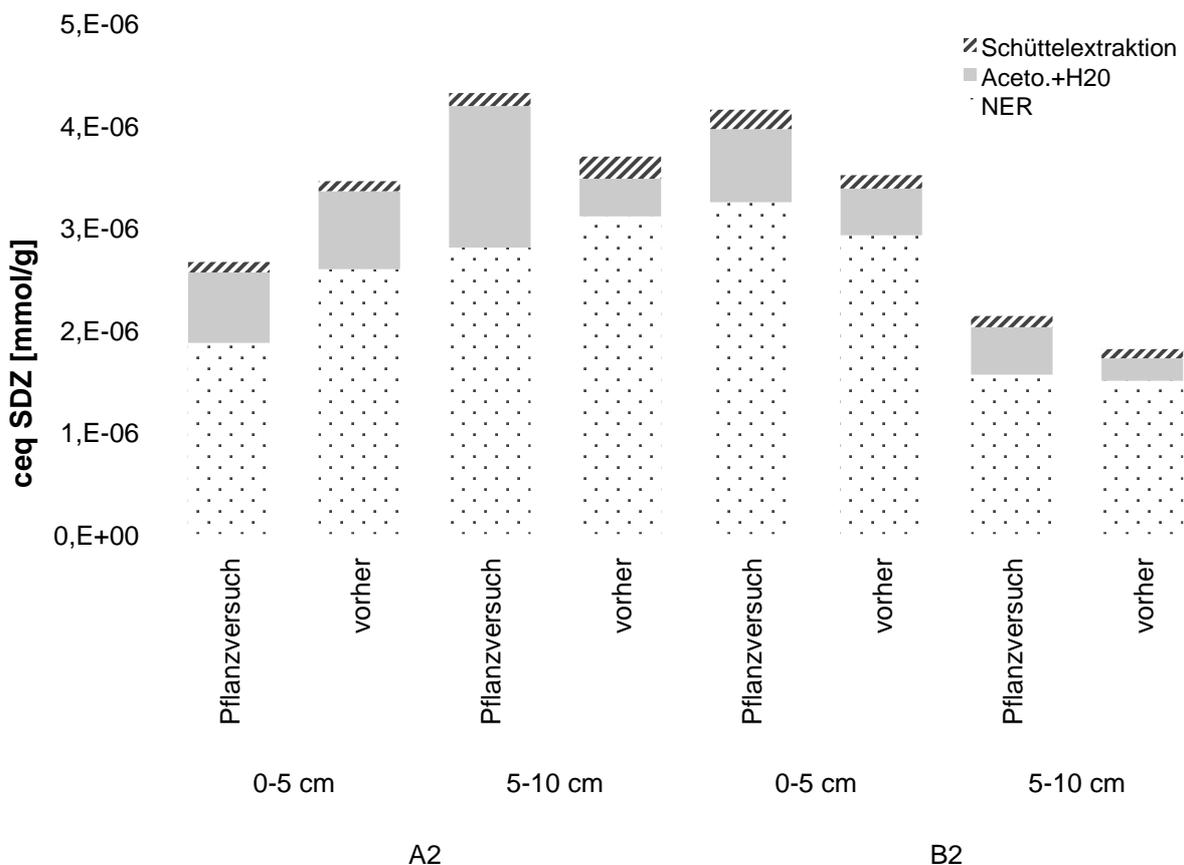


Abb. 35: Vergleich der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g⁻¹] aus der sequentiellen Extraktion, aus den Bodenproben von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) mit Pflanzenversuch Ansatz A2 (Kal) und B2 (Mer).

Tab. 20: Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ [mmol g^{-1}] des sequentiellen Extraktion aus Bodenproben aus Lysimeterversuch und Pflanzversuch A2 (Kal) und B2 (Mer).

Extraktionen		c_{eq} SDZ [mmol g^{-1}]			
		A2		B2	
		0-5	5-10	0-5	5-10
Pflanz- versuch	Schüttel-Extraktionen	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
	Kontrolle				
	Aceto.+H ₂ O	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$8,4 \cdot 10^{-7}$	$4,9 \cdot 10^{-7}$
	NER	$19,8 \cdot 10^{-7}$	$28,3 \cdot 10^{-7}$	$32,0 \cdot 10^{-7}$	$15,2 \cdot 10^{-7}$
	Schüttelextraktionen	$0,9 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
	bepflanzt				
	Aceto.+H ₂ O	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$	$5,9 \cdot 10^{-7}$	$4,4 \cdot 10^{-7}$
	NER	$19,8 \cdot 10^{-7}$	$27,7 \cdot 10^{-7}$	$32,9 \cdot 10^{-7}$	$16,0 \cdot 10^{-7}$
	1 m ² - Lysimeterversuch	Schüttelextraktionen	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$
	Aceto.+H ₂ O	$7,6 \cdot 10^{-7}$	$3,7 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$
	NER	$25,9 \cdot 10^{-7}$	$31,1 \cdot 10^{-7}$	$29,2 \cdot 10^{-7}$	$15,0 \cdot 10^{-7}$

Metaboliten-Analyse

Bei der Metaboliten-Analyse für den Pflanzenversuch ergaben sich für die CaCl₂-Extrakte sowie für die Extrakte der Me-OH-Extraktion keine Resultate. Die Konzentration dieser Extrakte lag unter 0,001 µg*ml⁻¹ und war somit zu gering, als dass das LC-MS/MS es hätte messen können. Für die Aceto. +H₂O-Extraktion konnte in allen Extrakten SDZ nachgewiesen werden, Tab 21. Bei der statistischen Auswertung sind keine signifikanten Unterschiede zwischen durchwurzelteten Boden und Kontrolle aufgefallen.

Aus diesem Grund können die Daten des Pflanzenversuches summiert und mit den Werten den zuvor gemessenen Konzentrationen des 1 m²-Lysimeterversuches verglichen werden. Die Verteilung der Konzentration SDZ [mmol g⁻¹] im Boden zeigt keine signifikanten Unterschiede. In Tabelle 21 sind die Werte des Pflanzenversuches aufgeführt.

Tab. 21: Konzentration von SDZ und seinen Metaboliten [mmol g⁻¹] der Aceto.+H₂O-Extraktion in Bodenproben aus Lysimeterversuch und Pflanzversuch A2 (Kal) und B2 (Mer).

Ansatz			SDZ [mmol g ⁻¹]	
A2	0-5	Kontrolle	2,0*10 ⁻⁷	
		Pflanzenversuch bepflanzt	1,8*10 ⁻⁷	
		Mittelwert	1,9*10 ⁻⁷	
	1 m ² -Lysimeter	Vorher	2,2*10 ⁻⁷	
		5-10	Kontrolle	1,9*10 ⁻⁷
			Pflanzenversuch bepflanzt	1,6*10 ⁻⁷
	Mittelwert		1,7*10 ⁻⁷	
	1 m ² -Lysimeter	Vorher	1,8*10 ⁻⁷	
	B2	0-5	Kontrolle	9,8*10 ⁻⁸
			Pflanzenversuch bepflanzt	6,8*10 ⁻⁸
			Mittelwert	8,3*10 ⁻⁸
		1 m ² -Lysimeter	Vorher	1,1*10 ⁻⁷
5-10			Kontrolle	8,8*10 ⁻⁸
			Pflanzenversuch bepflanzt	8,3*10 ⁻⁸
	Mittelwert	8,6*10 ⁻⁸		
1 m ² -Lysimeter	Vorher	6,5*10 ⁻⁸		

4 Diskussion

Im Diskussionsteil werden die Ergebnisse der Lysimeterstudie und des anschließenden Pflanzenversuches besprochen und mit Untersuchungen aus der Literatur verglichen und diskutiert.

4.1 Lysimeter

4.1.1 Begleitparameter

pH-Wert

Der pH-Wert nahm in den Lysimetern im Verlauf der drei Jahre immer mehr ab. Bei den mit Braunerde befüllten Lysimetern A versauerte der Boden von mäßig sauer zu stark sauer. In den Lysimetern B mit Parabraunerde versauerte der Boden von schwach alkalisch zum schwach sauer.

Bei der Versauerung handelt es sich um einen natürlichen Prozess in humiden Klimaten. Die dabei stattfindende Zunahme an H^+ -Ionen im Boden kann unterschiedliche Gründe haben: Wurzelaktivität, saurer Regen, Oxidation von Fe^{2+} und Mn^{2+} sowie die Aktivität von Mikroorganismen.

Durch die Wurzelaktivität von Pflanzen werden dem Boden Kationen entzogen, die Wurzeln geben dabei H^+ -Ionen ab um Kationen in die Pflanzenwurzel aufzunehmen. Da die Lysimeter im Versuch vegetationsfrei gehalten wurden, kann diesem Versauerungs-Effekt eine geringe Rolle zugesprochen werden.

Auch durch Niederschläge wird eine allmähliche Versauerung des Bodens hervorgerufen. Dabei werden geringe Mengen Schwefelsäure, Ammoniak und Salpetersäure aus der Luft ausgewaschen und in den Boden eingespült. In Deutschland liegt der pH-Wert des Niederschlages im Durchschnitt bei unter pH 5. Bei der Neutralisation dieser Säuren reagieren die Protonen mit der Matrix des Bodens, in Folge dessen versauert der Boden (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Bei der Versauerung durch Oxidation von Fe^{2+} und Mn^{2+} werden H^+ -Ionen verbraucht. Bei gleichzeitiger Hydrolyse werden pro oxidiertem Fe^{2+} oder Mn^{2+} zwei H^+ -Ionen freigesetzt.

Desweiteren kann auch die Aktivität von Mikroorganismen zur Versauerung beitragen. Beim Abbau von organischer Substanz kann es zu Mineralisierung und zur Bildung von Huminstoffen kommen. Beides sorgt für ein weiteres Absinken des pH-Wertes im Boden.

In Lysimeter B2 ist der pH-Wert mit pH 6,4 in allen Bodenschichten relativ gleich verteilt, hingegen besitzt der Lysimeter A2 in der oberen Bodenschicht ein saureren pH von 4,7. Dies könnte von der Aktivität der Mikroorganismen abhängen, welche in der oberen Bodenschicht zunimmt (Scheffer und Schachtschabel, 2002). In Parabraunerde B2 nimmt in den unteren Bodenschichten der pH-Wert wieder ab. Der Grund für diese Versauerung ist eine beginnende Vergleyung.

Die Beschreibung des pH-Wertes in Verbindung mit der Konfiguration des SDZ, sowie der Sorption wird in folgenden Abschnitt diskutiert.

Bodenfeuchte

Die Bodenfeuchte wurde in den oberen Bodenschichten gemessen. Sie lag in Lysimeter B, Parabraunerde aus Mer, stets um 10% (Masse-%) höher als die Bodenfeuchte des Lysimeters A, Braunerde Kal. Dies liegt darin begründet, dass die Parabraunerde mit 80 % einen deutlich höheren Schluffanteil besitzt als die Braunerde mit einem Anteil von 23 %. Aufgrund des hohen Schluffanteils besitzt die Parabraunerde eine höhere maximale Wasserhaltekapazität (WK_{max}) von 46%. Durch den hohen Anteil von Fein- und Mittel-Poren kann die Parabraunerde mehr Wasser speichern. Die Braunerde (Kal) hingegen besitzt aufgrund ihres Sand-Anteils von 73% eine geringere WK_{max} von 27%. Desweiteren besitzen sandhaltige Böden einen höheren Anteil an Grobporen, die das Auftreten des präferenziellen Fließens begünstigen (Scheffer und Schachtschabel, 2002).

4.1.2 Bilanzierung des SDZ in den Lysimetern

Die Verteilungen der Äquivalentmenge des SDZ im Lysimeter in Abbildung 17 für A1 und 18 für B1 sowie Abbildung 24 für A2 und B2 zeigen deutlich, dass es Unterschiede zwischen A der Braunerde (Kal) und B der Parabraunerde (Mer) gibt. Bei beiden Böden kam es zu einer Verlagerung von SDZ und seiner Metaboliten in die tieferen Bodenschichten.

In den Lysimetern die mit Parabraunerde befüllt waren konnte der Hauptanteil von ca. 80% des SDZ und dessen Metaboliten in den oberen beiden Schichten (0-10 cm) gefunden werden. Bei den Lysimetern die mit Braunerde gefüllt waren fand eine Verlagerung in tiefere Schichten statt. Der Hauptanteil von ca. 65% lag in den mittleren Schichten (5-20 cm). Mögliche Gründe für die unterschiedliche Verteilung könnten zu einem die unterschiedlichen Bodenarten, der präferentielle Fluss oder das Sorptionsverhalten sein.

Die Charakterisierung der Böden und deren physiochemischen Eigenschaften sind in Abschnitt 2.2 und Tab. 4. bereits beschrieben. Die Braunerde aus Kal besitzt einen hohen Sandanteil von 73%, was wiederum einen Einfluss auf die Porenverteilung hat. Die Parabraunerde dagegen besitzt mit Ihrem größerem Schluffanteil im Gefüge eine höhere Anteil an Mittelporen und somit eine höhere Kapillarwirkung in der Bodenmatrix vorhanden ist.

Durch diesen Kapillarwirkungsunterschied ist der Stofftransport von gelösten Stoffen, in diesem Fall SDZ, in die Tiefe in der Parabraunerde geringer als in der Braunerde. Dies liegt darin begründet, dass das Wasser länger in den oberen Bodenschichten verbleibt.

Durch die Grobporen gelangen gelöste Stoffe schneller in tiefere Bodenschichten, aber auch der präferentielle Fluss könnte ein Grund für die Verlagerung in die tieferen Bodenschichten sein. Langzeituntersuchungen von Hamscher et al. (2005) zeigen, dass in sandigen Böden eine Verlagerung von Antibiotika in Tiefen von 10-30 cm zu beobachten war. Bei Hamscher et al. (2005) wurden Lysimeterversuche über drei Jahre durchgeführt, bei denen eine Vielzahl von Antibiotika, darunter auch SDZ

und Sulfamethazine, untersucht wurden. Die Haupt-Konzentration war in der Bodentiefe 20-30 cm zu finden.

Bei der Parabraunerde hingegen, die einen Schluffanteil von 80% besaß, überwog der Anteil an Mittelporen. Dadurch verweilte Wasser länger in den oberen Schichten, wodurch das SDZ und seine Metaboliten an die Oberfläche der Bodenmatrix binden konnten. Bei Untersuchungen von Burkhardt (2007) und Kreuzig und Höltge (2005) mit SDZ in schluffigen Böden konnten ähnliche Verteilungen festgestellt werden. Der größte Anteil von SDZ befand sich in den oberen 5 cm.

Auch das Phänomen des präferentiellen Flusses konnte in beiden Böden nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der fehlenden Bodenfauna (Abschnitt 2.2.2) kann von fingering flow oder funneling flow ausgegangen werden. Über das präferentielle Fließen und seine Rolle bei der Verteilung von SDZ ist noch wenig bekannt (Burkhardt, (2007); Hamscher et al. (2005)).

Die Rolle des SDZ und seines spezifischen Sorptionsverhalten und die Beziehung auf die spezifischen physiochemischen Eigenschaften der Böden wird gesondert in folgendem Abschnitt beschrieben.

Für die ganzheitliche Betrachtung der A_{eq} SDZ konnten nur die Lysimeter A2 und B2 verwandt werden da bei den Lysimetern A1 und B1 durch die spaltenweise Beprobung eine zeitversetzte Entnahme des Bodens stattfand.

Darüber hinaus wurden bei der spaltenweisen Entnahme unterschiedlich hohe Äquivalentmengen (A_{eq}) an SDZ gemessen, siehe Abbildung 16. Die unterschiedlichen A_{eq} SDZ lassen sich mit der Applikationsmethode der Gülle erklären (siehe Abschnitt 2.2.1-2). Dabei wurde die Gülle mit Bechergläsern gleichmäßig auf den Lysimetern verteilt und eingearbeitet. Da jedoch Gülle aus einer Flüssig- und Festphase besteht und 80% der Radioaktivität an der Festphase in der Gülle gebunden war ist es höchst wahrscheinlich zu einer ungleichmäßigen Ausbringung von Flüssig- und Festphase gekommen. Damit lässt sich die hohe A_{eq} SDZ von A1 am Tag 218 von 0,72 mmol sowie von B1 am Tag 29 mit nahezu 1 mmol erklären. Die Summe aller A_{eq} SDZ lag bei beiden Lysimetern bei 0,60 mmol anstatt der angenommenen 0,50 mmol. Die Daten lassen somit vermuten, dass zu Beginn des Versuches insgesamt 0,60 mmol aufgetragen wurden.

Die A_{eq} des SDZ aus den Lysimetern A2, Braunerde aus Kal, und B2, Parabraunerde aus Mer, in Abbildung 24, zeigt, dass es bei Lysimeter B2 zu einem Verlust von A_{eq} SDZ gekommen ist. Es wurde zu Beginn des Versuches 1 mmol an Äquivalentmenge SDZ appliziert. In Lysimeter A2 konnten fast 100% wiedergefunden werden. In Lysimeter B2 konnten dagegen nur 62% (0,6 mmol) der applizierten Menge wiedergefunden werden.

Aufgrund des geringen Wissens über SDZ und seinem Verbleib im Boden über einen Zeitraum von drei Jahre, könnte der Verlust von SDZ und seiner Metaboliten in Lysimeter B2 mit zahlreichen Mechanismen zusammenhängen.

Ein Erklärungsansatz wäre, dass es im Lysimeter B2 im Gegensatz zu Lysimeter A2, zu einem Abbau des SDZ und seinen Metaboliten gekommen ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den Verlust von SDZ wäre ein Abbau durch Mikroorganismen und der damit verbundenen Mineralisierung oder andere chemische Vorgänge welche zur $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus der ^{14}C -markierung führten.

Bei Respirationsuntersuchungen von Kreuzig et al. (2003) wurden Böden auf deren die Mineralisierung von ^{14}C -SDZ haltiger Gülle untersucht. Die dort verwendeten Böden sind mit denen dieser Arbeit vergleichbar. Die Mineralisierung wurde 28 Tage lang auf bioaktiven und inaktiven Boden beobachtet. Es fand während dieser Zeit eine Mineralisierung von unter 2% statt. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen chemischen und mikrobiellen Abbau von SDZ festgestellt werden. Weiterhin konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den verschiedenen Bodentypen gefunden werden (Kreuzig et al. 2003).

Einen weiteren Einblick geben die Respirationsuntersuchungen von Wehrhan (2006) bei denen ^{14}C -markiertes SDZ mit Schweinegülle und Boden vermischt wurde. In den Versuchen wurden dieselben Böden wie in dieser Arbeit verwendet. Die Mineralisierung wurde über einen Zeitraum von 70 Tagen gemessen. Es konnte nur in den ersten 20 Tagen eine Mineralisierung von ^{14}C -SDZ in geringem Ausmaß festgestellt werden. Es konnten 0,3% des zuvor applizierten ^{14}C -SDZ als $^{14}\text{CO}_2$ aufgefangen werden. Auch hier spielt der mikrobielle Abbau von SDZ eine untergeordnete Rolle (Wehrhan, 2006).

Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse der Untersuchungen von Schmidt et al. (2008). Der Versuchsaufbau ähnelt dem von Wehrhan (2006). Der Untersuchungszeitraum lag bei 220 Tagen. Auch hier wurden die Böden von Mer

und Kal verwendet. Dabei wurde eine Mineralisierung von maximal 1,7% im Boden aus Mer beobachtet. In dem Boden von Kal fand eine geringere Mineralisierung (0,7%) statt. Die höhere Mineralisierung in der Parabraunerde aus Mer hängt laut Schmidt et al. mit einer höheren Konzentration an Mikroorganismen im Boden zusammen.

Die Parabraunerde aus Mer besaß einen höheren Humusanteil von 2,1% (Abschnitt 2.1, Tabelle 4), sowie ein schwach saures pH, was eine mögliche höhere Aktivität von Mikroorganismen erwarten lässt als bei der Braunerde aus Kal. In der Braunerde konnte ein Humusanteil von 1,7%, mit einem stark saurem pH, bestimmt werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz könnten die wechselnden Umweltbedingungen, die bei den Freilandlysometern vorhanden waren, sein. Unter Freilandbedingungen kann in langen Trockenphasen der Boden in den oberen Bodenschichten austrocknen und durch Niederschlagsereignisse wieder befeuchtet werden. Bei einem Trocknen und Wiederbefeuchten der Bodenmatrix veränderte sich die Gestalt der Bodenaggregate. Durch das Trocknen kommt es zur Schrumpfung und dadurch zur Verringerung der Oberfläche der Aggregate. Bei Wiederbenetzung können die Bodenaggregate wieder aufquellen, dabei erlangen sie jedoch nicht sofort wieder die gleiche Oberfläche wie zuvor. Durch das Schrumpfen könnte bereits sorbiertes SDZ desorbiert worden sein. Nach der Neubefeuchtung durch Niederschlag könnte das SDZ im Bodenwasser gelöst und war damit für Mikroorganismen verfügbar geworden sein, welche dieses wiederum abgebaut haben könnten.

In Untersuchungen von Jason et al. (1998) mit Pestiziden konnte ein solches Phänomen beobachtet werden. Laut Jason et al. (1998) wurden die Huminstoffe als besonders wichtig für diesen Mechanismus erachtet. Tonminerale besitzen ebenfalls solch einen Schrumpf- und Quell-Mechanismus. Bereits in Abschnitt 1.2.2 wurde auf die Bedeutung von Huminstoffen und Tonmineralen für die Sorption von SDZ eingegangen. Auf die Sorption wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Die Respirationenuntersuchungen von Schmidt et al., Kreuzig et al. sowie Wehrhan konnten dieses Phänomen nicht beobachten, da die besagten Untersuchungen in einem geschlossenen System stattfanden. Im Gegensatz dazu sind Lysimeter ein offenes System in dem es zu einem Austausch mit der Umwelt kommen kann. Durch Wechselwirkungen an der Lysimeter Oberfläche, bedingt durch Luftdruck- und Temperaturänderung sowie durch Wind, kommt es zu einem Gestransport an der

Oberfläche, wodurch den Mikroorganismen mehr Sauerstoff zur Verfügung steht. Durch einen höheren Sauerstoffgehalt in der oberen Bodenschicht könnte es zu einer höheren Aktivität der Mikroorganismen gekommen sein. Die Belüftung der oberen Bodenschicht durch Bioturbation kann als gering angesehen werden, da vor der Applikation die Makro-Bodenfauna abgetötet worden war, siehe Abschnitt 2.2.

4.1.3 Sequentieller Extraktion und Metaboliten Analyse

Bei der sequentiellen Extraktion nach Förster et al. (2008) wurde ein Anstieg des NER-Anteils im Laufe der Zeit in allen vier Lysimetern gemessen. Parallel dazu wurde der Anteil der extrahierbaren A_{eq} von SDZ kleiner. In Abbildung 21 für A1 und 22 für B1 ist an den Tagen 29 und 1022 die Verteilung des NER-Anteils und der extrahierbaren Anteile schichtweise dargestellt. Bei der Gegenüberstellung sind die Tendenzen der Zunahme des NER-Anteils und die Abnahme des extrahierbaren Anteils zu erkennen.

In Lysimeter A1 konnte am Tag 29 bis 218 durchschnittlich 53% Äquivalentmenge (A_{eq}) SDZ extrahiert werden; 47% lagen als NER vor. Am Probenentnahmetag 1022 lag die des A_{eq} SDZ bei 63% NER.

Beim Lysimeter B1, Parabraunerde, waren am Tag 29 bis 218 durchschnittlich über 56% NER vorhanden und 44% lagen als extrahierbare A_{eq} SDZ vor. Am Tag 1022 hingegen waren 70% NER und 30% extrahierbar.

Die Resultate der Lysimetern A2 und B2 unterstreichen diese Aussage, siehe Abbildung 25. In den Lysimetern A2 und B2, bei denen eine ungestörte Verteilung des SDZ erfolgte, wurden ca. 80% des gesamt A_{eq} SDZ der NER-Fraktion zugeschrieben und 20% A_{eq} SDZ waren extrahierbar.

Der Verbleib von SDZ im Boden und die Verteilung auf die Extrahierbare- und NER – Fraktionen wurden von vielen Autoren beschrieben, jedoch besteht ein großer Unterschied mit welcher Methode der Boden extrahiert wurde. Bei einer milden Extraktion erhöht sich der Anteil der NER-Fraktion. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten von Wehrhan (2006), Förster et al. (2009) sowie Schmidt et al. (2008) zum Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse herangezogen. In den genannten Arbeiten wurden ähnliche Extraktionsverfahren, sowie die gleichen Böden wie in der vorliegenden Diplomarbeit verwendet, weshalb sich auch die Ergebnisse untereinander vergleichen lassen.

Die Arbeiten von Wehrhan (2006) und Förster et al. (2009) untersuchten auch die Verteilung der zwei Haupt-Metaboliten, Acetyl-SDZ und 4-OH-SDZ. Der Untersuchungszeitraum lag durchschnittlich bei mehr als 218 Tagen.

Es wurde eine exponentielle Abnahme der in den Versuchen extrahierten A_{eq} SDZ in den ersten 2-6 Tagen nach Beginn der Extraktion ermittelt (Förster et al., 2008). Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der NER-Fraktion bis zu einem konstanten Anteil von 42% am 14.-29. Tag. Ab dem Tag 20 stellte sich ein Gleichgewicht von extrahierbaren Fraktionen und NER A_{eq} SDZ ein (Wehrhan, 2006).

In den hier durchgeführten Versuchen konnte die Verteilung der A_{eq} SDZ aus der sequentiellen Extraktion erst ab Tag 29 verfolgt werden. Deswegen kann diese Aussage in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Förster et al. stellte weiterhin fest, dass nach 8 Wochen alle Fraktionen stabile Konzentrationen angenommen hatten. Bei Messungen der sequentiellen Extraktion nach 6 Monaten waren 50% des A_{eq} SDZ in der NER-Fraktion und 50% in der extrahierbaren Fraktion zu messen.

In dieser Arbeit konnte der gleiche Effekt beobachtet werden. Die NER-Fraktion blieb im vergleichbaren Zeitraum von Tag 29 bis 218 konstant, d.h. sie lag für A1 bei 47%, und für B1 bei 63%.

Für A1 und B1 konnte am letzten Probenentnahmetag 1022 eine höhere NER-Fraktion von A1 für 63% und B1 für 70% ermittelt werden. Bei den Untersuchungen von Schmidt et al. wurde in einem vergleichbaren Zeitraum ein höherer NER-Anteil, von über 80%, gemessen.

Weiterhin wurde in den Untersuchungen von Förster et al. (2009) kein Unterschied zwischen der Extraktions-Verteilung der beiden Bodentypen, Braunerde (Kal) und Parabraunerde (Mer) gefunden. Dieses Ergebnis konnte in den Lysimetern A2 und B2 bestätigt werden. Bei den Lysimeter B1 wurde Jedoch ein 10% höherer NER-Anteil gemessen als im Lysimeter A1. Dieses wiederum kann von Schmidt et al. bestätigt werden. Dort wurden auch in der Parabraunerde (Mer) nach 218 Tagen ein 10% höhere NER-Anteil gefunden als in der Braunerde (Kal).

Metaboliten-Analyse

Bei der durchgeführten Metaboliten-Analyse wurden die Extrakte der sequentiellen Extraktion nach SDZ und seinen Haupt-Metaboliten, 4-OH-SDZ und Acetyl-SDZ, untersucht. Es konnte bis zum Tag 1022 SDZ in auswertbaren Konzentrationen in den Aceto. +H₂O-Extrakten und Me-OH-Extrakten gefunden werden. Qualitativ

konnte auch SDZ in den CaCl_2 -Extrakten nachgewiesen werden, siehe Tabelle 15 und Abbildung 23 für A1 und B1 sowie Tabelle 18 für A2 und B2. Die Konzentrationen nahmen im Laufe der Zeit kontinuierlich ab.

Beim Vergleich von A1 und B1 konnte in A1 mehr SDZ und seine Metaboliten nachgewiesen werden. Am Ende der Lysimeterversuche nach 1022 Tagen für A1 und B1 und 1079 Tagen für A2 sowie 1093 Tagen für B2 konnte SDZ und 4-OH-SDZ nachgewiesen werden.

Der Metabolit 4-OH-SDZ konnte in den Lysimetern A1 und B1 bis zum Probenentnahmetag 1022 gefunden werden. Dabei wurde 4-OH-SDZ in A1 häufiger Angetroffen als in B1. Hingegen konnte in den Lysimetern A2 und B2 kein 4-OH-SDZ nachgewiesen werden.

Der Metabolit Acetyl-SDZ war in den beiden Lysimetern A1 und B1 bis zum Probenentnahmetag 218 nachweisbar. Dabei konnte Acetyl-SDZ hauptsächlich in den CaCl_2 -Extrakten gemessen werden. Am Tag 29 konnte Acetyl-SDZ auch in der Aceto. + H_2O -Extrakten gefunden werden. Der Metabolit Acetyl-SDZ wurde am Probenentnahmetag 1022 in keinen der Lysimeter A1, B1 gefunden und konnte auch bei keiner Probenentnahme in einem der Extrakte der Lysimetern A2 und B2 nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind mit denen von Förster et al. (2009) und Wehrhan (2006) vergleichbar. Bei den Untersuchungen von Wehrhan kann jedoch nur eine Aussage über die ersten 40 Tage nach Applikation getroffen werden.

Die Berechnung der Halbwertszeit (DT_{50}) von SDZ ist in der Literatur umstritten und nicht eindeutig festgelegt. Kreuzig und Höltge (2005) geben eine DT_{50} von SDZ im Boden mit 3 Tagen an. Blackwell et al. (2007), bei dem die Verteilung von Sulfachlorpyridazine untersucht wurde – ein Antibiotikum welches auch zu den Sulfonamiden gehört –, gibt eine DT_{50} von 3,8 Tagen an. Weitere Untersuchungen von Accinelli et al. (2007) sprechen von einem DT_{50} von 18,6 für Sulfamethazine und DT_{50} von 21,3 Tagen für Sulfachlorpyridazine.

Diese Arbeit zeigt jedoch, dass selbst nach 1093 Tagen (B2) SDZ in messbaren Konzentrationen enthalten war. Somit kann eine weitaus höhere DT_{50} von SDZ angenommen werden. In den Untersuchungen von Förster et al. wird keine konkrete Aussage über die DT_{50} von SDZ im Boden getroffen, aber es wird eine 100fach

höhere DT_{50} vermutet als es in früheren Arbeiten der Fall gewesen ist. Auch die Ergebnisse von Wehrhan lassen eine höhere DT_{50} vermuten.

Eine Begründung für die niedrigen DT_{50} -Angaben für SDZ hängt wie oben beschrieben mit den unterschiedlichen Extraktions-Methoden zusammen.

Bei den Untersuchungen von Förster et al. (2009) konnte nach den ersten 28 Tagen eine Zunahme von 4-OH-SDZ in den Extrakten gemessen werden. Diese nahm nach einigen Wochen an Konzentration ab. Eine DT_{25} wird mit 17 Tagen angesetzt. Bei den Schüttelversuchen von Wehrhan mit zwei unterschiedlich hohen Konzentrationen an A_{eq} SDZ konnte eine DT_{25} von ca. 17 Tage angegeben werden, wobei die Konzentration von 4-OH-SDZ bis zu Tag 40 konstant blieb.

In dieser Arbeit konnte dieselbe Beobachtung gemacht werden: die Konzentration von 4-OH-SDZ nahm stärker ab als die des SDZ.

Die Konzentration von Acetyl-SDZ konnte am Anfang von Tag 29 bis Tag 218 gemessen werden. Am letzten Probenentnahmetag 1022 von A1 und B2 konnte Acetyl-SDZ nicht mehr nachgewiesen werden. Es muss demnach abgebaut, sorbiert oder in SDZ, 4-OH-SDZ bzw. einen weiteren Metaboliten umgewandelt worden sein. Bei Förster et al. (2009) zeigte Acetyl-SDZ eine ähnliche Verteilung. Nach einigen Wochen war Acetyl-SDZ gänzlich abgebaut, es wird von einer DT_{50} von 8 Tagen ausgegangen. In den Untersuchungen war schon ab dem Tag 6 die Hälfte Acetyl-SDZ gemessen worden verglichen zum ersten Tag nach der Applikation.

Bei Versuchen mit Gülle konnte eine Carboxylierung von Acetyl-SDZ zu SDZ oder 4-OH-SDZ beobachtet werden. Jedoch wurde der Prozess der Carboxylierung nicht im Boden beobachtet (Lamshöft et al. 2007). Die Abnahme von Acetyl-SDZ erhöhte nicht die Konzentration von SDZ und 4-OH-SDZ, somit könnte es zu einer Sorption speziell von Acetyl-SDZ gekommen sein (Förster et al., 2009).

In den Resultaten aus den Versuchen von Förster et al. (2009) und Wehrhan (2006) zeigten beide eine stabile Verteilung von SDZ nach 28 Tage. Förster konnte in den Extrakten aus der sequentiellen Extraktion nach 250 Tagen SDZ und 4-OH-SDZ nachweisen. Somit ist anzunehmen, dass SDZ und 4-OH-SDZ unverändert für eine weit längere Zeit als angenommen im Boden verbleibt und somit Verlagerungsprozessen ausgesetzt ist, die es eventuell ermöglichen die Stoffe in das Grundwasser auszuspülen.

4.1.4 Sorption von SDZ

Bei der Betrachtung der Persistenz von SDZ und seiner Metaboliten ist die Sorption von großer Bedeutung. In der Einleitung Abschnitt 1.2.2 wurde bereits auf die Sorption von SDZ eingegangen. Aufgrund seiner Konfiguration besitzt SDZ ein komplexes Sorptionsverhalten. Bei der Sorption spielen die Begleitparameter, Bodengefüge und Bodenstruktur eine Rolle.

Die Bedeutung der Bodenfeuchte in Zusammenhang mit der Sorption von Sulfadimethoxin in Gülle wurde von Wang et al. (2006) untersucht. Es konnte keine Veränderung der Persistenz von Sulfadimethoxin an die Bodenmatrix beobachtet werden. Da Sulfadimethoxin ein Sulfonamid ist und über einen ähnlichen Sorptionsmechanismus wie SDZ verfügt, wird höchst wahrscheinlich die Bodenfeuchte auch in der vorliegenden Arbeit einen geringen Einfluss auf die Persistenz von SDZ im Boden gehabt haben.

Der pH-Wert ist für die Konfiguration von SDZ mitentscheidend. In der Einleitung wurde darauf bereits eingegangen, Abschnitt Sorption von SDZ. Bei einem sauren pH-Wert, ab pH 4 steigt der Anteil der kationischen Form von SDZ. Da die kationische Form bevorzugt sorbiert wird, steigt der Anteil des sorbierten SDZ und damit auch der der NER-Fraktion an (Kahle und Stamm, 2006).

Der Gehalt an organischen Kohlenstoffen z.B. Huminstoffe, Wurzelmaterial im Bodengefüge spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Sorption. Durch einen erhöhten Anteil von organischem Kohlenstoff kann mehr SDZ im Boden sorbiert werden (Lertpaitoonpan et al., 2009). Die durch den Prozess der Humifizierung gebildete Huminstoffe haben aufgrund ihrer Struktur (große Oberfläche) eine hohe Sorptionskapazität, Abschnitt 1.2.2.

Allgemein ist die Zusammensetzung der Bodenstruktur wichtig für die Sorption. Dabei gilt: Je kleiner die Korngrößen, desto mehr kann die Bodenmatrix sorbieren. Besonders Tonminerale haben eine hohe Sorptionskapazität (Scheffer und Schachtschabel, 2002).

In dieser Arbeit wurde in den Lysimetern A2 und B2 mit 80% ein gleich hoher Anteil von NER gemessen. Dabei spielen die oben und in der Einleitung genannten Mechanismen eine Rolle. Der Kationenaustausch ist von besonderer Bedeutung. Für

die Braunerde von Kal (A2), die einen pH von unter 5 besitzt, kommt es höchst wahrscheinlich zum Kationenaustausch bedingt durch die Zunahme von H^+ -Ionen in der Bodenlösung.

Bei der Parabraunerde von Mer ist ein pH-Wert von über 6 gemessen worden. Daher ist anzunehmen, dass durchschnittlich ein höherer Anteil der wenig sorbierenden anionischen SDZ-Form vorhanden ist. Jedoch besitzt die Parabraunerde aus Mer einen höheren Humusgehalt und einen höheren Schluff-Anteil. Durch einen höheren Anteil an Tonmineralen durch den Schluff und den hohen Anteil an Huminstoffen kann von einer höheren verfügbare Oberfläche ausgegangen werden und somit eine höhere Sorptionskapazität vorausgesetzt werden, siehe Abschnitt 1.2.2.

Bei der Sorption der Metaboliten von SDZ werden diese durch Kationenaustausch an Huminstoffe und Tonminerale angelagert. Als Austauschpartner fungieren Tonminerale, Huminstoffe und pedogene Oxide- Hydroxide (Kahle und Stamm, 2006). Die einzelnen Metaboliten werden auch unterschiedlich stark sorbiert. Dabei bindet sich 4-OH-SDZ an organische Stoffe wie Fulvo-, Huminsäuren, Huminen aber auch an anorganische Bestandteile (Tonminerale) der Bodenmatrix (Förster et al. 2009; Kahle und Stamm, 2007). Dabei ist die Affinität zur Bindung an Huminstoffe wie folgt: Acetyl SDZ > 4-OH-SDZ > SDZ. Aus diesem Grund kann SDZ und 4-OH-SDZ stärker und für eine längere Zeit extrahiert werden (Stoob et al., 2009).

Wie in der Einleitung (Sorption von SDZ) erwähnt, wird von einer nicht linearen Sorption von SDZ ausgegangen. In dieser Arbeit wurden keine Sorptionsmodelle aufgestellt. Jedoch könnte eine irreversible und zugleich reversible Sorption stattgefunden haben. Irreversibel wurden wahrscheinlich die A_{eq} an SDZ die sich in der NER-Fraktion befinden sorbiert. Die NER-Fraktion nahm im Laufe der Zeit immer mehr zu, während der A_{eq} an SDZ der extrahiert werden konnte abnahm, siehe dafür Abschnitt 3.1.1 „sequentielle Extraktion“. Hingegen wurde ein Teil der A_{eq} an SDZ reversibel sorbiert. Dies zeigte sich dadurch, dass der extrahierbare Anteil an A_{eq} SDZ im Laufe der Zeit abnahm. Wenn SDZ reversibel sorbiert wurde konnten geringe Mengen des SDZ in der Bodenlösung gelöst werden, die damit den Mikroorganismen zur Verfügung standen. Die wiederum diesen geringen Anteil an SDZ abgebaut haben. Somit ist der Verlust von 40% des appliziertem A_{eq} SDZ der Lysimeter B1 und B2 zu erklären.

Bei den Untersuchungen von Unold et al. (2009), Wehrhan (2006) sowie Förster et al. (2009) in denen Sorptionsmodelle von SDZ erstellt wurden, zeigten die gleichen Verteilung von NER- und extrahierbaren Fraktion. Bei allen wurde nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Tagen ein Gleichgewicht des NER- und extrahierbaren Fraktion gefunden. In dieser Arbeit wurde am Probenentnahmetag 29 eine Verteilung von 45% NER und 56% extrahierbar A_{eq} SDZ für A1 und 54% zu 46% bei B1 gemessen, siehe Tabelle 14.

In den Untersuchungen von Unold et al. (2009), Wehrhan (2006) sowie Förster et al. (2009) nahm die irreversible Sorption im Laufe der Zeit zu. Es wurde ein höherer Anteil am NER gefunden, wie in dieser Arbeit auch. Somit ist davon auszugehen, dass die Sorption wie sie in dieser Arbeit vorgefunden wurde gut mit den Sorptionsmodellen von Unold et al. (2009) und Wehrhan (2006) erklärt werden kann.

4.2 Pflanzenversuch

Bei den Pflanzenversuchen wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine Rhizosphärentätigkeit einen Einfluss auf die Verteilung des SDZ-Metaboliten und dem NER-Verhältnis hat, sowie ob die Pflanzen eventuell bioverfügbar gewordenenes ^{14}C -SDZ über die Wurzeln aufnehmen würden.

4.2.1 Begleitparameter

Vor Beginn des Versuches wurde ein pH- Wert, in A2, im stark sauren Bereich mit 4,7 gemessen. Die pH-Wert Messung nach dem Pflanzversuch ergab das gleiche Ergebnis. Auch Düngung und das Anheben der Bodenfeuchte auf 25% Wk_{\max} hatten keinen messbaren Einfluss auf den pH-Wert. Beim Lysimeter A2 konnte ein erhöhter pH-Wert von 6,4, vor dem Versuch, auf 6,7 nach der Bepflanzung mit Mais gemessen werden. Die Düngung könnte eine Erhöhung der H^+ -Ionen Konzentration zufolge gehabt haben. Damit befindet sich der pH-Wert im schwach sauren Bereich (Stahr et al., 2008).

4.2.2 Remobilisierung sequestriertes SDZ durch Rhizosphärentätigkeit

Bei dem Vergleich von bepflanzttem Boden mit dem Boden aus der Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem bepflanzten und dem Kontrollboden gefunden werden. Der Anteil an der Äquivalentkonzentration (c_{eq}) von SDZ war gleich der c_{eq} SDZ nach der Bepflanzung. Es zeigte sich in allen vier Ansätzen keine Veränderung. Bei dem Vergleich von bepflanzttem Boden, dem Boden aus der Kontrolle und dem Boden der ursprünglich aus dem Lysimeter stammte, konnten keinen signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Durch Erhöhung der Bodenfeuchte auf 25% Wk_{max} und zusätzlicher Düngung erfolgte demnach keine Veränderung der extrahierbaren c_{eq} SDZ im Boden.

Die Ergebnisse der sequentiellen Extraktion sind für den bepflanzttem Boden und dem Boden der (unbepflanzt) aus den Lysimetern stammte gleich, Abschnitt 3.2 „sequentielle Extraktion“. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Böden gefunden werden.

Die Resultate der Untersuchungen der einzelnen Pflanzenteile: Blätter, Stängel und Wurzeln, zeigten, dass nur in den Wurzeln c_{eq} SDZ in Spuren enthalten war. Die maximale c_{eq} von SDZ wurde in Ansatz A2 mit jeweils $3,5 \cdot 10^{-8} \text{ mmol g}^{-1}$ in der Feuchtmasse für 0-5 cm und 5-10 cm gemessen.

Die Literatur berichtet über den Nachweis von SDZ in geringen Konzentrationen in Pflanzenwurzeln, zum Beispiel Grote et al. (2006) in Versuchen mit Weizen und Salat die nach frischer Applikation von SDZ haltiger Gülle gepflanzt wurden. Die Freilandparzellen auf denen Salat und Weizen gepflanzt wurden, wurden zweimal mit SDZ haltiger Gülle beaufschlagt. Die Konzentrationen von c_{eq} SDZ im Boden betrug bei Grote $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$. In den Untersuchungen fand eine, im Laufe der Zeit immer stärker werdende, Sorption statt. In den Weizen- und Salatpflanzen konnte zu Beginn des Versuches SDZ in Spuren in den Wurzeln und in Grünanteilen der Pflanzen gemessen werden. Dabei wurde eine höhere Konzentration im Grünanteil der Pflanzen gemessen. Boxall et al. (2006) fanden eine geringe Konzentrationen an SDZ in den untersuchten Pflanzen, die jedoch unter der unbedenklichen Tagesdosis, die der Autor mit $20 \text{ } \mu\text{g kg day}^{-1}$ angibt, lag. Die maximale Konzentration konnte in den Blättern gefunden werden.

In dem Pflanzenversuch dieser Arbeit konnte eine maximale c_{eq} SDZ von $45,5 \cdot 10^{-7} \text{ mmol g}^{-1}$ im Boden gemessen werden. Das ist 75-mal niedriger als die Konzentration die in den Versuchen von Grote et al. (2006) gefunden wurde. Desweiteren ist der hier verwendete Boden nur einmal mit SDZ haltiger Gülle beaufschlagt worden und im Anschluss daran für drei Jahr ruhen gelassen worden. Durch die lange Verweildauer des SDZ im Boden fand eine höhere und stärkere Sorption statt. So konnten die Pflanzen auch weniger aufnehmen. Entgegen der Resultate aus der Literatur konnte in diesem Versuch nur ^{14}C -SDZ in den Wurzeln gefunden werden jedoch nicht in den Blättern. Aus diesem Grund müssen die Ergebnisse der gefundenen c_{eq} SDZ in den Wurzeln kritisch begutachtet werden.

Da die Pflanzenwurzeln, besonders die Feinwurzeln, stark mit dem Boden in Verbindung getreten waren ist es denkbar, dass bei der Reinigung der Wurzel, siehe Abschnitt 2.8.2, nicht die komplette anhaftende Menge an Boden abgewaschen werden konnte und so einige Bodenpartikel, an denen sich das ^{14}C -SDZ angeheftet hatte, mit in die analytische Aufarbeitung einbezogen wurden. Somit könnte es zu einer Verunreinigung der Proben und folglich zu einer Verfälschung der Werte gekommen sein. Zusammenfassend: In den beiden Böden, in dem SDZ und Metaboliten nach drei Jahren überwiegend in der NER Fraktion festgelegt waren, ist es nicht gelungen nachzuweisen, dass eine Rhizosphärentätigkeit stark gebundenes SDZ remobilisieren kann.

4.3 Zusammenfassung

Der größte Teil des applizierten SDZ konnte der NER-Fraktion zugemessen werden. Dennoch konnte nach drei Jahren, nach nur einmaliger Applikation von SDZ haltiger Gülle, SDZ aus dem Boden extrahiert werden. Dabei wurde das Antibiotikum SDZ sowohl in unveränderter Form als auch als Metabolit, 4-OH-SDZ, in messbaren Konzentrationen im Boden gefunden werden. Die Abbauprozesse verlaufen für das hier getestete Antibiotikum demnach sehr langsam. In der Braunerde von Kal konnte sogar die gesamte applizierte Menge an SDZ im Boden gefunden werden. Somit fand wahrscheinlich in diesem Boden kein Abbau statt. In der Parabraunerde aus Mer hingegen konnte 1/3 der applizierten SDZ-Menge nicht gefunden werden. Wahrscheinlich fand dort ein Abbau statt.

Während des Untersuchungszeitraums konnte ein Ansteigen des NER-Anteils in beiden Böden beobachtet werden. Dies spricht für eine hohe und starke Sorptionkapazität des Bodens. Es fand zwar eine Verlagerung von SDZ in tiefere Bodenschichten statt, jedoch betrug diese maximal 20 cm in der Braunerde aus Kal. Bei der Parabraunerde aus Mer konnte eine geringere Verlagerungstiefe von 5 cm beobachtet werden. Dies deutet wiederum auf eine hohe Sorption von SDZ an der Bodenmatrix hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass SDZ sehr lang im Boden verbleibt. Es kann keine genaue Aussage getroffen werden, ob SDZ im Laufe der Zeit desorbiert und abgebaut wird.

Die Sorption von SDZ ist ein wichtiger Bestandteil um Aussagen über den Verbleib von SDZ in Böden treffen zu können. Auch um eine Abschätzung abgeben zu können ob SDZ eines Tages ins Grundwasser ausgewaschen werden könnte und so eine noch größere Verbreitung des Antibiotikums SDZ stattfindet könnte, ist die die Betrachtung der Sorption von SDZ von hoher Bedeutung. Durch den Transport im Grundwasser könnten weit größere Bereiche mit SDZ kontaminiert werden, welches wiederum eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bildung von Resistenzen zufolge haben könnte. Somit ist eine Erforschung um den Verbleib von SDZ und den eventuell damit zusammenhängende Umweltrisiken wichtig.

5 Literaturverzeichnis

Internetquellen

FuttMV 1981 Futtermittelverordnung

http://bundesrecht.juris.de/futtmv_1981/BJNR003520981.html.

[Zugriff: 25.07.2009]

Rechenberg, 2009 Arzneimittel in der Umwelt, Umweltbundesamt

<http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3757.pdf>.

[Zugriff: 07.08.2009]

Schneidert, 2006; Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen

[http://www.bft-](http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf)

[online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf](http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf)

[Zugriff: 07.08.2009]

WHO/EMC/BAC/98.6,1999, Antimicrobial Resistance Monitoring, 1998

http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_EMC_BAC_98.6.pdf

[Zugriff: 10.08.2009]

RICHTLINIE 2004/28/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES

http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-5/dir_2004_28/dir_2004_28_de.pdf

[Zugriff: 10.08.2009]

Sulfonamide und Trimethoprim ...

<http://medikamente.onmeda.de/Wirkstoffgruppe/Sulfonamide+und+Trimethoprim+.html>

[Zugriff: 05.08.2009]

Antibiotika-Resistenzatlas "GERMAP 2008"

http://www.bvl.bund.de/cln_027/DE/08__PresseInfothek/00__doks__downloads/Germap__2008.html

[Zugriff: 07.08.2009]

Rechenberg, 2009 Arzneimittel in der Umwelt, Umweltbundesamt

<http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3757.pdf>.

[Zugriff: 07.08.2009]

Compo, 2009

<http://www.compo-profi.de/kulturen/3328.php?PHPSESSID=3e01de6e7aca2ddcb54e29be8>

[Zugriff: 11.08.2009]

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2003 Antibiotika-Resistenz bei Keimen in der Fleischproduktion zu hoch

<http://www.bfr.bund.de/cd/2040>

[Zugriff: 10.08.2009]

Literatur

- Accinelli, C.; Koskinen, W. C.; Becker, J. M.; Sadowsky, M. J.** (2007): Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55, 2677–2682.
- Alder A.C.; McArdell C.S.; Golet E.M.; Ibric S.; Molnar E.; Nipales N.S.; Giger W.** (2001): Occurrence and Fate of Flouroquinolone, Macrolide, and Sulfanamide Antibiotics During Wastewater Treatment and in Ambient Water in Switzerland. *Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington, DC*, 56-69.
- Amelung W.; Bol R.; Friedrich C.** (1999): Natural C-13 abundance: A tool to trace the incorporation of dung-derived carbon into soil particle-size fractions. *Rapid communications in mass spectrometry*, 13, 13, 1291-1294, 1999
- Angulo FJ.; Nunnery JA.; Bair HD.** (2004): Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens, *Revue scientifique et technique de l'office international des epizooties*, 23, 2, 485-496, 2004
- Blackwell, PA.; Kay, P.; Boxall, ABA.** (2007): The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*, 2007, 67, 2, 292-299.
- Blume, H.-P.; Felix-Henningsen. P.; Fischer, W.R.; Frede, H.G.; Horn, R.; Stahr, K.** (1996): *Handbuch der Bodenkunde (Losebl.-Ausg.)*. Ecomed, Landsberg, 1-486.
- Boxall, ABA.; Fogg, LA.; Blackwell, PA.; Kay, P.; Pemberton, EJ.; Croxford, A.** (2004): Veterinary medicines in the environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 180, 1-91, 2004.
- Boxall, ABA.; Johnson, P.; Smith, EJ.; Sinclair, CJ.; Stutt, E.; Levy, LS.** (2006): Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54, 6, 2288-2297.
- Briggs G.; Rigitinano, R. L.; Bromilow, R. H.** (1987): Physico-chemical factors affecting uptake by roots and translocation to shoots of weak acids in barley. *Pesticide Science* 19,101–112.
- Burkhardt M.; Stamm C.; Waul C.; Singer H.; Muller S.** (2005): Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of environmental quality*, 34, 4, 1363-1371, 2005.
- Burkhardt, M.** (2007): *Abschwemmung, Verlagerung und Abbau von Sulfadimin auf gegülltem Grünland*. Verlag Oldenbourg München. *Tierarzneimittel in der Umwelt*, 2007, 36, 25-36.
- Dolliver, H.; Kumar, K.; Gupta, S.** (2007): Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of environmental quality*, 34, 36, 4, 1224-1230, 07-08.2007.
- ECPA** (1993): The regulatory use of lysimeter studies and computer modeling for the evaluation of pesticide mobility in soil. *ECPA Technical Monographies 16*. European Crop Protection Association, Bruxelles, 1-24.
- Flury, M.; Leuenberger, J.; Studer, B.; Flühler, H.; Jury, W.A.; Roth, K.** (1994): Pesticide Transport Through Unsaturated Field Soils: Preferential Flow. *Res. Rep. CIBA Ltd (available on request from ITOETH Zuerich, Soil Physics), Basel, Switzerland*, 1-293.
- Förster, M.; Laabs, V.; Lamshöft, M.; Pütz, T.; Amelung, W.** (2007): Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008, 391, 1029–1038.

- Förster, M.; Laabs, V.; Lamshoeft, M.; Groeneweg, J.; Zuehlke, S.; Spitteller, M.; Krauss, M.; Kaupenjohann, M.; Amelung, W.** (2009): Sequestration of Manure-Applied Sulfadiazine Residues in Soils Source. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43, 6, 1824-1830.
- Gräfe, U.** (1992): *Biochemie der Antibiotika, Struktur- Biosynthese-Wirkmechanismus.* Spektrum Akademischer Verlag.
- Grote, M.; Schwake-Anduschus, C.; Stevens, H.; Michel, R.; Betsche T.; Freitag M.** (2006): Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, Verlag Birkhäuser Basel.
- Halling-Sørensen, B.** (2000): Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40, 7, 731-739, 04.2000.
- Halling-Sørensen, B.; Lykkeberg, A.; Ingerslev, F.; Blackwell, P.; Tjørnelund, J.** (2003): Characterization of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere* 50, 2003, 1331-1342.
- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P.; Ingerslev, F.; Holten-Lutzhøft, H.; Jørgensen, S.** (1998): Occurrence, fate and effect of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, 1998, 36, 357-393.
- Hamscher, G.; Pawelzick, H.T.; Hoper, H.; Nau, H.** (2005): Different behaviours of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 4, 861-868, 04.2005.
- Hamscher, G.; Sczesny, S.; Hoper, H.; Nau, H.** (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, 7, 1509-1518, 01.04.2002.
- Hartke, K.H.; Stewart, B.A.** (1995): *Soil Structure its Development and Function.* CRC Press, Boca Raton, 1-424.
- Henkelmann, G.** (2003): Transfer und Verlagerung radioaktiver Pflanzenschutzmittel im Freilandlysimeter. 10. *Lysimetertagung Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein*; 2003; 173-174.
- Höper, H.; Kues, J.; Nau, H.; Hamscher, G.** (2002): Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffe in Böden. *Bodenschutz* 4, 141-148.
- Jason, C.; White, A.; Quiñones, R.; Martin, A.** (1998): Effect of wetting and drying on the bioavailability of organic compounds sequestered in soil. *Environmental toxicology and chemistry*, 1998, 17, 12, 2378-2382.
- Jørgensen, S. E.; Halling-Sørensen, B.** (2000): Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691-699.
- Kahle, M.; Stamm, C.** (2006): Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41, 132-138.
- Kahle, M.; Stamm, C.** (2007): Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere*, 2007, 68, 1224-1231.
- Kay, P.; Blackwell, P.A.; Boxall, A.B.A.** (2005): A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. *Environmental Pollution* 134, 2, 333-341, 03.2005.
- Kessler, M.L.** (1989): *Liquid Scintillation. Analysis-Science and Technology.* Packard Instrument Company

- Kolpin, DW.; Furlong, ET.; Meyer, MT.; Thurman, EM.; Zaugg, SD.; Barber, LB.; Buxton, HT.** (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 6, 1202-1211, 15.03.2002.
- Kreuzig, R.; Kullmer, C.; Matthies, B.; Höltge, S.; Dieckmann, H.** (2003): Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils. *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 6, 550-558, 2003.
- Kreuzig, R.; Höltge, S.** (2005): Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental toxicology and chemistry*, 2005, 24, 771–776.
- Lamshöft M.; Sukul P.; Zuhlke S.; Spiteller M.** (2007): Metabolism of C-14-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388, 8, 1733-1745, 08.2007.
- Langhammer, J. P.; Führ, F.; Büning-Pfaue H.** (1990): Verbleib von Sulfonamid-Rückständen aus der Gülle in Boden und Nutzpflanze. *Lebensmittelchemie*, 44:93.
- Langhammer, J.P.** (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. 1-138
- Larsson, M.H.; Jarvis, N.J.** (1999): Evaluation of a dual-porosity model to predict field-scale. Solute transport in a macroporous soil. *Journal of hydrology*, 215, 153-71.
- Leake, C.R. (1991): Lysimeter studies. *Pesticide Science*, 1991, 31, 363-373.
- Lertpaitoonpan, W.; Ong, SK.; Moorman, TB.** (2009): Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere*, 2009, 76, 4, 558-564.
- Löscher W.; Ungemachen F.R.; Kroker R.;** (1994): Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren - 2. neuerarbeitete und erweiterte Auflage; Verlag Paul Parey
- Macherey-Nagel** (1998): Applikations Handbuch (Broschüre). MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren.
- Mückenhausen, E.** (1977): Entstehung, Eigenschaften und Sytematik der Böden der Bundesrepublik Deutschland. 2. Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 1977.
- Pütz, T.** (1993): Lysimeterversuche zum Verlagerungsverhalten von Methabenzthiazuron und gelöstem organischen Kohlenstoff in einer Parabraunerde, Aufbau von zwei Klimameßstationen und Untersuchungen zur Validierung des Lysimetersystems. Ph.D. Thesis Univ. Bonn. In: Ber. Forschungszentrum Jülich, Jül-2812, 1-223.
- Röder, R.; Weiß, K.; Sengel, M.;** (2007): Arzneimittel in der Umwelt, Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, 58, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München, 2007.
- Sacher, F.; Lang, FT.; Brauch, HJ.; Blankenhorn, I.** (2001): Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurtemberg, Germany, *Journal of Chromatography A*, 938, 1-2, 199-210; 14.12.2001.
- Scheffer, F.; Schachtschabel, P.** (2002): Lehrbuch der Bodenkunde. Spektrum Akademischer Verlag, 15. A. 09.07.2002
- Schmidt, B.; Ebert, J.; Lamshöft, M.; Thiede, B.; Schumacher-Buffel, R.; Ji, R.; Corvini, P. F.-X.; Schäffer, A.** (2008): Fate in soil of ¹⁴C-sulfadiazine residues contained in manure of young pigs which were treated with the veterinary antibiotic. *Journal of environmental science and health B*, 43, 1–13, 2008.
- Schnoor, J.; Licht, L.; McCutcheon, S.; Wolfe, N.; Carreira, L.** (1995): Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environment Science and Technology*; 29:318A–323A.

- Schroeder und Blum M.** (1992): Bodenkunde in Stichworten; 5. Aufl. Hirt, Berlin 1-175.
- Sigg, L.; Stumm, W.** (1994): Aquatische Chemie, Teubner, Stuttgart.
- Stahr, K.; Kandeler, E.; Herrmann, L.; Streck, T.** (2008): Bodenkunde und Standortlehre - Grundwissen Bachelor; Verlag Eugen Ulmer; Stuttgart.
- Steffens W.; Mittelsteadt, W.; Stork, A.; Führ, F.** (1992): The lysimeter station at the Institute of Radioagronomy of the Research Centre Juelich, Germany. Br. Crop Prot. "Lysimeter Studies of Pesticides in the Soil", Counc. Monogr. 5321-34.
- Stolz, W.** (2003): Radioaktivität; Grundlagen – Messung – Anwendung, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage; B.G. Teubner.
- Stoob, K.; Singer, HP.; Goetz, CW.; Ruff, M.; Mueller, SR.** (2005) Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry - Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters; Journal of Chromatography A, 1097, 1-2, 138-147 02.12.2005. Stoob, 2009).
- Stoob, K.; Singer, H. P.; Stettler, S.; Hartmann, N.; Mueller, S. R.; Stamm, C. H.** (2006): Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. Journal of Chromatography A 2006, 1128, 1–9.
- Sukul, M.; Zühlke, P.; Spiteller, M.** (2007): Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 1733–1745, 2007.
- Sukul, P.; Spiteller, M.** (2006): Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. Reviews of environmental contamination and toxicology, 187, 67-101, 2006.
- Sukul, P.; Lamshoft, M.; Zuehlke, S.; Spiteller, M.** (2008): Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. Chemosphere, 73, 8, 1344-1350, 11.2008.
- Sukul, P.; Lamshoft, M.; Zuhlke, S.; Spiteller, M.** (2008): Photolysis of C-14-sulfadiazine in water and manure. Chemosphere, 71, 4, 717-725, 03.2008.
- Thiele-Bruhn, S.; Seibicke, T.; Schulten, H.-R.; Leinweber, P.** (2004): Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. Journal of Environmental Quality. 2004, 33, 1331–1342.
- Trapp, S.** (2004): Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. Environmental Science and Pollution Research, 11:33–39.
- Unold, M.; Simunek, J.; Kasteel, R.; Groeneweg, J.; Vereecken, H.** (2009): Transport of Manure-Based Applied Sulfadiazine and Its Main Transformation Products in Soil Columns. Vadose Zone Journal, 8, 3, 677-689, 2009.
- Wang, Q.; Guo, M.; Yates, S. R.** (2006): Degradation kinetics of manure derived sulfadimethoxine in amended soil. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54, 157–163.
- Wehrhan, A.** (2006): Fate of veterinary pharmaceuticals in Soil: An experimental and numerical study on the mobility, sorption and transformation of sulfadiazine. Verlag FZJ Jülich Zentralbibliothek, Band 66.
- Wolters, A.; Steffens, M.** (2005): Photodegradation of Antibiotics on Soil Surfaces: Laboratory Studies of Sulfadiazine in an Ozone-Controlled Environment. Environmental Science and Technology 39, 6071-6078.

6 Anhang A

Tab. 22: Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter A1 (Kal) bis in die Tiefe von 30 cm an dem Probenentnahmetag 29, 120, 218, 1022.

Zeit	Tiefe [cm]	A_{eq} SDZ [mmol]			Summe
		NER- Fraktion	Aceto.+H ₂ O- Extraktion	Schüttelextraktion (CaCl ₂ + Me-OH- Extraktion)	
Tag 29	0-5	0,22	0,15	0,10	0,47
	5-10	0,03	0,04	0,02	0,08
Tag 120	0-5	0,10	0,08	0,03	0,21
	5-10	0,08	0,08	0,03	0,19
	10-20	0,06	0,06	0,02	0,13
	20-30	0,01	0,01	0,00	0,02
Tag 218	0-5	0,11	0,07	0,01	0,19
	5-10	0,11	0,10	0,02	0,22
	10-20	0,12	0,12	0,03	0,27
	20-30	0,02	0,02	0,01	0,04
Tag 1022	0-5	0,08	0,03	0,01	0,12
	5-10	0,10	0,04	0,01	0,15
	10-20	0,13	0,07	0,01	0,22
	20-30	0,02	0,01	0,00	0,04

Tab. 23: Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] der sequentiellen Extraktion aus den Bodenproben von Lysimeter B1 (Mer) bis in die Tiefe von 30 cm an dem Probenentnahmetag 29, 120, 218, 1022.

Zeit	Tiefe [cm]	A_{eq} SDZ [mmol]			Summe
		NER-Fraktion	Aceto.+H ₂ O-Extraktion	Schüttelextraktion (CaCl ₂ + Me-OH-Extraktion)	
Tag 29	0-5	0,39	0,02	0,09	0,50
	5-10	0,03	0,25	0,01	0,29
Tag 120	0-5	0,20	0,13	0,02	0,35
	5-10	0,09	0,08	0,02	0,19
	10-20	0,04	0,03	0,02	0,09
	20-30	0,01	0,01	0,00	0,01
Tag 218	0-5	0,23	0,11	0,02	0,37
	5-10	0,09	0,06	0,01	0,17
	10-20	0,06	0,03	0,01	0,10
	20-30	0,01	0,01	0,00	0,02
Tag 1022	0-5	0,10	0,01	0,01	0,12
	5-10	0,06	0,03	0,01	0,10
	10-20	0,03	0,01	0,00	0,04
	20-30	0,01	0,00	0,00	0,01

Tab. 24: Summen der Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] aus den Bodenproben (TM) von Lysimeter A2 (Kal) und B2 (Mer) bis in zu einer Tiefe von 100 cm sowie Äquivalentmenge (A_{eq}) von SDZ [mmol] kumulativ über drei Jahren gesammeltem Perkolat der Lysimeter.

Tiefe [cm]	A_{eq} SDZ [mmol]	
	A2 Braunerde (Kal)	B2 Parabraunerde (Mer)
0-5	0,25	0,28
5-10	0,27	0,14
10-20	0,27	0,03
20-30	0,043	0,03
30-40	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$
40-50	$9,9 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-3}$
50-60	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$
60-70	$6,7 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
70-80	$4,4 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-3}$
80-90	$2,7 \cdot 10^{-3}$	
90-100		$1,5 \cdot 10^{-3}$
Perkolat	$9,7 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-3}$

Geräte:		
Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Tischzentrifuge	Hettich Mikro-Rapid	
Großzentrifuge	Allegra 6KR	Beckmann-Coulter, Krefeld
Hochleistungszentrifuge	J2-21 High Speed	Beckmann-Coulter, Krefeld
Überkopfschüttler:	Rotoshake RS12	Gerhardt GmbH & Co. KG, Hamburg
Analysewaage	Satorius L 420 S	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Präzisionswaage	Mettler Toledo PE 24	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Präzisionswaage 2	Mettler Toledo G5002-2	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Großwaage	Mettler Toledo ID1-KE 3000	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Trockenwaage:	Mettler Toledo HB43-S Halogen	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Planetenmühle:	Retsch PM4	Retsch GmbH & Co KG, Haan
Pipetten:	Finnpipette 5-50ul Finnpipette 200-1000ul Finnpipette 2ml- 10ml	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Oxidizer	Robox 192	Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Verbrennungsgerät	OX 500	R.J. Harvey Instrument, Tappan, USA
LSC	Canberra-Packard Tri-carb 2500TR	PerkinElmer, Inc., Boston, USA
LC-MS/MS	Siehe Abschnitt 3	
pH-Meter	Mettler Toledo 1120X	Mettler Inst. AG Greifensee, Österreich
Bodenmixer	Collomix RSU	Gaimersheim
Mikrowellenofen	MLS-Elthos1600	MLS GmbH, Leutkirch
Vakuumpumpe	Vacumbrand	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SPE-Halterung	SPE-24G	J.T. Baker, Philipsburg, USA
SPE-Säule	Oasis HLB 6 cc	Waters , Milford, USA
Humax-Handbohrer	Max Hug	Humax, Luzern, Schweiz

Chemikalien:

Lösungsmittel	Acetonitril	Biosolve B.V. , Valkenswaard, Niederlande
	Methanol	Merk, Darmstadt
	Calciumchlorid	Merk, Darmstadt
Puffersubstanz	Ameisensäure	Merk, Darmstadt
	Ammoniumacetat	Merk, Darmstadt
Scintillator:	Ultima Gold	Perkin Elmer, Shelton, USA
	Insta-Gel-Plus	Perkin Elmer, Shelton, USA
	Oxysolve C-400	Zinsser Analytic, Frankfurt

SOP 07/06-07	Version: 01	Seite 1 von 1
---------------------	--------------------	---------------

Arbeitsexemplar unterliegt dem Änderungsdienst Informationsexemplar unterliegt nicht dem Änderungsdienst

STANDARDARBEITSAUWEISUNG SOP (Standard Operation Procedure)	
Serie:	Probenaufbereitung und Analytik
Unterserie:	Radioaktivitätsmessungen im Flüssigkeitsszintillationspektrometer („LSC“)
Titel:	Veraschung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung
Gültigkeitsdatum:	2 Wochen nach Genehmigungsdatum durch die Leitung der Prüfeinrichtung (siehe unten). Diese SOP ersetzt alle vorherigen Versionen.
Zielsatzung:	Hinweise zur sicheren und korrekten Handhabung
Bemerkung:	Neufassung
Verantwortlich für die Umsetzung:	Prüfleiter, Laborpersonal

	Name	Datum	Unterschrift
Verfasser	M. Krause U. Langen		
Qualitätssicherungseinheit (QSE)	Th. Muckenheim Dr. J. Groeneweg Dipl.-Ing. H. Prast		
Archivar	Dipl.-Ing. R. Harms Th. Schuster (Stellv.)		
Leitung der Prüfeinrichtung (LdP)	Prof. H. Vereecken (Institusleiter des ICG-4)		

SOP-Historie

Version:	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
gültig ab:										

SOP 07/06-07	Version: 01	Seite 2 von 2
---------------------	--------------------	---------------

Veraschung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	2
2	PROBENVORBEREITUNG	2
3	DURCHFÜHRUNG	3
3.1	Einschalten des Gerätes	3
3.2	Kontaminationsüberprüfung ("Memorycheck") und ¹⁴ C-Aktivität ("Recoverycheck")	4
3.3	Normalbetrieb	4
3.4	Verlassen des Gerätes	5
4	ABSINKENDE WIEDERFINDUNGSRATE/ HOHE RESTAKTIVITÄT	5
4.1	Wiederfindungsrate	5
4.2	Restaktivität im Gerät	5
5	VORGEHEN BEI STÖRUNGEN	5
6	MITGELTENDE UNTERLAGEN	6

Abkürzungen

- LSC Liquid-Scintillation-Counter
- Bq Becquerel
- DPM Zertfälle pro Minute (Decay Per Minute)
- IPA Instrument Performance Assay (Geräteleistungsprüfung)

1 Einleitung

Diese SOP beschreibt die Veraschung von Proben zur ¹⁴C-Bestimmung im Flüssigkeitsszintillationspektrometer und ist speziell auf den Robox-192 (Zinsser) ausgerichtet. Gleichzeitig werden einige praktische Hinweise zur Bedienung dieses Gerätes gegeben.

2 Probenvorbereitung

Um die Veraschung vorzubereiten, werden die homogenisierten Probenmaterialien in Porzellantaschfchen eingewogen.

Versachung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung

3 Durchführung

Im Folgenden werden die wichtigsten Arbeitsschritte erläutert. Für Details siehe **SOP 05/12-02** bzw. die Bedienungsanleitung des Gerätes.

3.1 Einschalten des Gerätes

- (1) POWER ON am USY-Gerät einschalten;
- (2) roten Drehschalter (ECP 1) an der Frontseite auf ON drehen;
- (3) grünen Startknopf drücken. Die Running-Lampe leuchtet.
- (4) Versorgungsgase:
 - a) Druckluft überprüfen 5 bar
 - b) Stickstoff 0,5 bar 350 ml/Minute
 - c) Sauerstoff 0,5 bar 350 ml/Minute
- (5) PC einschalten;
- (6) das Robox-Trieblbild mit einer beliebigen Taste bestätigen;
- (7) nach Betätigung einer beliebigen Taste wird das Passwort abgefragt;
- (8) das Versachungsgerät schaltet sich automatisch ein;
- (9) ein leeres Tritiumvial an das Versachungsgerät anschrauben (ggf. vorher die Vialdichtung am Tritiumadapter überprüfen);
- (10) manuelle Ventile am Versachungsgerät auf Cocktail drehen und ca. 20 ml Oxisolve C400 in ein Becherglas am ¹⁴C-Lift durch Betätigung der schwarzen Taste dosieren. (Ggf. Cocktail-Vorratsflasche auffüllen oder austauschen) Ein Löffel der Löffelstation muss sich hierfür im Verbrennungsrohr befinden.
- (11) Drucker überprüfen;
- (12) mit „Clear Sample Data“ alte Probandaten löschen (ggf. vorher über Auswahlmenü vorherige Probandaten ausdrucken);
- (13) "Enter Sample Data" ermöglicht das Eingeben von neuen Usernamen und Probandaten;

Versachung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung

- (14) Porzellanschiffchen entsprechend der „Sample-Data-Liste“ platzieren;
- (15) zugehörige Vials (gut verschlossen mit Deckeln) in die Counterracks stellen;
- (16) "Start Process" auswählen und Startposition eingeben;
- (17) überprüfen, dass der Roboter sich in einer geeigneten Kalibrieposition befindet;
- (18) es werden anschließend Roboter-, Ladle- und Roboxstatuschecks abgefragt und durchgeführt;
- (19) evtl. warten bis Verbrennungstemperatur erreicht ist
- (20) danach startet der Roboter mit dem Transport von Vials und Porzellanschiffchen.

3.2 Kontaminationsüberprüfung ("Memorycheck") und ¹⁴C-Aktivität ("Recoverycheck")

Zweck dieser Überprüfung ist es, Leckagen des Gerätes zu erkennen, die eine Reduktion der ¹⁴C-Wiederfindung verursachen.

Zu Beginn einer Verbrennungsserie wird immer mit Memory (Background)-, Recovery-, Memory-Proben gestartet (3 Mem – 6 Rec – 3 Mem).

Am Ende eines jeden Verbrenungsablaufes werden Memory-, Recovery-, Standard-Proben verbrannt (3 Mem – 6 Rec – 6 Std.). Bei mehr als 144 Proben wird empfohlen nach der Hälfte der Proben ebenfalls Memory-, Recovery-, Memory-Proben zu verbrennen (3 Mem - 6 Rec - 3 Mem).

Memory-Probe ist ein höchstens 200mg schweres Zellulosestuch-Röllchen.

Recovery-Probe ist ein höchstens 200mg schweres Zellulosestuch Röllchen und 20µL Robox-Standard (¹⁴C-Standard mit ca. 600 Bq / 20 µL).

Standard-Probe ist ein höchstens 200mg schweres Zellulosestuch-Röllchen. Nach dem Versachen werden 20 µL ¹⁴C-Versachungsstandard mit einer geeigneten, kalibrierten Pipette in das mit Oxisolve gefüllte Vial gegeben. Zur Herstellung der "Standard"- und "Recovery"-Proben muss die Menge an ¹⁴C-Versachungsstandard identisch sein.

3.3 Normalbetrieb

Die Vorgänge während der Verbrennung laufen automatisch ab.

Weitergehende Informationen: **SOP 05/12-02**

SOP 07/06-07	Version: 01	Seite 5 von 5
---------------------	--------------------	---------------

Veraschung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung

3.4 Verlassen des Gerätes

Nach dem Beenden einer Veraschungsserie ist das Gerät so zu verlassen, dass ein nachfolgender Benutzer das Gerät voll funktionsfähig und sauber vorfindet. Verbrennungsgerät abschalten (automatisch oder über Robox-Menü) und abkühlen lassen.

Gase abschalten: Nur an dem Hahn vor dem Reduzierventil, die Einstellungen der Reduzierventile werden nicht verändert.

4 Absinkende Wiederfindungsrate/ hohe Restaktivität

4.1 Wiederfindungsrate

Jeder Löffel wird mit 2 Recovery-Probe überprüft. Die 6 Recovery-Proben werden mit kurzer Meßzeit im LSC gemessen. Liegt die Wiederfindungsrate unterhalb von 90 %, oder weicht sie stark (≈ 10 %) vom vorhergehenden Wert ab, werden sechs neue Recovery-Proben verbrannt, um zu prüfen, ob es sich um einen Pipettierfehler bei der Herstellung der Proben handelt oder ob das Gerät defekt ist.

Handelt es sich um einen Gerätefehler, wird entweder eine vorhandene Undichtigkeit beseitigt (Dichtungen, O-Ringe am Probenlöffel) oder der Katalysator ausgetauscht. Es werden alle Messergebnisse der Recovery-Proben mit den Rohdaten dokumentiert. Ob die sei der vorhergehenden Recovery-Bestimmung verbrannten Proben weiter ausgewertet werden oder erneut verbrannt werden müssen, wird im Einzelfall sorgfältig geprüft.

Handelt es sich um einen Pipettierfehler, wird der Recovery-Faktor nur aus den korrekten Recovery-Werten berechnet.

4.2 Restaktivität im Gerät

Bei zu erwartender ¹⁴C-Aktivität >100 Bq werden zwischen den verbrannten Laborproben (nicht Aliquote) 1 bis 5 Memory-Proben verbrannt. Die letzte Memory-Probe sollte nicht mehr als 0,4 Bq (~ 25 DPM, nach Abzug des IPA-Background) Restaktivität haben. Die Messergebnisse der Memory-Proben werden mit den Rohdaten dokumentiert. Sollten Memory-Proben nach einer Serie höhere Aktivität aufweisen, dann wird die nachfolgende Sequenz evtl. neu verbrannt.

5 Vorgehen bei Störungen

- durch Tastendruck am Terminal akustisches Signal quittieren;
- Fehler-/Störungsmeldung am Monitor beachten;

SOP 07/06-07	Version: 01	Seite 6 von 6
---------------------	--------------------	---------------

Veraschung von Festproben mit dem Robox 192 zur ¹⁴C-Messung

- Fehler-/ Störung laut Anweisung auf dem Monitor beheben;
- durch Tastendruck am Terminal Roboterarbeit fortsetzen lassen;
- wenn der Fehler nicht behoben werden kann, ist der Geräteverantwortliche zu informieren;
- bei Systemabschaltung nach Fehlermeldung sind jegliche Eigenversuche zum Neustart zu unterlassen. Der Geräteverantwortliche ist umgehend zu informieren.

6 Mitgelende Unterlagen

- SOP 05/12-02 Veraschungsgerät (Robox 192)
- Bedienungsanleitung des Veraschungsgerätes

- GLP -	SOP 06/01-09	Version: 03	Seite 1 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Probenahme Boden

Arbeitsexemplar unterliegt dem Änderungsdienst	Informationsexemplar unterliegt nicht dem Änderungsdienst
---	--

STANDARDARBEITSAUSWEISUNG
SOP
 (Standard Operation Procedure)

Serie:	Prüfsysteme
Unterserie:	Lysimeter
Titel:	Probenahme Boden
Gültigkeitsdatum:	2 Wochen nach Genehmigungsdatum durch die Leitung der Prüfeinrichtung (siehe unten). Diese SOP ersetzt alle vorherigen Versionen.
Zielsetzung:	Vorgehensweise bei der Bodenprobenahme
Bemerkung:	Neue Institutbezeichnung und Anpassung an die OECD-Grundsätze vom November 1997, Korrektur der Versions-Nr. und SOP-Historie.
Verantwortlich für die Umsetzung:	Prüfleiter, Laborpersonal

Verteiler ⁽¹⁾	Name	Datum	Unterschrift
Verfasser	Dipl.-Ing. W. Mittelstaedt		
Qualitätssicherung (QSE)	Th. Muckenheim Dr. J. Groeneweg Dipl.-Ing. H. Prast		
Archiv	Dipl.-Ing. R. Niehaus Dipl.-Ing R. Harms (Stellv.)		
Leiter der Prüfeinrichtung	Prof. H. Vereecken (Institutleiter)		

⁽¹⁾ = PL, GLP-Laboratorien

SOP-Historie

Version	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
gültig ab	Vorbereitung, nicht archiviert	26/08/94								

- GLP -	SOP 06/01-09	Version: 03	Seite 2 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Probenahme Boden

1. Allgemeines:

Art und Zeitpunkt der Probenahmen richten sich nach den jeweiligen Versuchsfragen und werden im Prüfplan festgeschrieben. Den genauen Entnahmepunkt setzt der Prüfleiter unter Berücksichtigung der Witterungsverhältnisse und der Feuchte des Bodens fest. Bei der Entnahme von Boden aus dem Lysimeter sind Maßnahmen, die den Strahlenschutz betreffen vorher mit dem Strahlenschutzbeauftragten (B-SSB) des IRA zu besprechen.

2. Bodenentnahme

Die Entnahme des Bodens kann auf 2 Arten erfolgen:

2.1 Zufallsverteilte Bohrkernproben

Für diese Art der Beprobung stehen zwei Geräte zur Auswahl:
 Humax-Motorbohrer (SOP 05/03-01)
 Humax-Handbohrer (SOP 05/03-02)

2.1.1 Beprobung bis 30 cm

Bei Bodenuntersuchungen, die während einer laufenden Studie anfallen, sind in der Regel Bohrungen bis zu einer Tiefe von 30 cm durchzuführen. Die genaue Vorgehensweise ebenso wie der Durchmesser des Bohrkernes ist im Prüfplan festgelegt. Vor der Probenahme wird der Bohrstock auf Kontamination überprüft. Die Kernpackhülsen werden mit der Studiennummer, Lysimeternummer, Bohrkern Nr. und dem Datum und Namenskürzel unverwischbar gekennzeichnet. Mit dem geeigneten Humax-Bohrer werden je Lysimeter so viele Bodenkerne gewonnen, wie im Prüfplan angegeben sind, wobei das Einstechen zufallsverteilt erfolgt. Der Prüfleiter hat den Zeitpunkt der Probenahme so zu wählen, daß eine gute Füllung der Kernpackhülse gewährleistet ist. Ein Zusammenstauchen des Bohrkernes in der Hülse ist ebenso zu vermeiden, wie eine unvollständige Entnahme (SOP 06/01-12). Ein senkrechtes Einstechen des Bohrers ohne dabei zu drehen hat sich bewährt. Bei der Entnahme sollte der Bohrer vorsichtig im Uhrzeigersinn drehend senkrecht herausgezogen werden, sodaß der Anteil des außen am Bohrer anhaftenden Bodens auf ein Minimum reduziert wird. Dieser Bodennest wird vor der nächsten Entnahme vollständig entfernt. Die Koordinaten der Einstiche sind zu dokumentieren, ebenso falls eine Hülse nicht vollständig gefüllt ist oder ähnliche relevante Ereignisse.

- GLP -	SOP 06/01-09	Version: 03	Seite 3 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Probenahme Boden

Nach der Entnahme werden die Bohrlöcher mit inaktivem Boden derselben Art aufgefüllt und mit einem Stab verdichtet, um die natürliche Lagerungsdichte wiederherzustellen. Diese Stellen dürfen bei einer folgenden Beprobung nicht mehr beprobt werden.

Im Falle einer Bodenbearbeitung nach der Ernte (SOP 07/01-07) werden Löcher des Lysimeters über die gesamte Tiefe nicht verfüllt.

2.1.2.Beprobung des Lysimeters über die gesamte Tiefe

Bei der letzten Bodenprobenahme einer Lysimeterstudie (SOP 06/01-14) wird das Lysimeter in seiner gesamten Tiefe beprobt. Im Prüflplan wird festgelegt, welche Bodenschichten vollständig zu entnehmen sind (siehe I) und welche Bodenschichten mit einem Bohrer (in der Regel Humax-Motorbohrer) entnommen werden. Bei der Probenahme mit dem Humax-Motorbohrer richtet man sich nach den Vorschriften zur Probenahme mit dem Handbohrer. Die Bohrlöcher werden nicht mehr rückverfüllt.

2.1.3.Fraktionierung der Proben

Die mit Boden gefüllten Kernpackhülsen der Humax-Bohrer werden mit einem scharfen Messer in die gewünschten Segmente zerschnitten. Die Proben gleicher Probentiefe eines jeden Lysimeters werden vereint, gewogen ggf. gemischt und die Aliquote bzw. der Gesamtboden in vorher beschriftete, geeignete Gefäße zur Lagerung bei < -20°C, ±3°C bzw. 3°C ±1°C überführt. Näheres bestimmt der Prüfleiter.

2.2 Vollständige Entnahme einer Bodenschicht bei Versuchsende

Bei Versuchsende wird der Boden nach der Ernte der Frucht mit einem geeigneten Werkzeug (Spaten, Klappspaten, Schüttgutschaufeln) vorsichtig entnommen, wobei durch Messungen ständig die Einhaltung der angestrebten Tiefe kontrolliert wird. Näheres wird im Prüflplan festgelegt oder vom Prüfleiter bestimmt.

Die das Lysimeter umgebende Kontrollparzelle wird mit Folie und geeigneten Brettern oder Kunststoffplatten so abgedeckt, daß eine Kontamination ausgeschlossen ist. (Rucksprache mit dem B-SSB). Der Boden einer Schicht wird in geeignete Behälter überführt (z.B. Transportkisten aus PE in ausreichender Größe), deren Gewicht bekannt ist, und gewogen. Der Boden wird anschließend zunächst im Labor von Hand mit Spaten, Schaufel o.ä. geeignetem Gerät gemischt. Anschließend werden Aliquo-

- GLP -	SOP 06/01-09	Version: 03	Seite 4 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Probenahme Boden

te zur Bodenfeuchtebestimmung und weitere 20 Aliquote von je 500 g gleichmäßig verteilt entnommen, gepoolt und im Rhönradnischer (SOP 05/05-01, SOP 07/03-03) weiter homogenisiert. Daraus werden Aliquote für Analysen in eindeutig beschrifteten Gefäßen zurückbehalten, Menge und Anzahl sowie die anschließende Lagerung und weitere Behandlung bestimmt der Prüfleiter. Der Restboden wird in Absprache mit dem B-SSB entsorgt.

3. Dokumentation

Alle relevanten Daten sind im Laborjournal bzw. Rohdatenblatt (erstellt der Prüfleiter) zu dokumentieren (SOP 08/04-01 und 08/04-02)

- GLP -	SOP 06/01-01	Version: 02	Seite 1 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Arbeitsexemplar unterliegt dem Änderungsdienst
Informationsexemplar unterliegt nicht dem Änderungsdienst

STANDARDARBEITSAUFWEG
SOP
(Standard Operation Procedure)

Serie:	Prüfsysteme
Unterserie:	Lysimeter
Titel:	Beschreibung
Gültigkeitsdatum:	2 Wochen nach Genehmigungsdatum durch die Leitung der Prüfeinrichtung (siehe unten). Diese SOP ersetzt alle vorherigen Versionen.
Zielsezung:	Beschreibung des Lysimeters
Bemerkung:	Neue Institutsbezeichnung und Anpassung an die OECD-Grundsätze vom November 1997, Korrektur der Versions-Nr. und SOP-Historie.
Verantwortlich für die Umsetzung:	Prüfleiter, Labormaterialien

Verteiler ⁽¹⁾	Name	Datum	Unterschrift
Verfasser	Dr. Th. Pütz Th. Muckenheim		
Qualitätssicherung (QSE)	Th. Muckenheim Dr. J. Groeneweg Dipl.-Ing. H. Prast		
Archiv	Dipl.-Ing. R. Niehaus Dipl.-Ing R. Harms (Stellv.)		
Leiter der Prüfeinrichtung	Prof. H. Vereecken (Institutleiter)		

⁽¹⁾ = P_L, GLP-Laboratorien

SOP-Historie

Version	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
gültig ab	26.10.94									

- GLP -	SOP 06/01-01	Version: 02	Seite 2 von 4
---------	--------------	-------------	---------------

Lysimeter Beschreibung

1. Einleitung:

Um praxisnahe Versuche mit ¹⁴C-markierten Prüfsubstanzen unter Freilandbedingungen durchzuführen, sind Lysimeterversuche, also Versuche mit Agrarkosystemausschnitten, unabdinglich.

2. Hersteller:

Fa. Gebr. Wolff
Langerweher Straße 32
D-52224 Stolberg-Schevenhütte

3. Lysimeteranlage:

Die Lysimeteranlage befindet sich im Freigelände des Kontrollbereiches des ICG IV des Forschungszentrums Jülich (FZJ). Sie liegt in einer großen Waldlichtung des Stettericher Forstes (FZJ-Gelände), umgeben von aufgelockertem Mischwald und größeren, bebauten Freiflächen. Die Koordinaten der Station sind 6° 54' 35" E und 50° 54' 41" N. Die Stationshöhe beträgt 91 m über NN. Das langjährige Temperaturmittel beträgt + 9,5 °C, wobei das langjährige Temperaturmaximum im Juli bei + 17 °C und das langjährige Temperaturminimum im Januar bei + 3 °C beobachtet wurden. Das langjährige Mittel der relativen Luftfeuchte liegt bei 79 % und zeigt nur sehr geringe Monatsabweichungen. Der durchschnittliche jährliche Niederschlag, ermittelt über 28 Jahre, beträgt 695,4 mm. Die ergiebigsten Niederschläge fallen in den Monaten Mai-Juli (BERGS et al., 1986). In dem 2500 m² großen Freigelände befinden sich 50 Lysimeter (20 x 0,5 und 30 x 1,0 m²), verteilt auf 10 Versuchspunkte à 5 Lysimeter.

4. Lysimeteraufbau:

Für die Versuchsdurchführung stehen sowohl runde 1 m²-Lysimeter, als auch quadratische 0,5 bzw. 1,0 m²-Lysimeter befüllt mit Bodenmonolithen von ca. 110 cm Profiltiefe zur Verfügung. Eine komplette Lysimeterreinheit besteht hierbei aus drei Teilen:

- .. Lysimeterzylinder
- .. Schneide-/Tragegestell
- .. Lysimeterwanne

Der Lysimeterzylinder, das Schneide-/Tragegestell sowie die Lysimeterwanne bestehen aus 10 mm starkem V₂A-Stahl.

- GLP -	SOP 06/01-01	Version: 02	Seite 3 von 4
Lysimeter Beschreibung			

Mit Hilfe der Lysimeterzylinder werden Bodenmonolithe aus dem Boden gestochen. Ein Lysimeterzylinder besitzt ca. 20 mm unterhalb der Oberkante 4 Bohrungen mit ca. 30 mm \varnothing , die jeweils um 90° versetzt sind. Die Unterkante eines Lysimeterzylinders ist mittig spitz angeschliffen, um beim Füllen des Lysimeters den Boden in den Lysimeterzylinder zu pressen. Die Gestaltung des Schliffs führt dazu, daß beim Füllen eine Hälfte des der Wandstärke entsprechenden Bodens in das Lysimeter und die andere Hälfte nach außen gedrückt wird (STEFFENS, 1990). Dabei entsteht im Randbereich der Lysimeter eine maximal 2-3 cm breite Verdichtungszone (ZAKOSEK, 1989), die zum einen einer abwärtsgerichteten Wasserbewegung entlang der Lysimeterwand entgegenwirkt und zum anderen nur ca. 1 % des Gesamtvolumens eines Bodenmonolithen ausmacht.

Durch ein Schneide-/Tragegestell wird der Bodenmonolith eines in den Boden gerammten Lysimeterzylinders an dessen Sohle abgesichert, der Lysimeterzylinder verschlossen und somit als gefüllte Einheit transport- bzw. einsatzfähig. Bei quadratischen Lysimetern besteht das Schneide-/Tragegestell aus einer Grundplatte, die an drei Seiten mit einem ca. 100 mm hohen Kragen versehen ist. Die vierte Seite ist als Schneide ausgearbeitet, wobei die Schneide einseitig angeschliffen ist und das Schneidgut nach außen wegdrückt. An jeder Krangenseite sind zwei ca. 50-80 mm breite und 1100 mm lange V_2A -Streifen angebracht, die nach ca. 500 mm und an der Oberkante durch eine 50-80 mm breite Traverse miteinander verbunden sind. In die beiden gegenüberliegenden Traversen sind entsprechend zum Lysimeterzylinder Schlitzlöcher (30 x 60 mm) angeordnet. Desweiteren besitzen die Grundplatten je nach Baujahr des Schneide-/Tragegestells eine unterschiedliche Anzahl von Löchern gleichen Durchmessers.

Schneide-/Tragegestelle für runde Lysimeter sind ähnlich denen der für quadratische Lysimeter konzipiert. Lediglich der Kragen umschließt die gesamte Grundplatte und das Schneide-/Tragegestell besteht aus zwei gleichen Hälften, so daß die Schneiden der entsprechenden Grundplattenhälften zusammenstoßen. Die beiden Hälften werden durch je zwei Zapfen an den beiden vertikalen Stoßkanten zusammengehalten.

Eine Lysimeterwanne ist notwendig, um einen Lysimeterzylinder im Boden zu platzieren, eventuell anfallendes Sickerwasser aufzufangen und somit einen Eintrag möglicher radioaktiver Lösungen in das Erdreich zu vermeiden. Die Lysimeterwannen sind je nach Form des Lysimeterzylinders rund oder quadratisch ausgeführt. Sie stehen auf einem Betonsockel und sind vollständig im Boden eingelassen. Die Sohlen der Lysimeterwannen sind angeschrägt (tieftster Punkt 1400 mm, gegenüberliegender Punkt 1300 mm), so daß sich das Sickerwasser im tiefsten Bereich sammelt. Bei den quadratischen Lysimeterwannen ist in der Mitte der tieferliegenden Kante nochmals ein 25 mm tiefe Aussparung (\varnothing 50 mm), die somit den tiefsten Punkt bildet. Ausgerichtet auf den tiefsten Punkt einer Lysimeterwanne ist von der Oberkante ein 1300 mm langes Rohr an der Wand angeschweißt durch das ein Schlauch oder Rohr eingeführt werden kann, um Sickerwasser abzusaugen (SOP 06 / 01 - 11). Um einen Lysimeterzylinder inklusive Schneide-/Tragegestell in einer Lysimeterwanne zu platzieren, sind 1200 mm von der Oberkante Edelstahlwinkel angebracht, so daß die Oberkanten der Lysimeterwanne, des Lysimeterzylinders und des Schneide-/Tragegestells bündig abschliessen. Der verbleibende Raum zwischen Lysimeterzylinder, Schneide-/Tragegestell und Lysimeterwanne muß mit einem geeigneten Hilfsmittel abgedeckt bzw. abgedichtet werden.

- GLP -	SOP 06/01-01	Version: 02	Seite 4 von 4
Lysimeter Beschreibung			

5. Wartung:

Vor dem Absenken eines Lysimeterzylinders inklusive Schneide-/Tragegestells in eine Lysimeterwanne ist diese gründlich zu reinigen. Darüber hinaus ist ein Dichtigkeittest der Lysimeterwanne vor Beginn eines Lysimeterversuches in Absprache mit dem ASS durchzuführen.

6. Literatur:

- BERGS, W., H. GEIL & G. POLSTER (1986): Klimawerte der meteorologischen Station der Kernforschungsanlage Jülich 1961-1985. Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Jül-Spez-351.
- STEFFENS, W. (1990): Lysimeter studies on long-term fate of pesticides: The experimental design. 7th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, August 5-10, 1990, Poster 07B-34, Book of Abstracts Vol. III, p. 78.
- ZAKOSEK, H. (1989): Persönliche Mitteilung.

- GLP -	SOP 05/03-02	Version: 02	Seite 1 von 3
---------	--------------	--------------------	---------------

Humax- Handbohrer

 **Arbeitsexemplar**
unterliegt dem Änderungsdienst  **Informationsexemplar**
unterliegt nicht dem Änderungsdienst

STANDARDARBEITSAUSWEISUNG SOP (Standard Operation Procedure)	
Serie:	Handhabung von Geräten
Unterserie:	Bohrer
Titel:	Humax- Handbohrer
Gültigkeitsdatum:	2 Wochen nach Genehmigungsdatum durch die Leitung der Prüfeinrichtung (siehe unten). Diese SOP ersetzt alle vorherigen Versionen
Zielsetzung:	Diese SOP regelt die Handhabung und Pflege des Gerätes
Bemerkung:	Neue Institutssbezeichnung und Anpassung an die OECD-Grundsätze von November 1997
Verantwortlich für die Umsetzung:	Prüfleiter, Laborpersonal

Verteiler⁽¹⁾	Name	Datum	Unterschrift
Verfasser	Dr. Th. Pütz		
Qualitätssicherung (QSE)	Th. Muckenheim Dr. J. Groeneweg Dipl.-Ing. H. Prast		
Archiv	Dipl.-Ing. R. Niehaus Dipl.-Ing. R. Harms (Stellv.)		
Leiter der Prüfeinrichtung	Prof. H. Vereecken (Institusleiter)		

(1) = PL, GLP-Laboratorien

SOP-Historie										
Version	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
gültig ab	26.10.94									

- GLP -	SOP 05/03-02	Version: 02	Seite 2 von 3
---------	--------------	--------------------	---------------

Humax- Handbohrer

1. Gerätebezeichnung:
Gerät:

Raum	Geräte-Nr.	Serien-Nr.	KFA-Inventar-Nr.	Inbetriebnahme
im Schrank für	-	-	274691	-
Bodenprobenahmegeräte	-	-	294667	-

2. Hersteller:

Fa. Humax
Max Hug
Postfach 47
CH-6000 Luzern-11

3. Bedienungsanleitung:

Es existiert keine Bedienungsanleitung zu den Humax-Handbohrsonden.

4. Gerätebeschreibung:

Die Humax-Handbohrsonden bestehen aus einer stählernen Bohrsonde und einem auf die Bohrsonde aufschraubbaren, stählernen Schlagkopf mit Griffen. Die Bohrsonde selbst besitzt am Sondenkopf einen Schneidring. In der Bohrsonde befindet sich eine Vorrichtung zur Aufnahme von PVC-Hülsen.

5. Bedienung:

Zur Probenahme werden die entsprechenden, beschriebenen PVC-Hülsen in die Bohrsonde mit der Öffnung nach unten eingeschoben. Hierbei ist auf einen spannungsfreien Sitz der PVC-Hülse zu achten. Anschließend wird der Schlagkopf aufgeschraubt. Die komplette Bohrsonde wird auf die Probenahmestelle gesetzt und durch Körperdruck so tief wie möglich in den Boden eingepreßt. Um die gewünschte Entnahmetiefe zu erreichen (0-30 und/oder 30-60 cm), wird die Humax-Handbohrsonde mittels eines Kunststoffhammers entsprechend weiter in den Boden getrieben. Anschließend wird die im Boden eingetriebene Humax-Handbohrsonde mehrfach in eine Richtung gedreht, damit der Kontakt zwischen Probe und Boden unterbrochen wird. Danach wird die Humax-Handbohrsonde unter weiteren drehenden Bewegungen vorsichtig aus dem Boden gezogen. Es ist besonders darauf zu achten, daß keine Bodenpartikel von den oberen Randbereichen losgebrochen werden und in das Bohrtloch fallen. Nun wird die gefüllte

- GLP -	SOP 05/03-02	Version: 02	Seite 3 von 3
---------	--------------	-------------	---------------

PVC-Hülse entnommen, mit dem entsprechenden Deckel verschlossen, eine neue PVC-Hülse kann eingesetzt und die nächste Bohrung durchgeführt werden.

6. Wartung:

Vor der Probenahme sollte auf jeden Fall der Schneidring an der Bohrsonde auf einwandfreien Schliff überprüft werden. Aufgetragener Korrosionsschutz kann durch mehrfaches Beprobieren eines Bodens in einer Kontrollfläche entfernt werden. Das Gewinde sollte leicht gefettet werden.

Nach der Probenahme muß die Bohrsonde sowie der Schlagkopf mit einer Messing-Drahtbürste und einem trockenen Tuch gründlich gereinigt werden. Hier ist besonders auf die Reinigung des Überganges in der Bohrsonde zwischen Schneidring und SONDENSCHAFT zu achten. Stahlteile müssen mit einem Korrosionsschutz (z.B. Caramba) eingesprüht werden

Eventuelle Störungen und Wartungsarbeiten werden im Gerätebuch notiert. Es sind der/die Geräteverantwortliche und der Prüfliter zu benachrichtigen, die die Beseitigung der Störung veranlassen.

7. Dokumentation

Bei jedem Gerät liegt ein Gerätekontrollbuch, in dem folgende Eintragungen vorzunehmen sind (SOP 08/04-04):

- Datum
- Benutzer
- Ergebnis der Kontrolle der Funktionsfähigkeit
- Bemerkungen
- Unterschrift

7. Archivierung

Bei Aussonderung des Gerätes bzw das vollständig beschriebene Geräte-Kontrollbuch wird im Archiv gelagert (SOP 08/04-04).