

Institut für Bodenökologie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Bedeutung der Leistung mikrobieller Lebensgemeinschaften
beim Umsatz und Abbau von Isoproturon in Böden und
Möglichkeiten zur Steuerung des in-situ-Pestizidabbaus**

Sabine Steffanie Kühn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. C. Munch
2. Univ.-Prof. Dr. W. Huber

Die Dissertation wurde am 17.11.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.2.2004 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit angefertigt. Am Zustandekommen dieser Arbeit hatten viele Menschen Anteil, bei denen ich mich ganz herzlich für die große Unterstützung bedanken möchte:

Bei Herrn Prof. Dr. J.C. Munch möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die kritische Durchsicht des Manuskripts und für seine Unterstützung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Huber danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. W. Oßwald für den Vorsitz in der Promotionsprüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Schroll für die umfassende Betreuung dieser Arbeit, die große Diskussionsbereitschaft und die unerschöpflichen Anregungen zum wissenschaftlichen Fortgang dieser Arbeit.

Bei der Einarbeitung in die Rückstands-Analytik und die Vorbereitung der Lysimeterversuche war mir Frau Dr. U. Dörfler eine große Hilfe. Bei Herrn Dr. B. Ruth bedanke ich mich für die Unterstützung beim Einsatz und der Betreuung der von ihm entwickelten Messsensoren während der Lysimeterversuche. Vielen Dank an Herrn Dr. M. Schmid für die Unterstützung bei der Bearbeitung der mikrobiologischen und molekularbiologischen Fragestellungen. Herrn J. Ruoff danke ich für die Hilfestellung bei der Aufnahme der pF-Wg-Kurven und die Diskussionsbereitschaft bei auftretenden bodenkundlichen Fragen. Frau C. Loos danke ich für die Bereitschaft zum Korrekturlesen und die freundschaftlichen Aufmunterungen während der Zeit des Schreibens dieser Arbeit. Für die tatkräftige und unermüdete Hilfe im Laboralltag und bei der Bearbeitung der Lysimeterversuche bedanke ich mich bei J. Arthofer, M. Schramm, K. Zott, C. Birke sowie allen beteiligten Auszubildenden und Zivildienstleistenden, ohne deren Hilfe die Probenflut kaum zu bewältigen gewesen wäre. Bei Herrn Dr. A. Embacher bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Für die hervorragende und freundschaftliche Zusammenarbeit, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die übermittelte Freude an der wissenschaftlichen Arbeit danke ich allen Mitarbeitern der AG Schroll ganz herzlich. Letztlich möchte ich allen übrigen Mitarbeitern des IBOe für die nette Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung des Laboralltags danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, da ihre Unterstützung und Aufmunterung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pestizide in der Umwelt	1
1.2	Verhalten von Pestiziden in Böden	2
1.3	Verhalten des Herbizids Isoproturon in der Umwelt	4
1.4	Ziele der Arbeit	6
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Verwendete Böden	10
2.2	Verwendetes Pflanzenschutzmittel und Referenzsubstanzen	13
2.3	Laborversuche zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden	15
2.3.1	Beschreibung des Laborsystems	15
2.3.2	Versuchsvorbereitung und Applikation des Wirkstoffs	18
2.3.3	Zugabe eines Bodenzusatzes (Weizenstroh)	19
2.3.4	Bestimmung der $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe und volatiler ^{14}C -Substanzen	19
2.4	Lysimeterstudien zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon im Boden- Pflanzensystem	20
2.4.1	Beschreibung des Lysimetersystems	20
2.4.2	Versuchsvorbereitung und Applikation des Wirkstoffs	24
2.4.3	Bestimmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe und volatiler ^{14}C -Substanzen	27
2.4.4	Entnahme und Analyse von Boden- und Pflanzenproben	28
2.5	Aufbereitung von Bodenproben	30
2.5.1	Bestimmung des Bodenwassergehalts	30
2.5.2	Bestimmung der Methanol-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände	30

Inhaltsverzeichnis	II
2.5.3 Festphasenextraktion zur Aufreinigung der Bodenextrakte	31
2.5.4 HPLC-Analyse der Bodenextrakte	32
2.5.5 Bestimmung der nicht-extrahierbaren bzw. der ¹⁴ C-Gesamtrückstände	33
2.6 Versuche zur Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon durch bodenbürtige Mikroorganismengemeinschaften in Flüssigkulturen	34
2.6.1 Verwendete Nährmedien, Standards und Pufferlösungen	34
2.6.1.1 Mineralsalz-IPU-Medium (MS-IPU-Medium)	35
2.6.1.2 ¹⁴ C-Arelon-Standard für Flüssigmedien	35
2.6.1.3 Arelon-Standard für Agarplatten	36
2.6.1.4 PBS-Puffer	36
2.6.1.5 PBS-Glycerin-Lösung	36
2.6.2 Mineralisierung von ¹⁴ C-Isoproturon in Flüssigkulturen	36
2.6.3 Bestimmung der ¹⁴ C-Aktivität der Flüssigkulturen bzw. der zellfreien Filtrate	37
2.6.4 Bestimmung der Lebendzellzahl von Mikroorganismen	38
2.6.5 Isolierung von Isoproturon-abbauenden Mikroorganismen	38
2.7 Transfer mikrobieller Gemeinschaften zur Steigerung des Isoproturon Abbaus in Böden	38
2.7.1 Transfer der Mikroorganismen mittels Boden (= Modifikation „S“)	39
2.7.2 Transfer der Mikroorganismen mittels Flüssigkultur (= Modifikation „EC“)	39
2.7.3 Transfer der Mikroorganismen als Biofilm (= Modifikation “BF”)	40
2.8 Selektive Porenwassergewinnung zur Bestimmung der in-situ-Verfügbarkeit von Isoproturon	40
2.9 Modellversuche zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus ¹⁴C-markierten Substanzen	43
2.9.1 Eingesetzte Nährmedien und ¹⁴ C-Standardlösungen	44
2.9.1.1 Plate Count-Medium (PC-Medium)	44
2.9.1.2 ¹⁴ C-Glucose-Standard für Flüssigkulturen	44

2.9.2	Anzucht von ^{14}C -markierter mikrobieller Biomasse und Bestimmung der daraus nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände	44
2.9.2.1	^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Glucose	45
2.9.2.2	^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Isoproturon	46
2.9.3	Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände in sterilen Böden	47
2.10	Identifikation von Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaften	47
2.10.1	Extraktion und Aufreinigung der bakteriellen DNA	48
2.10.2	Qualitative Analyse der DNA durch horizontale Agarosegelelektrophorese	49
2.10.3	Quantitative, photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	49
2.10.4	Amplifikation der 16S-rRNA codierenden Gene mittels PCR	50
2.10.5	Vereinzelung der erhaltenen Genfragmente durch Klonierung	52
2.10.6	Isolierung der Plasmide und Überprüfung der Transformationseffizienz	53
2.10.7	Amplifikation und RFLP-Analyse der Plasmid-Inserts	53
2.10.8	Sequenzierung der 16S-rDNA Fragmente	54
2.10.9	Auswertung der Sequenzdaten	55
2.10.10	Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume	55
2.11	Nachweis von Bakteriengruppen mittels Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung	56
2.11.1	Verwendete Pufferlösungen	56
2.11.1.1	Tris/HCl-Puffer	56
2.11.1.2	EDTA-Lösung	56
2.11.1.3	SDS-Lösung	57
2.11.1.4	NaCl	57
2.11.1.5	Hybridisierungspuffer	57
2.11.1.6	Waschpuffer zur Hybridisierung	58
2.11.2	Fixierung von Bakterien mit Paraformaldehyd	58
2.11.3	Verwendete Oligonukleotidsonden	59
2.11.4	Hybridisierung von Zellen auf Blätton	60

Inhaltsverzeichnis	IV
2.11.5 Mikroskopische Auswertung	60
2.12 Statistische Auswertung	61
3 ERGEBNISSE	62
3.1 Verhalten von ¹⁴C-Isoproturon in vier landwirtschaftlichen Böden unter kontrollierten Bedingungen (Laborversuche)	62
3.1.1 Einfluss des Wassergehalts auf die Mineralisierung	62
3.1.2 Zusammenhang zwischen Mineralisierung und wassergefülltem Porenraum der Böden	66
3.1.3 Bodenatmung bei der Mineralisierung	67
3.1.4 Zusammenhang zwischen Mineralisierung und Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer ¹⁴ C-Rückstände	70
3.1.5 Zusammensetzung der Methanol-extrahierbaren ¹⁴ C-Rückstände	72
3.1.6 Massenbilanzen	76
3.2 Verhalten von ¹⁴C-Isoproturon im Boden-Pflanzen-System unter Freilandbedingungen (1. Lysimeterversuch im Jahr 2001)	78
3.2.1 Verhalten von ¹⁴ C-Isoproturon in Böden	78
3.2.1.1 Mineralisierung in Böden	78
3.2.1.2 Freisetzung volatiler ¹⁴ C-markierter Substanzen aus Böden	79
3.2.1.3 Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer ¹⁴ C-Rückstände in Böden	80
3.2.1.4 Zusammensetzung der Methanol-extrahierbaren ¹⁴ C-Rückstände	82
3.2.1.5 Einfluss von Bodentemperatur und -feuchtigkeit auf das Verhalten von ¹⁴ C-Isoproturon	84
3.2.1.5.1 Einfluss auf die Mineralisierung	84
3.2.1.5.2 Einfluss auf die Volatilität	89
3.2.2 Verhalten von ¹⁴ C-Isoproturon in Pflanzen	91
3.2.2.1 Mineralisierung in Pflanzen	91

Inhaltsverzeichnis	V
3.2.2.2 Freisetzung volatiler ^{14}C -markierter Substanzen aus Pflanzen	92
3.2.3 Verlagerung von ^{14}C -Isoproturon im Sickerwasser und Massenbilanzen	92
3.3 Verhalten von ^{14}C-Isoproturon im 2. Lysimeterversuch im Jahr 2002	94
3.4 Zusammenfassung des Verhaltens von ^{14}C-Isoproturon unter Labor- und Freilandbedingungen	95
3.5 Mineralisierung von ^{14}C-Isoproturon durch bodenbürtige Mikroorganismengemeinschaften in Flüssigkultur	97
3.5.1 Flüssigkulturen „Feldkirchen“	97
3.5.2 Flüssigkulturen „Scheyern“	101
3.5.3 Flüssigkulturen isolierter Mikroorganismen	101
3.6 Verhalten von ^{14}C-Isoproturon in Böden mit Strohzugabe	102
3.7 Verhalten von ^{14}C-Isoproturon in Böden beim Transfer mikrobieller Gemeinschaften mit hohem Abbaupotential	103
3.7.1 Verhalten unter Laborbedingungen	103
3.7.2 Verhalten unter Freilandbedingungen	107
3.8 Bestimmung der in-situ-Verfügbarkeit von ^{14}C-Isoproturon in Böden	110
3.9 Ansätze zur Beurteilung von nicht-extrahierbaren ^{14}C-Rückständen in Böden	112
3.9.1 Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände in sterilen Böden	112
3.9.2 Methanolextraktion von ^{14}C -markierter Biomasse	113
3.9.2.1 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Glucose	113
3.9.2.2 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Isoproturon	114
3.10 Vergleich der Ergebnisse zur Mineralisierung von Isoproturon und dem Einfluss von Bodenkenndaten mit vorangegangenen Arbeiten	116
3.11 Identifikation und Nachweis einer Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft	119
3.11.1 Phylogenetische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft durch vergleichende Sequenzanalyse der 16S-rDNA – Konstruktion von Stammbäumen	119

3.11.2	Etablierung eines Protokolls für den Nachweis einer mikrobiellen Gemeinschaft auf Blähton mittels Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung	121
4	DISKUSSION	123
4.1	Abbau und Mineralisierung von Isoproturon unter kontrollierten Bedingungen	123
4.1.1	Einfluss des Bodenwassergehalts und der chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften auf den Abbau von Isoproturon	123
4.1.2	Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaften von Böden auf den Abbau von Isoproturon	129
4.2	Bildung und Bedeutung gebundener Rückstände beim Abbau von Isoproturon	135
4.3	Verhalten von Isoproturon unter Freilandbedingungen	137
4.4	Möglichkeiten zur Steuerung der Isoproturon-Mineralisierung	145
4.5	Ausblick	149
5	ZUSAMMENFASSUNG	152
6	LITERATURVERZEICHNIS	156
7	ANHANG	167
7.1	Ausgewählte ¹⁴ C-HPLC-Chromatogramme	167
7.2	Korrelationsmatrix	170

Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Böden und Versuchsansätze

F	Feldkirchen
H	Hohenwart
K	Kelheim
S	Scheyern

FK „A“, „B“, „C“	Flüssigkultur der Stufe „A“, „B“ oder „C“
IPU-amG-F	Isoproturon-abbauende mikrobielle Gemeinschaft „Feldkirchen“
Modifikation BF	Biofilm-Inokulum der IPU-amG-F
Modifikation EC	Flüssigkultur-Inokulum der IPU-amG-F
Modifikation S	Bodeninokulum der IPU-amG-F
RB	nativer Boden

¹⁴C-Chemikalie und das Verhalten in Boden und Pflanze

GRB	Gesamtrückstände im Boden
GRP	Gesamtrückstände in Pflanzen
kum. CO ₂	Summe des Entwickelten CO ₂ (= Bodenatmung)
kum. ¹⁴ CO ₂	Summe des Entwickelten ¹⁴ CO ₂ (= Mineralisierung)
IPU	Isoproturon
MBL	Massenbilanz
MER	Methanol-extrahierbare Rückstände
MIN	Mineralisierung
MIN-R.	Mineralisierungsrate
NER	nicht-extrahierbare Rückstände
SiWa	Sickerwasser
Vola	Volatilität
Vola-R.	Volatilitätsrate

Sonstiges

CCS	Chemikalienkonzentration am Boden
CCW	Chemikalienkonzentration im Bodenwasser
CPC	Chemikalien Verteilungskoeffizient

Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'- tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N- hydroxysuccinimidester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
ds DNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDB	Mischung aus Ethanolamin und Diethylenglycolmonobuthylether
EMME	Ethylenglycolmonomethylether
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
H ₂ O _{dem}	entionisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	filtergereinigtes Reinstwasser
HPLC	High performance liquid chromatography
kB	Kilo-Basen
KBE	koloniebildende Einheit
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
TS	Trockensubstanz
WG	gravimetrischer Wassergehalt
WHK	maximale Wasserhaltekapazität

1 Einleitung

1.1 Pestizide in der Umwelt

In der modernen Landwirtschaft werden weltweit große Mengen an Pestiziden eingesetzt, deren Aufgabe es ist, Kulturpflanzen vor pathogenen Organismen zu schützen bzw. die zu den Kulturpflanzen in Konkurrenz stehenden Wildkräuter in ihrem Wachstum derart zu beeinträchtigen, dass sich die Kulturpflanzen ungehindert entwickeln können. Die Pestizide werden, je nach der Organismengruppe gegen die sie eingesetzt werden, hauptsächlich in Fungizide, Herbizide und Insektizide unterteilt. Im Gegensatz zu den meisten anderen organischen Xenobiotika werden die Pestizide gezielt, großflächig und in großen Mengen in die Umwelt ausgebracht. So werden in Deutschland jährlich mehr als 30000 Tonnen Pestizide in Form von 1900 verschiedenen Präparaten ausgebracht, die einen der ca. 250 in Deutschland zugelassenen Wirkstoffe enthalten (umweltlexikon-online, 2003). Herbizide, die über 50 % der in Deutschland ausgebrachten Pestizide ausmachen, entwickeln ihre schädigende Wirkung gegenüber den Zielarten entweder direkt über die grünen Pflanzenteile oder sie müssen von den Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen werden, um ihre Wirkung entfalten zu können. Bei der großflächigen Applikation im Freiland gelangt ein Teil der eingesetzten Herbizidmenge gewollt oder ungewollt direkt auf die Bodenoberfläche. Darüber hinaus wird ein Teil des auf die Pflanzen applizierten Pestizids durch Regen von der Pflanzenoberfläche abgewaschen. Schließlich gelangen in den Pflanzen festgelegte Pestizid-Rückstände beim Absterben von Pflanzenteilen in den Boden. Der Boden ist damit letztlich das Umweltkompartiment, in dem die Pestizide und ihre Rückstände akkumuliert werden und in dem deren Schicksal zu erfassen und gegebenenfalls zu steuern ist.

1.2 Verhalten von Pestiziden in Böden

In der Umwelt und vor allem im Boden unterliegen die Pestizide, wie alle organischen Xenobiotika, einer Vielzahl an Verlagerungs- und Umwandlungsprozessen. Dazu zählen die Verflüchtigung der Xenobiotika von der Boden- bzw. Pflanzenoberfläche, die Verlagerung mit dem Oberflächen- oder Bodenwasser, der Transfer in die Pflanzen, die Sorption an die Bodenmatrix, sowie die biotischen und abiotischen Prozesse, die zum Abbau der Substanz beitragen. Im folgenden sollen die aufgezählten Mechanismen, die das Verhalten von Xenobiotika in Böden beeinflussen, näher dargestellt werden:

Unter Volatilität versteht man die Verflüchtigung eines Stoffes in die Atmosphäre. Die Volatilität von Pestiziden, die nach der Applikation sowohl von der Boden- als auch von der Pflanzenoberfläche erfolgen kann, wird in Umweltproben entscheidend vom Dampfdruck der Substanz, ihrer Löslichkeit in Wasser und dem Adsorptionsverhalten bestimmt (Burkhard und Guth, 1981). Darüber hinaus wird die Verflüchtigung von Pestiziden stark von den Bodeneigenschaften sowie der Bodentemperatur- und feuchtigkeit beeinflusst (Burkhard und Guth, 1981; Dörfler et al., 1991; Alvarez-Benedi et al., 1999). Dabei kann es sich bei den volatilen organischen Verbindungen entweder um die applizierte Ausgangssubstanz selbst oder um Abbauprodukte handeln.

Die Volatilität von Pestiziden stellt einen Pfad dar, über den ein ungewollter und unkontrollierter Verlust von applizierten Pflanzenschutzmitteln und ein Transport in angrenzende Umweltkompartimente erfolgt. Bei Pestiziden, die sehr langsam über biotische und abiotische Wege abgebaut werden, kann die Volatilität sogar den wichtigsten Pfad für die Abnahme von Pestizidrückständen in Boden- und Pflanzenproben darstellen (Dörfler et al., 1991; Stork et al., 1994).

Das Sorptionsverhalten einer Chemikalie, das durch die Teilprozesse der Adsorption und Desorption gekennzeichnet wird, bestimmt den Verbleib einer Substanz an der Bodenmatrix. Beeinflusst wird die Sorption von Pestiziden an die Bodenmatrix sowohl durch die chemischen Eigenschaften der Substanz als auch durch die chemisch-physikalischen Charakteristika der Böden (Nemeth-Konda et al., 2002), wobei je nach untersuchtem Pestizid die organische oder die anorganische Bodenfraktion das

Sorptionsverhalten bestimmen kann (Beck und Jones, 1996; Spark und Swift, 2002). Will man das Verhalten von Pestiziden in Böden untersuchen, so ist darüber hinaus zu beachten, dass die Sorption und Desorption dieser Substanzen von schwankenden Feuchtigkeits- und Temperaturbedingungen der Böden beeinflusst werden (Gaillardon und Dur, 1995; Gaillardon, 1996) und einem Alterungsprozess unterliegen, der die Verfügbarkeit, Toxizität, Mobilität und Abbaubarkeit von Chemikalien beeinflusst (Hatzinger und Alexander, 1995; Pignatello und Xing, 1996; Beck et al., 1996; Robertson und Alexander, 1998; Gevaio et al., 2000).

Im Boden unterliegen die Xenobiotika darüber hinaus biotischen und abiotischen Umsetzungsprozessen, wobei der Anteil der biologischen Prozesse beim Abbau von organischen Fremdstoffen gewöhnlich überwiegt (Scheunert, 1994). Die biologische Umsetzung von Xenobiotika in Böden wird unterteilt in cometabolische und metabolische Prozesse. Cometabolische Umsetzungen sind dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff durch unspezifische Enzyme umgesetzt wird, ohne dass die beteiligten Mikroorganismen Kohlenstoff oder Energie aus der Reaktion gewinnen und für ihr Wachstum einsetzen können. Dagegen spricht man von einer metabolischen Reaktion, wenn Mikroorganismen auf einem Fremdstoff als Kohlenstoffquelle wachsen können und diesen dabei sowohl als Energiequelle nutzen als auch zur Synthese von Biomasse einsetzen. Da die Böden einen sehr komplexen Lebensraum darstellen, ist davon auszugehen, dass am Abbau von Xenobiotika in Böden sowohl abiotische als auch biotische und hier wiederum metabolische und cometabolische Prozesse beteiligt sind und eine getrennte Quantifizierung der Prozesse fast unmöglich ist (Scheunert, 1994).

Den kompletten Abbau einer organischen Chemikalie bis hin zu Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Molekülen bezeichnet man als Mineralisierung. Die Mineralisierung ist der einzige Weg, um einen Fremdstoff komplett aus dem Boden zu entfernen. Gewöhnlich kommt es aber beim Abbau von Xenobiotika in Böden zur Bildung von Zwischenprodukten, so genannten Metaboliten, die aufgrund molekularer Veränderungen andere chemisch-physikalische Eigenschaften und demzufolge ein anderes Umweltverhalten zeigen als ihre Ausgangssubstanzen (Scheunert, 1994).

Weiterhin bilden viele Pestizide in Böden große Mengen an nicht-extrahierbaren Rückständen, die häufig auch als gebundene Rückstände bezeichnet werden. Je nach Pestizid und Boden kann der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände über 90 % der applizierten Wirkstoffmenge betragen (Roberts, 1984). Von der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) werden nicht-extrahierbare Rückstände in Pflanzen und Böden als Chemikalienrückstände aus Pestiziden definiert, die ohne signifikante Veränderung der chemischen Struktur der Rückstände nicht extrahiert werden können. Dabei werden von den nicht-extrahierbaren Rückständen die Chemikalien-Fragmente ausgeschlossen, die über metabolische Umsetzungen in Naturprodukte umgeformt wurden (Roberts, 1984). Bei nicht-extrahierbaren Rückständen von Pestiziden in Böden, deren Langzeitverhalten und das daraus entstehende Gefährdungspotential für die Umwelt in der Literatur z.T. kontrovers diskutiert wird (Roberts, 1984; Gevaio et al., 2000; Jones et al., 2000; Bruns-Nagel et al., 2000; Gevaio et al., 2001), kann es sich sowohl um das applizierte Ausgangsprodukt als auch um ein biotisch oder abiotisch gebildetes Abbauprodukt handeln (Roberts, 1984). Voraussetzung für die Quantifizierung der gesamten nicht-extrahierbaren Rückstände ist die Applikation einer ^{14}C -markierten Chemikalie. Im Anschluss an eine erschöpfende Lösungsmittelextraktion werden die nicht-extrahierbaren Rückstände durch eine vollständige Oxidation von z.B. Boden- oder Pflanzenproben in Form von $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt. Da hierdurch keine Unterscheidung zwischen den tatsächlich gebundenen Chemikalienrückständen und den Rückständen, die über metabolische Umsetzungen in Naturprodukte umgeformt wurden, möglich ist, werden trotz der oben erwähnten Unterscheidung meist die gesamten nicht-extrahierbaren Rückstände als „gebundene Rückstände“ bezeichnet.

1.3 Verhalten des Herbizids Isoproturon in der Umwelt

In dieser Studie wurde das Verhalten des Herbizids Isoproturon, stellvertretend für die Gruppe der Phenylharnstoffderivate, als Modellsubstanz im Boden-Pflanzen-System untersucht. Das Herbizid Isoproturon wird zur Vor- und Nachauflaufbehandlung gegen

einjährige Gräser und Wildkräuter im Getreideanbau eingesetzt und ist in Europa weit verbreitet. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurde das Verhalten von Herbiziden aus der Phenylharnstoffgruppe in mehreren Studien untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der mikrobielle Abbau der Chemikalie, an dem sowohl Bakterien (Cox et al., 1996; Roberts et al., 1998; Cullington und Walker, 1999; Sørensen et al., 2001) als auch Pilze (Vroumsia et al., 1996; Berger, 1998; Pilar Castillo et al., 2001; Wirén-Lehr et al. 2001) beteiligt sein können, der wichtigste Weg ist, um das Herbizid Isoproturon aus Böden zu entfernen. In der Mehrzahl der bisherigen Studien zum Verhalten von Isoproturon wurde jedoch nur das Verschwinden der Ausgangssubstanz nach der Applikation des Wirkstoffs untersucht, während hingegen die Mineralisierung der Chemikalie nur in wenigen Untersuchungen verfolgt wurde. Um den Verbleib des eingesetzten Isoproturon und der entstehenden Abbauprodukte in den untersuchten Böden verfolgen zu können, wurde in dieser Studie ^{14}C -markiertes Isoproturon eingesetzt. Denn nur durch den Einsatz der ^{14}C -Markierung ist es möglich, eine komplette Massenbilanz aufzustellen, in der die Ausgangssubstanz, die extrahierbaren Metabolite, die nicht-extrahierbaren Rückstände und das aus dem kompletten Abbau der Chemikalie stammende $^{14}\text{CO}_2$ quantitativ erfasst werden (Scheunert, 1994). In dieser Studie wurde ^{14}C -markiertes Isoproturon eingesetzt, bei dem sich das ^{14}C -Atom im Phenol-Ring, der stabilsten Stelle der Ausgangssubstanz, befand. Durch diese Form der Markierung ist es möglich, den Verbleib der Chemikalie im Boden bis zu seiner Mineralisierung, die über die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ detektiert werden kann, zu verfolgen. In vorangegangenen Untersuchungen mit ^{14}C -ringmarkiertem Isoproturon, die über einen Zeitraum von 60 bis 100 Tagen durchgeführt wurden, betrug die Mineralisierung der Ausgangssubstanz nur 10 % bis 34 % des applizierten Wirkstoffs (Kubiak et al., 1995; Lehr et al., 1996b; Pieuchot et al., 1996; Perrin-Ganier et al. 2001), während der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände über 60 % des applizierten ^{14}C betrug (Kubiak et al., 1995; Pieuchot et al., 1996). Diese relativ geringen Mineralisierungswerte für Isoproturon sowie die starke Bildung von Abbauprodukten, die toxischer sein können als die Ausgangssubstanz (Mansour et al., 1999), können, in Anbetracht des langjährigen und verbreiteten Einsatz der Substanz in der Landwirtschaft, zu bedeutenden Umweltproblemen führen. So wurden bereits erhöhte Konzentrationen von Isoproturon im Oberflächen- und Grundwasser festgestellt (Garmouma et al., 1997 und 1998;

Nitschke und Schüssler, 1998; Johnson et al., 2001), die zum Teil den von der Europäischen Union festgesetzten Grenzwert von $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ überschritten.

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Herbizid Isoproturon um eine Chemikalie handelt, die in unserer Umwelt zwar in großen Mengen eingesetzt wird, deren langfristiges Verhalten und Gefährdungspotential für die Umwelt jedoch noch nicht ausreichend untersucht wurde. Um das Verhalten von Isoproturon in landwirtschaftlichen Böden möglichst umfassend untersuchen zu können, wurden am Institut für Bodenökologie der GSF für diese Untersuchung Böden ausgewählt, die eine möglichst breite Streuung hinsichtlich des organischen Kohlenstoffgehalts und des pH-Werts aufwiesen, da diese Bodenparameter in der Literatur als mögliche Einflussgrößen auf die Mineralisierung des Wirkstoffs beschrieben wurden (Pieuchot et al., 1996; Walker et al., 2001). Darüber hinaus sollte das Abbauverhalten von Isoproturon nicht nur in Laborversuchen sondern auch in Lysimeterstudien verfolgt werden, da es Lysimeterversuche ermöglichen, das Langzeitverhalten des Herbizids unter natürlich wechselnden Freilandbedingungen und unter dem Einfluss von Pflanzen untersuchen zu können. Wie in der Literatur bereits gezeigt wurde, sind Lysimeterstudien besser geeignet das Verhalten von Chemikalien in der Umwelt zu untersuchen als Laborexperimente, da in kurzen Laborversuchen unter kontrollierten und konstant gehaltenen Laborbedingungen die Bedeutung der einzelnen Umwandlungsprozesse häufig falsch eingeschätzt wird (Kubiak et al., 1990; Schroll et al., 1992).

1.4 Ziele der Arbeit

In einer vorangegangenen, am Institut für Bodenökologie durchgeführten Untersuchung zum Abbau von ^{14}C -Isoproturon in Böden mit unterschiedlicher landwirtschaftlicher Nutzung aber recht ähnlichen bodenphysikalischen und –chemischen Eigenschaften wurde festgestellt, dass die Mineralisierung des Herbizids Isoproturon unspezifisch verläuft und ohne Adaptation der Mikroflora erfolgen kann (Wirén-Lehr, 1997). In der genannten Studie wurden darüber hinaus in allen untersuchten Bodenproben sehr ähnliche Metabolitenmuster detektiert, die zu der Schlussfolgerung führten, dass für das gesamte Boden-Pflanzen-System nur ein Abbauschema existiere.

In Vorversuchen, die der hier vorliegenden Arbeit direkt vorangingen, wurden dagegen in vier landwirtschaftlichen Böden (in dieser Arbeit stets nach ihrer Herkunft bezeichnet: „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“) mit unterschiedlichen Bodencharakteristika zum Teil große Unterschiede im Verhalten von Isoproturon festgestellt (unveröffentlichte Daten, 2003).

Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Abbauverhalten von ^{14}C -Isoproturon in den bodenphysikalisch und –chemisch recht unterschiedlichen Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ zu untersuchen und die Ursachen für auftretende Unterschiede im Abbauverhalten zu erklären.

Dazu sollten Freiland-Lysimeterversuche durchgeführt werden, in denen der Abbau des Herbizids unter realen Umweltbedingungen und unter dem Einfluss von Pflanzen untersucht werden sollte. Zur exakten Charakterisierung des Herbizid-Abbaus sollte dabei vor allem die Mineralisierung des Pestizids kontinuierlich erfasst werden. Dies sollte einerseits durch die Applikation von ^{14}C -markiertem Isoproturon und andererseits durch den Einsatz eines neu entwickelten Testsystems (Schroll und Kühn, 2003) ermöglicht werden, durch dessen Einsatz zwischen den verschiedenen gasförmigen ^{14}C -Verlusten, bedingt durch die Prozesse der Wirkstoffmineralisierung und –volatilisierung, eindeutig unterschieden werden kann. Durch den Einsatz dieser Technik sollte auch zwischen den gasförmigen ^{14}C -Freisetzungen über Boden- und Pflanzenoberflächen unterschieden werden, um so die Bedeutung aller am Abbau von Isoproturon beteiligter Einzelprozesse quantifizieren zu können. Darüber hinaus sollte mit Hilfe von neuartigen, räumlich hochauflösenden Messsensoren (Ruth, 1999) der Einfluss der Umweltparameter „Bodenfeuchtigkeit“ und „Bodentemperatur“ auf die Wirkstoffmineralisierung speziell in den Bodentiefen von 0 bis 1 Zentimeter untersucht werden, da die Hauptmenge der Pestizidrückstände in der Anfangsphase der Versuche in diesen Bereichen verbleibt.

Um das Verhalten von Isoproturon in den ausgewählten landwirtschaftlichen Böden jedoch hinreichend genau beschreiben bzw. erklären zu können, sollte eine größere

Anzahl an begleitenden Untersuchungen unter Zuhilfenahme diverser Methoden durchgeführt werden. Hierzu zählten:

1. Laborversuche, in denen unter kontrollierten und konstant gehaltenen Umweltbedingungen gezielt der Einfluss des jeweiligen Bodenwassergehalts auf den Wirkstoffabbau untersucht werden sollte.
2. Bodenphysikalische Untersuchungen: Durch die Aufnahme der pF-Wg-Kurven sollte der Zusammenhang zwischen dem Füllungsgrad der Bodenporen mit Wasser und der Wirkstoffmineralisierung untersucht werden. Des Weiteren sollten durch eine Methode zur selektiven Porenwassergewinnung Informationen über die in-situ-Verfügbarkeit des Wirkstoffs in den Böden gewonnen und ein neuer Chemikalien Verteilungskoeffizient berechnet werden.
3. Chemische Analytik zur Identifizierung der verschiedenen Wirkstoffabbauprodukte (= Metabolitenmuster).
4. Mikrobiologische Untersuchungen: In Flüssigkulturen der mikrobiellen Gemeinschaften der einzelnen Böden sollte gezielt der Beitrag der Mikroorganismen am Abbau des Herbizids verfolgt werden.
5. Molekularbiologische Methoden zur Bestimmung der Diversität der am Abbau von Isoproturon beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften.
6. Versuche zur Aufklärung von Prozessen, die zur Bildung von sogenannten „nicht-extrahierbaren (Pestizid-)Rückständen“ führen: Um beurteilen zu können, welche neben den in der Literatur bereits genannten Vorgängen zur Bildung solcher Rückstände führen können und wie diese Rückstände zu bewerten sind, sollte geklärt werden, ob das ^{14}C -Atom aus Isoproturon in den primären Stoffwechsel von Mikroorganismen Eingang findet. Darüber hinaus sollte das Verhalten der ^{14}C -markierten Biomasse im Boden verfolgt werden, um den Beitrag der mikrobiellen Biomasse an der Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände bestimmen zu können.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über die Ursachen des unterschiedlichen Abbauverhaltens von Isoproturon in Böden sollten schließlich Methoden entwickelt

werden, die eine Steuerung der am Abbau beteiligten Prozesse erlauben, um somit das Verhalten des Herbizids in Böden bzw. dessen Abbau gezielt beeinflussen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Böden

Für die Labor- und Lysimeterversuche wurden vier landwirtschaftliche Böden aus Süddeutschland eingesetzt, die nach ihrer Herkunft als „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ bezeichnet wurden. Aus den Böden, die aufgrund unterschiedlicher Bodentypen ausgewählt wurden, wurden im Jahr 1995 ungestörte Bodensäulen mit einem Durchmesser von 113 cm und einer Tiefe von 2 m entnommen. Diese Bodensäulen wurden als Lysimeter in der GSF-Lysimeteranlage eingesetzt, wo sie in der Mitte eines 1 ha großen landwirtschaftlichen Feldes eingelassen wurden, um so auf den Lysimeterböden ein landwirtschaftlichen Feldern vergleichbares Bestandesklima zu erzeugen. Die bodenphysikalischen und –chemischen Kenndaten, die von der HVA-Freising nach Standardmethoden bestimmt wurden, sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Bodenphysikalische und –chemische Kenndaten der verwendeten Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“.

Standort Bezeichnung	Horizont	Textur / Bodenart	Ton % TM	Schluff % TM	Sand % TM	pH-Wert CaCl ₂	Org. C % TM	Ges. N % TM	CaCO ₃ % TM
„Feldkirchen“ Calcaric Regosol	Ap	Lts	33	34	33	7,2	2,7	0,27	5,1
	C	Kies							
„Kelheim“ Humic Cambisol	Ap	Sl ₃	11	19	70	6,9	1,3	0,1	0,5
	Bv	Sl ₃	12	13	75	6,6	0,17	0,02	<0,2
	Cv	Su ₄	6	46	48	7,8	0,2	0,02	24,5
„Scheyern“ Mollic Gleysol	Ap	Lu	22	60	18	5,4	1,5	0,17	<0,2
	Sw	Lu	29	61	10	5,9	0,48	0,07	<0,2
	Sd	Lu	28	65	7	6,7	0,32	0,05	<0,2
„Hohenwart“ Aric Anthrosol	Ap	Sl ₃	13	19	68	6,7	0,99	0,1	<0,2
	M	Sl ₃	9	21	70	6,7	0,87	0,1	<0,2
	Bv1	Sl ₂	5	14	81	6,1	0,12	0,02	<0,2
	Bv2	S	1	4	95	6,1	0,06	<0,01	<0,2

Die in den Laborversuchen eingesetzten Bodenproben wurden vor Versuchsbeginn jeweils aus dem Ap-Horizont der entsprechenden Lysimeter entnommen. Die maximalen Wasserhaltekapazitäten (% WHK) der Bodenproben, die in Tabelle 2.2 zusammengestellt sind, wurde nach dem von Nehring (1960) beschriebenen Verfahren bestimmt. Darüber hinaus wurden in die Tabelle 2.2 die im Ap-Horizont der Böden bestimmten Mengen an verfügbaren Nährstoffen (HVA-Freising) und die K_d-Werte für Isoproturon (Ma und Dörfler, unveröffentlichte Daten, 2003) aufgenommen.

Tabelle 2.2: Maximale Wasserhaltekapazitäten (% WHK), K_d -Werte von Isoproturon (= IPU) und Mengen an verfügbaren Nährstoffen der verwendeten Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ (Ap-Horizont).

Standort	Horizont	% WHK	K_d -Wert von IPU	P_2O_5 mg 100g ⁻¹	K_2O mg 100g ⁻¹	NH_4-N mg 100g ⁻¹	NO_3-N mg 100g ⁻¹
„Feldkirchen“	Ap	44,09	1,83	33	15	0,06	2,96
„Kelheim“	Ap	38,38	0,86	38	9	0,06	1,30
„Scheyern“	Ap	47,44	1,06	15	20	0,06	1,72
„Hohenwart“	Ap	33,69	0,71	22	22	0,06	1,18

Die pF-Wg-Kurven der Böden wurden am Institut für Bodenkunde der TU München nach dem Verfahren von Schlichting und Blume (1995) aufgenommen. Die Umrechnung der pF-Werte in das wassergefüllte Porenvolumen bzw. die Porengrößenverteilung erfolgte nach Hartge (1965) bzw. Scheffer und Schachtschabel (1992).

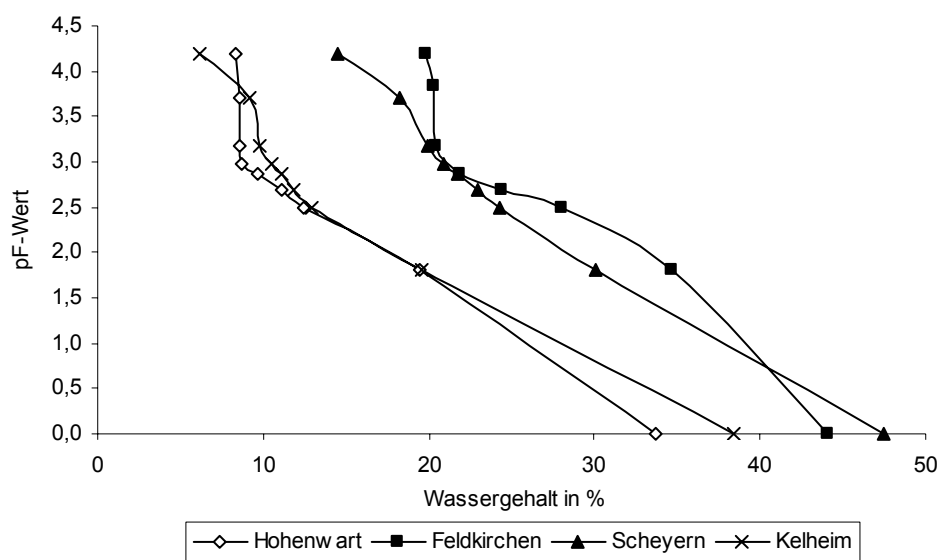


Abbildung 2.1: pF-Wg-Kurven der Oberböden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“

2.2 Verwendetes Pflanzenschutzmittel und Referenzsubstanzen

In dieser Studie wurde das Herbizid Isoproturon [3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff] (IPU) als Modellsubstanz eingesetzt, dessen Strukturformel in der Abbildung 2.2 dargestellt ist.

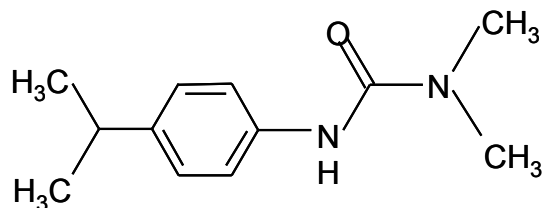


Abbildung 2.2: Strukturformel des Herbizids Isoproturon [3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff]

In den Labor- und Lysimeterversuchen wurde das Herbizid entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis in Form der formulierten Substanz eingesetzt, die unter dem Handelsnamen Arelon vertrieben wird. Isoproturon, ein Vertreter der Phenylharnstoffe, wurde für diese Untersuchung ausgewählt, da es in Europa weit verbreitet zur Vor- und Nachauflaufapplikation im Getreidebau zur Bekämpfung von Ungräsern und einjährigen Wildkräutern eingesetzt wird.

Die wichtigsten physikalischen und chemischen Eigenschaften von Isoproturon sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: *Physikalische und chemische Eigenschaften von Isoproturon (Bruno und Schaper, 2002)*

Chemische Bezeichnung:	3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
Chemische Formel:	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O
Molekulargewicht:	206,3 g M ⁻¹
Schmelzpunkt:	156,5 - 158 °C
Dampfdruck:	2,8 - 8,1 *10 ⁻⁶ Pa bei 20 °C
Löslichkeit:	70,2 mg l ⁻¹ in Wasser
Stabilität im Boden:	gegen Photolyse (90 % verbleibend nach 30 d)

Um nicht nur das Verschwinden der applizierten Ausgangssubstanz vom Anwendungsort verfolgen zu können, wurde in dieser Studie ¹⁴C-ringmarkiertes Isoproturon eingesetzt, bei dem die ¹⁴C-Markierung an der stabilsten Stelle des Moleküls platziert war. Somit war es möglich, die Mineralisierung (= Totalabbau zu ¹⁴CO₂) sowie die Volatilität der Ausgangssubstanz bzw. der Abbauprodukte in den untersuchten Boden- und Pflanzenproben zu verfolgen, nicht-extrahierbare Rückstände zu quantifizieren, Metabolite zu identifizieren und eine Massenbilanz für das Pestizid aufzustellen. Das ¹⁴C-ringmarkierte Isoproturon hatte eine spezifische Radioaktivität von 4,28 MBq mg⁻¹ (Z8/97) bzw. 3,96 MBq mg⁻¹ (Z3/01) (Hersteller: International Isotopes Munich). Die Substanz wies jeweils eine radiochemische Reinheit von > 98 % auf. Das ¹⁴C-markierte Isoproturon wurde jeweils mit den Formulierungshilfsstoffen des handelsüblichen Produkts Arelon vermischt, um die vom Pestizid Hersteller Agrevo (Höchst, Frankfurt) vorgeschlagene Wirkstoffkonzentration von 0,5 kg l⁻¹ einzustellen. Nach dieser Anweisung wurden zwei Arbeitsstandards hergestellt, deren spezifische Radioaktivität 507 Bq µg⁻¹ (Arelon-Standard Z8/97) bzw. 686 Bq µg⁻¹ (Arelon-Standard Z3/01) betrug.

Als nicht ¹⁴C-markierte Referenzsubstanzen mit einer chemischen Reinheit > 98 % wurden verwendet: (3-[4-(2- Hydroxyisopropylphenyl)]1-methylharnstoff (= 2-OH-

Monodesmethyl-IPU), 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff (= 4-Isopropylanilin), 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff (= Monodesmethyl-IPU) und Isoproturon (jeweils von Dr. Ehrendorfer, Augsburg).

2.3 Laborversuche zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden

2.3.1 Beschreibung des Laborsystems

Die Laborversuche erfolgten mit dem in Abbildung 2.3 dargestellten Inkubationssystem nach Lehr et al. (1996b), das neben der Quantifizierung der Mineralisierung ($^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung) auch eine Bestimmung der Atmungsaktivität der Böden (= Bodenatmung, CO_2 -Freisetzung) und der volatilen ^{14}C -organischen Substanzen ermöglichte.

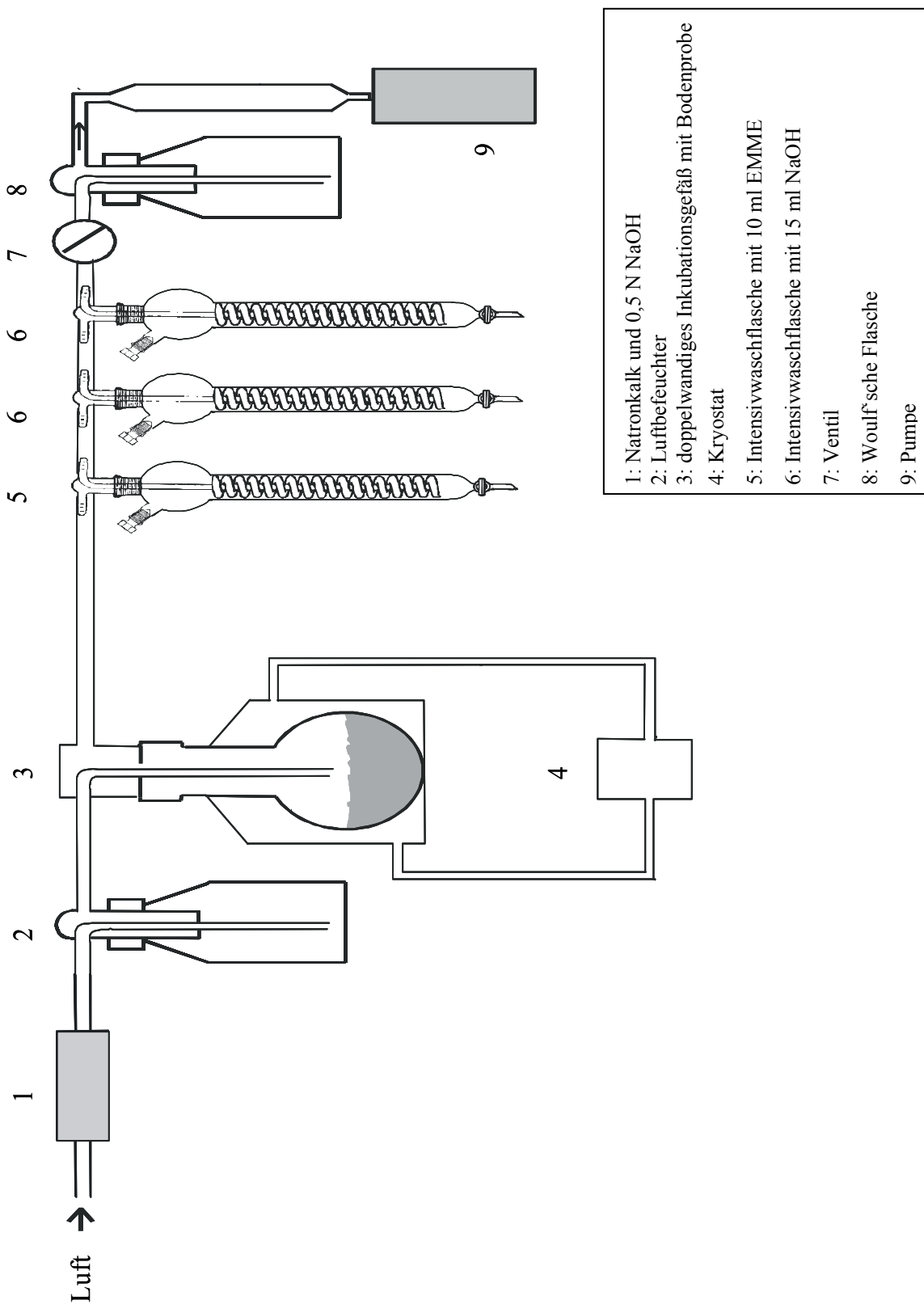


Abbildung 2.3: Laborsystem zur Bestimmung der Mineralisierung von ^{14}C -Chemikalien in Böden (nach Lehr et al., 1996b).

Eine 50 g trockenem Boden entsprechende Menge an feuchtem Bodenmaterial wurde in einem doppelwandigen Gefäß inkubiert, das über einen angeschlossenen Kryostaten (mwg Lauda, Lauda-Königshofen) auf 20 °C temperiert wurde. Um die im Laborsystem befindliche Luft auszutauschen und daraus den Totalabbau von Isoproturon zu untersuchen, wurde dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) für eine Stunde CO₂-freie Luft mit einer Flussrate von 1 l h⁻¹ durch das Inkubationssystem gesaugt. Die CO₂-freie Luft wurde dadurch erzeugt, dass die angesaugte Raumluft zunächst durch CO₂-Fallen mit Natronkalk Plätzchen (Merck, Darmstadt) und anschließend durch 0,5 N Natronlauge (Titrisol, Merck, Darmstadt) geführt wurde. Ein Austrocknen der Bodenproben wurde durch eine dem Inkubationsgefäß vorgeschaltete und mit Wasser gefüllte Waschflasche, die der Luftbefeuchtung diene, verhindert.

Die aus dem Inkubationsgefäß abgesaugte Luft wurde durch drei hintereinander geschaltete Intensivwaschflaschen geleitet. Die erste Intensivwaschflasche war mit 10 ml Ethylenglycolmonomethylether (EMME p.a., Merck, Darmstadt) gefüllt und diente der Absorption flüchtiger organischer Verbindungen. Die zweite und dritte Intensivwaschflasche war jeweils mit 15 ml 0,1 N Natronlauge (NaOH, Titrisol, Merck, Darmstadt) gefüllt und diente der Absorption des aus dem Boden entwichenen CO₂/¹⁴CO₂. Die zweite mit NaOH gefüllte Intensivwaschflasche diente dazu, das CO₂, das nicht erschöpfend in der ersten mit NaOH gefüllten Intensivwaschflasche ausgewaschen wurde, aufzufangen, wobei jeweils mehr als 98 % der ¹⁴CO₂-Radioaktivität in der ersten mit NaOH gefüllten Falle bestimmt wurden. Da das System mit CO₂-freier Luft belüftet wurde, entstammte das aufgefangenen CO₂ allein der Atmungsaktivität der im Boden lebenden Mikroorganismen. Das ¹⁴CO₂ wurde bei der Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon entwickelt.

Die gesamte Versuchsanlage umfasste 16 parallel angeordnete Laborsysteme, wobei drei oder vier Wiederholungen (d.h. Systeme) pro Versuchsansatzes betrieben wurden.

Die Böden wurden jeweils für eine Versuchsdauer von 46 Tagen inkubiert. Am Versuchsende wurden die Böden aus den Inkubationsgefäßen entnommen und direkt nach den im Kapitel 2.5 beschriebenen Methoden untersucht. War keine sofortige Bearbeitung der Böden möglich, so wurden diese bei -18 °C gelagert.

2.3.2 Versuchsvorbereitung und Applikation des Wirkstoffs

Bodenvorbereitung: Das in den Laborversuchen eingesetzte Bodenmaterial wurde vor Versuchsbeginn aus dem Ap-Horizont der jeweiligen Lysimeter entnommen und auf 2 mm gesiebt. Nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im Lysimeterversuch war es nicht mehr möglich, unbehandelten Boden für die Laborversuche direkt aus den Lysimetern zu entnehmen. Vor dem Lysimeterversuch wurden deshalb je ca. 8 kg Boden aus dem Ap-Horizont der Lysimeter entnommen und bei einem Wassergehalt von ca. 10 % in gut durchlüfteten Gefäßen gelagert. Aus diesen Vorratsgefäßen wurde in der Zeit nach dem Lysimeterversuch der Boden für die Laborversuche entnommen. Um gleiche Ausgangsbedingungen für die Mineralisierung von Isoproturon zu schaffen, wurden die Böden vor Versuchsbeginn jeweils auf einen Wassergehalt von 55 % der max. WHK eingestellt und bei 20 °C für vier Wochen equilibriert. Anschließend wurde der für die Laborversuche angestrebte Wassergehalt durch die Zugabe von Wasser oder das Trocknen bei 20 °C eingestellt. Abschließend wurden die Böden bei einer Temperatur von 20 °C nochmals für 10 Tage beim Wassergehalt des Laborversuchs equilibriert. Vorversuche zeigten, dass eine homogene Verteilung des zu applizierenden Wirkstoffs bei einem Wassergehalt über 55 % max. WHK nicht mehr möglich war. Da die Atmungsaktivität, die als Maß für die mikrobielle Aktivität der Böden bestimmt wurde, bei Wassergehalten größer 55 % max. WHK jeweils vergleichbare Werte aufwies, wurden die Böden für die Laborversuche bei einem Wassergehalt von maximal 55 % max. WHK equilibriert. Das zum Erreichen des angestrebten Wassergehalts fehlende Wasser wurde erst bei der Applikation zugegeben. Die während des Equilibrierens auftretenden Wasserverluste, die gravimetrisch bestimmt wurden, wurden jeweils durch die Zugabe von Wasser ausgeglichen.

Von den pro Inkubationsgefäß eingesetzten 50 g trockenem Boden stammten 46,5 g aus dem beim angestrebten Wassergehalt equilibrierten Boden. Die restlichen 3,5 g Boden wurden in trockener Form zugegeben und dienten zur Applikation des ^{14}C -Wirkstoffs, wie im folgenden Abschnitt dargestellt wird.

Wirkstoffapplikation: Pro 50 g trockenem Versuchsboden wurden 230 µg Isoproturon in Form des im Kapitel 2.2 beschriebenen ^{14}C -Arelon-Standards (Arelon-Standard Z8/97) appliziert. Um eine homogene Verteilung des Wirkstoffs zu ermöglichen, wurde der Arelon-Standard zunächst mit einer Hamilton-Spritze auf 3,5 g bei 104 °C getrockneten und gemörserten Versuchsboden aufgetropft und mit Hilfe eines Spatels untergemischt. Anschließend wurden die 3,5 g trockener Boden in einem Becherglas unter eine 46,5 g trockenem Boden entsprechende, beim angestrebten Wassergehalt equilibrierte Bodenmenge gemischt und in das Inkubationsgefäß überführt. Durch leichtes Schütteln des Gefäßes wurde eine möglichst ebene Bodenoberfläche erzeugt. Das zum Erreichen des angestrebten Wassergehalts benötigte Wasser wurde aufgetropft und die Inkubationsgefäße mit Alufolie abgedunkelt.

2.3.3 Zugabe eines Bodenzusatzes (Weizenstroh)

In einem Versuchsansatz wurde der Versuchsboden vor der Inkubation im Laborsystem mit Weizenstroh versetzt. Der Boden wurde dazu nach der im Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode vorbereitet. Direkt vor der Applikation des Wirkstoffs wurden dem feuchten Boden 0,6 g trockenes, auf 2 mm gesiebt Weizenstroh untergemischt.

2.3.4 Bestimmung der $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe und volatiler ^{14}C -Substanzen

Zur Quantifizierung der freigesetzten CO_2 - und $^{14}\text{CO}_2$ -Menge sowie der volatilen organischen ^{14}C -Substanzen wurden die Intensivwaschflaschen des Laborsystems jeweils nach dem Gasaustausch beprobt:

Die in der ersten Intensivwaschflasche enthaltenen 10 ml EMME wurden abgelassen, mit 10 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande) versetzt und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) bestimmt.

Die 15 ml 0,1 N NaOH der zweiten und dritten Intensivwaschflasche wurden nach dem Luftaustausch abgelassen. Ein Aliquot von je 3 ml wurde mit 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Flo AF, Packard, Groningen, Niederlande) vermischt und die

enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) bestimmt. Ein weiterer Aliquot von je 10 ml des abgelassenen NaOH wurde zur Bestimmung des CO₂ mit 2 ml 0,5 M Bariumchloridlösung (Merck, Darmstadt) und wenigen Tropfen des Indikators Phenolphthalein (Merck, Darmstadt) versetzt. Die unverbrauchte Lauge wurde anschließend mit 0,1 N Salzsäure (Titrisol, Merck, Darmstadt) rüchtitriert.

2.4 Lysimeterstudien zum Verhalten von ¹⁴C-Isoproturon im Boden-Pflanzensystem

Die Lysimeterstudien zur Mineralisierung von ¹⁴C-ringmarkiertem Isoproturon wurden im Frühjahr/Sommer des Jahres 2001 und 2002 auf der Lysimeteranlage der GSF durchgeführt, wobei von jedem der vier untersuchten Böden ein Lysimeter mit einem Durchmesser von 113 cm und einer Tiefe von 2 m zur Verfügung stand. Die verwendeten Lysimeter, die als ungestörte Bodensäulen aus landwirtschaftlichen Flächen entnommen worden waren, befanden sich in der Mitte eines 1 ha großen Feldes dessen Bearbeitung und Fruchtfolge mit den Lysimetern übereinstimmte, um somit ein dem landwirtschaftlichen Feld vergleichbares Bestandesklima zu gewährleisten. Die Lysimeter wurden nach der Entnahmestelle ihrer Böden benannt: „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“, „Hohenwart“ (Kenndaten der Böden vgl. Kapitel 2.1).

2.4.1 Beschreibung des Lysimetersystems

Die Mineralisierung und Verflüchtigung von ¹⁴C-markiertem Isoproturon im Lysimetersystem wurde mit Hilfe des in Abbildung 2.4 dargestellten Zweikammernsystems (Schroll und Kühn, 2003) untersucht, das aus einer Boden- und einer Pflanzenkammer bestand (Abbildung 2.5). Dieses System ermöglichte eine getrennte Erfassung der von der Bodenoberfläche bzw. von der Pflanzenoberfläche abgegebenen Menge an ¹⁴C-markierten gasförmigen Verbindungen. Darüber hinaus war es möglich, zwischen den flüchtigen organischen Substanzen und dem freigesetzten ¹⁴CO₂ aus der Mineralisierung des Wirkstoffs zu unterscheiden.

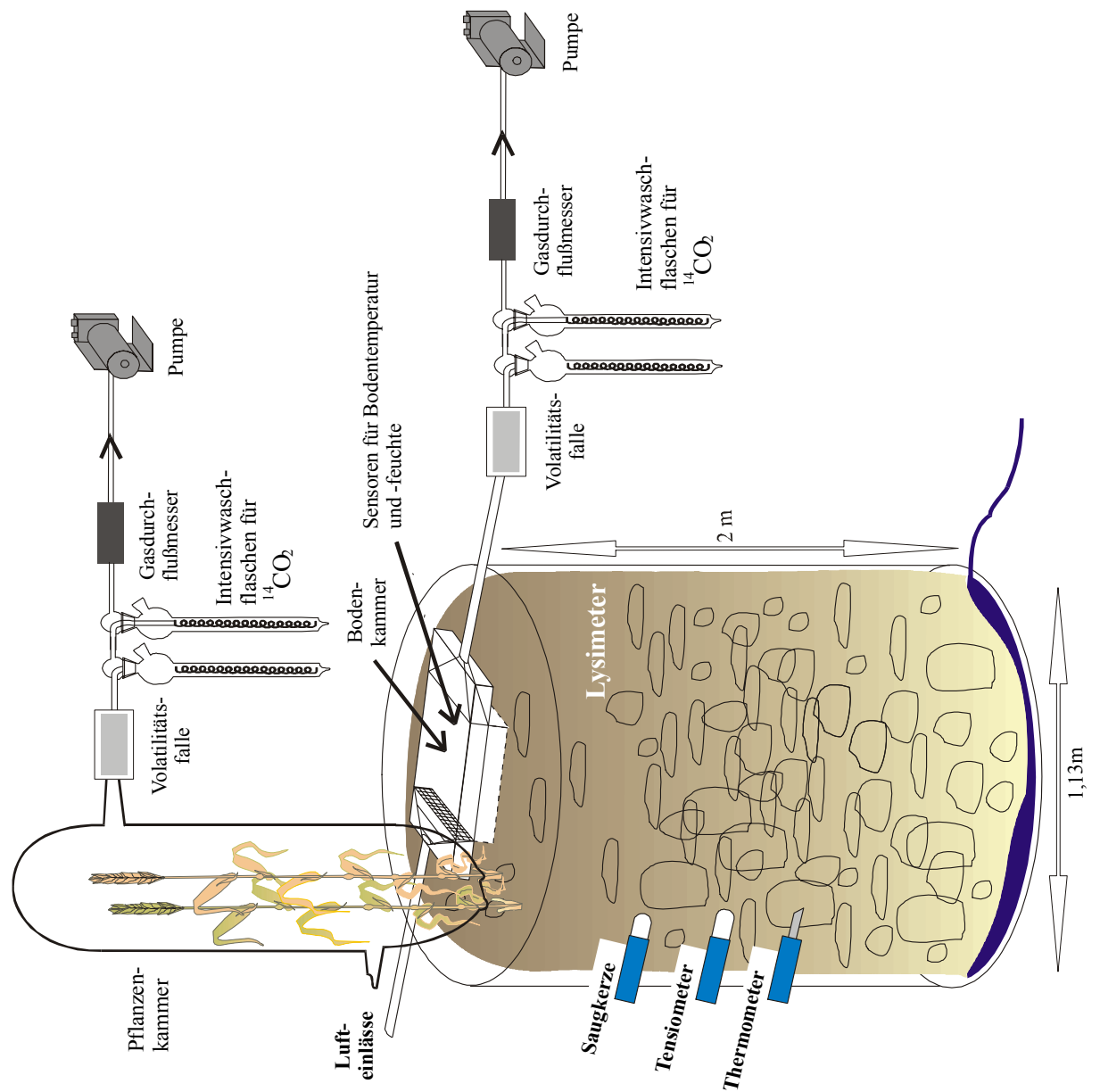


Abbildung 2.4: Freiland-Lysimetersystem, eingesetzt zur Bestimmung der Mineralisierung und Verflüchtigung von organischen ^{14}C -markierten Chemikalien im Boden-Pflanzen-System (nach Schroll und Kühn, 2003).

Bodenkammer: Die Bodenkammer, deren Beprobungsfläche 20 cm lang und 8 cm breit war, wurde oben von einem Glasdeckel verschlossen. Zur Verankerung im Boden war die Kammer unten mit einem 10 cm langen Edelstahlrahmen versehen, der komplett in den Boden gedrückt wurde. Um das Bodenmikroklima innerhalb und außerhalb der Kammer vergleichen zu können bzw. den Einfluss der Bodenparameter Temperatur und Feuchtigkeit auf das Verhalten von Isoproturon untersuchen zu können, wurden in der Bodenkammer sowie außerhalb der Kammer spezifische, neu entwickelte Feuchtigkeitssensoren (Ruth, 1999) und kleine Thermometer (Typ AD 490, Analog Devices, Norwood, USA) jeweils 0,5 cm unter der Bodenoberfläche installiert. Darüber hinaus wurden in der Kammer 1 cm über der Bodenoberfläche zwei Metallrohre mit je 18 0,7 mm weiten Löchern befestigt, um Regenereignisse in der Bodenkammer zu simulieren. Dazu wurde das natürliche Regenwasser aufgefangen und jeweils kurz nach dem Regenereignis das entsprechende Volumen auf den Boden der Kammer appliziert.

Entsprechend den Richtlinien der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft für Volatilitätsexperimente (Nolting et al., 1990) wurde Luft mit einer Geschwindigkeit von 1 m s^{-1} durch die Bodenkammer gesaugt. Um den Einsatz ^{14}C -freier Luft zu garantieren, wurde die Luft einige Meter entfernt vom Lysimeterrand angesaugt. Eine laminare Strömung in der Bodenkammer wurde dadurch ermöglicht, dass die Zuluft beim Eintritt in die Kammer durch vier Metallsiebe geleitet wurde.

In möglichst geringem Abstand hinter der Bodenkammer wurde ein spezifisches Fallensystem installiert in welchem aus der Luft zunächst die volatilen ^{14}C -Substanzen und anschließend das $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ gefiltert wurden. Dazu wurde die Luft über einen Teflonschlauch in eine Glasvorrichtung geleitet, in welcher zwei Polyuretanschwämme (PU-Schwämme, T 3546, Polyether Typ, 35 kg m^{-3} , Seybold, 100 mm o.d.) von je 5 cm Dicke durchströmt wurden. Die verwendeten Schwämme mit einer Porosität von 60 ppi (pores per inch) filterten die volatilen organischen ^{14}C -Substanzen zu mehr als 95 % aus der Luft (Schroll und Kühn, 2003). Da es nicht möglich war aus dem großen Luftvolumen von über 1000 l h^{-1} das enthaltene $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ komplett zu filtern, wurde hinter der Volatilitätsfalle ein Teilluftstrom, der 12,5 % des Gesamtluftstroms umfasste, in zwei aufeinander folgende gekühlte Intensivwaschflaschen geleitet. Die zweite Intensivwaschflasche diente dazu, das $^{14}\text{CO}_2$, das nicht erschöpfend in der ersten

Waschflasche aufgefangen wurde, auszuwaschen, wobei jeweils über 95 % der gesamten $^{14}\text{CO}_2$ -Menge in der ersten Intensivwaschflasche nachgewiesen wurden. Die Waschflaschen wurden zur Absorption des $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ mit einer 1:1 Mischung von Ethanolamin und Diethylenglycolmonobutylether (EDB, jeweils p.a. - Qualität, Merck, Darmstadt) gefüllt. Zur Bestimmung der im Fallensystem gebundenen $^{14}\text{CO}_2$ -Menge bzw. der volatilen ^{14}C -markierten Verbindungen wurde das System dreimal pro Woche (Montag, Mittwoch, Freitag) nach den im Kapitel 2.4.3 beschriebenen Methoden beprobt. Der in der Bodenkammer (160 cm^2) bestimmte Anteil an volatilisierter und mineralisierter Ausgangssubstanz wurde auf die gesamte Lysimeterfläche von 1 m^2 extrapoliert.

Um ausreichend Zeit zur Kalibrierung der Feuchtigkeitssensoren zu haben und um dem Boden in der Kammer nach dem Einbau der Sensoren ausreichend Zeit zur natürlichen Verdichtung zu geben, wurden die Bodenkammern inklusive Messsensoren bereits 55 Tage vor der Wirkstoffapplikation auf den vier Lysimetern installiert. Direkt nach der Applikation von Isoproturon (vgl. Kapitel 2.4.2) wurde die in der Vorbereitungszeit offene Kammer mit einem Glasdeckel verschlossen und die Beprobung gestartet.

Pflanzenkammer: Die Installation der Pflanzenkammer erfolgte erst nach der Applikation des Pestizids (vgl. Kapitel 2.4.2). Dazu wurde eine Pflanze pro Lysimeter nach der Wirkstoffapplikation ausgewählt und der obere Teil mit Blättern und Stängel in die Pflanzenkammer präpariert. Um das Eindringen von ^{14}C -markierten Verbindungen von der Bodenoberfläche in die Pflanzenkammer zu vermeiden, wurde die Pflanzenkammer knapp über dem Boden mit einer beweglichen Irisblende abgeschlossen, deren Öffnung jeweils dem wachsenden Pflanzenstamm angepasst werden konnte. Wie bereits für die Bodenkammer beschrieben, wurde die Zuluft einige Meter vom Lysimeterrand entfernt angesaugt, um auch hier einen ungewollten Eintrag von ^{14}C -Verbindungen zu verhindern. Zur Quantifizierung der volatilen organischen ^{14}C -Verbindungen und der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus der Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon wurde die aus der Pflanzenkammer abgesaugte Luft in ein Fallensystem geleitet, das dem für die Bodenkammer identisch war und dreimal wöchentlich nach den im Kapitel 2.4.3 beschriebenen Methoden beprobt wurde.

Die in der Pflanzenkammer für eine Pflanze bestimmten ^{14}C -Emissionen wurden auf den gesamten Pflanzenbestand des Lysimeters extrapoliert.

1)



2)



Abbildung 2.5: Geöffnete Bodenkammer (1) und Pflanzenkammer (2) des Lysimetersystems nach Abschluss der Messungen.

2.4.2 Versuchsvorbereitung und Applikation des Wirkstoffs

1. Lysimeterversuch im Jahr 2001:

Versuchsvorbereitung: Im April 2001, nachdem die Böden von Hand von Unkraut befreit und der Boden etwas gelockert worden war, erfolgte die Aussaat von Sommergerste auf den Lysimetern. Pro Lysimeter wurde eine Menge von 19 g m^{-2} Saatgut eingesetzt, was der in der landwirtschaftlichen Praxis üblichen Einsatzmenge von 190 kg ha^{-1} entsprach. Um eine gleichmäßige Verteilung des Saatguts zu gewährleisten, wurden auf den Lysimetern im Abstand von 12 cm Reihen gezogen, in welche das Saatgut entsprechend der Reihenlänge verteilt wurde. Das Getreide keimte in den folgenden Tagen auf den vier Lysimetern gleichmäßig aus und wuchs gut an.

Im Mai wurden die Lysimeterböden einer N-Düngung entsprechend 75 kg N ha^{-1} unterzogen. Als Dünger wurde MR-Freisin SSA eingesetzt, das pro Lysimeter in einer Menge von 32 g m^{-2} ausgebracht wurde.

Applikation: Die Applikation von ^{14}C -Isoproturon auf den vier untersuchten Lysimetern erfolgte am 29. Mai 2001 (1. Lysimeterversuch im Jahr 2001). Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen 15 bis 20 cm groß. Es war angestrebt, die in der landwirtschaftlichen Praxis eingesetzte Aufwandmenge von $2,5 \text{ l Arelon ha}^{-1}$, bei einem Wirkstoffgehalt von 500 g IPU l^{-1} Arelon, zu applizieren, was $125 \text{ mg Isoproturon pro Lysimeteroberfläche (1 m}^2)$ entsprach. Für die Applikation wurde der ^{14}C -Arelon-Standard Z3/01 verwendet, der mit Hilfe einer halbautomatischen Spritzdüse, die von einem Computer-gesteuerten Linearmotor über den Lysimeter bewegt wurde, auf die Lysimeter appliziert wurde (Abbildung 2.6). An der Spritzdüse (Teejet 8004E, Spraying Systems) lag ein Druck von 2,3 bar an. Die Applikationsvorrichtung ermöglichte eine homogene, tropfenfreie und der landwirtschaftlichen Praxis vergleichbare Pestizidapplikation auf die Versuchsböden. Die fehlerfreie Funktion der Applikationsvorrichtung wurde in Vorversuchen mit der Applikation von blauer Tinte auf weißes Papier getestet.

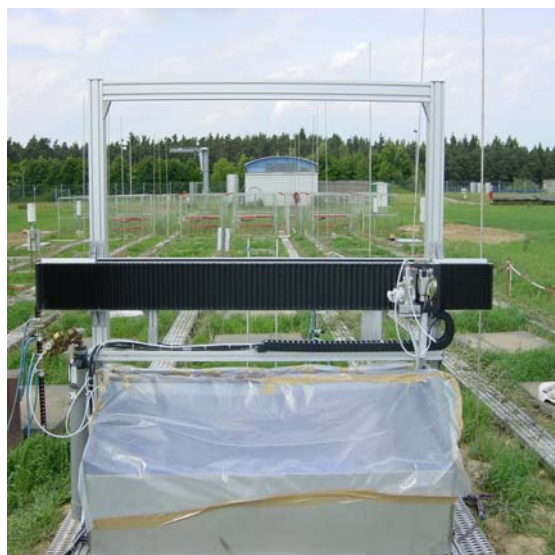
Um die Applikationsverluste, d.h. die Menge an ^{14}C -Isoproturon die nicht auf die Lysimeteroberfläche appliziert wurde, bestimmen zu können, wurde der die Lysimeter umgebende Boden mit einem Spritzschutz aus Edelstahl abgedeckt (vgl. Abbildung 2.6). Nach jeder Applikation auf einen der Lysimeter wurde der Spritzschutz mit organischem Lösungsmittel abgewaschen und die Radioaktivität des Lösungsmittels mittels Flüssigszintillation bestimmt. Das tatsächlich auf die Lysimeteroberfläche applizierte ^{14}C -Isoproturon wurde aus der Differenz des vorbereiteten ^{14}C -Arelon-Standards und den gemessenen Applikationsverlusten errechnet (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Applikationsmengen von ^{14}C -Isoproturon (= ^{14}C -IPU) auf die Lysimeter und gemessene „Verluste“ (= in der Spritzvorrichtung zurückgebliebene und auf den Spritzschutz geratene Wirkstoffmengen).

Lysimeter	„Verluste“ an ^{14}C -IPU (%)	tatsächlich applizierte Menge an ^{14}C -IPU		
		(%)	(dpm)	(mg)
"Feldkirchen"	43,29	56,71	3.145.979.121	76,40
"Kelheim"	48,03	51,97	2.985.254.636	60,89
"Scheyern"	45,55	54,45	3.216.825.672	78,12
"Hohenwart"	44,94	55,06	3.106.156.602	75,43

Unmittelbar nach der Wirkstoffapplikation wurden die Bodenkammern (vgl. Kapitel 2.4.1) verschlossen, die Pflanzenkammern installiert und der kontinuierliche Luftdurchsatz durch beide Systeme gestartet.

1)



2)



Abbildung 2.6: Vorbereitung der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch (2001). Bild 1): Applikationsvorrichtung mit Linearmotor und Spritzschutz um die Lysimeter. Bild 2): Füllen der Spritzdüse mit ^{14}C -Arelon-Standardlösung.

2. Lysimeterversuch im Jahr 2002:

Im Jahr 2002 wurde ein zweiter Freilandversuch auf den Lysimetern durchgeführt, bei dem das Pestizid mit der in den Laborversuchen eingesetzten Technik nur in die Bodenkammern appliziert wurde. Pro 160 cm² Bodenfläche wurde, entsprechend der Aufwandmenge von 1250 g IPU ha⁻¹, eine Menge von 0,002 g ¹⁴C-IPU appliziert. Es wurde der ¹⁴C-Arelon-Standard Z3/01 verwendet, der auf eine 0,3 cm dicke Bodenschicht appliziert wurde. Bei der bestimmten durchschnittlichen Bodendichte von 1,36 g cm⁻³ entsprach dies einer Menge von 65,3 g trockenem Boden. Der für die Applikation vorgesehene Boden wurde eine Woche vor Versuchsbeginn aus den obersten 10 Zentimeter der Lysimeterböden entnommen und auf 2 mm gesiebt. Entsprechend der im Kapitel 2.3.2 beschriebenen Applikationsform wurde der Wirkstoff zuerst im Labor auf 8 g trockenen Boden appliziert und anschließend unter die verbleibende, auf einen Wassergehalt von 30 % max. WHK eingestellte Bodenmenge (57,3 g Trockengewicht) gemischt. Der so vorbereitete Boden wurde in den Bodenkammern gleichmäßig verteilt und etwas verfestigt.

2.4.3 Bestimmung der ¹⁴CO₂-Abgabe und volatiler ¹⁴C-Substanzen

Die Fallensysteme der Boden- und Pflanzenkammern wurden dreimal wöchentlich beprobt. Für die Dauer der Probenahme wurde der Luftdurchsatz unterbrochen, um Radioaktivitätsverluste an die Umwelt zu vermeiden.

Quantifizierung volatiler ¹⁴C-markierter Verbindungen: Zur Bestimmung der in den PU-Schwämmen adsorbierten ¹⁴C-markierten volatilen Substanzen wurden diese im Labor mit Hilfe einer Auspreßvorrichtung dreimal für 10 min mit jeweils 250 ml Aceton (Aceton zur Analyse, Merck, Darmstadt) ausgewaschen. Das Aceton wurde nach 10 min abgesaugt, das Volumen bestimmt, ein Aliquot von 3 ml Aceton mit 15 ml Ultima Gold (Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande) versetzt und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) bestimmt.

Quantifizierung des freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$: Pro Boden- bzw. Pflanzenkammer wurden zwei hinter einander geschaltete und mit EDB gefüllte Intensivwaschflaschen eingesetzt (vgl. Kapitel 2.4.1), deren Inhalt bei der Probenahme jeweils getrennt abgelassen und analysiert wurde. Zur Quantifizierung der in der EDB-Lösung gebundenen Menge an $^{14}\text{CO}_2$ wurde das Volumen des abgelassenen Lösungsmittels bestimmt und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillation in drei Aliquoten bestimmt. Dazu wurden je 3 ml der homogenisierten EDB-Probe mit 5 ml destilliertem Wasser und 12 ml Hionic Fluor (Hionic Fluor, Packard, Groningen, Niederlande) versetzt. Abschließend wurden die Intensivwaschflaschen mit frischer EDB-Lösung gefüllt, wobei jeweils montags und mittwochs ein Volumen von 100 ml und freitags ein Volumen von 150 ml eingesetzt wurden, um der unterschiedlichen Probenahmezeitdauer (2, 2, 3 Tage) Rechnung zu tragen.

Nach dem Abschluss der Probenahme wurde der Luftdurchsatz erneut gestartet und der Luftstrom in den beprobten Boden- und Pflanzenkammern mit Hilfe von Luftdurchflussmessern eingestellt.

2.4.4 Entnahme und Analyse von Boden- und Pflanzenproben

Zur Bestimmung der im Boden bzw. in den Pflanzen verbliebenen ^{14}C -Mengen wurden nach der Applikation des ^{14}C -Isoproturons jeweils im Abstand von zwei Wochen Boden- und Pflanzenproben aus den Lysimetern entnommen und analysiert. Um den laufenden Versuch in seiner Anfangsphase nicht zu beeinträchtigen, wurden die ersten Bodenproben erst 28 Tage nach Versuchsbeginn entnommen. Über die Aufstellung einer Massenbilanz stellte die Bestimmung der Restradioaktivität eine Kontrollmöglichkeit dar, um die mit Hilfe der Fallensysteme gemessenen Mengen an mineralisiertem und volatilisiertem Isoproturon zu überprüfen.

Entnahme von Bodenproben: Pro Lysimeter wurden pro Probenahme 5 jeweils 15 cm tiefe Bohrkerne mit dem Bohrstock (3 cm Durchmesser) entnommen. Jeweils Stechtiefen von 5 cm Dicke wurden zu einer Mischprobe vereinigt und daraus eine

Menge von ca. 10 g trockenem Boden zur weiteren Analyse entnommen. Das verbleibende Bodenmaterial wurde schichtweise wieder in die Bohrlöcher gefüllt, um eine Beeinträchtigung des laufenden Versuchs zu verhindern.

Nach Abschluss der kontinuierlichen Probenahme, 56 Tage nach der Applikation, wurde eine Mischprobe aus ca. 15 Bohrungen zur Bestimmung der in die Massenbilanz eingehenden ^{14}C -Rückstände entnommen.

Die weitere Aufbereitung der Bodenproben nach den im Kapitel 2.5 beschriebenen Methoden erfolgte direkt nach der Probenahme bzw. nach einer Lagerung der Proben bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Entnahme und Analyse von Pflanzenproben: Pro Probenahmetermin wurde von jedem Lysimeter jeweils eine Pflanze zur Bestimmung der enthaltenen ^{14}C -Mengen entnommen. Die Pflanze wurde zunächst in Haupt- und Nebentriebe getrennt. Anschließend wurden die einzelnen Triebe in ihre Bestandteile (Blätter, Stängel, Ähre) zerlegt. Zur Bestimmung der enthaltenen Menge an ^{14}C wurden die Pflanzenteile in Verbrennungshütchen (Packard, Zürich, Schweiz) eingewogen, mit drei bis vier Tropfen einer gesättigten Zuckerlösung beträufelt und in einem Verbrennungsautomaten (Oxidizers 306, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) verbrannt. Die eingesetzte Zuckerlösung diente dazu, die vollständige Verbrennung der Proben zu unterstützen. Das bei der Verbrennung entstandene $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ wurde vom Lösungsmittel Carbo-Sorb (Packard, Groningen, Niederlande) absorbiert und mit dem Scintillationscocktail Permafluor E^+ (Packard, Groningen, Niederlande) vermischt, das die Messung der enthaltenen Radioaktivität über Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) ermöglichte. Das Ergebnis der Verbrennung einer Pflanze, die am Tag 56 nach der Applikation entnommen wurde, wurde auf die gesamte Pflanzenmenge pro Lysimeter extrapoliert und ging in die Massenbilanz des Versuchs als Anteil des in den Pflanzen gebundenen ^{14}C ein.

2.5 Aufbereitung von Bodenproben

Die in den Laborversuchen zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon eingesetzten Böden wurden am Versuchsende jeweils einer Rückstandsanalyse unterzogen. Dabei wurden die extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände quantifiziert und die Metabolitenmuster der extrahierbaren Rückstände analysiert. Ebenso wurden die während des Lysimeterversuchs entnommenen Bodenproben aufbereitet.

2.5.1 Bestimmung des Bodenwassergehalts

Die Quantifizierung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände erfolgte jeweils bezogen auf das Trockengewicht der Versuchsböden. Vor der weiteren Aufbereitung von Bodenproben wurde deshalb zunächst der Wassergehalt der Proben bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot von 5 - 10 g Boden in eine Petrischale eingewogen und für ca. 24 Stunden bei 104 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Gewichtsänderung der Bodenprobe wurde der Wassergehalt (WG) in % nach folgender Formel berechnet:

$$\text{WG in \%} = ((\text{Feuchtgewicht [g]} - \text{Trockengewicht [g]}) / \text{Trockengewicht [g]}) * 100$$

2.5.2 Bestimmung der Methanol-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände

Zur Bestimmung der Methanol-extrahierbaren Rückstände wurden die Bodenproben mit einem Accelerated soil extractor (ASE 200, Dionex GmbH, Idstein und zugehöriger Kompressor JunAir 6, JUN-AIR International A/S, Norresundby, Dänemark) extrahiert. Die ASE ermöglichte eine Extraktion der Bodenproben mit konventionellen Lösungsmitteln bei erhöhten Temperaturen und erhöhtem Druck, was im Vergleich zu anderen Extraktionsverfahren den Extraktionsprozess beschleunigte und den Lösungsmittelverbrauch verringerte.

Die Böden wurden direkt nach der Probenahme in die Extraktionshülsen der ASE eingefüllt. Dazu wurde zunächst auf den Boden der Extraktionshülse ein Zellulosefilter (Dionex GmbH, Idstein) aufgebracht, bevor die Hülsen komplett mit Boden gefüllt

wurden. Wenn der zu extrahierende Boden die Extraktionshülsen nicht vollständig ausfüllte, wurden die Extraktionshülsen mit gereinigtem Seesand aufgefüllt, da nach Herstellerangaben die Extraktionshülsen zum Gelingen der Extraktion vollständig gefüllt sein müssen.

Waren die Böden so feucht, dass ein direktes Füllen der ASE-Hülsen nicht möglich war (dies war bei einem Wassergehalt von über 60 % max. WHK der Fall), dann wurden die Bodenproben zunächst für einen Tag im Laborabzug bei Raumtemperatur getrocknet und danach extrahiert. Die Extraktion von Isoproturon wurde unter den folgenden Extraktionsbedingungen durchgeführt: Lösungsmittel 100 % Methanol (LiChrosolv, gradient grade, Merck, Darmstadt), Temperatur 90 °C, Druck 100 bar. Es wurden fünf Extraktionszyklen mit jeweils 1 min Einwirkzeit des Methanols auf den Boden durchlaufen. Dass die eingesetzte Methode zur Extraktion von Isoproturon aus Bodenmaterial geeignet war, wurde in Vorversuchen gezeigt, wo Isoproturon zu 100 % aus Bodenmaterial ohne Bildung von Artefakten extrahiert werden konnte, was mittels HPLC-Analyse überprüft wurde.

Nach Abschluss des Extraktionsverfahrens wurde das Volumen des Methanolextrakts bestimmt. Zur Bestimmung der enthaltenen ^{14}C -Aktivität wurden zwei Aliquote des Extrakts mit 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande) versetzt und im Szintillationszähler (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) gemessen.

2.5.3 Festphasenextraktion zur Aufreinigung der Bodenextrakte

Um die mittels ASE-Extraktion gewonnenen Bodenextrakte über eine Festphasenextraktion aufreinigen zu können, mussten die im Methanol-Extrakt enthaltenen Isoproturon-Rückstände in eine wässrige Phase überführt werden. Dazu wurde der Methanol-Extrakt zunächst mit einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114, Büchi, Flawil, Schweiz) auf ein Volumen von ca. 1 ml eingengt und anschließend in 300 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Der wässrige Extrakt wurde über einen Filter (20 μm Frits, Varian, Middelburg, Niederlande) gefolgt von einer ENV-Säule (Bond Elut ENV 200 mg, Varian, Darmstadt) geleitet. Vor der eigentlichen Extraktion

wurde die Säule mit Methanol (Methanol gradient grade, Merck, Darmstadt) und destilliertem Wasser konditioniert. Nach der Extraktion wurde die Festphasensäule im sanften Stickstoffstrom getrocknet und mit 10 ml Methanol (Methanol gradient grade, Merck, Darmstadt) eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf 1 ml und anschließend im Stickstoffstrom auf ca. 200 µl eingeengt. Kam es in den so vorbereiteten Proben zu Ausfällungen, welche die HPLC-Kapillare verstopft hätten, so wurden die Proben zusätzlich über 0,2 µm Zentrifugalfilter filtriert (Anapore, VectraSpin Micro Zentrifugalfilter, Whatman, Maidstone, England).

Zur Kontrolle etwaiger Verluste durch die Aufreinigungsschritte wurden nach jedem Arbeitsschritt zwei Aliquote zur Radioaktivitätsmessung entnommen, mit 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande) gemischt und im Szintillationszähler (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) gemessen. Im Eluat fanden sich durchschnittlich $81 \% \pm 6 \%$ der Ausgangsradioaktivität wieder.

Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

2.5.4 HPLC-Analyse der Bodenextrakte

Die in den Kapiteln 2.5.2 und 2.5.3 gewonnenen und aufgereinigten Bodenextrakte wurden zur Identifikation und Quantifizierung von Isoproturon und seiner Metabolite einer HPLC-Analyse unterzogen. Das verwendete HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

UV/VIS-Detektor:	240 nm, L-4250 (Hitachi, Merck, Darmstadt)
Radiodetektor:	Radioactivity Monitor LB 506 C1 (Berthold, Bad Wildbach)
Pumpe:	L-6200 Intelligent Pump (Hitachi, Merck, Darmstadt)
Vorsäule:	LiChrospher 10 RP-18, 5 µm, 250 * 4 mm (Merck, Darmstadt)
Säule:	LiChrospher 10 RP-18, 5 µm, 250 * 4 mm (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	Wasser (= A), Acetonitril (= B), entgast, (HPLC-grade, Merck, Darmstadt)

Flussrate:	1,0 ml min ⁻¹
Gradient:	T ₀ : A = 95 %; T ₂₀ : A = 70 %; T ₃₀ : A = 40 %; T ₃₅ : A = 40 %; T ₄₀ : A = 95 %; T ₅₀ : A = 95 %
Probevolumen :	20 µl
Software :	Winflow 1.21 (Berthold, Bad Wildbach)

Die Ausgangssubstanz und die Metabolite im Bodenextrakt wurden jeweils durch Vergleich der Retentionszeiten der ¹⁴C-Peaks (¹⁴C-Detektor) mit den nicht ¹⁴C-markierten Referenzsubstanzen, deren Analyse mit dem in Reihe geschalteten UV-Detektor erfolgt, identifiziert.

2.5.5 Bestimmung der nicht-extrahierbaren bzw. der ¹⁴C-Gesamtrückstände

Zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren ¹⁴C-Rückstände (NER) wurden die Bodenproben im Anschluss an die Methanolextraktion verbrannt (s. u.). Dazu wurden jeweils 5 Aliquote à 300 mg der extrahierten, trockenen und gemörserten Bodenprobe in Verbrennungshütchen (Packard, Zürich, Schweiz) eingewogen und mit drei bis vier Tropfen einer gesättigten Zuckerlösung beträufelt. Vor der Verbrennung wurden die Ansätze über Nacht bei 104 °C getrocknet.

Sollte zu Vergleichszwecken bzw. zur Bestimmung etwaiger ¹⁴C-Verluste (z.B. durch die Extraktionsmethode) die Menge an ¹⁴C-Gesamtrückständen in einer nicht extrahierten Bodenprobe bestimmt werden, so wurde der frische Boden homogenisiert und nach der Einwaage mit Zuckerlösung beträufelt. Zusätzlich wurde der Wassergehalt des Bodens bestimmt, da die Menge an ¹⁴C-Rückständen jeweils auf das Trockengewicht des Bodens bezogen wurde. Diese Ansätze wurden direkt nach der Einwaage verbrannt oder bei -18 °C gelagert.

Die Proben wurden in einem Verbrennungsautomaten (Oxidizers 306, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) verbrannt. Das dabei entstandene CO₂/¹⁴CO₂ wurde vom Lösungsmittel Carbo-Sorb (Packard, Groningen, Niederlande) absorbiert und mit dem Szintillationscocktail Permafluor E⁺ (Packard, Groningen, Niederlande) vermischt. Die

Messung der enthaltenen Radioaktivität erfolgte mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich).

2.6 Versuche zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon durch bodenbürtige Mikroorganismengemeinschaften in Flüssigkulturen

Um die Fähigkeit der mikrobiellen Gemeinschaften der jeweiligen Böden in Bezug auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon gezielt untersuchen zu können, wurde die Mineralisierung des Wirkstoffs in einem flüssigen Nährmedium untersucht, das Isoproturon als einzige C- und N-Quelle enthielt. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil in einem Flüssigmedium der Einfluss der bodenphysikalischen und –chemischen Wechselwirkungen geringer und dafür der Einfluss der mikrobiellen Bodeneigenschaften größer sein sollte als im System Boden selbst. Ein weiteres Ziel war es, die zum Abbau der Chemikalie befähigten Mikroorganismen der Böden in einem Mineralsalzmedium anzureichern und zu identifizieren.

2.6.1 Verwendete Nährmedien, Standards und Pufferlösungen

Die im folgenden aufgeführten Nährmedien und Pufferlösungen wurden mit entionisiertem Wasser, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$, oder filtergereinigtem Wasser, $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, aus einer Reinstwasseranlage (EasypureTM UV / UF D8612-33, Werner GmbH, Leverkusen) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit NaOH- und HCl-Lösungen verschiedener Molaritäten an einem pH-Meter (InoLab, WTW, Weilheim) eingestellt. Die Sterilisation der Nährmedien, Pufferlösungen und Verbrauchsmaterialien erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, in einem Wasserdampfhochdruckautoklaven (Varioklav Typ 300E bzw. Vapoklav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, München) für 20 min bei 121°C.

2.6.1.1 Mineralsalz-IPU-Medium (MS-IPU-Medium)

Das MS-Medium nach Sørensen et al. (2001) wurde für die Versuche zur Mineralisierung von Isoproturon im Flüssigmedium eingesetzt. Diesem Minimalmedium wurde Isoproturon als einzige C- und N-Quelle zugegeben. Es diente auch zur Anreicherung der im Boden am Abbau von Isoproturon beteiligten Mikroorganismen.

KH_2PO_4 , 1,36 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,78 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g; CaCl_2 , 0,01 g; H_3BO_4 , 2,86 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,54 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 mg; ZnCl_2 , 0,21 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,041 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg; (Agar 15,0 g)
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ ad 1000 ml; pH-Wert 7,2

Nach dem Abkühlen wurden $5,14 \text{ mg l}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ sterilfiltriert zugeben.

Bei Versuchen zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon wurden dem flüssigen Nährmedium bei Versuchbeginn $25 \text{ mg l}^{-1} \text{ }^{14}\text{C}$ -Isoproturon (s. Kapitel 2.6.1.2 ^{14}C -Arelon-Standard für Flüssigmedien) zugegeben. Bei der Herstellung von festen Nährmedien (Agarplatten) wurde dem Medium nach dem Sterilisieren 50 mg l^{-1} Isoproturon (s. Kapitel 2.6.1.3 Arelon-Standard für Agarplatten) zugegeben

2.6.1.2 ^{14}C -Arelon-Standard für Flüssigmedien

Es wurde eine wässrige ^{14}C -Arelon-Stammlösung mit einer Isoproturon-Konzentration von 10 mg ml^{-1} hergestellt. Um einen Standard mit geeigneter Menge an ^{14}C -Isoproturon zu erhalten wurden $80 \mu\text{l } ^{14}\text{C}$ -Arelon-Standard (Z3/01) mit $100 \mu\text{l}$ handelsüblichem Arelon (Agrevo, Höchst, Frankfurt) vermischt und mit destilliertem und sterilisiertem Wasser auf 5 ml verdünnt. Der so entstandene ^{14}C -Arelon-Standard für Flüssigmedien hatte eine spezifische Radioaktivität von $5,53 \text{ Bq } \mu\text{g}^{-1}$.

2.6.1.3 Arelon-Standard für Agarplatten

Es wurde eine wässrige Arelon-Standardlösung mit einer Isoproturon-Konzentration von 50 mg ml^{-1} hergestellt. Dazu wurde ein handelsübliches Arelon (Agrevo, Höchst, Frankfurt) mit einer Isoproturon-Konzentration von 500 mg ml^{-1} mit entionisiertem und sterilisiertem Wasser verdünnt.

2.6.1.4 PBS-Puffer

Der PBS-Puffer (phosphate buffered saline) wurde für die Herstellung von Verdünnungsreihen (Kapitel 2.6.4), zum Waschen von mikrobieller Biomasse (Kapitel 2.9.2.1) und bei der PFA-Fixierung von Bakterien (Kapitel 2.11.2) eingesetzt. Der zehnfach konzentrierte Puffer enthielt die folgenden Komponenten.

NaH_2PO_4 , 12 g; Na_2HPO_4 , 14,2 g; NaCl, 75,97 g

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ ad 1000 ml; pH-Wert 7,2

2.6.1.5 PBS-Glycerin-Lösung

1 x PBS wurde im Verhältnis 1:1 mit Glycerin gemischt und anschließend sterilisiert. Die PBS-Glycerin-Lösung wurde zur Konservierung isolierter Bakterien bzw. von bewachsenem Blähton bei -20 °C bzw. bei -80 °C eingesetzt.

2.6.2 Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in Flüssigkulturen

Für die Versuche zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon wurden jeweils 25 ml MS-IPU-Medium (Kapitel 2.6.1.1) in sterile 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und 5 g Boden (Trockengewichtsequivalent, das für 10 Tage bei 20 °C und 55 % max. WHK equilibriert worden war) zugegeben (= Flüssigkultur „A“ = FK „A“). Den Ansätzen wurde ^{14}C -markiertes Isoproturon in Form des ^{14}C -Arelon-Standards (Kapitel 2.6.1.2) zugegeben, um in den Flüssigkulturen eine Isoproturon-Konzentration von 25 mg l^{-1} zu erreichen. Die Mineralisierung von Isoproturon in den Flüssigkulturen wurde über die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung verfolgt. Wie für das Laborsystem 2.3.1 beschrieben, wurden die

Inkubationsgefäße mit drei hintereinander geschalteten Intensivwaschflaschen verbunden. Dreimal wöchentlich wurden die Reaktionsgefäße für 90 Minuten belüftet. Um ein unkontrolliertes Entweichen der Luft aus den Reaktionsgefäßen zu verhindern, wurden die Zu- und Abluftschläuche jeweils nach dem Luftaustausch mit Schlauchklemmen abgeklemmt. Um eine Kontamination der Flüssigkulturen mit externen Mikroorganismen zu verhindern, wurden die Zu- und Abluftschläuche jeweils mit 0,2 µm Filtern (Midisart 2000, Sartorius AG, Göttingen) versetzt. Nach dem Luftaustausch in den Inkubationsgefäßen wurden, je nach Versuchsziel, mit unterschiedlicher Häufigkeit Aliquote von je 400 µl Medium entnommen. Diese dienten der Bestimmung der in der Kultur bzw. im filtrierten Medium verbliebenen Radioaktivität (Kapitel 2.6.3) und der Bestimmung der Lebendzellzahl (Kapitel 2.6.4).

Um die zum Abbau von Isoproturon befähigte mikrobielle Gemeinschaft im Flüssigmedium anzureichern, wurde, nach dreiwöchiger Inkubation, 1 ml der Flüssigkultur in 24 ml frisches MS-IPU-Medium übertragen. Die auf die Flüssigkultur „A“ folgenden Ansätze wurden als Flüssigkultur „B“ (= FK „B“), Flüssigkultur „C“ (= FK „C“) usw. bezeichnet. Auch in diesen Kulturen konnte die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon, wie für die Flüssigkultur „A“ beschrieben, verfolgt werden.

Die Flüssigkulturen wurden bis zu 39 Tagen auf einem Horizontalschüttler (3005, GFL, Burgwedel) bei 100 rpm und 20 °C im Dunkeln inkubiert. Die in den Intensivwaschflaschen aufgefangenen Mengen an volatilen ^{14}C -Verbindungen und an $^{14}\text{CO}_2$ wurden nach den im Kapitel 2.3.4 beschriebenen Methoden bestimmt.

2.6.3 Bestimmung der ^{14}C -Aktivität der Flüssigkulturen bzw. der zellfreien Filtrate

Während der Versuche zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in Flüssigkulturen wurde nach dem Luftaustausch im Inkubationsgefäß jeweils auch die in der Zellkultur bzw. im filtrierten Medium verbliebene Radioaktivität bestimmt. Dazu wurden 200 µl der aus den Inkubationsgefäßen entnommenen Probe filtriert (0,2 µm VectraSpin

Anapore- filters von Whatman, Maidstone, England). Aliquote à 50 µl der unfiltrierten und der filtrierten Kultur wurden mit jeweils 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Dreieich) versetzt und mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) die Radioaktivität bestimmt.

2.6.4 Bestimmung der Lebendzellzahl von Mikroorganismen

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Mikroorganismen wurden den Flüssigkulturen jeweils 100 µl-Proben entnommen und dezimal mit 1 x PBS-Puffer verdünnt, wobei jeweils 100 µl der konzentrierteren Probe mit 900 µl 1 x PBS-Puffer 1:10 gemischt wurden. Anschließend wurden jeweils 100 µl mehrerer Verdünnungsstufen auf MS-IPU-Agarplatten ausplattiert und bei 20 °C inkubiert. Nach 14 Tagen Inkubation wurde die Lebendzellzahl durch das Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt.

2.6.5 Isolierung von Isoproturon-abbauenden Mikroorganismen

Von den im Kapitel 2.6.4 beschriebenen Platten wurden Kolonien, die sich optisch unterscheiden ließen, auf frischen MS-IPU-Agarplatten subkultiviert. Nach weiterer zweiwöchiger Inkubation auf den MS-IPU-Agarplatten wurde die Fähigkeit zur Isoproturon-Mineralisierung der isolierten Kolonien in Flüssigkulturen, wie im Kapitel 2.6.2 dargestellt, überprüft. Die Flüssigkulturen wurde dabei mit ein oder zwei Impfösen der auf den Agarplatten angewachsenen Kolonien beimpft.

2.7 Transfer mikrobieller Gemeinschaften zur Steigerung des Isoproturon Abbaus in Böden

Es wurden drei Methoden entwickelt, um die Isoproturon abbauende mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ (IPU-amG-F), die zu einer hohen Mineralisierung von Isoproturon im Boden fähig war, auf die übrigen Versuchsböden zu übertragen. Der Effekt der übertragenen mikrobiellen Gemeinschaft auf die

Mineralisierung von Isoproturon im Zielboden wurde über jeweils 46 Tage in Labor- und Lysimeterversuchen überprüft, die nach den oben beschriebenen Methoden durchgeführt wurden. In den Laborversuchen wurde jeweils ein Wassergehalt von 57 % der max. WHK eingestellt, da nach den ersten Laborversuchen im Bereich dieser Bodenfeuchte geeignete Bedingungen für die Mineralisierungsversuche vorherrschten (Ausnahme: Der Versuch im Boden „Hohenwart“ wurde bei 68 % WHK durchgeführt).

2.7.1 Transfer der Mikroorganismen mittels Boden (= Modifikation „S“)

Eine Möglichkeit zur Übertragung der IPU-amG-F auf den Zielboden war das Untermischen einer geringen Menge des Bodens (soil) „Feldkirchen“ unter den Zielboden (= Modifikation „S“). Dazu wurden die beiden Böden zunächst für 10 Tage bei 20 °C und beim jeweiligen Wassergehalt von 55 % der max. WHK equilibriert. Unmittelbar vor der Applikation von Isoproturon auf den Zielboden wurde dann eine geringe Menge des vorbereiteten Bodens „Feldkirchen“ in einem Becherglas mit Hilfe eines Spatels unter den Zielboden gemischt. Der Effekt der übertragenen IPU-amG-F auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon war maximal, wenn 5 % der inokulierten Bodenmenge aus dem Boden „Feldkirchen“ stammten.

2.7.2 Transfer der Mikroorganismen mittels Flüssigkultur (= Modifikation „EC“)

Bei der als Modifikation „EC“ („EC“ = enriched culture) bezeichneten Methode wurde die IPU-amG-F entsprechend der Methode 2.6.2 in einer Flüssigkultur FK „B“ angereichert. Bei der Applikation von ^{14}C -Isoproturon auf den Zielboden wurde die Anreicherungskultur FK „B“ dann anstelle des sonst verwendeten Wassers eingesetzt, um den in diesen Versuchen angestrebten Bodenwassergehalt von 57 % der max. WHK einzustellen.

2.7.3 Transfer der Mikroorganismen als Biofilm (= Modifikation "BF")

Die IPU-amG-F konnte auch in Form eines auf künstlichen Oberflächen gebildeten Biofilms (= Modifikation „BF“) auf den Zielboden übertragen werden. Dazu wurden künstliche Oberflächen wie Blähton oder Seesand den Anreicherungskulturen des Bodens „Feldkirchen“ (vgl. Kapitel 2.6.2) zugegeben, für drei Wochen in diesen Flüssigkulturen inkubiert und anschließend in frisches MS-IPU-Medium übertragen. Nach drei aufeinander folgenden Inkubationsschritten wurde die mikrobielle Gemeinschaft, die nun einen Biofilm auf dem Blähton oder Seesand bildete, auf den Zielboden übertragen. Hierzu wurden die bewachsenen Oberflächen mit einem Löffel aus den Flüssigkulturen abgeschöpft, in sterile Petrischalen überführt und in Häufchen aufgeteilt, die jeweils ca. 1 g trockenem Blähton bzw. 1,7 g Seesand (Einteilung nach optischem Vergleich mit frischem Aufwuchsmaterial) entsprachen. Die so vorbereiteten Oberflächen wurden bei der Applikation von ^{14}C -Isoproturon in einem Becherglas mit Hilfe eines Spatels direkt unter den feuchten Zielboden gemischt.

2.8 Selektive Porenwassergewinnung zur Bestimmung der in-situ-Verfügbarkeit von Isoproturon

Die Abbaubarkeit einer organischen Chemikalie im Boden wird u.a. durch die Verfügbarkeit der Substanz beeinflusst, die ihrerseits durch die chemisch-physikalischen Wechselwirkungen zwischen Chemikalie und Bodenmatrix bestimmt wird. Die Verteilung einer Chemikalie zwischen der flüssigen und der festen Phase im Boden wird üblicherweise durch den K_d -Wert beschrieben, der durch Schütteln der Substanz in einer Bodensuspension von einem Teil Boden zu fünf Teilen Wasser (Anonym, 1981) unter sehr artifiziellen Bedingungen ermittelt wird. Mit Hilfe der im folgenden beschriebenen selektiven Porenwassergewinnung sollte überprüft werden, ob die in-situ-Verteilung bzw. Verfügbarkeit von Isoproturon in den untersuchten Böden ermittelt werden kann.

Die Versuche wurden jeweils bei einem Wassergehalt von 68 % WHK durchgeführt, da bei diesem Wassergehalt die Mineralisierung von Isoproturon in allen Böden maximale Werte erreichte und gute Diffusionsbedingungen angenommen werden konnten. Um

den alleinigen Einfluss der unbelebten Bodenmatrix auf die Verfügbarkeit von Isoproturon abschätzen zu können, wurde die Porenwassergewinnung jeweils parallel in nativen (unbehandelten) und sterilen Bodenproben untersucht. Zur Sterilisation der Bodenproben wurden diese vor der Applikation dreimal im Abstand von jeweils drei Tagen für 20 min bei 121 °C einer Dampfdrucksterilisation unterzogen (Varioklav Typ 300E, H+P Labortechnik GmbH, München). Zwischen den Sterilisationsprozessen wurden die Bodenproben bei 20 °C im Dunkeln gelagert, um einen Übergang der mikrobiellen Dauerstadien in vegetative Formen zu erreichen, die dann im folgenden Sterilisationsschritt abgetötet werden konnten. Die durch den Sterilisationsprozess verursachten Wasserverluste wurden gravimetrisch bestimmt und jeweils nach dem Abkühlen der Bodenproben durch die Zugabe von sterilem Wasser ausgeglichen. Die Applikation von ^{14}C -Isoproturon auf die Versuchsböden (25 g Trockengewicht pro Ansatz) erfolgte nach der im Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Da sich ein Wirkstoff nach der Applikation auf den Boden mittels Diffusion über das Bodenwasser verteilt und dabei auch in feinere Bodenporen eindringt, wurde in nativen und sterilen Böden eine Zeitreihe aufgenommen. Bis zur selektiven Porenwassergewinnung wurden die applizierten Böden bis zu 8 Tagen bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Eine längere Inkubation war nicht möglich, da in den nativen Ansätzen durch die einsetzende Mineralisierung des Wirkstoffs eine Beeinflussung der Verfügbarkeit von Isoproturon zu erwarten war.

Nach der Inkubation wurde das Porenwasser mit Hilfe spezifischer Zentrifugenbecher (nach Steinweg, 2002, Abbildung 2.7) durch Zentrifugation aus dem Boden extrahiert. Dazu wurde der Zentrifugenbecher wie folgt vorbereitet: Um ein Verstopfen des Porenwasserabflusses zu verhindern, wurde zunächst ein Zellulose-Acetat-Filter (Sartorius AG, Göttingen) mit Porengröße 0,45 μm in das Bodenbehältnis gelegt. Mittels eines Klemmrings wurde darauf ein Zellulosefilter (Dionex GmbH, Idstein) befestigt. Anschließend wurde der feuchte Boden möglichst dicht in das Bodenbehältnis des Zentrifugenbeckers gefüllt. Zur Porenwassergewinnung wurden an der Zentrifuge (J2-21 mit Rotor JA-14, Beckman, München) für jeweils 90 min 800 g, 2700 g und 3900 g angelegt. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Volumen des gewonnenen Porenwassers gemessen. Zur Bestimmung der enthaltenen ^{14}C -Radioaktivität wurden zwei Aliquote à 100 μl des Extrakts mit 15 ml

Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande) versetzt und im Szintillationszähler (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) gemessen.

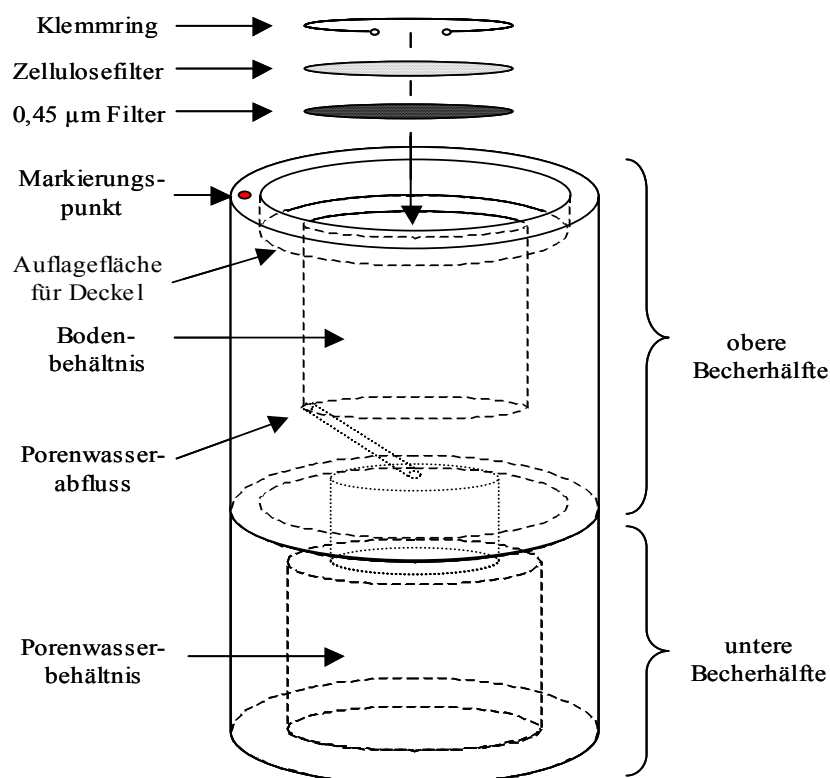


Abbildung 2.7: Zentrifugenbecher zur selektiven Extraktion von Porenwasser aus Bodenproben (nach Steinweg, 2002).

Ziel der Porenwassergewinnung war die Berechnung eines neuen Chemikalien Verteilungskoeffizienten (CPC), der unter „Natur näheren“ Bedingungen gewonnen wurde als der sonst übliche K_d -Wert. In Anlehnung an den K_d -Wert wurde der CPC als Quotient der Chemikalienkonzentration am Boden (= CCS) zur Konzentration im Bodenwasser (= CCW) berechnet, d.h. $CPC = CCS/CCW$.

Die Berechnung erfolgte wie folgt:

1. Zur Bestimmung der im Bodenwasser gelösten IPU-Menge wurden die bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten extrahierten IPU-Mengen addiert.
2. Für das nicht extrahierte Restbodenwasser wurde die im letzten Zentrifugationsschritt bestimmte IPU-Porenwasser-Konzentration übernommen. Die so berechnete IPU-Menge im Restbodenwasser ging in den Wert der gelösten IPU-Menge im Bodenwasser ein.
3. Die Differenz von applizierter IPU-Menge minus im Porenwasser gelöster IPU-Menge ergab die von der Matrix zurückgehaltene IPU-Menge.
4. Die berechneten IPU-Mengen wurden in Konzentrationen (bezogen auf g Trockengewicht Boden bzw. g Bodenwasser) umgerechnet und ergaben so den CCW bzw. CCS, die zur Berechnung des CPC eingesetzt wurden.

2.9 Modellversuche zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus ^{14}C -markierten Substanzen

Beim Abbau von Xenobiotika in Böden wird jeweils ein gewisser Anteil des applizierten Fremdstoffs in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen in den Böden festgelegt. Um die Qualität der beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon in Böden gebildeten, nicht-extrahierbaren Rückstände beurteilen zu können, wurde in ersten Modellversuchen der Anteil der mikrobiellen Biomasse an der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen untersucht. Dazu wurden, durch den Einsatz von ^{14}C -markierten Substraten, ^{14}C -markierte Mikroorganismen in Flüssigkulturen angezogen. Anschließend wurde die Extrahierbarkeit des applizierten ^{14}C aus der gebildeten mikrobiellen Biomasse bzw. die Menge an nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen mit den für Isoproturon entwickelten Methoden bestimmt.

Neben ^{14}C -Isoproturon wurde ^{14}C -Glucose als Substrat der Mikroorganismen eingesetzt, um qualitative und quantitative Unterschiede bei der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus Isoproturon und der leicht verfügbaren Glucose untersuchen zu können.

2.9.1 Eingesetzte Nährmedien und ^{14}C -Standardlösungen

Neben dem im Kapitel 2.6.1.1 beschriebenen Mineralsalzmedium und dem im Kapitel 2.6.1.2 beschriebenen ^{14}C -Arelon-Standard für Flüssigkulturen wurden in diesen Modellversuchen die folgenden Lösungen eingesetzt.

2.9.1.1 Plate Count-Medium (PC-Medium)

Beim PC-Medium handelt es sich um ein komplexes Nährmedium, das in diesen Versuchen zur schnellen Anzucht einer möglichst großen Menge an mikrobieller Biomasse eingesetzt wurde

Pepton aus Casein, 5 g; Hefeextrakt, 2,5 g; (Agar, 14 g)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ ad 1000 ml; pH-Wert 7,0; 20 min 121 °C

2.9.1.2 ^{14}C -Glucose-Standard für Flüssigkulturen

Es wurde ein ^{14}C -Glucose-Standard mit einer Konzentration von 2 mg ml^{-1} und einer spezifischen Radioaktivität von $17,18 \text{ Bq } \mu\text{g}^{-1}$ hergestellt. Als Ausgangssubstanz diente eine ^{14}C -markierte Glucose mit einer spez. Radioaktivität von $40 - 60 \text{ mCi mMol}^{-1}$ (Sigma, Deisenhofen)

2.9.2 Anzucht von ^{14}C -markierter mikrobieller Biomasse und Bestimmung der daraus nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände

Die Anzucht ^{14}C -markierter Biomasse erfolgte entweder im PC-Medium (Kapitel 2.9.1.1), das je nach Fragestellung mit ^{14}C -markierter Glucose oder mit ^{14}C -markiertem Isoproturon versetzt wurden, oder im MS-IPU-Medium (Kapitel 2.6.1.1).

2.9.2.1 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Glucose

Die Anzucht von ^{14}C -markierter Biomasse mit ^{14}C -Glucose erfolgte in sterilen 250 ml Erlenmeyer-Kolben, die mit 100 ml PC-Medium gefüllt wurden. Die Kulturen wurden jeweils mit 2 ml der Anreicherungskulturen FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“ beimpft. Um ein unkontrolliertes Entweichen volatiler Verbindungen bzw. von $^{14}\text{CO}_2$ zu verhindern, wurden die Flüssigkulturen mit dem im Kapitel 2.6.2 beschriebenen Versuchsaufbau verbunden und dreimal pro Woche belüftet. Dem Medium wurden dreimal wöchentlich (nach dem Luftaustausch) je 0,2 mg ^{14}C -Glucose aus dem im Kapitel 2.9.1.2 beschriebenen Standard zugegeben, um die Aufnahme der ^{14}C -Glucose in die wachsende Biomasse zu fördern.

Die Flüssigkulturen wurden bis zu zwei Wochen auf einem Horizontalschüttler (3005, GFL, Burgwedel) bei 100 rpm und 20 °C im Dunkeln inkubiert.

Die so angezogene Zellkultur wurde für 10 min mit 4000 g zentrifugiert (J2-21 mit Rotor JA-14, Beckman, München), der Überstand verworfen und das Zellpellet (= abgesetztes Zellmaterial) zum Waschen der Zellen in 10 ml 1 x PBS-Puffer aufgenommen. Zum Entfernen von Mediumsresten wurde der Waschvorgang in 1 x PBS-Puffer wiederholt. Die gewaschenen Zellen wurden in 26 ml PBS-Puffer aufgenommen. Zwei Aliquote à 100 µl der entstandenen ^{14}C -markierten Zellsuspension wurden mit 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Dreieich) versetzt und die enthaltene Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (Tri-Carb 1900 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) bestimmt. Je 5 ml der Zellsuspension wurden auf je 30 g luftgetrocknete Bodenproben der Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“, auf 51 g Seesand und auf 49 g Glaskugeln aufgetropft. Um eine homogene Verteilung der aufgetropften Zellsuspension zu erhalten, wurden die Proben mit einem Spatel gemischt. Anschließend wurden die Proben einer Methanolextraktion mittels ASE unterzogen (nach Kapitel 2.5.2), um die Extrahierbarkeit von ^{14}C -markierten Verbindungen aus der ^{14}C -Biomasse bei den unterschiedlichen Trägermaterialien bestimmen zu können. Zur Quantifizierung der nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände (NER) wurden die Bodenproben wie beschrieben verbrannt (vgl. Kapitel 2.5.5). In den Ansätzen mit Seesand und Glaskugeln wurde der Anteil der ^{14}C -NER dadurch bestimmt, dass zum einen die auf den künstlichen Oberflächen verbliebenen ^{14}C -markierten Verbindungen mit 25 ml Wasser abgewaschen und die enthaltene

Radioaktivität mittels Flüssigszintillation bestimmt wurde. Zum anderen wurden die in den ASE-Hülsen eingesetzten Zellulosefilter, in denen das durch den Methanolstrom abgespülte Zellmaterial hängen blieb, zur Quantifizierung der enthaltenen ^{14}C -Aktivität verbrannt (nach Kapitel 2.5.5).

2.9.2.2 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Isoproturon

Die Anzucht von ^{14}C -markierter Biomasse aus ^{14}C -Isoproturon erfolgte in je drei sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben, die mit 25 ml PC-Medium (= Ansatz PC) oder MS-IPU-Medium (= Ansatz MS) gefüllt und mit sterilem Blähton, der als Aufwuchsmaterial für die IPU-abbauenden Mikroorganismen diente, versetzt wurde. Die Kulturen wurden jeweils mit 2 ml der Anreicherungskulturen FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“ beimpft. Darüber hinaus wurden drei sterile Kontrollen mit MS-IPU-Medium (= Ansatz K) mitgeführt. Den Ansätzen wurde ^{14}C -markiertes-Isoproturon in Form des im Kapitel 2.6.1.2 beschriebenen ^{14}C -Arelon-Standards zugegeben, um in den Flüssigkulturen eine Isoproturon-Konzentration von 25 mg l^{-1} zu erreichen. Die Kulturen wurden mit dem im Kapitel 2.6.2 beschriebenen Versuchsaufbau verbunden und dreimal pro Woche belüftet.

Die Flüssigkulturen wurden im PC-Medium bis zu zwei, im MS-IPU-Medium bis zu vier Wochen auf einem Horizontalschüttler (3005, GFL, Burgwedel) bei 100 rpm und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln inkubiert.

Um die Biomasse vom Medium zu trennen, wurden die Flüssigkulturen und der bewachsene Blähton über $0,4\text{ }\mu\text{m}$ Zellulose-Acetat-Filter (Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Zur Bestimmung des aus der Biomasse mit Methanol extrahierbaren Anteils an appliziertem ^{14}C wurde der abfiltrierte Blähton und die in Stücke zerteilten Filter mit Seesand gemischt, in ASE-Hülsen eingefüllt und wie im Kapitel 2.5.2 für Bodenproben beschrieben extrahiert. Zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände wurden die Proben nach der ASE homogenisiert und zur Quantifizierung der Rückstände verbrannt (vgl. Kapitel 2.5.5).

2.9.3 Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände in sterilen Böden

Um die Ergebnisse zur Bildung von nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen durch mikrobielle Biomasse beurteilen zu können, wurde als Kontrollansatz die Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände von ^{14}C -Isoproturon im sterilen Boden mit je drei Wiederholungen untersucht.

Vor der Applikation des Wirkstoffs wurde sowohl der feuchte Versuchsboden (Vorinkubation nach Kapitel 2.3.2) als auch der zur Applikation eingesetzte gemörserte Boden nach der im Kapitel 2.8 beschriebenen Methode sterilisiert. Die Applikation von ^{14}C -Isoproturon erfolgte nach der im Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Um eine gute Verteilung des applizierten Wirkstoffs in der Bodenprobe zu ermöglichen, wurden die Versuche jeweils bei einem Wassergehalt von 68 % max. WHK der Versuchsböden durchgeführt. Da die Verteilung der applizierten Chemikalie im Boden durch Diffusion ein zeitabhängiger Prozess ist, wurde eine Zeitreihe untersucht und die Versuchsböden nach einer Inkubationszeit zwischen 0 und 8 Tagen mit Methanol extrahiert (vgl. Kapitel 2.5.2). Die Bodenproben wurden in dem beschriebenen Laborsystem inkubiert (vgl. Kapitel 2.3.1), so dass jeweils vor Versuchsende durch einen Luftaustausch im Bodengefäß überprüft werden konnte, ob volatile Verbindungen freigesetzt oder $^{14}\text{CO}_2$ gebildet wurde. Dies war jedoch in allen Ansätzen nicht der Fall. Zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände wurden die Versuchsböden nach der Methanolextraktion verbrannt (vgl. Kapitel 2.5.5).

2.10 Identifikation von Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaften

Das Ziel der im folgenden beschriebenen Methoden war es, die Isoproturon gut abbauende mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ (IPU-amG-F) zu charakterisieren (= Diversitätsuntersuchung).

Wie im Kapitel 2.7.3 beschrieben, bildete die IPU-amG-F nach Anreicherung im Flüssigmedium einen Biofilm auf Blähton aus, der als Ausgangsmaterial zur Identifikation der abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft eingesetzt wurde.

Die Diversitätsuntersuchung umfasste dabei die folgenden Schritte: In einem ersten Schritt wurde die zu analysierende DNA der mikrobiellen Gemeinschaft aus Blähton extrahiert (vgl. Kapitel 2.10.1). Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde aus der Mischung an extrahierter bakterieller DNA jeweils ein spezifisches Fragment vervielfältigt (amplifiziert), dessen Basensequenz von Art zu Art leicht variierte und damit zur Identifikation der Spezies herangezogen werden konnte (vgl. Kapitel 2.10.4). Die erhaltene Mischung an 16S-rDNA-Fragmenten unterschiedlicher Herkunft wurde durch Klonierung in *E. coli* - Zellen vereinzelt (vgl. Kapitel 2.10.5). Die so vereinzelt DNA-Fragmente wurden anschließend aus den *E. coli* - Zellen isoliert (vgl. Kapitel 2.10.6). Mittels der Methode der Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP), bei der die DNA durch Restriktionsenzyme spezifisch geschnitten wird, konnten die in der DNA-Sequenz übereinstimmenden bzw. sich unterscheidenden DNA-Fragmente identifiziert werden (vgl. Kapitel 2.10.7). Jeweils eine Probe der DNA-Fragmente unterschiedlicher Spezifikation wurde zur Sequenzierung der DNA-Basen und damit zur Identifikation der zugrundeliegenden Bakterienart herangezogen (vgl. Kapitel 2.10.8).

2.10.1 Extraktion und Aufreinigung der bakteriellen DNA

Zur Extraktion der hochmolekularen, chromosomalen bakteriellen DNA des Biofilms der IPU-amG-F aus Blähton wurde der „Fast DNA[®]SPIN Kit for soil“ (BIO101, Carlsbad, USA) eingesetzt. Es wurde dabei stets nach Herstellerangaben verfahren und das Vorgehen der dem Kit beiliegenden Anweisung entnommen. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels einer horizontalen Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.10.2) überprüft.

Um die DNA von störenden Bestandteilen und von die PCR inhibierenden Stoffen zu reinigen, wurde die extrahierte DNA mit dem „NucleoSpin[®]Extract 2 in 1 (Macherey – Nagel, Düren) aufgereinigt.

2.10.2 Qualitative Analyse der DNA durch horizontale Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe eingesetzt. Dazu wurde ein 1 % bis 2,5 %iges Agarosegel (100 ml 1 x TAE-Puffer mit 1 g – 2,5 g Agarose) in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. In die vorbereiteten Taschen des Gels wurden 5 µl der zu untersuchenden DNA-Probe, versetzt mit 2 µl 6 x konz. Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth), pipettiert. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Stromstärke von 120 mA angelegt, die eine Wanderung der negativ geladenen DNA in der Agarosematrix in Richtung der Anode ermöglichte. Um die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurden stets 5 µl eines Größenstandards (GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Roth) auf das Gel mit aufgetragen. Die Auswertung des Gels erfolgte nach der Färbung mit Ethidium-Bromid unter UV-Licht.

Der verwendete TAE-Puffer (50 x) setzte sich wie folgt zusammen:

Tris HCl (2 M), 2,42 g; EDTA (0,1 M), 36,4 g

H₂O_{dem} ad 1000 ml; pH-Wert 8,8 mit Eisessig eingestellt

2.10.3 Quantitative, photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der extrahierten und aufgereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA 1:200 mit H₂O_{reinst} verdünnt und mit Hilfe eines Spektralphotometers (Cecil 3021CE, Cambridge, Großbritannien) die Absorption bei 260 nm (Kantenlänge der Küvette 1 cm) bestimmt. Zur Umrechnung der gemessenen optischen Dichte (= OD) in Konzentrationen doppelsträngiger DNA wurde das folgende Verhältnis verwendet (Cryer et al., 1995):

1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg ds DNA ml⁻¹

2.10.4 Amplifikation der 16S-rRNA codierenden Gene mittels PCR

Die für die 16S-rRNA kodierenden Gene der extrahierten und aufgereinigten DNA (der zu untersuchenden mikrobiellen Gemeinschaft, vgl. Kapitel 2.10.1) wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zur Amplifikation wurden die Primer 616F (Leserichtung vorwärts) und 630R (Leserichtung rückwärts) (Juretschko et al., 1998) eingesetzt. Eine erfolgreiche Amplifikation resultierte in einem etwa 1,5 kB großen DNA-Fragment. Die Sequenz der verwendeten Primer ist in der Tabelle 2.5 angegeben.

Tabelle 2.5: Übersicht über die zur Amplifikation der 16S-rDNA verwendeten Primer mit Angabe der Sequenzen. Mit $K = G$ oder T und $Y = C$ oder T .

Primer	Sequenz
616F	5´-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3´
630R	5´-CAKAAGGAGGTGATCC-3´

Zur Vorbereitung der PCR wurde ein Mastermix ohne DNA-Probe (Template) angesetzt, der auf dünnwandige PCR-Eppendorfreagenzgefäße (Eppendorf, Köln) aufgeteilt und auf Eis gekühlt wurde. Zur Volumenberechnung des Mastermixes wurde die Anzahl der Proben + 1 Positivkontrolle (= 16S-rDNA von *E. coli* K12) + 1 Negativkontrolle (ohne DNA im Ansatz) + 1 Zusatzansatz angenommen. Die extrahierte und aufgereinigte DNA wurde 1:10 mit H_2O_{reinst} verdünnt, so dass pro PCR-Ansatz eine DNA-Menge von $14 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ eingesetzt wurde. Pro Reaktionsansatz wurden folgende Reagentien (alle von MBI Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt:

PCR-Puffer [10 x]	5 μl
dNTP-Mix [2,5 mM each]	5 μl
MgCl ₂ [25 mM]	3 μl
Primer 616F [50 pmol]	1 μl

Primer 630R [50 pmol]	1 μ l
Taq-DNA-Polymerase [$1\text{u } \mu\text{l}^{-1}$]	1,5 μ l
DNA-Probe	1 μ l
H ₂ O _{reinst} ad 50 μ l (= 32,5 μ l pro Ansatz)	

Bei Diversitätsuntersuchungen ist es sinnvoll, vor einer anschließenden Klonierung PCR-Ansätze mit unterschiedlicher Anzahl an Reaktionszyklen durchzuführen. Diese Vorgehensweise ist vorteilhaft, da die direkt aus einer Umweltprobe extrahierte DNA eine Mischung von DNA-Strängen enthält, die sich in der PCR nicht unbedingt einheitlich amplifizieren lässt. Eine stark uneinheitliche Vervielfältigung der gemischten DNA-Probe könnte demnach zur Folge haben, dass das Gen eines in der Umweltprobe vorhandenen Bakteriums, das sich sehr schwer amplifizieren lässt, nach der PCR mit sehr vielen Zyklen im Verhältnis zu leicht amplifizierbaren Genen in so geringem Maße vorhanden ist, dass es in folgenden Arbeitsschritten verloren geht. Um Verschiebungen in der Häufigkeit der auftretenden Gene zu minimieren, wurden deshalb PCR-Ansätze mit vier verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt.

Die Amplifikation der DNA-Proben erfolgte mit PCR-Cyclern des Typs Primus 25 und Primus 96 (MWG Biotech, Ebersberg) nach folgendem Temperatur-Zeit-Zyklus. Es wurden PCR mit 20, 25, 30 und 35 Zyklen durchgeführt:

1. Primäre Denaturierung 94 °C – 4 min
Zyklusbeginn
2. Denaturierung 94 °C – 1 min
3. Annealing 50 °C – 45 sec
4. Elongation 72 °C – 1 min
Zyklusende
5. Finale Elongation 72 °C – 10 min
6. Programmende 4 °C – unbegrenzt

Die Annealing-Temperatur (T_M = Temperatur, bei der sich der Primer an die DNA anlagert) wurde dabei nach der „2 + 4 Regel“ bestimmt, die die Länge und Basenfolge der Primer berücksichtigt und nach folgender Formel berechnet wird:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$

In der genannten Formel wird anstelle der Faktoren (A + T) bzw. (G + C) die Anzahl der im Primer vorkommenden Basen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) eingesetzt. Die verwendete Annealing-Temperatur von 50 °C wurde nach dem Primer 630R ausgewählt.

Der Erfolg der PCR-Reaktionen wurde mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese überprüft. Vor der anschließenden Klonierung wurden die PCR-Produkte der Ansätze mit unterschiedlicher Zyklenzahl aufgrund der genannten Fehlermöglichkeiten vereinigt.

2.10.5 Vereinzelung der erhaltenen Genfragmente durch Klonierung

Ziel der Klonierung war es, die in der PCR vervielfältigten DNA-Fragmente unterschiedlicher Bakterienarten zu vereinzeln. Dazu wurden die DNA-Fragmente in Plasmide ligiert und damit kompetente *E. coli* – Zellen TOP 10 F' transformiert.

Die Klonierung wurde mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit (Invitrogen, Paisley, Großbritannien) durchgeführt. Bei der Klonierung wurden die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen mit der Bezeichnung TOP 10 F' des genannten Klonierungs-Kits verwendet. (Es wurde stets nach Herstellerangaben verfahren und das Vorgehen der dem Kit beiliegenden Anweisung entnommen)

Nach der Klonierungs-Reaktion wurde die erhaltene Zellsuspension zur Vereinzelung der verschiedenen Klone auf Agarplatten unter selektiven Bedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den Agarplatten konnten die Klone, bei denen die Klonierung erfolgreich war, am folgenden Tag anhand einer Farbreaktion ausgewählt werden.

2.10.6 Isolierung der Plasmide und Überprüfung der Transformationseffizienz

Aus den transformierten *E. coli* – Zellen wurden die Plasmide (mit den DNA-Fragmenten der Umweltprobe) mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey – Nagel, Düren) isoliert. Aus den isolierten Plasmiden wurden die DNA-Fragmente der Umweltprobe mittels des Restriktionsenzym Eco R1 (MBI Fermentas , St. Leon-Roth) herausgeschnitten. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

isolierte Plasmid-Probe	2 µl
Enzym-Puffer 0+	1 µl
Eco R1-Lösung	0,2 µl
H ₂ O _{reinst}	6,8 µl
= 10 µl Ansatz	

Der Ansatz wurde für 3 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das ausgeschnittene Insert musste, entsprechend dem vorher eingesetzten DNA-Fragment (vgl. Kapitel 2.10.4), eine Länge von etwa 1,5 kB aufweisen. Dies wurde mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.10.2) überprüft.

2.10.7 Amplifikation und RFLP–Analyse der Plasmid-Inserts

Die positiv überprüften Plasmide wurden wie folgt weiterbehandelt:

Zur Untersuchung der Diversität der aus den Anreicherungskulturen gewonnenen und in die Plasmide integrierten 16S-rDNA-Fragmente wurde die Analysenmethode der Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) eingesetzt. Bei dieser Analysenmethode werden die zu charakterisierenden 16S-rDNA-Fragmente zunächst mittels PCR amplifiziert. In einem zweiten Schritt werden die Amplifikate mit ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten. Je diverser die Umweltprobe ist, desto mehr Fragmentstücke unterschiedlicher Länge entstehen. Durch Agarosegelelektrophorese werden die Fragmentstücke aufgetrennt und ein Vergleich der Bandenmuster ermöglicht es, die unterschiedlichen DNA-Fragmente zu erkennen.

Die genannten Schritte werden im folgenden ausführlich dargestellt:

Mit Hilfe einer PCR (Kapitel 2.10.4 mit 35 Zyklen) erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Fragments. Dazu wurden die isolierten Plasmid-Lösungen jeweils 1:100 mit H_2O_{reinst} verdünnt und einzeln mittels PCR amplifiziert. Die amplifizierten 16S-rDNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen Msp I und Rsa I in 4 – 5 Abschnitte geschnitten.

Für die Enzym-Reaktion wurde ein Mastermix angesetzt, der auf PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln) verteilt wurde. Abschließend wurde das PCR-Produkt der DNA-Probe zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Pro DNA-Probe wurde folgender Ansatz verwendet:

Enzym-Puffer	2 μ l
Enzym-Lösung (= 4 u)	0,4 μ l
DNA-PCR-Produkt	13 μ l
H_2O_{reinst}	4,6 μ l
= 20 μ l Ansatz	

Die Auftrennung der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte in einem 2,5 % Agarose-Gel (vgl. Kapitel 2.10.2). Es wurden 15 μ l Probe + 3 μ l 6 x konz. Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) aufgetragen und bei 100 mA für ca. 1,5 h aufgetrennt.

Die Plasmide, die auf dem Agarosegel ein übereinstimmendes Schnittmuster der DNA und demnach identische DNA-Sequenzen aufwiesen, wurden in Gruppen zusammengefasst. Jeweils ein Plasmid der gebildeten Gruppen wurde anschließend sequenziert.

2.10.8 Sequenzierung der 16S-rDNA Fragmente

Die Sequenzierung wurde von der Firma SEQUISERVE (Vaterstetten) mit einer automatischen Sequenziereinheit (Abi Prism 377 DNA-Sequencer) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die in der Tabelle 2.6 angegebenen Primer verwendet.

Tabelle 2.6: Übersicht über die zur Sequenzierung der 16S-rDNA-Fragmente verwendeten Primer mit Angabe der Sequenzen. Mit Y = C oder T.

Primer	Sequenz
T7	5´-CCCTATAGTGAGTCGTATTA -3´
M13-R	5´-CAGGAAACAGCTATGAC -3´
612R2	5´-GTAAGGTTYTNCGCGT -3´

2.10.9 Auswertung der Sequenzdaten

Alle erhaltenen Sequenzen wurden in ein „*Alignment*“ bereits bekannter Sequenzen der Datenbank der TU-München (Dr. Ludwig) eingepasst. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die homologen Positionen nach der Anordnung an der gleichen Stelle befanden. In den variablen Sequenzbereichen dienten Sekundärstrukturanalysen oder kleinere Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung zur Bestimmung homologer Positionen. Eine automatische Anordnung der Sequenzen war mit dem „Fast Aligner“ aus dem ARB Software Paket (www.arb-home.de) möglich.

2.10.10 Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume

Die Stammbäume zur Rekonstruktion phylogenetischer Verwandtschaft wurden nach der „Maximum-Parsimony“- , „Neighbor-Joining“- (Saitou und Nei, 1987) oder „Maximum-Likelihood“- (Felsenstein, 1981) Methode erstellt. Alle Baumberechnungsverfahren waren im Programm ARB implementiert (www.arb-home.de). Die Matrix der paarweisen Distanzwerte diente als Grundlage zur Stammbaumrekonstruktion nach der „Neighbor-Joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987). Mittels „Maximum-Parsimony“ und „Maximum-Likelihood“-Analysen wurde die Topologie der Stammbäume überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

2.11 Nachweis von Bakteriengruppen mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung

Um die identifizierten, am Abbau von Isoproturon beteiligten Mikroorganismen direkt im Boden bzw. auf dem in Flüssigkulturen gebildeten Biofilm nachweisen zu können, wurde die Technik der **Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung** (FISH) angewandt. Bei dieser Technik werden spezifische fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden eingesetzt, die an die 16S- und 23S-rRNA von Bakterien binden. Je nach Spezifikation der Sonden ist es dabei möglich in der untersuchten Probe Bakteriengruppen oder einzelne Arten zu identifizieren. Zur Vorbereitung der Hybridisierung ist eine Fixierung der zu untersuchenden Probe mit einer Paraformaldehyd-Lösung notwendig, die die Zellwände derart verändert, dass ein Eindringen der Sonden in die Zellen ermöglicht wird, ohne dabei die ursprüngliche Form der Bakterienzelle zu verändern.

2.11.1 Verwendete Pufferlösungen

Für die *in-situ* Hybridisierung wurden die im folgenden aufgezählten Pufferlösungen benötigt. Die Einstellung des pH-Werts und die Sterilisation erfolgte wie im Kapitel 2.6.1 beschrieben.

2.11.1.1 Tris/HCl-Puffer

Die 1 M Lösung enthielt:

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 157,6 g

H₂O_{reinst} ad 1000 ml; pH-Wert 8,0

2.11.1.2 EDTA-Lösung

Die 0,5 M Lösung enthielt:

Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 186 g; NaOH Plätzchen, 20 g

H₂O_{reinst} ad 1000 ml; pH-Wert 8,0

2.11.1.3 SDS-Lösung

Die 10 % ige Lösung enthielt:

Natriumdodecylsulfat, 1 g

H₂O_{reinst} ad 10 ml

2.11.1.4 NaCl

Die 5 M Lösung enthielt:

NaCl, 292,2 g

H₂O_{reinst} ad 1000 ml

2.11.1.5 Hybridisierungspuffer

Für den Hybridisierungsschritt, der bei 46 °C durchgeführt wurde, wurde der folgende Puffer verwendet:

Die für die verwendeten Sonden (vgl. Kapitel 2.11.3) empfohlene Stringenz des Hybridisierungspuffers wurde durch Zugabe von 35 % deionisiertem Formamid (Sigma, Taufkirchen) in die Pufferlösung eingestellt.

NaCl (5 M)	360 µl
Tris/HCl (1 M; pH 8,0)	40 µl
Formamid (deionisiert)	700 µl
H ₂ O _{reinst}	900 µl
SDS (10 %)	2 µl

2.11.1.6 Waschpuffer zur Hybridisierung

Der Waschpuffer für Hybridisierungen mit 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl (5 M)	700 µl
Tris/HCl (1 M; pH 8,0)	1000 µl
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	500 µl
SDS (10 %)	50 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 50 ml

Der Waschvorgang wurde bei 48 °C durchgeführt.

2.11.2 Fixierung von Bakterien mit Paraformaldehyd

Die 4 % Paraformaldehyd - Lösung zur Fixierung von Bakterien wurde wie folgt hergestellt (nach Amann et al., 1990):

45 ml H₂O_{dem} wurden auf 60 – 65 °C erhitzt und unter Rühren 2 – 3 g Paraformaldehyd (PFA) zugegeben. Um das PFA vollständig zu lösen, wurde tropfenweise 10 N NaOH zugegeben bis die Lösung klar wurde. Anschließend wurden 5 ml 10 x PBS - Puffer zugegeben und die Lösung auf 20 °C abgekühlt. Der pH-Wert wurde auf 7,2 – 7,4 eingestellt und die Lösung über 0,45 µm Filter (Millipore, Eschborn) steril filtriert. Die so vorbereitete PFA-Lösung wurde bis zu einer Woche bei 4 °C oder über einen längeren Zeitraum bei – 20 °C gelagert.

Fixierung von bewachsenem Blähton:

Zur Fixierung von mit einem Biofilm bewachsenem Blähton (aus den Anreicherungskulturen „Feldkirchen“) wurden die Blähton-Proben in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln) gegeben und mit 1 x PBS-Puffer vollständig benetzt. Dem Ansatz wurde 4 % PFA-Lösung zugegeben, um ein Mischungsverhältnis

von 1 Teil PBS zu 3 Teilen PFA herzustellen. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das über der Probe stehende PFA abgesaugt und die Proben dreimal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Proben in einer 1:1 Mischung aus 1 x PBS und eisgekühltem EtOH_{abs} aufgenommen. In dieser Form wurden die Proben bei – 20 °C gelagert.

2.11.3 Verwendete Oligonukleotidsonden

Die verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (Interactiva, Ulm), die jeweils spezifisch an die 16S-rRNA der angegebenen Bakteriengruppen banden, sind in der Tabelle 2.7 aufgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten Fluorescein (grüne Fluoreszenz), Cy3 (orange Fluoreszenz) und Cy5 (blaue Fluoreszenz).

Tabelle 2.7: Bezeichnung, Sequenz und Spezifität der verwendeten Oligonukleotidsonden.

Sonden-bezeichnung	Sondensequenz in 5'–3' Leserichtung	Spezifischer Nachweis von:	Referenz
Eub-338-I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i> (ohne II und III)	Amann et al., 1990
Eub-338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetales</i> II	Daims et al., 1999
Eub-338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i> III	Daims et al., 1999
Beta-42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	β- Proteobakterien, Gram-neg.	Manz et al., 1992
Gam-42a	GCCTTCCCACATCGTTT	γ-Proteobakterien, Gram-neg.	Manz et al., 1992

Die Sonden Eub-338 I, II und III wurden zu einem Eub-338_{Mix} gemischt.

2.11.4 Hybridisierung von Zellen auf Blähton

Die Hybridisierung der PFA-fixierten Blähtonproben wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Köln) durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst für jeweils 3 Minuten in 50 %, 80 % und 100 % EtOH_{abs} entwässert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit Hybridisierungspuffer benetzt und jeweils 4 µl der gewünschten Sonde zugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden für 90 Minuten bei 46°C in einem Hybridisierungsofen (Mettler Typ BE20, Schwabach) inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer, der auf 48 °C vorgewärmt wurde, sowie mit H₂O_{reinst} gespült. Auf einem Papiertuch wurden die Proben getrocknet und in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf, Köln) im Dunkeln gelagert.

2.11.5 Mikroskopische Auswertung

Die Visualisierung der fluoreszenzmarkierten Bakterien erfolgte in einem inversen konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Oberkochen) in dem Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen (Argon: 488 nm, Helium-Neon: 543 nm bzw. 633 nm) als Lichtquelle eingesetzt wurden. Die Proben, die nicht plan auf Objektträger aufgetragen werden konnten, wurden in kleinen Plastikschaalen, eingebettet in einige Tropfen eines Antifadingreagenzes (Citifluor Ltd., London, Großbritannien), mit einem Skalpell in kleine Partikel zerteilt und direkt in den Schalen untersucht. Es wurde jeweils der Rand der Blähtonpartikel untersucht, wobei es durch den Einsatz des Laser Scanning Mikroskops auch möglich war, mehrere Tiefenschichten abzuscannen und einen Eindruck von der dreidimensionalen Anordnung des Biofilms auf dem Blähton zu erhalten. Mit Hilfe der in der Tabelle 2.8 aufgeführten Filtersätze war es möglich, die Fluoreszenzsignale zu detektieren.

Tabelle 2.8. *Verwendete Filtersysteme am Laser Scanning Mikroskop. (BP = Bandpassfilter, FT = Farbteiler, LP = Langpassfilter) 1) Filtersätze der Firma Zeiss (Oberkochen).*

Filtersatz¹⁾	Bandpaßfilter	Farbteiler (nm)	Emissionsfilter	verwendbar für
15	BP 546	FT 580	LP 590	Cy3
16	BP 485	FT 510	LP 520	Fluorescein
26	BP 575-625	645	BP 660-710	Cy5

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe einer spezifischen Software der Firma Zeiss ("Laser Scanning Microscope" (LSM) 510, Version 2.80.1123, Carl Zeiss, Jena).

2.12 Statistische Auswertung

Zur Statistischen Auswertung wurde der t-Test eingesetzt, der sich nach Sachs (1984) zum Vergleich zweier empirischer Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten eignet. Mit Hilfe dieses Tests wird geprüft, ob die Mittelwerte der beiden zu vergleichenden Stichproben gleich sind (= Nullhypothese). Dazu wird der berechnete Prüfwert mit den Signifikanzschranken der statistischen Tabelle der Student-Verteilung verglichen (vgl. Sachs, 1984). Ist der Prüfwert größer als die Signifikanzschranke, so kann die Nullhypothese abgelehnt werden, d.h. die Mittelwerte sind signifikant verschieden. Zur Beurteilung der Signifikanz der einzelnen Werte wurde jeweils ein Signifikanzniveau von 0,05 % zugrundegelegt.

Um die Mineralisierung von Isoproturon in zwei Versuchsansätzen auf signifikante Unterschiede untersuchen zu können, wurden jeweils die Mineralisierungsraten der zu untersuchenden Ansätze während der exponentiellen Abbauphase verglichen. Unterschieden sich die Mineralisierungsraten signifikant voneinander, dann wurden zusätzlich die Summenwerte der Mineralisierung verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in vier landwirtschaftlichen Böden unter kontrollierten Bedingungen (Laborversuche)

Das Verhalten der ^{14}C -markierten Modellchemikalie Isoproturon wurde in Laborversuchen unter kontrollierten Bedingungen in den vier Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ untersucht.

3.1.1 Einfluss des Wassergehalts auf die Mineralisierung

Um den Einfluss des Wassergehalts auf das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon zu untersuchen, wurden in den Versuchsböden jeweils vier verschiedene Wassergehalte eingestellt, die einen möglichst breiten Bereich der im Freiland zu erwartenden Feuchtigkeitsbedingungen abdecken sollten.

Die Versuche zeigten, dass die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon sehr stark von der Bodenfeuchtigkeit abhängt.

In den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ war die kumulative $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung bei Bodenfeuchten von 21 % WHK bis 68 % WHK sehr unterschiedlich, wobei ein höherer Bodenwassergehalt jeweils mit einer signifikant höheren Mineralisierung verbunden war (Abbildung 3.1). Bei 21 % WHK im Boden „Hohenwart“ bzw. 34 % WHK im Boden „Feldkirchen“ wurden nur ca. 4 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon mineralisiert. Bei jeweils 68 % WHK wurde dagegen eine Mineralisierung von 43,7 % („Feldkirchen“) bzw. 36,8 % („Hohenwart“) bestimmt. Im Boden „Feldkirchen“ führte ein Wassergehalt von 74 % WHK im Vergleich zu 68 % WHK zu einer Reduktion der Mineralisierung. In diesem Boden lagen damit im Bereich von 68 % WHK die für den Totalabbau von Isoproturon günstigsten Feuchtigkeitsbedingungen vor.

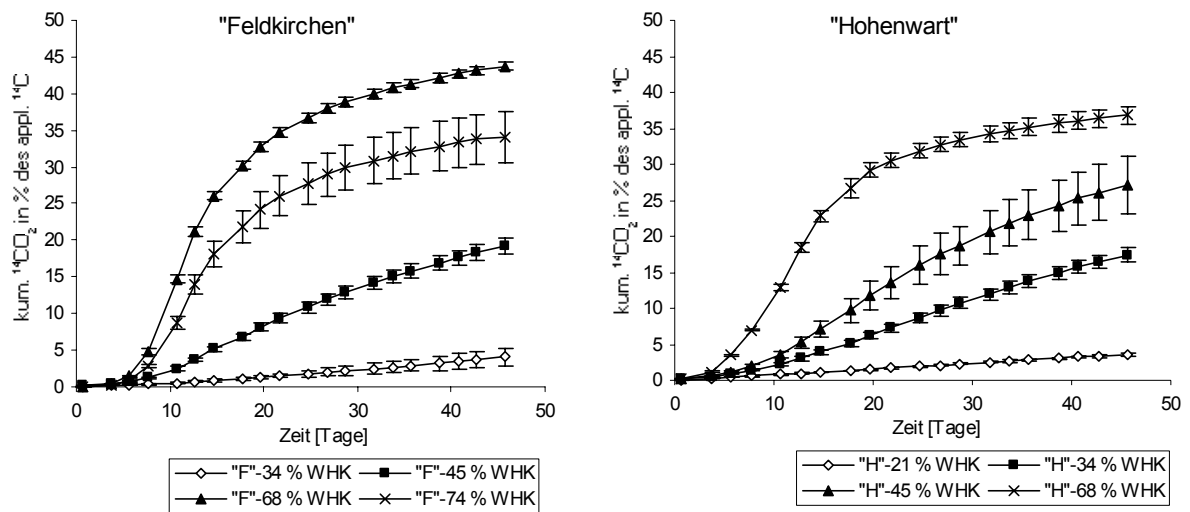


Abbildung 3.1: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“ („F“) und „Hohenwart“ („H“) bei unterschiedlicher Bodenfeuchtigkeit (% WHK) im Laborversuch. Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

Im Boden „Kelheim“ waren bei Bodenfeuchten von 34 % WHK bis 68 % WHK keine signifikanten Unterschiede der Isoproturon-Mineralisierung messbar (Abbildung 3.2). Es wurden zwischen 18,8 % (bei 34 % WHK) und 21,5 % (bei 45 % WHK) des applizierten Wirkstoffs mineralisiert. Die für den Isoproturon-Abbau günstigste Bodenfeuchte wurde somit bei nur 34 % WHK erreicht.

Bei Wassergehalten über 45 % WHK blieb die Mineralisierung von Isoproturon im Boden „Kelheim“ deutlich geringer als in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“.

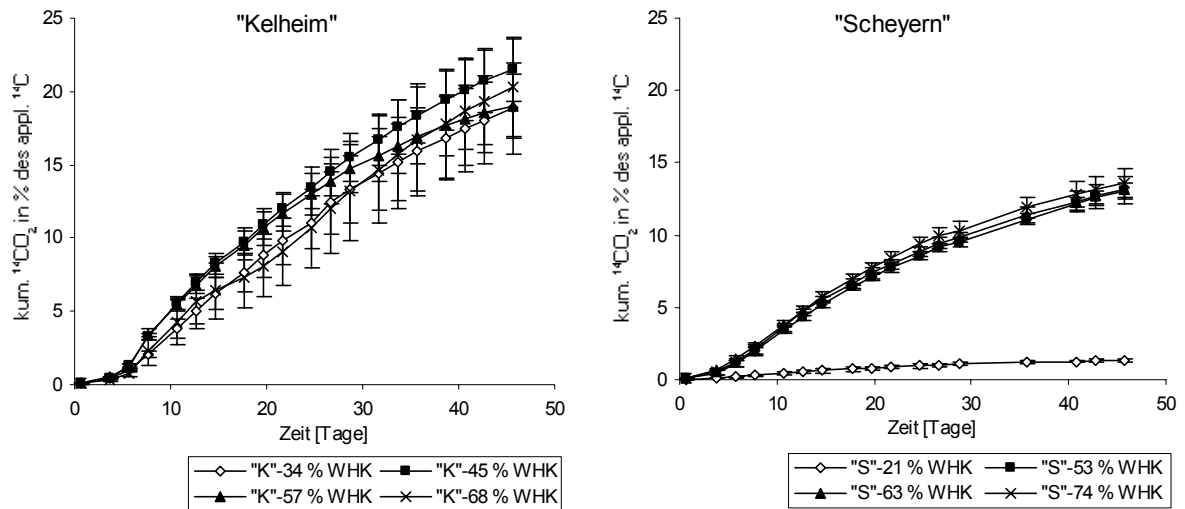


Abbildung 3.2: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Kelheim“ („K“) und „Scheyern“ („S“) bei unterschiedlicher Bodenfeuchtigkeit (% WHK) im Laborversuch. Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

Der niedrigste Isoproturon-Abbau aller Versuchsböden wurde im Boden „Scheyern“ bei einem Wassergehalt von 21 % WHK mit einem Wert von 1,3 % Mineralisierung bestimmt (Abbildung 3.2). Eine Bodenfeuchte von 53 % WHK führte, im Vergleich zu dem Ansatz mit 21 % WHK, zu einer deutlichen Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung (auf 13,1 %), wohingegen noch höhere Bodenfeuchten keinen zusätzlichen Einfluss auf die Mineralisierung des Wirkstoffs hatten.

Somit hatte der Wassergehalt in den vier untersuchten Böden einen großen Einfluss auf die Mineralisierung von Isoproturon, der allerdings sehr bodenspezifisch war.

Die Mineralisierungsraten (Abbildung 3.3) zeigen zusammenfassend die großen Unterschiede in der Isoproturon-Mineralisierung der Versuchsböden bei den jeweils günstigsten Wassergehalten der Laborversuche. Bei einem Wassergehalt von 68 % WHK stimmte die Dynamik der Isoproturon Mineralisierung in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ weitgehend überein. In beiden Böden wurde eine lag-

Phase von vier Tagen festgestellt, bevor die Mineralisierungsraten rasch anstiegen und nach 11 bzw. 13 Tagen mit einer Mineralisierung von 3,3 % pro Tag („Feldkirchen“) bzw. 2,7 % pro Tag („Hohenwart“) ein Maximum erreichten. Im Boden „Kelheim“ wurde eine kurze exponentielle Abbauphase mit einer maximalen Mineralisierungsrate von nur 1,0 % Mineralisierung pro Tag bestimmt. Keine exponentielle Phase und maximal 0,5 % Mineralisierung pro Tag wurde im Boden „Scheyern“ gemessen.

Auffällig am weiteren Verlauf der Mineralisierungsraten in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ war, dass die Raten nach einem kurzen Maximum sehr schnell wieder abfielen und bereits nach 25 Versuchstagen mit einem Wert von 0,7 % Mineralisierung pro Tag den Wert der Böden „Kelheim“ und „Scheyern“ erreichten. Dies deutet darauf hin, dass der überwiegende Teil der leicht verfügbaren Mengen an Isoproturon zu diesem Zeitpunkt bereits mineralisiert war und weiteres Isoproturon in einer schwerer verfügbaren bzw. langsamer umsetzbaren Form in den Böden festgelegt war.

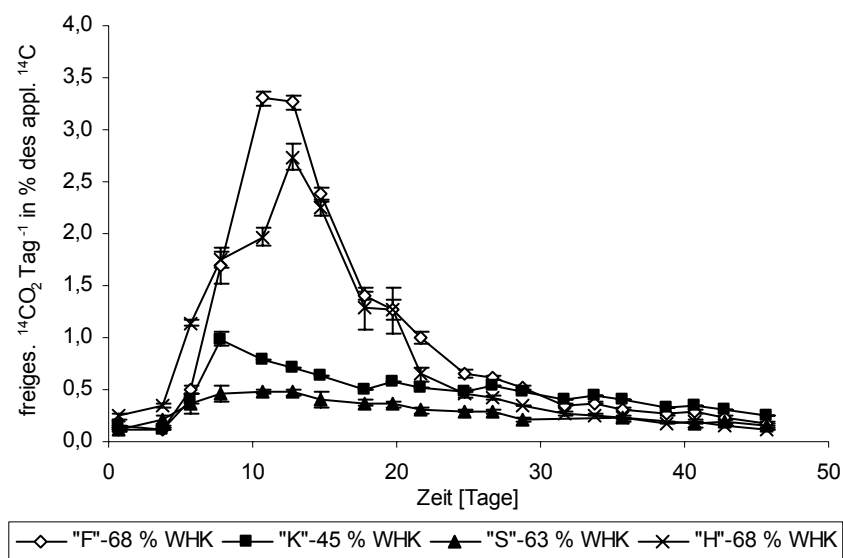


Abbildung 3.3: Mineralisierungsraten von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“ („F“), „Kelheim“ („K“), „Scheyern“ („S“), „Hohenwart“ („H“) bei den für die IPU-Mineralisierung jeweils günstigsten Wassergehalten (% WHK). Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

3.1.2 Zusammenhang zwischen Mineralisierung und wassergefülltem Porenraum der Böden

Anhand der aus den pF-Wg-Kurven abgeleiteten Porengrößen-Wassergehalts-Kurven (vgl. Kapitel 2.1) wurde festgestellt, dass die höchste Mineralisierung des Wirkstoffs Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ jeweils erfolgte, wenn die Bodenporen mit einem Porendurchmesser von 10 bis 15 μm mit Wasser gefüllt waren. Aufgrund der unterschiedlichen Bodeneigenschaften war diese Porenfüllung im Boden „Kelheim“ bereits bei einem gravimetrischen Wassergehalt von 13 % (= 34 % WHK) erreicht, während im Boden „Feldkirchen“ ein Wassergehalt von 28 % (= 64 % WHK) nötig war (Abbildung 3.4). Eine weitere Steigerung des Wassergehalts und damit des wassergefüllten Porenvolumens führte in den Böden „Kelheim“ und „Scheyern“ zu keiner weiteren Veränderung der Isoproturon-Mineralisierung während im Boden „Feldkirchen“ sogar eine Reduktion der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung erfolgte (vgl. Kapitel 3.1.1). Im Boden „Hohenwart“ wurde die höchste Mineralisierung dagegen nicht bei dem Wassergehalt bestimmt, bei dem die Poren mit einem Durchmesser von ca. 10 μm gefüllt waren (entsprechend einem gravimetrischen Wassergehalt von 12 % = 34 % WHK), sondern jede Erhöhung der Bodenfeuchtigkeit (von 21 % bis 68 % WHK) war mit einer Steigerung der Mineralisierung verbunden (vgl. Kapitel 3.1.1).

In Abbildung 3.4 ist für die vier Versuchsböden der jeweilige Zusammenhang zwischen Wassergehalt der Böden und Durchmesser der wassergefüllten Poren dargestellt. Die Pfeile zeigen jeweils auf den Wassergehalt bei dem in den Laborversuchen die höchsten Mineralisierungsergebnisse gemessen wurden. Für den Boden „Hohenwart“ konnte dieser Punkt auf der Kurve nicht vermerkt werden.

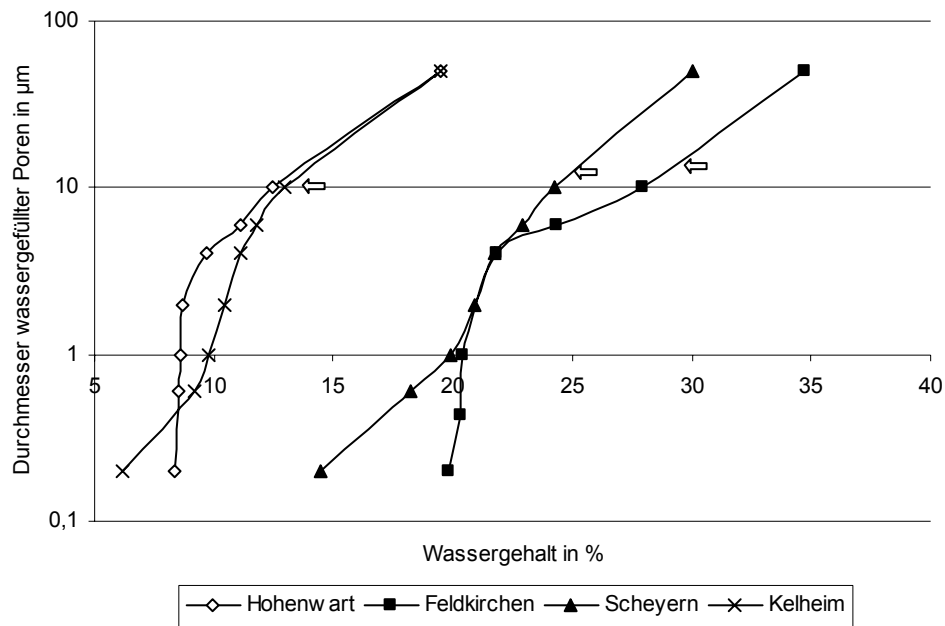


Abbildung 3.4: Bodenwassergehalt und Durchmesser der wassergefüllten Bodenporen in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“. Die Pfeile deuten auf den für die Mineralisierung von Isoproturon günstigsten Wassergehalt der jeweiligen Böden, der in den Laborversuchen bestimmt wurde.

3.1.3 Bodenatmung bei der Mineralisierung

In den Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ war eine Erhöhung der Bodenfeuchtigkeit mit einer Zunahme der Atmungsaktivität (= CO₂-Freisetzung), die als Maß der mikrobiellen Aktivität bestimmt wurde, verbunden (Abbildung 3.5).

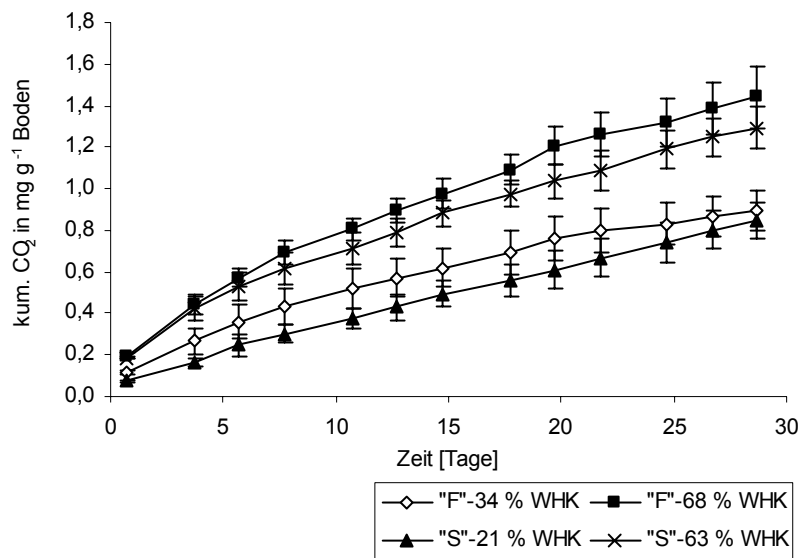


Abbildung 3.5: Atmungsaktivität der Böden „Feldkirchen“ („F“) und „Scheyern“ („S“) beim Abbau von Isoproturon bei unterschiedlicher Bodenfeuchtigkeit (% WHK) im Laborversuch. Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

Der Einfluss der Bodenfeuchtigkeit auf die Atmungsaktivität der Böden war jedoch deutlich geringer als der Einfluss dieses Bodenparameters auf die Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon. Während die Atmungsaktivität der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ in den feuchten Ansätzen (> 60 % WHK) nur um den Faktor 1,5 bzw. 1,6 höher war als in den trockenen Ansätzen (< 34 % WHK), erreichte die Mineralisierung von Isoproturon in den Ansätzen mit höherem Wassergehalt einen 10,8 („Feldkirchen“) bzw. 9,8 („Scheyern“) mal so hohen Wert.

Zwischen den Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ waren sowohl beim niedrigsten wie auch beim höchsten untersuchten Wassergehalt (Abbildung 3.5) mit dieser Untersuchungsmethode keine Unterschiede (nach t-Test-Berechnung) in der mikrobiellen Gesamtaktivität der Böden festzustellen.

Aus Abbildung 3.6 ist zu entnehmen, dass die Atmungsaktivität und damit die mikrobielle Gesamtaktivität in allen Versuchsböden kein geeigneter Parameter für die Charakterisierung der Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon war.

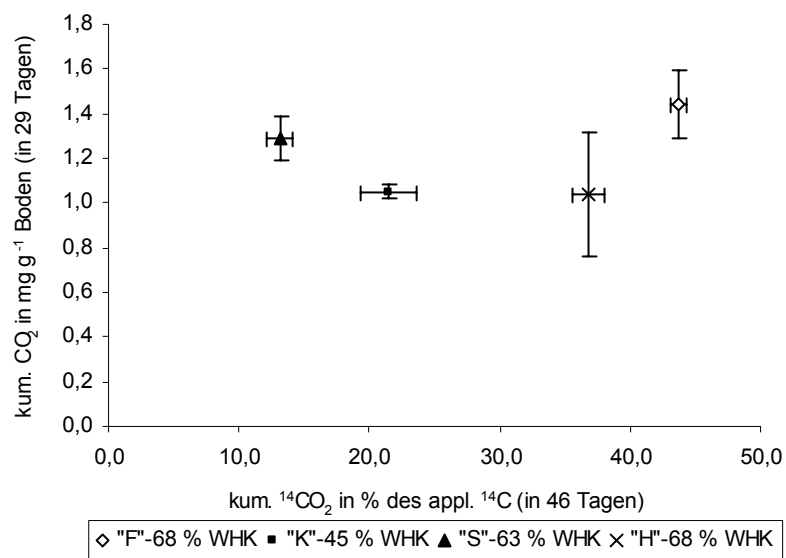


Abbildung 3.6: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon (kum. $^{14}\text{CO}_2$) und Atmungsaktivität (kum. CO_2) der Böden „Feldkirchen“ („F“), „Kelheim“ („K“), „Scheyern“ („S“) und „Hohenwart“ („H“) bei den für die IPU-Mineralisierung günstigsten Wassergehalten (% WHK) in den Laborversuchen.

3.1.4 Zusammenhang zwischen Mineralisierung und Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände

Die bei den unterschiedlichen Wassergehalten gemessene Mineralisierung (MIN) von ^{14}C -Isoproturon in den Versuchsböden sowie den jeweilige Anteil an Methanol-extrahierbaren (MER) bzw. nicht-extrahierbaren Rückständen (NER) zeigt Abbildung 3.7.

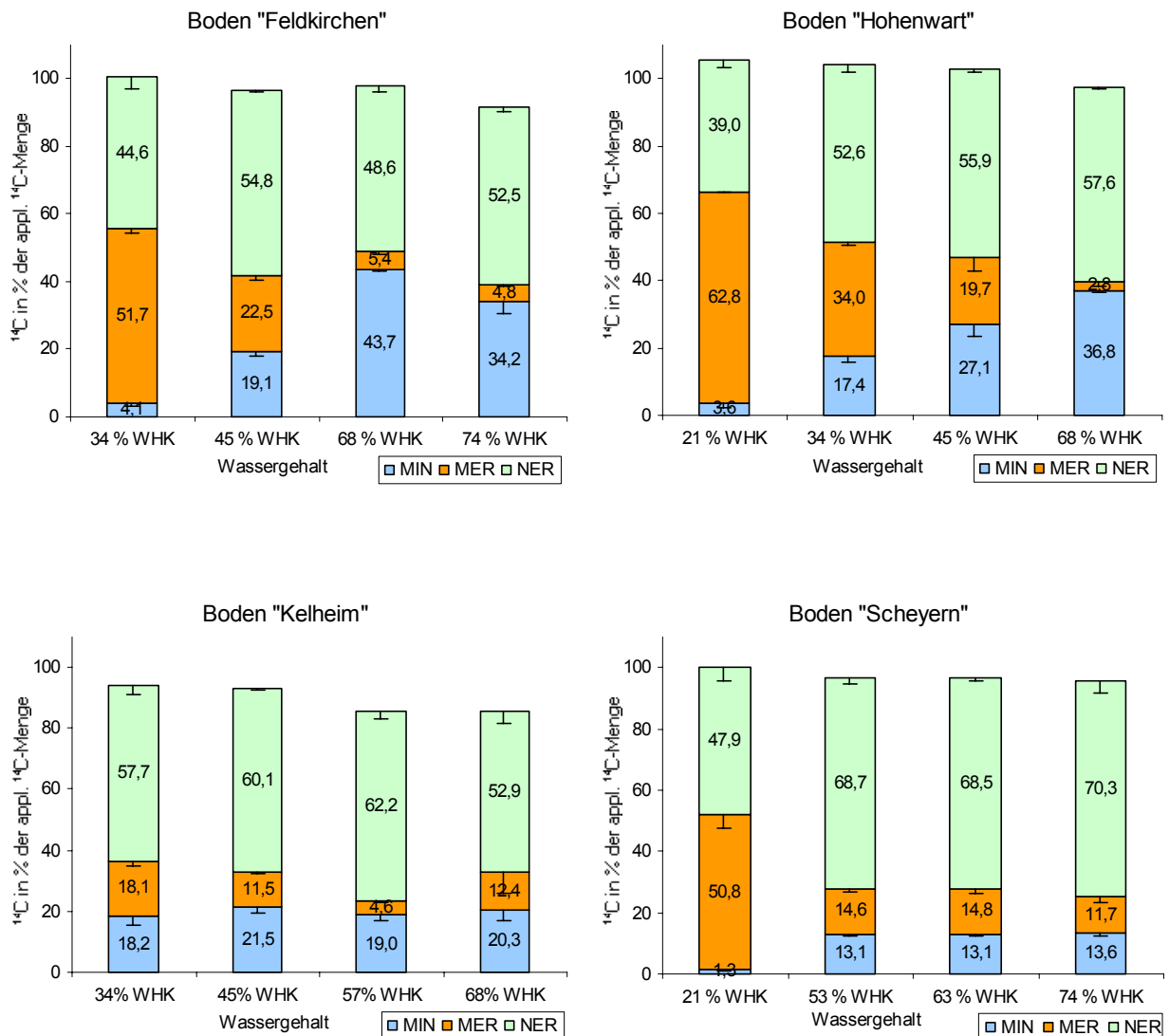


Abbildung 3.7: Mineralisierung (MIN) von ^{14}C -Isoproturon, Methanol-extrahierbare Rückstände (MER) und nicht-extrahierbare Rückstände (NER) der Versuchsböden in den Laborversuchen mit unterschiedlicher Bodenfeuchtigkeit (% WHK) nach 46 Tagen.

Mit steigender Isoproturon-Mineralisierung nahm in den Böden der Anteil der MER, unter denen sich vor allem auch die Ausgangssubstanz verbirgt, ab. Darüber hinaus stellten die NER in allen Versuchsvarianten einen sehr großen Anteil der applizierten ^{14}C -Menge dar. Selbst in den Ansätzen der Böden „Feldkirchen“, „Hohenwart“ und „Scheyern“ mit Wassergehalten von 34 % bzw. 21 % WHK, in denen die Mineralisierung des Wirkstoffs aufgrund des Wassermangels begrenzt war, wurden 39,0 % bis 47,9 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon in Form von NER festgelegt. Für die Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“, die jeweils eine hohe potentielle IPU-Mineralisierung aufwiesen, wurde eine deutliche Tendenz der verstärkten Bildung von NER bei der Steigerung der Fremdstoff-Mineralisierung beobachtet. Die hohe Isoproturon-Mineralisierung führte dazu, dass bei Wassergehalten von 68 % und 74 % WHK im Boden „Feldkirchen“ bzw. bei 68 % WHK im Boden „Hohenwart“ der Anteil der NER am Versuchsende über 90 % der im Boden verbliebenen Gesamttrückstände (MER + NER) betrug. Ein Zusammenhang von Isoproturon-Mineralisierung und Bildung von NER konnte für den Boden „Hohenwart“ durch die Berechnung einer linearen Regression bestätigt werden (Abbildung 3.8).

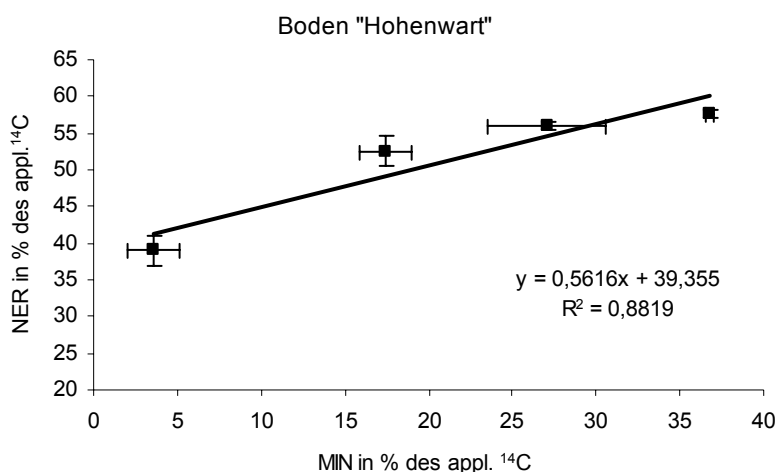


Abbildung 3.8: Zusammenhang zwischen der Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon (MIN) und der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (NER) im Boden „Hohenwart“.

Im Boden „Kelheim“, in dem unterschiedliche Bodenfeuchten zwischen 34 % WHK und 68 % WHK keinen Einfluss auf die Mineralisierung hatten, waren auch keine gerichteten Veränderungen in der Menge an MER und NER zu beobachten (Abbildung 3.7).

Im Boden „Scheyern“ führte eine Erhöhung des Wassergehalts von 21 % auf 53 % WHK zu einer Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung, die mit einer Abnahme der MER und einer Zunahme der NER verbunden war (Abbildung 3.7). Eine weitere Erhöhung des Wassergehalts über den Wert von 53 % WHK hatte im Boden „Scheyern“ weder einen Einfluss auf die Isoproturon-Mineralisierung noch auf die Zusammensetzung der MER und NER.

In den Böden „Kelheim“ und „Scheyern“ war der Anteil der MER auch unter den besten Abbaubedingungen (bei 63 % WHK Boden „Scheyern“ und 68 % WHK Boden „Kelheim“) mit einem Anteil von über 12 % der applizierten ^{14}C -Menge deutlich größer als in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“, wo bei jeweils 68 % WHK nur 5,4 % („Feldkirchen“) bzw. 2,8 % („Hohenwart“) MER gemessen wurden.

3.1.5 Zusammensetzung der Methanol-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände

Die Analyse der MER aus den Laborversuchen zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in den Versuchsböden ergab, dass sich die extrahierbaren Rückstände nicht nur quantitativ (vgl. Abbildung 3.7) sondern z.T. auch qualitativ unterschieden. Die in den Methanolextrakten der Versuchsböden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ detektierten Metabolite, die jeweils aus den Ansätzen mit der minimalen und maximalen Isoproturon-Mineralisierung gewonnen wurden, sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Detektierte Metabolite beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ bei Bodenwassergehalten (% WHK) mit jeweils niedrigster und höchster Mineralisierung. Metabolit A = 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]1-methylharnstoff; Metabolit B = 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff; Metabolit C = 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff; Verunr. = Verunreinigung des applizierten ^{14}C -Standards; unbekannt = nicht identifizierbare Peaks im ^{14}C -HPLC-Chromatogramm.

Name der Peaks	Retentionszeit (min)	Peaks in % des extrahierbaren ^{14}C				^{14}C -Arelon (% ^{14}C)
		Scheyern	Scheyern	Feldkirchen	Feldkirchen	
		21 % WHK	63 % WHK	34 % WHK	68 % WHK	
unbekannt 1	19,2 +/- 0,4		5,0 +/- 2,2	1,0 +/- 0,2		
unbekannt 2	20,7 +/- 0,2					
Metabolit A	21,9 +/- 0,5	2,2 +/- 0,7	15,6 +/- 2,5	6,1 +/- 0,7		
Verunr. 1	23,6 +/- 0,7	9,4 +/- 0,2	5,6 +/- 1,1	5,5 +/- 0,4	5,8 +/- 0,7	0,3 +/- 0,1
Verunr. 2	25,7 +/- 0,7		1,1 +/- 0,5		18,4 +/- 1,1	1,3 +/- 0,2
unbekannt 3	28,1 +/- 0,7		3,4 +/- 2,8			
Metabolit B	29,6 +/- 0,7	6,0 +/- 3,6	7,1 +/- 3,6			
unbekannt 4	32,1 +/- 0,3		3,2 +/- 1,1			
Metabolit C	33,3 +/- 0,4	6,1 +/- 1,2	26,4 +/- 1,3	21,1 +/- 0,9	9,6 +/- 1,5	0,3 +/- 0,1
Isoproturon	35,0 +/- 0,5	33,8 +/- 6,0	21,0 +/- 1,8	64,7 +/- 1,4	66,3 +/- 1,9	98,1 +/- 0,3
unbekannt 5	37,3 +/- 0,3	1,2 +/- 0,2	2,2 +/- 0,4			
unbekannt 6	38,7 +/- 0,5	2,2 +/- 0,5	1,3 +/- 0,5	0,9 +/- 0,2		
unbekannt 7	40,5 +/- 0,9	40,3 +/- 5,8	9,9 +/- 3,4	1,0 +/- 0,6		

Die größten Unterschiede zwischen den Metabolitenmustern der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ wurden bei den für die Mineralisierung günstigsten Wassergehalten von 68 % bzw. 63 % WHK festgestellt (Tabelle 3.1). Bei 68 % WHK war das Metabolitenmuster des Bodens „Feldkirchen“ dem Muster des applizierten ^{14}C -Arelon-Standards sehr ähnlich, was zeigt, dass in diesem Boden keine detektierbaren extrahierbaren Rückstände gebildet wurden, sondern Isoproturon entweder komplett mineralisiert oder in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden festgelegt wurde. Im Boden „Scheyern“ wurden dagegen bei 63 % WHK mehrere Metabolite gebildet, von denen die mit Metabolit A bis C bezeichneten Abbauprodukte identifiziert werden konnten. Beim Metabolit A handelt es sich um 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]1-methylharnstoff, beim Metabolit B um 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff und beim Metabolit C um 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff.

Ein Vergleich der Metabolitenmuster der sehr feuchten ($> 60\%$ WHK) mit den sehr trockenen Ansätzen ($< 35\%$ WHK) der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ zeigt (Tabelle 3.1), dass die Erhöhung des Wassergehalts und die damit verbundene Steigerung der Mineralisierung (vgl. Abbildung 3.7) zu einer deutlichen quantitativen und qualitativen Veränderung der Metabolitenmuster führte. Im Boden „Scheyern“ war die Erhöhung des Wassergehalts mit einer Zunahme der detektierten Metabolite verbunden, während es im Boden „Feldkirchen“ zu einer Reduktion der Metabolite auf das Muster des applizierten Standards kam. Verschiebungen in der prozentualen Zusammensetzung der detektierten Abbauprodukte waren besonders an den Metaboliten A und C zu beobachten, deren Anteil an den MER bei einer Zunahme des Wassergehalt im Boden „Scheyern“ anstieg, während er im Boden „Feldkirchen“ abfiel.

In den Böden „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ wurden jeweils 10 bis 12 übereinstimmende Metabolite detektiert (Tabelle 3.2), die sich quantitativ von Boden zu Boden unterschieden. Das im Boden „Feldkirchen“ bei 68% WHK ausgebildete Metabolitenmuster mit der Reduktion auf 4 Peaks wurde auch im Boden „Hohenwart“, der bei 68% WHK eine dem Boden „Feldkirchen“ vergleichbare Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon erreichte, nicht ausgeprägt. Im Boden „Scheyern“ war die hohe Konzentration des Metaboliten C (= 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff) auffällig, der mit $26,4\%$ der MER den Hauptmetaboliten bildete und damit in größeren Mengen vorlag als ^{14}C -Isoproturon ($21,0\%$ der MER). In den übrigen Böden stellte jeweils ^{14}C -Isoproturon mit einem Wert von $46,4\%$ („Hohenwart“) bis $66,3\%$ („Feldkirchen“) den mit Abstand größten Anteil der MER dar.

(Eine Auswahl der ^{14}C -HPLC-Chromatogramme ist im Anhang (Kapitel 7.1) zu finden.)

Tabelle 3.2: Detektierte Metabolite beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ bei Bodenwassergehalten (% WHK) mit der jeweils höchsten Mineralisierung. Metabolit A = 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]1-methylharnstoff; Metabolit B = 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff; Metabolit C = 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff; Verunr. = Verunreinigung des applizierten ^{14}C -Standards; unbekannt = nicht identifizierbare Peaks im ^{14}C -HPLC-Chromatogramm.

Name der Peaks	Retentionszeit (min)	Peaks in % des extrahierbaren ^{14}C				^{14}C -Arelon (% ^{14}C)
		Scheyern	Kelheim	Hohenwart	Feldkirchen	
		63 % WHK	45 % WHK	68 % WHK	68 % WHK	
unbekannt 1	19,2 +/- 0,4	5,0 +/- 2,2	2,0 +/- 0,0	7,3 +/- n.n.		
unbekannt 2	20,7 +/- 0,2			4,3 +/- n.n.		
Metabolit A	21,9 +/- 0,5	15,6 +/- 2,5	16,9 +/- 2,4	5,2 +/- n.n.		
Verunr. 1	23,6 +/- 0,7	5,6 +/- 1,1	10 +/- 0,2	10,8 +/- n.n.	5,8 +/- 0,7	0,3 +/- 0,1
Verunr. 2	25,7 +/- 0,7	1,1 +/- 0,5	1,4 +/- 0,3	2,8 +/- n.n.	18,4 +/- 1,1	1,3 +/- 0,2
unbekannt 3	28,1 +/- 0,7	3,4 +/- 2,8		3,6 +/- n.n.		
Metabolit B	29,6 +/- 0,7	7,1 +/- 3,6	3,1 +/- 0,5	2,5 +/- n.n.		
unbekannt 4	32,1 +/- 0,3	3,2 +/- 1,1	2,0 +/- 0,2			
Metabolit C	33,3 +/- 0,4	26,4 +/- 1,3	1,6 +/- 0,4	7,9 +/- n.n.	9,6 +/- 1,5	0,3 +/- 0,1
Isoproturon	35,0 +/- 0,5	21,0 +/- 1,8	60,8 +/- 2,1	46,4 +/- n.n.	66,3 +/- 1,9	98,1 +/- 0,3
unbekannt 5	37,3 +/- 0,3	2,2 +/- 0,4	1,2 +/- 0,0			
unbekannt 6	38,7 +/- 0,5	1,3 +/- 0,5	2,3 +/- 0,3	2,1 +/- n.n.		
unbekannt 7	40,5 +/- 0,9	9,9 +/- 3,4		7 +/- n.n.		

3.1.6 Massenbilanzen

In der Tabelle 3.3 sind die Massenbilanzen aller Versuchsvarianten zum Einfluss des Wassergehalts auf das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon dargestellt.

Tabelle 3.3: ^{14}C -Isoproturon-Mineralisierung (MIN), Methanol-extrahierbare Rückstände (MER), nicht-extrahierbare Rückstände (NER) sowie ^{14}C -Massenbilanz (MBL) für die Laborversuche zum ^{14}C -Isoproturon-Abbau in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ bei unterschiedlicher Bodenfeuchtigkeit (% WHK) nach 46 Tagen.

Boden	Wassergehalt	Wiederfindung des applizierten ^{14}C -Isoproturon in %			
		MIN	MER	NER	MBL
"Feldkirchen"	34 % WHK	4,1 ± 1,0	51,7 ± 1,5	44,6 ± 3,6	100,4 ± 3,1
	45 % WHK	19,1 ± 1,1	22,5 ± 1,3	54,8 ± 0,5	96,4 ± 0,9
	68 % WHK	43,7 ± 0,6	5,4 ± 1,0	48,6 ± 1,7	97,7 ± 1,5
	74 % WHK	34,2 ± 3,5	4,8 ± 0,3	52,5 ± 1,4	91,4 ± 4,3
"Kelheim"	34% WHK	18,2 ± 2,8	18,1 ± 1,4	57,7 ± 3,0	94,1 ± 4,1
	45% WHK	21,5 ± 2,1	11,5 ± 0,8	60,1 ± 0,5	93,1 ± 2,0
	57% WHK	19,0 ± 2,2	4,6 ± 0,6	62,2 ± 2,5	85,7 ± 0,6
	68% WHK	20,3 ± 3,4	12,4 ± 6,8	52,9 ± 3,8	85,5 ± 1,4
"Scheyern"	21 % WHK	1,3 ± 0,1	50,8 ± 4,5	47,9 ± 4,5	100,0 ± 1,2
	53 % WHK	13,1 ± 0,5	14,6 ± 0,9	68,7 ± 1,7	96,4 ± 1,8
	63 % WHK	13,1 ± 0,9	14,8 ± 1,6	68,5 ± 0,9	96,4 ± 1,4
	74 % WHK	13,6 ± 1,0	11,7 ± 2,2	70,3 ± 3,8	95,5 ± 4,4
"Hohenwart"	21 % WHK	3,6 ± 1,5	62,8 ± 0,2	39,0 ± 2,0	105,3 ± 3,1
	34 % WHK	17,4 ± 1,5	33,0 ± 0,9	52,6 ± 2,0	103,9 ± 2,7
	45 % WHK	27,1 ± 3,6	19,7 ± 4,0	55,9 ± 0,6	102,7 ± 1,4
	68 % WHK	36,8 ± 0,3	2,8 ± 1,2	57,6 ± 0,4	97,2 ± 1,3

In den Laborversuchen wurden jeweils ca. 100 % des applizierten ^{14}C in den untersuchten Pfaden Mineralisierung, extrahierbare und nicht-extrahierbare Rückstände wiedergefunden (Tabelle 3.3). Die Volatilität der Ausgangssubstanz bzw. der Abbauprodukte war in allen Versuchsböden und bei allen untersuchten Wassergehalten mit einem Wert kleiner 0,2 % der applizierten Wirkstoffmenge zu vernachlässigen.

Die Laborversuche zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon zeigten, dass der Wassergehalt der Versuchsböden einen bodenspezifisch sehr unterschiedlichen Einfluss sowohl auf die Mineralisierung des applizierten Wirkstoffs als auch auf die Bildung der MER und NER hatte.

3.2 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon im Boden-Pflanzen-System unter Freilandbedingungen (1. Lysimeterversuch im Jahr 2001)

Im 1. Lysimeterversuch wurde das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in den Versuchsböden über einen Zeitraum von 56 Tagen unter natürlich wechselnden Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen und unter dem Einfluss von Pflanzen untersucht.

3.2.1 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden

3.2.1.1 Mineralisierung in Böden

Die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon verlief in den untersuchten Böden unter Freilandbedingungen sehr unterschiedlich, wie Abbildung 3.9 zu entnehmen ist.

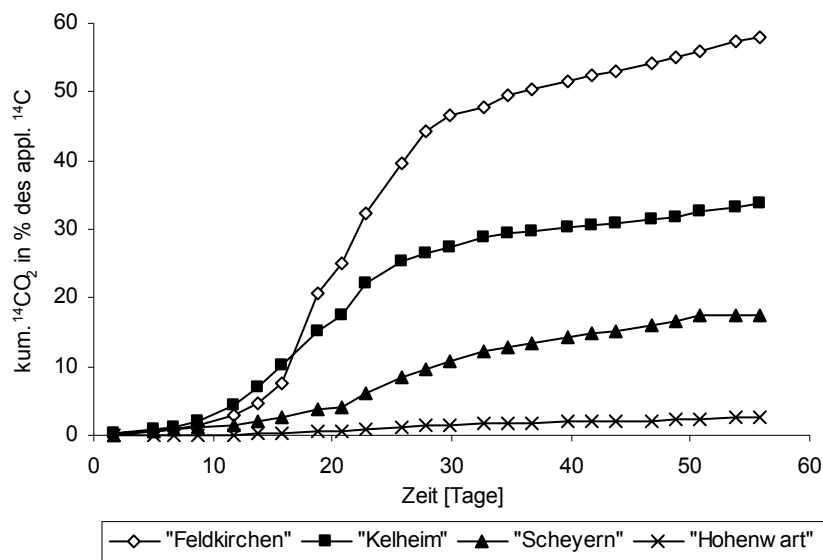


Abbildung 3.9: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unter Freilandbedingungen im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Im Boden „Feldkirchen“ wurde mit einem Wert von 58,0 % die höchste Isoproturon-Mineralisierung der Versuchsböden gemessen. Dagegen wurden im Boden „Kelheim“ nur 33,7 % und im Boden „Scheyern“ 17,5 % des ^{14}C -markierten Wirkstoffs vollständig zu $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut. Die geringste $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung erfolgte im Boden „Hohenwart“, in dem nur 2,6 % der applizierten Herbizidmenge mineralisiert wurden.

3.2.1.2 Freisetzung volatiler ^{14}C -markierter Substanzen aus Böden

Wie Abbildung 3.10 zeigt, wurden direkt nach der Applikation in allen Versuchsböden hohe Volatilitätsraten gemessen, die für die Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Hohenwart“ die Maxima darstellten. Im weiteren Versuchsverlauf nahmen die Volatilitätsraten in den Böden zunächst stark ab, bevor ein bis zwei weitere Anstiege bestimmt wurden.

Im Boden „Scheyern“ wurde die maximale Volatilitätsrate im Gegensatz zu den übrigen Böden erst 12 Tage nach der Applikation gemessen.

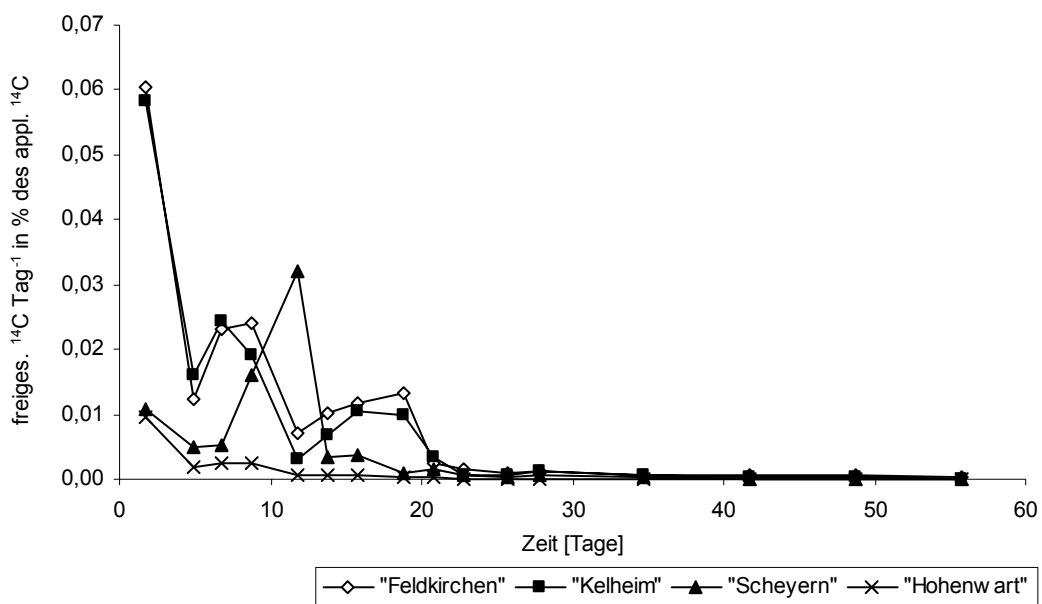


Abbildung 3.10: Volatilitätsraten von ^{14}C -Isoproturon von den Bodenoberflächen der Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unter Freilandbedingungen im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Über einen Zeitraum von vier Wochen nach der Applikation waren volatile ^{14}C -markierte Substanzen messbar, die aufsummiert einen Anteil von 0,04 % („Hohenwart“) bis 0,37 % („Feldkirchen“) des applizierten ^{14}C darstellten.

3.2.1.3 Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände in Böden

Die Rückstandsanalyse, die 56 Tage nach der Applikation für den Bereich von 0 bis 15 cm Bodentiefe erstellt wurde (Tabelle 3.4), zeigt, dass ein bedeutender Anteil des applizierten ^{14}C -Isoproturon in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen in den Versuchsböden festgelegt wurde. Im Boden „Hohenwart“ war der Anteil der NER mit einem Wert von 67,44 % des applizierten Wirkstoffs besonders hoch.

Tabelle 3.4: Methanol-extrahierbare Rückstände (MER), nicht-extrahierbare Rückstände (NER) und ^{14}C -Gesamtrückstände (GRB) in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ von 0 bis 15 cm Bodentiefe; 56 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Lysimeter	Wiederfindung des applizierten ^{14}C in %		
	MER	NER	GRB
"Feldkirchen"	13,01	22,19	35,20
"Kelheim"	14,50	47,19	61,69
"Scheyern"	22,57	49,72	72,29
"Hohenwart"	19,61	67,44	87,04

Da die Analyse der Rückstände im Lysimeterversuch getrennt für jeweils 5 cm dicke Tiefenbereiche durchgeführt wurde, war es möglich, die Verlagerung des applizierten ^{14}C -Wirkstoffs in tiefere Bodenbereiche zu verfolgen (Tabelle 3.5). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Anteil der NER der Versuchsböden in den untersuchten Tiefenbereichen jeweils deutlich größer war als der Anteil der MER. Wie Tabelle 3.5 zeigt, wurde im Boden „Hohenwart“ die stärkste Verlagerung der applizierten ^{14}C -

Menge in 5 bis 15 cm Bodentiefe und die größte Menge an NER der Versuchsböden gemessen.

Tabelle 3.5: Methanol-extrahierbare (MER), nicht-extrahierbare (NER) und ^{14}C -Gesamtrückstände (GRB) in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ in jeweils 5 cm dicken Tiefenbereichen von 0 bis 15 cm Tiefe; 56 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Lysimeter	Bodentiefe	^{14}C -Rückstände in $\mu\text{g } ^{14}\text{C g}^{-1}$ Boden		
		MER	NER	GRB
"Feldkirchen"	0 - 5 cm	0,13	0,15	0,28
	5 - 10 cm	0,04	0,19	0,23
	10 - 15 cm	0,03	0,08	0,11
"Kelheim"	0 - 5 cm	0,07	0,29	0,36
	5 - 10 cm	0,03	0,17	0,20
	10 - 15 cm	0,02	0,07	0,09
"Scheyern"	0 - 5 cm	0,15	0,39	0,54
	5 - 10 cm	0,04	0,14	0,18
	10 - 15 cm	0,04	0,07	0,10
"Hohenwart"	0 - 5 cm	0,13	0,49	0,56
	5 - 10 cm	0,06	0,25	0,31
	10 - 15 cm	0,02	0,09	0,12

Die Analyse der Rückstände im Zeitraum von 28 bis 56 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon ergab starke Schwankungen in der Menge der ^{14}C -Gesamtrückstände in den Böden (GRB), wie Tabelle 3.6 zu entnehmen ist. Diese Schwankungen waren auf versuchsbedingte Einflüsse (z.B. die Spritzapplikation auf Boden, Steine und Pflanzen) sowie auf die Maßnahmen der Analysenvorbereitung zurückzuführen und gingen nicht auf Inhomogenitäten der Wirkstoff-Mineralisierung zurück. Diese Aussage ließ sich dadurch bestätigen, dass man den Quotienten von MER bzw. NER zu den GRB bildete, wodurch die Schwankungen der Einzelwerte nivelliert wurden (Ausnahme: Boden „Feldkirchen“ mit hohem Steinanteil). Wie Tabelle 3.6 zeigt, nahm im Versuchsverlauf der relative Anteil der NER an den GRB in den Böden „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ bis zu einem Maximum nach 42 Tagen zu, bevor der Anteil der NER wieder leicht abnahm.

Tabelle 3.6: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon (MIN), Gesamtrückstände (GRB) und nicht-extrahierbare Rückstände (NER) in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ in % der applizierten ^{14}C -Menge bzw. als Quotient der NER zu GRB im Zeitraum von 28 bis 56 Tage nach der Applikation im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Lysimeter		Zeit nach der Applikation in Tagen			
		28	35	42	56
"Feldkirchen"	MIN in %	44,15	49,57	52,29	57,95
	GRB in %	44,65	77,28	25,49	35,20
	NER in %	30,62	57,21	6,33	22,19
	NER / GRB	0,69	0,74	0,25	0,63
"Kelheim"	MIN in %	26,61	29,46	30,50	33,66
	GRB in %	63,36	63,57	58,14	61,69
	NER in %	46,06	48,91	46,60	47,19
	NER / GRB	0,73	0,77	0,80	0,76
"Scheyern"	MIN in %	9,71	12,81	14,81	17,51
	GRB in %	61,49	85,16	70,22	72,29
	NER in %	36,33	58,45	54,38	49,72
	NER / GRB	0,59	0,69	0,77	0,69
"Hohenwart"	MIN in %	1,32	1,75	2,03	2,59
	GRB in %	102,03	109,81	74,10	87,04
	NER in %	68,59	85,02	62,54	67,44
	NER / GRB	0,67	0,77	0,84	0,77

3.2.1.4 Zusammensetzung der Methanol-extrahierbaren ^{14}C -Rückstände

Im Lysimeterversuch wurden die MER aus 0 bis 15 cm Bodentiefe 28, 35 und 42 Tage nach der Applikation analysiert. Im Boden „Scheyern“ wurden qualitative und quantitative Veränderung des Metabolitenmusters detektiert (Tabelle 3.7). So nahm im Versuchsverlauf im Boden „Scheyern“ die Zahl der detektierten Metabolite zu. Zugleich wurden Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung der MER anhand des Metabolits C (Anstieg von 18,8 % auf 27,8 % der MER) und Isoproturon (Abnahme von 43,5 % auf 31,3 % der MER) deutlich.

Tabelle 3.7.: Detektierte Metabolite im Boden „Scheyern“ (0 bis 15 cm Bodentiefe) 28, 35 und 42 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001. Metabolit A = 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]-1-methylharnstoff; Metabolit B = 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff; Metabolit C = 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff; Verunr. = Verunreinigung des applizierten ^{14}C -Standards; unbekannt = nicht identifizierbare Peaks im ^{14}C -HPLC-Chromatogramm.

Name der Peaks	Retentionszeit (min)	Peaks in % des extrahierbaren ^{14}C			^{14}C -Arelon (% ^{14}C)
		Boden "Scheyern"			
		nach 28 Tagen	nach 35 Tagen	nach 42 Tagen	
unbekannt 1	19,2 +/- 0,4		3,8	2,7	
unbekannt 2	20,7 +/- 0,2				
Metabolit A	21,9 +/- 0,5	7,7	5,4	5,4	
Verunr. 1	23,6 +/- 0,7	4,2	5,6	3,6	0,3 +/- 0,1
Verunr. 2	25,7 +/- 0,7				1,3 +/- 0,2
unbekannt 3	28,1 +/- 0,7			2,4	
Metabolit B	29,6 +/- 0,7		2,7	2,5	
unbekannt 4	32,1 +/- 0,3				
Metabolit C	33,3 +/- 0,4	18,8	25,8	27,8	0,3 +/- 0,1
Isoproturon	35,0 +/- 0,5	43,5	32	31,3	98,1 +/- 0,3
unbekannt 5	37,3 +/- 0,3	4,3	5,3	4,7	
unbekannt 6	38,7 +/- 0,5	5,6	3,3	3,2	
unbekannt 7	40,5 +/- 0,9	16	16,2	16,5	

Die Metabolitenmuster der übrigen Versuchsböden ergaben keine auffälligen Besonderheiten. Nach einer Versuchsdauer von über 35 Tagen war Isoproturon in den Böden „Kelheim“, „Hohenwart“ und „Feldkirchen“ noch mit einem prozentualen Anteil von 32,5 % („Kelheim“) bis 55,9 % („Feldkirchen“) im Bodenextrakt enthalten und bildete jeweils den Hauptrückstand (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Detektierte Metabolite in den Böden „Scheyern“, „Kelheim“, „Hohenwart“ und „Feldkirchen“ (0 bis 15 cm Bodentiefe) 35 bzw. 42 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001. Metabolit A = 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]1-methylharnstoff; Metabolit B = 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff; Metabolit C = 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff; Verunr. = Verunreinigung des applizierten ^{14}C -Standards; unbekannt = nicht identifizierbare Peaks im ^{14}C -HPLC-Chromatogramm.

Name der Peaks	Retentionszeit (min)	Peaks in % des extrahierbaren ^{14}C				^{14}C -Arelon (% ^{14}C)
		Scheyern	Kelheim	Hohenwart	Feldkirchen	
		nach 42 Tagen	nach 42 Tagen	nach 35 Tagen	nach 42 Tagen	
unbekannt 1	19,2 +/- 0,4	2,7	6,1	4,4	2,3	
unbekannt 2	20,7 +/- 0,2					
Metabolit A	21,9 +/- 0,5	5,4	14,8	13,5	7,6	
Verunr. 1	23,6 +/- 0,7	3,6	7,5	4,7	6,5	0,3 +/- 0,1
Verunr. 2	25,7 +/- 0,7					1,3 +/- 0,2
unbekannt 3	28,1 +/- 0,7	2,4	2,3			
Metabolit B	29,6 +/- 0,7	2,5				
unbekannt 4	32,1 +/- 0,3					
Metabolit C	33,3 +/- 0,4	27,8	21,5	16,2	17,7	0,3 +/- 0,1
Isoproturon	35,0 +/- 0,5	31,3	32,5	44,3	55,9	98,1 +/- 0,3
unbekannt 5	37,3 +/- 0,3	4,7	3,7	4,1		
unbekannt 6	38,7 +/- 0,5	3,2	5	5,7	4,6	
unbekannt 7	40,5 +/- 0,9	16,5	6,6	7,1	5,4	

3.2.1.5 Einfluss von Bodentemperatur und -feuchtigkeit auf das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon

Im 1. Lysimeterversuch wurden Feuchtigkeits- und Temperatursensoren in den Bodenkammern der Lysimeter „Scheyern“ und „Hohenwart“ installiert, um den Effekt dieser natürlich schwankenden Bodenparameter auf den Abbau von ^{14}C -Isoproturon untersuchen zu können. In den Böden „Feldkirchen“ und „Kelheim“ konnten diese Parameter im Jahr 2001 nicht aufgenommen werden, da zu diesem Zeitpunkt die neu entwickelten Feuchtigkeitssensoren nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung standen.

3.2.1.5.1 Einfluss auf die Mineralisierung

Die während des 1. Lysimeterversuchs berechneten Mineralisierungsraten der Versuchsböden sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

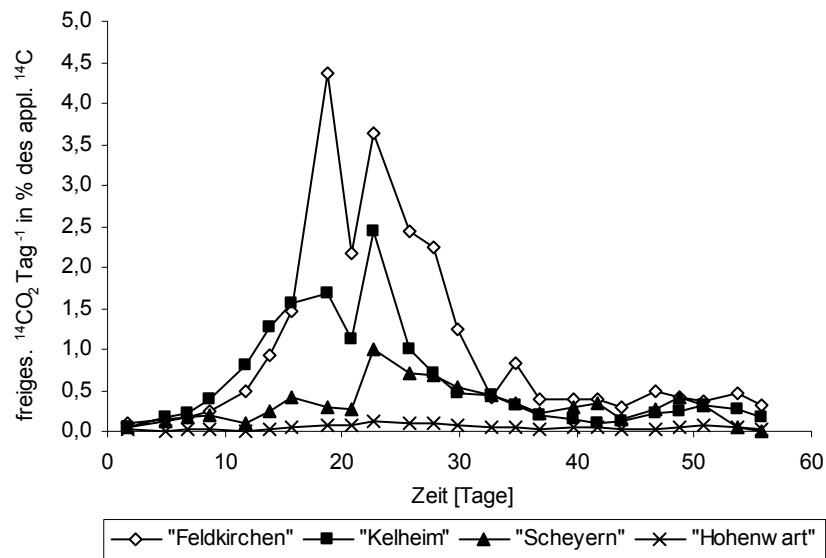


Abbildung 3.11: Mineralisierungsraten von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

In den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ wurde zu Versuchsbeginn eine lag-Phase (= Phase reduzierten Abbaus) von 7 bis 12 Tagen beobachtet, bevor es zu einem deutlichen Anstieg der Mineralisierungsraten kam. Im Boden „Hohenwart“ wurde dagegen kaum ein Anstieg der Mineralisierungsraten detektiert.

Für die Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ wurden deutliche Maxima der Mineralisierungsraten nach 16 bzw. 19 und 23 Versuchstagen berechnet, zwischen denen ein kurzzeitiger Abfall der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung bestimmt wurde (Abbildung 3.11). Dieser auffällige Kurvenverlauf war auf den Einfluss der Bodentemperatur und –feuchtigkeit zurückzuführen, was für den Boden „Scheyern“ anhand der Abbildung 3.12 und der Abbildung 3.13 gezeigt wird.

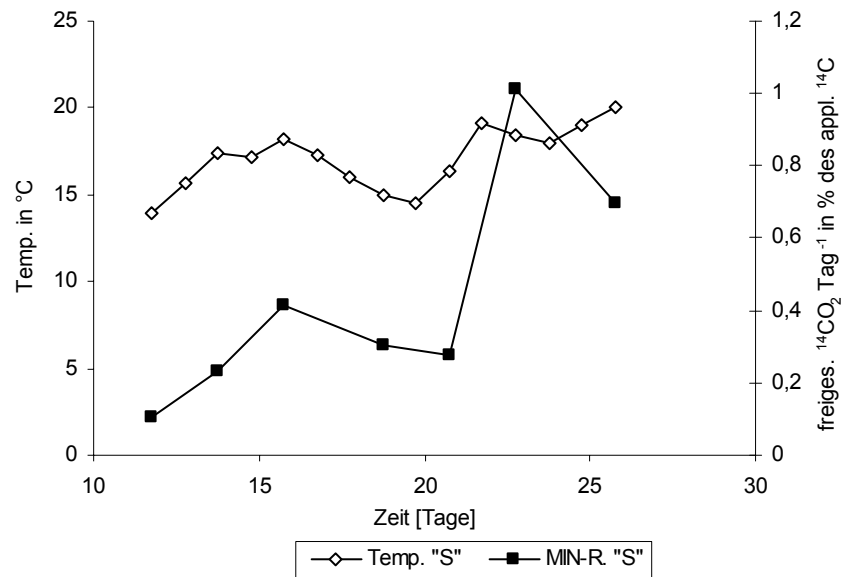


Abbildung 3.12: Verlauf der Bodentemperatur (Temp. „S“) und der Mineralisierungsraten von ¹⁴C-Isoproturon im Boden „Scheyern“ (MIN-R. „S“) im Zeitraum von 12 bis 26 Tagen nach der Applikation im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Wie Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, war ein Anstieg der Bodentemperatur im Lysimeter „Scheyern“ innerhalb des Zeitraums von 12 bis 26 Tage nach der Applikation jeweils mit einem Anstieg der Mineralisierungsrate von ¹⁴C-Isoproturon verbunden. Temperaturschwankungen, die während der lag-Phase gemessen wurden, hatten dagegen keine messbaren Auswirkungen auf die Mineralisierungsraten.

Die Veränderungen der Bodenfeuchtigkeit im Boden „Scheyern“ wirkten sich unmittelbar auf die ¹⁴CO₂-Freisetzung unter Freilandbedingungen aus (Abbildung 3.13). Im Zeitraum von 3 bis 7 Tage nach der Applikation wurde im Boden „Scheyern“ zunächst eine starke Abnahme des Wassergehalts festgestellt, die zu einer Austrocknung der Bodenporen bis kleiner 0,2 μm (vgl. Abbildung 3.4) führte. Im weiteren Versuchsverlauf wurde zwischen den Versuchstagen 9 und 12 eine starke Zunahme des gravimetrischen Wassergehalts bis auf ca. 32 % gemessen, die einen exponentiellen Anstieg der Mineralisierungsraten nach sich zog (Versuchstage 12 - 16). Diese Phase hoher Mineralisierung wurde durch eine erneute Trockenperiode

unterbrochen, so dass es im Boden „Scheyern“ erst nach einem erneuten Regenereignis am Versuchstag 21 bzw. 22 zur Ausbildung des Maximums der Mineralisierungsraten kommen konnte.

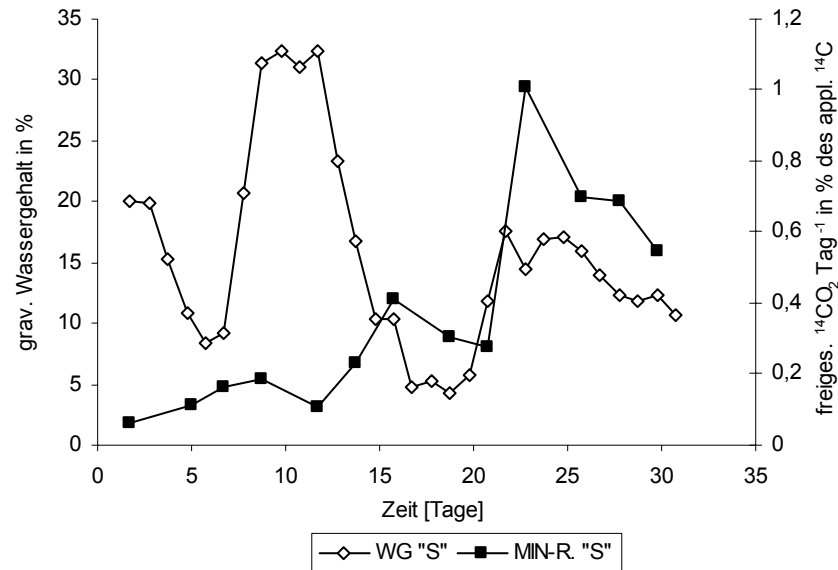


Abbildung 3.13: Verlauf des Bodenwassergehalts (WG "S") und der Mineralisierungsraten von ¹⁴C-Isoproturon im Boden „Scheyern“ (MIN-R. "S") im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Bodenfeuchtigkeit als auch die Bodentemperatur einen Einfluss auf den dynamischen Prozess der Wirkstoffmineralisierung im Lysimeterversuch hatten. Mit dem begrenzten Datensatz war es jedoch nicht möglich, den Zusammenhang zwischen den Bodenparametern Temperatur und Feuchtigkeit einerseits und der Herbizid-Mineralisierung andererseits zu berechnen.

Wie Vergleichsmessungen der Bodentemperatur und –feuchtigkeit in allen vier Lysimeterböden im Anschluss an den Versuchszeitraum zeigten, führten Regenereignisse und Temperaturveränderungen zu zeitgleichen Schwankungen der Feuchtigkeits- und Temperaturmesswerte in den untersuchten Böden, die sich nur in der

Amplitude aber nicht in der Dauer unterschieden (Abbildung 3.14). Somit lässt sich der zwischen dem Versuchstag 19 und 23 in den Böden „Feldkirchen“ und „Kelheim“ gemessene Abfall der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung (vgl. Abbildung 3.11), der noch deutlicher ausfiel als im Boden „Scheyern“, ebenfalls auf starke Veränderungen der Bodentemperatur und –feuchtigkeit zurückführen.

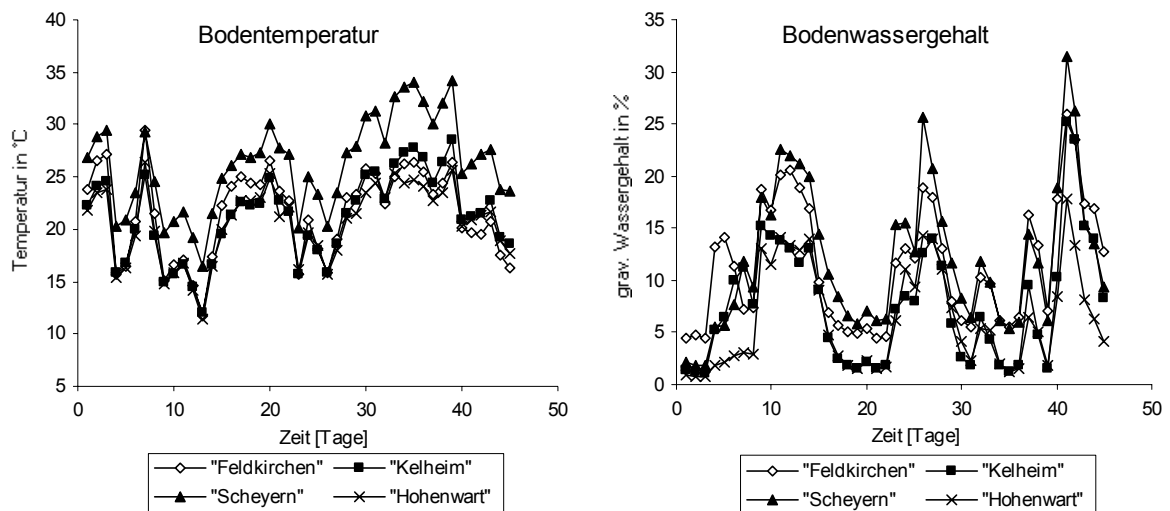


Abbildung 3.14: Verlauf der Bodentemperatur und des Bodenwassergehalts in den Lysimetern „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ in 0,5 cm Bodentiefe. Die Datenaufnahme erfolgte nach Abschluss des 1. Lysimeterversuchs im Jahr 2001.

Im Boden „Hohenwart“ wurde während der ersten 30 Tage nach der Applikation im 1. Lysimeterversuch ein durchschnittlicher gravimetrischer Wassergehalt von nur 2,9 % bestimmt, was 9 % der max. WHK dieses Bodens entsprach. Diese andauernde Trockenheit war für die niedrige Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Boden „Hohenwart“ verantwortlich, wie ein Vergleich des Lysimeterversuchs mit den im Kapitel 3.1.1 dargestellten Laborversuchen verdeutlicht.

3.2.1.5.2 Einfluss auf die Volatilität

In den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Hohenwart“ wurden die maximalen Volatilitätsraten am Versuchsbeginn festgestellt (vgl. Abbildung 3.10), was durch ein Regenereignis am Tag nach der Applikation begünstigt wurde (vgl. Abbildung 3.15), das die größere Volatilität aus der wässrigen Phase ermöglichte.

Im Boden „Scheyern“ wurde die maximale Volatilitätsrate dagegen erst 12 Tage nach der Applikation gemessen (Abbildung 3.15). Das Regenereignis direkt nach der Applikation hatte hier nur geringe Auswirkungen auf den Wassergehalt an der Bodenoberfläche, da dieser Boden aufgrund langer Trockenheit von Schrumpfungsrissen durchzogen war, die ein schnelles Abfließen des Wassers in untere Bodenbereiche ermöglichten. Erst die Regenereignisse 6 bzw. 7 Tage nach der Applikation sorgten, nachdem die Schrumpfungsrisse nahezu verschwunden waren, im Boden „Scheyern“ zu einem deutlichen Anstieg des Wassergehalts an der Bodenoberfläche und führten zu dem Volatilitätsmaximum am Tag 12 nach der Isoproturon-Applikation (Abbildung 3.15).

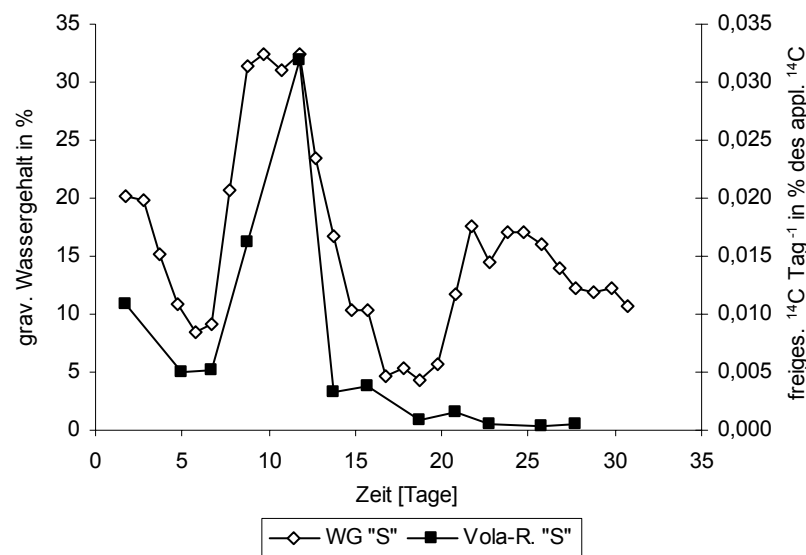


Abbildung 3.15: Verlauf des Bodenwassergehalts (WG "S") und der Volatilitätsraten von ¹⁴C-Isoproturon (Vola-R. "S") im Boden „Scheyern“ im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Nach dem Abfall der anfänglich sehr hohen Volatilitätsraten aus den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Hohenwart“ wurde die Freisetzung volatiler ^{14}C -markierter Verbindungen aus diesen Böden stark von der Bodentemperatur beeinflusst, wie ein Vergleich mit dem im Boden „Hohenwart“ gemessenen Temperaturverlauf zeigt (Abbildung 3.16).

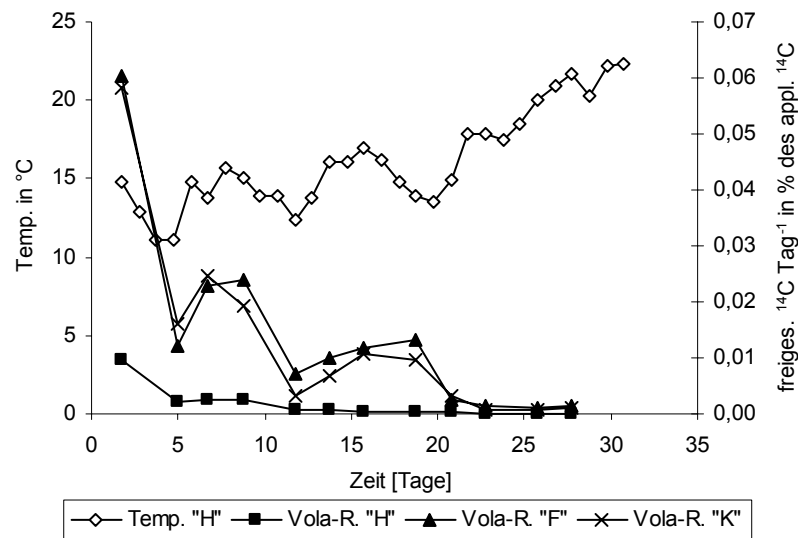


Abbildung 3.16: Verlauf der Bodentemperatur des Bodens „Hohenwart“ (Temp. „H“) und der Volatilität ^{14}C -markierter Substanzen aus den Böden „Feldkirchen“ (Vola-R. „F“), „Kelheim“ (Vola-R. „K“) und „Hohenwart“ (Vola-R. „H“) im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

Somit war es mit Hilfe der verwendeten Sensoren möglich, den unmittelbaren Einfluss der Bodentemperatur und –feuchtigkeit auf die Volatilität von ^{14}C -Isoproturon unter Freilandbedingungen in den Versuchsböden zu belegen. Aufgrund der geringen Anzahl an Böden und Sensorwerten war es jedoch nicht möglich, den jeweiligen Einfluss der Bodenparameter auf die Volatilität der ^{14}C -Chemikalie zu quantifizieren.

3.2.2 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Pflanzen

Bei der Applikation gelangte ein Teil des Pestizids direkt auf die Pflanzenoberfläche und führte dazu, dass beim Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Pflanzen zwei Effekte gemessen wurden: Erstens die Volatilität bzw. der Photoabbau von auf die Pflanzenoberflächen appliziertem ^{14}C -Isoproturon und zweitens die Emissionen von Isoproturon und seinen Abbauprodukten inklusive $^{14}\text{CO}_2$, die von den Wurzeln aufgenommen, durch die Stängel transportiert und schließlich von den Blättern an die Atmosphäre abgegeben wurden.

3.2.2.1 Mineralisierung in Pflanzen

Im Lysimeter „Hohenwart“ wurde, mit einem Wert von 13,65 % des applizierten Wirkstoffs, die mit Abstand größte Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon durch den Pflanzenbestand gemessen. Dagegen wurde im Lysimeter „Scheyern“ eine $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung über die Pflanzen von 6,80 %, im Lysimeter „Feldkirchen“ von 2,85 % und im Lysimeter „Kelheim“ von nur 2,01 % des applizierten Wirkstoffs bestimmt (Abbildung 3.17).

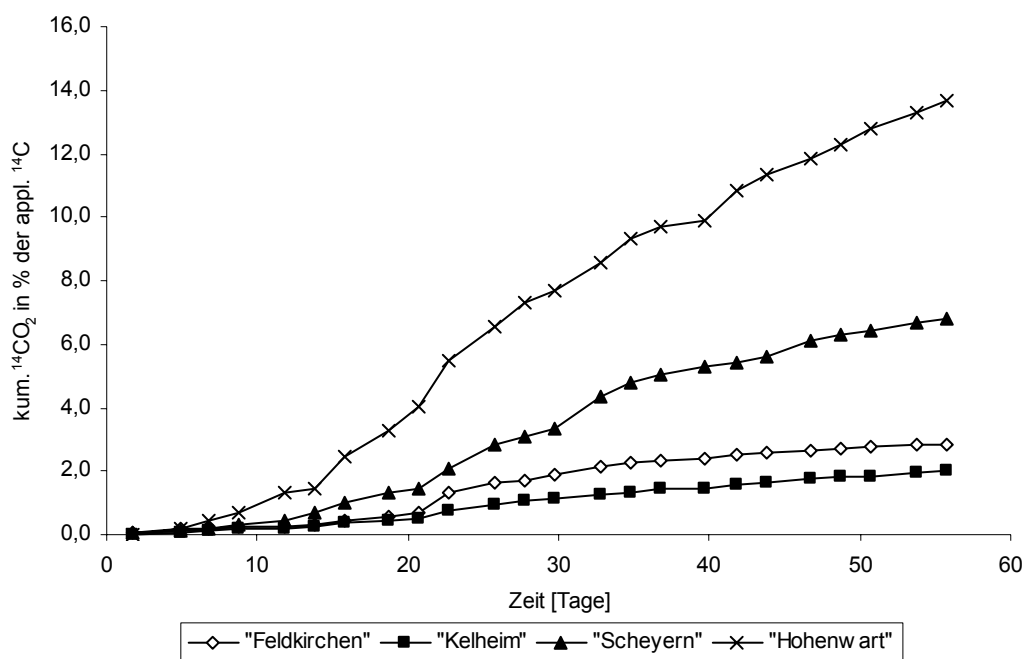


Abbildung 3.17: Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon durch die Pflanzen der Lysimeter „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001.

3.2.2.2 Freisetzung volatiler ¹⁴C-markierter Substanzen aus Pflanzen

Die größte Freisetzung an ¹⁴C-markierten volatilen Verbindungen erfolgte durch die Pflanzen des Lysimeters „Hohenwart“, aus denen über die gesamte Versuchszeit 1,13 % des applizierten Isoproturon in volatiler Form emittierten. Hohe Volatilitätswerte (0,90 %) wurden ebenfalls für die Pflanzen des Lysimeters „Scheyern“ gemessen, während hingegen aus den Pflanzen der Lysimeter „Feldkirchen“ und „Kelheim“ nur 0,12 % bzw. 0,16 % des Wirkstoffs volatilisierten.

3.2.3 Verlagerung von ¹⁴C-Isoproturon im Sickerwasser und Massenbilanzen

Neben der Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon und der Freisetzung volatiler Verbindungen aus den Böden bzw. den Pflanzen wurde der Austrag von ¹⁴C-markierten Verbindungen mit dem Sickerwasser quantifiziert (Datenerhebung durch Dörfler, IBOe, GSF). Das aus den Lysimeterböden austretende Sickerwasser wurde über die gesamte

Versuchszeit aufgefangen und jeweils einmal wöchentlich das Volumen und die enthaltene ^{14}C -Radioaktivität bestimmt. Wie der Tabelle 3.9 zu entnehmen ist, wurden im 1. Lysimeterversuch nahezu 100 % des applizierten Wirkstoffs in den verschiedenen Kompartimenten des Systems wiedergefunden.

Tabelle 3.9: Wiederfindung des applizierten ^{14}C -Isoproturon im Boden- und Pflanzensystem nach 56 Versuchstagen unter Freilandbedingungen in den Lysimetersystemen „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ im 1. Lysimeterversuch im Jahr 2001; MIN = Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon, Vola = volatile ^{14}C -Verbindungen, GRB bzw. GRP = ^{14}C -Gesamtrückstände in Böden bzw. Pflanzen, SiWa = ^{14}C -Rückstände im Sickerwasser, MBL = Massenbilanz für ^{14}C -Isoproturon.

Lysimeter	Wiederfindung des applizierten ^{14}C in %							
	System Boden			System Pflanzen			SiWa	MBL
	MIN	Vola	GRB	MIN	Vola	GRP		
"Feldkirchen"	57,95	0,37	35,20	2,85	0,12	0,08	0,05	96,62
"Kelheim"	33,66	0,33	61,69	2,01	0,16	0,18	0,02	98,05
"Scheyern"	17,51	0,20	72,29	6,80	0,90	0,22	0,50	98,42
"Hohenwart"	2,59	0,04	87,04	13,65	1,13	0,46	0,004	104,91

3.3 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon im 2. Lysimeterversuch im Jahr 2002

Im 2. Lysimeterversuch (2002) wurden die Bodenkammern aller Lysimeterböden mit Feuchtigkeits- und Temperatursensoren ausgerüstet und der Abbau des applizierten ^{14}C -Isoproturon über einen Zeitraum von 46 Tagen verfolgt. Auch im Jahr 2002 waren die Lysimeter mit Pflanzen bewachsen, ihr Einfluss auf das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon wurde jedoch nicht direkt verfolgt.

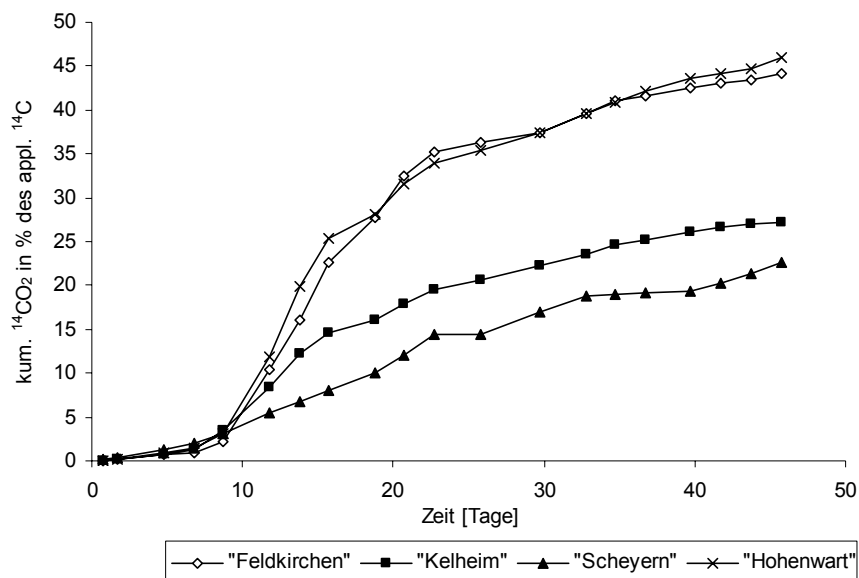


Abbildung 3.18: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unter Freilandbedingungen im 2. Lysimeterversuch im Jahr 2002.

Wie Abbildung 3.18 zeigt, wurde der stärkste Abbau von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ gemessen, aus denen 44,2 % („Feldkirchen“) bzw. 46,0 % („Hohenwart“) des applizierten ^{14}C -Wirkstoffs in Form von $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt wurden. Im Gegensatz dazu war die Mineralisierung im Boden „Scheyern“ mit 22,6 % und im Boden „Kelheim“ mit 27,2 % stark reduziert.

3.4 Zusammenfassung des Verhaltens von ¹⁴C-Isoproturon unter Labor- und Freilandbedingungen

Die Ergebnisse der Labor- und Lysimeterversuche zum Verhalten von ¹⁴C-Isoproturon in den Versuchsböden sind in der Tabelle 3.10 zusammengestellt, in die jeweils die Werte zur Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon bis 46 Tage nach Versuchsbeginn sowie die durchschnittliche Bodentemperatur und –feuchtigkeit während der ersten 30 Tage nach der Applikation aufgenommen wurde.

Tabelle 3.10: Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon (Min in %) in Lysimeter- und Laborversuchen (46 Tage nach der Applikation) sowie Mittelwerte der Bodentemperatur (Temp. in °C) und –feuchtigkeit (WG in % WHK) über einen Zeitraum von 30 Tagen nach der Applikation des Wirkstoffs.

Boden	Lysimeterversuch 1			Lysimeterversuch 2			Laborversuch		
	WG in % WHK	Temp. in °C	Min in %	WG in % WHK	Temp. in °C	Min in %	WG in % WHK	Temp. in °C	Min in %
"Feldkirchen"			54,3	40,0	21,6	44,2	68,0	20,0	43,7
"Kelheim"			31,4	47,3	22,0	27,2	45,0	20,0	21,5
"Scheyern"	32,9	17,0	15,9	61,4	22,0	22,6	63,0	20,0	13,1
"Hohenwart"	8,5	16,2	2,2	58,4	20,5	46,0	68,0	20,0	36,8

Wie der Tabelle 3.10 zu entnehmen ist, erreichte die Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ in den verwendeten Versuchssystemen jeweils vergleichbare Werte. Eine Ausnahme bildete der Boden „Hohenwart“, wo im 1. Lysimeterversuch eine im Vergleich zu den übrigen Versuchsansätzen ungewöhnlich niedrige Isoproturon-Mineralisierung gemessen wurde. Dies war, wie bereits im Kapitel 3.2.1.5.1 gezeigt wurde, auf den extrem niedrigen Wassergehalt des Bodens „Hohenwart“ während des 1. Lysimeterversuchs zurückzuführen.

Leichte Unterschiede zwischen den Labor- und Lysimeterversuchen waren in der Dynamik der Isoproturon-Mineralisierung zu erkennen. Wie Abbildung 3.19 zeigt, ging die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Laborversuchen bereits nach 4 Tagen in die exponentielle Phase über, während in den Lysimeterversuchen eine lag-Phase von mindestens 7 Tagen gemessen wurde.

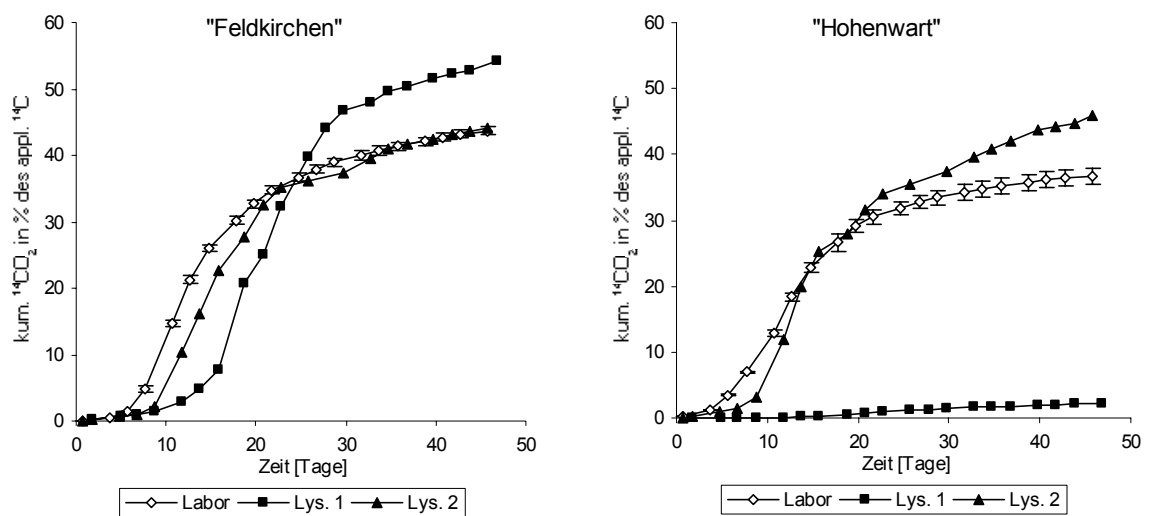


Abbildung 3.19: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Laborversuchen bei 68 % WHK (Labor), im 1. Lysimeterversuch (Lys. 1) und im 2. Lysimeterversuch (Lys. 2) der Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“.

Ein weiterer Unterschied zwischen der in den Labor- und Lysimeterversuchen gemessenen Isoproturon-Mineralisierung bestand im Übergang der exponentiellen Abbauphase in eine Plateauphase. Während sich die Mineralisierung im Laborsystem bereits 20 Tage nach Versuchsbeginn deutlich abschwächte, wurden unter Freilandbedingungen in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ z.T. auch 30 Tage nach der Applikation noch deutlich höhere Mineralisierungsraten gemessen (Abbildung 3.19).

3.5 Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon durch bodenbürtige Mikroorganismengemeinschaften in Flüssigkultur

Um den Einfluss der bodenbürtigen Mikroorganismen auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon beurteilen zu können, wurde der Totalabbau des Herbizids in Flüssigkulturen der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ untersucht, da zwischen diesen beiden Böden in den Laborversuchen die größten Unterschiede hinsichtlich der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung gemessen wurden.

3.5.1 Flüssigkulturen „Feldkirchen“

Wie der Abbildung 3.20 zu entnehmen ist, erreichte die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Flüssigkulturen FK „A“ (44,2 %) und FK „B“ (47,5 %) des Bodens „Feldkirchen“ über einen Versuchszeitraum von 36 bzw. 28 Tagen dem nativen Boden (41,4 %) vergleichbare Werte.

Dagegen wurden beachtliche Unterschiede in der Dynamik der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung der Versuchsansätze beobachtet, die anhand der maximalen Mineralisierungsrate und der Dauer der lag-Phase messbar waren: Während im Boden „Feldkirchen“ eine maximale $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung von 3,3 % pro Tag berechnet wurde, wurde in den Flüssigkulturen FK „A“ und FK „B“ ein Wert von 5,0 % bzw. 4,9 % Mineralisierung pro Tag gemessen (Tabelle 3.11). Die lag-Phase der Isoproturon Mineralisierung betrug in der Flüssigkultur FK „A“ 11 Tage und dauerte damit deutlich länger als im nativen Boden „Feldkirchen“, in dem sie nur 4 Tage betrug. In der Flüssigkultur FK „B“ wurde gar keine lag-Phase durchlaufen, was, verbunden mit der gesteigerten Mineralisierung dieses Ansatzes, auf die größere Präsenz von Mikroorganismen bzw. spezifischen Enzymen hinwies, die in der Lage waren, das applizierte Herbizid zu $^{14}\text{CO}_2$ abzubauen.

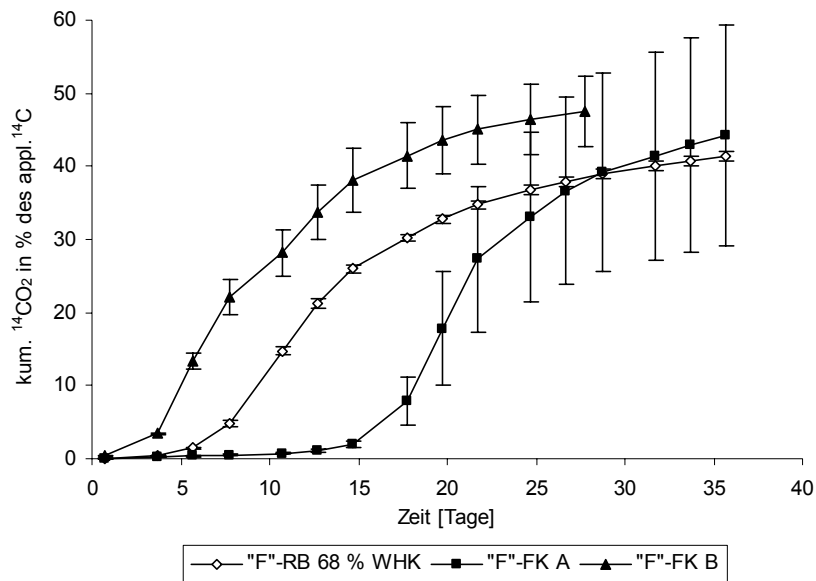


Abbildung 3.20: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im nativen Boden „Feldkirchen“ („F“-RB 68 % WHK) sowie in den Flüssigkulturen FK „A“ und FK „B“ („F“-FK A bzw. B) dieses Bodens. Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

Die unterschiedliche Dynamik der Isoproturon-Mineralisierung in den Flüssigkulturen FK „A“ und FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“ konnte nicht mit einer unterschiedlichen Entwicklung der Lebendzellzahl der Mikroorganismen in den Flüssigkulturen erklärt werden, deren Anzahl, unabhängig von der Mineralisierungs-Dynamik, zwischen 1×10^6 und 1×10^7 KBE ml^{-1} Flüssigkultur schwankte.

In den Flüssigkulturen FK „A“ und FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“ wurde eine Zeitspanne von 7 Tagen festgestellt, in der eine schnelle Abnahme der ^{14}C -Radioaktivität im filtrierten Medium gemessen wurde, die zeitgleich zum Anstieg der Mineralisierung (= Ende der lag-Phase) erfolgte und nur zwei Tage nach dem Erreichen der maximalen Mineralisierungsrate beendet war (Abbildung 3.21). Dabei fiel auf, dass die Abnahme der ^{14}C -Radioaktivität im filtrierten Medium deutlich größer war als die zeitgleiche Wirkstoff-Mineralisierung: So stand einer Reduktion der ^{14}C -markierten Substanzen um 38,3 % im Filtrat der Flüssigkultur FK „A“ eine $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung von

nur 25,4 % des applizierten Isoproturon gegenüber. In der FK „B“ war eine Abnahme des ^{14}C -markierten Kohlenstoffs im filtrierten Medium um 68,6 % mit einer Mineralisierung von 21,6 % des applizierten ^{14}C verbunden.

Der starke Umsatz von ^{14}C -Isoproturon in den Flüssigkulturen des Bodens „Feldkirchen“ führte dazu, dass am Versuchsende nur noch 12,5 % (FK „A“) bzw. 10,3 % (FK „B“) der applizierten ^{14}C -Menge im Filtrat des Mediums verblieben. Der Rest der ^{14}C -Aktivität, der nicht mineralisiert worden war, war in den Mikroorganismen bzw. an den Bodenpartikeln gebunden.

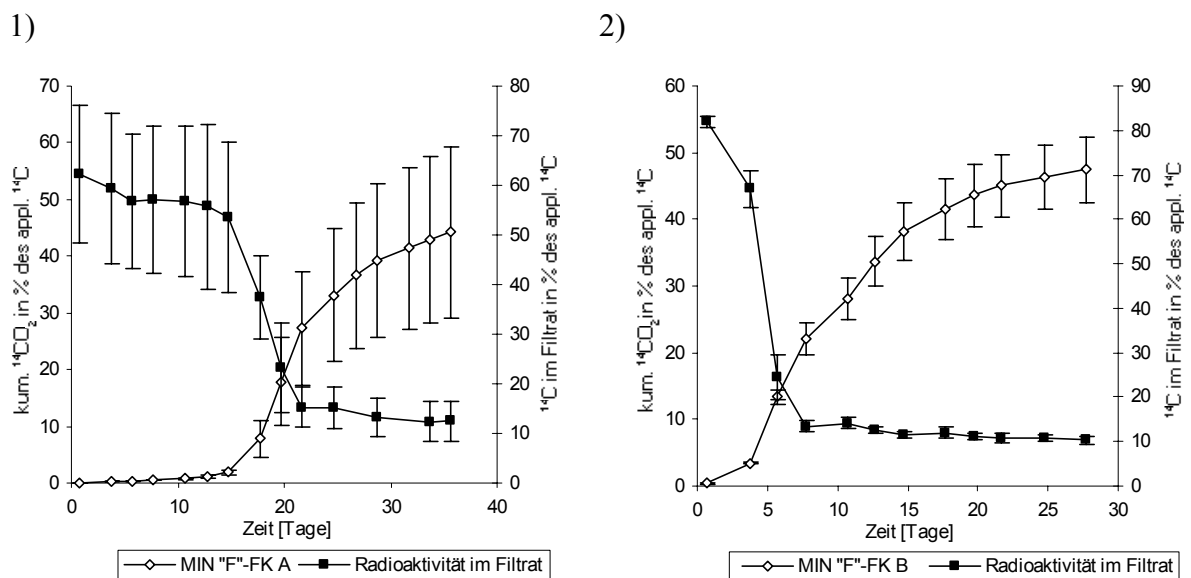


Abbildung 3.21: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon (MIN „F“-FK A und MIN „F“-FK B) und die verbleibende ^{14}C -Aktivität im filtrierten Medium: 1) Flüssigkulturen FK „A“ und 2) Flüssigkulturen FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“. Angegeben sind Mittelwerte ($n=4$) mit der Standardabweichung als vertikale Balken.

Die im nativen Boden „Feldkirchen“ sowie in dessen Flüssigkulturen FK „A“ und FK „B“ gemessenen Werte zur Mineralisierung von Isoproturon sind in der Tabelle 3.11 zusammengestellt.

Tabelle 3.11: Mineralisierung (MIN), maximale Mineralisierungsrate (max. MIN-R.) sowie im Filtrat der FK verbliebene ^{14}C -Rückstände (verbl. ^{14}C im Filtrat) von ^{14}C -Isoproturon im nativen Boden (RB) und in den Flüssigkulturen (FK) „A“ und „B“ der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“. Versuchsdauer: Ansätze „Scheyern“ FK „A“, FK „B“ und RB sowie „Feldkirchen“ FK „B“ = 28 Tage; „Feldkirchen“ RB und FK „A“ = 36 Tage.

Ansatz	lag-Phase in Tagen	Phase schneller MIN in Tagen	max. MIN-R. in % des appl. ^{14}C	MIN in % des appl. ^{14}C	verbl. ^{14}C im Filtrat in % des appl. ^{14}C
"Scheyern" FK "A"			0,5 ± 0,13	6,0 ± 0,16	67,2 ± 0,41
"Scheyern" FK "B"			0,1 ± 0,01	1,2 ± 0,19	
"Scheyern" RB			0,5 ± 0,02	9,4 ± 0,35	
"Feldkirchen" FK "A"	11	21	5,0 ± 2,25	44,2 ± 15,09	12,5 ± 4,02
"Feldkirchen" FK "B"	0	18	4,9 ± 0,51	47,5 ± 4,9	10,3 ± 0,92
"Feldkirchen" RB	4	21	3,3 ± 0,07	41,4 ± 0,64	

Eine stabile Kultur der Isoproturon abbauenden Mikroorganismen des Bodens „Feldkirchen“ wurde nicht durch einfaches Überimpfen der Ansätze (= Übertragen von 1ml Kultur in neues Medium) erreicht. Bereits die aus der Flüssigkultur FK „B“ hervorgehenden Flüssigkulturen FK „C“ mineralisierten innerhalb von 22 Versuchstagen nur noch 1,3 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon. Die Fähigkeit der Flüssigkulturen „Feldkirchen“ zur Isoproturon-Mineralisierung konnte jedoch durch die Zugabe künstlicher Oberflächen, wie z.B. Blähton oder Seesand, zu den Flüssigkulturen FK „B“ aufrechterhalten werden. Auf die Isoproturon-Abbauleistung der Flüssigkulturen FK „B“ hatte die Zugabe der Aufwuchsflächen keinen Einfluss. Nach einer 20 Tage dauernden Inkubation der künstlichen Oberflächen in den Flüssigkulturen konnten die auf den Oberflächen angewachsenen Mikroorganismen durch einfaches Abschöpfen des eingebrachten Materials in neues Medium übertragen werden, ohne einen Verlust der Abbauleistung von Isoproturon zu beobachten (Mineralisierung von ca. 37 % innerhalb von 23 Versuchstagen).

3.5.2 Flüssigkulturen „Scheuern“

In den Flüssigkulturen des Bodens „Scheuern“ war die über 27 Versuchstage gemessene Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon mit Werten von 6,0 % (FK „A“) bzw. 1,2 % (FK „B“) deutlich niedriger als im nativen Boden „Scheuern“, aus dem 9,4 % des applizierten Wirkstoffs in Form von $^{14}\text{CO}_2$ abgegeben wurden (Tabelle 3.11). Darüber hinaus war die Fähigkeit zur Isoproturon-Mineralisierung in der Flüssigkultur FK „B“ des Bodens „Scheuern“ bereits deutlich niedriger als in der Flüssigkultur FK „A“ und selbst durch den Einsatz künstlicher Oberflächen war es in diesen Flüssigkulturen nicht möglich, eine stabile Kultur an Mikroorganismen zu erhalten.

Trotz der genannten großen Unterschiede in der Summe der Isoproturon-Mineralisierung war die Dynamik des Abbaus im Boden und in den Flüssigkulturen „Scheuern“ ähnlich: In beiden Systemen wurde keine exponentielle Phase der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung ausgebildet.

In den Flüssigkulturen „Scheuern“ wurde kein Zusammenhang zwischen der Abnahme der ^{14}C -Radioaktivität im filtrierten Medium und der Dynamik der Mineralisierung beobachtet. Die Menge an ^{14}C -markierten Verbindungen nahm im Filtrat über die Inkubationszeit kontinuierlich aber nur sehr langsam ab, so dass am Versuchsende noch 67 % der applizierten ^{14}C -Menge im filtrierten Medium der Flüssigkultur FK „A“ nachweisbar waren (Tabelle 3.11).

3.5.3 Flüssigkulturen isolierter Mikroorganismen

Aus der mikrobiellen Gemeinschaft der Flüssigkulturen „Feldkirchen“ wurden 10 Kolonien vereinzelt und jeweils ihre Fähigkeit zur Isoproturon-Mineralisierung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass keine der zehn isolierten Kolonien zu einer hohen Isoproturon-Mineralisierung befähigt war: Über einen Versuchszeitraum von 38 Tagen wurden von den isolierten Kolonien maximal 0,2 % des applizierten Wirkstoffs in Form von $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt.

3.6 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden mit Strohzugabe

In einem Versuchsansatz wurde untersucht, ob die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Boden „Feldkirchen“ durch Strohzugabe gesteigert werden kann. Das zugegebene Weizenstroh, das den Bodenmikroorganismen als zusätzliche C-Quelle diente, sollte dabei die mikrobielle Gesamtaktivität fördern. Der Versuchsansatz wurde bei einem Wassergehalt von 57 % WHK des Bodens „Feldkirchen“ durchgeführt und die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon über einen Zeitraum von 71 Tagen verfolgt.

Die Zugabe des Weizenstrohs führte im Boden „Feldkirchen“ zu einer deutlichen Steigerung der Atmungsaktivität von 2,6 mg CO_2 -Freisetzung pro g nativer Boden auf 7,5 mg CO_2 -Freisetzung pro g Boden + Stroh. Die erhöhte mikrobielle Gesamtaktivität im Ansatz mit Weizenstroh war jedoch nicht mit einer Steigerung sondern mit einer Reduktion der Isoproturon-Mineralisierung verbunden, wie Tabelle 3.12 zeigt. Darüber hinaus wurden im Ansatz „Feldkirchen“ + Stroh bei niedrigerer IPU-Mineralisierung mehr *NER* gebildet als im Kontrollansatz mit nativem Boden „Feldkirchen“.

Tabelle 3.12: Mineralisierung (*MIN*), Methanol-extrahierbare Rückstände (*MER*), nicht-extrahierbare Rückstände (*NER*) und Massenbilanz (*MBL*) des appl. ^{14}C -Isoproturon im Laborversuch zur Steigerung der IPU-Mineralisierung im nativen Boden „Feldkirchen“ bzw. im Boden „Feldkirchen“ + Stroh nach 71 Tagen.

Ansatz	Wiederfindung des applizierten ^{14}C -Isoproturon in %			
	MIN	MER	NER	MBL
"Feldkirchen"	39,9 ± 1,3	6,7 ± 0,4	46,5 ± 2,6	93,2 ± 1,5
"Feldkirchen" + Stroh	35,0 ± 1,4	6,5 ± 0,3	49,5 ± 2,6	91,1 ± 2,9

Der Einsatz von Weizenstroh war damit nicht zur Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung im Boden „Feldkirchen“ geeignet.

3.7 Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden beim Transfer mikrobieller Gemeinschaften mit hohem Abbaupotential

Das Ziel der folgenden Versuche war es, die Mineralisierung von Isoproturon in Böden mit geringem IPU-Abbaupotential durch den Transfer der Isoproturon gut abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ (IPU-amG-F) zu steigern.

3.7.1 Verhalten unter Laborbedingungen

Die ersten Versuche zur Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung wurden im Boden „Scheyern“ durchgeführt, da dieser Boden unter verschiedenen Umweltbedingungen sowohl in den Labor- als auch in den Lysimeterversuchen die geringste Mineralisierung des applizierten Wirkstoffs aufwies (vgl. Tabelle 3.10). Den positiven Effekt der drei Steuerungsmethoden auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Boden „Scheyern“ zeigt Abbildung 3.22.

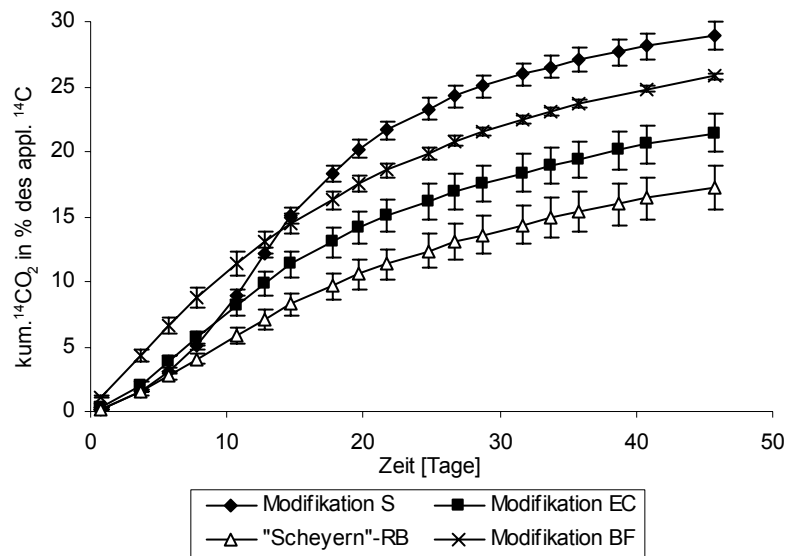


Abbildung 3.22: Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im nativen Boden „Scheyern“ („Scheyern“-RB) und im Boden „Scheyern“ inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum), „EC“ (= Flüssigkultur-Inokulum) und „BF“ (= Biofilm-Inokulum). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ($n = 4$). Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung an.

Ein signifikanter Anstieg der ^{14}C -Isoproturon-Mineralisierung von 17,3 % im nativen Boden „Scheyern“ („Scheyern“-RB) auf 21,4 % wurde durch den Einsatz der Methode „Modifikation EC“ erreicht.

Die „Modifikation S“ hatte den größten Effekt auf die Wirkstoff-Mineralisierung im Zielboden. Durch den Transfer eines Bodeninokulums „Feldkirchen“ (5 % der gesamten inokulierten Bodenmenge) wurden 28,9 % des applizierten Isoproturon in Form von $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt, was einer Steigerung um mehr als 10 % im Vergleich zum nativen Boden „Scheyern“ entsprach.

Beim Einsatz der Methode „Modifikation BF“, die zu einer Mineralisierung von 25,8 % führte, wurde eine auffällige Abbau-Dynamik für Isoproturon festgestellt: Während die verstärkte Mineralisierung im nativen Boden „Scheyern“ sowie bei den Modifikationsmethoden „S“ und „EC“ jeweils erst nach einer lag-Phase von 4 Tagen einsetzte, wurde die höchste Mineralisierungsrate im Ansatz mit der Modifikation „BF“ direkt am Beginn des Bioabbaubversuchs gemessen (Abbildung 3.23).

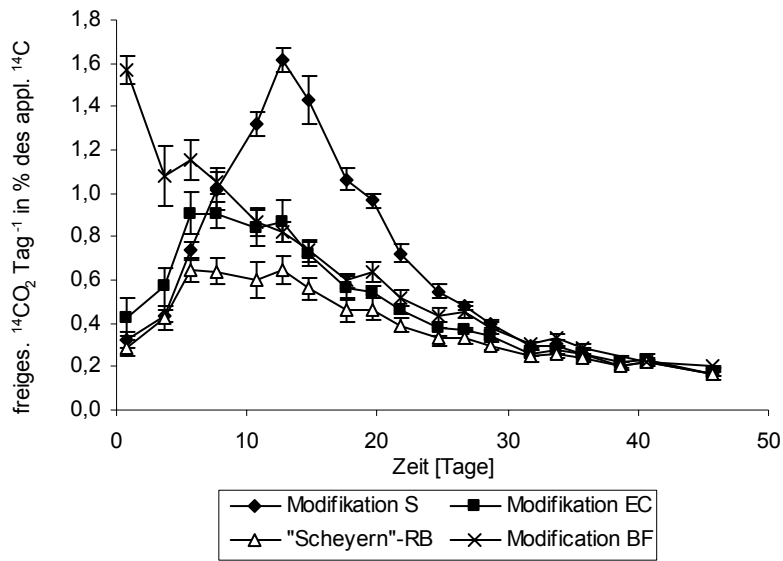


Abbildung 3.23: ^{14}C -Isoproturon-Mineralisierungsraten im nativen Boden „Scheuern“ („Scheuern“-RB) und im Boden „Scheuern“ inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum), „EC“ (= Flüssigkultur-Inokulum) und „BF“ (= Biofilm-Inokulum). Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 4$). Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar.

Wie die Massenbilanzen zeigen (Tabelle 3.13), war die durch den Transfer der IPU-amG-F erreichte Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung im Boden „Scheuern“ nicht nur mit einer Abnahme der MER (Ausnahme Modifikation BF) sondern auch mit einer Abnahme der NER verbunden.

Tabelle 3.13: Mineralisierung (MIN), Methanol-extrahierbare Rückstände (MER), nicht-extrahierbare Rückstände (NER) und Massenbilanz (MBL) des appl. ^{14}C -Isoproturon in den Laborversuchen zur Steigerung der IPU-Mineralisierung im reinen Boden „Scheyern“ („Scheyern“-RB) und im Boden „Scheyern“ inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum), „EC“ (= Flüssigkultur-Inokulum) und „BF“ (= Biofilm-Inokulum). Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 4$) und die Standardabweichung nach 46 Tagen.

Ansatz	Wiederfindung des applizierten ^{14}C in %			
	MIN	MER	NER	MBL
"Scheyern" - RB	17,3 ± 1,7	7,1 ± 0,3	75,2 ± 0,8	99,5 ± 2,0
Modifikation EC	21,4 ± 1,5	6,4 ± 0,3	74,0 ± 0,9	101,8 ± 0,8
Modifikation BF	25,8 ± 0,2	9,2 ± 0,9	69,7 ± 0,9	104,7 ± 0,4
Modifikation S	28,9 ± 1,1	4,1 ± 0,5	67,1 ± 1,4	100,1 ± 1,9

In weiteren Laborversuchen wurde der Effekt der im Boden „Scheyern“ besonders erfolgreichen Modifikationsmethoden „S“ und „BF“ auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Hohenwart“ und „Kelheim“ untersucht (Tabelle 3.14).

Im Boden „Hohenwart“ führte die Übertragung der IPU-amG-F mittels Bodeninokulum (Modifikation „S“), trotz des hohen eigenen Abbaupotentials dieses Bodens, zu einer Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung und einer Reduktion der NER.

Im Boden „Kelheim“ konnte die Mineralisierung von Isoproturon durch die Modifikationsmethode „BF“ von 25,0 % auf 53,2 % mehr als verdoppelt und die Menge der NER um 30 % reduziert werden. Darüber hinaus führte die Modifikationsmethode „BF“ auch im Boden „Kelheim“ zu einem sofortigen Anstieg der Mineralisierungsraten, eine lag-Phase wurde nicht beobachtet.

Tabelle 3.14: Mineralisierung (MIN), Methanol-extrahierbare Rückstände (MER), nicht-extrahierbare Rückstände (NER) und Massenbilanz (MBL) des appl. ^{14}C -Isoproturon in den Laborversuchen zur Steigerung der IPU-Mineralisierung in den nativen Böden „Hohenwart“ („Hohenwart“-RB) bzw. Kelheim („Kelheim“-RB) und in diesen Böden inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum) und „BF“ (= Biofilm-Inokulum). Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 3$) und die Standardabweichung nach 46 Tagen.

Ansatz	Wiederfindung des applizierten ^{14}C in %			
	MIN	MER	NER	MBL
"Hohenwart" - RB	36,8 ± 1,2	2,8 ± 0,3	57,6 ± 0,4	97,2 ± 1,3
"H"-Modifikation S	41,1 ± 3,7	3,0 ± 0,3	54,0 ± 1,3	98,1 ± 2,6
"Kelheim" - RB	25,0 ± 2,3	7,8 ± 0,7	63,0 ± 0,2	95,8 ± 1,5
"K"-Modifikation BF	53,2 ± 4,2	3,2 ± 0,2	33,2 ± 1,8	89,6 ± 6,1

In weiteren Laborversuchen mit dem Boden „Scheyern“ wurde festgestellt, dass weder die Zugabe von sterilem MS-Medium noch von sterilisiertem Blähton einen positiven Effekt auf die Mineralisierung von Isoproturon hatte. Dieses Ergebnis bestätigte eindeutig den entscheidenden Einfluss der übertragenen mikrobiellen Gemeinschaft auf die Mineralisierung des applizierten Herbizids.

3.7.2 Verhalten unter Freilandbedingungen

Um den Effekt der entwickelten Modifikationsmethoden unter Freilandbedingungen untersuchen zu können, wurde in einem 3. Lysimeterversuch (entsprechend und parallel zum 2. Lysimeterversuch) die Wirkung der Modifikationsmethode „S“ auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Boden „Scheyern“ untersucht.

Wie Abbildung 3.24 zeigt, wurde die Isoproturon-Mineralisierung im Boden „Scheyern“ durch die Übertragung der IPU-amG-F unter Freilandbedingungen mehr als verdoppelt. Während im nativen Boden „Scheyern“ 22,6 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon komplett abgebaut wurden, wurde durch die Modifikation „S“ eine Mineralisierung von 49,2 % erreicht. Die Dynamik der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung zeigt, dass

die Modifikation „S“ auch nach 46 Versuchstagen noch eine höhere Mineralisierungsrate aufwies als der unbehandelte Boden „Scheyern“.

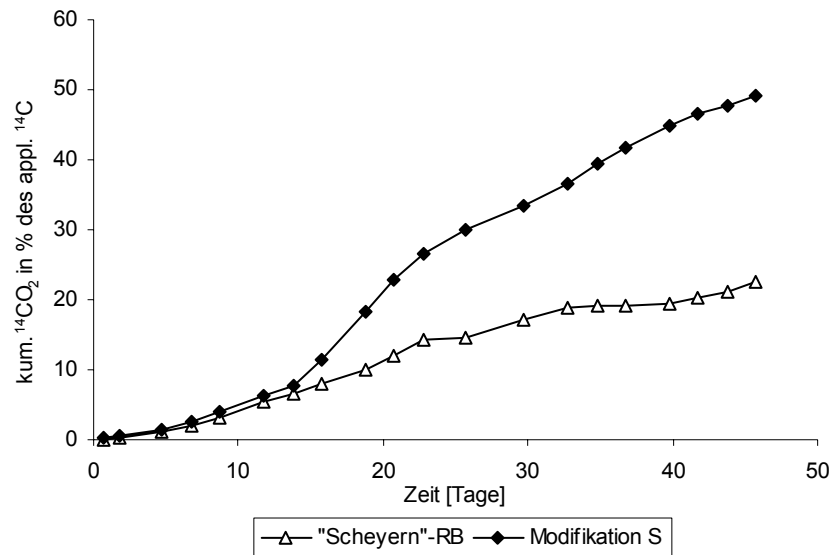


Abbildung 3.24: Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon unter Freilandbedingungen im nativen Boden „Scheyern“ („Scheyern“-RB) und im Boden „Scheyern“ inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum); 3. Lysimeterversuch im Jahr 2002.

Die Analyse der Methanol-extrahierbaren Rückstände zeigte, dass die Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung im Boden „Scheyern“ mit einer Veränderung des Metabolitenmusters verbunden war. Wie der Tabelle 3.15 zu entnehmen ist, wurde im Methanolextrakt der Modifikation „S“ nicht nur ein geringerer Anteil an Isoproturon sondern auch ein deutlich größerer Anteil des Metaboliten C als im nativen Vergleichsboden „Scheyern“ detektiert.

Table 3.15: Detektierte Metabolite im nativen Boden „Scheyern“ („Scheyern“-RB = Kontrolle) und im Boden „Scheyern“ inokuliert mit der IPU-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ mittels der Modifikationen „S“ (= Bodeninokulum) 46 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 3. Lysimeterversuch im Jahr 2002. Metabolit A = 3-[4-(2-Hydroxyisopropylphenyl)]-1-methylharnstoff; Metabolit B = 3-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff; Metabolit C = 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff; Verunr. = Verunreinigung des applizierten ^{14}C -Standards; unbekannt = nicht identifizierbare Peaks im ^{14}C -HPLC-Chromatogramm.

Name der Peaks	Retentionszeit (min)	Peaks in % des extrahierbaren ^{14}C		
		Scheyern		^{14}C -Arelon
		RB	S	(% ^{14}C)
unbekannt 1	19,2 +/- 0,4		1,8	
unbekannt 2	20,7 +/- 0,2			
Metabolit A	21,9 +/- 0,5	3,5	3,6	
Verunr. 1	23,6 +/- 0,7			0,3 +/- 0,1
Verunr. 2	25,7 +/- 0,7			1,3 +/- 0,2
unbekannt 3	28,1 +/- 0,7		5,2	
Metabolit B	29,6 +/- 0,7	5,2	3,6	
unbekannt 4	32,1 +/- 0,3	8,5	5	
Metabolit C	33,3 +/- 0,4	17,8	32,3	0,3 +/- 0,1
Isoproturon	35,0 +/- 0,5	21,3	14,1	98,1 +/- 0,3
unbekannt 5	37,3 +/- 0,3			
unbekannt 6	38,7 +/- 0,5	8,1	4,9	
unbekannt 7	40,5 +/- 0,9	35,6	30,5	

3.8 Bestimmung der in-situ-Verfügbarkeit von ^{14}C -Isoproturon in Böden

Um die in-situ-Verfügbarkeit von ^{14}C -Isoproturon in den Versuchsböden beurteilen zu können, wurde durch selektive Porenwassergewinnung ein neuer Chemikalien-Verteilungskoeffizient (CPC) für organische Chemikalien in Bodenproben bestimmt.

Für die Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ wurde eine Zeitreihe zur Porenwassergewinnung aus nativen und sterilen Böden bis zu 8 Tage nach der Applikation aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass der CPC für Isoproturon über einen Inkubationszeitraum von 8 Tagen in nativen und sterilen Böden konstant blieb: D.h. die Menge an im Bodenwasser gelöstem und damit gut verfügbarem Isoproturon änderte sich in den beiden Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ mit der Zeit nicht. Nach diesen Ergebnissen wurde der CPC für Isoproturon in den Böden „Kelheim“ und „Hohenwart“ nur nach einer Inkubation von 8 Tagen und nur in nativen Bodenproben bestimmt (Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Kd-Wert (Ma und Dörfler, unveröffentlichte Daten, 2003) und nach 8 Tagen Inkubation bestimmter Chemikalien-Verteilungskoeffizient (CPC) von Isoproturon (IPU) in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unter nativen bzw. sterilen Inkubationsbedingungen.

Ansatz	CPC	Kd-Wert für IPU
"Feldkirchen" nativ	8,77	1,83
"Feldkirchen" steril	5,27	
"Scheyern" nativ	6,39	1,06
"Scheyern" steril	3,16	
"Kelheim" nativ	3,49	0,86
"Hohenwart" nativ	3,34	0,71

In den Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ war der in sterilen Ansätzen bestimmte CPC-Wert für Isoproturon niedriger als der entsprechende Wert in den nativen Proben,

d.h. im sterilen Boden war die Konzentration des im Bodenwasser gelösten Isoproturon höher als im nativen Boden (Tabelle 3.16).

Wie Abbildung 3.25 zeigt, verhielt sich der über die selektive Porenwassergewinnung berechnete CPC-Wert in den untersuchten Böden direkt proportional zum Kd-Wert. Damit war es über die Porenwassergewinnung nicht möglich, die Verteilung von Isoproturon zwischen der Bodenlösung und der Bodenmatrix besser zu beschreiben als mit dem Kd-Wert.

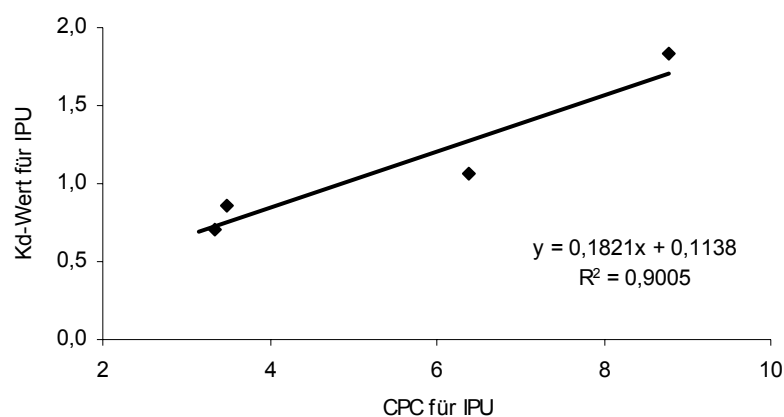


Abbildung 3.25: Zusammenhang zwischen dem Chemikalien-Verteilungskoeffizienten (CPC) und dem Kd-Wert für Isoproturon (IPU).

3.9 Ansätze zur Beurteilung von nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen in Böden

Sowohl in den Labor- als auch in den Lysimeterversuchen wurden große Mengen an nicht-extrahierbaren ^{14}C -Isoproturon-Rückständen gebildet (vgl. Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Ziel der folgenden Versuche war es, die Qualität der bei der Mineralisierung von Isoproturon in Böden gebildeten NER zu beurteilen.

3.9.1 Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände in sterilen Böden

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, zu welchem Anteil ^{14}C -Isoproturon im sterilen Boden, d.h. ohne Einfluss der mikrobiellen Aktivität, so festgelegt wurde, dass es mit Methanol nicht mehr extrahierbar war. Die Versuche wurden mit dem Boden „Feldkirchen“, der die höchste Mineralisierung von Isoproturon aufwies, und dem Boden „Scheyern“, in dem die größte Menge an NER gebildet wurde (vgl. Tabelle 3.3), durchgeführt.

Die Extraktion der Bodenproben ergab, dass sowohl direkt nach der Applikation (= Inkubationszeit 0) als auch bei einer Inkubationsdauer von bis zu 8 Tagen 100 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon aus den Versuchsböden mit Methanol extrahiert werden konnten. Auch bei nativen Bodenproben, die als Vergleich direkt nach der Applikation extrahiert wurden, konnten 100 % des applizierten ^{14}C im Methanol-Extrakt nachgewiesen werden.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass unter abiotischen Bedingungen in den Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ innerhalb eines Zeitraums von 8 Tagen keine NER gebildet wurden.

3.9.2 Methanolextraktion von ^{14}C -markierter Biomasse

Um den Anteil der mikrobiellen Biomasse bei der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen beurteilen zu können, wurde ^{14}C -markierte Biomasse hergestellt und mit der Extraktionsmethode behandelt, die für die Extraktion von Isoproturon aus Böden entwickelt wurde.

3.9.2.1 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Glucose

^{14}C -markiertes Zellmaterial, das in einem mit ^{14}C -Glucose versetztem komplexen Nährmedium angezogen worden war, wurde auf Bodenproben, Seesand oder Glaskugeln appliziert und einer Methanolextraktion unterzogen.

Wie Tabelle 3.17 zeigt, konnten aus dem Bodenmaterial maximal 11 % des in Form von Biomasse zugegebenen ^{14}C extrahiert werden, während mehr als 80 % des applizierten ^{14}C in nicht extrahierbarer Form vorlagen und als NER bezeichnet wurden. Selbst aus dem sehr glatten und locker gepackten Material der Glaskugeln konnten nur ca. 69 % der applizierten ^{14}C -Aktivität mit Methanol extrahiert werden.

Tabelle 3.17: Methanol-extrahierbare Rückstände (MER), nicht-extrahierbare Rückstände (NER) und Massenbilanz von ^{14}C -markierter Biomasse (Anzucht in ^{14}C -Glucose haltigem PC-Medium) nach der Applikation auf die Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ bzw. auf die künstlichen Oberflächen Seesand und Glaskugeln.

Ansatz	Wiederfindung des applizierten ^{14}C in %		
	MER	NER	MBL
"Feldkirchen"	7,3	90,1	97,3
"Kelheim"	11,2	82,7	93,9
"Scheyern"	8,3	90,7	99,0
Seesand	46,2	46,4	92,7
Glaskugeln	68,8	30,7	99,6

3.9.2.2 ^{14}C -Biomasse aus ^{14}C -Isoproturon

Während der Anzuchtphase der ^{14}C -markierten Biomasse wurde im komplexen Nährmedium (Ansatz PC), in dem den Mikroorganismen eine Vielzahl an leicht verfügbaren Substraten zur Verfügung stand, nur ein Anteil von 0,6 % des applizierten ^{14}C -Isoproturon mineralisiert. Im Gegensatz dazu wurde das applizierte ^{14}C -Isoproturon im MS-IPU-Medium (Ansatz MS), in dem Isoproturon als einzige C- und N-Quelle zur Verfügung stand, während der Inkubationsphase zu 36,4 % mineralisiert. Im sterilen Kontrollansatz K wurde keine $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung gemessen. Diese Unterschiede im Umsatz des ^{14}C -markierten Substrats in der Anzuchtphase der ^{14}C -markierten Biomasse hatten deutliche Auswirkungen auf den Anteil an extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen, wie Tabelle 3.18 zeigt.

Tabelle 3.18: Methanol-extrahierbare Rückstände (MER) und nicht-extrahierbare Rückstände (NER) aus ^{14}C -markierter Biomasse, die in ^{14}C -Isoproturon haltigem PC-Medium (Ansatz PC) bzw. MS-IPU-Medium (Ansatz MS) angezogen wurde. Als Kontrolle diente ein steriler Ansatz mit ^{14}C -Isoproturon haltigem MS-IPU-Medium (Ansatz K).

Ansatz	Wiederfindung des ^{14}C in %	
	MER	NER
Ansatz K	86,4 ± 13,8	13,6 ± 13,8
Ansatz PC	78,7 ± 5,9	21,4 ± 5,9
Ansatz MS	19,6 ± 2,3	80,4 ± 2,3

Während in der ^{14}C -markierten Biomasse des PC-Ansatzes nur 21,4 % der in der Biomasse enthaltenen ^{14}C -Gesamtrückstände in Form von NER festgelegt wurden, betrug der Anteil der NER in der Biomasse des MS-Ansatzes 80,4 %.

Der Kontrollansatz K verdeutlichte, dass auch die als Aufwuchsmaterial verwendeten sterilen künstlichen Oberflächen als Adsorptionsflächen dienen, von denen der applizierte Wirkstoff aber zu 86,4 % mit Methanol extrahiert werden konnte (Tabelle 3.18).

Der Anteil von 80,4 % NER, der im Ansatz MS gemessen wurde, stimmt sehr gut mit den im Kapitel 3.9.2.1 beschriebenen Ergebnissen überein, mit denen gezeigt wurde, dass das ^{14}C aus mit ^{14}C -Glucose angezogener Biomasse zu mehr als 80 % aus Bodenproben nicht extrahiert werden konnte.

3.10 Vergleich der Ergebnisse zur Mineralisierung von Isoproturon und dem Einfluss von Bodenkenndaten mit vorangegangenen Arbeiten

Um die Beziehung von Bodenkennwerten zur Mineralisierung von Isoproturon besser beurteilen zu können, wurden in die Berechnung der im folgenden dargestellten Regressionen jeweils die Charakteristika von Böden mit aufgenommen, die in vorangegangenen Untersuchungen von Wirén-Lehr (1997) und Kliem (1994) zum Abbau von ^{14}C -Isoproturon eingesetzt wurden. Die in die Berechnungen einbezogenen Daten zur mikrobiellen Biomasse der Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ wurden durch Loos (unveröffentlichte Daten, 2003) bestimmt. Um den Einfluss der in dieser Studie verwendeten Böden in den Regressionsberechnungen zu verdeutlichen, wurden jeweils zwei Regressionsgeraden bestimmt.

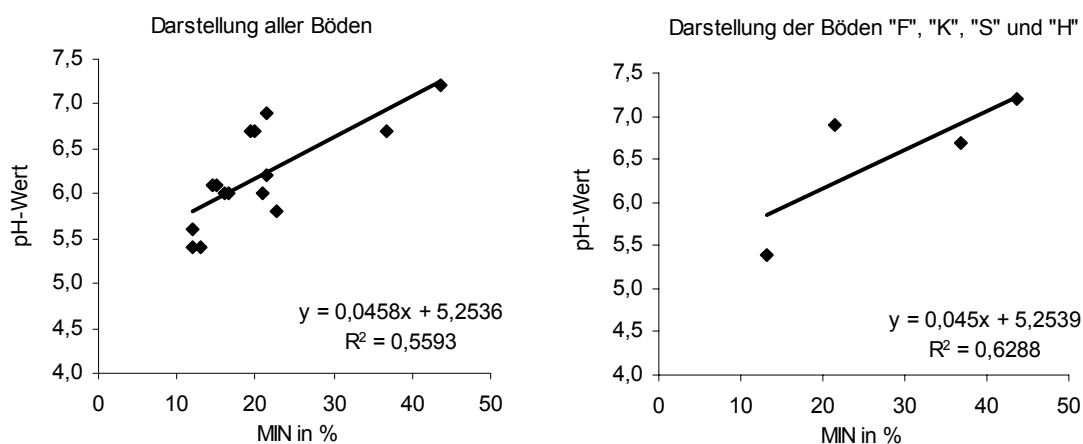


Abbildung 3.26: Zusammenhang zwischen der Mineralisierung (MIN) von ^{14}C -Isoproturon und dem pH-Wert aller untersuchten Böden bzw. den Böden „Feldkirchen“ („F“), „Kelheim“ („K“), „Scheyern“ („S“) und „Hohenwart“ („H“).

Wie Abbildung 3.26 zeigt, war zwischen den Größen „pH-Wert“ und „Mineralisierung“ ein geringer Zusammenhang zu erkennen, wobei die Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“,

„Scheyern“ und „Hohenwart“ den Verlauf der Regressionsgeraden entscheidend beeinflussten und damit die Güte bestimmten, wie das rechte Diagramm der Abbildung 3.26 zeigt. Darüber hinaus war ein Zusammenhang zwischen den Größen „mikrobielle Biomasse“ und „Mineralisierung“ erkennbar (Abbildung 3.27), wobei in diesem Fall die Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“, die die höchsten Mineralisierungswerte und die höchste mikrobielle Biomasse enthielten, den Verlauf der Regressionsgerade festlegten. Um den Verlauf dieser Geraden besser bestimmen zu können, wären zusätzliche Böden mit höheren Gehalten an mikrobieller Biomasse notwendig.

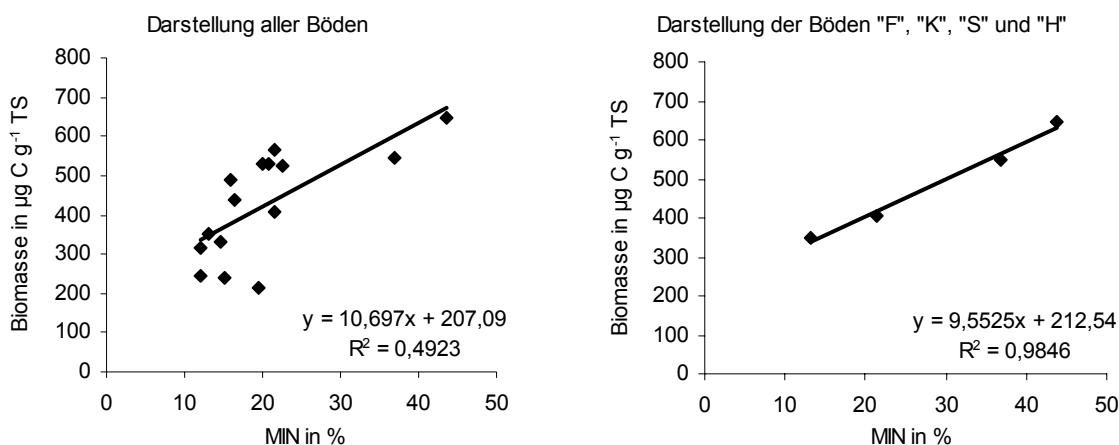


Abbildung 3.27: Zusammenhang zwischen der Mineralisierung (MIN) von ^{14}C -Isoproturon und der mikrobiellen Biomasse aller untersuchten Böden bzw. der Böden „Feldkirchen“ („F“), „Kelheim“ („K“), „Scheyern“ („S“) und „Hohenwart“ („H“). Mit TS = Trockensubstanz.

Kein Zusammenhang war dagegen zwischen der Mineralisierung von Isoproturon und dem Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis (C/N) der Böden zu beobachten (Abbildung 3.28). Ebenso konnte keine Beziehung zwischen dem Gehalt der Böden an organischem Kohlenstoff und der mikrobiellen Biomasse festgestellt werden (Abbildung 3.28), wobei die Unterschiede der untersuchten Böden hinsichtlich dieser Größen zur Berechnung eines Zusammenhangs möglicherweise zu gering waren.

Die Berechnung einer Korrelationsmatrix, in die alle untersuchten Bodenkennwerte mit aufgenommen wurden, ist im Anhang (Kapitel 7.2) zu finden.

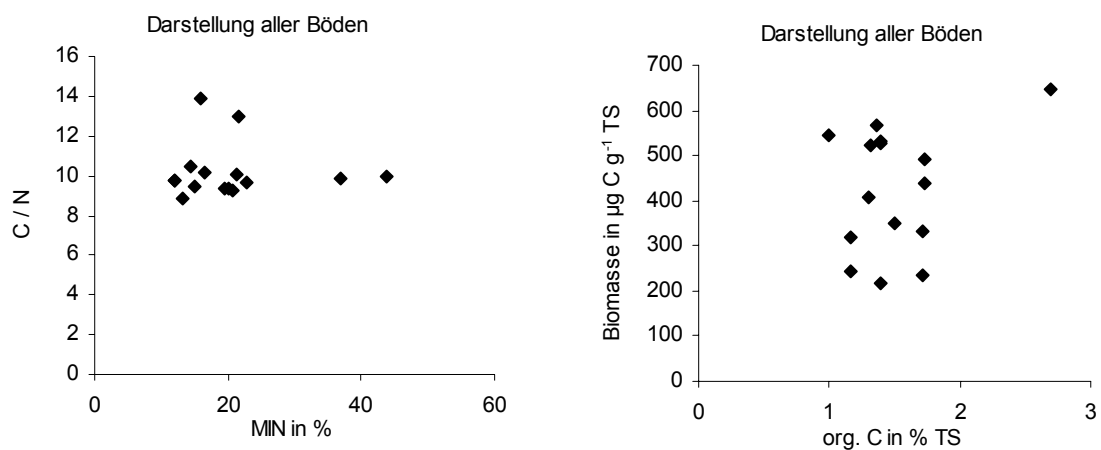


Abbildung 3.28: Zusammenhang zwischen der Mineralisierung (MIN) von ^{14}C -Isoproturon und dem Kohlenstoff/ Stickstoff - Verhältnis (C/N) bzw. dem organischen Kohlenstoffgehalt (org. C) und der mikrobiellen Biomasse aller untersuchten Böden. Mit TS = Trockensubstanz.

3.11 Identifikation und Nachweis einer Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, einen ersten Einblick in die mikrobielle Diversität der Isoproturon gut abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ (IPU-amG-F) zu bekommen. Zusätzlich sollte durch den Einsatz phylogenetischer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung in Kombination mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ein Protokoll erarbeitet werden, um Mikroorganismen direkt *in situ* auf künstlichen Oberflächen, wie z.B. Blähton, nachzuweisen.

3.11.1 Phylogenetische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft durch vergleichende Sequenzanalyse der 16S-rDNA – Konstruktion von Stammbäumen

Ein auf Blähton gebildeter Biofilm der Flüssigkultur FK „C“ des Bodens „Feldkirchen“ diente als Ausgangsmaterial für die Identifikation der am Isoproturon-Abbau beteiligten Mikroorganismen. Es wurden 29 Klone der mikrobiellen Gemeinschaft „Feldkirchen“ untersucht und in einen phylogenetischen Stammbaum bereits bekannter Sequenzen an 16S-rDNA eingerechnet (Abbildung 3.29).

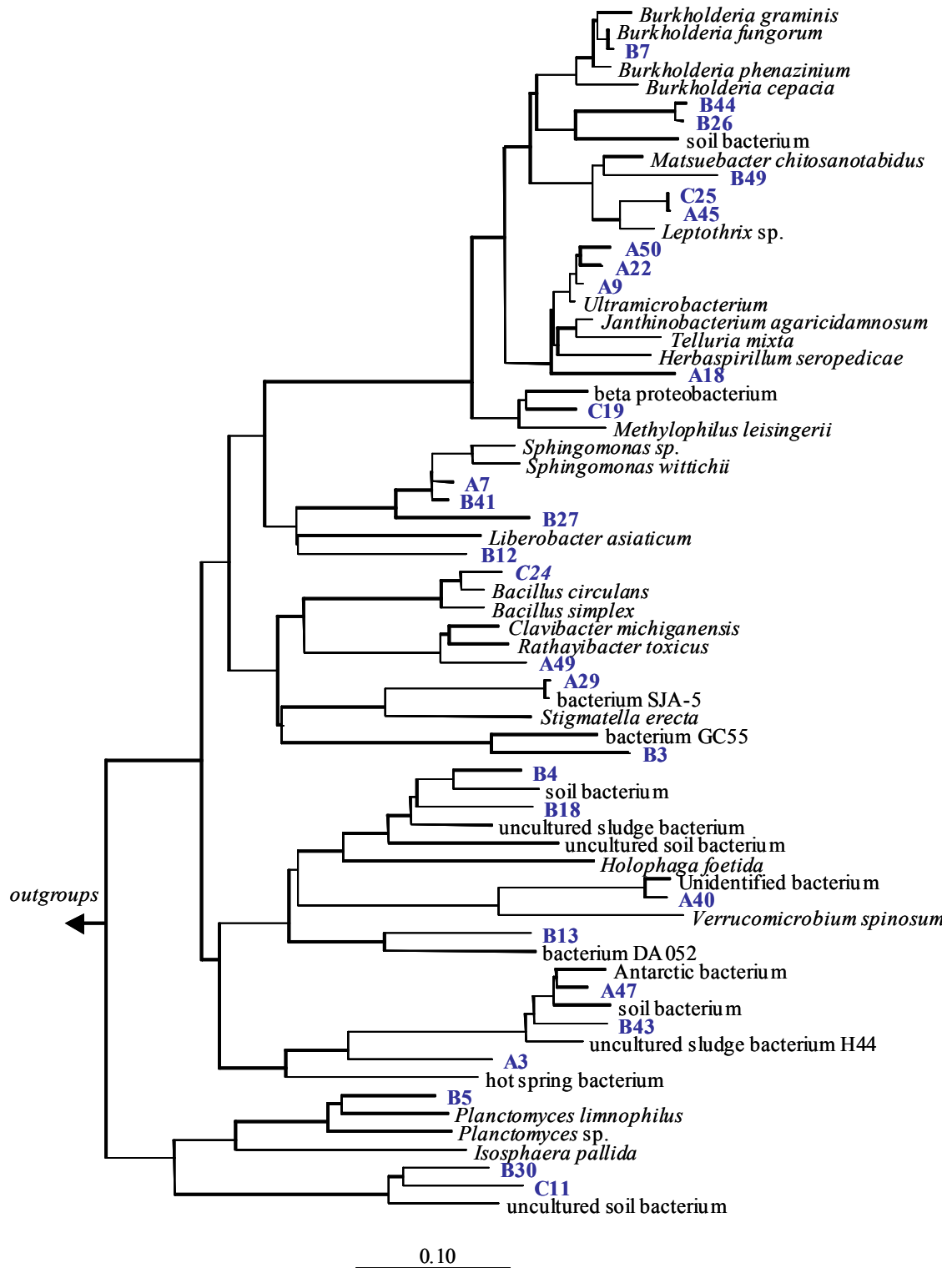


Abbildung 3.29: Phylogenetischer Stammbaum (Berechnung über Maximum Likelihood) mit den identifizierten Klonen der Flüssigkultur FK „C“ der Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“. Die in dieser Untersuchung identifizierten Klone sind im Stammbaum blau hervorgehoben. Der Balken zeigt 10 % Sequenzdivergenz an.

Die identifizierten Klonsequenzen waren sehr unterschiedlichen bakteriellen Phyla zuzuordnen, was die hohe Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft verdeutlichte. In der analysierten Probe war das Phylum der β -Proteobakterien, das im Stammbaum der Abbildung 3.29 von oben beginnend von *Burkholderia graminis* bis zu *Methylophilus leisingerii* reichte, mit 11 identifizierten Klonen am stärksten vertreten. Aufgrund der Vielzahl der in der Flüssigkultur FK „C“ vorhandenen und identifizierten Klone ist es aus den Ergebnissen nicht möglich, die für den Abbau von Isoproturon hauptverantwortlichen Bakterienstämme zu benennen. Hierzu wären detailliertere Untersuchungen sowohl in phylogenetischer Hinsicht als auch im Bereich der Kultivierungs- bzw. Anreicherungsversuche nötig, die zu einer Einschränkung der bakteriellen Vielfalt führen würden.

3.11.2 Etablierung eines Protokolls für den Nachweis einer mikrobiellen Gemeinschaft auf Blähton mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung

Nach der Identifikation der am Abbau von Isoproturon beteiligten Klone ist es das Ziel weiterführender Untersuchungen, die Abundanz und Verteilung der identifizierten Arten im Biofilm der IPU-amG-F auf künstlichen Oberflächen bzw. im nativen Boden zu bestimmen. Es wurde deshalb zunächst ein Protokoll erarbeitet, das es erlaubt, eine Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von Bakterienzellen des auf Blähton gebildeten Biofilms durchzuführen. Wie im Kapitel 2.11.5 beschrieben, wurde der fluoreszenzmarkierte Blähtonpartikel direkt vor der inversen konfokalen Laser Scanning Mikroskopie mit einem Skalpell zerkleinert. Die Ränder der entstandenen und mit fluoreszenzmarkierten Bakterien besiedelten Blähtonfragmente konnten dann mit dem eingesetzten Laser visualisiert werden.

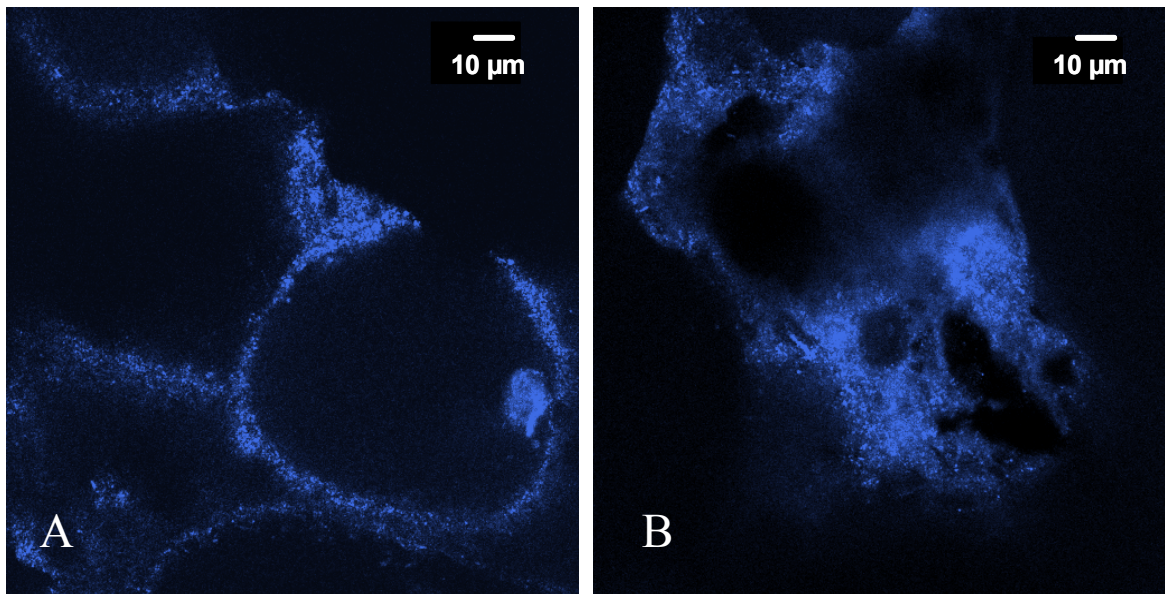


Abbildung 3.30: Bewachsener Blähton der Flüssigkultur FK „C“ des Bodens „Feldkirchen“, der einer Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung mit EUB-338_{Mix} Cy5 (blaue Fluoreszenz) unterzogen wurde. Bild A zeigt Blähtonfragmente, deren Ränder mit fluoreszenzmarkierten Bakterien besiedelt waren. Bild B zeigt einen Ausschnitt des mikrobiellen Biofilms, der bei der Präparation des Blähtons von dessen Oberfläche abgelöst und dadurch flächig aufgenommen werden konnte.

Wie Abbildung 3.30 zeigt, war eine direkte Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung des bewachsenen Blähtons möglich. Eine gezielte Untersuchung des Biofilms der IPU-amG-F auf den künstlichen Oberflächen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wäre somit möglich.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von ^{14}C -markiertem Isoproturon in landwirtschaftlichen Böden zu untersuchen, mögliche Unterschiede im Verhalten zu erklären und mit Hilfe dieser Kenntnisse Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen auf den Abbau des Herbizids in Böden steuernd einzuwirken. Dazu wurden zunächst Laborversuche unter kontrollierten Bedingungen und anschließend Lysimeterversuche unter natürlich variierenden Umweltbedingungen durchgeführt. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurden drei Methoden entwickelt, die es erlaubten, die Mineralisierung von Isoproturon in Böden mit geringem Abbaupotential hoch signifikant zu steigern.

4.1 Abbau und Mineralisierung von Isoproturon unter kontrollierten Bedingungen

4.1.1 Einfluss des Bodenwassergehalts und der chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften auf den Abbau von Isoproturon

Bereits in den ersten Laborversuchen wurde ein sehr diverses Abbaupotential der verwendeten Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ gegenüber ^{14}C -Isoproturon sichtbar. So wurde bei dem für die Isoproturon-Mineralisierung jeweils günstigsten Bodenwassergehalt ein Totalabbau zwischen 13 % („Scheyern“) und 44 % („Feldkirchen“) des applizierten Herbizids innerhalb von 46 Versuchstagen bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.6).

Beim Vergleich dieser Werte mit Literaturangaben ist zu beachten, dass nur in wenigen Studien ^{14}C -ringmarkiertes Isoproturon eingesetzt wurde. Nur durch den Einsatz der ^{14}C -Technik und gleichzeitiger Markierung am Phenol-Ring, der stabilsten Stelle des Moleküls, ist es aber möglich, das komplette Abbauverhalten des Herbizids bis zu $^{14}\text{CO}_2$ zu verfolgen. Beim Einsatz von ^{14}C -ringmarkiertem Wirkstoff wird in der Literatur eine Mineralisierung von 10 % bis 34 % innerhalb von 60 bis 100 Tagen angegeben (Kubiak et al., 1995; Lehr et al., 1996; Pieuchot et al., 1996; Perrin-Ganier et

al., 2001), was mit den in dieser Studie gemessenen Werten vereinbar ist. Im Gegensatz dazu wurde in einigen Studien, in denen lediglich das Verschwinden der unmarkierten Ausgangssubstanz Isoproturon in Böden gemessen wurde, ein kompletter Abbau des Herbizids innerhalb von 10 Tagen beschrieben (Cox et al., 1996; Walker et al., 2001; Bending et al., 2003). Wie in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, ist das Schicksal organischer Chemikalien in Böden jedoch nicht ausschließlich mit deren „Verschwinden“ zu beschreiben.

Einfluss des Bodenwassergehalts

In den ersten Laborversuchen wurde, in Vorbereitung des Lysimeterversuchs der Einfluss des Wassergehalts auf die Mineralisierung von ^{14}C -ringmarkiertem Isoproturon untersucht. Der bedeutende Einfluss dieses Bodenparameters auf die Mineralisierung von Isoproturon wurde in der Literatur bereits beschrieben (z.B. Mudd et al., 1983; Cox et al., 1996), wobei eine Absenkung des Wassergehalts jeweils mit einer Abnahme der Mineralisierung verbunden war. Dieser Effekt auf die Fremdstoff-Mineralisierung in Böden lässt sich zum einen dadurch erklären, dass ein niedriger Wassergehalt allgemein negative Auswirkungen auf die Physiologie der am Abbau beteiligten Mikroorganismen (Felsot, 1993) hat. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Adsorption (Gaillardon und Dur, 1995; Gaillardon, 1996) bzw. die Extrahierbarkeit (Pätzold und Brümmer, 2003) von Herbiziden in Böden stark vom Wassergehalt beeinflusst wird, wobei niedrige Wassergehalte mit niedrigen Extraktionsausbeuten verbunden sind (Pätzold und Brümmer, 2003). Der hemmende Einfluss niedriger Wassergehalte auf den Herbizid-Abbau wurde auch in dieser Studie beobachtet, da bei Wassergehalten unter 34 % WHK in den Böden „Feldkirchen“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ Mineralisierungswerte von höchstens 4 % gemessen wurden, die weit vom Maximalwert der Böden entfernt waren (vgl. Abbildung 3.7).

Veränderungen des Bodenwassergehalts hatten in den untersuchten Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unterschiedlich große Auswirkungen auf die Isoproturon-Mineralisierung, so dass das sehr diverse Abbaupotential der Böden erst bei dem für die Isoproturon-Mineralisierung im

jeweiligen Boden günstigsten Wassergehalt sichtbar wurde (vgl. Abbildung 3.1 und 3.2). Diese Beobachtung konnte mit Hilfe der pF-Wg-Kurven bzw. des daraus abgeleiteten Wassergehalts-Porengrößen-Diagramms (vgl. Abbildung 3.4) erklärt werden. Eine Erhöhung des Bodenwassergehalts ist generell mit einer Zunahme des wassergefüllten Porenraums in Böden verbunden. Da für die mikrobielle Aktivität Wasser unerlässlich ist und die Fremdstoff-Desorption nur im wässrigen Milieu erfolgen kann, steigt mit dem Wassergehalt das Bodenvolumen in dem mikrobieller Abbau erfolgen kann an. Dies konnte in dieser Studie sehr gut in den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ beobachtet werden, in denen eine höhere Bodenfeuchte im Bereich von 34 % WHK bis 68 % WHK jeweils mit einer höheren Isoproturon-Mineralisierung (bis maximal 43,7 % im Boden „Feldkirchen“) verbunden war. Ein Vergleich der Mineralisierungswerte mit den Porengrößen-Wassergehalts-Kurven zeigte, dass die maximale Herbizid-Mineralisierung in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ jeweils bei dem Wassergehalt gemessen wurde, bei dem die Bodenporen von 10 bis 15 μm Durchmesser mit Wasser gefüllt waren. Da diese Porenfüllung im Boden „Kelheim“ bereits bei 34 % WHK erreicht war, hatte eine weitere Steigerung des Wassergehalts in diesem Boden keine Auswirkungen auf die Mineralisierung. Dagegen führte ein Anstieg der Bodenfeuchte von 68 % WHK auf 74 % WHK im Boden „Feldkirchen“ zu einer deutlichen Reduktion der Isoproturon-Mineralisierung, die so im Boden „Scheyern“ nicht zu beobachten war. Anhand der pF-Wg-Kurven (vgl. Abbildung 2.1) dieser beiden Böden lässt sich diese Beobachtung folgendermaßen erklären: Im Bereich zwischen 68 % und 100 % WHK werden die noch luftgefüllten Poren im Boden „Feldkirchen“ bei einem weiteren Anstieg der Bodenfeuchte schneller mit Wasser gefüllt als die entsprechenden Poren im Boden „Scheyern“. Da der Sauerstofftransport in wassergefüllten Poren langsamer erfolgt als in luftgefüllten, könnte die unzureichende Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen im Boden „Feldkirchen“ zur beobachteten starken Reduktion der Mineralisierung bei 74 % WHK geführt haben.

Wirkstoffverfügbarkeit

Um zu klären, ob die jeweilige mikrobielle Gemeinschaft der Böden, die für den Abbau von Isoproturon hauptverantwortlich ist (Fournier et al., 1975; Mudd et al., 1983; Cox et al., 1996; Bending et al., 2001), oder die chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften für das diverse Abbaupotential der untersuchten Böden verantwortlich waren, wurden u.a. Versuche zur Bioverfügbarkeit durchgeführt, da diese ebenfalls den mikrobiellen Abbau von Fremdstoffen in Böden beeinflusst (Guerin und Boyd, 1992; Pignatello und Xing, 1996).

Da es bis heute kein anerkanntes Verfahren gibt um die Bioverfügbarkeit von Fremdstoffen in Böden in-situ zu bestimmen, wird zur Beschreibung der Verteilung einer Chemikalie zwischen flüssiger und fester Phase in Böden der Kd-Wert eingesetzt. Wie ein Vergleich der in der Tabelle 2.2 angegebenen Kd-Werte für Isoproturon mit den in den Laborversuchen bestimmten Werten der Isoproturon-Mineralisierung (vgl. Tabelle 3.3) zeigt, war der Kd-Wert jedoch kein geeigneter Parameter, um das Mineralisierungspotential der untersuchten Böden abzuschätzen. Der höchste Kd-Wert und damit die stärkste Adsorption von Isoproturon an die Bodenmatrix wurde für den Boden „Feldkirchen“ bestimmt (vgl. Tabelle 2.2), in dem aber sowohl unter Labor- als auch unter Freilandbedingungen die höchste Mineralisierung der Versuchsböden (vgl. Tabelle 3.10) gemessen wurde. Die hohe Adsorption an die Bodenmatrix hatte somit im Boden „Feldkirchen“ keinen hemmenden Effekt auf den Isoproturon-Abbau. Um die Verfügbarkeit von Fremdstoffen unter „Natur näheren“ Bedingungen als bei der Kd-Wert Bestimmung zu messen, bei der 1 Teil Boden in 5 Teilen Wasser geschüttelt und die Verteilung einer Chemikalie zwischen flüssiger und fester Phase bestimmt wird (Anonym, 1981), wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der selektiven Porenwassergewinnung angewandt. Mit diesem Verfahren sollte die in-situ-Verfügbarkeit von Isoproturon in Bodenproben bestimmt werden, um daraus eine Aussage über die Abbaubarkeit des Wirkstoffs ableiten zu können. Dieses Ziel wurde jedoch nicht erreicht, da für den Boden „Feldkirchen“ der geringste Anteil an gelöstem Isoproturon im Porenwasser der Versuchsböden gemessen wurde. Die selektive Porenwassergewinnung und der daraus berechnete CPC-Wert, der sich direkt proportional zum Kd-Wert verhielt (vgl. Abbildung 3.25), stellte somit in der hier

angewandten Form kein geeignetes Mittel zur Abschätzung der Mineralisierung von Isoproturon dar.

Der fehlende Zusammenhang zwischen Verfügbarkeit und Abbaubarkeit war zunächst überraschend. Es ist jedoch zu beachten, dass beim Fremdstoffabbau im Boden nicht nur die Sorption der Chemikalie an die Bodenmatrix sondern auch die Desorption von der Matrix in die wässrige Lösung eine den Abbau beeinflussende Größe ist, wie z.B. von Guerin und Boyed (1992) für den Abbau von Naphthalin festgestellt wurde. Wie die Untersuchungen von Ma und Dörfler (unveröffentlichte Daten, 2003) zeigten, wurde für den Boden „Feldkirchen“ die niedrigste Desorption von Isoproturon im Vergleich zu den übrigen Versuchsböden bestimmt. Es bleibt somit festzuhalten, dass das große Potential des Bodens „Feldkirchen“ zur Mineralisierung von Isoproturon nicht mit dem Sorptionsverhalten der Substanz an diesen Boden erklärt werden kann.

Einfluss der chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften

Über die Berechnung einer Korrelationsmatrix (Anhang, Tabelle 7.1) bzw. linearer Regressionen zwischen einzelnen Kenngrößen (Kapitel 3.10) wurde der Einfluss der chemisch-physikalischen Bodenkennwerte auf die Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon untersucht. Danach hatten weder das C/N-Verhältnis der Böden, noch der Ton-Gehalt, noch der Gehalt an organischem Kohlenstoff einen Einfluss auf die Mineralisierung von Isoproturon. Der größte Zusammenhang wurde zwischen den Größen „pH-Wert“ und „Mineralisierung“ bzw. „mikrobielle Biomasse“ und „Mineralisierung“ errechnet (vgl. Abbildung 3.26 und 3.27). Die Bedeutung des Einflussfaktors „pH-Wert“ ist für die Beurteilung der Isoproturon-Mineralisierung in Böden sehr aufschlussreich, da der pH-Wert nicht nur ein Maß für die Acidität der Bodenlösung darstellt. Vielmehr ist der pH-Wert ein Indikator für die Bodenentwicklung, der das Milieu für die mikrobielle Gemeinschaft festlegt und sich damit langfristig auf die mikrobielle Ausstattung der Böden auswirkt. In dieser Untersuchung wurde die stärkste Mineralisierung von ¹⁴C-Isoproturon im Boden „Feldkirchen“ gemessen, der den höchsten pH-Wert (7,2) der Versuchsböden hatte. Im Boden „Scheyern“, der mit einem Wert von 5,4 einen deutlich niedrigeren pH-Wert aufwies, wurde das geringste Abbaupotential der untersuchten Böden gegenüber Isoproturon gemessen.

Der Einfluss des pH-Werts auf den Abbau von Isoproturon in Böden wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Zwischen dem pH-Wert von Böden, der Isoproturon- bzw. Monodesmethyl-Isoproturon-Mineralisierung und der Anzahl kultivierbarer Bakterien wurde von Sørensen und Aamand (2001) kein Zusammenhang festgestellt. Ein direkter Einfluss des Boden-pH-Werts auf die funktionellen Eigenschaften der zum Abbau von Isoproturon befähigten Mikroorganismen wurde auch von Bending et al. (2001) in Frage gestellt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in Versuchen mit Zellkulturen, in denen ein isolierter, Isoproturon-abbauender Stamm von *Sphingomonas* sp. eingesetzt wurde, ein starker Einfluss des pH-Werts auf die Fähigkeit der Mikroorganismen zum Fremdstoff-Abbau festgestellt (Bending et al., 2003). In diesen Versuchen verlief der Herbizid-Abbau bei einem pH-Wert von 7,5 deutlich schneller als bei einem pH-Wert unter 7. Ein Einfluss des Boden-pH-Werts wurde auch von Pieuchot et al. (1996) vermutet, der das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in drei Böden untersuchte: Während einer Inkubationszeit von vier Monaten wurde in einem nahezu neutralen Boden (pH 7,3) eine Mineralisierung von 34 % gemessen, während in einem sauren Boden (pH 5,6) nur 10 % des applizierten Wirkstoffs komplett abgebaut wurden. Eine hohe Heterogenität im Verschwinden der Ausgangssubstanz Isoproturon selbst innerhalb eines landwirtschaftlichen Feldes wurde von Walker et al. (2001) festgestellt, wobei in den untersuchten Bodenproben sowohl Unterschiede in den DT_{50} -Werten als auch in der Kinetik des Verschwindens von Isoproturon gemessen wurden. Nach den Ergebnissen dieser Studie waren die Probenahmepunkte mit niedrigeren DT_{50} -Werten jeweils mit höheren pH-Werten verbunden. Darüber hinaus wurde in der genannten Untersuchung von Walker et al. (2001) auf einen Einfluss des pH-Werts auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft der Böden hingewiesen. Bei der Beurteilung dieser konträren Ergebnisse ist zu beachten, dass bisher nur ein kleiner Anteil der Bodenmikroorganismen kultiviert werden kann (Torsvik et al., 1990) und dass nicht auszuschließen ist, dass unkultivierbare Bakterienarten am Abbau der untersuchten Substanzen beteiligt sind, wie dies z.B. für die Mineralisierung von Glyphosat von Forlani et al. (1999) vermutet wurde.

Betrachtet man die Langzeitwirkung, so ist davon auszugehen, dass der pH-Wert einen Effekt auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft eines Bodens hat und damit die Konkurrenz der Pestizid-abbauenden und nicht abbauenden Mikroorganismen

beeinflusst. Auf diese Weise stellt der pH-Wert neben anderen chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften einen Faktor dar, der Auswirkungen auf den Isoproturon-Abbau in Böden hat.

4.1.2 Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaften von Böden auf den Abbau von Isoproturon

Bedeutung der mikrobiellen Gesamtaktivität

Der Einfluss der mikrobiellen Biomasse, die zur Charakterisierung der mikrobiellen Gesamtaktivität von Böden eingesetzt wird, auf die Mineralisierung von Isoproturon wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Reuter (1997) keinen Zusammenhang zwischen der Mineralisierung des Fremdstoffs und der mikrobiellen Biomasse eines mit unterschiedlichen organischen Substraten behandelten Bodens beobachtete, wurde von Lehr et al. (1996b) teilweise eine Korrelation zwischen diesen beiden Größen in unterschiedlich bewirtschafteten Böden festgestellt. Auch in der Untersuchung von Walker et al. (2001) zur Variabilität des Isoproturon-Abbaus innerhalb eines Feldes wurde ein Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Biomasse und dem Abbau von Isoproturon beschrieben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in den Laborversuchen zur Mineralisierung von Isoproturon in Böden die Atmungsaktivität als Parameter der mikrobiellen Gesamtaktivität bestimmt. Trotz unterschiedlicher Mineralisierung des applizierten Herbizids wurden aber keine Unterschiede in der Atmungsaktivität und damit in der mikrobiellen Gesamtaktivität der Böden festgestellt (vgl. Abbildung 3.5). Die Atmungsaktivität war somit kein geeigneter Parameter, um daraus Rückschlüsse auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den untersuchten Böden zu ziehen.

Wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, ließ sich die unterschiedliche Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den untersuchten Böden weder mit Hilfe eines Chemikalien-Verteilungskoeffizienten, noch mittels der chemisch-physikalischen Bodenparameter, noch mittels der Atmungsaktivität der untersuchten Böden erklären. Die großen Unterschiede der Versuchsböden hinsichtlich des Herbizid-Abbaus wurden jedoch auch

in den Versuchen zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Flüssigmedium bestätigt, in denen die Mineralisierung weniger durch physikalische und chemische sondern eher durch mikrobielle „Bodeneigenschaften“ beeinflusst wurde. Somit musste das heterogene Verhalten von Isoproturon in den untersuchten Böden vor allem auf Unterschiede in den Fähigkeiten ihrer mikrobiellen Gemeinschaften zurückzuführen sein.

Unterschiede in der Abbaudynamik

Ein wichtiger Faktor, der auf Unterschiede in den am Abbau von Isoproturon beteiligten mikrobiellen Gemeinschaften der Versuchsböden hinwies, war die unterschiedliche Dynamik der Wirkstoff-Mineralisierung, die sowohl in den Laborversuchen zum Abbau von Isoproturon in Böden (vgl. Abbildung 3.1 und 3.2) als auch in den entsprechenden Flüssigkulturen (vgl. Tabelle 3.11) beobachtet wurde.

Im Boden „Scheyern“ war die niedrige Isoproturon-Mineralisierung mit dem Fehlen einer exponentiellen Abbauphase verbunden. Darüber hinaus wurde in den aufeinanderfolgenden Flüssigkulturen FK „A“ und „B“ dieses Bodens eine deutliche Abnahme der Isoproturon-Mineralisierung gemessen, die auf das Fehlen von Mikroorganismen hinwies, die das Herbizid als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnten. Ein kontinuierlicher und meist langsamer Pestizid-Abbau ohne die Ausbildung einer exponentiellen Abbauphase wurde auch in der Literatur sowohl für Isoproturon (Mudd et al., 1983; Walker et al., 1999; Bending et al., 2001 und 2003; Sørensen und Aamand, 2001) als auch für andere Pestizide (Robertson und Alexander, 1994; Beigel et al., 1999) bereits beschrieben. Eine derartige Abbau-Kinetik, die einer Dynamik erster Ordnung entspricht, wurde in der Literatur häufig mit cometabolischem Abbau in Zusammenhang gebracht (Ottow, 1991; Robertson und Alexander, 1994; Beigel et al., 1999; Bending et al., 2001), was mit den Ergebnissen zur Mineralisierung im Boden und in den Flüssigkulturen „Scheyern“ sehr gut vereinbar ist. Ein derartiger Zusammenhang zwischen der Dynamik der Isoproturon-Mineralisierung und dem zugrundeliegenden Metabolismus wurde auch in einer Untersuchung von Sørensen et al. (2001) bestätigt, wo es nicht gelang aus einem Versuchsboden (Bezeichnung „Graese“),

der nur eine niedrige Isoproturon-Mineralisierung und keine exponentielle Abbauphase zeigte, eine stabile Anreicherungskultur zu gewinnen.

Im Gegensatz zum Boden „Scheuern“ war die Fähigkeit der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ zur Mineralisierung von Isoproturon sehr hoch. Dabei wurde sowohl im Boden als auch in den Flüssigkulturen „Feldkirchen“ zuerst eine lag-Phase der Mineralisierung beobachtet, auf die jeweils eine exponentielle Phase des Abbaus folgte. Diese Abbaudynamik deutet auf das Vorhandensein von Mikroorganismen hin, die ihren Metabolismus an das applizierte Herbizid anpassten, um es als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können (Torstensson, 1980; Ottow, 1991). Die übereinstimmende Dynamik der Isoproturon-Mineralisierung im Boden und in den Flüssigkulturen „Feldkirchen“ bestätigte darüber hinaus, dass die abbauende mikrobielle Gemeinschaft dieses Bodens im Flüssigmedium etabliert werden konnte.

Auch in der Literatur (Pieuchot et al., 1996; Cox et al., 1996; Bending et al., 2001) wurden bereits Böden beschrieben, in denen der Mineralisierungs-Prozess von Isoproturon durch das Auftreten einer lag-Phase mit anschließender exponentieller Abbauphase gekennzeichnet war. Von Bending et al. (2001) wurde die lag-Phase als die Zeitspanne dargestellt, die zum Anwachsen der spezifischen Isoproturon-abbauenden mikrobiellen Population bis zu einem bestimmten Schwellenwert nötig ist, bevor die Phase schnellen Abbaus erfolgen kann. Das Fehlen einer lag-Phase in den Flüssigkulturen FK „B“ des Bodens „Feldkirchen“ bestätigte zum einen die Präsenz von Mikroorganismen, die an die Mineralisierung von Isoproturon adaptiert waren und zeigte darüber hinaus, dass die am Abbau von Isoproturon beteiligten Mikroorganismen in den aufeinanderfolgenden Anreicherungskulturen FK „A“ und FK „B“ effektiver wurden (vgl. Abbildung 3.20).

Die Existenz von Mikroorganismen, die sich in Böden auf die Mineralisierung von Isoproturon spezialisieren und dabei exponentielle Abbauphasen ausbilden, wird auch in der Literatur beschrieben: In einer Studie von Sørensen et al. (2001) wurde ein IPU-mineralisierendes *Sphingomonas* sp. Bakterium aus einem Boden mit der Bezeichnung „Deep Slade“ isoliert, das eine sigmoide Mineralisierungs-Dynamik für Isoproturon zeigte. In einem anderen Boden, der ebenfalls eine sehr schnelle und nach sigmoider Dynamik verlaufende Mineralisierung von Isoproturon aufwies, wurde von Bending et

al. (2003) innerhalb weniger Tage nach der Applikation des Pestizids eine Vermehrung von Isoproturon abbauenden Mikroorganismen detektiert.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es in einigen Untersuchungen möglich war aus der Abbaudynamik von Pestiziden auf die zugrundeliegenden Prozesse des Abbaus zu schließen. Die Ergebnisse zum gesteigerten Abbau von Isoproturon im Boden „Scheyern“ zeigen jedoch (vgl. Kapitel 3.7), dass aus einer Abbaudynamik erster Ordnung nicht automatisch auf den cometabolischen Abbau eines Pestizids geschlossen werden kann. So wurde im Boden „Scheyern“ nach der Zugabe der Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ in Form eines Biofilms (Modifikation „BF“) eine unmittelbare und schnelle Isoproturon-Mineralisierung gemessen, die ebenfalls einer Dynamik erster Ordnung entsprach (vgl. Abbildung 3.22), aber auf den Einfluss der adaptierten, Isoproturon metabolisch abbauenden Mikroorganismen zurückzuführen war. Auch bei der Mineralisierung von ^{14}C -Glucose (Ghani et al., 2001; Nguyen und Guckert, 2001) und ^{14}C -Glyphosat (Robertson und Alexander, 1994) wurde in Böden eine kontinuierliche und schnelle $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung beobachtet, die mit einem metabolischen Umsatz der Substanzen erklärt wurde. Die genannten Ergebnisse zur unterschiedlichen Dynamik der Pestizid-Mineralisierung in Böden lassen den Schluss zu, dass aus der Abbaudynamik einer Substanz in Böden nicht direkt auf den Abbaumechanismus geschlossen werden kann. Vielmehr sollten diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung führen, dass es meist nicht möglich ist den Abbau von Xenobiotika in Böden mit einem spezifischen Abbaumechanismus zu beschreiben, da bei der komplexen Struktur bzw. mikrobiellen Ausstattung von Böden immer mit einer Summe aus metabolischem und cometabolischen aber auch abiotischem Abbau einer Substanz zu rechnen ist.

Unterschiede in der Aufnahme des Wirkstoffs in die mikrobielle Biomasse

Große Unterschiede im Umsatz bzw. in der Aufnahme von ^{14}C -Isoproturon in die Zellen der mikrobiellen Gemeinschaften der Böden „Feldkirchen“ und „Scheyern“ wurden in den Flüssigkulturversuchen deutlich:

In den Flüssigkulturen des Bodens „Feldkirchen“ erfolgte ein hoher Umsatz von Isoproturon, der mit einer zeitgleich zur Mineralisierung stattfindenden Inkorporation des Wirkstoffs in die Mikroorganismen verbunden war (vgl. Abbildung 3.21). Die Aufnahme des Wirkstoffs in die Zellen war aus dem Ergebnis zu folgern, dass am Versuchsende nur noch ca. 11 % des applizierten Pestizids im filtrierten Medium nachweisbar waren, während aber nur 44 % bzw. 48 % Mineralisierung in den Kulturen FK „A“ und FK „B“ gemessen wurden (vgl. Tabelle 3.11). Der verbleibende Anteil des applizierten ^{14}C konnte nicht direkt in der mikrobiellen Biomasse nachgewiesen werden, da die Mikroorganismen einen Biofilm auf den verbleibenden Bodenpartikeln bildeten und somit eine Unterscheidung zwischen dem in die Biomasse aufgenommenen und dem an der Oberfläche der Mikroorganismen bzw. der Bodenpartikel haftenden ^{14}C nicht möglich war. In vergleichbaren Flüssigkultur-Experimenten mit ^{14}C -markiertem Linuron (Roberts et al., 1993) und Isoproturon (Sørensen et al., 2001) wurden bis zum Ende der Inkubationszeit ca. 50 % des applizierten Wirkstoffs mineralisiert, aber weder die Ausgangssubstanz noch einer der Abbaumetaboliten des applizierten Pestizids konnten im Flüssigmedium identifiziert werden. Auch aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass zumindest ein Großteil der verbliebenen Pestizide in die mikrobielle Biomasse inkorporiert wurde.

Im Gegensatz zur mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ erfolgte durch die Mikroorganismen der Flüssigkulturen „Scheyern“ nur ein sehr geringer Isoproturon-Umsatz, so dass am Versuchsende noch 67 % der applizierten Radioaktivität im filtrierten Medium der FK „A“ gemessen wurden (vgl. Tabelle 3.11). Die fehlende Inkorporation von Isoproturon in die Zellen der Flüssigkulturen „Scheyern“ bestätigte den vermuteten cometabolischen Abbau des Pestizids in diesem Boden. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit einer Studie von Bending et al. (2001) überein, die beschreibt, dass in Böden mit cometabolischem Abbau von Isoproturon die Inkorporation eines Ring-Kohlenstoff-Atoms der Substanz in die mikrobielle Biomasse vier bis fünf mal kleiner war als in Böden mit gesteigertem Pestizidabbau.

Unterschiede im Metabolitenmuster

Am Ende der Laborversuche zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in den vier Versuchsböden wurde jeweils die Zusammensetzung der Methanol-extrahierbaren Rückstände analysiert. Vor allem in den Ansätzen mit hohen Wassergehalten und entsprechend hoher Mineralisierung wurden qualitative Unterschiede in den Metabolitenmustern der Versuchsböden deutlich (vgl. Tabelle 3.2), die ihrerseits auf Unterschiede im Isoproturon-Metabolismus der Böden hinwiesen. In dieser Studie wurden die wenigsten Abbaumetabolite im Boden „Feldkirchen“, der die höchste Mineralisierung von Isoproturon aufwies, detektiert. In diesem Boden, wie auch in den Böden „Kelheim“ und „Hohenwart“ stellte Isoproturon jeweils den mengenmäßig größten extrahierbaren Rückstand dar. Im Boden „Scheyern“ war dagegen der große Anteil des Metaboliten C (= 3-(4-Isopropylphenyl)-1-methylharnstoff = Monodesmethyl-IPU) im Methanolextrakt auffällig, der bei einem Wassergehalt von 63 % WHK sogar prozentual stärker im Bodenextrakt vertreten war als Isoproturon selbst (vgl. Tabelle 3.2). Der Metabolit C, der von Mudd et al. (1983) als erstes Abbauprodukt von Isoproturon in Böden beschrieben wurde und von Gaillardon und Sabar (1994) als Hauptmetabolit von Isoproturon in Böden bezeichnet wurde, reicherte sich im Boden „Scheyern“ bei einer Steigerung des Bodenwassergehalts und der damit verbundenen Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung an (vgl. Tabelle 3.1). Der Metabolit C wurde damit durch die mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Scheyern“ deutlich schlechter abgebaut als in den übrigen Versuchsböden (vgl. Tabelle 3.2) und stellte evtl. ein „dead-end-Produkt“ des Isoproturon-Abbaus in diesem Boden dar.

Nur geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Metabolitenmuster beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon in vier unterschiedlichen landwirtschaftlichen Böden wurden dagegen in einer Studie von Lehr et al. (1996a) detektiert. Die untersuchten Böden, die sowohl im Boden als auch in Anreicherungskulturen nur ein geringes Potential zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon zeigten, waren in ihrem Abbauverhalten evtl. zu ähnlich, um Unterschiede im Metabolitenmuster detektieren zu können. Bei der Analyse und dem Vergleich extrahierbarer Rückstände ist jedoch immer zu beachten, dass auch die Bodeneigenschaften (Hatzinger und Alexander, 1995) und das gewählte Extraktionsmittel (Hatzinger und Alexander, 1995; Kelsey et al., 1997) einen großen

Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Rückstände und damit auf das zu detektierende Metabolitenmuster haben können.

4.2 Bildung und Bedeutung gebundener Rückstände beim Abbau von Isoproturon

In den Laborversuchen zum Abbau von ^{14}C -Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ wurde jeweils ein großer Anteil des applizierten Wirkstoffs in Form von nicht-extrahierbaren ^{14}C -Rückständen (NER) festgelegt, wobei in allen Versuchsböden die Tendenz zu beobachten war, dass eine Steigerung der Wirkstoffmineralisierung mit einer Zunahme der NER verbunden war (vgl. Abbildung 3.7). Dieser Zusammenhang wurde in den Versuchen zum Einfluss des Wassergehalts auf die Mineralisierung von Isoproturon im Boden „Hohenwart“ besonders deutlich (vgl. Abbildung 3.8). In den Böden „Feldkirchen“ und „Hohenwart“ betrug der Anteil der NER am Versuchsende bis zu 95 % der im Boden verbliebenen Gesamtrückstände.

Die starke Bildung von NER beim Abbau von Isoproturon in Böden wird auch in der Literatur beschrieben. Dabei wurden von mehreren Autoren trotz unterschiedlicher Lösungsmittel und Extraktionsmethoden vergleichbare Mengen an NER gemessen. So geben Kubiak et al. (1995) und Pieuchot et al. (1996) für Versuche mit ^{14}C -markiertem Isoproturon nach 100 Tagen Inkubation über 60 % NER an, wobei in einem Fall mit einem Methanol-Wasser-Gemisch und im anderen Fall mit reinem Methanol extrahiert wurde. Auch bei der Extraktion mit Aceton wurde von Wirén-Lehr (1997) ein Anteil von mehr als 55 % des applizierten Isoproturon nach 67 Versuchstagen in Form von NER bestimmt. Die Beobachtung, dass die Fraktion der NER von ^{14}C -Isoproturon mit steigender Mineralisierung des Wirkstoffs zunahm, wird auch von Reuter bestätigt (1997). Als Erklärung wird dazu angegeben (Scheunert und Reuter, 2000), dass beim Abbau von Isoproturon das reaktive Isopropylanilin gebildet werde, das an die organische Bodensubstanz binde und nur zu einem geringen Teil mineralisiert werden könne. Dieser Erklärungsansatz von Scheunert und Reuter (2000) wird aufgrund des folgenden Ergebnisses als nicht umfassend angesehen: In der vorliegenden

Untersuchung konnte mit Hilfe von Flüssigkulturen bodenbürtiger Mikroorganismen indirekt gezeigt werden, dass eine hohe Mineralisierung von Isoproturon mit einer zeitgleich stattfindenden Aufnahme des applizierten Wirkstoffs in die mikrobielle Biomasse verbunden war (vgl. Abbildung 3.21 und Tabelle 3.11). Aus dieser Beobachtung, sowie aus der Tatsache, dass der Anteil der NER bei steigender Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in Böden anstieg, wurde die folgende Hypothese abgeleitet: Beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon in Böden wird ein Teil des applizierten Wirkstoffs in die mikrobielle Biomasse eingebaut, so dass ^{14}C -markierte Naturstoffe gebildet werden. Der Einbau des ^{14}C -Atoms erfolgt dabei eventuell auch erst nach dem Totalabbau zu $^{14}\text{CO}_2$. Die gebildeten ^{14}C -markierten Naturstoffe sind aus Bodenproben mit dem für Isoproturon optimierten Extraktionsverfahren nicht oder nur zum Teil extrahierbar und können einen bedeutenden Anteil der mit Methanol nicht extrahierbaren ^{14}C -Rückstände darstellen.

Um die aufgestellte Hypothese überprüfen zu können, wurde in dieser Studie zunächst die Bildung von NER aus ^{14}C -Isoproturon in sterilen Böden untersucht (Kapitel 3.9.1). Hier konnte gezeigt werden, dass aus den verwendeten Böden unter abiotischen Bedingungen auch nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen noch 100 % des applizierten Wirkstoffs mit Methanol extrahierbar waren. Sieht man die Methanol-extrahierbaren Rückstände als den potentiell verfügbaren Anteil einer Chemikalie im Boden an (Northcott und Jones, 2000), so lässt das Ergebnis die folgenden Schlussfolgerungen zu:

1. Ohne den Einfluss der mikrobiellen Aktivität werden in den untersuchten Böden innerhalb von 8 Tagen keine NER gebildet.
2. Isoproturon selbst ist für Mikroorganismen auch 8 Tage nach der Applikation auf Böden noch vollständig verfügbar. Dieses Ergebnis wird durch eine Untersuchung von Gaillardon (1996) bestätigt, in der aus einem Boden, dessen mikrobielle Aktivität chemisch gehemmt wurde, mehr als vier Wochen nach der Applikation von Isoproturon noch 100 % des Wirkstoffs mit Methanol extrahiert werden konnten.

Des Weiteren lassen die Versuche zur Extrahierbarkeit ^{14}C -markierter Biomasse (Kapitel 3.9.2), die sowohl aus ^{14}C -Glucose als auch aus ^{14}C -Isoproturon angezogen wurde, folgende Schlussfolgerung zu: ^{14}C -markierte Substrate, die den

Mikroorganismen in den Flüssigkulturen als Kohlenstoffquelle dienten, wurden in die mikrobielle Biomasse derart eingebaut, dass sie mittels Methanolextraktion nur zu einem geringen Anteil extrahiert werden konnten. Wurde den zum Abbau von Isoproturon befähigten Mikroorganismen ^{14}C -Isoproturon als einzige Kohlenstoffquelle angeboten, so konnten sie das Substrat ähnlich gut verstoffwechseln und in die mikrobielle Biomasse einbauen wie ^{14}C -Glucose, was anhand der vergleichbaren Extraktionsergebnisse gezeigt werden konnte. Die aufgestellte Hypothese zur Bildung von NER beim Abbau von Isoproturon in Böden durch Inkorporation des Wirkstoffs bzw. von Teilen des Wirkstoffmoleküls in die mikrobielle Biomasse wurde durch diese Ergebnisse gestützt.

Die Folgerung, dass es sich bei den NER zu einem bedeutenden Teil um ^{14}C -markierte Biomasse und damit um Naturstoffe handeln könnte, wird auch durch die Ergebnisse von Kästner et al. (1999) untermauert, der den Einbau von $^{14}\text{CO}_2$, das aus der Mineralisierung von ^{14}C -markiertem Anthracen stammte, in die Bodenmatrix untersuchte. In der genannten Studie wurden nach einer Inkubationszeit von 90 Tagen 95,2 % des applizierten $^{14}\text{CO}_2$ in der Matrix einer Boden-Kompost-Mischung wiedergefunden, wobei 85,8 % der fixierten Aktivität als nicht-extrahierbar bestimmt wurden. Kästner et al. (1999) konnten somit zeigen, dass die nicht photosynthetische CO_2 -Fixierung, die bisher nicht verstanden ist, einen bedeutenden Anteil an der Bildung von NER beim Abbau von Xenobiotika in Böden haben kann.

4.3 Verhalten von Isoproturon unter Freilandbedingungen

Mineralisierung in Böden

Das Verhalten von ^{14}C -Isoproturon im Boden-Pflanzen-System unter Freilandbedingungen wurde in Lysimeterversuchen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mineralisierung von Isoproturon in allen Versuchsböden unter Labor- und Freilandbedingungen vergleichbare Werte erreichte (vgl. Tabelle 3.10). Nur im Boden „Hohenwart“ war die Mineralisierung im 1. Lysimeterversuch (2001) reduziert, was auf hemmende ökologische Bedingungen zurückzuführen war.

Eine genauere Analyse der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung unter Labor- und Freilandbedingungen zeigt, dass die Mineralisierung im 2. Lysimeterversuch (2002) in allen Böden etwas höher war als unter Laborbedingungen. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass der Wassergehalt der Böden im zweiten Freilandversuch während der ersten 30 Versuchstage im Durchschnitt so hoch war, dass die Wasserfüllung der Bodenporen den Stand erreichte, der sich anhand der Laborversuche als besonders günstig für die Mineralisierung von Isoproturon erwies (vgl. Abbildung 3.4). Zum anderen lagen die Mittelwerte der Bodentemperatur bis zu zwei °C über den in den Laborversuchen verwendeten Temperaturen von 20 °C (vgl. Tabelle 3.10). Die erhöhte Temperatur, verbunden mit den optimalen Wassergehalten der Versuchsböden, ermöglichte über eine allgemeine Steigerung der mikrobiellen Aktivität die Erhöhung der Isoproturon-Mineralisierung in den Versuchsböden (vgl. Hurle und Walker, 1980). Der direkte Einfluss der Bodentemperatur auf die Mineralisierung von Isoproturon wurde auch im 1. Lysimeterversuch beobachtet, wo sich Temperaturschwankungen unmittelbar auf die Mineralisierungsraten auswirkten (vgl. Abbildung 3.12).

Im Kapitel 3.2.1.5 wurde die geringe Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon im Boden „Hohenwart“ während des 1. Lysimeterversuchs mit der sehr niedrigen Bodenfeuchtigkeit und der damit verbundenen geringen mikrobiellen Aktivität im Versuchsverlauf erklärt. Diese Erklärung wurde durch den 2. Lysimeterversuch bekräftigt, da hier im Boden „Hohenwart“ bei größerer Bodenfeuchtigkeit eine im Vergleich zum 1. Lysimeterversuch deutlich gesteigerte $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung gemessen wurde, die sogar das Ergebnis der Laborversuche noch übertraf (vgl. Tabelle 3.10).

Leichte Unterschiede zwischen Labor- und Lysimeterversuch waren in der Dynamik der Isoproturon-Mineralisierung zu erkennen, wobei die lag-Phase in den Lysimeterversuchen (> 7 Tage) jeweils länger war als in den Laborversuchen (4 Tage) (vgl. Abbildung 3.19). Im 1. Lysimeterversuch war die deutlich verlängerte lag-Phase darauf zurückzuführen, dass die Böden zum Zeitpunkt der Applikation sehr trocken waren, was gerade in den obersten Zentimetern der Böden zu einer deutlichen Beeinträchtigung der mikrobiellen Aktivität und der Bioverfügbarkeit des applizierten Wirkstoffs geführt haben muss. Es ist davon auszugehen, dass erst die kurz nach der

Applikation einsetzenden Regenfälle den Wirkstoff im Lysimetersystem für die Mikroorganismen verfügbar machten und generell zu einer Steigerung der mikrobiellen Aktivität in den für die Mineralisierung entscheidenden obersten Zentimetern der Böden führten. Die in den Lysimeterversuchen verlängerte lag-Phase lässt sich darüber hinaus mit dem Einfluss der Bodentemperatur erklären, die im Gegensatz zu den Laborversuchen tageszeitlichen Schwankungen unterworfen war. Die kühleren Bodentemperaturen während der Nacht könnten, im Vergleich zum Laborversuch, ein verlangsamtes Wachstum bzw. eine reduzierte Enzymsynthese der Isoproturon abbauenden Mikroorganismen während der lag-Phase verursacht haben, was zu einer Verzögerung der Mineralisierung von Isoproturon führte.

Ein weiterer Unterschied der Versuchsansätze, der Auswirkungen auf die Dynamik der Mineralisierung gehabt haben könnte, war die Form der Wirkstoffapplikation. Im 1. Lysimeterversuch wurde das Pestizid entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis auf die Bodenoberfläche aufgesprüht und nicht eingearbeitet. Damit war der Wirkstoff im 1. Lysimeterversuch zumindest bis zum ersten Regenereignis nur den an der Bodenoberfläche sitzenden Mikroorganismen zugänglich bzw. wurde überhaupt erst durch das genannte Regenereignis verfügbar. Im Laborversuch und im 2. Lysimeterversuch wurde Isoproturon dagegen unter die eingesetzte Bodenmenge gemischt, war somit sehr gut im untersuchten Boden verteilt und von Versuchsbeginn an einer großen Menge an Mikroorganismen zugänglich. Die unterschiedliche Applikationsform und Mineralisierungsdynamik, die hier beschrieben wurde, hatte aber keinen Einfluss auf die Summe der Mineralisierung, wie dies auch von Mudd (1983) für Versuche mit ^{14}C -Isoproturon beschrieben wurde.

Der entscheidende Einfluss des Bodenwassergehalts auf die Verfügbarkeit von Chemikalien in Böden wurde bereits von Pätzold und Brümmer (2003) beschrieben. In Extraktionsversuchen mit drei Herbiziden wurde festgestellt, dass ein niedriger Bodenwassergehalt bei der Applikation zu einer reduzierten Extrahierbarkeit der Chemikalien aus den Böden führte. Darüber hinaus stellten Pätzold und Brümmer (2003) fest, dass auch nach längerer Inkubationszeit der extrahierbare Anteil der applizierten Herbizide durch die Wiederbefeuchtung der Bodenproben anstieg. Die

Untersuchungsergebnisse von Pätzold und Brümmer (2003) bestätigen die obige Aussage, dass die bei der Applikation von Isoproturon im 1. Lysimeterversuch dieser Studie herrschende Trockenheit die Verfügbarkeit des Wirkstoffs zunächst beeinträchtigte. Darüber hinaus könnte, nach den Ergebnissen der genannten Autoren, die gesteigerte Isoproturon-Mineralisierung in den Lysimeterversuchen (Ausnahme Boden „Hohenwart“ im 1. Lysimeterversuch) im Vergleich zu den Laborversuchen darauf zurückzuführen sein, dass sich die zum Teil extremen Feuchtigkeitsschwankungen der Böden unter Freilandbedingungen positiv auf die Verfügbarkeit von Isoproturon auswirkten.

Durch den Einsatz von Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren in den Lysimeterstudien dieser Arbeit war es möglich, den Einfluss der beiden natürlich schwankenden Umweltparameter Bodentemperatur und -feuchtigkeit auf die Mineralisierung von Isoproturon online zu verfolgen. Wie für den 1. Lysimeterversuch ausführlich dargelegt wurde (vgl. Kapitel 3.2.1.5), wirkten sich Änderungen dieser beiden Bodenparameter direkt auf die Mineralisierungsraten von Isoproturon in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Scheyern“ aus, so dass außergewöhnliche und kurzzeitige Schwankungen der Isoproturon-Mineralisierung auf die sich verändernden Umweltbedingungen zurückzuführen waren (vgl. Abbildung 3.11, 3.12 und 3.13). Durch den Einsatz der Feuchtigkeitssensoren war es darüber hinaus möglich, die extrem trockenen Verhältnisse im Boden „Hohenwart“ während des 1. Lysimeterversuchs zu belegen, die für die außergewöhnlich niedrige Mineralisierung von Isoproturon in diesem Boden verantwortlich waren.

Volatilität von Bodenoberflächen

Neben der Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon wurde in den Lysimeterversuchen die Volatilität von ^{14}C -markierten Substanzen von den Bodenoberflächen untersucht:

Dabei zeigte sich, dass die maximalen Isoproturon-Volatilitätsraten für die Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“ und „Hohenwart“ direkt nach der Applikation bestimmt wurden, wie dies in der Literatur auch für andere Pestizide bereits beschrieben wurde (Schroll et al., 1992 und 1999; Stork et al., 1994). Des Weiteren war an der Freisetzung

^{14}C -markierter volatiler organischer Verbindungen von den Bodenoberflächen der Lysimeter auffällig, dass über den Versuchszeitraum von 56 Tagen aus dem Boden „Feldkirchen“, der die höchste Mineralisierung zeigte, auch die größte Menge an volatilen Substanzen freigesetzt wurde (0,37 % des applizierten ^{14}C). Dieses Ergebnis war überraschend, da der Boden „Feldkirchen“ den höchsten Kd-Wert der verwendeten Böden aufwies, was niedrige Volatilitätsraten erwarten ließ. Ursache für die unerwartet hohe Volatilität im Boden „Feldkirchen“ war möglicherweise der hohe C-Gehalt und die darauf zurückzuführende dunkle Farbe dieses Bodens, die zu einer schnellen Erwärmung des Bodens und der damit verbundenen verstärkten Volatilität beitrug.

Von der Bodenoberfläche der übrigen Lysimeter wurden geringere Mengen volatiler Substanzen freigesetzt. Trotz gleicher Reihung der Lysimeterböden in der Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ und volatiler ^{14}C -markierter organischer Verbindungen ist bei Betrachtung der Ausgangssubstanz kein ursächlicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen zu vermuten. Vielmehr kommt den physikalisch-chemischen Bodenbedingungen sowie der Bodenfeuchtigkeit und –temperatur eine große Bedeutung bei der Beurteilung der Volatilität zu (Dörfler et al., 1991; Alvarez-Benedi et al., 1999; Lembrich et al., 1999). Der Einfluss dieser beiden Bodenparameter auf die Volatilität von Isoproturon konnte mit Hilfe der eingebauten Sensoren direkt verfolgt werden (vgl. Abbildung 3.15 und 3.16).

Im sandigen und gut durchlüfteten Boden „Hohenwart“, der den niedrigsten Kd-Wert der Versuchsböden aufwies, war die Volatilität viel geringer als in den Vergleichsböden. Dies war auf die starken Regenfälle kurz nach der Applikation zurückzuführen, die zu einer verstärkten Einwaschung des Pestizids im Boden „Hohenwart“ führten, wie ein Vergleich der ^{14}C -Rückstände in den Bodentiefen von 5 bis 15 Zentimeter aller Versuchsböden aufzeigt (vgl. Tabelle 3.5). Folglich konnten nur noch geringere Mengen Isoproturon am Prozess der Volatilität, der v.a. an der Bodenoberfläche stattfand, teilhaben.

Mineralisierung und Volatilität durch Pflanzen

Die unterschiedliche Verlagerung von ^{14}C -Isoproturon in den untersuchten Böden hatte auch Auswirkungen auf den Umsatz des applizierten Herbizids durch die Pflanzen. Der

größte ^{14}C -Gehalt wurde am Versuchsende des 1. Lysimeterversuchs in den Pflanzen des Bodens „Hohenwart“ gemessen. Ebenso wurde im Boden „Hohenwart“, in dem die applizierte ^{14}C -Radioaktivität am stärksten in die Bodentiefe von 5 bis 15 Zentimeter und damit in den stark durchwurzelten Bodenbereich transportiert wurde, die größte Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ und volatilen ^{14}C -Verbindungen über die Pflanzen gemessen (vgl. Abbildung 3.17 und Tabelle 3.9). Diese starke Aufnahme und Umsetzung des applizierten ^{14}C -Isoproturon durch die Pflanzen des Bodens „Hohenwart“ wurde durch die umweltbedingte geringe Mineralisierung in diesem Boden sowie die starke Einwaschung des Wirkstoffs (vgl. Tabelle 3.5) während des 1. Lysimeterversuchs begünstigt. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss zwar beachtet werden, dass es im Pflanzensystem des Lysimeterversuchs nicht möglich war, zwischen dem über die Wurzeln aufgenommenen und im Stängel transportierten ^{14}C und dem auf die Blätter applizierten und abgebauten ^{14}C -Fremdstoff zu unterscheiden. Da die Pflanzen der vier Lysimeterböden zum Zeitpunkt der Applikation jedoch nahezu identische Wachstumsstadien aufwiesen, müssen die gemessenen Unterschiede im Umsatz von Isoproturon auf eine unterschiedliche Wirkstoffaufnahme über die Wurzelsysteme zurückzuführen sein.

Auch in den übrigen Lysimeterböden wurde im 1. Lysimeterversuch ein negativer Zusammenhang zwischen der Wirkstoffmineralisierung im Boden und dem Umsatz von Isoproturon durch die Pflanzen beobachtet: D. h. im Boden „Feldkirchen“, in dem die höchste $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung aus dem Boden gemessen wurde, wurde der geringste Chemikalienumsatz durch die Pflanzen gemessen (vgl. Tabelle 3.9).

Die geringste Menge an ^{14}C -markierten volatilen Verbindungen wurde aus den Pflanzen der Lysimeter „Feldkirchen“ und „Kelheim“ freigesetzt, die auch die niedrigste $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung der Versuchspflanzen zeigten (vgl. Tabelle 3.9).

Der Einfluss von Pflanzen auf den Umsatz von organischen Chemikalien in Böden wird auch in der Literatur diskutiert (Liste und Alexander, 2000a und 2000b). Dabei sind aber nur wenige Informationen über die Mineralisierung von Chemikalien durch Pflanzen enthalten. So wurde in einigen Studien z.B. der Umsatz von TNT (Hughes et al., 1997) und ^{14}C -Atrazin (Burken und Schnoor, 1997) durch Pflanzen untersucht, aber

in beiden Untersuchungen wurde keine Mineralisierung des applizierten Fremdstoffs durch die Pflanzen beobachtet. Die Aufnahme von drei verschiedenen Herbiziden in Feldfrüchte und Getreidepflanzen wurde in einer Lysimeterstudie untersucht (Burael und Führ, 2000). Dabei zeigte sich, dass Terbutylazin, das im Vergleich zu den beiden anderen Herbiziden den größten Gehalt an extrahierbaren Rückständen im Boden bildete, über einen Zeitraum von 25 Monaten zu 2,85 % der applizierten Wirkstoffmenge in die Pflanzen aufgenommen wurde. In der genannten Studie (Burael und Führ, 2000) war es aufgrund des verwendeten Versuchsaufbaus jedoch nicht möglich, die im Versuchsverlauf auftretende $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung durch die Pflanzen zu bestimmen. Bei einem Wert von 2,85 % Gesamtrückstände in den Pflanzen ist es jedoch möglich, wie ein Vergleich mit den Werten dieser Studie zeigt, dass die Pflanzen einen beträchtlichen Beitrag zur Mineralisierung des Wirkstoffs leisteten.

Analyse der extrahierbaren Rückstände – „Metabolitenmuster“

Der Einfluss von Pflanzen auf den Abbaumetabolismus von ^{14}C -Isoproturon in Böden wurde von Mudd et al. (1983) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Weizenpflanzen keinen Einfluss auf das beim Abbau entstehende Metabolitenmuster des Wirkstoffs im Boden haben. Ein Vergleich der Lysimeterversuche (= mit Pflanzen) mit den Laborversuchen (= ohne Pflanzen) der vorliegenden Arbeit zeigt, dass auch in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ kaum Unterschiede in der Bildung von Metaboliten festzustellen waren (vgl. Tabelle 3.2 und 3.8). Das Ergebnis, dass die Pflanzen keinen Einfluss auf den Abbaumetabolismus von Isoproturon in Böden haben, lässt den Schluss zu, dass die für den Herbizidabbau verantwortlichen Mikroorganismen durch die Rhizosphäre und die pflanzlichen Exsudate nicht beeinflusst werden oder dass Isoproturon in An- oder Abwesenheit von Pflanzen zwar von unterschiedlichen Mikroorganismen aber mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut wird (Mudd et al., 1983).

Des Weiteren konnte durch die mehrmalige Entnahme und Analyse von Bodenproben im Verlauf des Isoproturon-Abbaus im Lysimeterversuch des Bodens „Scheyern“ eine Anreicherung des Metaboliten C bei Zunahme der Mineralisierung von Isoproturon verfolgt werden (vgl. Tabelle 3.7). Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung der

Laborversuche, bei denen im Boden „Scheuern“ unter dem Einfluss unterschiedlicher Wassergehalte und daraus folgender unterschiedlicher Mineralisierung von Isoproturon ebenfalls eine Anreicherung dieses Metaboliten beobachtet wurde (vgl. Tabelle 3.1). In den übrigen Versuchsböden erfolgte dagegen keine Anreicherung eines Abbaumetaboliten, sondern Isoproturon selbst stellte, wie in den Laborversuchen, den mit Abstand größten extrahierbaren Rückstand dar.

Gebundene Rückstände

In den untersuchten Böden wurden 56 Tage nach der Applikation von ^{14}C -Isoproturon im 1. Lysimeterversuch die großen Mengen an ^{14}C -Rückständen (GRB bis zu 87 % des applizierten ^{14}C) detektiert, die bereits in den Laborversuchen (GRB bis zu 84 % des applizierten ^{14}C) festgestellt wurden. Die Analyse der Gesamtrückstände ergab, dass im Bereich von 0 bis 15 Zentimeter Bodentiefe der Anteil der NER jeweils größer war, als der Anteil der MER (vgl. Tabelle 3.4 und 3.5). Wie die Labor- und Flüssigkulturversuche zeigten, kam es mit fortschreitender Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon zur verstärkten Bildung von NER in Böden. Dies wurde auch im Lysimeterversuch bestätigt, da zwischen den Versuchstagen 28 und 42 der Anteil der NER an den Gesamtrückständen in den Böden „Kelheim“, „Scheuern“ und „Hohenwart“ mit der Mineralisierung zunahm, bevor es im weiteren Versuchsverlauf wieder zu einer leichten Abnahme der NER kam (vgl. Tabelle 3.6). Diese Entwicklung des Anteils an extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückständen ist sehr gut mit der von Führ (1987) beschriebenen allgemeinen zeitlichen Entwicklung des Anteils an verfügbaren und gebundenen Rückständen von Pflanzenschutzmitteln in Böden vereinbar. Im Boden „Feldkirchen“ konnte diese Entwicklung der NER unter Freilandbedingungen nicht beobachtet werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass der Schotteranteil in diesem Boden sehr groß war und damit eine repräsentative Probenahme deutlich schwieriger war als in den übrigen Versuchsböden, was die großen Schwankungen der Gesamtrückstände zeigen (vgl. Tabelle 3.6).

Der Vergleich der Labor- und Lysimeterversuche zum Verhalten von ^{14}C -Isoproturon in Böden zeigt, dass die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in beiden Versuchssystemen vergleichbar war. Die verwendeten Versuchssysteme waren damit zur Untersuchung des Wirkstoffverhaltens in Böden geeignet. Die Lysimeterversuche machten jedoch auch deutlich, wie wichtig es ist, das Verhalten von Chemikalien in einem komplexen Ökosystem und unter Freilandbedingungen mit wechselnden Umweltfaktoren zu untersuchen, da sonst die Auswirkungen von Pflanzen und von extremen Umweltbedingungen, wie der hier beschriebenen andauernden Trockenheit im 1. Lysimeterversuch, auf der Grundlage von Laborversuchen oft unterschätzt werden.

4.4 Möglichkeiten zur Steuerung der Isoproturon-Mineralisierung

Um eine Akkumulation von Pestiziden in Böden und mögliche nachteilige Auswirkungen auf angrenzende Umweltkompartimente (wie z.B. Oberflächen- und Grundwasser) zu verhindern, muss angestrebt werden, die Verweilzeit der Chemikalien in Böden auf das Nötigste zu begrenzen. Grundsätzlich müssen Pestizide, um ihrer herbiziden Wirkung gerecht zu werden, in Böden nur so lange in ihrer chemischen Struktur unverändert und damit wirksam bleiben, bis sie die Wildkräuter so nachhaltig geschädigt bzw. unterdrückt haben, dass die Kulturpflanze einen vegetativen Vorteil gegenüber den Wildkräutern erlangt hat. Daraufhin wäre eine möglichst schnelle und umfassende Entfernung der Pestizidrückstände aus den Böden wünschenswert. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Studie Möglichkeiten zu entwickeln, um gezielt und steuernd auf den Umsatz von Isoproturon in Böden einwirken zu können.

Als ein entscheidender Einflussfaktor auf das Isoproturon-Abbaupotential der Versuchsböden wurde in dieser Untersuchung die Leistungsfähigkeit bzw. Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften der Böden erkannt. Die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in Böden wird von den ökologischen Rahmenbedingungen entscheidend beeinflusst, wobei der pH-Wert von Böden einen einflussreichen integrierenden Umweltparameter darstellt, der in der Literatur häufig in direkten Zusammenhang mit dem Abbau von Isoproturon gebracht wird (Pieuchot et al., 1996; Walker et al., 2001). Eine gezielte und nachhaltige Beeinflussung bzw.

Anhebung des pH-Werts landwirtschaftlicher Böden wäre unter Freilandbedingungen jedoch kaum durchführbar. Es wurde deshalb versucht, gezielt auf die mikrobielle Aktivität von Böden einzuwirken, um auf diese Weise eine Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung zu erwirken. Eine allgemeine Steigerung der Atmungsaktivität, die in dieser Studie durch eine Strohdüngung erreicht wurde, war jedoch nicht mit einer Steigerung des Fremdstoffabbaus gekoppelt, sondern führte im Gegenteil zu einer Reduktion der Isoproturon-Mineralisierung (vgl. Tabelle 3.12).

Bei der Entwicklung anderer Möglichkeiten zur Steigerung der Fremdstoffmineralisierung in landwirtschaftlichen Böden wurde angestrebt, die am Abbau von Isoproturon beteiligte mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“, der das größte Abbaupotential der Versuchsböden zeigte, auf Zielböden mit geringerem Abbaupotential zu übertragen, um so eine effektivere Wirkstoffmineralisierung zu erreichen. Es wurden drei Methoden entwickelt, die es ermöglichten, die mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“, die zu einem metabolischen Umsatz der Ausgangssubstanz fähig war, auf die Zielböden zu übertragen. Durch den Transfer der spezifischen Mikroorganismen mittels Bodeninokulum, mittels Flüssigkultur oder als Biofilm konnte das Abbaupotential der Zielböden sowohl unter Labor- als auch unter Freilandbedingungen gesteigert werden (vgl. Tabelle 3.13, 3.14 und Abbildung 3.24). Die Funktion der übertragenen aktiven mikrobiellen Gemeinschaft konnte erfolgreich im Zielboden etabliert werden, auch wenn der pH-Wert der Zielböden für eine gesteigerte Wirkstoffmineralisierung ungeeignet schien. So zeigten die Versuche zur Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung im Boden „Scheyern“ (pH 5,4), dass der pH-Wert dieses Bodens für die Zeit der Inkubation (46 Tage) keinen direkten hemmenden Effekt auf die zugefügten Isoproturon abbauenden Mikroorganismen hatte. Der Lysimeterversuch, in dem im modifizierten Boden bis zum Versuchsende eine höhere Mineralisierungsrate gemessen wurde als im Kontrollboden, machte darüber hinaus deutlich, dass sich die übertragene mikrobielle Gemeinschaft über einen Zeitraum von mindestens 46 Tagen im Zielboden etablieren ließ (vgl. Abbildung 3.24). Da die Zugabe von sterilem Mineralsalzmedium und sterilem Blähton keine Auswirkungen auf die Mineralisierung von Isoproturon im Boden „Scheyern“ hatte, konnte bestätigt werden, dass die Additive selbst die Eigenschaften der mikrobiellen Gemeinschaft dieses Bodens nicht veränderten, sondern die übertragene Gemeinschaft

des Bodens „Feldkirchen“ der ausschlaggebende Faktor war. In den Flüssigkulturen des Bodens „Scheuern“ wurde gezeigt, dass auch eine Milieuveränderung (von pH 5,4 im Boden auf pH 7 in den FK) nicht zu einer höheren Mineralisierung von Isoproturon durch die mikrobielle Gemeinschaft des Bodens „Scheuern“ führte (vgl. Tabelle 3.11). Dieses Ergebnis bestätigte, dass der pH-Wert nicht nur ein Maß für die Acidität der Bodenlösung ist, sondern ein Indikator der Bodenentwicklung, der zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung und Leistung der für die Isoproturon-Mineralisierung verantwortlichen mikrobiellen Gemeinschaften der Versuchsböden führte.

In dieser Studie wurde festgestellt, dass beim Abbau von Isoproturon in Böden jeweils große Mengen an NER gebildet wurden. Eine Erhöhung des Bodenwassergehalts bzw. eine Strohdüngung führten sogar zu einer verstärkten Bildung von NER in den Versuchsböden. Im Gegensatz dazu führte die Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung durch den Transfer adaptierter Mikroorganismen in den Böden „Scheuern“, „Kelheim“, und „Hohenwart“ jeweils zu einer Reduktion der NER (vgl. Tabelle 3.13 und 3.14). Dieses Ergebnis ist besonders erfreulich, da es das Ziel aller Remediationsverfahren sein muss, Chemikalien vollständig aus den Böden zu entfernen und nicht im Boden in Form von NER festzulegen, wie dies u.a. für die Chemikalien TNT (Bruns-Nagel et al., 2000), PAKs (Eschenbach et al., 1998), DDT und Dieldrin (Robertson und Alexander, 1998) diskutiert wurde. Eine gezielte Bildung nicht-extrahierbarer Pestizid-Rückstände in Böden kann keine Alternative zur Mineralisierung der Substanz darstellen, da die Remobilisierung von gebundenen Pestizid-Rückständen und z.B. der folgende Austrag ins Grundwasser selbst Jahre nach der Applikation gezeigt wurde (Johnson et al., 2001). Die Kontamination des Oberflächen- und Grundwassers mit Pestizid-Rückständen stellt bereits ein reales Problem dar (Garmouma et al., 1997; Garmouma et al., 1998; Loewy et al., 1999; Johnson et al., 2001), das dadurch verschärft wird, dass das Potential zum Abbau von z.B. Isoproturon im Oberflächen- und Grundwasser sehr gering ist (Mouvet et al., 1997; Albrechtsen et al., 2001) und sowohl räumlich als auch zeitlich variiert (Johnson et al., 2000; Albrechtsen et al., 2001). Auch in Bayern werden in vielen Grundwasserleitern bereits Isoproturon- und Atrazin-Konzentrationen gemessen, die nahe am zulässigen

Grenzwert von $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ liegen (Bayerisches Wasserwirtschaftsamt, persönliche Mitteilung, 2003).

Das größte Optimierungspotential zur weiteren Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung in Zielböden liegt, nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der Übertragung eines adaptierten Biofilms, da diese Modifikationsmethode (Modifikation „BF“) sehr hohe Mineralisierungsraten direkt nach der Applikation des Wirkstoffs ermöglichte (vgl. Abbildung 3.23). Eine Anwendung der Modifikationsmethode „BF“ auf landwirtschaftliche Böden, nachdem das applizierte Herbizid seine volle Funktion erfüllen konnte, wäre somit gut geeignet, um den Abbau der Chemikalie in Böden gezielt und mit schnellem Erfolg zu steigern. Der Einsatz eines spezifischen Biofilms ist nach den bisherigen Untersuchungen auch nötig, da es in den Versuchen zur Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon in Flüssigkultur nicht möglich war, eine einzelne Bakterienart aus dem Boden „Feldkirchen“ zu isolieren, die zur Mineralisierung des ^{14}C -markierten Wirkstoffs fähig war. Auch war es nicht möglich, durch einfaches Überimpfen von einem Teil der Ausgangskultur in frisches Medium, eine stabile Flüssigkultur der Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens „Feldkirchen“ zu erreichen. Erst durch den Einsatz künstlicher Oberflächen, die den Mikroorganismen in den Flüssigkulturen als Aufwuchsmaterial dienten, war es möglich, die mikrobielle Gemeinschaft in Form eines Biofilms ohne Verlust ihres Abbaupotentials in ein frisches Medium bzw. auf einen Zielboden zu übertragen. Die Notwendigkeit eines geeigneten Aufwuchsmaterials bzw. der Ausbildung eines Biofilms zur Mineralisierung von Isoproturon weist darauf hin, dass im Boden „Feldkirchen“ nicht nur eine Art von Mikroorganismen sondern eine mikrobielle Gemeinschaft am Abbau des Wirkstoffs beteiligt war. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit anderen Studien überein, in denen ebenfalls auf die Notwendigkeit komplexer Bakterienkulturen zum kompletten Abbau von Herbiziden hingewiesen wurde (Lappin et al., 1985; Roberts et al., 1993; Assaf und Turco, 1994; El-Fantroussi, 2000). So gelang es z.B. El-Fantroussi (2000) und Roberts et al. (1993) nicht, Reinkulturen von Bakterien zu isolieren, die zum Abbau des Phenylharnstoff-Herbizids Linuron fähig waren. Sie zogen daraus die Schlussfolgerung, dass die Mineralisierung dieses Wirkstoffs nur durch Konsortien von Mikroorganismen erfolgen kann. Die mikrobiellen

Konsortien, die fähig sind Pestizide zu mineralisieren, müssen dabei wenigstens aus zwei Stämmen von Mikroorganismen bestehen. Die zwei beteiligten Arten von Mikroorganismen können dabei entweder aufeinanderfolgende Schritte in der Mineralisierung der Ausgangssubstanz durchführen (De Souza et al., 1998) oder der zum Abbau befähigte Stamm von Mikroorganismen benötigt zusätzliche Wachstumsfaktoren bzw. Nährstoffe, die vom zweiten Stamm geliefert werden (Sørensen et al., 2002).

Die Möglichkeit einer beschleunigten Mineralisierung organischer Chemikalien in Böden durch den Transfer adaptierter mikrobieller Gemeinschaften wurde auch von Sørensen et al. (2002) und Assaf und Turco (1994) berichtet. Bisher sind jedoch keine Daten über den Langzeiteffekt der übertragenen Mikroorganismen auf die Zielböden verfügbar. Anzustreben ist hierbei, dass die übertragene mikrobielle Gemeinschaft jeweils so lange im Zielboden etabliert werden kann, bis die organische Chemikalie nahezu komplett mineralisiert wurde. Wird zur Mineralisierung eines Pestizids eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft benötigt, so ist zu berücksichtigen (Roberts et al., 1993), dass diese Gemeinschaft in Abwesenheit des Selektionsfaktors (= Xenobiotika) evtl. anfälliger ist als eine Vielzahl an Mikroorganismen, von denen jede einzelne Art zur Mineralisierung der Ausgangssubstanz befähigt wäre. In der Literatur wurde bisher jedoch nur ein Bakterienstamm, *Sphingomonas* sp. (Sørensen et al., 2001), beschrieben, der Isoproturon mineralisiert. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Methoden zur Übertragung einer adaptierten mikrobiellen Gemeinschaft, die auch unter Freilandbedingungen über 46 Tage im Zielboden etabliert werden konnte, erscheint somit als geeignete Methode zur gezielten Steigerung der Isoproturon-Mineralisierung in Böden.

4.5 Ausblick

Landwirtschaftliche Böden können ein sehr unterschiedliches Potential zum Abbau des Herbizids Isoproturon besitzen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Mineralisierung von Isoproturon in Böden mit geringem Abbaupotential durch die

Übertragung einer Isoproturon gut abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft sowohl unter Laborbedingungen als auch unter Freilandbedingungen über Versuchszeiträume von ca. 50 Tagen hoch signifikant gesteigert werden konnte. Das Ziel weiterer Untersuchungen muss es sein, den Transfer der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Zielböden zu optimieren und die Stabilität und Nachhaltigkeit der übertragenen Mikroorganismen in den Zielböden zu untersuchen. Für einen großflächigen Einsatz im Freiland scheint die Übertragung der Isoproturon abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft mittels Biofilm-Inokulum besonders geeignet zu sein, da die spezifischen Mikroorganismen bei dieser Methode einen Biofilm auf künstlichen Oberflächen ausbilden, die z.B. mit Hilfe eines Düngerstreuers ohne großen technischen Aufwand auf das Feld ausgebracht werden könnten.

Die Stabilität der übertragenen mikrobiellen Gemeinschaft im Zielboden könnte, nach der Identifikation der am Abbau beteiligten Arten, mit Hilfe der FISH-Technik über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. So wäre es durch den Einsatz spezifischer und fluoreszenzmarkierter RNA-Sonden möglich, die Verteilung und Verbreitung der übertragenen Mikroorganismen bei einer Bodenbeprobung über die Zeit zu erfassen. Aus diesen Ergebnissen wäre abzuleiten, ob bei einer Übertragung der entwickelten Methoden ins Freiland für eine möglichst vollständige Mineralisierung von Pestizid-Rückständen in Böden eine einfache Applikation von adaptierten Mikroorganismen ausreichen würde oder ob ein wiederholter Transfer von Abbau-Spezialisten erforderlich wäre.

Nach der Identifikation der am Abbau beteiligten „Schlüsselarten“ wäre darüber hinaus eventuell eine gezielte Beeinflussung der ökologischen Bedingungen in den Zielböden möglich, um den autochthonen bzw. übertragenen Isoproturon abbauenden Mikroorganismen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Zur Identifizierung der „Schlüsselarten“ des Isoproturon-Abbaus wäre die erneute Charakterisierung der seit ca. einem Jahr mit Isoproturon als alleinigem Substrat fortgeführten Anreicherungskultur „Feldkirchen“ notwendig. Durch die lange Adaptationszeit ist in der Anreicherungskultur mit einer Reduktion der Artenzahl auf die Isoproturon-Abbauer zu rechnen, so dass anhand dieser Ergebnisse die Auswahl spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden für die *in-situ* Hybridisierung möglich wäre.

Ein weiteres Ziel fortführender Arbeiten müsste es sein, die Einsatzmöglichkeiten der entwickelten Methoden zur Steigerung des Isoproturon-Abbaus gegen gealterte bzw. gebundene Pestizid-Rückstände zu überprüfen. An dieser Stelle wären weitere Untersuchungen nötig, inwieweit es sich bei den nicht-extrahierbaren Pestizid-Rückständen um das Herbizid selbst, um Abbaumetabolite oder um aus dem Pestizid hervorgegangene Naturstoffe handelt.

Schließlich wäre eine Übertragung der entwickelten Methoden auf andere Problemstoffe, wie z.B. Atrazin, erstrebenswert. Nach Auskunft des Bayerischen Wasserwirtschaftsamts (persönliche Mitteilung, 2003) stellt Atrazin in vielen Regionen Bayerns eine Gefahr für das Grundwasser dar, obwohl sein Einsatz seit Jahren verboten ist. Wie in Lysimeterversuchen am Institut für Bodenökologie der GSF gezeigt werden konnte (Schroll, unveröffentlichte Daten, 2003) befindet sich ein Großteil der Substanz Terbutylazin, einem dem Atrazin verwandten Stoff, auch Jahre nach der Applikation des Wirkstoffs noch in den obersten Zentimetern des Bodens. Die für Isoproturon entwickelten und erfolgreich angewandten Methoden zur Steigerung der Pestizid-Mineralisierung wären somit evtl. auch gut geeignet, um den Abbau der Substanz Atrazin in den oberen Zentimetern von belasteten Ackerflächen zu steigern und damit eine langfristige Bedrohung des Grundwassers zu reduzieren.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten von Isoproturon in landwirtschaftlich genutzten Böden aufzuklären. Aus den gewonnenen Kenntnissen sollten Methoden entwickelt werden, die es erlauben, steuernd in den Abbau von Isoproturon in Böden eingreifen zu können. Um das Gesamtverhalten des Modellherbizids in Böden vollständig zu beschreiben, wurde die Substanz in Labor- und Lysimeterversuchen in einer ^{14}C -markierten Form eingesetzt. Dies ermöglichte die Identifikation und Quantifizierung aller am Isoproturon-Umsatz beteiligten Prozesse: die Mineralisierung und Volatilität des Wirkstoffs in Böden und Pflanzen, die Identifikation seiner Abbauprodukte (= Metabolite) sowie die Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -markierter Rückstände.

Als bedeutender Einflussfaktor auf das Abbauverhalten von Isoproturon in den vier Versuchsböden stellte sich der Bodenwassergehalt heraus. Um in den Laborversuchen das maximale Abbaupotential der verwendeten Böden gegenüber dem Wirkstoff zu ermitteln, wurde versucht, den für den Umsatz jeweils optimalen Wassergehalt der Versuchsböden zu bestimmen. Dabei wurden zum einen die Unterschiede zwischen den Böden in der Qualität (Metabolitenmuster) und der Quantität des Abbaus bzw. der Mineralisierung von Isoproturon deutlich hervorgehoben. Zum anderen zeigte sich, dass das jeweilige maximale Abbaupotential der Versuchsböden übereinstimmend bei einer Wasserfüllung der Bodenporen mit 10 bis 15 μm Durchmesser erreicht wurde. Die hoch signifikanten Unterschiede der nach ihrer Herkunft benannten Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ bezüglich der Isoproturon-Mineralisierung zeigten sich sowohl unter Labor- und Freilandbedingungen in Bodenproben als auch in Flüssigkulturen. In den Lysimeterversuchen wurde jedoch auch deutlich, dass das Abbaupotential der Versuchsböden, das in den Laborversuchen ermittelt wurde, im Freiland nur dann erreicht werden kann, wenn die ökologischen Bedingungen, die von der Witterung abhängen und damit vom Menschen nur bedingt beeinflussbar sind, nicht hemmend wirken. Durch den Einsatz spezifischer Temperatur- und

Feuchtigkeitssensoren konnte der bedeutende und unmittelbare Einfluss dieser Bodenparameter auf den Abbau des Herbizids online in situ verfolgt werden. Darüber hinaus konnte in den Lysimeterversuchen gezeigt werden, dass auch Pflanzen einen Beitrag zum Abbau von Isoproturon leisten, der von Boden zu Boden variiert und z.T. hohe Werte annehmen kann.

Um das beobachtete diverse Abbaupotential von Böden gegenüber Isoproturon beurteilen und daraus Einflussfaktoren auf den Totalabbau dieser Substanz ableiten zu können, wurde der Einfluss chemisch-physikalischer und mikrobiologischer Bodenparameter auf die Mineralisierung des Wirkstoffs mit Hilfe einer Korrelationsmatrix berechnet. Die Berechnung, in die auch Daten früherer am Institut für Bodenökologie der GSF durchgeführter Versuche mit aufgenommen wurde, zeigte, dass einzig der pH-Wert und die mikrobielle Biomasse der Böden Einflussfaktoren auf die Wirkstoff-Mineralisierung darstellten. Da eine der gestellten Aufgaben die Steuerung bzw. Beschleunigung des Chemikalienabbaus war, eine gezielte pH-Wert-Änderung landwirtschaftlicher Böden als Möglichkeit zur Steuerung des Herbizid-Abbaus jedoch nicht geeignet ist, wurde aufgrund der Korrelationsberechnung zunächst versucht die Isoproturon-Mineralisierung gezielt durch eine Erhöhung der mikrobiellen Gesamtaktivität zu steigern.

Der Ansatz die mikrobielle Aktivität und damit die Mineralisierung von Isoproturon gezielt durch Strohzugabe zu erhöhen, führte jedoch nicht zum Erfolg. Zwar war die Strohzugabe mit einer deutlichen Steigerung der Atmungsaktivität der Böden verbunden, diese führte aber nicht zu einer Erhöhung sondern sogar zu einer Reduktion der Isoproturon-Mineralisierung.

Mit Hilfe eines neu entwickelten Verfahrens zur Bestimmung der in-situ-Verfügbarkeit von Chemikalien in Böden konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch das Sorptions- und Desorptionsverhalten von Isoproturon, das entscheidend durch chemisch-physikalische Bodenparameter beeinflusst wird, nicht ausschlaggebend ist für die Unterschiede der Böden hinsichtlich der Isoproturon-Mineralisierung.

Da eine nachhaltige Änderung des pH-Werts landwirtschaftlicher Böden großflächig nicht praktikabel ist, eine Steigerung der Wirkstoff-Mineralisierung durch eine Strohdüngung nicht erreicht wurde und eine Steigerung des Isoproturon-Abbaus durch Veränderung der Bodenfeuchtigkeit nur begrenzt möglich war, blieb zur Steuerung der Isoproturon-Mineralisierung nur die Möglichkeit, gezielt auf die zum Abbau von Isoproturon geeignete mikrobielle Gemeinschaft der Böden einzuwirken. Das Vorhandensein diverser Isoproturon abbauender mikrobieller Gemeinschaften in den Böden „Feldkirchen“, „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ wurde anhand der unterschiedlichen Mineralisierungs-Dynamik in den Böden und der unterschiedlichen Aufnahme von Isoproturon in die Zellen der bodenbürtigen Mikroorganismen in den durchgeführten Flüssigkulturversuchen deutlich. Eine gezielte Einflussnahme auf die Zusammensetzung der für den Abbau von Isoproturon verantwortlichen mikrobiellen Gemeinschaft der Böden wurde in dieser Studie durch den Transfer spezifischer Mikroorganismengemeinschaften erreicht. So wurde durch die Übertragung der *„Isoproturon gut abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft“* des Bodens „Feldkirchen“ die angestrebte Steigerung der Wirkstoff-Mineralisierung in den Zielböden „Kelheim“, „Scheyern“ und „Hohenwart“ unter Labor- und Freilandbedingungen erreicht. Diese Steigerung war hochsignifikant und von großer Nachhaltigkeit.

Bei der Bewertung der entwickelten Methoden zur Steuerung der Isoproturon-Mineralisierung ist auch die Bildung so genannter nicht-extrahierbarer Rückstände zu berücksichtigen. Sowohl in den Labor- als auch in den Lysimeterversuchen wurde beim Abbau von Isoproturon jeweils eine große Menge an nicht-extrahierbaren Rückständen gebildet. Durch den Transfer der *„Isoproturon gut abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft“* wurde jedoch nicht nur eine Steigerung der Mineralisierung, sondern auch eine Reduktion der nicht-extrahierbaren Rückstände erreicht. Dieses Ergebnis ist sehr positiv zu bewerten, da im schwer zu analysierenden Pool der nicht-extrahierbaren Rückstände unbekannte, in die Bodenmatrix eingeschlossene Mengen an Isoproturon und seinen Abbauprodukte enthalten sind, deren Gefährdungspotential für die Umwelt schwer abschätzbar ist. Aus den eigenen Versuchen zur Bewertung nicht-extrahierbarer, aus Isoproturon entstandener Rückstände ist jedoch zu schließen, dass es sich bei den nicht-extrahierbaren Rückständen zu einem bedeutenden Anteil um Biomasse handelte, die aus dem abgebauten Wirkstoff neu synthetisiert wurde und keinerlei chemische

Ähnlichkeit mehr mit der Ausgangssubstanz Isoproturon hatte. Da diese Form der Rückstände als unbedenklich einzustufen ist, ist eine nähere Untersuchung der nicht-extrahierbaren Rückstände unerlässlich.

6 Literaturverzeichnis

- Albrechtsen, H.-J., Mills, M.S., Aamand, J., Bjerg, P.L. (2001). Degradation of herbicides in shallow Danish aquifers: an integrated laboratory and field study. *Pest. Manage. Sci.* 57: 341-350.
- Alvarez-Benedi, J., Taberner, M.T., Atienza, J., Bolado, S. (1999). A coupled model representing volatilisation and sorption of soil incorporated herbicides. *Chemosphere* 38: 1583-1593.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Anonym (1981): OECD-Guideline for testing chemicals 106.
- Assaf, N.A., Turco, R.F. (1994). Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. *Biodegradation* 5: 29-35.
- Beck, A.J., Harris, G.L., Howse, K.R., Johnston, A.E., Jones, K.C. (1996). Spatial and temporal variation of isoproturon residues and associated sorption/desorption parameters at the field scale. *Chemosphere* 33: 1283-1295.
- Beck, A.J., Jones, K.C. (1996). The effect of particle size, organic matter content, crop residues and dissolved organic matter on the sorption kinetics of atrazine and isoproturon by clay soil. *Chemosphere* 32: 2345-2358.
- Beigel, C., Charnay, M.-P., Barriuso, E. (1999). Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biol. Biochem.* 31: 525-534.
- Bending, G.D., Shaw, E., Walker, A. (2001). Spatial heterogeneity in the metabolism and dynamics of isoproturon degrading microbial communities in soil. *Biol. Fertil. Soils* 33: 484-489.

- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Sørensen, S.R., Morgan, J. A.W., Aamand, J., Walker, A. (2003). In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Spingomonas* spp. and soil pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 827-834.
- Berger, B. M. (1998). Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 60: 71-82.
- Bruno, H., Schaper, S. (2002). EU-Beurteilungsbericht Isoproturon: Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen, Band D31. Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik. In: Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 102. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Eds). Ribbesbüttel: Saphir-Verlag.
- Bruns-Nagel, D., Knicker, H., Drzyzga, O., Bütehorn, U., Steinbach, K., Gemsa, D., von Löw, E. (2000). Characterization of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR Spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1549-1556.
- Burauel, P., Führ, F. (2000). Formation and long-term fate of non-extractable residues in outdoor lysimeter studies. *Environ. Pollut.* 108: 45-52.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L. (1997). Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1399-1406.
- Burkhard, N., Guth, J.A. (1981). Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces, comparision of calculated results with those determined in a laboratory model system. *Pestic. Sci.* 12: 37-44.
- Cox, L., Walker, A., Welch, S.J. (1996). Evidence for the accelerated degradation of isoproturon in soils. *Pestic. Sci.* 48: 253-260.
- Cryer, D.R., Eccleshall, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745.
- Cullington, J. E., Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 31: 677-686.

- Daims, H., Brühl, A., Amann, R. I., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999). The domain specific probe Eub-338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
- De Souza, M.L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. (1998). Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 178-184.
- Dörfler, U., Adler-Köhler, R., Schneider, P., Scheunert, I., Korte, F. (1991). A laboratory system for determining the volatility of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 23: 485-496.
- El-Fantroussi, S. (2000). Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5110-5115.
- Eschenbach, A., Wienberg, R., Mahro, B. (1998). Fate and stability of nonextractable residues of [¹⁴C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2585-2590.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences, a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Felsot, A.S., Shelton, D.R. (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical processes and microbial ecology. In: Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. SSSA Special Publication Number 32. Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.-H. (Eds). Madison: Soil Science Society of America, Inc.
- Forlani, G., Mangiagalli, A., Nielsen, E., Suardi, C.M. (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 31 : 991-997.
- Fournier, J-C., Soulas, G., Catroux, G. (1975). Dégradation microbienne de l'isoproturon dans des modèles de laboratoire. *Chemosphere* 4: 207-214.

- Führ, F. (1987). Non-extractable pesticide residues in soil. In: Pesticide Science and Biotechnology. Greenhalgh R., Roberts T. R. (Eds). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Gaillardon, P., Sabar, M. (1994). Changes in the concentrations of isoproturon and its degradation products in soil and soil solution during incubation at two temperatures. *Weed Res.* 34: 243-250.
- Gaillardon, P., Dur, J. C. (1995). Influence of soil moisture on short-term adsorption of diuron and isoproturon by soil. *Pestic. Sci.* 45: 297-303.
- Gaillardon, P. (1996). Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon by soil. *Pestic. Sci.* 47: 347-354.
- Garmouma, M., Blanchard, M., Chesterikoff, A., Ansart, P., Chevreuil, M. (1997). Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin: Mélarchez (France). *Water Res.* 31: 1489-1503.
- Garmouma, M., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M. (1998). Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci. Total Environ.* 224: 93-107.
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.* 108: 3-14.
- Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K.T., Pearce, T.G., Jones, K.C. (2001). Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 35: 501-507.
- Ghani, A., Wardle, D.A. (2001). Fate of ^{14}C from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system. *Soil Biol. Biochem.* 33: 777-785.
- Guerin, W.F., Boyd, S.A. (1992). Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1142-1152.
- Hartge, K.H. (1965). Die Bestimmung von Porenvolumen und Porengrößenverteilung. *Z. f. Kulturtechnik und Flurber.* 6: 193-206.

- Hatzinger, P.B., Alexander, M. (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29: 537-545.
- Hughes, J.B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., Bhadra, R. (1997). Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.* 31: 266-271.
- Hurle, K., Walker, A. (1980). Persistence and its prediction. In: Interactions between herbicides and the soil. Hance, R.J. (Ed). London: Academic Press.
- Johnson, A.C., Besien, T.J., Bhardwaj, C.L., Dixon, A., Goody, D.C., Haria, A.H., White, C. (2001). Penetration of herbicides to groundwater in an unconfined chalk aquifer following normal soil applications. *J. Contam. Hydrol.* 53: 101-117.
- Johnson, A.C., White, C., Bhardwaj, C.L. (2000). Potential for isoproturon, atrazine and mecoprop to be degraded within a chalk aquifer system. *J. Contam. Hydrol.* 44: 1-18.
- Jones, K.C., Geva, B., Mordaunt, C., Northcott, G., Semple, K.T. (2000). Introductory remarks to the special issue. *Environ. Pollut.* 108: 1-2.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3042-3051.
- Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H., Fritsche, W. (1999). Formation of bound residues during microbial degradation of [^{14}C]anthracene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1834-1842.
- Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. (1997). Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31: 214-217.
- Kliem, D. (1994). Abbau des Pflanzenschutzmittels ^{14}C -Isoproturon in Böden in Abhängigkeit von der landwirtschaftlichen Nutzung. Diplomarbeit. Universität Ulm.

- Kubiak, R., Ellßel, H., Lambert, M., Eichhorn, K.W. (1995). Degradation of isoproturon in soil in relation to changes of microbial biomass and activity in small-scale laboratory and outdoor studies. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59: 123-132.
- Kubiak, R., Führ, F., Mittelstaedt, W. (1990). Comparative studies on the formation of bound residues in soil in outdoor and laboratory experiments. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 39: 47-57.
- Lappin, H.M., Greaves, M.P., Slater, J.H. (1985). Degradation of the herbicide mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid] by a synergistic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 429-433.
- Lehr, S., Gläßgen, W.E., Sandermann, H., Beese, F. Jr., Scheunert, I. (1996a). Metabolism of isoproturon in soils originating from different agricultural management systems and in cultures of isolated soil bacteria. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 65: 231-243.
- Lehr, S., Scheunert, I., Beese, F. (1996b). Mineralization of free and cell-wall-bound isoproturon in soils in relation to soil microbial parameters. *Soil Biol. Biochem.* 28: 1-8.
- Lembrich, D., Beese, F., Scheunert, I. (1999). Microcosm studies on the volatility of pesticides from soil surfaces. *J. Environ. Qual.* 28: 721-726.
- Liste, H.-H., Alexander, M. (2000a). Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40: 7-10.
- Liste, H.-H., Alexander, M. (2000b). Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40: 11-14.
- Loewy, M., Kirs, V., Carvajal, G., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M. (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the northern patagonic region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225: 211-218.
- Mansour, M., Feicht, E.A., Behechti, A., Schramm, K.-W., Kettrup, A. (1999). Determination photostability of selected agrochemicals in water and soil. *Chemosphere* 39: 575-585.

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Mouvet, C., Jeannot, R., Riolland, H., Maciag, C. (1997). Stability of isoproturon, bentazone, terbuthylazine and alachlor in natural groundwater, surface water and soil water samples stored under laboratory conditions. *Chemosphere* 35: 1083-1097.
- Mudd, P.J., Hance, R.J., Wright, S.J.L. (1983). The persistence and metabolism of isoproturon in soils. *Weed Res.* 23: 239-246.
- Nehring, K. (1960). *Agrikulturchemische Untersuchungsmethoden für Dünge- und Futtermittel, Böden und Milch*. Hamburg-Berlin: Verlag Paul Parey.
- Nemeth-Konda, L., Füleky, Gy., Morovjan, Gy., Csokan, P. (2002). Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil. *Chemosphere* 48: 545-552.
- Nguyen, C., Guckert, A. (2001). Short-term utilisation of ^{14}C -[U]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. *Soil Biol. Biochem.* 33: 53-60.
- Nitschke, L., Schüssler, W. (1998). Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere* 36: 35-41.
- Nolting, H.G., Siebers, J., Storzer, W., Wilkening, Q., Herrmann, M., Schlüter, C., (1990). Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren, Teil IV, Fassung 6-1 (Juli 1990): Prüfung des Verflüchtigungsverhaltens und des Verbleibs von Pflanzenschutzmitteln in der Luft. Abt. Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik, Biologische Bundesanstalt Braunschweig (Eds). Ribbesbüttel: Saphir Verlag.
- Northcott, G.L., Jones, K.C. (2000). Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ. Pollut.* 108: 19-43.
- Ottow, J.C.G. (1991). Mikrobiologische und chemisch-physikalische Wechselwirkungen beim Abbau organischer Schadstoffe in Böden. *Mitteilungen d. Dt. Bodenkundlichen Gesellschaft* 63: 19-26.

- Pätzold, S., Brümmer, G.W. (2003). Influence of microbial activity and soil moisture on herbicide immobilization in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166: 336-344.
- Perrin-Ganier, C., Schiavon, F., Morel, J.-L., Schiavon, M. (2001). Effect of sludge-amendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *Chemosphere* 44: 887-892.
- Pieuchot, M., Perrin-Ganier, C., Portal, J.-M., Schiavon, M. (1996). Study on the mineralization and degradation of isoproturon in three soils. *Chemosphere* 33: 467-478.
- Pignatello, J.J., Xing, B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1-11.
- Pilar Castillo, M. del, Wirén-Lehr, S. von, Scheunert, I., Torstensson, L. (2001). Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biol. Fertil. Soils* 33: 521-528.
- Reuter, S. (1997). Die Bildung und Stabilität von Abbauprodukten und gebundenen Rückständen des Herbizids Isoproturon in Bodenproben in Gegenwart organischer Substrate. Dissertation, TU München.
- Roberts, S.J., Walker, A., Parekh, N.R., Welch, S.J., Waddington, M.J. (1993). Studies on a mixed bacterial culture from soil which degrades the herbicide linuron. *Pestic. Sci.* 39: 71-78.
- Roberts, S.J., Walker, A., Cox, L., Welch, S.J. (1998). Isolation of isoproturon-degrading bacteria from treated soil via three different routes. *J. Appl. Microbiol.* 85: 309-316.
- Roberts, T.R. (1984). Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure & Appl. Chem.* 56: 945-956.
- Robertson, B.K., Alexander, M. (1994). Growth-linked and cometabolic biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. *Pestic. Sci.* 41: 311-318.

- Robertson, B.K., Alexander, M. (1998). Sequestration of DDT and dieldrin in soil: disappearance of acute toxicity but not the compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1034-1038.
- Ruth, B. (1999). A capacitance sensor with planar sensitivity for monitoring soil water content. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 48-54.
- Sachs, L. (1984). *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, 6. Aufl.: 209-212. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1992): *Lehrbuch der Bodenkunde*, 12. Aufl.: 148-149. Stuttgart: F. Enke Verlag.
- Scheunert, I. (1994). Mikrobieller Abbau organischer Fremdstoffe im Boden. *Chemie in unserer Zeit* 28: 68-78.
- Scheunert, I., Reuter, S. (2000). Formation and release of residues of the ^{14}C -labelled herbicide isoproturon and its metabolites bound in model polymers and in soil. *Environ. Pollut.* 108: 61-68.
- Schlichting, E., Blume, H.-P., Stahr, K. (1995). *Bodenkundliches Praktikum*, Pareys Studentexte 81, 2. Aufl.: 106-107. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Schroll, R., Langenbach, T., Cao, G., Dörfler, U., Schneider, P., Scheunert, I. (1992). Fate of [^{14}C]terbutylazine in soil-plant systems. *Sci. Total Environ.* 123/124: 377-389.
- Schroll, R., Dörfler, U., Scheunert, I. (1999). Volatilization and mineralization of ^{14}C -labelled pesticides on lysimeter surfaces. *Chemosphere* 39: 595-602.
- Schroll, R., Kühn, S. (2003). A test-system to establish mass balances for ^{14}C -labeled substances in soil-plant-atmosphere-systems under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* Im Druck.
- Sørensen, S.R., Aamand, J. (2001). Biodegradation of the phenylurea herbicide isoproturon and its metabolites in agricultural soils. *Biodegradation* 12: 69-77.

- Sørensen, S.R., Ronen, Z., Aamand, J. (2001). Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5403-5409.
- Sørensen, S.R., Ronen, Z., Aamand, J. (2002). Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3478-3485.
- Spark, K.M., Swift, R.S. (2002). Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Sci. Total Environ.* 298: 147-161.
- Steinweg, B. (2002). Untersuchungen zur in-situ Verfügbarkeit von wasserlöslichem Humus (DOM) in Oberböden und Grundwasserleitern: Gewinnung, Charakterisierung und Abschätzung seiner Funktionen als mikrobielles Substrat und Träger des Schadstoffes Pyren. *FAM-Bericht* 52: 1-109. ISBN 3-89791-245-7.
- Stork, A., Witte, R., Führ, F. (1994). A wind tunnel for measuring the gaseous losses of environmental chemicals from the soil/plant system under field-like conditions. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 1: 234-245.
- Torstensson, L. (1980). Role of microorganisms in decomposition. In: *Interactions between herbicides and the soil*. Hance, R.J. (Ed). London: Academic Press.
- Torsvik, V., Goksöyr, J., Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Umweltlexikon-online (2003). [http://www.umweltlexikon-online.de/fp/archiv/RUB landwirtsrohstoffe/Pestizide](http://www.umweltlexikon-online.de/fp/archiv/RUB_landwirtsrohstoffe/Pestizide)
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.-L., Khadrani, A. (1996). Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere* 33: 2045-2056.
- Walker, A., Turner, I.J., Cullington, J.E., Welch, S.J. (1999). Aspects of the adsorption and degradation of isoproturon in a heavy clay soil. *Soil Use and Management* 15: 9-13.

- Walker, A., Jurado-Exposito, M., Bending, G.D., Smith, V.J.R. (2001). Spatial variability in the degradation rate of isoproturon in soil. *Environ. Pollut.* 111: 407-415.
- Wirén-Lehr, S. von (1997). Mikrobieller Abbau der Herbizide Isoproturon und Glyphosat und ihrer in organischen Bestandesabfällen festgelegten Rückstände in Bodenproben aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Bewirtschaftungssystemen. Dissertation. TU München.
- Wirén-Lehr, S. von, Pilar Castillo, M. del, Torstensson, L., Scheunert, I. (2001). Degradation of isoproturon in biobeds. *Biol. Fertil. Soils* 33: 535-540.

7 Anhang

7.1 Ausgewählte ^{14}C -HPLC-Chromatogramme

^{14}C -HPLC-Chromatogramme des ^{14}C -Arelon-Standards (Abbildung 7.1) sowie der Methanol-extrahierbaren Rückstände der Böden „Feldkirchen“ (Abbildung 7.2), „Hohenwart“ (Abbildung 7.3), „Kelheim“ (Abbildung 7.4) und „Scheyern“ (Abbildung 7.5) beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon bei den Wassergehalten (% WHK) mit der jeweils höchsten Fremdstoffmineralisierung unter kontrollierten Bedingungen (20 °C).

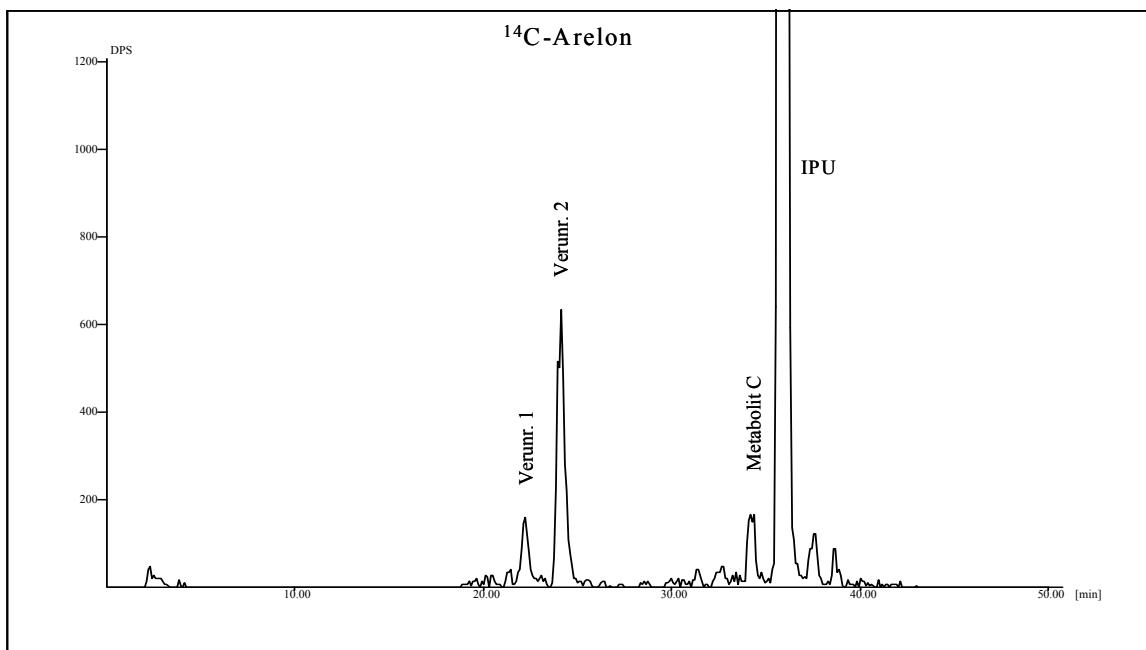


Abbildung 7.1: ^{14}C -HPLC-Chromatogramm des ^{14}C -Arelon-Standards.

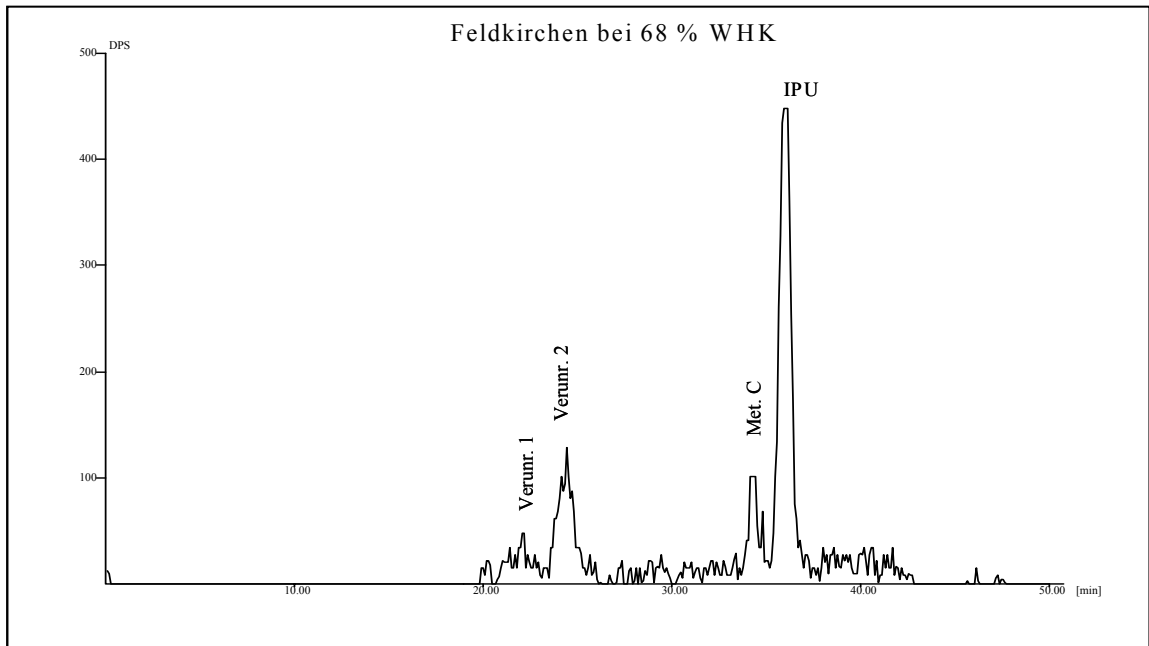


Abbildung 7.2: ^{14}C -HPLC-Chromatogramm des methanolischen Bodenextrakts „Feldkirchen“ beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon nach 46 Versuchstagen (Versuchsbedingungen: Bodenwassergehalt 68 % WHK, Temperatur 20 °C).

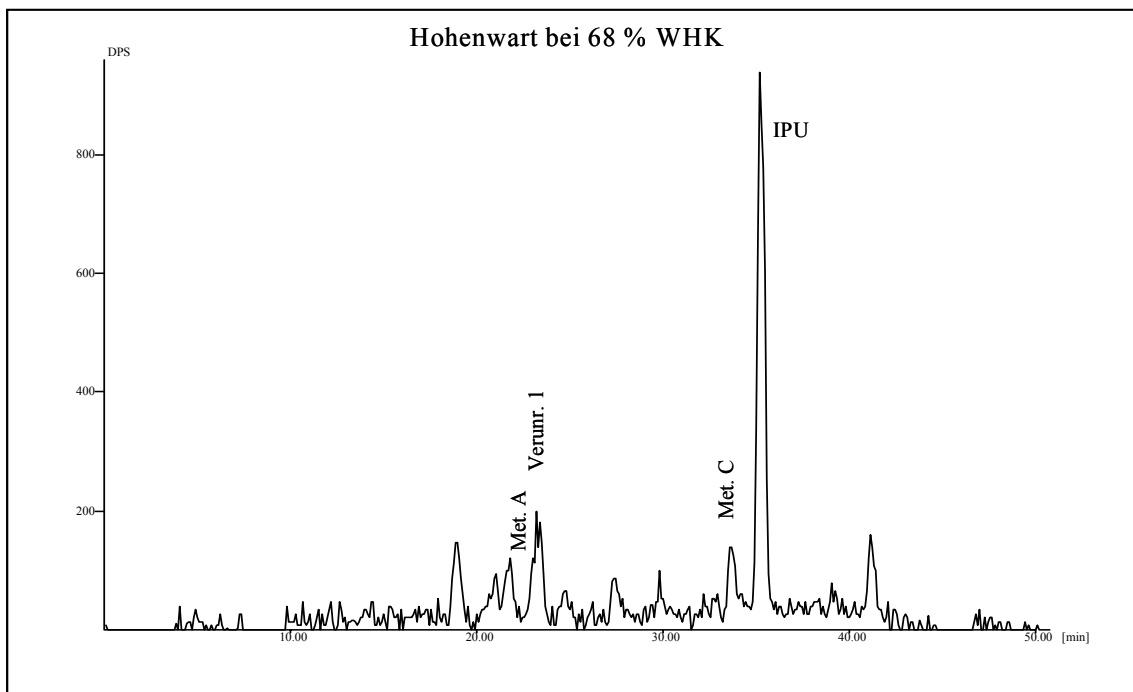


Abbildung 7.3: ^{14}C -HPLC-Chromatogramm des methanolischen Bodenextrakts „Hohenwart“ beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon nach 46 Versuchstagen (Versuchsbedingungen: Bodenwassergehalt 68 % WHK, Temperatur 20 °C).

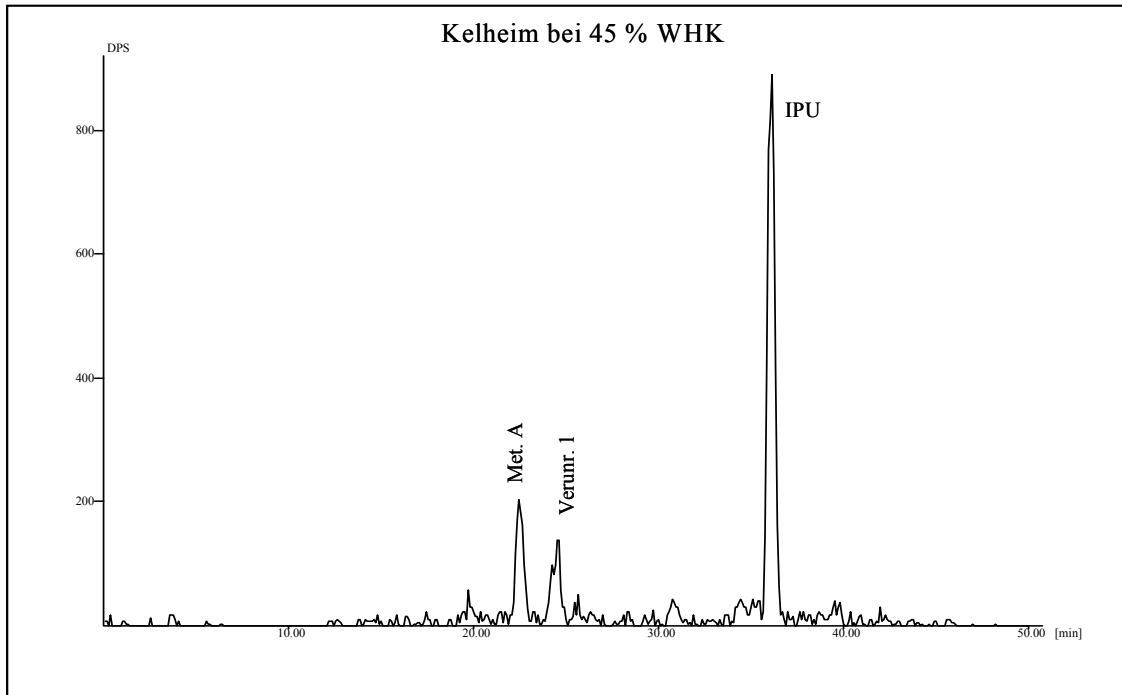


Abbildung 7.4: ^{14}C -HPLC-Chromatogramm des methanolischen Bodenextrakts „Kelheim“ beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon nach 46 Versuchstagen (Versuchsbedingungen: Bodenwassergehalt 45 % WHK, Temperatur 20 °C).

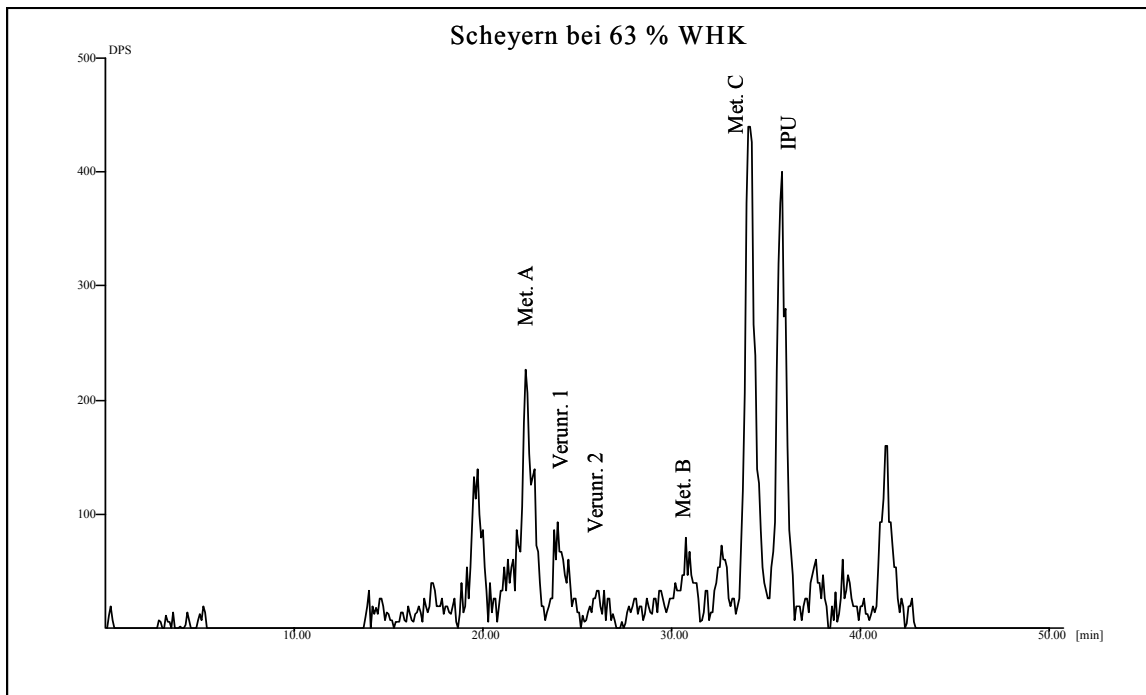


Abbildung 7.5: ^{14}C -HPLC-Chromatogramm des methanolischen Bodenextrakts „Scheyern“ beim Abbau von ^{14}C -Isoproturon nach 46 Versuchstagen (Versuchsbedingungen: Bodenwassergehalt 63 % WHK, Temperatur 20 °C).

7.2 Korrelationsmatrix

Über die Berechnung einer Korrelationsmatrix (Tabelle 7.1) sollte der Einfluss chemisch-physikalischer Bodenkennwerte auf die Mineralisierung von ^{14}C -Isoproturon beurteilt werden. In die Korrelationsberechnung gingen neben den im Verlauf dieser Arbeit erhobenen Daten auch Werte aus vorangegangenen Untersuchungen zum Abbau von ^{14}C -Isoproturon von Wirén-Lehr (1997), Kliem (1994) und Loos (unveröffentlichte Daten, 2003) mit ein.

Tabelle 7.1: Korrelationsmatrix mit chemisch-physikalischen und mikrobiologischen Bodenparametern, sowie Daten zur Mineralisierung und zur Verteilung von ¹⁴C-Isoproturon in Böden.

		MIN-R.	Kd-Wert	CPC-Wert	P ₂ O ₅	K ₂ O	NO ₃ -N	TON	SCHLUFF	SAND	pH-Wert	C _{org}	GES-N	CaCO ₃	C/N-Verh.	C _{mic}
MIN-R.	Korrelation nach Pearson	1	0,486	0,296	0,360	0,088	0,505	0,467	-0,238	0,044	0,748	0,403	0,389	0,704	-0,017	0,702
	Signifikanz (2-seitig)		0,514	0,704	0,640	0,912	0,495	0,079	0,394	0,876	0,001	0,136	0,152	0,296	0,953	0,004
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Kd-Wert	Korrelation nach Pearson	0,486	1	0,949	0,268	-0,182	0,988	0,984	0,293	-0,590	0,319	0,998	0,980	0,955	-0,246	0,588
	Signifikanz (2-seitig)	0,514		0,051	0,732	0,818	0,002	0,046	0,707	0,410	0,681	0,002	0,020	0,045	0,754	0,414
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CPC-Wert	Korrelation nach Pearson	0,296	0,949	1	-0,028	0,031	0,958	0,991	0,569	-0,811	0,012	0,832	0,989	0,825	-0,491	0,412
	Signifikanz (2-seitig)	0,704	0,051		0,971	0,969	0,042	0,009	0,431	0,169	0,988	0,068	0,011	0,175	0,509	0,588
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
P ₂ O ₅	Korrelation nach Pearson	0,360	0,268	-0,028	1	-0,887	0,217	-0,032	-0,665	0,509	0,838	0,323	0,072	0,435	0,849	0,337
	Signifikanz (2-seitig)	0,640	0,732	0,971		0,113	0,783	0,968	0,335	0,491	0,162	0,677	0,928	0,565	0,151	0,663
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
K ₂ O	Korrelation nach Pearson	0,088	-0,182	0,031	-0,887	1	-0,119	0,094	0,359	-0,305	-0,492	-0,238	-0,007	-0,229	-0,870	0,092
	Signifikanz (2-seitig)	0,912	0,818	0,969	0,113		0,881	0,906	0,641	0,695	0,508	0,762	0,993	0,771	0,130	0,908
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
NO ₃ -N	Korrelation nach Pearson	0,505	0,998	0,958	0,217	-0,119	1	0,969	0,311	-0,609	0,298	0,993	0,988	0,952	-0,303	0,606
	Signifikanz (2-seitig)	0,495	0,002	0,042	0,783	0,881		0,031	0,689	0,391	0,702	0,007	0,012	0,048	0,697	0,394
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
TON	Korrelation nach Pearson	0,467	0,954	0,991	-0,032	0,094	0,969	1	0,322	-0,605	0,130	0,694	0,759	0,860	-0,232	0,417
	Signifikanz (2-seitig)	0,079	0,046	0,009	0,968	0,906	0,031		0,242	0,017	0,644	0,004	0,001	0,140	0,405	0,122
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
SCHLUFF	Korrelation nach Pearson	-0,238	0,293	0,569	-0,665	0,359	0,311	0,322	1	-0,949	-0,444	-0,012	0,169	0,005	-0,439	0,151
	Signifikanz (2-seitig)	0,394	0,707	0,431	0,335	0,641	0,688	0,242		0,000	0,098	0,966	0,546	0,995	0,101	0,592
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
SAND	Korrelation nach Pearson	0,044	-0,590	-0,811	0,505	-0,305	-0,609	-0,605	-0,949	1	0,330	-0,222	-0,396	-0,338	0,447	-0,266
	Signifikanz (2-seitig)	0,876	0,410	0,189	0,491	0,695	0,391	0,017	0,000		0,230	0,428	0,144	0,662	0,095	0,338
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
pH-Wert	Korrelation nach Pearson	0,748	0,319	0,012	0,838	-0,492	0,298	0,130	-0,444	0,330	1	0,370	0,278	0,575	0,207	0,424
	Signifikanz (2-seitig)	0,001	0,681	0,968	0,162	0,508	0,702	0,644	0,098	0,230		0,175	0,315	0,425	0,460	0,116
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
C _{org}	Korrelation nach Pearson	0,403	0,996	0,932	0,323	-0,238	0,993	0,694	-0,012	-0,222	0,370	1	0,913	0,960	0,100	0,291
	Signifikanz (2-seitig)	0,136	0,002	0,068	0,677	0,762	0,007	0,004	0,966	0,428	0,175		0,000	0,040	0,724	0,293
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
GES-N	Korrelation nach Pearson	0,389	0,990	0,989	0,435	-0,007	0,988	0,759	0,169	-0,396	0,278	0,913	1	0,898	-0,311	0,210
	Signifikanz (2-seitig)	0,152	0,020	0,011	0,928	0,993	0,012	0,001	0,546	0,144	0,315	0,000		0,102	0,260	0,452
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
CaCO ₃	Korrelation nach Pearson	0,704	0,955	0,825	0,335	-0,229	0,952	0,860	0,005	-0,338	0,575	0,960	0,898	1	-0,104	0,777
	Signifikanz (2-seitig)	0,296	0,045	0,175	0,565	0,771	0,048	0,140	0,995	0,662	0,425	0,040	0,102		0,896	0,223
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
C/N-Verh.	Korrelation nach Pearson	-0,017	-0,246	-0,491	0,849	-0,870	-0,303	-0,232	-0,439	0,447	0,207	0,100	-0,311	-0,104	1	0,142
	Signifikanz (2-seitig)	0,953	0,754	0,509	0,151	0,130	0,697	0,405	0,101	0,095	0,460	0,724	0,260	0,896		0,613
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
C _{mic}	Korrelation nach Pearson	0,702	0,586	0,412	0,337	0,092	0,606	0,417	0,151	-0,266	0,424	0,291	0,210	0,777	0,142	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,004	0,414	0,588	0,663	0,908	0,394	0,122	0,592	0,338	0,116	0,293	0,452	0,223	0,613	
	N	15	4	4	4	4	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Sabine Steffanie Kühn
geb.: 25.09.1974
Geburtsort: Coburg
Vater: Dieter Kühn, Oberregierungsrat
Mutter: Angelika Kühn, kfm. Angestellte

Schulbildung:

- 1981 - 1985 Grundschule in Dörfles-Esbach
- 1985 - 1994 Gymnasium Casimirianum in Coburg

Schulabschluß:

- 1.7.1994 Abitur

Studium:

- 1.10.1994 – 14.10.1996 Grundstudium der Biologie an der Universität Regensburg
- 1.10.1996 – 30.06.2000 Hauptstudium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 - 1.10.1998 bis 31.01.1999 einsemestriger Studienaufenthalt in Rennes / Frankreich
 - 15.08.1999 bis 15.05.2000 Diplomarbeit am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik der Fraunhofer-Gesellschaft in Stuttgart

Arbeitsverhältnis:

- 1.07.2000 – 30.09.2003 Promotion am Institut für Bodenökologie der GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg