

Studien zum Einfluss extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände des Fungizids ¹⁴C-Metalaxyl im Boden

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Jens Botterweck

aus Düren/Nordrhein-Westfalen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer.nat Andreas Schäffer

Universitätsprofessorin Dr. rer nat. Ursula Prierer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

**„ Die Erde ist eine kleine Bühne in einer gigantischen kosmischen Arena und für
den Moment unser einziger Lebensraum“**

— Carl Sagan

Vorabveröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen in Fachzeitschriften:

Botterweck, J.; Claßen, D.; Zegarski, T.; Gottfroh, C.; Kalathoor, R.; Schäffer, A.; Schwarzbauer, J.; Schmidt, B., A correlation between the fate and non-extractable residue formation of ^{14}C -metalaxyl and enzymatic activities in soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **2014**, 49:2, 69-78.

Publikationen als Posterpräsentationen:

Botterweck, J.; Claßen, D.; Schmidt, B.; Schäffer, A., "Methods to measure Phenoloxidase and Peroxidase activity in soil to examine the connection between the formation of non extractable residues and microbial activity". *Enzymes in the Environment*, International Conference, Bad Nauheim, Deutschland, 17.7-21.7.2011.

Botterweck, J.; Schmidt, B.; Schwarzbauer, J.; Schäffer, A.: "Influence of microbial activities, extracellular phenoloxidases and peroxidases on the structure-chemistry and chemodynamics of covalently immobilised residues of Metalaxyl in Ultuna soil". *Jahrestreffen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Schwerpunktprogramm SPP 1315 (Biogeochemical Interfaces in Soil)*, Dornburg, Deutschland, 10.10-12.10.2012.

Botterweck, J.; Schmidt, B.; Schäffer, A.: „The degradation of metalaxyl with emphasis on phenoloxidase and peroxidase activities“. *Jahrestagung der deutschen bodenkundlichen Gesellschaft (DBG)*, Rostock, Deutschland, 7-9-12.9.2013.

Botterweck, J.: "The influence of extracellular oxidative enzymes on the formation of non – extractable residues of ^{14}C -metalaxyl in soil". *SETAC GLB 18. Jahrestagung mit Beiträgen der Gesellschaft deutscher Chemiker (GdCh)*, Essen, Deutschland, 23.9.-26.9.2013.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 9 |
| 1.1 | Anthropogene Chemikalien in der Umwelt..... | 9 |
| 1.2 | Fungizide und Resistenz..... | 10 |
| 1.3 | Das Ökosystem Boden..... | 12 |
| 1.4 | Humifizierung und Huminstoffe..... | 15 |
| 1.5 | Extrazelluläre Enzyme im Boden und die Bedeutung von Phenoloxidasen und Peroxidasen | 20 |
| 1.6 | Xenobiotika im Boden..... | 26 |
| 1.7 | Die Definition, Bildung und Untersuchung gebundener Rückstände | 28 |
| 1.8 | Die Modellchemikalie Metalaxyl..... | 33 |
| 1.8 | Zielsetzung der vorliegenden Studie | 37 |
| 2 | Material..... | 39 |
| 2.1 | Chemikalien..... | 39 |
| 2.1.1 | Radiochemikalie | 39 |
| 2.1.2 | Referenzsubstanzen | 39 |
| 2.1.3 | Chemikalien zur quantitativen Bestimmung des Radioisotops..... | 39 |
| 2.1.4 | Organische Lösungsmittel..... | 40 |
| 2.1.5 | Sonstige Chemikalien..... | 40 |
| 2.2 | Puffer und Lösungen | 41 |
| 2.2.1 | Verwendeter Puffer zur Isolation von Mikroorganismen aus dem Versuchsboden..... | 42 |
| 2.2.2 | Verwendeter Puffer bei der photometrischen Messung der extrazellulären Phenoloxidaseaktivität..... | 42 |
| 2.2.3 | Verwendeter Puffer bei der photometrischen Messung der extrazellulären Peroxidaseaktivität..... | 42 |
| 2.2.4 | Verwendeter Puffer bei der Inkubation von Resorcinol, Huminsäuren, Huminstoff-Fraktionen und oxidativen Enzymen mit ¹⁴ C-Metalaxyl <i>in vitro</i> | 43 |
| 2.2.5 | Verwendete Puffer zur Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehalts mittels nasser Oxidation..... | 43 |
| 2.3 | Wachstumsmedien | 43 |
| 2.4 | Enzyme | 44 |
| 2.5 | Verbrauchsmaterial & Zubehör..... | 44 |
| 2.6 | Verwendete Geräte | 46 |
| 2.6.1 | Verwendete Geräte bei der Probenaufarbeitung..... | 46 |
| 2.6.2 | Verwendete Geräte zur Radioanalytik und Chromatographie..... | 48 |
| 2.7 | Wasser | 49 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.8 | Versuchsboden | 50 |
| 3 | Methoden | 53 |
| 3.1 | Synthese von Metalaxylsäure | 53 |
| 3.2 | Stationäre Systeme zur Inkubation | 54 |
| 3.3 | Inkubationsansätze in stationären Systemen und Sterilisation des Versuchsbodens | 54 |
| 3.3.1 | Inkubationsansätze | 54 |
| 3.3.2 | Sterilisation des Versuchsbodens..... | 55 |
| 3.3.3 | Kontrolle der Sterilisationsmethoden | 58 |
| 3.4 | Immobilisierung von Laccase auf Alginat | 58 |
| 3.5 | Applikation der Inkubationsansätze und Bilanzierung der Radioaktivität | 59 |
| 3.5.1 | Applikation..... | 59 |
| 3.5.2 | Bilanzierung der Radioaktivität | 60 |
| 3.6 | Vergleich der Extraktionsmethoden | 62 |
| 3.7 | Aufarbeitung der Inkubationsansätze..... | 63 |
| 3.7.1 | Aufarbeitung der Gesamtbodenproben..... | 63 |
| 3.7.2 | Aufarbeitung Fraktionsproben..... | 65 |
| 3.7.3 | Aufarbeitung von Boden mit/ohne Enzymzugabe..... | 66 |
| 3.8 | Partikelgrößenfraktionierung..... | 66 |
| 3.9 | Huminstoff-Fraktionierung..... | 68 |
| 3.10 | Chemische Degradation durch alkalische Hydrolyse..... | 69 |
| 3.11 | Bestimmung von pH-Wert und Wasserhaltekapazität | 70 |
| 3.11.1 | pH-Wert..... | 70 |
| 3.11.2 | Wasserhaltekapazität | 70 |
| 3.12 | Messung der mikrobiellen Aktivität (DMSO-Reduktion) | 70 |
| 3.13 | Messung der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen..... | 72 |
| 3.14 | Bestimmung des Gehalts der organischen Bodensubstanz und des organischen Kohlenstoffgehaltes | 75 |
| 3.15 | Extraktion von Ergosterol | 76 |
| 3.16 | Inkubation von ¹⁴ C-Metalaxyl und Resorcinol oder Huminsäuren mit Laccase oder Lignin-Peroxidase im Modellsystem..... | 77 |
| 3.17 | Inkubation von ¹⁴ C-Metalaxyl und Laccase und isolierten Huminstoff-Fractionen mit Laccase oder Lignin-Peroxidase im Modellsystem..... | 78 |
| 3.18 | Analytische Methoden | 79 |
| 3.18.1 | Dünnschichtchromatographie (DC) | 79 |
| 3.18.2 | Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)..... | 79 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.18.3 | Hochdruckflüssigchromatographie mit Massenspektroskopie (LC-MS)..... | 80 |
| 3.18.4 | Gaschromatographie mit Massenspektroskopie (GC-MS)..... | 81 |
| 3.19 | Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung | 82 |
| 4 | Ergebnisse..... | 83 |
| 4.1 | <i>In vitro</i> Inkubationen in Modellsystemen | 83 |
| 4.1.1 | Inkubation von ¹⁴ C-Metalaxyl und Resorcinol oder Huminsäuren mit Laccase oder Peroxidase | 83 |
| 4.1.2 | Inkubation von ¹⁴ C-Metalaxyl und isolierten Huminstoff-Fractionen mit Laccase oder Lignin-Peroxidase..... | 84 |
| 4.2 | Vergleich der Extraktionsmethoden | 85 |
| 4.3 | Prozentuale Verteilung der Korngrößenfraktionen | 86 |
| 4.4 | Kontrolle der Sterilisationsmethoden | 87 |
| 4.5 | Biologische und chemische Charakteristika der Inkubationsansätze im stationären System | 88 |
| 4.5.1 | Gesamtbodenproben..... | 88 |
| 4.5.1.1 | Mikrobielle Aktivität | 88 |
| 4.5.1.2 | Gehalt organischen Bodenmaterials und pH-Wert | 90 |
| 4.5.1.3 | Messungen der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen | 91 |
| 4.5.2 | Fraktionsproben..... | 93 |
| 4.5.2.1 | Mikrobielle Aktivität | 94 |
| 4.5.2.2 | Gehalt organischen Bodenmaterials und pH-Wert | 95 |
| 4.5.2.3 | Messung der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen | 97 |
| 4.5.2.4 | Ergosterolkonzentration..... | 100 |
| 4.5.3 | Boden mit/ohne Enzymzugabe | 100 |
| 4.5.3.1 | Mikrobielle Aktivität | 101 |
| 4.5.3.2 | Messungen der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen | 101 |
| 4.6 | Der Verbleib von ¹⁴ C-Metalaxyl in den Inkubationsansätze in stationären Systemen..... | 102 |
| 4.6.1 | Gesamtbodenproben..... | 102 |
| 4.6.1.1 | Bilanzierung der Radioaktivität..... | 102 |
| 4.6.1.2 | Analyse der extrahierbaren Radioaktivität | 105 |
| 4.6.1.3 | Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff Fraktionen..... | 108 |
| 4.6.1.4 | Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse..... | 111 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.6.2 | Fraktionsproben | 113 |
| 4.6.2.1 | Bilanzierung der Radioaktivität..... | 114 |
| 4.6.2.2 | Analyse der extrahierbaren Radioaktivität | 116 |
| 4.6.2.3 | Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff- Fraktionen..... | 118 |
| 4.6.2.4 | Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse..... | 119 |
| 4.6.3 | Boden mit/ohne Enzymzugabe | 120 |
| 4.6.3.1 | Bilanzierung der Radioaktivität..... | 121 |
| 4.6.3.2 | Analyse der extrahierbaren Radioaktivität | 122 |
| 4.6.3.3 | Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff- Fraktionen..... | 123 |
| 4.6.3.4 | Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse..... | 124 |
| 5 | Diskussion..... | 126 |
| 5.1 | <i>In vitro</i> Inkubationen in Modellsystemen | 126 |
| 5.2 | Etablierung einer erschöpfenden Extraktionsmethode unter Einsatz der Partikelgrößenfraktionierung..... | 129 |
| 5.3 | Kontrolle der Sterilisationen des Versuchsbodens | 132 |
| 5.4 | Gesamtbodenproben im stationären System | 133 |
| 5.5 | Fraktionsproben im stationären System..... | 151 |
| 5.6 | Boden mit/ohne Enzymzugabe im stationären System | 160 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 165 |
| 6 | Summary and Outlook..... | 168 |
| | Literaturverzeichnis | 171 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 188 |
| | Tabellenverzeichnis..... | 190 |
| | Abbildungsverzeichnis | 192 |
| | Formeln zur Berechnung | 194 |
| | Anhang | 195 |
| | Danksagung..... | 199 |

1 Einleitung

1.1 Anthropogene Chemikalien in der Umwelt

Das zunehmende Wachstum der Weltbevölkerung geht einher mit dem technischen, industriellen und wissenschaftlichen Fortschritt, den dadurch gestiegenen Lebensstandards und einem erhöhtem Ressourcen- und Energieverbrauch. Zahlreiche Entdeckungen in den Naturwissenschaften, der Medizin und den Ingenieurwissenschaften haben die aktuelle Massenproduktion von Verbrauchs- und Gebrauchsmitteln in den global vernetzten Informationsgesellschaften ermöglicht und begleitet. Die fortschreitende Globalisierung und weltweite Erschließung neuer Märkte wird diese Entwicklung noch weiter fortsetzen. Der Energie- und Ressourcenverbrauch und die ansteigende Produktion anthropogener Chemikalien haben einen direkten Einfluss auf die weltweiten Ökosysteme und damit auch auf die Zukunft der gesamten menschlichen Zivilisation. In diesem Zusammenhang wird die Kontamination der Umwelt durch produzierte Chemikalien als eine von zehn Hauptbedrohungen für die menschliche Gemeinschaft angesehen (Rockström et al., 2009). Anthropogene Chemikalien werden auch als Xenobiotika (xenos = fremd, bios = Leben) bezeichnet, weil sie ursprünglich in ihrer Form und Anzahl nicht in der Umwelt vorkommen. Gemäß der ACS (engl.: American Chemical Society) und ihrer Unterabteilung CAS (engl.: Chemical Abstracts Service) betrug die Gesamtzahl der im Jahr 2012 registrierten anorganischen und organischen Chemikalien 70 Millionen, von denen sich mehr als 100.000 im unmittelbaren Gebrauch befinden. Die produzierten Chemikalien werden unabsichtlich, wie beispielsweise polyaromatische Kohlenwasserstoffe aus industriellen Produktions- und Verbrennungsprozessen, aber auch absichtlich, wie beispielsweise Pflanzenschutzmittel, in die Umwelt entlassen (Fent, 1998). Der Eintrag erfolgt hierbei in alle Kompartimente der Umwelt, also die Atmosphäre, die Hydrosphäre und die Lithosphäre. Gemäß ihrer Stoffeigenschaften und den Wechselwirkungen mit biologischen und physiko-chemischen Gegebenheiten in den Umweltkompartimenten können sich die Xenobiotika und oder ihre Transformationsprodukte weiträumig verteilen (Langstreckentransport in Luft und Gewässer) und in Böden und Sedimenten akkumulieren. Die Fremdstoffe können von Organismen aufgenommen werden und sich in Nahrungsketten der Ökosysteme anreichern (Bioakkumulation). Dies kann viele Organismen gefährden und schädigen und darüber hinaus die gesamten Ökosysteme nachhaltig beeinflussen.

Einen bedeutenden Anteil der heutzutage produzierten Xenobiotika stellen Herbizide, Insektizide und Fungizide dar. Angesichts der weitreichenden ökonomischen, demographischen und kulturellen Auswirkungen von Pflanzenkrankheiten sind sie elementar für die Produktionskraft der Landwirtschaft und somit für die Deckung des steigenden Nahrungsmittelbedarfs. Fatale Folgen von Pflanzenkrankheiten wie beispielsweise der

Hungersnot in Irland mit über einer Million Todesopfern in den Jahren 1845/1846, die durch einen Befall der Kartoffelpflanzen durch den Pilz *Phytophthora infestans* verursacht wurde, versucht man in der heutigen Zeit mit dem Einsatz von Pestiziden vorzubeugen. Dennoch werden auch in der heutigen Zeit die größten Ernteverluste immer noch von Pflanzenkrankheitserregern verursacht, deren Ausbreitung aufgrund der Monokulturanbauweise, einer erhöhten Produktion auf kleiner werdenden Anbauflächen, und den global vernetzter Produktionswege zusätzlich begünstigt wird (Henningsen, 2003). Beispielsweise gelangen Pathogene aktuell nicht nur über die Luft, sondern auch entlang globaler Verkehrswege in weit entfernte Regionen und können dort erneut Nutzpflanzen infizieren. Neben zahlreichen Bakterien, Nematoden und Viren sind vor allem verschiedene Pilzarten für die Pflanzenschädigungen verantwortlich (McGrath, 2004), weil sie sich im Anbau häufig rasch ausbreiten und die Nutzpflanzen gleichzeitig enorm schädigen können (Yang et al., 1991). Demgemäß bilden Fungizide einen bedeutenden Anteil an den weltweit produzierten Pestiziden: Im Jahr 2005 wurden 150 verschiedene Fungizide weltweit genutzt und ihr gesamter Verkaufswert an den Endverbraucher wurde auf etwa 7,4 Milliarden US Dollar geschätzt (Morton und Staub, 2008).

1.2 Fungizide und Resistenz

Fungizide werden aktuell aus vier Gründen eingesetzt: Erstens um die Ausbreitung der Schadorganismen im Ernteanbau zu verhindern, zweitens um die Produktivität der Erntepflanzen durch geringere Schädigung zu erhöhen, drittens um ihre Qualität nach Ernte bei der Lagerung zu gewährleisten und viertens um Saatgut schon vor seiner Ausbringung vor Pathogenen zu schützen. Die Fungizide können hierbei zum einen protektiv (zum Schutz vor einer Infektion) als auch kurativ (Bekämpfung des Krankheitserregers direkt nach der Infektion) wirken. Eine erfolgreiche Bekämpfung nach Ausbildung von Krankheitssymptomen (eradikative Wirkung) ist bisher zumeist nur bei ektoparasitischen Pilzen gelungen. Fungizide werden auf das Saatgut (Beizen), die oberirdischen Pflanzenbestandteile auf dem Feld und oder auch auf den Ackerboden selbst ausgebracht. Als Fungizide können sowohl anorganische, metallorganische als auch organische Chemikalien genutzt werden. Im 19. Jahrhundert wurden vor allem Kupfersulfatlösungen und zu Anfang des 20. Jahrhunderts organische Quecksilberverbindungen eingesetzt (Russel, 2005). Ab den 1930er Jahren wurden beispielsweise Dithiocarbamate verwendet und ab den 1950er Jahren kamen neue Wirkstoffklassen wie beispielsweise Phthalimide, Morpholine, Benzimidazole und Acetylanilide hinzu. Ab den 1990er Jahren wurden auch Strobilinerine eingesetzt. Neben Breitbandfungiziden wurden zunehmend Fungizide entwickelt, die selektiv auf eine jeweilige Pathogenart wirken. Die verschiedenen Wirkstoffe können gemäß ihrer Strukturchemie, ihrer protektiven oder kurativen Rolle beim Pflanzenschutz und bezüglich ihres Wirkortes

und ihrer Wirkungsweise im Zielorganismus klassifiziert werden. Eine bis in die heutige Zeit fortlaufende Weiterentwicklung und Synthese neuartiger Fungizide wurde u.a. dadurch bedingt, dass Resistenzen der Pathogene gegenüber bereits genutzten Wirkstoffen entgegenzutreten. Die Ausbildung solcher Resistenzen konnte bereits seit den 1970er Jahren beobachtet werden (Brent und Hollomon, 2007). Dem Prozess liegt zugrunde, dass ein kleinerer Teil einer Pathogenpopulation eine Genmutation trägt, die die Wirkung des Fungizids herabsetzen oder verhindern kann. Diese Mutation hat normalerweise keine Vorteile für das Pathogen. Unter dem durch den Einsatz des Fungizids bewirkten Selektionsdruck bietet sie jedoch den Mutationsträgern einen evolutiven Vorteil und ermöglicht ihre rasche Ausbreitung. Die Gefahr einer Schädigung von Nutzpflanzen durch resistente Pathogene ist im Monokulturanbau besonders groß, da sich die Krankheitserreger dort leicht von Wirtspflanze zu Wirtspflanze im gesamten Anbaugebiet ausbreiten können (Brent und Hollomon, 2007). Die Gefahr von Resistenzentwicklungen ist sehr hoch, wenn das jeweilige Fungizid nur an einer Stelle im Metabolismus des Schadorganismus wirkt (engl. „one-site-activity“).

Aufgrund ihrer Anwendung in der Landwirtschaft stehen Pestizide in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Ökosystem Boden, der Basis des Pflanzenwachstums (Miller, 2004) und der menschlichen Gesundheit. Demzufolge nimmt das wachsende Bewusstsein der Gesellschaft für Umweltschutz zusätzlich zu den Resistenzentwicklungen einen direkten Einfluss auf die aktuelle Entwicklung und Erforschung neuartiger Fungizide. Die Ziele der Agrarindustrie und der Umweltforschung sind dementsprechend u.a. die Entwicklung umweltschonender Wirkstoffe mit hoher Effizienz bei einer gleichzeitigen Reduktion der eingesetzten Aufwandmengen. Fungizide werden zu diesem Zweck oft in einem Gemisch anderer Chemikalien gelöst und mit diesen ausgebracht (Formulierung). Dies erleichtert u.a. ein Vordringen des Wirkstoffs bis zum eigentlichen Wirkort im Zielorganismus und erhöht somit seine Effizienz. Zusätzlich werden politische Strategien zur besseren Verteilung und nachhaltigem Konsum der produzierten Nahrungsmittel entwickelt und auch neue Anbauformen wie der ökologische Landbau gefördert. Des Weiteren erforscht man die Züchtung resistenterer Pflanzenarten und die gentechnische Veränderung von Nutzpflanzen, um den beschriebenen Problemen entgegenzuwirken. Zusätzlich werden bereits genutzte und neu entwickelte Fungizide hinsichtlich ihres Gefährdungspotentials für die Umwelt und den Menschen registriert und ökochemisch und ökotoxikologisch durch verschiedene unabhängige Institutionen getestet bevor sie zum Gebrauch für eine begrenzte Zeitperiode zugelassen werden können. Dennoch ist festzustellen, dass das Ökosystem Boden aufgrund der zunehmenden Intensivierung der Landwirtschaft und dem damit einhergehenden Einsatz von vielen Arten von Pflanzenschutzmitteln wie den Fungiziden nachhaltig beeinflusst wird. Es wurde beispielsweise erforscht, dass teilweise mehr als 90 % der

ausgebrachten Pestizide nicht zum eigentlichen Schädling (Zielorganismus), sondern stattdessen sowohl in Nicht-Zielorganismen, Wasserflächen als auch in die Nahrung gelangen und sich in Böden anreichern. In diesem Zusammenhang wird von Wissenschaftlern geschätzt, dass etwa ein Drittel der weltweit ausgebrachten Pestizide (3 Millionen Tonnen) in den Agrarböden verbleibt (Barriuso et al., 2008). Dadurch entstehende Umweltprobleme können nur vor dem Hintergrund einer gesamtwissenschaftlichen Übersicht der Zustände und Prozesse der natürlichen und agrartechnisch genutzten Böden diskutiert und gelöst werden (Gisi et al., 1997).

1.3 Das Ökosystem Boden

Der Boden stellt einen Naturkörper dar, welcher die gesamte nicht-wässrige Erdoberfläche umspannt und in dem sich die Phasen Luft, Wasser und Gestein zeitlich und örtlich überlagern (Gisi et al., 1997). Böden sind essentiell für das Leben aller Organismen auf der Erde. Sie stellen die Grundlage des Pflanzenwachstums und des Abbaus organischer Reststoffe dar und verbinden elementare Stoff- und Energiekreisläufe der Atmosphäre und Hydrosphäre miteinander (Scheffer und Schachtschabel, 2010). Wichtige Stoffumwandlungen in diesen Kreisläufen und Reinigungs- sowie Filterprozesse finden im Boden statt, welcher auch als Puffersystem bei diesen Reaktionen fungiert. Die physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse in Böden nehmen somit eine zentrale Rolle beim Erhalt der gesamten Biosphäre des Planeten ein. Der Boden ist zudem ein multidimensionaler Lebensraum (Pedosphäre), der kontinuierlich aufgrund von biogeochemischen, klimatischen, geologischen, topologischen und zeitlichen Einflüssen entstand und weiterhin entsteht (Huang et al., 2005). Die physikalischen, chemischen und biologischen Komponenten des Bodens sind hierarchisch in einem komplexen System strukturiert, welches große Grenzflächen zwischen Fest-, Gas- und Flüssigkeitsphase in den Bodenporen beinhaltet (Young und Crawford, 2004). Diese Poren stellen ein wichtiges Stoffaustauschsystem und einen Wasserspeicher dar (Paul, 2007; Totsche et al., 2010).

Die anorganischen Bodenbestandteile der festen Bodenphase sind zumeist Quarz, Tonminerale, Aluminium-, Eisen und Manganoxide sowie Hydroxide und Carbonate, die durch Verwitterungsprozesse des Muttergesteins entstehen (Pedogenese). Bei diesen Prozessen freigesetzte Ionen dienen den Pflanzen als Nährstoffe. Die oberirdischen Pflanzenbestandteile sind die primären Produzenten des organischen Materials im Boden (SOM, engl.: Soil Organic Matter), welches zusammen mit der Gesamtheit aller im Bodensystem vorkommenden Lebewesen (Edaphon) den zweiten Bestandteil der festen Bodenphase bildet. Das Edaphon setzt sich aus der Bodenflora (Bakterien, Pilze, Algen, unterirdische Pflanzenorgane) und Bodenfauna (Protozoen, Nematoden, Mollusken, Anneliden und Arthropoden) zusammen. Die abgestorbenen Pflanzenbestandteile und auch

Bodentiere sowie zusätzlich eingetragenes organisches Material, wie beispielsweise organische Xenobiotika, werden durch die im Boden lebenden Konsumenten und Destruenten aufgenommen, verlagert, umgewandelt und zersetzt. Insbesondere die Mikroorganismen bauen die organische Bodensubstanz um und ab und tragen damit zur Umwandlung und Neusynthese von Stoffen, der Nährstoffmobilisierung sowie der Strukturbildung und Durchmischung des Bodens bei. Die Mikroorganismen in Böden bestehen aus zahlreichen Arten von Eubakterien, Archaeen, Pilzen, Algen, Protozoen und Viren (Kästner, 2000). Es wird vermutet, dass in einem Gramm fruchtbaren Bodens etwa bis zu 7000 verschiedene Bakterienspezies vorkommen, deren Populationen bis zu 100 Millionen Individuen beinhalten (Gauvrilescu, 2005). Die Mikroorganismen sind jedoch nicht homogen im Boden verteilt, sondern es sind nur geringe Volumina des Gesamtbodenkörpers besiedelt (Nannipieri et al., 2011). Dazu zählen Biofilme (Jahnke und Priefer, 2002) und die Rhizosphäre (wurzelnahe Bodenumgebung), weil insbesondere diese Bodenbereiche ein konstantes Nährstoffangebot bieten. Da die mikrobiellen Abbauprozesse häufig von der Verfügbarkeit von Licht, Wasser und Sauerstoff abhängen, finden sie zudem vor allem in den oberen Bodenschichten statt.

Die Gesamtheit der organischen Bodensubstanz (SOM) setzt sich aus dem Edaphon (etwa 15 %) und dem Humus oder der Nekromasse, also den Bestandteilen des Abbaus organischen Materials (etwa 85 %) zusammen. Das organische Bodenmaterial stellt ein Nährstoffreservoir dar, welches reich an stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Verbindungen ist und häufig die anorganischen Mineralien ummantelt. Dieser Prozess wird dadurch ermöglicht, dass pedogene Mineralien, insbesondere Tonpartikel eine zumeist negativ geladene Oberfläche besitzen. Dadurch wird eine Bindung von organischen Bodenbestandteilen über Wasserstoffbrückenbindungen und Metallkationeneinlagerungen ermöglicht. Diese als Ton-Humus-Aggregate bezeichneten Strukturen tragen wesentlich zu einer stabilen Strukturbildung des Bodens bei (Gisi et al., 1997).

Das Strukturgefüge des Bodenkörpers entsteht kontinuierlich, indem die Gesamtheit der organischen Umwandlungsprodukte und die anorganischen Bodenbestandteile durch physikalische und chemische Einwirkung sowie durch Lebendverbau verlagert, miteinander verkittet und aggregiert werden (Tisdall und Oades, 1982). Generell besitzen die im Bodenkörper miteinander aggregierten Partikel einen Größendurchmesser im Bereich von wenigen μm bis hin zu Steinfragmenten, die mehrere Meter Durchmesser haben können. Nach Klassifizierungsnorm EN ISO 14688 werden abseits der Steinfragmente die mineralischen Bodenpartikel gemäß ihrer Größe in Sand (63 bis 2000 μm), Schluff (2 bis 63 μm) und Ton ($\leq 2 \mu\text{m}$) unterschieden. Die prozentualen Anteile dieser Korngrößenfraktionen am Gesamtboden bedingen dessen Textur (Gisi et al., 1997), die zur Klassifizierung von

Bodentypen genutzt werden kann. Das Schema eines derart gebildeten Bodenkörpers ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

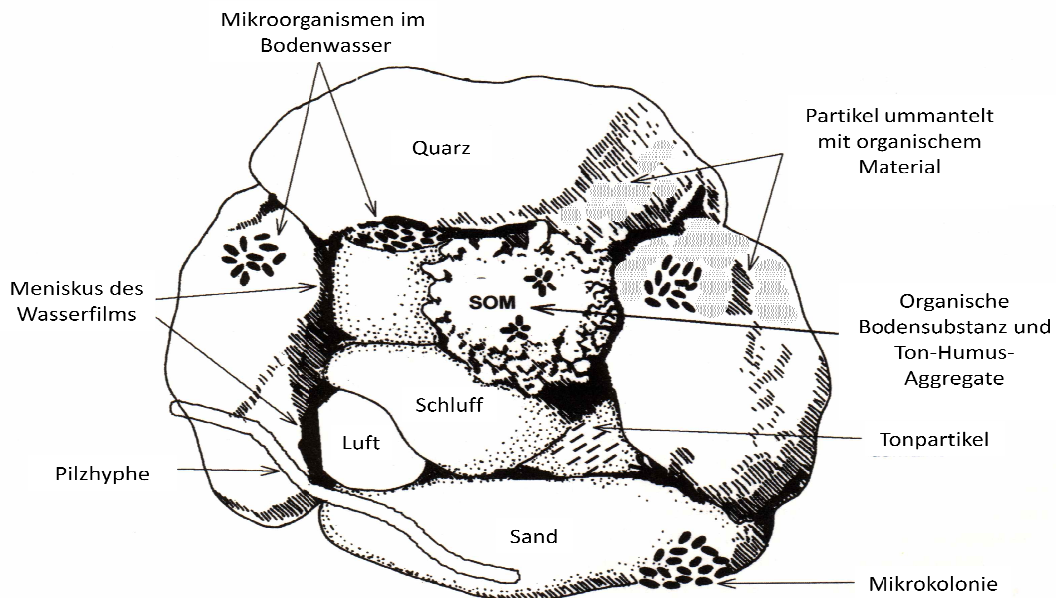


Abb. 1.1: Schema der heterogenen Struktur eines Bodenkörpers und seiner Phasensysteme nach Kästner et al. (2013). SOM (engl. soil organic matter) = organische Bodensubstanz.

Insbesondere die Tonpartikel verleihen dem Boden eine hohe Plastizität und Quellfähigkeit und ermöglichen aufgrund ihrer großen Oberfläche den für die Pflanzenernährung wesentlichen Kationenaustausch. Die Verkittung der verschiedenen Partikel mit der organischen Substanz wird aufgrund von Pflanzenwurzeln und von diesen ausgeschiedenen Polysacchariden noch weiter fortgeführt. Diese Zucker (EPS, engl.: extracellular polysaccharides) wirken hierbei als Verbundstoffe und verkleben die Partikel zu sogenannten Mikroaggregaten einer Größe von 20 bis 250 μm . (Bronick und Lal, 2005; Scheffer und Schachtschabel, 2010). Zusammenlagerungen organischer Bodensubstanz einer Größe von 0,053 bis 2 mm Größe werden als POM (engl.: Particulate Organic Matter) bezeichnet, die zusammen mit Pilzhypen und Pflanzenwurzeln diese Mikroaggregate stabilisieren und mit größeren anorganischen Partikeln, wie primären Mineralen, zu sogenannten Makroaggregaten einer Größe von bis zu mehreren Millimeter vernetzen. Die Bindung der POM an die Mineralien erfolgt hierbei oft an Aluminium- und Eisenoxide- sowie Hydroxide (Kaiser und Guggenberger, 2003; Haider und Schäffer, 2009). Der Hohlraum und die Poren zwischen diesen Makroaggregaten können mit Luft oder wässriger Bodenlösung gefüllt sein und machen in Böden bis zu 50 % des gesamten Porenvolumens aus. Das komplexe Wirkungsgefüge der unterschiedlichen Aggregate und Bodenpartikel ist in Abbildung 1.2 aufgeführt.

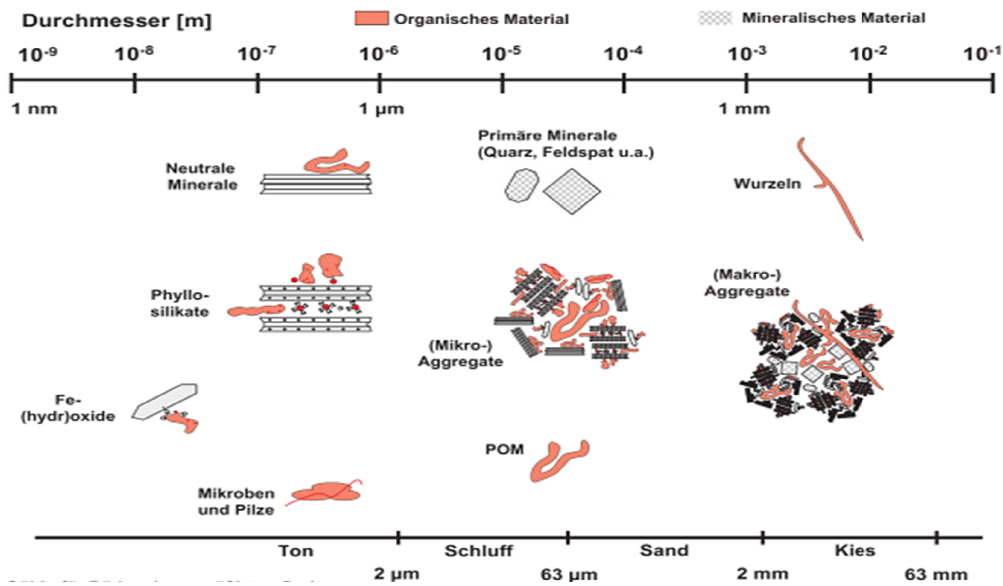


Abb. 1.2: Schema der Assoziation von organischer Bodensubstanz im Mikro- und Makroaggregaten in Böden der gemäßigten Breiten nach Scheffer und Schachtschabel, 2010. POM (engl.: Particulate organic matter; entspricht organischen Bodenpartikeln einer Größe von 0,053 bis 2 mm gemäß Cambardella und Elliot (1994).

Die beschriebenen Aggregate können durch Wasserzugabe und Ultraschall aufgebrochen und der Boden mit folgendem Sieben und sequentieller Resuspendierung und Zentrifugation in seine Partikelgrößenfraktionen aufgetrennt werden (Laird und Dowdy, 1994). Dieses Verfahren wird als Partikelgrößenfraktionierung bezeichnet und kann u.a. zur Texturbestimmung des Bodens und zur Untersuchung des Umsatzes des organischen Bodenmaterials sowie der Verteilung des organischen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts in den jeweiligen Korngrößenfraktionen genutzt werden (Tisdall und Oades, 1980; Tiessen und Stewart, 1983; Christensen, 1986; Schulten et al., 1993; Cambardella und Elliott, 1994) und wurde gemäß dem Untersuchungsziel der jeweiligen Forschung verschiedentlich modifiziert.

1.4 Humifizierung und Huminstoffe

Die Verarbeitung abgestorbener Pflanzenbestandteile und Tiere durch Teile des Edaphons kann im Ökosystem Boden vollendet bis zur Umwandlung in anorganische Endprodukte wie zum Beispiel Wasser, Kohlenstoffdioxid und Ammonium (Mineralisierung) als auch bis hin zum Aufbau neuer Biomasse erfolgen. Des Weiteren kann das organische Ausgangsmaterial, welches vor allem aus Pflanzenbestandteilen besteht (Kögel-Knabner, 2002), aber auch unvollendet zu organischen Zwischenprodukten umgewandelt werden. Für den Abbau- und Umbau der organischen Substanz durch Mikroorganismen, der auch als Humifizierung bezeichnet wird, sind verschiedene Parameter entscheidend. Zu ihnen zählen der

Gesamtgehalt der organischen Bodensubstanz, die Temperatur, die Bodenfeuchte und der pH-Wert, welche die Diversität und Abundanz der Destruenten und Konsumenten beeinflussen (Bollag und Liu, 1990; Gavrilesco, 2005). Des Weiteren haben die Bodenstruktur, Textur und die vorherrschenden Mineralformen einen entscheidenden Einfluss auf die Humifizierung (Six et al., 2004). Die Menge und Stoffeigenschaften der organischen Ausgangssubstanzen wie ihre Wasserlöslichkeit, ihre Adsorptionskoeffizienten, ihre Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten und ihre chemische Struktur beeinflussen ebenfalls ihre Humifizierung, da sie u.a. die Mobilität und Verweildauer im Boden bedingen (Stevenson, 1994; Baldock und Nelson, 2000; Gavrilesco, 2005).

Die Produkte unvollständigen Abbaus des Ausgangsmaterials und auch Nekromasse wie Zellwandreste von Mikroben gehen in den Humus der organischen Bodensubstanz ein, deren Auf- und Abbau sich in Böden insgesamt ausgleicht (Gisi et al., 1997). Hierbei wird traditionell zwischen Nährhumus, dem zersetzbaren und energie- sowie nährstoffliefernden Bestandteil und dem persistenteren Dauerhumus, den Endprodukten des Abbaus, unterschieden. Die schwarz bis bräunlich gefärbten Huminstoffe sind die Hauptbestandteile des Dauerhumus und bestehen aus einem Kontinuum zahlreicher organischer Komponenten in verschiedensten Phasen ihres Um- und Abbaus aufgrund biotischer Prozesse (Baldock und Skjemstad, 2000) und der Interaktion mit mineralischen Oberflächen (Schmidt et al., 2011). Sie können als das Resultat von Transformation, Polymerisation, Dekomposition und Stabilisierung des organischen Ausgangsmaterials gemäß der vorherrschenden Bedingungen im Ökosystem Boden beschrieben werden (Prescott et al., 2000; Schmidt et al., 2011). Die Huminstoffe bilden ca. 50 bis 60 % der gesamten organischen Bodensubstanz (Paul und Clark, 1996). Ihr Molekulargewicht beträgt einige hundert bis tausende Dalton (Huang und Hardie, 2009). Die Bodenstruktur und Porosität des Bodenkörpers, sowie dessen Fähigkeit Wasser zu speichern sowie Kationen- und Anionenaustausch zu gewährleisten, beruht vor allem auf den huminen Substanzen (Sollins et al., 1996; Stevenson, 1994; Piccolo, 2001; 2002). Des Weiteren sind sie ein bedeutender Nährstoffspeicher für die Mikroorganismen im Boden (Sollins, 1996) und grundlegend für die Fruchtbarkeit eines Bodens und seiner Funktion als Ökosystem. Zusätzlich wurde erforscht, dass organische Fremdstoffe, wie Pflanzenschutzmittel bevorzugt an die organische Bodensubstanz, die Ton-Humus-Aggregate und Tonminerale sorbieren (Führ et al., 1985; Bollag et al., 1992; Xie et al., 1997; Haider und Schäffer, 2000), wobei dieses Phänomen bei hydrophoben Fremdstoffen besonders ausgeprägt ist (Raber, 1996). Dies wird in den Abschnitten 1.6 und 1.7 erläutert.

Trotz dieser enormen Bedeutung der Huminstoffe für alle Ökosysteme weltweit, ist ihre Bildung, chemische Struktur, Dynamik und Stabilisierung nach jahrzehntelanger Forschung noch nicht hinreichend aufgeklärt. Dies ist mit ihrer enormen Komplexität zu erklären. Huminstoffe werden als eine der komplexesten natürlich vorkommenden Strukturen

beschrieben (Schulten und Leinweber, 1996). Traditionell werden ihre Komponenten gemäß ihrer Löslichkeit unter sauren und basischen Bedingungen unterschieden und können durch ein als Huminstoff-Fraktionierung bezeichnetes Verfahren voneinander getrennt werden (Sollins, 1996). Hierbei werden die alkaliunlöslichen Humine von den alkalilöslichen Fulvin- und Huminsäuren sowie Nicht-Huminen abgetrennt. Nicht-Humine bestehen zumeist aus Fetten, Wachsen und Zuckern (Baldock und Nelson, 2000; Pettit, 2013). Die an mineralische Partikel gebundenen unlöslichen Humine und die ungebundenen Huminsäuren und Fulvinsäuren werden als die eigentlichen Huminstoffe klassifiziert. Diese besitzen häufig identische Stoffeigenschaften aber unterschiedlich hohe Molekulargewichte, die von den Fulvinsäuren über die Huminsäuren bis hin zu den Huminen zunehmend größer werden (Pettit, 2013). Da Fulvinsäuren aber eine größere Anzahl saurer funktioneller Gruppen beinhalten als die Huminsäuren, können diese durch Ansäuern voneinander getrennt werden (Schnitzer und Khan, 1972; Aiken et al., 1985; Hayes, 1997; Piccolo, 2002). Die Huminstoffe wurden in der bodenwissenschaftlichen Forschung mittels Chromatographie, Spektrometrie und Spektroskopie untersucht, um ihre jeweiligen Inhaltsstoffe zu identifizieren. Sie beinhalten gemäß der Heterogenität des organischen Ausgangsmaterials und der verschiedenen Ab- und Umbaureaktionen im mikrobiellen Ana- und Katabolismus eine Vielzahl organischer Verbindungen, die teilweise eine enorme Persistenz im Boden aufweisen (Stevenson, 1994). Zu diesen zählen unter anderem Aminosucker, Fette, Zucker, Lignin, Biopolymere, Tannine und Proteine (Kögel-Knabner, 2002) sowie polymere Produkte des mikrobiellen Abbaus (Theng, 2012) und auch Fragmente mikrobieller Zellhüllen (Schurig et al., 2012).

Verschiedene Theorien der Bildung von Huminstoffen sind in den letzten Jahrzehnten erhoben und experimentell untersucht worden. Die Persistenz von Huminstoffen wurde anfangs allein mit der Strukturchemie des jeweiligen Ausgangsmaterials begründet. Es wurde zum Beispiel die Hypothese erhoben, dass die aromatische Struktur des schwer mikrobiell abbaubaren Lignins, eine Hauptkomponente des Pflanzenmaterials (Kögel-Knabner, 2002), mittels Schiffischer Base Reaktion mit Proteinen reagiert sowie auch Ligninderivate oxidativ aneinander gekoppelt werden und sich somit die stabilen Huminstoffstruktur ausbildet (Hobson und Page, 1932; Waksman und Iyer, 1932; Thevenot, 2010). Dieser Prozess wird als Ligintheorie bezeichnet. Eine weitere Hypothese vermutete, dass braun gefärbte Polymere als Folge einer Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern, welche Zwischenprodukte des mikrobiellen Stoffwechsels darstellen, die Bestandteile von Huminstoffen sein können (Stevenson, 1994). Des Weiteren wurde vermutet dass die phenolischen Gruppen von Tanninen mit Amidgruppen von Proteinen reagieren und stabile Komplexe ausbilden, die zur Huminstoffstruktur beitragen (Handley, 1961; Gustavson, 1966; Ladd und Butler, 1966; Haslam, 1989; Loll und Bollag, 1983; McManus et al., 1981; Oh et al., 1980; Hagerman,

2012). Eine weitere Theorie von Konova (1966) besagte, dass das Ausgangsmaterial zuerst zu Monomeren abgebaut wird und phenolischen Monomere dann folgend mittels Kondensationsreaktionen zu polymeren Makrostrukturen verbunden werden. Dies wurde als Polphenoltheorie bezeichnet.

Unabhängig von der jeweiligen Hypothese wurde die Ausbildung polymerer Strukturen mit enzymatischen und abiotischen Prozessen, wie Kondensationen, Oxidationen, und Radikalbildungen erklärt (Ziechmann, 1980; Bollag et al., 1992; Stevenson, 1994;). Der enzymatische Einfluss auf die Humifizierung wurde insbesondere auf die Aktivitäten von Phenoxidasen und Peroxidasen zurückgeführt (Bollag et al., 1992; Sinsabaugh, 2010). Die von diesen Enzymfamilien katalysierte Oxidation von Metallionen wie Mn^{2+} und Fe^{2+} und Phenolen führt hierbei zur Bildung freier, reaktiver Phenoxyradikale und die Oxidationen von nicht phenolischen Substanzen zur Bildung von Arylradikale (Sinsabaugh, 2010; Zavarzina, 2011). Diese organischen Komponenten können dann als Folge der Radikalbildungen zu Polymeren vernetzt werden (Martin und Haider, 1978; Sarkar et al., 1989; Bollag, 1983; Filip und Preusse, 1985; Bollag et al., 1992; Bialk und Pedersen, 2008; Sinsabaugh, 2010). Die Polymerisation von Phenolen aufgrund dieser oxidativen Kopplung ist schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt.

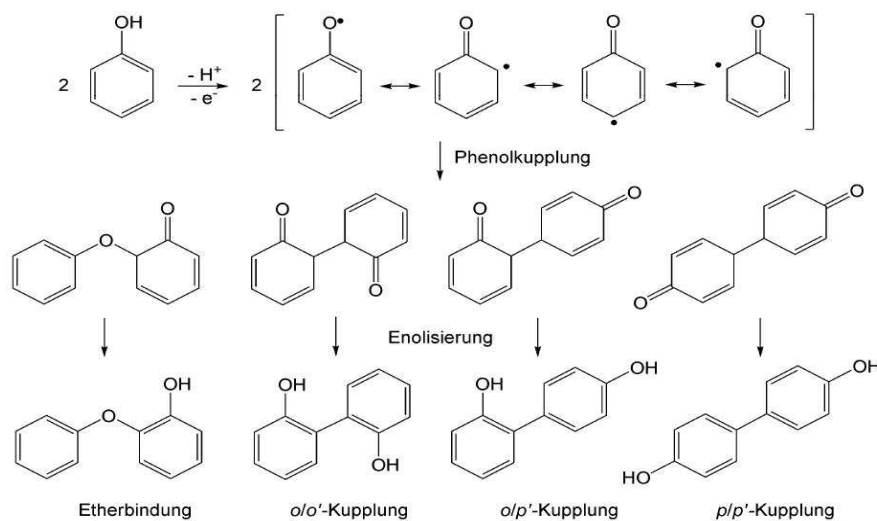


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Oxidation von Phenolen zu Phenoxyradikalen mit anschließender Radikalkopplung. Ohne Kontrolle der Selektivität entstehen durch intramolekulare Kopplung zweier Radikale Ether, o/o'-, o/p'-, p/p'- verknüpfte Ketotautomere. Diese werden durch Enolisierung in Enolautomere umgewandelt. (o= ortho; p = para). Abbildung gemäß Dissertation K. Koschorek, Universität Stuttgart (2009).

Des Weiteren wurde erforscht, dass die Radikale auch den ungerichteten Abbau organischer Substanz beispielsweise mittels einer Ringspaltung und Demethylierung der organischen Komponenten (Zavarzina et al., 2011) katalysieren können. Zusätzlich können oxidative Kopplungen abiotisch mittels oxidierter Metallkationen in Tonmineralen wie beispielsweise Illit erfolgen (Bollag et al., 1992; Shindo und Huang, 1982). Die polymeren Aggregate der

heterogenen Einzelsubstanzen sollten den Forschungen zur Folge zusätzlich über kovalente Bindungen und Wasserstoffbrücken untereinander stabilisiert sein (Stevenson, 1994, Theng, 2012). Die beschriebenen Theorien wurden von Stevenson (1994) zusammenfassend in einem Polymer-Modell der Huminstoffe beschrieben.

Die Schlussfolgerung einer polymeren Struktur der Huminstoffe beruhte jedoch zumeist auf Ergebnissen aus *in vitro* Experimenten, in denen typische monomere Vertreter organischer Substanzen im Boden mit oxidativen Enzymen zu Modell-Polymeren verbunden werden konnten. Deren Stoffeigenschaften ähnelten denen der natürlich vorkommenden Huminstoffe (Bollag et al., 1992). Beispielsweise synthetisierten und oxidierten Haider und Martin (1967, 1970) Phenole mittels verschiedener Bodenpilze, die mit Peptiden Polymere ausbildeten, deren Stoffeigenschaften denen der Huminsäuren im Boden ähnelten. Des Weiteren gelang es Bollag et al. (1992) typische Vertreter organischer Substanzen im Boden, wie Syringaldehyd mit Laccase oxidativ zu Polymeren zu koppeln. Schlussfolgerungen des Polymer-Modells stützten sich des Weiteren auf Extraktions- und Degradationstechniken der alkalilöslichen beziehungsweise alkaliunlöslichen Fraktionen der Huminstoffe, die u.a. von Schnitzer und Khan (1972), Aiken et al. (1985) und Sollins, 1996 beschrieben wurden. Da diese invasiven Methoden aber zu Artefakten in den folgenden Untersuchungen führen können, ist eine Beschreibung der *in situ* Struktur und Organisation der Huminstoffe mit diesen Methoden nicht ermöglicht worden. Das gesamte Polymer-Modell wurde kritisiert und wird auch aktuell immer noch kontrovers diskutiert (Hayes et al., 1989; Burdon, 2001; Piccolo, 2002; Pena-Mendez et al., 2005).

In der heutigen Zeit erlauben nicht-invasive Untersuchungsmethoden wie die Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (NMR), die Pyrolyse-Gas-Massenspektroskopie (Py-GC/MS) und auch Methoden wie die Größenausschlusschromatographie einen Einblick in die *in situ* Situation der Huminstoffe im Boden. Sie ermöglichten somit eine neue Perspektive. Gemäß dieser neuen Techniken bestehen die Huminstoffe mehrheitlich nicht aus kovalent, quervernetzten Polymeren, sondern aus einer komplexen Mischung aus Proteinen, aliphatischen Substanzen, Zuckern, Peptidoglykanen und Lignin (Kelleher und Simpson, 2006; Simpson et al., 2011) als auch mikrobiellen Zellwandfragmenten und nur zu geringen Anteilen aus kovalent vernetzten Makromolekülen. Die diversen niedermolekularen Substanzen bilden Aggregatgruppen, deren Stabilität auf der Größe, Struktur, chemischen Affinität und Hydrophobizität der beinhalteten Einzelsubstanzen und van der Waals Bindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Substanzen beruht (Nebbioso und Piccolo, 2012). Die Zusammenlagerung der Aggregatgruppen zu stabilen Suprastrukturen wird insbesondere aufgrund von Wasserstoffbrücken, polyvalenten Kationen, hydrophobe Wechselwirkungen und der Interaktion mit mineralischen Oberflächen im Boden in ermöglicht (Sutton und Sposito, 2005; Piccolo, 2002; Ellerbrock

und Gerke; 2007; Setia et al., 2011; Schmidt et al., 2011). Diese neue Sicht stützt teilweise eine vormals von Wershaw (1986; 1993) postulierte Huminstoffstruktur. Wershaw untersuchte, dass die niedermolekularen Huminsäuren einen amphiphilen Charakter haben und sich in Micellen im Boden zusammenlagern können. Diese Micellen bilden Strukturen aus, in denen die hydrophilen Gruppen auf der Außenseite sich an die mineralischen Oberflächen binden, wobei die hydrophoben Teile käfigartige Innenräume ausbilden und weitere organische Einzelsubstanzen einschließen können.

Gemäß der neuen Sichtweise kann somit die Verweildauer von organischen Substanzen im Boden auch unabhängig von ihrer Strukturchemie mehrere Jahre und länger betragen (Flessa et al., 2008; Kleber et al., 2005), ohne dass sie kovalent in Huminstoff-Polymeren vernetzt sein müssen (von Lützow et al., 2006; Marschner et al., 2008; Miltner et al.; 2009). Der Einschluss strukturell leicht abbaubarer Substanzen wie Proteinen und Fettsäuren in die Suprastrukturen, sowie deren zusätzliche Stabilisation aufgrund von Interaktionen mit mineralischen Oberflächen (Aluminium- Mangan- Eisenoxide und Phyllosilikate) bedingt also ihre Persistenz, da sie durch die Inkorporation dem Abbau durch Destruenten im Boden entzogen sind (von Lützow et al., 2006; Schmidt et al., 2011; Kögel-Knabner et al., 2008). Die u.a. von Stevenson (1994) postulierten Polymere der Huminstoffe, in denen aromatische Kerne über C-C, Ester und Etherbrücken miteinander verbunden sind (Gisi et al., 1997), repräsentieren nach neuester Erkenntnis nur einen Teil der Huminstoffe und bilden nicht die hauptsächliche Basis ihrer Stabilisation (Schmidt et al., 2011). Dennoch leisten wohl oxidative Kondensationsreaktionen und kovalente Einbindungen organischer Substanzen, wie sie in den Polymer Modell beschrieben werden, trotzdem einen Teilbeitrag zur Gesamtstruktur der Huminstoffe. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass auch die niedermolekularen Substanzen in den Suprastrukturen bei Zugabe von Laccase und Peroxidasen unter Laborbedingungen zu höhermolekularen Polymeren kondensieren (Piccolo, 2002). Demgemäß wird vermutet, dass bei geeigneten Bedingungen für oxidative Reaktionen in Böden, ein Einfluss von Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die Bildung und somit auch auf die Struktur der Aggregatgruppen der Suprastrukturen existiert.

1.5 Extrazelluläre Enzyme im Boden und die Bedeutung von Phenoloxidasen und Peroxidasen

Von Exoenzymen im Boden katalysierte biologische Prozesse sind essentiell für globale Kohlenstoff- und Nährstoffkreisläufe, die Bodenbildung und die Pflanzenernährung (Baldrian, 2006). Die höchste Bedeutung kommt ihnen als Katalysatoren von Mineralisation, Transformation und Abbau der diversen stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Pflanzen- und Tierbestandteile im Boden und somit auch der Huminstoffbildung zu (Burns et al., 2013;

Sinsabaugh, 2010). Die Mikroorganismen tendieren bei den genannten Prozessen dazu, den aus den Exoenzymreaktionen erreichten Nutzen zu maximieren und die Enzyme unter möglichst geringem Energie- und Nährstoffverbrauch zu produzieren, sekretieren und ihre Funktion aufrecht zu erhalten (Allison et al., 2011). Aufgrund dieses für den Zellstoffwechsel ökonomisch sinnvollen Prozesses werden die Exoenzyme verstärkt produziert, wenn sich zersetzbares Material in der näheren Umgebung mikrobieller Zellen befindet und von diesen detektiert wurde. Dies soll ein maximales Kosten-Nutzen-Verhältnis der Exoenzymproduktion gewährleisten (Burns et al., 2013). Exoenzymklassen im Boden sind beispielsweise Chitinasen, Hydrolasen, Amylasen, Arylsulfatasen, Phosphatasen, Proteasen, Dehydrogenasen, Phenoxidasen und Peroxidasen (Makoi und Ndakidemi, 2008; Sinsabaugh, 2010; Burns, 2013). Diese diversen Enzymarten sind im Ökosystem Boden unterschiedlich lokalisiert. Sie können durch die Cytoplasmamembran sekretiert werden und folgend an mikrobiellen Zelloberflächen gebunden sein. Diese Enzyme sind dabei derartig in ihrer Konformation organisiert, dass ihr katalytisches Zentrum der Außenumgebung der Zelle zugewandt ist und sie durch die Verankerung in der Zellmembran vor Abbau durch beispielsweise Proteasen in der Zellumgebung geschützt sind (Burns et al., 2013). Diese verankerten Exoenzyme sind auf Substrate angewiesen, die in der Bodenlösung durch Diffusion und Brownsche Molekularbewegung zufällig in ihre Nähe kommen. Ihr Umsatz kann zusätzlich durch Chemotaxis der Mikroorganismen hin zu den Substraten verstärkt werden (Marx und Aitken, 2000). Des Weiteren können Exoenzyme im Cytoplasma und periplasmatischen Raum von Mikrobenzellen vorliegen. Ihr Substratumsatz wird oft über eine Verbindung der mikrobiellen Zellen mit den Substraten über Biofilme ermöglicht (Costerton, 1992). Der Hauptanteil der Exoenzyme im Boden wird von den Zellen über ihre Membran hinaus in die Bodenlösung sekretiert und liegt dort als frei diffundierbare Enzyme vor. Diese Enzyme sind häufig über Disulfidbrücken und Glykosilierungen strukturell stabiler als intrazelluläre Enzyme, um ihre Aktivität in der Bodenlösung in weiten pH- und Temperaturbereichen zu gewährleisten und sie vom Abbau durch Proteasen zu schützen (Zhang und Ten Hagen, 2011). Des Weiteren wird spekuliert, dass zusätzlich Proteaseinhibitoren zum Schutz der Exoenzyme sekretiert werden (Schwarz und Zverlov, 2006). In Folge des durch die Glykosylierung veränderten Sorptionsverhaltens, können die extrazellulären Enzyme mit Tonmineralen, organischer Bodensubstanz und Huminstoffen assoziieren und somit weiter vor Abbau geschützt und stabilisiert werden (Burns et al., 1982; Boyd und Mortland, 1986; Burns, 1986; Dick und Tabatabai, 1987). Extrazelluläre Enzyme können des Weiteren noch auf Überdauerungsformen von Mikroorganismen, wie beispielsweise Pilzsporen, als auch auf toten und intakten mikrobiellen Zellen und Zellwandfragmenten im Boden vorliegen. Im Weiteren können Exoenzyme im Boden auch aus toten, lysierten Zellen freigesetzt werden und folgend wieder in der Bodenlösung

vorliegen und oder auch auf Oberflächen immobilisiert werden. Eine Gesamtübersicht der Lokalisation von Exoenzymen im Boden ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

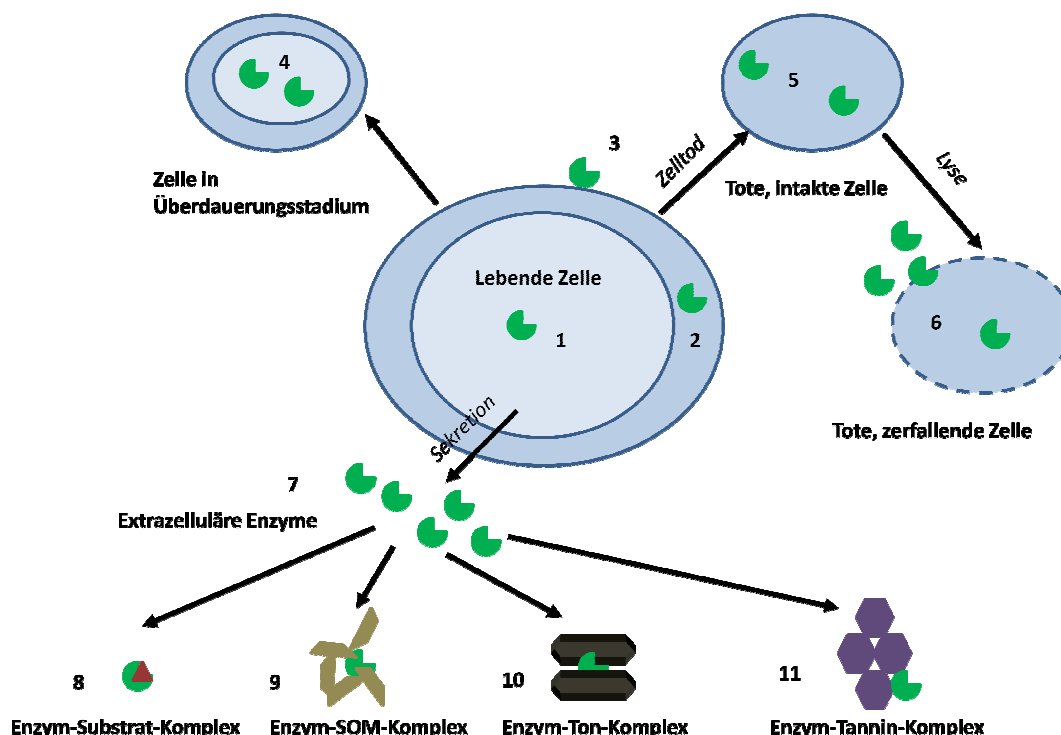


Abb. 1.4: Die Lokalisation von extrazellulären Enzymen im Boden gemäß Burns et al. (2013). 1: Enzyme in intakten, lebenden Zellen; 2: Enzyme im periplasmatischen Raum; 3: Enzyme verankert auf Zelloberflächen intakter Zellen; 4: Enzyme in Zellen im Überdauerungsstadium; 5: Enzyme in toten, intakten Zellen; 6: Enzyme freigesetzt aus toten, lysierenden Zellen; 7: Enzyme in der wässrigen Bodenlösung nach Sekretion; 8: Enzyme assoziiert mit Substraten in Enzym-Substrat-Komplexen; 9: Enzyme assoziiert mit organischer Bodensubstanz; 10: Enzyme assoziiert mit Tonmineralen; 11: Enzyme assoziiert mit Tanninen. SOM (engl.: Soil Organic Matter).

Aufgrund der Bindung an die Tonminerale und organische Bodensubstanz können die katalytischen Aktivitäten dieser immobilisierten Exoenzyme im Vergleich zu frei diffundierbaren Exoenzymen reduziert werden. Gründe hierfür sind oft eine Konformationsänderung im Protein aufgrund der Bindung oder auch eine Abschirmung der katalytischen Zentren durch die Matrix (Allison und Jastrow, 2006; Nannipieri, 2006; Quiquampoix und Burns, 2007). Dennoch kann die Assoziation mit den beschriebenen Oberflächen auch eine verbleibende katalytische Aktivität dieser immobilisierten Exoenzyme bewirken oder diese sogar verstärken, wodurch sie eine bedeutende Quelle für Enzymaktivitäten in Böden darstellen (Burns, 1981; Gianfreda und Nannipieri, 2001; Burns et al., 2013). Es wurde sogar geschlossen, dass ein Hauptanteil vieler Exoenzymaktivitäten in Böden auf den immobilisierten Enzymen beruht (Kandeler, 1990).

Gemäß der Diversität der Bodenmikroorganismengemeinschaften und der Vielzahl der physiko-chemischen Bodenoberflächeneigenschaften, sowie der Heterogenität des

organischen Ausgangsmaterials, sind viele verschiedene Bodenenzyme für den Abbau des organischen Materials und die Humifizierung nötig (Wallenstein und Weintraub, 2008). Die stickstoff- phosphor- und kohlenstoffhaltigen Verbindungen wie beispielsweise Lignin, Proteine, Fette, Zellulose und Stärke (Wallenstein und Weintraub, 2008; Theuerl und Buscot, 2010) sind häufig zu komplex, um von den Bodenmikroorganismen direkt als Substrate in ihre Zellen aufgenommen werden zu können. Deshalb scheiden die Mikroorganismen im Boden extrazelluläre Enzyme (Exoenzyme) aus, um das Substrat sukzessiv enzymatisch zu spalten und zu transformieren. Die Bruchstücke und Transformationsprodukte werden dann in die Zellen aufgenommen und im Katabolismus und Anabolismus der Mikroorganismen weiter verarbeitet (Burns, 1982; Burns und Dick, 2002; Gianfreda und Rao, 2004;). Wie eingangs beschrieben nehmen insbesondere extrazelluläre Phenoloxidasen und Peroxidasen eine zentrale Rolle beim Abbau der Substanzen ein.

Phenoloxidasen zählen zur Enzymfamilie der Oxidoreduktasen, die Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor nutzen (IUPAC Klassifizierungsnummer: EC 1.10.3). Zu diesen gehören Dioxygenasen und Monooxygenasen, die jeweils ein oder zwei Sauerstoffatome in ihre Substrate einführen können. Wichtige Vertreter dieser Gruppen sind Tyrosinasen, Catecholoxidasen und die größte Gruppe der Phenoloxidasen, die Laccasen (Masai et al., 2007). Laccase wird gemäß der Anzahl der Kupferatome in ihrem katalytischen Zentrum den Multikupfer-Oxidaseproteinen zugeordnet (Hoegger et al., 2006). Zumeist sind vier Kupferatome in ihrem aktiven Zentrum angeordnet, um die stufenweise Oxidation des Substrats mittels der Übertragung vier einzelner Elektronen aus dem Sauerstoff zu gewährleisten. Sauerstoff wird bei diesem Prozess zu Wasser reduziert. Intrazelluläre Laccase katalysiert u.a. den Ligninaufbau, die Melaninsynthese und ist elementar für morphogenetischen Prozessen von Pilzen und ihre antimikrobielle Abwehr (Baldrian, 2006; Eichlerova et al., 2012) Extrazelluläre Laccasen werden von Bakterien aber zumeist von Ascomyceten und Basidiomyceten wie Weißfäule- und Braunfäulepilzen im Boden gebildet und sekretiert, um zusammen mit sekretierten Dehydrogenasen, Chitinasen und Proteasen komplexe organische Substanz wie Huminstoffe und Lignin abzubauen (Kellner et al., 2008; Hobbie und Horton, 2007; Talbot et al., 2008; Courty et al., 2009). Ihre Größe beträgt im Mittel etwa 66 kD, und sie katalysieren Reaktionen bei einem weiten pH- und Temperaturbereich, weil sie durch Glykosylierung geschützt sind (Bugg et al., 2011). Ihre Redoxpotentiale betragen 450 bis 800 mV und sie sind generell in der Lage ein breites Spektrum von Substraten zu oxidieren (Sinsabaugh, 2010). Trotzdem sind ihre Redoxpotentiale zu gering, um direkt die C-C und Etherbindungen der Propanoidmonomere des Lignins aufzuspalten. Dennoch können sie die Oxidation von Lipiden, Phenolen, Benzendiolen und Metallkationen katalysieren und die dabei entstehenden freien Radikale

als Redoxmediatoren nutzen. Diese Mediatoren weisen dann deutlich höhere Redoxpotentiale auf als die Laccasen selbst und können die komplexen Ligninmoleküle spalten (Leonowitc et al., 2001; Camarero et al., 2005). Die Messung der Aktivität von exozellulären Phenoloxidasen in Bodenproben kann u.a. mit dem Substrat ABTS (Chromophor) in einer geeigneten Pufferlösung erfolgen (Floch et al., 2007). ABTS (2,2'-Azinobis(-3ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz), welches einen Mediator für Laccase darstellt, wird von Phenoloxidasen zum Radikalkation ABTS⁺ oxidiert, welches spektrophotometrisch gemessen werden kann. Ein generelles Schema der Reaktion ist in Abbildung 1.5 aufgeführt.

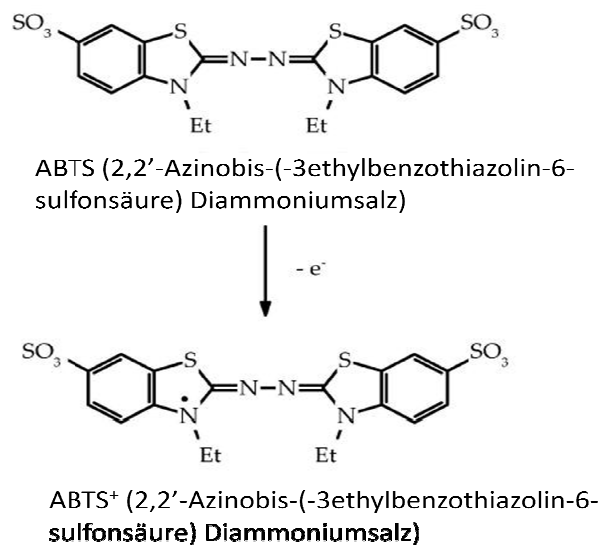


Abb. 1.5: Umsetzung von ABTS (2,2'-Azinobis(-3ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz) zum spektrophotometrisch messbaren Radikalkation ABTS⁺ mittels Oxidation. Et = Ethylgruppe.

Peroxidasen besitzen prosthetische Eisen-Hämgruppen in ihrem katalytischen Zentrum und nutzen Wasserstoffperoxid als Cosubstrat (Burns et al., 2013). Zu ihnen zählen die Gruppen der Lignin-Peroxidasen und Mangan-Peroxidasen. Das für die enzymatische Reaktion benötigte Wasserstoffperoxid wird zumeist von Arylalkoholoxidasen durch Hydrolyse von Carbonylen synthetisiert. Peroxidasen werden zumeist von Pilzen aber auch von Bakterien produziert; sie sind häufig eine Zellantwort auf oxidativen Stress (Rabinovich et al., 2004). Ihre Expression wird wie auch bei Phenoloxidasen von phenolischen Substanzen induziert (Sinsabaugh, 2010). Die Redoxpotentiale von Peroxidasen betragen im Mittel bis zu 1480 mV, sind also deutlich höher als die der Laccasen. Dies befähigt Peroxidasen dazu C-C Bindungen der Propanoideinheiten im Ligninmolekül und anderen Verbindungen direkt, aber auch durch Redoxmediatoren wie Mn³⁺ zu spalten (Higuchi, 1990; Kersten et al., 1990; Rabinovich et al., 2004). Die Messung der Aktivität von Peroxidasen in Bodenproben kann mit dem Substraten L-DOPA oder TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) (Chromophore) in geeigneter Pufferlösung erfolgen (Johnsen und Jacobson, 2008). TMB wird von

Phenoloxidasen und anderen Bodenzymen nicht oder nur vernachlässigbar umgesetzt und gilt somit als sehr sensitives Substrat bei Messungen der Peroxidaseaktivität. Es wird Peroxidasen unter Anwesenheit des Co-Substrats Wasserstoffperoxid zu dem Radikalkation TMB⁺ oxidiert, welches blau gefärbt ist. Parallel wird Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor der Reaktion zu Wasser reduziert. Nach Zugabe von Schwefelsäure wird das Radikalkation zu einem Diimin (3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion) umgewandelt, welches gelblich gefärbt und bei einer Wellenlänge von 450 nm spektrophotometrisch messbar ist (Josephy et al., 1982; Gallati und Pracht, 1985, Rhee et al., 2010). Das Schema der beschriebenen Reaktion ist in Abbildung 1.6 aufgeführt.

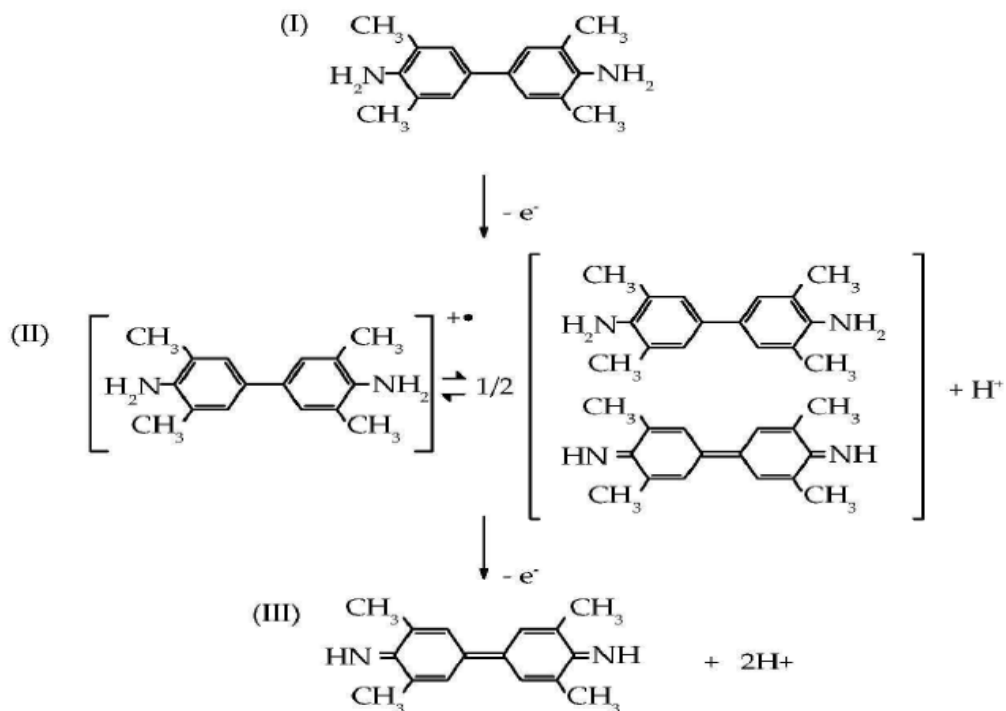


Abbildung 1.6: Schema des Umsatzes von TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) (I) zu seinem Radikalkation TMB⁺ (II) und dessen Reaktion zum Diimin (III) (3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion) unter sauren Bedingungen.

Parallel zu den beschriebenen Abbauprozessen gelten extrazelluläre Phenoloxidasen und Peroxidasen als die Katalysatoren der Kondensation organischer Bodensubstanz und leisten somit einen Beitrag zum Aufbau der Gesamtstruktur der Huminstoffe (Tabatabai, 1994; Piccolo et al., 2002; Dec et al., 2001; Grandy und Neff, 2008; Sinsabaugh, 2010). Der Nährstoffgewinn von Mikroorganismen im Boden durch Abbauprozesse, die von extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen katalysiert werden, und ihre Funktion beim Ab- Um- und Aufbau der organischen Bodensubstanz sowie der Huminstoffe ist in Abbildung 1.7 zusammengefasst.

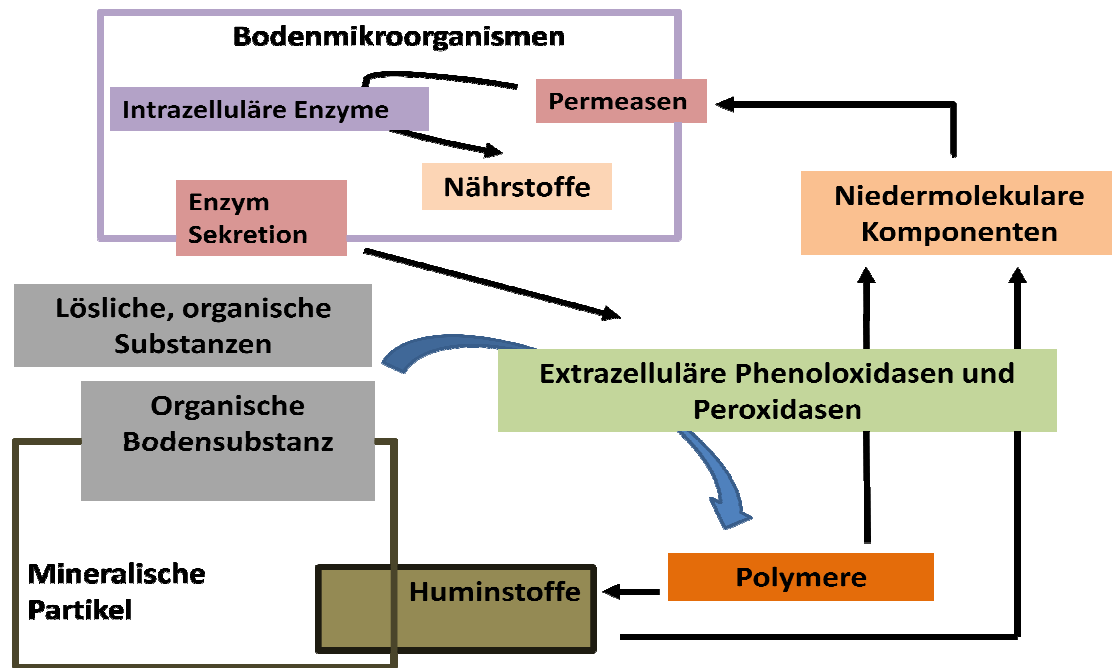


Abb. 1.7: Schema der Reaktionen sekretierter Phenoloxidasen und Peroxidasen in Böden bezüglich Nährstoffgewinn sowie Ab-, Um- und Aufbau organischer Bodenbestandteile. Modifiziert nach Gianfreda und Rao (2004).

Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und der Mitwirkung am Ab-, Um- und Aufbau der organischen Bodensubstanz haben Phenoloxidasen und Peroxidasen auch einen bedeutenden Einfluss auf die Transformation, den Abbau und den Verbleib organischer Xenobiotika in Böden (Bollag et al., 1992; Gianfreda und Rao, 2004; Rabinovich et al., 2004; Magan, 2010; Tuomela und Hatakka, 2011; Eichlerova, 2012). Dieser Aspekt wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.6 Xenobiotika im Boden

Xenobiotika können sich je nach Stoffeigenschaft nach ihrer Aufbringung auf die Agrarflächen verflüchtigen, vom Oberflächenwasser abgetragen und schon in der Luft oder auf Pflanzen- und Bodenoberflächen photochemisch abgebaut werden. Des Weiteren unterliegen organische Pestizide prinzipiell denselben Prozessen, die auch den Ab- und Umbau und Persistenz natürlicher, organischer Substanzen im Boden bestimmen. Demgemäß können sie nach Eintrag in den Boden durch die dort vorherrschenden physikochemische Bedingungen und biologische Einwirkungen transformiert, transloziert und auch von Pflanzen und aufgenommen werden (Führ et al., 1998; Andreu und Pico, 2004). Die Mikroorganismen in Böden können sie – teilweise nur cometabolisch - zwecks einer Energie- und Nährstoffgewinnung bis zu anorganischen Komponenten wie Kohlendioxid abbauen (Mineralisation) und auch zum Aufbau ihrer Biomasse nutzen (Jenkinson und Ladd, 1981; Nowak et al., 2011). Beim abiotischen Abbau der Fremdstoffe können Transformationsprodukte und durch biologischen Abbau Metaboliten gebildet werden, die

folgend wieder sorbiert, verlagert und eingebunden werden können. Des Weiteren können Xenobiotika auch direkt in der wässrigen Bodenphase, nach Desorption von Oberflächen und auch gebunden an gelöstes, organisches Material in tiefere Bodenschichten verlagert werden (Translokation) und bis ins Grundwasser hinein ausgewaschen werden (Versickerung) (Vereecken et al., 2001). Xenobiotika können des Weiteren an verschiedenste Bodenoberflächen schwach und reversibel gebunden werden (Adsorption), aber auch so stark mit diesen interagieren oder inkorporiert werden, dass sie als gebundene Rückstände (GR) im Boden verbleiben und mit der Zeit akkumulieren (Wanner, 2005). Des Weiteren können die extrazellulären Bodenenzyme mikrobiellen und pflanzlichen Ursprungs den Abbau und die Bindung der Fremdstoffe an den Boden katalysieren (Bollag et al., 1992; Gianfreda und Rao, 2004). Die beschriebenen Prozesse laufen im Boden oft simultan ab und werden durch pedologische und klimatische Faktoren zusätzlich beeinflusst (Senesi, 1992).

Das beschriebene Stoffschicksal von Fremdstoffen im Boden kann sowohl in Freilanduntersuchungen als auch unter Laborbedingungen erforscht werden. Im Gegensatz zu den Freilandexperimenten können die Fremdstoffe bei Laboruntersuchungen radioaktiv markiert werden (beispielsweise mittels einer ^{14}C -Markierung im Molekül) und in Versuchsböden inkubiert werden. Eine experimenteller Ansatz mit sterilen Bodenproben ohne gleichzeitige bedeutende Veränderung ihrer physiko-chemischen Bodencharakteristika (Wolf und Skipper, 1994 Trevors und van Elsas, 1995) kann dann im Vergleich zu nicht sterilen Proben genutzt werden, um den biologischen Einfluss und den Metabolismus des Fremdstoffs zu untersuchen. Die radioaktive Markierung erleichtert eine qualitative Bestimmung der extrahierbaren Substanzen mit Radiodetektoren in der Chromatographie. Zusätzlich ermöglicht sie eine Quantifizierung der mineralisierten, extrahierbaren und nicht extrahierbaren Radioaktivität (NER). Diese NER werden quantitativ dem Anteil der gebundenen Rückstände (GR) der jeweiligen Substanz im Boden gleichgesetzt. Eine Identifikation der Strukturchemie der gebundenen Fremdstoffe und eine Erforschung der zugrundeliegenden Bindungsmechanismen bedarf jedoch zusätzlich zahlreicher weiterer Techniken der Aufarbeitung und Analyse (Barriuso et al., 2008). Das Stoffschicksal eines radioaktiv markierten Fremdstoffs im Boden ist schematisch in Abbildung 1.8 aufgeführt.

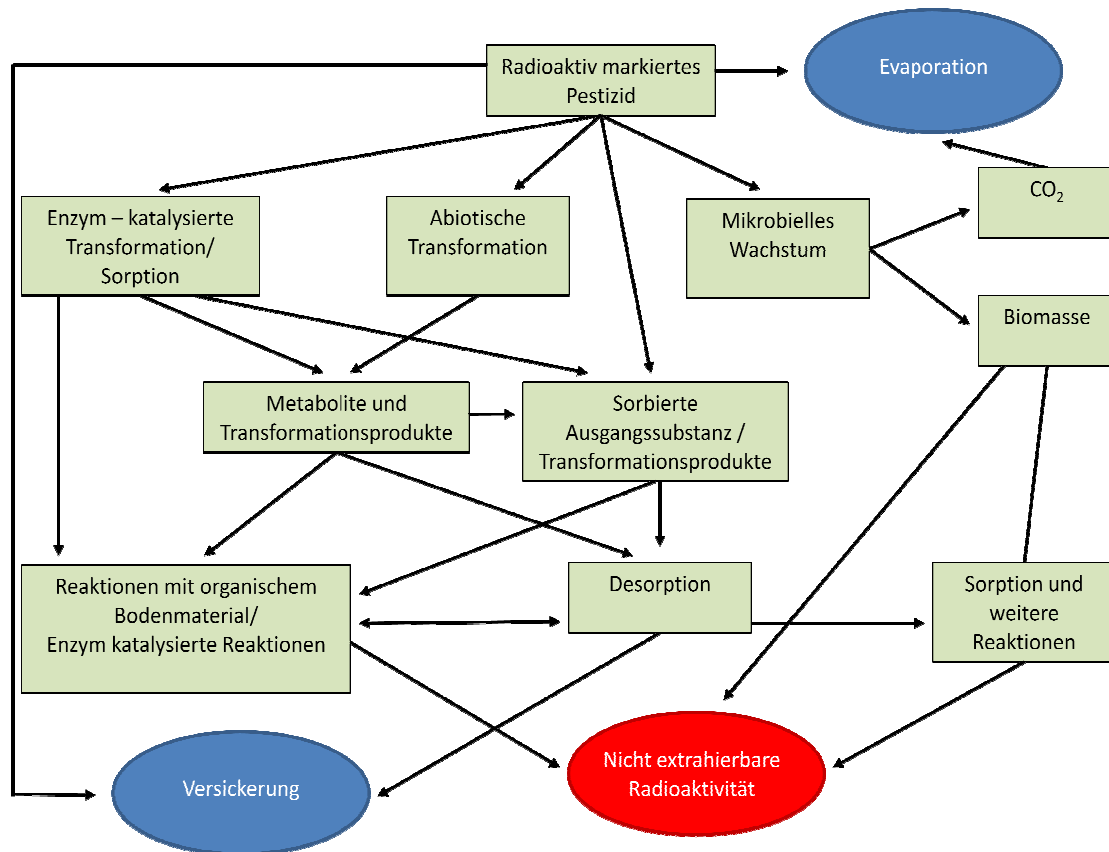


Abb. 1.8: Stoffschicksal eines radioaktiv markierten Pestizids im Boden und darauf Einfluss nehmende Prozesse.

1.7 Die Definition, Bildung und Untersuchung gebundener Rückstände

Wie beschrieben kann eine Inkorporation und kovalente Bindung des Fremdstoffs und seiner Transformationsprodukte an die Bodenmatrix zu irreversiblen Bindungen zwischen den Chemikalien und den Inhaltstoffen des Bodens führen. Dies führt dazu, dass auch nach Extraktion des Bodens mit verschiedensten Extraktionsmitteln und Techniken Anteile der Substanz im Boden verbleiben. Diese nicht extrahierbaren Rückstände sind laut Führ (1998) wie folgt definiert: „Gebundene Rückstände repräsentieren Chemikalien im Boden, Pflanzen und Tieren, die in der Matrix als Ausgangskomponente oder ihrer primären Degradationsprodukte verbleiben“. Ein wesentlicher Aspekt der Definition von nicht extrahierbaren Rückständen im Boden wurde von Calderbank (1989) aufgezeigt, der die gebundenen Rückstände wie folgt definierte: „ Gebundene Rückstände in Böden sind Rückstände eines intakten Pestizids oder seiner Degradationsprodukte, die keine signifikante biologische Aktivität mehr zeigen oder nicht aus dem Boden durch Extraktionsmethoden extrahiert werden können, die die Struktur der Rückstände selbst bei Zerstörung der Bodenmatrix nicht beeinträchtigen“. Hierbei ist wesentlich, dass die genaue Quantifizierung

gebundener Rückstände nur nach erschöpfender Extraktion des Fremdstoffs im Boden möglich ist. Gemäß der vorherrschenden Bodenarten sowie stofflichen Eigenschaften des jeweiligen Fremdstoffs muss also stets eine am besten geeignete Methode zur erschöpfenden Extraktion des Fremdstoffs in der Untersuchung gewählt werden (Northcott und Jones, 2000). Eine verbindliche, generelle Vorgehensweise der Extraktion ist deswegen bislang nicht erfolgt und die Menge an nicht-extrahierbarer Radioaktivität eines radioaktiv markierten Fremdstoffs in Bodensystemen wird wie beschrieben als Maß seines nicht extrahierbaren Anteils angenommen.

Zusätzlich zur Interaktion mit mineralischen Oberflächen im Boden binden organische Pestizide bevorzugt an die organische Bodensubstanz, Ton-Humus-Aggregate und die Tonminerale (Führ et al., 1985; Bollag et al., 1992; Senesi, 1992; Haider und Schäffer, 2000; Riefer et al., 2010; Jablonowski et al., 2009). Dieser Zusammenhang wird dadurch gestützt, dass Xenobiotika und ihre primären Umwandlungsprodukte im Boden häufig funktionelle Gruppen tragen, die identisch zu denen der natürlich vorkommenden organischen Bodenbestandteile sind. Zu diesen zählen Carbonsäuren, Phenole, Chinone, Amide, Amine, Hydroxyl-, Ether-, und Estergruppen (Barraclough et al. 2005). Die verbleibenden gebundenen Rückstände im Boden werden demgemäß oft mit einer Interaktion von Fremdstoffen und Huminstoffen im SOM erklärt (Dankward et al., 1996; Dec und Bollag, 1997; Schmidt et al., 2008; Barriuso et al., 2008; Nowak et al., 2011; Kästner et al., 2013). Die Bindung an die Huminstoffe wird hierbei oft als zweiteiliger Prozess verstanden, bei dem vorerst eine Sorption an die Huminstoffoberfläche erfolgt und die Fremdstoffe anschließend in die molekularen Zwischen- und Hohlräume der Huminstoffe eindringen (Weissenfels, 1992; Haider und Schäffer, 2000). Dieser zunehmende Einschluss (Sequestrierung) und eine stärkere Bindung der Pestizide an die organische Substanz reduziert zunehmend ihre Bioverfügbarkeit und somit ihren Abbau und Translokation, und bedingt ihre Persistenz und Akkumulation im Boden (Agnihotri und Baraoah, 1994; Totsche et al., 1997; Barraclough et al., 2005). In Bezug auf die amphiphilen Strukturen von Huminsäuren und Fulvinsäuren und ihre Aggregation in Micellen innerhalb der Suprastruktur der Huminstoffe wird insbesondere ein Einschluss hydrophober Chemikalien in die Micelleninnenräume begünstigt, welcher die Fremdstoffe vor Abbau schützt und stabilisiert (Engebretson und Wandruszka, 1994; Raber, 1996). Zusätzlich zum Mechanismus der Sequestrierung wird vermutet, dass die Assoziation von Pestiziden an Huminstoffe vor Inkorporation nichtkovalent in Form von ionischen Wechselwirkungen, Kationenaustausch, Wasserstoffbrückenbindungen und Ladungsaustausch erfolgen kann (Senesi, 1992). Des Weiteren können die Fremdstoffe auch kovalent in Form von u.a. Ester-, Ether- und C-C Bindungen an Bestandteile des SOM gebunden werden (Gevao et al. 2000).

Die Form der unterschiedlichen Assoziationen von Fremdstoffen und Huminstoffen mit ihren jeweiligen Bindungsstärken ist in Abbildung 1.9 aufgeführt.

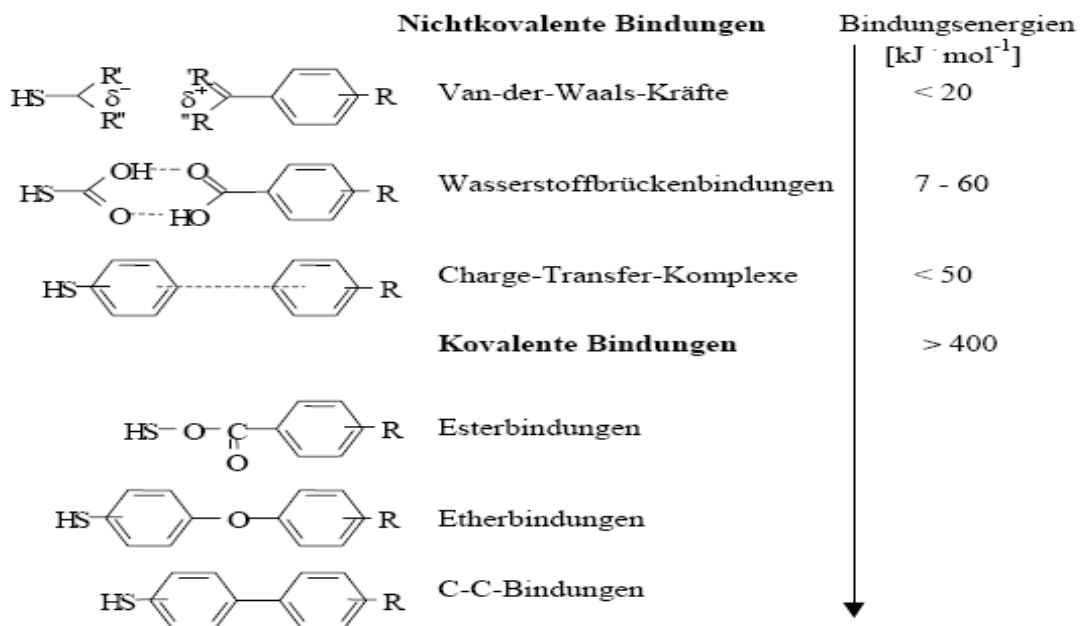


Abb. 1.9: Assoziationsformen zwischen Huminstoffen und Fremdstoffen im Boden mit ihrer jeweiligen Bindungsstärke gemäß Schulze (1998). HS=Huminstoff

Bezüglich der kovalenten Einbindung wird vermutet, dass die Fremdstoffe und ihre Transformationsprodukte ebenso wie natürliches, organisches Material in Böden durch Radikalprozesse wie der oxidativen Kopplung durch Phenoloxidasen und Peroxidasen kovalent eingebunden werden können (Filip und Preusse, 1985; Bollag et al., 1992). Dies wird insbesondere in der Forschung diskutiert, wenn die Pestizide mittels Ester- und Etherbindungen inkorporiert werden (Richnow et al., 1997). Die Identifikation der für diese Einbindung verantwortlichen Enzyme, ihre Lokalisation im Boden und die spezifischen Mechanismen der Einbindung sind jedoch noch nicht erfolgt beziehungsweise noch nicht ausreichend erforscht. Insbesondere ist bisher nicht bekannt in welchem Ausmaß immobilisierte Enzyme im Boden an diesen Prozessen mitwirken.

Ein weiterer Aspekt der Einbindung der Fremdstoffe in das SOM besteht darin, dass Fremdstoffe nach ihrem mikrobiellen Abbau zum Aufbau von Biomasse genutzt werden und in dieser Form folgend als organische Komponente in die Huminstoffe eingebunden werden. Dieser Mechanismus wird als wesentlich für die GR Bildung leicht abbaubarer Fremdstoffe angesehen (Nowak et al., 2011). Dadurch entstandene Rückstände von Fremdstoffen werden als biogene Rückstände bezeichnet. Auch in diesem Prozess können Phenoloxidasen und Peroxidasen eine wichtige Rolle spielen. Dies konnte bereits bei Untersuchungen zum Abbau von halogenen Fremdstoffen und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen im Boden gezeigt

werden konnte (Tuomela, 2011). Generell wird somit den enzymatisch katalysierten Humifizierungsprozessen im Rahmen der Bildung gebundener Rückstände eine große Bedeutung zugemessen (Pignatello und Xing, 1989; Dec et al., 1997; Loiseau und Barriuso, 2002; Miltner et al., 2009) und die Rolle von Peroxidasen und Phenoloxidasen in diesen Prozessen intensiv erforscht.

Aus Sicht der Risikobewertung werden gebundene Rückstände kontrovers diskutiert. Generell kann sich ihr Anteil aufgrund von weiterer Inkorporierung und Bindung im Boden erhöhen. Gleichzeitig kann er aber auch aufgrund einer kontinuierlichen Freisetzung vormals gebundener Anteile absinken. Diese antagonistisch wirkenden Prozesse bedingen letztendlich eine Stabilisierung der nicht extrahierbaren Anteile von Fremdstoffen in Böden und sind schematisch in Abbildung 1.10 aufgeführt.

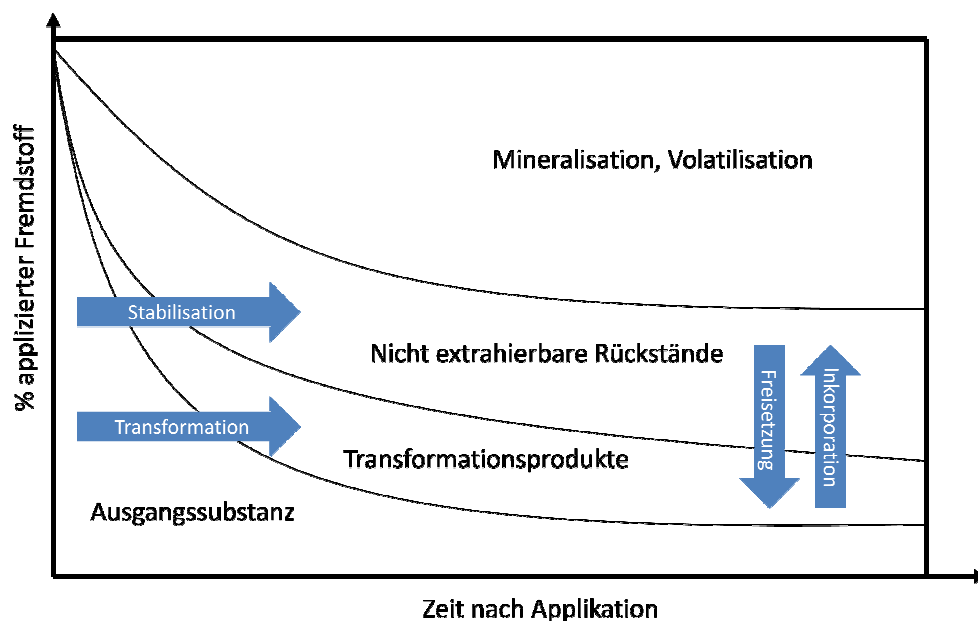


Abb. 1.10: Verbleib einer xenobiotischen Ausgangssubstanz im Boden inklusive ihrer Verweildauer und die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände und darauf Einfluss nehmende Prozesse. Modifiziert nach Barriuso und Benoit (2006).

Somit kommt der Identifikation der gebundenen Substanzen eine große Bedeutung zu, die eine Klassifizierung und Zuordnung der gebundenen Rückstände aus Sicht der Risikobewertung ermöglichen soll. Zusammenfassend lassen sich nicht extrahierbare Rückstände von organischen Fremdstoffen im Boden gemäß der beschriebenen Prozesse in drei Kategorien einteilen: Typ I (Fremdstoffe und primäre Umwandlungsprodukte, die in organischer Substanz und anorganischen Bodenbestandteilen sequestriert sind), Typ II (Fremdstoffe und primäre Umwandlungsprodukte, die kovalent an die organische Substanz gebunden sind) und Typ III (Fremdstoffe, die zu Biomasse durch mikrobiellen Metabolismus umgewandelt und kovalent eingebunden worden sind: biogene Rückstände) (Kästner et al., 2013). In Bezug auf die Umweltproblematik sind nur die Rückstände von Typ I entscheidend,

da sie noch aus xenobiotischer Ausgangssubstanz beziehungsweise primären Metaboliten bestehen, die nicht kovalent gebunden sind und somit remobilisiert werden können. Für Rückstände des Typs II besteht nur geringes Risiko, da sie zwar aus xenobiotischer Substanz bestehen aber irreversibel gebunden sind. Kein Risiko für die Umwelt haben NER des Typs III, da sie biogen sind und somit keine anthropologischen Substanzen mehr beinhalten. Böden können demgemäß also als eine sichere Senke für Schadstoffe aber auch als eine Quelle zukünftiger Kontamination bei Remobilisation nicht-extrahierbarer Anteile aufgrund pedologischer und biogeochemischer Prozesse angesehen werden. Dementsprechend bilden die Identifizierung gebundener Rückstände und vor allem die Aufklärung der zugrundeliegenden Einbindungsmechanismen einen zentralen Aspekt der Umweltforschung und Risikobewertung. Bislang erfolgt eine Zulassung von neuartigen Pestiziden wenn diese nach Inkubation in Voruntersuchungen nicht mehr als 70 % gebundene Rückstände bilden und sich nicht weniger als 5 % Mineralisation ergibt.

In der aktuellen Forschung werden die GR u.a. unter Einsatz invasiver Techniken untersucht. Hierbei sollen vormals gebundene Fremdstoffe von der Bodenmatrix gelöst werden, um sie folgend mittels Chromatographie und Spektrometrie zu identifizieren (Dec und Bollag, 1997). Dieser Ansatz wird als Lösungs- und Identifikationsansatz beschrieben (engl.: release and identify) (Northcott und Jones, 2000). Es werden hierfür verschieden Chemikalien genutzt, um sequentiell und spezifisch Bindungen unterschiedlicher Stärke zwischen dem Fremdstoff und der Matrix zu spalten. Ein solches Verfahren ist beispielsweise die sequentielle Degradation mittels alkalischer Hydrolyse mit Methanol und Kaliumhydroxidlösung (Northcott und Jones, 2000, Riefer et al., 2010), eine Behandlung mit Bortribromid (Richnow et al., 1997), Rutheniumtetroxid sowie eine finale Pyrolyse des Matrixmaterials (Schulten und Leinweber, 1996, Riefer et al., 2010). Des Weiteren nutzen Haider et al. (2000) die Trimethylsilylierung, um verschieden funktionelle Gruppen in Huminstoffen, wie beispielsweise Hydroxylgruppen, durch Trimethylsilylgruppen zu derivatisieren (bei Hydroxylgruppen resultieren so Trimethylsilylester). Dadurch wurde die Huminstoffstruktur in nichtkovalent oder z.B. über Wasserstoffbrücken gebundene Fragmente zerlegt, und eine Freisetzung von rein physikalisch inkorporierten Fremdstoffen und ihre Analyse ermöglicht. Kovalent gebundene Xenobiotika (z.B. über Ester-, Ether oder Amidbindungen) können durch Trimethylsilylierung nicht freigesetzt werden; allenfalls könnten nachfolgend, z.B. spektroskopisch, kleinere Huminstofffragmente und kovalent an diese gebundene Fremdstoffmoleküle in ihrer Struktur untersucht werden. Generell ist jedoch bei jeder dieser Techniken zu erwähnen, dass sie eine – abhängig von der Reaktivität der eingesetzten Reagenzien - mögliche Zerstörung des Huminstoffmoleküls und auch der Fremdstoffe selbst bewirken können und folgend identifizierte Metaboliten erst aufgrund der Methode an sich entstanden sein können, also Artefakte der Aufarbeitung darstellen (Northcott und Jones,

2000). Dabei ist die Trimethylsilylierung als die schonendste Methode anzusehen, wobei es allerdings auch hierbei zu einer Desintegration von größeren Huminstoffaggregaten durch Aufhebung nicht-kovalenter Bindung zwischen verschiedenen Huminstoffmolekülen kommt.

Zusätzlich zu den Degradationstechniken werden im Anschluss an eine Extraktion mit organischen und wässrigen Lösungsmitteln und eine konventionelle Huminstoff-Fraktionierung auch Techniken, wie die Größenausschlusschromatographie von z.B. Fulvinsäuren (Junge et al. 2012) und nicht invasive Techniken wie die Fluoreszenzspektroskopie und Nuklearmagnetresonanzspektroskopie genutzt (Northcott und Jones, 2000).

1.8 Die Modellchemikalie Metalaxyl

Metalaxyl [N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl) alanin-methyl ester] wird weltweit als systemisches Fungizid zur Bekämpfung von falschem Mehltau, der Kraut- und Knollenfäule sowie der Wurzel, Stängel und Fruchtfäule bei vielen Anbaupflanzen eingesetzt (Sukul et al., 2013). Zu den mit Metalaxyl behandelten Pflanzen zählen unter anderem Kartoffeln, Tabak und Weinreben (Buerge et al., 2003). Nach Aufnahme über die Wurzeln, den Stängel oder die Blätter wird der Wirkstoff akropetal in die gesamte Pflanze transportiert (Monkiedje et al. 2002). Die Wirkung von Metalaxyl erfolgt vornehmlich gegen Pilze der Ordnung *Peronosporales* (Sharma und Awasthi, 1997). Der Wirkstoff wurde im Jahre 1977 erstmals eingeführt und ist zum Beispiel Wirkbestandteil der kommerziell vertriebenen Fungizidlösung Ridomil® (Dureja et al., 2000). Metalaxyl hat sowohl protektive, kurative und eradikative Wirkung und wird entweder auf die Blätter der Nutzpflanzen, auf Saatgut oder auf Ackerboden appliziert (Fernandes et al., 2003). Der Wirkstoff unterdrückt die Ausbildung von Sporangien des Pilzes sowie sein Myzelwachstum (Hamilton, 2004). Der biologische Hintergrund des Wirkungsmechanismus von Metalaxyl blieb noch einige Jahre nach Zulassung ungeklärt. Erste Hinweise ergaben sich auf eine Wirkung im RNA Stoffwechsel der Pilzzellen durch Untersuchungen von Kerkenaar (1981) und Fisher und Hayes (1982). Anschließend konnte aufgeklärt werden, dass Metalaxyl die ribosomale RNA-Polymerase I inhibiert und insbesondere der Einbau der Base Uridin in die rRNA unterdrückt wird (Hassal, 1990; Gisi und Cohen, 1996; Marucchini und Zadra, 2002). Die Inhibition hat somit eine Blockierung der Proteinbiosynthese und ein sistierendes Myzelwachstum zur Folge (Börner et al., 2009). Metalaxyl wirkt also an nur einem Zielort des Zellstoffwechsels der Schadorganismen: RNA-Polymerase I. Die Wirkung an nur einem Ort im Zielorganismus (engl.: one site activity) kann Resistenzentwicklungen gegenüber dem Fungizid fördern. Dementsprechend wurden bereits zunehmend Resistenzen gegenüber Metalaxyl beim Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel, *Phytophthora infestans* beobachtet (Fontem et al., 2005). Der Wirkstoff wird aktuell oft nur noch in Kombination mit

anderen fungiziden Wirkstoffen wie Carboxin, Captan und Mancozeb eingesetzt (Sukul und Spittler, 2000). Metalaxyl ist ein chirales Fungizid, dessen fungizide Wirkung vor allem auf das R(-) Enantiomer zurückzuführen ist (Bürge et al., 2003; Chen und Liu, 2009). Aus diesem Grund wird Metalaxyl seit dem Jahr 2005 in vielen Ländern auch zunehmend weniger als Racemat eingesetzt, sondern durch Produkte mit angereichertem R(-) Enantiomer (Mefenoxam) ersetzt (Park et al., 2005). Mefenoxam besteht üblicherweise aus 97,5 % R(-) Metalaxyl und 2,5 % S(+) Metalaxyl. Die chemische Struktur beider Konfigurationsisomere des Metalaxyl ist in Abbildung 1.11 aufgeführt.

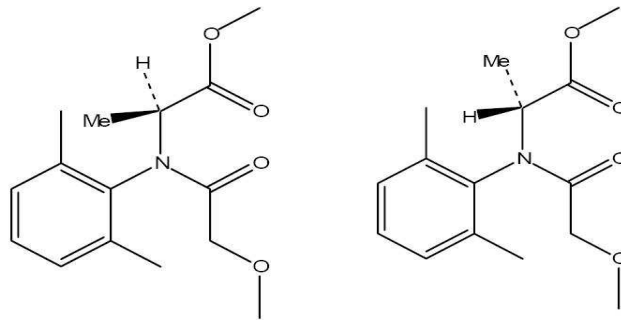


Abb. 1.11: Die chemische Strukturen von S (+) Metalaxyl (links) und R (-) Metalaxyl (links) mit fungizider Wirkung.

Die Anwendung von Produkten mit R(-) Enantiomer als Wirkstoff wie beispielsweise Ridomil gold, Fongamil gold und Apron XL, gewähren eine gleiche Wirkungseffizienz wie das Racemat bei einer deutlich reduzierten Aufwandmenge (Monkiedje et al., 2002). Die molekulare Masse von Metalaxyl beträgt 279,33 g/mol (Summenformel: $C_{15}H_{21}NO_4$), und es gilt als chemisch stabil bei einem breiten pH Bereich. Der Wirkstoff gilt als hydrolysestabil in einem pH Bereich von 1 bis 7,5 bei 20 °C. Des Weiteren gilt er als stabil bei einem breiten Temperatur,- und Wellenlängenbereich (Singh und Tripathi, 1982; Bürge et al., 2003). Der Dampfdruck der kaum volatilen Substanz liegt bei $3,5 \times 10^{-5} \text{ Pa} \times \text{m}^3 \times \text{mol}^{-1}$ und ihre Löslichkeit in Wasser beträgt 26 g/L bei 25 °C unabhängig vom vorherrschenden pH Wert. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von Metalaxyl liegt bei 1,65 bei pH 7 und 20 C. Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 71-72 °C und ihr Siedepunkt bei 295,9 °C bei 760 mm Hg (Datenbank der Universität von Hertfordshire; Pesticide Properties Database Hertfordshire, 2013).

Die Toxizität von Metalaxyl wird als sehr gering bis nicht toxisch für die meisten Arthropoden und Vertebraten beschrieben. Der LD_{50} nach orale Aufnahme von Raten liegt bei mehr als 566 mg pro Kilogramm Körpergewicht (Gestis Stoffdatenbank (IFA); 2013). Sein Verbleib in der Umwelt kann jedoch aufgrund hoher Aufwandmengen von bis 8,97 kg/ha in der Landwirtschaft problematisch sein (Triantafyllidis et al., 2013).

Als Feststoff liegt Metalaxyl als weißes, kristallines Pulver vor und es kann durch Einwirkung von Licht einer Wellenlänge von 254 und 290 nm photolytisch zerfallen. Dabei entsteht durch Abspaltung einer Methylgruppe am Metalaxyl-Molekül das primäre Transformationsprodukt N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alaninpropionsäure (Sukul et al., 1992) welches als Metalaxylsäure bezeichnet wird. Diese stellt ein chirales Molekül dar (Buser, 2002). Die chemische Struktur der Metalaxylsäure ist in Abbildung 1.12 aufgeführt.

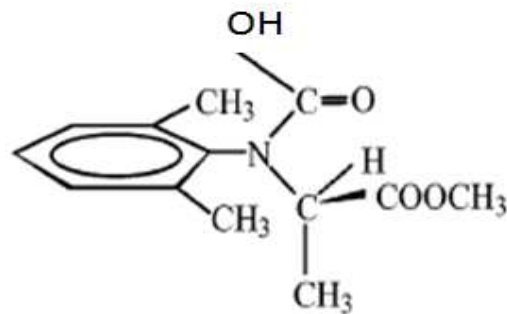


Abb. 1.12: Chemische Struktur von Metalaxylsäure N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alaninpropionsäure

Die Biodegradation von Metalaxyl in Pflanzen, Tieren und im Boden erfolgt gemäß Roberts und Hutsons (1999) durch Esterspaltung und folgende oxidative Biotransformationen wie eine N-Dealkylierung, sowie eine Alkyl- und Arylhydroxylation. Das Haupttransformationsprodukt von Metalaxyl im Metabolismus von Pflanzen und Tieren sowie bei seinem Abbau im Boden ist ebenfalls die Metalaxylsäure (Monkiedje et al., 2002; Pesaro et al., 2004; Baker et al., 2010). Diese wird als nicht mehr toxisch eingestuft (EU Commission Health Consumer Directorate; 2010).

Im Boden korreliert der Abbau von Metalaxyl hauptsächlich als Biodegradation (Bailey und Coffey, 1986; Droby und Coffey, 1991), wobei jedoch nur geringe Anteile der Substanz mineralisiert werden (Sukul und Spitteller, 2001;a; Sukul, 2006; Spessoto et al., 2006). In zahlreichen Studien wurde zudem erforscht, dass der Abbau von Metalaxyl in Böden enantioselektiv erfolgt, wobei je nach Bodentyp- und Herkunft der pH-Wert im Bodensystem, sowohl seine Redoxverhältnisse als auch die Zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft für einen schnelleren Abbau des R(-) - beziehungsweise des S(+) Enantiomers verantwortlich sind (Buser et al., 2002, Bürge et al., 2003; Monkiedje et al., 2007). Das S(+) Enantiomer wurde in anaeroben Böden und aeroben Böden ($\text{pH} \leq 4$) und das R(-) Enantiomer wurde in aeroben Böden ($\text{pH} \geq 5$) schneller abgebaut (Celis et al., 2013). Die Prozesse, die den enantioselektiven Abbau von Metalaxyl in Böden mit gleichem pH Wert verursachen, sind noch nicht hinreichend erforscht (Celis et al., 2013). Einen

Zusammenhang des enantioselektiven Abbaus der Substanz mit der Zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft konnte von Pesaro et al. (2004) gezeigt werden. Diese Forschergruppe beobachtete eine Veränderung der Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft durch Trocken- und Wasserstress im Bodensystem, die in unterschiedlichen Abbauraten der Enantiomere resultierte.

Es konnte zudem aufgezeigt werden, dass auch abiotische Faktoren im Boden abseits des Lichteinflusses einen Abbau des Fungizids bewirken konnten (Sukul und Spiteller, 2001;b; Baker et al., 2010). Beispielsweise wurde Metalaxylsäure auch in sterilisierten Böden als Transformationsprodukt identifiziert (Pesaro et al., 2004; Baker et al., 2010).

Obwohl Metalaxyl eines der meist genutzten Fungizide weltweit darstellt, ist immer noch wenig über sein Sorptionsverhalten in Böden bekannt (Sukul et al., 2013). Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit des Fungizids (Petrovic et al., 1996) besitzt Metalaxyl im Boden jedoch hohe Mobilität. Die geringe Interaktion der Substanz mit den Bodenoberflächen führt zu rascher Desorption und Auswaschung in tiefere Bodenschichten und das Grundwasser (Sukul und Spiteller, 2000; Sukul et al. 2013; Triantafyllidis et al., 2013).

Es wurde jedoch erforscht, dass die Substanz in Böden mit hohem Tongehalt und hohem organischen Anteil an diese Bestandteile der Bodenmatrix adsorbiert und dann zum Großteil in den ersten 5 cm der Bodenschicht verbleibt (Sukul et al., 2013). Eine Adsorption an mineralische Bodenoberflächen wurde von Sukop und Cogger (1992) beobachtet und auf Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Fungizid und den Bodenoberflächen zurückgeführt (Sharma und Awasthi, 1997).

Gemäß einer Studie von Sukul und Spiteller (2001,a) verblieb ein großer Anteil von appliziertem ¹⁴C-Metalaxyl in verschiedenen Böden aus Indien als nicht extrahierbare Radioaktivität (bis zu 47 % der applizierten Menge). In dieser Studie wurde Metalaxylsäure als Haupttransformationsprodukt von Metalaxyl aus den Böden extrahiert und eine Korrelation der Halbwertszeit von Metalaxyl mit dem Tongehalt beobachtet. In einer weiteren Bodenstudie von Papini und Andrea (2001) wurden nach 63 Tagen Inkubation 48 % der applizierten Substanz als nicht extrahierbar bestimmt. Das Potential zur Bildung nicht extrahierbarer Anteile im Boden wurde gemäß Barriuso et al. (2008) bestätigt, welche die nicht extrahierbaren Anteile von Metalaxyl durchschnittlich auf maximal 63 bis 73 % nach 82 Tagen Inkubation angegeben. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Bildung und Zusammensetzung nicht extrahierbarer Rückstände des Fungizids im Boden noch nicht hinreichend erforscht ist. Insbesondere die Beteiligung von Phenoloxidasen und Peroxidasen an diesen Prozessen wurde noch nicht hinreichend untersucht (Botterweck et al., 2014).

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die vorliegende Studie ist Teil eines Schwerpunktforschungsprogramms der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Im Fokus der interdisziplinären Forschung durch die DFG stehen die biogeochemischen Bodenoberflächen (engl.: Biogeochemical interfaces), die elementar für die beschriebenen Prozesse der Bodenentwicklung sind, und die treibende Kraft entscheidender Ökosystemfunktionen wie Pflanzenproduktivität und Wasserqualität darstellen (Totsche et al., 2010). Das Schwerpunktprogramm soll die Struktur dieser Oberflächen sowie die dort lokalisierten biologischen und physiko-chemischen Prozesse und ihre Interdependenzen erforschen. Dem Transport und dem Schicksal von Nährstoffen als auch organischen Fremdstoffen im Ökosystem Boden kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Verschiedenste Forschergruppen aus Teilgebieten der Physik, Chemie und Biologie arbeiten unter Einsatz und Entwicklung neuester Techniken zusammen, um den gestellten Aufgaben gerecht zu werden. Verschiedene Versuchsböden, zum Beispiel der in dieser Studie verwendete Boden aus Ultuna in Schweden, und Modellchemikalien, wie das in dieser Arbeit genutzte Metalaxyl, werden innerhalb des Schwerpunktprojektes hinsichtlich verschiedenster Aspekte untersucht.

Die vorliegende Studie soll neue Erkenntnisse über den Verbleib und das Schicksal der ¹⁴C-radioaktiv markierten Modellchemikalie Metalaxyl in einem Versuchsboden aus Ultuna in Schweden erbringen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Erforschung des Zusammenhangs der mikrobiellen Aktivität und dem Einfluss extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die Bildung kovalent gebundener Rückstände des Fungizids im Bodensystem. Eine Differenzierung der Effekte lebender Mikroorganismen und der unterschiedlich lokalisierten Bodenenzyme sowie auch abiotischen Einflüssen durch beispielsweise mineralische Bodenoberflächen sollte mit mehreren Verfahren zur Sterilisation des Bodens in dieser Studie ermöglicht werden. Dadurch sollte erstens ermittelt werden, ob die beiden Enzymfamilien zur NER Bildung beitragen und den Fremdstoff und oder seine Transformationsprodukte im Boden kovalent binden. Zweitens sollte es ermöglicht werden, das Ausmaß des Beitrages von mikrobieller Aktivität, extrazellulärer Enzymaktivität und abiotischer Faktoren auf die NER Bildung selektiv zu bestimmen. Drittens sollten neue Erkenntnisse über den Metabolismus von Metalaxyl im Boden gewonnen werden. Viertens sollte die vorliegende Studie Hinweise erbringen, ob insbesondere immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen die NER Bildung bedingen. Letztendlich sollten die gebundenen Rückstände identifiziert werden, um Informationen über die Risikobewertung von Metalaxyl im Boden zu gewinnen und einen enzymatischen Einfluss auf ihre Bildung nachzuweisen. Diese Erkenntnisgewinne sollten sowohl mit sterilen und nicht sterilen Gesamtbodensystemen als auch isolierten Partikelgrößenfraktionen, die

mit ^{14}C -Metalaxyl für verschiedene Zeiträume inkubiert werden, ermöglicht werden. Der Einsatz konventioneller Techniken wie der Partikelgrößenfraktionierung und die Huminstoff-Fraktionierung sollten hinsichtlich des Forschungsschwerpunkts der Studie bewertet werden und eine geeignete Extraktionstechnik etabliert werden. Zusätzlich sollten Bodenproben mit immobilisierter Laccase und ^{14}C -Metalaxyl versetzt werden, um zu untersuchen, ob insbesondere immobilisierte Laccase als Vertreter der Enzymfamilie der Phenoloxidasen einen Haupteinfluss auf die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände hat. Der Einfluss der oxidativen Kopplung auf die Einbindung von ^{14}C -Metalaxyl an einen typischen, monomeren Bestandteil von Huminstoffen (Resorcinol) und an Huminstoff-Fractionen des Bodens sollte zusätzlich in *in vitro* Studien in Modellsystemen nachgewiesen werden.

Generell soll durch die vorliegende Arbeit ein Beitrag dazu geleistet werden, das Stoffschicksal von Fremdstoffen im Boden besser zu verstehen, um der Umweltproblematik aufgrund ihres Eintrags in die Umwelt entgegenzutreten und Strategien für zukünftige umweltschonendere Pflanzenschutzmittel zu ermöglichen.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Radiochemikalie

¹⁴C-markiertes Metalaxyl:

Institute of Isotopes, Hungary

[N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)
alanin-methyl ester]

uniform, ¹⁴C-ringmarkiert, gelöst in Methanol

Spezifische Aktivität: 4,13 MBq/mg ,

radioanalytische Reinheit ≥ 99,9 %

2.1.2 Referenzsubstanzen

Metalaxyl,
Augsburg

Dr. Ehrendorfer GmbH,

[N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)
alanin-methyl ester]

Reinheit 98,7 %

Metalaxylsäure,

aus eigener Synthese

N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)
alanin propionic acid

(siehe Abschnitt 3.1)

Reinheit ≥ 99 %

2.1.3 Chemikalien zur quantitativen Bestimmung des Radioisotops

Oxysolve C – 400

Zinsser Analytic, Frankfurt a.M.

Szintillationscocktail Lumasafe™ plus

Perkin Elmer, Rodgau

Standard für Oxidizer Messungen:

Spec-Chec ¹⁴C for sample Oxidizer (9,56*10⁵ dpm/mL)

Perkin Elmer, Rodgau

2.1.4 Organische Lösungsmittel

Alle für die hier dargestellten Studien verwendete Lösungsmittel, mit Ausnahme der Lösungsmittel für die Analytik mittels HPLC und DC, waren p.a. reinst. oder 1-mal destilliert.

HPLC Lösungsmittel

| | |
|--|----------------------|
| Acetonitril Rotisol [®] , HPLC gradient grade | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol, HPLC gradient grade | Merck, Darmstadt |

DC Lösungsmittel

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Ethylacetat, HPLC gradient grade | Merck, Darmstadt |
|----------------------------------|------------------|

2.1.5 Sonstige Chemikalien

| | |
|---|--------------------------|
| Ameisensäure, ≥ 98 % | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure, ≥ 99,8 % | Riedel-de Haën, Seelze |
| Salzsäure, 37 % | VWR, Belgien |
| Schwefelsäure, 95-97 % | Riedel-de Haën, Seelze |
| Maleinsäure, ≥ 99 % | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Borsäure (pur) | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid, ≥ 99 % | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfid, ≥ 99 % | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydroxid | Riedel-de Haën, Seelze |
| Natriumsulfat, ≥ 98 % | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid, ≥ 98 % | Riedel-de Haën, Seelze |
| Zitronensäure (Monohydrat) | Appli Chem, Darmstadt |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan, ≥ 99 % | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Tetrahydrofuran | Merck, Darmstadt |
| Lithiumhydroxid (Monohydrat) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tri-Natriumcitrat-2-hydrat, ≥ 99 % | Merck, Darmstadt |
| 2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] - diammonium-Salz, ≥ 98 % | Sigma Aldrich, Steinheim |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin- Liquid Substrat- System | Sigma Aldrich, Steinheim |

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| Kaliumdichromat | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Eisensulfat | Merck, Darmstadt |
| O-Phenanthrolin | Merck, Darmstadt |
| Sauerstoff 5.0 | PraxAir, Düsseldorf |
| Stickstoff 5.0 | PraxAir, Düsseldorf |
| Helium 5.0 | PraxAir, Düsseldorf |
| Natronkalk, gekörnt, 3-5 mm | Carl Rot, Karlsruhe |
| Alginat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Resorcinol | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Huminsäuren, technisch | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Ergosterol | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Aceton, technisch | VWR, Belgien |
| Ethanol, technisch | VWR, Belgien |
| n-Hexan | Institut Biologie V, RWTH Aachen |
| Dichlormethan | Institut Biologie V, RWTH Aachen |
| Zellulose | Merck, Darmstadt |
| Kupfer(II)Sulfat-Pentahydrat | Merck, Darmstadt |
| Quecksilberchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt |
| Phenylhydrazin, 97 % | Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Chloroform (alkoholfrei) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |
| BSA (Bovine serum albumin) | Sigma Aldrich, Steinheim |

2.2 Puffer und Lösungen

Alle in dieser Studie verwendeten Puffer und Lösungen wurden in Glasgefäßen angesetzt, die vor Benutzung sterilisiert wurden (120 °C, 20 Minuten).

2.2.1 Verwendeter Puffer zur Isolation von Mikroorganismen aus dem Versuchsboden

| | |
|---------------------------|--------------|
| Dinatriumhydrogenphosphat | 0,2 % (v/v) |
| Reinstwasser | 99,8 % (v/v) |

2.2.2 Verwendeter Puffer bei der photometrischen Messung der extrazellulären Phenoloxidaseaktivität

Stammlösung MUB (Modified Universal Buffer) Puffer

| | |
|--------------------------------|------------------------|
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 12,11 g/L |
| Malonsäure | 11,6 g/L |
| Zitronensäure | 14 g/L |
| Borsäure | 6,3 g/L |
| NaOH | 19,47 g/L |
| Wasser | auf 1000 mL aufgefüllt |

Messlösung MUB (Modified Universal Buffer) Puffer (pH 5)

| | |
|-----------------|------------------------|
| Stammlösung MUB | 200 mL |
| Wasser | auf 1000 mL aufgefüllt |

Auf pH 5 mit HCl konz. eingestellt.

2.2.3 Verwendeter Puffer bei der photometrischen Messung der extrazellulären Peroxidaseaktivität

Natriumacetatpuffer (0,2M, pH 5)

| | |
|----------------|---------|
| Eisessig | 3 g |
| Natriumchlorid | 6,966 g |
| Wasser | 900 mL |

Auf pH 5 mit HCl konz. eingestellt.

2.2.4 Verwendeter Puffer bei der Inkubation von Resorcinol, Huminsäuren, Huminstoff-Fraktionen und oxidativen Enzymen mit ¹⁴C-Metalaxyl *in vitro*

Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| Natriumchlorid | 8,76 g/L |
| Dinatriumhydrogenphosphat | 7,98 g/L |
| Reinstwasser | auf 1000 mL aufgefüllt. |

2.2.5 Verwendete Puffer zur Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehalts mittels nasser Oxidation

1 N K₂Cr₂O₇ (Kaliumdichromat) Lösung

| | |
|-----------------|-------------------------|
| Kaliumdichromat | 49 g |
| Reinstwasser | auf 1000 mL aufgefüllt. |

0,4 N FeSO₄ (Eisensulfat) Lösung

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| Eisensulfat | 112 g |
| Schwefelsäure (konz.) | 15 mL |
| Reinstwasser | 800 mL |
| Reinstwasser | auf 1000 mL aufgefüllt. |

2.3 Wachstumsmedien

Im Folgenden sind die Medien angegeben, die zur Kontrolle einer erfolgreichen Sterilisation von Bodenmaterial in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Alle Medien wurden vor Einsatz in die Experimente autoklaviert (1 bar, 120 °C) und in autoklavierten Glasgefäßen angesetzt.

Standard Nährmedium 1 (pH 7,5)

| | |
|-------------|------------------------|
| Pepton | 15 g/ L |
| Hefeextrakt | 3 g/L |
| NaCl | 6 g/L |
| Glucose | 1 g/L |
| Wasser | auf 1000 mL aufgefüllt |

Czapek-Dox-Medium (pH 7,3)

| | |
|--|------------------------|
| Saccharose | 30 g/L |
| NaNO ₃ | 3,0 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 1, 0 g/L |
| MgSO ₄ (7 H ₂ O) | 1,0 g/L |
| FeSO ₄ (7 H ₂ O) | 0,0180 g /L |
| Agar | 13 g/ L |
| Wasser | auf 1000 mL aufgefüllt |

2.4 Enzyme

| | |
|--|--------------------------|
| Laccase aus <i>Trametes versicolor</i> , ≥ 10 Units/mg | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Enzyme Commission Number (EC Nummer) 1.10.3.2 | |
| Lignin-Peroxidase | Sigma Aldrich, Steinheim |
| ≥ 0,1 Units/mg | |

2.5 Verbrauchsmaterial & Zubehör

| | |
|--|--|
| Hamilton Dosierspritzen (50, 100, 200, 500 µL) | Hamilton, Bonaduz, CH |
| Hamilton Auftragsspritze DC (100, 500 µL) | Camag, Berlin |
| Membranfilter Polyamid (0,2 µm 25 mm ø NL 16) | Schleicher und Schuell, Dassel |
| Einmalfilter, Chromafil (CA 45/25, 0,45 µm Pore) | Macherey-Nagel, Düren |
| Einwegspritzen (2, 10 mL) | B. Braun, Melsungen |
| Einmalinjektionskanülen Sterican | B.Braun, Melsungen |
| Parafilm | Pechiny Plastic Packaging, Menasha, USA |
| Soxhlet Extraktionshülsen (22 x 180 mm) | Macherey-Nagel, Düren |
| Einmal Küvetten PMMA, 1,5 mL halbmikro (12,5 x 12,5 x 45 mm) ,Plastibrand | Sigma Aldrich, Steinheim |
| DC Fertigplatten (S/L G-25, UV 254) | Macherey-Nagel, Düren |
| DC Fertigplatten (S/L G-100, UV 254) | Macherey-Nagel, Düren |
| HPLC Probengläser (2 mL) | Chrom.Service, Eschweiler |
| Szintillationsvials (groß) | |

| | |
|---|--------------------------------|
| Super Polyethylene Vials (20 mL) | Perkin Elmer, Rodgau |
| Szintillationsvials (klein) | |
| Pocto-Vial ISC (6 mL) | Lumac-LSC, Groningen, NL |
| Polyamid Präzisionssiebgewebe (Maschenweite 60 µm) | VWR, Darmstadt |
| Rundfilter (70 mm ø, 589) | Schleicher und Schuell, Dassel |
| Petrischalen (94 x 16 mm, Plastik) | VWR, Darmstadt |
| Mikroliterpipetten (10, 20, 50, 200, 1000 µL) | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Verbrennungshütchen (Zellulose, für Oxidizer) | Canberra-Packard, Zürich, CH |
| Whatman Papier (Typ 675) | Macherey-Nagel, Düren |
| Eppendorfreaktionsgefäße (Eppis); (1,5, 2 mL) | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Zentrifugenröhrchen BD (Falconreaktionsgefäß); (15, 50 mL) | VWR, Belgien |
| Seesand (gereinigt, gegläht; 1,4 kg/L Schüttdichte) | Merck, Darmstadt |
| Zentrifugenbecher (250 mL) | Beckman Coulter, Krefeld |
| Einmal Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µL) | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Faltenfilter (90 mm ø, 615) | Macherey-Nagel, Düren |
| pH Indikatorpapier (pH 0-14, Universalindikator) | VWR, Darmstadt |
| Schottglasflaschen (50, 250, 500, 1000 mL) | VWR, Darmstadt |
| Rundkolben (250, 500 mL) | VWR, Darmstadt |
| Spitzkolben (10, 50, 250 mL) | VWR, Darmstadt |
| Messzylinder (geeicht, 50, 100, 250, 500 mL) | VWR, Darmstadt |
| Messbürette (25 mL, Glasküken) | VWR, Darmstadt |
| Scheidetrichter (50, 100, 500 mL, PTFE Küken) | VWR, Darmstadt |
| Braunglasgefäße (50 mL) | VWR, Darmstadt |
| Glaswolle (Typ N) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Micropore Medical Tape (3 M Plus Tape, 1532-1) | VWR, Darmstadt |
| Glaspipetten (1, 10, 20, 25 mL) | VWR, Darmstadt |
| Mörser (250 mL, unglasierte Reibefläche) | VWR, Darmstadt |
| Pistill (rauhe Reibefläche, 125 mm) | VWR, Darmstadt |

2.6 Verwendete Geräte

2.6.1 Verwendete Geräte bei der Probenaufarbeitung

Tab. 2.1: Verwendete Geräte und Zubehör bei der Probenaufarbeitung.

| Gerätetyp | Bezeichnung | Firma |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Magnetrührer 1 | IKA-Combimag REO | Janke&Kunkel GmbH, Staufen |
| Magnetrührer 2 | IKA-Combimag RET | Janke&Kunkel GmbH, Staufen |
| pH Meter | Five easy pH FE20 | Mettler Toledo AG, Gießen |
| pH Elektrode | LE409 pH | Mettler Toledo AG, Gießen |
| Rotationsverdampfer 1 | Ika Dest RV 05 | Janke&Kunkel GmbH, Staufen |
| Wasserbad | n.a. | Büchi |
| Vakuumpumpe | 113042 | Ilmvac GmbH |
| Pumpensteuerung | 600037 Vacuum Controll Box | Ilmvac GmbH |
| Rotationsverdampfer 2 | iKA DEST RV05 | Janke&Kunkel GmbH u. Co KG |
| Wasserbad | B 471 Oil Bath | Büchi, Flawil, CH |
| Vakuumpumpe | Membranpumpe | Vacuumbrand GmbH, Wertheim |
| Steuereinheit | CVC24 | Vacuumbrand GmbH, Wertheim |
| Rotationsverdampfer 3 | Rotavapor R210 | Büchi, Flawil, CH |
| Wasserbad | Heating Bath B-491 | Büchi, Flawil, CH |
| Ultraschallbad | Sonorex Digitec DT 100 | Bandelin electronic, Berlin |
| Trockenschrank | Trockenschrank | Memmert, Schwabach |
| Laborwaage | LC1200 S | Sartorius AG, Goettingen |
| Feinwaage | CPA225D | Sartorius AG, Goettingen |
| Zentrifuge 1 | Avanti Centrifuge J-20 XPI | Beckman Coulter, Krefeld |

Tab. 2.2: Verwendete Geräte und Zubehör bei der Probenaufarbeitung (Fortsetzung).

| Gerätetyp | Bezeichnung | Firma |
|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Rotor | JA-14 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifuge 2 | Universal 32 R | Hettlich, Tuttlingen |
| Rotor | 1617 | Hettlich, Tuttlingen |
| Zentrifuge 3 | Biofuge pico | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Rotor | 3325B | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Ultraschall-Desintegrator | Sonoplus HD 200 | Bandelin electronic, Berlin |
| Ultraschallstab | UW 200 | Bandelin electronic, Berlin |
| Gefriertrocknung (Lyophylle) | Alpha 1-2 | Martin Christ GmbH, Osterode |
| Muffelofen | | Memmert, Schwabach |
| Speedextractor (ASE) | E 914 | Büchi, Flawil, CH |
| Erasor | n.a. | Raytest, Straubenhardt |
| Eppischüttler | Thermomixer comfort | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Horizontalschüttler | GFL3017 | GFL, Burgwedel |
| Inkubationsschüttler | G24 | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Inkubationsschrank | Thermoschrank 9010- 0004 B28 | Binder GmbH, Tuttlingen |
| Mikrowelle | | |
| UV Lampe | Camag (254nm / 366 nm) | Camag, Berlin |
| Photometer | UV - DU - 640 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Wasserbad | | |
| Sterilbank | Kojair KR 13 | Dietmar Müller Labortechnik, Windhagen |
| Dampfdruckkochtopf | | WMF, Geislingen, Steige |

2.6.2 Verwendete Geräte zur Radioanalytik und Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC):

| | |
|--|---------------------------------|
| DC-Scanner tracemaster 40 | Berthold, Bad Wildbad |
| DC Auftragsmaschine Linomat IV | Camag, Berlin |
| BioImager BAS 1000 | Fujifilm/Raytest, Straubenhardt |
| Eraser | Raytest, Straubenhardt |
| Fuji Imaging Plate Type BAS-MS 1912 (20 x 40 mm) | Fujifilm/Raytest, Straubenhardt |
| Fuji Imaging Plate Type BAS-MS 209 (20 x 40 mm) | Fujifilm/Raytest, Straubenhardt |
| BAS Kassette 2040 | Fujifilm/Raytest, Straubenhardt |
| Software: PC-BAS, Version 2.09 | |

Gaschromatographie (GC):

| | |
|---|--------------------|
| Agilent 6890N | Agilent, Waldbronn |
| GC Säule: FS-Supreme 5, 5 % Phenylpolysilylphenyloxan | |
| Dimensionen: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Filmdicke | |
| Detektor: MSD Agilent | |
| Software: GC/MSD ChemStation, Version D.01.02.16 | |

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Säule für die HPLC (ebenso genutzt bei LC-MS/MS):

| | |
|--|------------------------|
| EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 | Macherey-Nagel, Düren |
| HP Agilent 1100 HPLC HP | Waldbronn |
| Degasser G1322A | |
| Quat Pump G1311A | |
| ALS Autosampler G1313A | |
| Col Comp G1316A | |
| DAD G1315A | |
| Ramona Star Radiodetektor mit Flüssigmesszelle | Raytest, Straubenhardt |
| HPLC-LS-Pumpe | Raytest, Straubenhardt |
| Software: Gina Star, Version 4.08 | |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Beckman HPLC | Beckman-Coulter, Krefeld |
| Pumpe: Programmable Solvent Module 126 | |
| UV Detektor: Diode Array Detector Module 168 | |
| Ramona Star Radiodetektor mit Feststoffsintillator | Raytest, Straubenhardt |
| Software: System Gold Version | Beckman-Coulter, Krefeld |
| Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS): | |
| HP Agilent 1200 HPLC | Agilent, Waldbronn |
| Micro-Vakuum Degasser G1379B | |
| Binäre Pumpe SL G1312B | |
| SL G1367C Autosampler | |
| Säulenthermostat SL G1316B | |
| LTQ Orbitrap XL | Thermo Fisher, Dreieich |
| H-ESI II Quelle | |
| Chiller TF9 B A 230/50 P | |
| Szintillationszähler LSC | Beckman Coulter, Krefeld |
| LS 6500 Multi-Purpose | |
| Szintillationszähler LSC | |
| Tri-carb Liquid Scintillation Analyzer | Canberra-Packard, Zürich, CH |
| Oxidizer | Zinsser Analytic, Frankfurt a. M. |
| Biological Oxidizer OX 500 | |

2.7 Wasser

Insofern nicht anders angegeben wurde für alle Versuche der vorliegenden Arbeit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore, Bedford) verwendet. Das Wasser wurde über einen dem Gerät nachgeschalteten Sterilfilter (22 µm, Millipore, Bedford) filtriert. Dieses wird in dieser Studie als Reinstwasser bezeichnet. Im Rahmen dieser Studie wurde auch steriles Wasser verwendet. Dieses entsprach Reinstwasser, welches bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert wurde.

2.8 Versuchsboden

Der verwendete Boden stammt ist einer der für das DFG Schwerpunktprojekt SPP1315 (Biogeochemical Interfaces in Soil) ausgewählten Versuchsböden und stammt aus Ultuna (nahe Uppsala, Schweden; 60° Nord, 17° Ost). Der Boden wurde einer Versuchsfläche entnommen, die mit anderen Bodenflächen einen Teil eines seit dem Jahr 1956 laufenden Freilandexperimentes darstellt. Dieses erforscht die langfristigen Auswirkungen von chemischer Düngung, Düngung mittels Gülle und die Auswirkung der Applikation anderer organischer Materialien auf verschiedene Bodencharakteristika (pH-Wert, die Zusammensetzung der organischen Bodenbestandteile, den Kohlenstoff und Stickstoffhaushalt und seine Dynamik) und daraus resultierende Ernteausbeuten. Das gesamte Experiment wird als „The long term organic matter experiment“ bezeichnet (Kirchman et al., 1994). Der geographische Standort der Bodenversuchsflächen und eine Anordnung der Versuchsflächen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.



Abb. 2.1: Links: Standort der Versuchsflächen in Ultuna, nahe Uppsala in Schweden. Die Stadt Ultuna ist durch rote Markierung auf der Karte hervorgehoben. http://maps.google.de/maps?q=ultuna+schweden&bav=on.2,or.r_qf.&bvm=bv.47534661,d.d2k&biw=1280&bih=709&um=1&ie=UTF8&sa=X&ei=Xm2wUfqBMYSOOL2ygZAF&ved=0CAGQ_AUoAg Rechts: Anordnung eines Feldversuchs in Ultuna mit verschiedenen Bepflanzungen (von: Swedish University of Agricultural Sciences (SLU). Lessons from Swedish Long-term field experiments).

Die folgende Beschreibung des verwendeten Bodens wurde zwei wissenschaftlichen Veröffentlichungen entnommen, die das Langzeit-Freiland Experiment in Ultuna beschreiben: Gerzabeck et al. (2006); Kirchman et al. (1994).

Demzufolge ist der Versuchsboden ein postglazialer Tonboden in welchem Illit das hauptsächlich vorkommende Tonmineral darstellt. Der Standort der Versuchsflächen liegt in einer Höhe von 14 m über dem Meeresspiegel. Der jährliche Niederschlag beträgt in etwa 660 mm bei einer durchschnittlichen Jahrestemperatur von 5,5 °C. Der Boden ist laut

internationaler Bodenklassifizierungsrichtlinie WRS (engl.: World Reference Base for Soil Resources) als „Eutric Cambisol“ beschrieben. Cambisole sind als in situ verwitterte Böden definiert, die einen "cambic horizon", also einen Verlehmungs- und Verbraunungshorizont aufweisen, dessen Merkmale zu schwach ausgeprägt sind, um in eine andere Gruppe eingeordnet zu werden. Sie entsprechen etwa den Braunerden der deutschen Nomenklatur. Vor Beginn des Langzeitexperimentes in Ultuna im Jahre 1956 wurde die Bodenfläche landwirtschaftlich genutzt und regelmäßig mit Gülle gedüngt. Die im Jahr 1956 etablierten Versuchsflächen bestanden aus 14 Einzelflächen zu je vier Replikaten, die in zufälligem Muster angeordnet sind. Jede individuelle Fläche ist 4 m² groß und von jeweils anderen über Holzplanken getrennt. Seit Jahrzehnten wird der Boden der jeweiligen Flächen mit 14 verschiedenen Arten anorganischen beziehungsweise organischen Materials versetzt, u.a. Phosphat-Dünger und Gülle. Desweiteren wurden verschiedene Arten an Nutzpflanzen im Laufe der Zeit für unterschiedlich lange Zeitperioden auf den Flächen angepflanzt. Bei jeder Ernte der Pflanzen (Gerste, Weizen, Raps und Mais) wurde der jeweilige Bewuchs entfernt; jährlich wurden im Oktober Bodenproben aus der oberen Bodenschicht (Ap-Horizont; 0-39 cm Bodentiefe) der unterschiedlichen Bepflanzungsflächen entnommen. Parallel existiert seit dem Jahr 1973 ebenfalls eine Versuchsfläche, die nach Behandlung mit anorganischen Düngern (Natrium, Phosphat und Kaliumdünger) hauptsächlich mit englischem Weidelgras (*Lolium perenne L.*) bewachsen ist. Die Zugabe von Dünger wurde regelmäßig wiederholt und das Gras in der Regel 2- bis 3-mal im Sommer jedes Jahres geschnitten und dieses auf den Flächen als Beschnitt belassen.

Der in der vorliegenden Arbeit genutzte Boden wurde im Herbst 2010 einer Versuchsfläche nach Grasbewuchs entnommen und bei – 70 °C im Dunkeln verwahrt und in im gefrorenen Zustand an das Institut Biologie V der RWTH Aachen verschickt. Vor der Nutzung des Bodens für die Experimente wurde der Boden dann so behandelt, dass er als wurzelfreier Versuchsboden eingesetzt werden konnte. Hierzu wurde der Boden auf einem Aluminiumblech für acht Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend auf 2 mm gesiebt, um ihn für die Versuche zu homogenisieren und verbliebene Steine zu entfernen. Im Boden verbliebene Pflanzenreste, Wurzeln und etwaiger Bewuchs wurden so gründlich wie möglich entfernt. Anschließend wurde der Boden mehrfach mit einem Spatel gemischt, in einen Plastikeimer überführt und mit Alufolie abgedeckt. Der gesamte Boden wurde dann bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die in dieser Studie aufgeführten Experimente wurden mit dem wie beschrieben gelagerten Boden aus Ultuna in einem Zeitraum von 2,5 Jahren durchgeführt. Während dieser Zeit wurde der Boden immer bei 4 °C und Dunkelheit verwahrt. In Tabelle 2.3 sind Merkmale des Versuchsbodens gemäß Literaturangaben aufgeführt.

Tab. 2.3: Kenndaten des untersuchten Versuchsbodens aus Ultuna (Schweden) nach Gerzabeck et al. (2006), Kirchmann et al. (1994) inklusive Standardabweichung.

| Bodenmerkmale | Kenndaten |
|--|------------------|
| C:N Verhältnis | 10,4 |
| Wasserhaltekapazität (mm per mm) | 17,5 |
| Bodendichte (g/cm ³) | 1,3 |
| pH Wert (gemessen mittels 0,01 M CaCl ₂) | 5,7 |
| Kationenaustauschkapazität (cmol _c /kg) | 22,2 (+/-) 0,1 |
| Sand [63 – 2000 µm] (%) | 17,0 - 23,8 |
| Schluff [2 – 63 µm] (%) | 49,9 - 52,6 |
| Ton [< 2 µm] (%) | 23,6 – 37,0 |
| Organischer Kohlenstoffgehalt (je g/kg) | |
| Gesamtboden | 25,85 (+/-) 0,25 |
| Sand | 2,98 (+/-) 0,16 |
| Schluff | 17,3 (+/-) 0,34 |
| Ton | 4,6 (+/-) 0,11 |
| Wasserlöslicher organischer Kohlenstoff (mg/L) | 60,6 (+/-) 1,8 |
| Jahresniederschlag (mm) | 660 |
| Jahresdurchschnittstemperatur (°C) | 5,5 |
| Stickstoff-Gehalt (je g/kg) | |
| Gesamtboden | 2,5 (+/-) 0,02 |
| Sand | 0,13 (+/-) 0,014 |
| Schluff | 1,78 (+/-) 0,06 |
| Ton | 0,55 (+/-) 0,01 |
| Oberflächengröße (m ² /g) | 8,3 (+/-) 0,1 |

3 Methoden

3.1 Synthese von Metalaxylsäure

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Metalaxylsäure [N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanin-methyl-ester] als Referenzsubstanz für die chromatographische Analyse der Proben synthetisiert. Metalaxylsäure stellt ein bekanntes Transformationsprodukt von Metalaxyl im Boden dar (Ariens et al., 1988; Crosby, 1996;). Die Synthese der Substanz erfolgte nach Sukul et al. (1992) und Sukul und Spitteller (2001,a) und wurde wie folgend beschrieben durchgeführt (siehe auch Abbildung 3.1).

Metalaxyl, 300 mg, (Dr. Ehrendorfer GmbH, Reinheit 98,7 %) wurden in 13 mL kaltem (0 °C) Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren über 15 min tropfenweise mit einer Lösung von Lithiumhydroxid (0,5 M) versetzt. Anschließend wurde die Lösung für 48 h bei Raumtemperatur weiter gerührt, dann durch Zugabe von 50 mL Eiswasser gestoppt und mit 0,5 M HCl auf pH 4 eingestellt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde 3-mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abtrennen des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die verbleibende kristalline Substanz wurde in Acetonitril gelöst und mittels präparativer HPLC (Bedingungen siehe Abschnitt 3.18.3) aufgereinigt. Das aufgereinigte Syntheseprodukt wurde mittels ¹H und ¹³C-NMR Kernspinresonanzspektroskopie (NMR: engl.: nuclear magnetic resonance spectroscopy) als Metalaxylsäure identifiziert (Diplomarbeit D. Claßen, RWTH Aachen, 2012) und verschlossen bei 4 °C verwahrt.

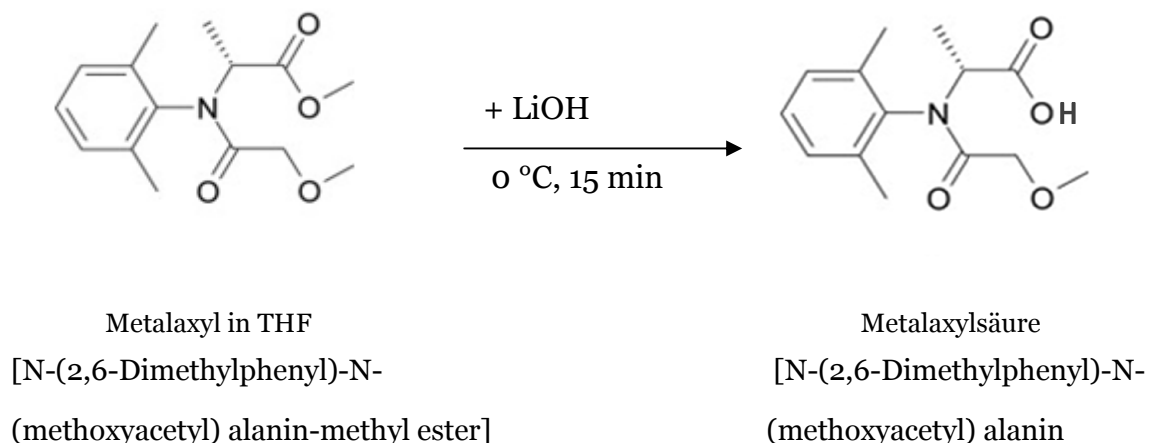


Abb. 3.1: Schema der Synthese von Metalaxylsäure (THF = Tetrahydrofuran).

3.2 Stationäre Systeme zur Inkubation

^{14}C -Metalaxyl wurde in Glasgefäßen ohne Gasdurchfluss (stationäre Systeme) mit Boden inkubiert. Der Boden befand sich hierzu in einer 250 mL Schottglasflasche, mit der ein Glas-schornstein (Höhe: 225 mm) verbunden war (siehe Abbildung 3.2). In diesem befanden sich als CO_2 -Adsorptionsfalle 15 g Natronkalk, welcher mit Glaswolle fixiert war. Durch eine Seitenöffnung am Schornstein konnten die Bodenansätze vor Aufarbeitung mit Stickstoff gespült und dadurch das im Flaschenraum befindliche $^{14}\text{CO}_2$ über die Falle geleitet und adsorbiert werden. Während der Inkubation war die Seitenöffnung mit Parafilm und die obere Öffnung des Schornsteins mit luftdurchlässigem Medical Tape verschlossen.

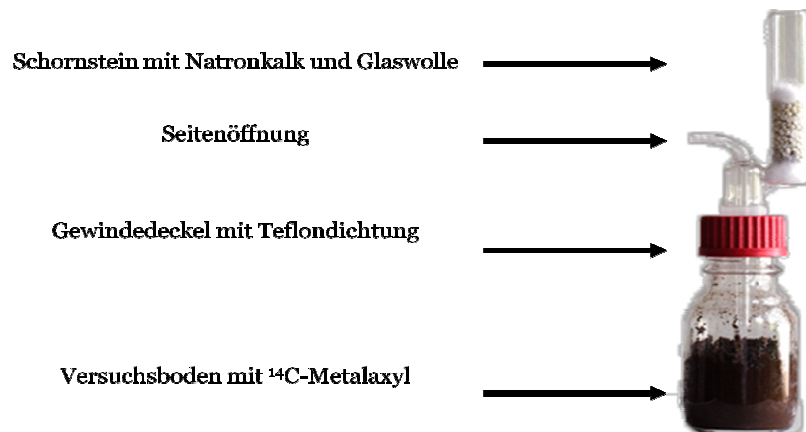


Abb. 3.2: Stationäres System zur Inkubation von ^{14}C -Metalaxyl im Boden.

3.3 Inkubationsansätze in stationären Systemen und Sterilisation des Versuchsbodens

3.3.1 Inkubationsansätze

Der Verbleib und das Schicksal von ^{14}C -Metalaxyl in Versuchsboden aus Ultuna wurden anhand verschiedener Versuchsansätze untersucht:

Proben des authentischen Bodens ohne Partikelgrößenfraktionierung (Gesamtbodenproben):

Auf verschiedene Weise sterilisierter Gesamtboden (siehe Abschnitt 3.3.2) und nicht steriler Gesamtboden wurden in Triplikaten angesetzt und nach 10 und 92 Tagen Inkubation aufgearbeitet (in Abschnitt 3.7.1 beschrieben). Alle Ansätze wurden mit ^{14}C -Metalaxyl inkubiert, um folgende mögliche Einflüsse hinsichtlich des Metabolismus des Fungizids zu untersuchen:

- der Einfluss abiotischer Bodenparameter ohne jeden biologischen Einfluss
- der Einfluss nach Sterilisation verbliebener, extrazellulärer, oxidativer Enzyme
- der Einfluss einer intakten, lebenden Mikroorganismengemeinschaft und deren exozelluläre, oxidative Enzyme im ungestörten Bodensystem

Proben von Partikelgrößenfraktionen des Gesamtbodens (Fraktionsproben):

Die vor Applikation aus authentischem Boden isolierten Partikelgrößenfraktionen Ton und Schluff wurden in Duplikaten angesetzt und nach 10 und 92 Tagen Inkubation aufgearbeitet (siehe Abschnitt 3.7.2). Hinsichtlich der Unterscheidung abiotischer und biotischer Einflüsse auf den Verbleib von ^{14}C -Metalaxyl wurden sterile und nicht sterile Fraktionen untersucht (in Abschnitt 3.3.2 beschrieben). Parallel wurden gleiche Mengen der Fraktionen mit nicht radioaktivem Metalaxyl appliziert ($40\ \mu\text{g}$) und inkubiert.

Proben von Gesamtboden mit/ohne Enzymzugabe (Boden mit/ohne Enzymzugabe):

Sterile Bodenproben wurden in Triplikaten direkt nach Applikation von ^{14}C -Metalaxyl aufgeteilt. Eine Hälfte der jeweiligen Bodenprobe wurde mit auf Alginat immobilisierter Laccase versetzt, die andere ohne Zugabe von Enzymen belassen (Boden mit Enzymzugabe, siehe Abschnitt 3.4). Beide Bodenproben wurden gemeinsam in stationären Systemen (siehe Abbildung 3.3) für 10 Tage inkubiert und nach Aufarbeitung verglichen (in Abschnitt 3.7.3 beschrieben). Analog wurde mit Boden verfahren dem nur Alginat ohne Laccase zugesetzt wurde (Boden ohne Enzymzugabe, siehe Abschnitt 3.4).

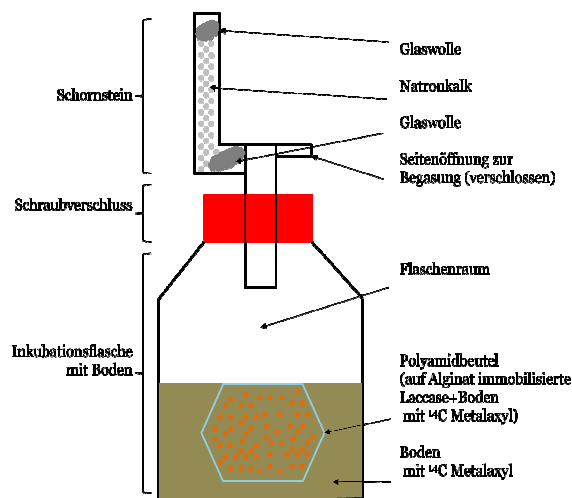


Abb. 3.3: Das stationäre System mit sterilem Gesamtboden und mit auf Alginat immobilisierter Laccase.

3.3.2 Sterilisation des Versuchsbodens

Gesamtbodenproben und Fraktionsproben wurden auf verschiedenen Arten sterilisiert. Je nach Untersuchungsziel bestand der Zweck der Sterilisationen darin, die Mikroorganismen abzutöten beziehungsweise zusätzlich extrazelluläre Enzyme zu denaturieren und zu inhibieren. Eine Übersicht aller sterilen Ansätze mit jeweiligem Untersuchungsziel und ihrer Bezeichnung (Nomenklatur) ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Überblick über die verwendeten sterilen Ansätze mit ihrer jeweiligen Nomenklatur. Die Art der Sterilisation und das jeweilige Untersuchungsziel für die Inkubation mit ^{14}C -Metalaxyl in Gesamtbodenproben, isolierten Fraktionen und Boden mit/ohne Enzymzugabe sind angegeben.

| Ansatz/ Nomenklatur | Sterilisationsmethode | Ziel der Untersuchung |
|--|--|---|
| Gesamtbodenproben | | |
| Ultuna _{SE,ST.} | γ -Bestrahlung (25 kGy) + Autoklavieren + Natriumazid (50 mg) + Phenylhydrazinzugabe (1,0mL Phenylhydrazinlsg.) | Einfluss physiko- chemischer Bodenparamter |
| | Ultuna _{γ-bestrahlt} | γ -Bestrahlung (25 kGy) |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | Chloroform- Fumigation + Quecksilberchlorid (50 mg) | Einfluss oxidativer Bodenenzyme ohne Anwesenheit von Mikroben |
| Fraktionsproben | | |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} / Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | Chloroform-Fumigation + Quecksilberchlorid (50 mg) | Einfluss oxidativer Bodenenzyme ohne Anwesenheit von Mikroben |
| Boden mit/ohne Enzymzugabe | | |
| Boden mit/ohne Enzymzugabe | γ -Bestrahlung (25 kGy) | Einfluss zugegebener Laccase ohne Anwesenheit von Mikroben |

Gesamtbodenproben (Ultuna_{SE,ST.}):

Zur Untersuchung abiotischer Einflüsse (aufgrund physiko-chemischer Bodencharakteristika) alleine musste eine Sterilisationsmethode etabliert werden welche sowohl die Mikroorganismen abtötete als auch die im Boden vorhandenen Enzyme vollständig denaturierte oder inhibierte. Dieser sterile Bodenzustand sollte zudem für die gesamte Inkubationszeit (maximal 92 Tage) aufrechterhalten bleiben. Zu diesem Zweck wurden je 50 g gesiebter, auf 60 % WHK eingestellter Boden in 250 mL Schottglasflaschen eingebracht und luftdicht verschlossen. Die Proben wurden anschließend durch die Firma BGS (Beta-Gamma-Service, Wiehl) mit einer Strahlendosis von 25 kGy für 60 min γ -

bestrahlt. Die Bestrahlung von Boden ermöglicht ein Abtöten der Bodenorganismen bei geringer Veränderung der Bodenstruktur und ohne die Bildung toxischer Abbauprodukte (Bank et al., 2008). Dies ist ein seit Jahrzehnten etabliertes Verfahren. Da jedoch eine vollständige Inaktivierung der u.a. exozellulären Enzyme im Boden durch die Bestrahlung nicht anzunehmen war (Shi und Souza, 1978; Perotti und Pidello, 1999), wurden die bestrahlten Proben zusätzlich für 2 h bei 120 °C autoklaviert. Um danach eventuell verbliebene, katalytisch aktive oxidative Enzyme zu inhibieren, wurden den Proben noch Inhibitoren für Phenoloxidasen und Peroxidasen zugesetzt; dabei handelte es sich um Natriumazid (Trevors, 1996; Alef und Nannipieri, 1995) und Phenylhydrazin (Dankwardt und Hock, 2000). Die bestrahlten und autoklavierten Bodenproben wurden hierzu unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) mit 1,08 mL einer 68 mM Phenylhydrazinlösung und 50 mg Natriumazid (Feststoff) vermischt und bis zur Applikation luftdicht verschlossen.

Gesamtbodenproben (Ultuna_γ-bestrahlt):

Zur Untersuchung des Einflusses oxidativer, extrazellulärer Bodenenzyme wurden die Bodenproben γ -bestrahlt (25 kGy, 60 min) und ohne weitere Sterilisationstechnik behandelt.

Gesamtbodenprobe (Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}):

Zwecks eines gleichen Untersuchungsziels wie bei den Proben Ultuna_γ-bestrahlt wurde Boden durch Chloroform-Begasung (Fumigation) und folgende Zugabe von Quecksilberchlorid sterilisiert. Zur Fumigation (Powelson und Jenkinson, 1976) wurden je 50 g lufttrockener Versuchsboden in unverschlossenen 250 mL Schottglasflaschen in einen mit feuchtem Papier ausgelegten Eksikator gestellt. Dann wurde nach einer publizierten Vorschrift (Alef und Nannipieri, 1995) ein Becherglas mit 300 mL alkoholfreiem Chloroform in den Eksikator gestellt, dieser verschlossen und der Eksikatorraum evakuiert. Die Apparatur wurde für 24 h bei Unterdruck belassen, daraufhin unter einem Gasabzug geöffnet und die Bodenproben luftdicht verschlossen. Quecksilberchlorid inhibiert die mikrobielle Aktivität in Böden durch Interaktion mit Sulfhydrylgruppen zellulärer Proteine (Tuominen et al., 1994). Zu diesem Zweck wurden die fumigierten Bodenproben (50 g Ultunaboden) mit 50 mg Quecksilberchlorid (Feststoff) unter sterilen Bedingungen vermischt und bis zur Applikation luftdicht verschlossen.

Fraktionsproben (Ton_{CHCl₃/HgCl₂}; Schluff_{CHCl₃/HgCl₂}):

Ton und Schluff wurden durch Fumigation und Quecksilberchloridzugabe sterilisiert und bis zur Applikation luftdicht verwahrt.

Boden mit/ohne Enzymzugabe:

Die Bodenproben wurden durch γ -Bestrahlung sterilisiert, bevor auf Alginat immobilisierte Laccase beziehungsweise nur Alginat ohne Laccase und ^{14}C -Metalaxyl zugesetzt wurden (siehe Abschnitt 3.4).

Zusätzlich zu den sterilen Inkubationsansätzen wurden auch nicht sterile Ansätze verwendet. Diese sind jeweils mit dem Zusatz „nativ“ in der vorliegenden Arbeit gekennzeichnet.

3.3.3 Kontrolle der Sterilisationsmethoden

Die Effizienz der verwendeten Sterilisationsmethoden wurde vor Durchführung der Experimente überprüft. Es wurden möglicherweise verbliebene, intakte Mikroorganismen isoliert und dann auf Vollmedienplatten für Bakterien (Standard Nährmedium I) sowie Pilze (Czapek-Dox) ausgebracht und ein mögliches Wachstum auf den Platten dokumentiert.

Hierzu wurden jeweils 10 g jeder sterilisierter Boden für 92 Tage inkubiert und folgend unter sterilen Bedingungen in eine 250 mL Schottglasflasche überführt, mit 100 mL Extraktionspuffer versetzt und luftdicht verschlossen. Das Gemisch wurde anschließend 2 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (200 U/min) geschüttelt. Danach wurden die Proben für 48 h im Dunkeln belassen, bis das Bodenmaterial sedimentiert war. Der Überstand wurde zum Animpfen von in Petrischalen befindlichen verfestigten Vollmedien verwendet (Schwiening, 1999). Hierzu wurden die Platten mit Standard-M Nährmedium I oder mit Czapek Dox Medium mit je 1 mL es Überstandes beimpft und für 48 h in einem Thermoschrank bei 27 °C bebrütet. Danach wurde ein mögliches Wachstum auf den Platten dokumentiert. Zusätzlich wurde die mikrobielle Aktivität in allen applizierten Proben nach jedem Inkubationszeitpunkt mittels DMSO-Reduktion gemessen (siehe Abschnitt 3.12).

3.4 Immobilisierung von Laccase auf Alginat

Laccase wurde auf Alginat gemäß einer von Palmieri et al. (1994) publizierten Vorschrift immobilisiert. Hierzu wurden 10 mg Laccase aus *Trametes versicolor* (entspricht ≥ 100 Units) in 1 mL BSA Lösung (10 mg/mL Reinstwasser) in einem Falconreaktionsgefäß (50 mL) gelöst. Es wurden 10 mL einer 3 %-igen Alginatlösung in Reinstwasser zugegeben und das Gefäß geschüttelt. Die resultierende Mischung wurde für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Dann wurden mittels einer 1000 μL Eppendorfpipette mit abgeschnittener Spitze (2 mm cut-off) der Überstand entnommen und in 50 mL einer 0,15 M Kupfersulfatlösung (pH 4) in einem zweiten Falconreaktionsgefäß (50 mL) getropft. Die sich hierbei bildenden Alginatkugeln hatten je Tropfen einen Durchmesser von ca. 3 bis 4 mm. Nach kompletten Eintropfen der Lösung wurde alle Alginatkugeln vorsichtig mit einem Sieb aus der Kupfersulfatlösung entnommen und in ein Glasgefäß überführt. Die katalytische

Aktivität der immobilisierten Laccase wurde überprüft, indem einige Kugeln in eine 0,1 M ABTS Substratlösung Lösung in MUB Puffer (siehe Abschnitt 3.13) überführt wurden. Nach Applikation von 100g γ -bestrahltem Boden (50 g Versuchsboden und 50 g Seesand) mit ^{14}C -Metalaxyl wurden aus diesem 50 g unter einer Sterilbank mit jeweils 100 Alginatkugeln in einen Beutel (Größe 10 x 10 cm) aus Polyamidsiebgewebe (63 μm Maschenweite) gegeben. Die Kugeln wurden dem Boden vorsichtig mit einem Spatel untergerührt. Der Beutel wurde mit Medical Tape verschlossen und zurück in die Inkubationsflasche mit den übrigen 50 g Boden überführt. Die Ansätze (siehe Abbildung 16) wurden für 10 Tage im Dunkeln bei 19 °C inkubiert (Boden mit Enzymzugabe). Analog wurden Kontrollen inkubiert, die Alginatkugeln ohne Laccase enthielten (Boden ohne Enzymzugabe). Die Alginatkugeln wurden hierzu durch Zutropfen einer 3 %-igen Alginatlösung in Reinstwasser zu einer 0,4 M Kupfersulfatlösung (pH 4) gewonnen und wie beschrieben im Polyamidbeutel mit Boden gemischt und inkubiert.

3.5 Applikation der Inkubationsansätze und Bilanzierung der Radioaktivität

3.5.1 Applikation

Zu Beginn jeder Inkubation wurde luftgetrockneter Gesamtboden (steril sowie nicht steril) und die Partikelgrößenfraktionen Ton und Schluff (steril sowie nicht steril) mit Seesand (reinst., gegläht) zur besseren Aufarbeitung und Homogenisierung vermischt und in die stationären Systeme überführt. Bei den Gesamtbodenproben und den Proben mit Enzymzugabe wurden jeweils 50 g Boden verwendet und mit 50 g Seesand vermischt. Bei den isolierten Fraktionen Ton und Schluff wurden je Ansatz 20 g der jeweiligen Fraktion verwendet und mit 30 g Seesand gemischt.

Es wurden die in Tabelle 5 für die Ansätze angegebenen Mengen von ^{14}C Metalaxyl aus der Stammlösung (Konzentration: 0,9 mg/mL in Methanol; spez. Aktivität: 4,13 MBq/mg) entnommen. Die für den jeweiligen Ansatz eingesetzte Menge an ^{14}C -Metalaxyl entsprach der vorgeschriebenen Agraraufwandmenge von 600 g/ ha bei 5 cm Bodentiefe und 1,5 g/cm³ Bodendichte von (Sukul und Spiteller, 2001;a). Dies entsprach einer Menge von 40 μg Metalaxyl in 50 g Boden (Trockengewicht). Alle Ansätze wurden mit den in Tabelle 5 angegebenen Mengen Reinstwasser auf 60 % ihrer maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. ^{14}C -Metalaxyl wurde dabei den jeweiligen Mengen Reinstwasser zugesetzt und die resultierende Applikationslösung dann auf den Boden mit einer Glaspipette appliziert. Die Verteilung erfolgte durch Rühren mit einem Glasstab.

Vor und zwischen der Zugabe der Applikationslösung wurde deren Radioaktivität in Aliquoten am Szintillationszähler vermessen. Die Proben wurden dann mit CO₂-Adsorptionsfallen verschlossen (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3). Dann wurde die

Seitenöffnung jedes Schornsteins mit Parafilm abgedichtet und die gesamte Glasflasche mit Alufolie umwickelt. Bei den sterilen Ansätzen wurde steriles Wasser verwendet und unter einer Sterilbank gearbeitet. Alle Ansätze wurden für die jeweilige Inkubationszeit bei Dunkelheit und 19 °C inkubiert. Die Kontrollen (Seesand) wurden analog zu den Bodenproben appliziert.

Tab. 3.2: Die für die Applikation verwendeten Volumina der ^{14}C -Metalaxyl Stammlösung und die Mengen Bodenmaterial (g), Wasser (mL) und Radioaktivität (dpm).

| Inkubationsansatz | Boden/Fraktion (g) | Seesand (g) | Wasser (mL) | Radioaktivität (dpm) |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Gesamtboden | 50 | 50 | 10,3 | 9246475 |
| Fraktionsprobe (Ton) | 20 | 30 | 10,3 | 4500064 |
| Fraktionsprobe (Schluff) | 20 | 30 | 10,3 | 4500064 |
| Boden mit/ohne Enzymzugabe | 50 | 50 | 10,3 | 9246475 |
| Kontrolle | - | 100 | 10,3 | 9246475 |

3.5.2 Bilanzierung der Radioaktivität

Die Bilanzierung der Radioaktivität aller Ansätze setzte sich aus folgenden Anteilen zusammen:

- a) Mineralisierung
- b) extrahierbare Radioaktivität
- c) nicht extrahierbare Radioaktivität

Mineralisierung:

Mittels des in den Adsorptionsfallen befindlichen Natronkalks (ein Gemisch aus NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$) wurde das gebildete $^{14}\text{CO}_2$ gebunden. Der Natronkalk wurde zu Beginn jeder Aufarbeitung in einen Dreihalskolben überführt. An diesen wurden vier Szintillationsvials, jeweils gefüllt mit 15 mL Oxysolve Szintillationscocktail, in Reihe luftdicht angeschlossen. In den Dreihalskolben wurden dann langsam 60 mL 25 % HCl tropfenweise zugesetzt, bis der Natronkalk sich aufgelöst hatte. Das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ wurde dann mit einem Stickstoffstrom

in den Szintillationscocktail überführt. Die Szintillationsgefäße wurden mit LSC vermessen. Die Summe der vier Radioaktivitätsmengen ergab den Anteil an gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ im jeweiligen Ansatz.

Extrahierbare Radioaktivität:

Die Inkubationsansätze wurden erschöpfend extrahiert (Etablierung siehe Abschnitt 3.6). Die im Extrakt befindliche Radioaktivität wurde mit einer Flüssigszintillationzählung (LSC, engl.: Liquid Scintillation Counting) von Aliquoten quantifiziert. Volumina der Extrakte wurden auf die gesamte Menge an extrahierter Radioaktivität hochgerechnet.

Nicht extrahierbare Radioaktivität:

Zur Verbrennungsanalyse wurden je Probe vier Aliquote der homogenisierten Bodenprobe (extrahiert oder nicht extrahiert) entnommen und in Zellulose-Verbrennungshütchen überführt. Durch Differenzwägung ließ sich die Masse der Aliquote bestimmen, die im Mittel zwischen 200 und 500 mg Boden lag. Vor Verbrennung der Proben wurde das Gerät mit folgend aufgeführten Verbrennungen geeicht (jeder Verbrennungszyklus: 2 min).

1. 4 Blindproben [BL]
Verbrennungszyklus ohne Probenmaterial
2. 4 Leerverbrennungen [LV]
Verbrennung von mit Zellulose befüllten Verbrennungshütchen
3. 4 Standards [ST]
Verbrennungszyklus ohne Probenmaterial, jedoch wurden vor Verbrennung in das vial 10 μL Oxidizer Standardlösung (ca. 8000 dpm) zugeführt.
4. Standardverbrennungen [STV]
Verbrennung von mit Zellulose befüllten Verbrennungshütchen, in die zuvor 10 μL Oxidizer Standardlösung (ca. 8000 dpm) überführt wurden.

Zusätzlich wurde nach Verbrennung jeder zehnten Bodenprobe eine Standardverbrennung durchgeführt. Die Verbrennungshütchen wurden über 4 min verbrannt. Gemäß folgender Formel wurde dann ein Korrekturfaktor berechnet, der bei der Quantifizierung der nicht extrahierbaren Radioaktivität der eigentlichen Proben einzuberechnen war.

$$[1] \quad \text{KF} = (\text{ST} - \text{LV}) / (\text{STV} - \text{LV})$$

KF Korrekturfaktor
ST Standard
LV Leerverbrennung
STV Standardverbrennung

3.6 Vergleich der Extraktionsmethoden

Es wurden 15 Proben (jeweils 25 g Boden gemischt mit 25 g Seesand) mit ^{14}C -Metalaxyl (jeweils 2011249 dpm) analog zu den eigentlichen Inkubationsansätzen appliziert und 10 Tage inkubiert. Dann wurden diese Ansätze auf verschiedene Arten extrahiert, um eine dem Untersuchungsschwerpunkt angemessene, erschöpfende Extraktion zu etablieren. Die Partikelgrößenfraktionierung (siehe Abschnitt 3.8) wurde als ein erster Extraktionsschritt untersucht.

Extraktion mittels Methanol:

Angelehnt an eine von Sukul (2006) publizierte Methode wurden 3 Ansätze mit jeweils 100 mL Methanol vermischt und für 5 min in einem Ultraschallbad behandelt. Der Boden wurde bei 3900 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in eine 1000 mL Schottglasflasche überführt. Der Boden wurde dann 2-mal auf die gleiche Weise mit 100 mL eines Methanol/Wasser-Gemischs (80/20; v/v) extrahiert und die Überstände der sequentiellen Extraktionsschritte vereinigt. Die Quantifizierung ihrer Radioaktivität erfolgte in Aliquoten mit LSC. Die Menge nicht extrahierbarer Radioaktivität wurde in Aliquoten des Bodens nach Trocknung bei Raumtemperatur mit Verbrennungsanalyse bestimmt.

Extraktion mittels Soxhlet-Apparatur:

Es wurden 9 Ansätze in einer Soxhlet-Apparatur mit 150 mL Methanol extrahiert. Die Extraktionsdauer betrug für jeweils 3 dieser Ansätze 2, 4 und 6 Stunden. Die Radioaktivität der Extrakte wurde in Aliquoten mit LSC quantifiziert. Die Menge nicht extrahierbarer Radioaktivität wurde in Aliquoten des Bodens nach Trocknung bei Raumtemperatur mit Verbrennungsanalyse bestimmt.

Extraktion mittels Partikelgrößenfraktionierung und Soxhlet-Apparatur:

Es wurden 3 Ansätze in 250 mL Schottglasflaschen überführt und mit jedem Boden eine Partikelgrößenfraktionierung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8). Die Quantifizierung der Radioaktivität des hierbei anfallenden Fraktionswassers erfolgte in Aliquoten mit LSC. Die Aliquote des Fraktionswassers wurden zentrifugiert (2h, 12.000 x g) und die Radioaktivität der resultierenden Überstände erneut mit LSC quantifiziert. Sand, Schluff und Ton wurden dann nach Trocknung mit jeweils 50 mL Methanol in einer Soxhlet-Apparatur 6 h extrahiert, die Extrakte vereinigt und die Radioaktivität in Aliquoten mit LSC quantifiziert. Die insgesamt mit dieser Methode extrahierbare Radioaktivität setzte sich aus der Radioaktivität des Fraktionswassers und der Radioaktivität der Soxhlet Extrakte zusammen. Die Menge nicht extrahierbarer Radioaktivität wurde in Aliquoten der isolierten Partikelgrößenfraktionen nach Trocknung (Lyophilisation) mit Verbrennungsanalyse

bestimmt. Diese Extraktionstechnik wurde bei der Aufarbeitung der Inkubationsansätze der vorliegenden Studie genutzt.

Extraktion mittels Mikrowellenextraktion:

Die Mikrowellen-unterstützte Extraktion von Fremdstoffen aus Böden stellt eine effiziente Extraktionsmethode dar (Förster et al., 2008; Dissertation T. Junge RWTH Aachen, 2012). Auf diesen Arbeiten basierend wurden jeweils 3 Bodenproben (10 g Boden und 10 g Seesand) mit ^{14}C -Metalaxyl (jeweils 2011249 dpm) appliziert und nach 10 Tagen Inkubation in Mikrowellenextraktionsgefäße überführt. Dann erfolgte die Zuführung von jeweils 50 mL eines Lösungsmittelgemisches (Acetonitril/Reinstwasser, 4:1, v/v) zugeführt. Die Gefäße wurden verschlossen und in die Mikrowelle gestellt. Mittels eines in den Probengefäßen befindlichen Temperaturfühlers konnte die Extraktion folgend über die Temperatur gesteuert werden. Die Proben wurden in 5 min auf 150 °C erhitzt und für 15 min bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen wurde der Boden in Zentrifugenbecher (250 mL) überführt und bei 3900 x g für 30 min zentrifugiert. Es erfolgte die Abdekantierung der Überstände und eine Quantifizierung der darin befindlichen Radioaktivität in 4 Aliquoten mit LSC. Die Menge nicht extrahierbarer Radioaktivität wurde in Aliquoten des Bodens nach Trocknung bei Raumtemperatur mit Verbrennungsanalyse bestimmt.

3.7 Aufarbeitung der Inkubationsansätze

3.7.1 Aufarbeitung der Gesamtbodenproben

Zu Beginn der Aufarbeitung der Ansätze wurde jedes stationäre System für 5 min mit Stickstoff belüftet und der Natronkalk aus dem Schornstein entfernt (siehe Abschnitt 3.5.2). Folgend wurden 20 g des Bodens für die Bestimmung des pH-Werts, der mikrobiellen Aktivität, der Messung der Aktivität von Phenoloxidasen und Peroxidasen, und der Bestimmung der Radioaktivität des Ansatzes vor Extraktion entnommen. Es erfolgte dann die Bilanzierung der Radioaktivität des Ansatzes ausgehend von der Radioaktivitätsmenge im verbliebenen Boden (80 g). Dieser wurde in seine Korngrößen Sand, Schluff und Ton aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.8). Die Menge des Fraktionswassers, welche etwa 1000.000 dpm enthielt wurde in 1000 mL Schottglasflaschen überführt und mit 150 mL Ethylacetat zur Extraktion 10 min vermischt (Rührfisch) und dann bis zur Phasentrennung belassen. Die Ethylacetatphase wurde mit einer Glaspipette (20 mL) abgenommen und das extrahierte Fraktionswasser analog erneut 2-mal extrahiert. Es erfolgte die Vereinigung aller 3 Ethylacetatphasen und die Bestimmung ihrer Radioaktivität in Aliquoten mit LSC. Anschließend wurde das Ethylacetat am Rotationsverdampfer entfernt und die getrocknete Probe in HPLC Anfangseluent (Reinstwasser/Acetonitril, 90:10, 0,1 % Ameisensäure, v/v) bei 5 min Beschallung im Ultraschallbad gelöst (500.000 dpm/mL) und in HPLC

Probengefäße steril filtriert. Diese wurden bis zur Analyse verschlossen im Dunkeln bei 4 °C verwahrt. Zusätzlich wurden Aliquote des Fraktionswassers zentrifugiert (12.000 x g; 2 h), und dann die Radioaktivität im Überstand erneut mit LSC bestimmt. Sand, Schluff und Ton wurden nach Lyophylisation gewogen und für 6 h mit jeweils 200 mL Methanol extrahiert (Soxhlet). Die Quantifizierung der Radioaktivität und Aufarbeitung dieser Extrakte für die Analyse erfolgte analog zu den Extrakten aus dem Fraktionswasser. Alle Extrakte wurden mit HPLC und DC analysiert. Das Schema der Aufarbeitung der Gesamtbodenansätze ist in Abbildung 3.4 aufgeführt.

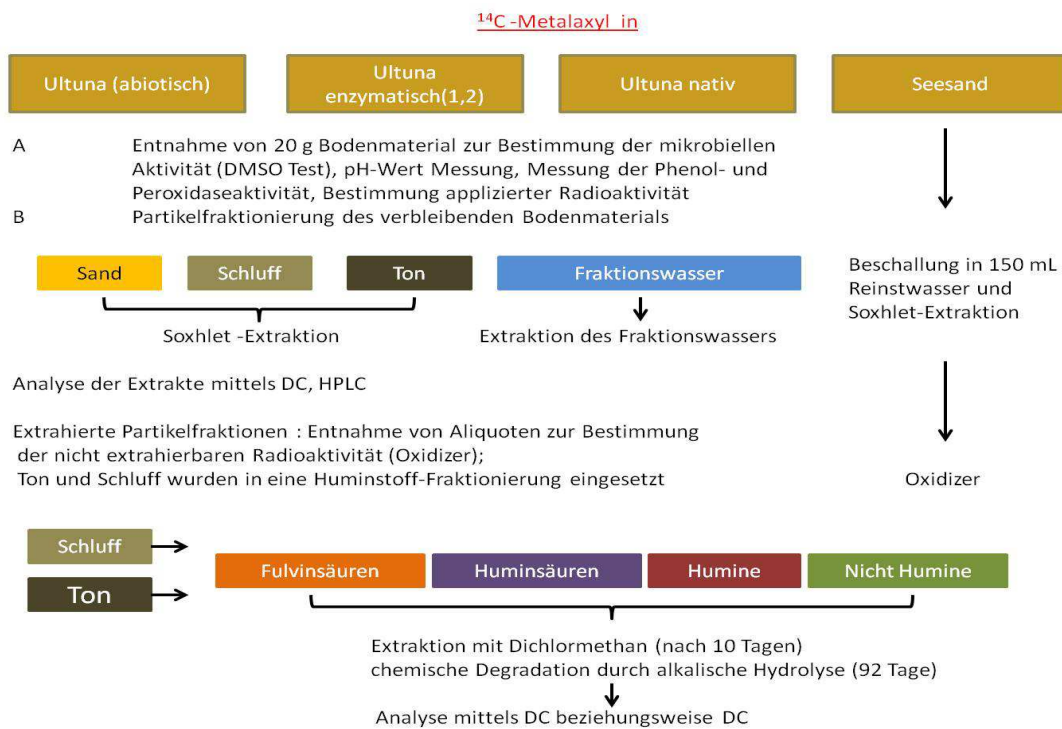


Abb. 3.4: Schema der Aufarbeitung von Gesamtbodenproben.

Zur Bestimmung der nicht extrahierbaren Radioaktivität und deren Untersuchung, wurden nach Extraktion getrocknete Fraktionen (Raumtemperatur, 48 h) mit einem Glasstab vermischt, ihre Radioaktivität in Aliquoten mittels Verbrennungsanalyse (Oxidizer) quantifiziert, und der Ton sowie Schluff dann in eine Huminstoff-Fraktionierung eingesetzt (siehe Abschnitt 3.9). Die isolierten Huminstoff-Fractionen der für 10 Tage inkubierten Proben wurden nach Trocknung mit Lyophylisation mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Das mit Lyophylisation entfernte Wasser und die Extrakte wurden mit LSC vermessen. Dichlormethan wurde mit Rotationsverdampfung entfernt und die Trockenrückstände in jeweils 0,5 mL Methanol (reinst.) aufgenommen, steril filtriert und mit DC analysiert. Die Degradierung der isolierten Huminstoff-Fractionen der für 92 Tage inkubierten Proben erfolgte nach Trocknung (Lyophylisation) mittels alkalischer Hydrolyse

(siehe Abschnitt 3.10). Anstelle einer Partikelgrößenfraktionierung wurden die Kontrollen (Seesand) nach Abnahme von 20 g mit 150 mL Reinstwasser versetzt und beschallt. Das dabei gewonnene „Fraktionswasser“ wurde wie beschrieben extrahiert und der getrocknete Seesand analog zu den Fraktionen des Gesamtbodens extrahiert. Eine Huminstoff-Fraktionierung und alkalische Hydrolyse erfolgte nicht bei den Kontrollen.

3.7.2 Aufarbeitung Fraktionsproben

Ein Schema der Aufarbeitung der Fraktionsproben ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

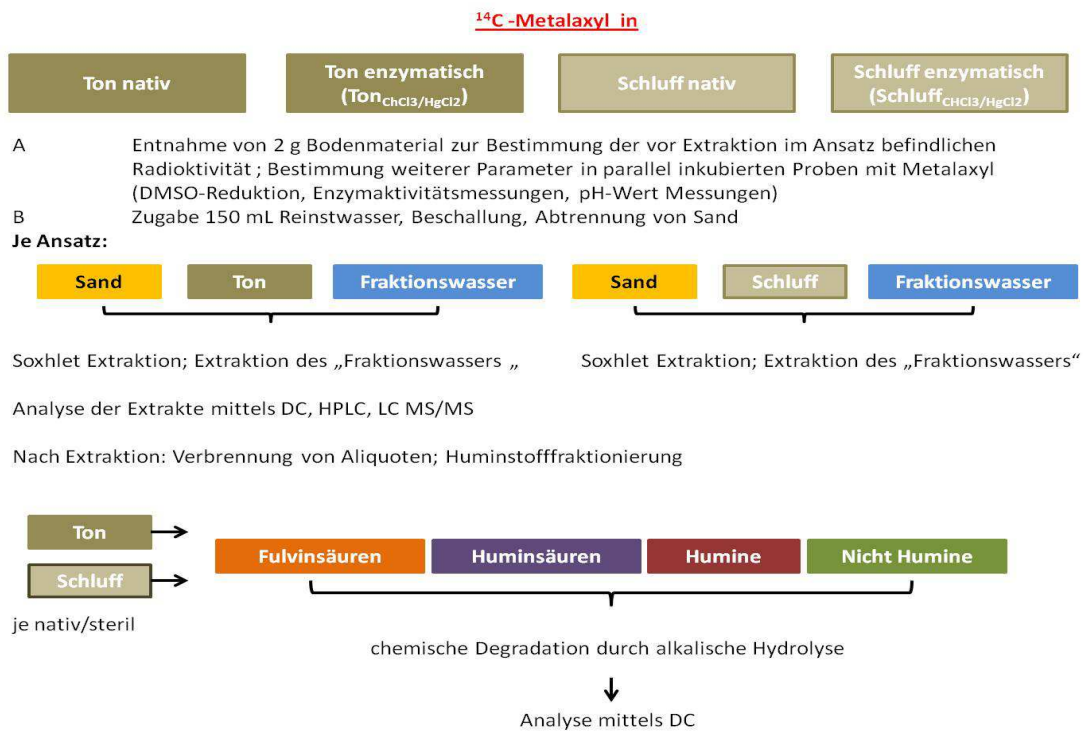


Abb. 3.5: Schema der Aufarbeitung der Fraktionsproben.

Zu Beginn der Aufarbeitung der Fraktionsproben wurde jedes stationäre System mit Stickstoff belüftet und der Natronkalk aus dem Schornstein entfernt (siehe Abschnitt 3.5.2). Es erfolgte die Entnahme von jeweils 2 g Probe zur Bestimmung der Radioaktivität des Ansatzes vor Extraktion mittels Verbrennungsanalyse. Der verbliebene Boden wurde analog zur Partikelgrößenfraktionierung des Gesamtbodens mit 150 mL Reinstwasser versetzt, beschallt und der Sand abgeseigt. Dies sollte eine Vergleichbarkeit zu Extraktion des Gesamtbodens gewährleisten. Das gewonnene Fraktionswasser sowie der getrocknete Ton bzw. Schluff wurden analog zu den Gesamtbodenproben extrahiert und für die Analyse aufgearbeitet (siehe Abschnitt 3.7.1). Aliquote des „Fraktionswassers“ wurde analog zu den Gesamtbodenproben zentrifugiert und ihre Radioaktivität mit LSC bestimmt. Alle Extrakte wurden mit HPLC beziehungsweise DC analysiert. Mit extrahiertem Ton und Schluff erfolgte

die Durchführung einer Huminstoff-Fraktionierung (siehe Abschnitt 3.9) und einer alkalische Hydrolyse (siehe Abschnitt 3.10), sowohl nach 10 als auch 92 Tagen Inkubation. Diese Extrakte wurden mit DC analysiert. Die mikrobielle Aktivität, Enzymaktivitäten der Phenoloxidasen und Peroxidasen und der pH-Wert wurden anhand parallel inkubierter Ansätze, die mit nicht radioaktiv markiertem Metalaxyl (40 µg) appliziert waren, untersucht.

3.7.3 Aufarbeitung von Boden mit/ohne Enzymzugabe

Jedes stationäre System wurde mit Stickstoff belüftet und der Natronkalk aus dem Schornstein entfernt (siehe Abschnitt 3.5.2). Es erfolgte die Entnahme von sowohl 20 g Boden aus dem Polyamidbeutel (Alginatkugeln und Boden) als auch 20 g aus dem den Beutel vormals umgebenden Bodens. Diese Aliquote wurden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität, der Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und der im Ansatz befindlichen Radioaktivität genutzt. Die nach Entnahme verbliebenen Bodenmengen wurden getrennt aufgearbeitet. Zur Aufarbeitung des vormals den Beutel umgebenden Bodens wurde analog zu den Gesamtbodenproben verfahren. Der Boden im Polyamidbeutel wurde in eine 1000 mL Schottflasche überführt. Am Polyamidgewebe haftender Boden wurde mit Reinstwasser abgewaschen und dem Beutelinhalt in der Schottflasche zugeführt und dann mit dem Boden analog zur Aufarbeitung der Gesamtbodenproben verfahren.

3.8 Partikelgrößenfraktionierung

Die Partikelgrößenfraktionierung erfolgte gemäß einer von Stemmer et al. (1998) publizierten Vorschrift mit wenigen Modifikationen

Gesamtbodenproben und Boden mit/ohne Enzymzugabe:

Der Boden (jeweils 100 g) wurde mit 150 mL Reinstwasser versetzt (1:1,5) und geschüttelt. Im Eisbad wurden die Proben für 10 min bei einem Energieeintrag von 170 J/g mit einer Ultraschallsonde behandelt (Stemmer et al. 1998). Dann wurden sie nass durch ein 63 µm Polyamidgewebe gesiebt, dieses mehrmals mit Reinstwasser gewaschen und somit die Sandfraktion isoliert. Diese wurde bei 40 °C in einem Thermoschrank vor weiterer Aufarbeitung getrocknet und gewogen. Das in einem Zentrifugenbecher (250 mL) aufgefangene Wasser, Ton und Schluffgemisch wurde daraufhin für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der wässrige Überstand (Tonfraktion) in einen zweiten Zentrifugenbecher (250 mL) abdekantiert. Der im ersten Zentrifugenbecher sedimentierte Boden enthielt die Schlufffraktion sowie noch geringe Mengen an Ton. Um diesen vom Schluff zu trennen, erfolgte ein viermaliges Waschen mit je 30 mL Reinstwasser. Dieses wurde durch 5 min Zentrifugation bei 150 x g wieder abgetrennt und nach jedem Waschschrift in den zweiten Zentrifugenbecher mit der Tonfraktion überführt (Stemmer et al., 1998). Die somit gewonnene, wässrige Tonfraktion wurde für 30 min bei 3900 x g zentrifugiert und der

Überstand in eine 1000 mL Schottglasflasche überführt. Das verbliebene Pellet wurde noch 2-mal in je 30 mL Reinstwasser resuspendiert und jeweils für 30 min bei 3900 x g zentrifugiert. Es erfolgte die Vereinigung der resultierenden Überstände mit dem Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt. Dieses Gemisch wurde als Fraktionswasser der Probe bezeichnet. Ton und Schluff wurden in je 30 mL Reinstwasser gelöst, in einem 250 mL Rundkolben in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die prozentualen Anteile der Korngrößenfraktionen am Gesamtboden ergaben sich durch die bestimmten Massen der Korngrößenfraktionen hinsichtlich der insgesamt in die Partikelgrößenfraktionierung eingesetzten Bodenmenge.

Fraktionsproben:

Zur Gewinnung der Partikelgrößenfraktionen Ton und Schluff für die Fraktionsansätze wurden je 100 g nicht applizierter Boden mit 150 mL Reinstwasser versetzt und wie beschrieben fraktioniert. Nach Inkubation wurden Ton und Schluff analog zu den Gesamtbodenproben mit 150 mL Reinstwasser versetzt, für 10 min mit 17 kJ beschallt und mit dem Sand wie beschrieben verfahren. Es erfolgte die Zentrifugation (bei 3900 x g, 30 min) der verbleibenden Ton-Wasser beziehungsweise Schluff-Wassergemische. Die Quantifizierung der Radioaktivität in den Überständen („Fraktionswasser“) erfolgte nach Abdekantieren in Aliquoten mit LSC. Ton und Schluff wurden in 30 mL Reinstwasser gelöst und lyophilisiert.

Kontrolle der Effizienz der Partikelgrößenfraktionierung

Im Vorfeld der Inkubationsansätze wurde die Effizienz der Partikelgrößenfraktionierung mit Sedimentationsexperimenten überprüft. Nicht applizierter Boden (50 g Ultuna und 50 g Seesand) wurde analog zu den Gesamtbodenproben fraktioniert. Jeweils 10 g getrockneter Schluff wurden in 100 mL Messzylinder eingefüllt in dem sich 100 mL Reinstwasser befanden. Nach 136 min Wartezeit sollten nach alle Partikel größer als 2 µm die ersten 3 cm des Wasserstandes im Zylinder durch Sedimentation mit der Schwerkraft passiert haben. Die ersten 4 cm der Wassersäule wurden mit einer Glaspipette (20 mL) abgenommen, in ein zuvor leer gewogenes Glasgefäß überführt und für 24 h bei 105 °C getrocknet und gewogen. Die in der Säule verbliebene wässrige Bodenlösung wurde in einen zuvor leer gewogenen Zentrifugenbecher überführt und bei 3900 x g 2 h zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abdekantiert, der sedimentierte Boden im Zentrifugenbecher getrocknet (105 °C, 24 h) und gewogen. Laut Stemmer et al. (1998) konnte somit der Anteil an noch nicht sedimentiertem Boden in den ersten 4cm der Säule (Partikel kleiner als 2µm: Ton) bestimmt werden. Dieser wurde mit folgender Formel berechnet.

[2] Tongehalt der Schluffraktion (%) = $(VZ \times TGT \times 100) / TGP \times Va$

VZ Volumen des Messzylinders (mL)

TGT Trockengewicht des Bodens in 4cm Wassersäule (g)

TGP Trockengewicht Boden in Zylinder nach Abnahme 4 cm (g)

Va Volumen der abgenommenen Menge (mL)

3.9 Huminstoff-Fraktionierung

Die Huminstoff-Fraktionierung wurde gemäß einer von Kohl und Rice (1998) publizierten Vorschrift durchgeführt und ist schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt.

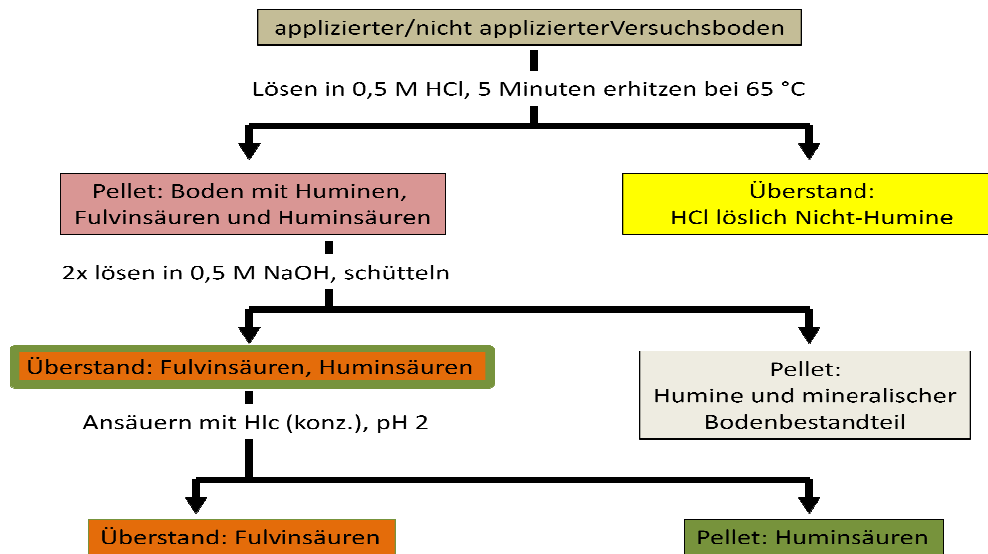


Abb. 3.6: Schema der Huminstoff-Fraktionierung gemäß Kohl und Rice (1998).

Nach Extraktion und Trocknung wurden Ton und Schluff in Zentrifugenbecher (250 mL) überführt, mit je 100 mL 0,5 M HCl vermischt und für 5 min in einem Wasserbad (65 °C) erhitzt. Nach Abkühlen erfolgte die Zentrifugation der Proben für 30 min bei 15000 x g und die Überführung der Überstände in 250 mL Plastikgefäße. Diese in HCl löslichen Substanzen wurden als Nicht-Humine bezeichnet. Die verbliebenen Fulvinsäuren, Huminsäuren und Humine konnten dann gemäß ihrer Löslichkeit getrennt werden (Hayes, 1997). Die Pellets wurden in 100 mL 0,5 M NaOH Lösung gelöst und für 24 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 15000 x g zentrifugiert, die Überstände in 250 mL Plastikbecher überführt und den Pellets erneut 100 mL 0,5 M NaOH Lösung zugegeben. Die Proben wurden erneut bei 170 rpm für 2 h geschüttelt und zentrifugiert. Es erfolgte dann die Vereinigung der Überstände mit dem ersten Überstand. Dieses Gemisch enthielt Fulvinsäuren und Huminsäuren und wurde mit konzentrierter HCl (37 %) auf pH 2 eingestellt. Dann wurden die Proben für 24 h bei Raumtemperatur belassen bis die im Sauren unlöslichen Huminsäuren ausgefallen waren. Es erfolgte die Zentrifugation (15000 x g 30 min) zwecks einer Trennung von Fulvinsäuren und Huminsäuren. Die

Fulvinsäuren wurden abdekantiert. Die Radioaktivität der gelösten Nicht-Humine, Fulvinsäuren und Huminsäuren wurde in Aliquoten mit LSC quantifiziert und die Fraktionen bis zur alkalischen Hydrolyse im Dunkeln bei 4 °C verschlossen verwahrt. Die verbliebenen unlöslichen, mit mineralischen Bodenbestandteile assoziierten Humine wurden bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem Mörser vermischt, gewogen und ihre Radioaktivität durch Verbrennungsanalyse von Aliquoten bestimmt. Die restlichen Humine wurden bis zur alkalischen Hydrolyse im Dunkeln bei 4 °C verschlossen verwahrt. Für weitere Experimente (siehe Abschnitt 3.17) erfolgte eine analoge Isolierung von Huminstoff-Fractionen aus Schluff nicht applizierten Bodens.

3.10 Chemische Degradation durch alkalische Hydrolyse

Zwecks Untersuchung der nicht extrahierbaren Radioaktivität wurden Huminstoff-Fractionen der Inkubationsansätze mittels alkalischer Hydrolyse degradiert. Die Lösungen mit Fulvinsäuren, Huminsäuren und Nicht-Huminen wurden mit konzentrierter HCl (37 %) auf pH 7 eingestellt und lyophilisiert. Dann wurden die Fraktionen gewogen, in je 20 mL eines 2 M KOH-Methanol-Wasser-Gemischs (1:1,2:250; v/v/w; Degradationslösung) gelöst und in druckdichte Mirowellenextraktionsgefäße überführt. Die Einwaage der Humine erfolgte direkt bei Überführung in die Mikrowellenextraktionsgefäße denen dann Degradationslösung zugesetzt wurde. Alle Proben waren druckdicht verschlossen und es erfolgte eine 3-malige Beschallung für 5 min in einem Ultraschallbad. Anschließend wurden die Gefäße in einem Thermoschrank bei 105 °C für 24 h inkubiert. Nach Abkühlen der Proben bei Raumtemperatur wurden diese erneut 3-mal für 5 min im Ultraschallbad beschallt und für 2 h bei Raumtemperatur zwecks Sedimentation belassen. Die Überstände wurden dann in 250 mL Schottglasflaschen überführt und mittels konzentrierter HCl (37 %) auf pH 2 angesäuert. Es erfolgte eine 3-malige Extraktion der Überstände mit 30 mL Ethylacetat. Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abgetrennt und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Die Trockenrückstände wurden jeweils in 5 mL Methanol reinst. aufgenommen und auf Kieselgelsäulen (5 g Kieselgel) aufgegeben. Die Säulen wurden für 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen und dann mit 30 mL Lösungsmittelgemisch (Ethylacetat/Hexan; 30:70) eluiert. Es erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels im Eluat am Rotationsverdampfer und die Aufnahme der Trockenrückstände in 1 mL HPLC Anfangseluent (Reinstwasser/Acetonitril, 90:10, 0,1 % Ameisensäure, v/v). Das Lösen der Proben wurde durch 5 min Beschallung im Ultraschallbad unterstützt. Die Proben wurde in HPLC Probengefäße steril filtriert und ihre Radioaktivität in Aliquoten per LSC quantifiziert. Die Proben wurden bis zur Analyse mit DC bei 4 °C im Dunkeln verwahrt.

In zusätzlichen Versuchen wurde 3-mal ^{14}C -Metalaxyl (1122214 dpm) direkt in die Degradationslösung gegeben und für 24 h bei 105 °C inkubiert. Die Degradationslösung wurde wie beschrieben extrahiert und der Extrakt mit DC vermessen. Dies diente als Kontrolleexperiment der alkalischen Hydrolyse.

3.11 Bestimmung von pH-Wert und Wasserhaltekapazität

3.11.1 pH-Wert

Wenn nicht anders angegeben wurde der pH Wert von verwendeten Puffern und Lösungen sowie Extrakten mit pH-Universalindikatorpapier (VWR, Darmstadt) bestimmt.

Der pH-Wert aller Inkubationsansätze wurde gemäß der Versuchsvorschrift DIN ISO 10390 bestimmt. Es wurden Aliquote des Bodens bzw. der Partikelgrößenfraktion (jeweils 1,5 g) in ein 30 mL Becherglas überführt und mit 6 mL einer 0,1M CaCl_2 Lösung vermischt. Die Proben wurden folgend für 2 h bei Raumtemperatur zur Sedimentation des Bodens belassen. Die Bestimmung des pH-Werts des Überstandes erfolgte mit einem Five easy pH FE20 pH-Meter (Mettler Toledo, Gießen) mit einer LE409 pH Elektrode (Mettler Toledo, Gießen) bestimmt.

3.11.2 Wasserhaltekapazität

In jeweils drei Parallelen wurden 4 g naturfeuchter, nicht applizierter Boden auf Filterpapier überführt, gewogen und mit dem Papier in Trichter eingesetzt. Dann erfolgte so lange eine Befeuchtung mit Reinstwasser bis dieses aus dem Trichter abtropfte. Der nun maximal feuchte Boden wurde gewogen, bei 105 °C für 24 h getrocknet und dann erneut gewogen. Die maximale Wasserhaltekapazität des Versuchsbodens wurde wie folgend bestimmt.

$$[3] \quad \text{WHK}_{\max} (100 \%) = a/b * 100 = \text{Wasseraufnahme} / 10 \text{ g Trockengewicht}$$

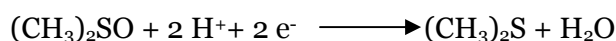
WHK_{\max} = maximale Wasserhaltekapazität

a Wassergehalt in 10 g maximal feuchtem Boden

b Trockengewicht von 10 g naturfeuchtem Boden

3.12 Messung der mikrobiellen Aktivität (DMSO-Reduktion)

Die mikrobielle Aktivität aller Inkubationsansätze dieser Studie wurde mittels eines Reduktase Tests mit DMSO (Dimethylsulfoxid) gemäß einer Vorschrift von Alef und Kleiner (1989) bestimmt. Die Reduktion verläuft nach folgender Reaktion:



Je 4 Aliquote eines Ansatzes (je 1 g naturfeuchter Boden in vorab leer gewogenen 20 mL Glasflaschen) wurden jeweils 200 µL einer 5 %igen, wässrigen DMSO Lösung tropfenweise zugesetzt. Die Proben wurden gasdicht verschlossen und für 24 h im Dunkeln bei 27 °C inkubiert. Dann wurden je 100 µL Gas aus den Flaschenräumen mit einer gasdichten Spritze entnommen und in definiertem Zeitabstand (1 min) in den Gaschromatograph injiziert und analysiert. Die injizierte DMS Menge konnte mittels einer vorab durchgeführten Kalibration am Gerätes mit Proben definierter DMS Menge berechnet werden. Zur Analyse der Proben aus der DMSO-Reduktion wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Parameter der Gaschromatographie verwendet.

Tab. 3.3: Parameter zur Messung der DMSO-Reduktion von Bodenproben und Detektion von DMS in den Kalibrationsproben mittels Gaschromatographie.

| Säulenofen | |
|---|---|
| Temperatur | 50 °C, isotherm |
| Dauer des Analyselaufes | 80 min |
| Einlass | |
| Temperatur | 250 °C |
| Säulenkopfdruck | 0,521 bar |
| Gesamtflussrate | 20,1 mL/min |
| Split Verhältnis | 16, 4:1 |
| Trägergas | Helium |
| Kapillarsäule | |
| Typ | FS-Supreme-5 (5 % Phenylpolysilylphenylsiloxan) |
| Max. Temperatur | 340 °C |
| Länge | 30 m |
| Durchmesser | 0,25 mm |
| Filmdicke | 0,25 µm |
| Fluss über Säule | 1 mL/min |
| Massenspektrometer | |
| Ionisierungsenergie (EI) | 70 eV |
| Elektronenmultiplier-Spannung | 1294,1 V |
| Temperatur der Ionenquelle | 220 °C |
| Temperatur des Quadrupol | 150 °C |
| Detektierter Massenbereich (Scan Modus) | 40,0 – 100,0 m/z |

Nach Vermessung der Bodenproben wurden diese geöffnet und bei 105 °C in einem Thermoschrank für 24 h verwahrt. Dann wurden die Glasflaschen gewogen und das Trockengewicht der Aliquote bestimmt. Zur Kalibration wurden 20 µL reines DMS in eine 100 mL Gasflasche überführt und diese gasdicht verschlossen. Durch die Inkubation der Glasflasche für 15 min bei 37 °C wurde sichergestellt, dass die komplette Menge an DMS in den Gaszustand übergetreten war. Mit einer gasdichten Spritze wurde dann Gas aus dem Flaschenraum, je 4-mal 25 µL, 2-mal 50µL und 2-mal 100 µL in separate, gasdichte 20 mL Glasflaschen überführt. Aus dem Flaschenraum dieser Kalibrationsproben wurde jeweils 100 µL Gas mit gasdichter Spritze in den Gaschromatographen in definierten Zeitabständen (1 min) injiziert und analysiert. Über die Peakfläche und die Konzentration konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden.

Die Menge gebildetem DMS je Stunde und Gramm Trockengewicht wurde wie folgt berechnet:

$$[4] \quad \text{DMSO-Reduktionsrate} = (m_{\text{DMS}} \times V_{\text{Gas}}) / t \times V_{\text{GC}} \times \text{TG}$$

m_{DMS} Masse entstandenes DMS (g)

V_{Gas} $V_{\text{Flasche}} - V_{\text{Einwaage}}$ = Volumen des freien Gasraums der Glasflasche (µL)

t Inkubationszeit (min)

V_{GC} In den Gaschromatographen injiziertes Volumen (µL)

TG Trockengewicht des Bodens (g)

Die mikrobielle Aktivität Fraktionsansätze Ton und Schluff wurden gemäß der prozentualen Anteile der jeweiligen Partikelgrößenfraktion am Gesamtboden nach folgender Formel umgerechnet:

$$[5] \quad \text{MA F1} = \text{MA F1 (isoliert)} / 100 \times B$$

MA F1 Mikrobielle Aktivität (MA) in der Korngrößenfraktion 1 als Anteil einer Gesamtprobe

OA F1 (isoliert) Durch DMSO Test bestimmte mikrobielle Aktivität in Fraktion 1

B Anteil der Korngrößenfraktion 1 am Gesamtboden (%)

3.13 Messung der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen

Phenoloxidaseaktivität:

Vor Messung wurde 1 g jeder Bodenprobe bei 105 C für 24 h getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Die Messung der Aktivität von extrazellulären Phenoloxidasen (PO) erfolgte dann gemäß einer von Floch et al. (2007) publizierten Vorschrift. Triplikate zu je 0,1 g Bodenprobe wurden in 10 mL einer MUB Pufferlösung (pH 2) gelöst und jeweils 200 µL einer 0,1 M ABTS Lösung in Reinstwasser zugegeben. Die Lösungen wurden bei 30 °C auf

einem Horizontalschüttler für 5 min bei 160 rpm im Dunkeln geschüttelt, dann 2 mL der Lösungen entnommen und in Eppendorfreaktionsgefäße (Volumen: 2 mL) auf Eis überführt, um die Reaktion zu stoppen. Die Gefäße waren mit Alufolie umwickelt, um eine mögliche Photooxidation von ABTS zu verhindern. Nach 2 min Zentrifugation bei 12000 x g, um verbleibende Bodenpartikel zu sedimentieren, wurden 500 µL der Überstände mit 500 µL MUB Puffer in 1,5 mL Einmalküvetten (PMMA, Plastibrand, Sigma Aldrich Steinheim) vermischt. Es erfolgte dann die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge 414 nm (Floch et al., 2007). Die Phenoloxidaseaktivität wurde in Units (µmol ABTS⁺ gebildet aus ABTS je Minute und Gramm Trockensubstanz Boden; Floch et al., 2007) wie folgt berechnet.

$$[6] \quad \text{Units je mL} = \Delta\text{Extinktion}/\text{min} \times \text{KV} / \varepsilon \times \text{PV} \times \text{KD}$$

| | |
|-----------------|---|
| ΔExtinktion/min | Extinktionsänderung je Minute |
| KV | Küvettenvolumen (mL) |
| ε | Extinktionskoeffizient (µmol ⁻¹ * cm ⁻¹) |
| PV | Probenvolumen (0,1 g Boden in 10 mL MUB) (mL) |
| KD | Küvetten Dicke (cm) |

Peroxidaseaktivität:

Die Bestimmung der extrazellulären Peroxidaseaktivität (PERO) der Ansätze wurde nach einer von Johnsen und Jacobsen (2008) publizierten Vorschrift mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Je 4 g Versuchsboden wurden mit 98 mL Acetatpuffer (5 °C) in einem Glasgefäß (250 mL) vermischt und für 1 h bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler im Dunkeln bei 160 rpm geschüttelt. Dann wurden je Ansatz 3-mal 250 µL der Mischung mit einer 1000 µL Eppendorfpipette mit abgeschnittener Spitze (2 mm) entnommen und in mit Alufolie umwickelte Eppendorfreaktionsgefäße (Volumen: 2 mL) überführt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µL TMB Gebrauchslösung (TMB ready-to-use-solution, Sigma Aldrich, Steinheim). Die Proben wurden in einem Eppendorf-Thermomixer bei 600 rpm und 25 °C für 5 min geschüttelt und dann 1250 µL 0,2 M Schwefelsäure zum Stoppen der Reaktion zugegeben. Die Gefäße wurden bei 12000 x g für 3 min zentrifugiert, um Bodenpartikel zu sedimentieren. Jeweils 1 mL des Überstandes wurde in 1,5 mL Einmalküvetten (Plastibrand, PMMA, Sigma Aldrich, Steinheim) überführt, und es erfolgte die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Johnsen und Jacobson, 2008). Der Natriumacetatpuffer der jeweiligen Proben wurde abdekantiert, das Bodenmaterial bei 105 °C für 24 h getrocknet und anschließend das Trockengewicht der Bodenprobe mittels Differenzwägung bestimmt. Mit 4 g Boden wurde analog verfahren aber direkt nach Zugabe von TMB die Reaktion mit 0,2 M Schwefelsäure (1250 µL) gestoppt. Die Vermessung dieser Probe ergab den Nullwert (Blank) der photometrischen Messung. Die Peroxidaseaktivität konnte unter Einbezug des Extinktionskoeffizienten x in Units (µmol TMB⁺ gebildet aus TMB je Minute) berechnet und auf das Trockengewicht der Probe bezogen werden.

$$[7] \quad \text{Units je mL} = \Delta\text{Extinktion}/\text{min} \times \text{KV} / \varepsilon \times \text{PV} \times \text{KD}$$

| | |
|--------------------------------------|--|
| $\Delta\text{Extinktion}/\text{min}$ | Extinktionsänderung je Minute |
| KV | Küvettenvolumen (mL) |
| ε | Extinktionskoeffizient ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) |
| PV | Probenvolumen (bezogen aus 4 g Boden in 98 mL Acetatpuffer) (mL) |
| KD | Küvettdicke (cm) |

Der Extinktionskoeffizient des Radikalkations ABTS⁺ wurde separat mittels ABTS Substratlösungen verschiedener Konzentration bestimmt (Kalibration). Dies erfolgte nach einer Vorschrift von Farnet et al. (2004). Substratlösungen (0,01 mM, 0,02 mM, 0,03 mM und 0,04mM ABTS in jeweils 10 mL MUB Puffer) wurden mittels Zugabe von jeweils 1mg Laccase aus *Trametes versicolor* (entsprach 20 Units) bis zum vollständigen Substratumsatz bei 30 °C für 24 h im Dunkeln auf einem Horizontalschüttler inkubiert und Aliquote dieser Lösungen einer Wellenlänge von 414 nm vermessen.

Der Extinktionskoeffizient von TMB wurde separat gemäß Johnsen und Jacobsen (2008) bestimmt. Hierzu erfolgte die Überführung von jeweils 200 μL TMB Lösungen (0,005mM, 0,01 mM, 0,015 mM, 0,02 mM in je 8 mL Natriumcitratpufferlösung (205 mM, pH 4) mit Wasserstoffperoxid (3,07 mM). Den Lösungen wurden 10 mg/mL Lignin-Peroxidase (Sigma Aldrich, Steinheim) in Reinstwasser zugesetzt (entsprach 1 Unit), dann die Proben bis zum vollständigen Substratumsatz 24 h im Dunkeln bei 30 °C auf einem bei Horizontalschüttler (160 rpm) im Dunkeln geschüttelt. Nach Zugabe von 50 mL 0,2 M Schwefelsäure erfolgte die Vermessung von jeweils 1 mL der Lösungen bei 450 nm am Photometer.

Die Phenoloxidaseaktivität und Peroxidaseaktivität der Fraktionsansätze wurden gemäß der prozentualen Anteile der jeweiligen Partikelgrößenfraktion am Gesamtboden nach folgender Formel umgerechnet:

Mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes (Formel [9]) konnten die Extinktionskoeffizienten für ABTS⁺ beziehungsweise TMB⁺ berechnet werden.

$$[8] \quad A = \varepsilon \times \text{KD} \times c$$

| | |
|---------------|---|
| A | Absorption |
| ε | Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) |
| KD | Küvettdicke (cm) |
| c | Konzentration (M) |

$$[9] \quad \text{PO/PEROX F1} = \text{PO/PEROX F1 (isoliert)} / 100 \times \text{B}$$

| | |
|------------------------|---|
| PO/PEROX F1 | Phenoloxidaseaktivität (PO) bzw. Peroxidaseaktivität (PERO) in der Korngrößenfraktion 1 als Anteil einer Gesamtbodenprobe |
| PO/PEROX F1 (isoliert) | Phenoloxidaseaktivität beziehungsweise Peroxidaseaktivität bestimmt in Fraktion 1 (Units / Gramm Trockengewicht) |
| B | Anteil der Korngrößenfraktion x am Gesamtboden (%) |

3.14 Bestimmung des Gehalts der organischen Bodensubstanz und des organischen Kohlenstoffgehaltes

Der organische Anteil des Bodens wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Glühverlust bestimmt.

Es wurden jeweils 1 g Boden beziehungsweise 1 g Partikelgrößenfraktion in zuvor leer gewogene Tiegel eingewogen und diese bei 550 °C im Muffelofen für 1 h geglüht. Dann wurden die Tiegel in einem Exsikator auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut für 30 min bei 550 °C geglüht, um Gewichtskonstanz zu erreichen. Nach Abkühlen wurden die Tiegel gewogen und die Trockenmasse sowie der Glühverlust des Bodens mittels folgender Formeln berechnet:

$$[10] \quad T_R = (A-B) / (C-B)$$

$$[11] \quad G_V = (A-D) / (A-B)$$

T_R Trockensubstanz des Bodens (%)

G_V Glühverlust der Bodenprobe (%)

A Masse des Tiegels mit der Trockenmasse der Bodenprobe (g)

B leerer Tiegel (g)

C Masse des Tiegels mit Bodenprobe (g)

D Masse des Tiegels mit geglühter Trockenmasse der Bodenprobe (g)

Der organische Kohlenstoffgehalt der Fraktionsproben wurde gemäß der prozentualen Anteile der jeweiligen Partikelgrößenfraktion am Gesamtboden nach folgender Formel umgerechnet:

$$[12] \quad OA_{F1} = OA_{F1}(\text{isoliert}) / 100 \times B$$

OA_{F1} Organischer Anteil (OA) in der Korngrößenfraktion 1 als Anteil einer Gesamtprobe (g/kg)

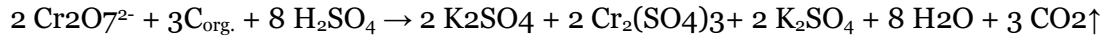
$OA_{F1}(\text{isoliert})$ Durch Glühverlust bzw. nasse Oxidation bestimmter organischer Anteil in Fraktion 1 (g/kg)

B Anteil der Korngrößenfraktion 1 am Gesamtboden (%)

Der Gewichtsverlust nach Verbrennung des organischen Bodenmaterials einer Bodenprobe (Glühverlust) stellt eine gute Annäherung an den enthaltenen organischen Kohlenstoff dar. Dieser wurde mit nasser Oxidation mit Kaliumdichromat (Titration) in Gesamtbodenproben und Fraktionsproben bestimmt:

Gemäß einer standardisierten Vorschrift (OC/C6/A/2) kann der organische Kohlenstoffgehalt einer Bodenprobe mit 1 N $K_2Cr_2O_7$ Lösung (gelöstes Kaliumsalz der Dichromsäure) nach Zugabe von Schwefelsäure unter Hitzeeinfluss oxidiert werden. Das im Kaliumdichromat enthaltene 6-wertige Chromat (Oxidationsmittel) oxidiert die organische Substanz zu CO_2 und wird hierbei zu 3-wertigem Chromat reduziert. Das verbleibende

Dichromat mit einem spezifischen Indikator (Ferroul) kann anschließend mit Eisensulfat titriert werden (Page, 1982; van Reeuwuk, 1993). Gemäß der zugrundeliegenden Reaktionsgleichung entspricht ein mL einer 1 N Dichromatlösung 3 mg Kohlenstoff (Allison et al. (1965); Schulte und Hoskins, 2009). Die Reaktion ist folgend dargestellt:



Der organische Kohlenstoffgehalt des Gesamtbodens und der Fraktionsansätze wurde in Triplikaten bestimmt. Es erfolgte hierzu die Überführung von je 0,1 g Boden beziehungsweise 0,1 g Fraktion in einen 250 mL Rundkolben und eine Zugabe von 10 mL einer 1 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Lösung. Nach mehrmaligem Schwenken wurden je Probe 20 mL konzentrierte Schwefelsäure (98 %) zugegeben und erneut geschwenkt. Der Kolben wurde dann unter Rückfluss auf 135 °C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt (20-30 min) und 200 mL Reinstwasser sowie 4 Tropfen Ferroul Indikator zugegeben. Die Lösung wurde dann mit 0,4 N Eisensulfatlösung (FeSO_4) in einer Bürette bis zum Farbumschlag des Indikators (tiefrot) titriert (Proben titration), bei Farbumschlag die Titration gestoppt und die Menge an zugegebener Eisensulfatlösung notiert. Analog wurde mit einer 1 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Lösung ohne Boden verfahren (Blank Titration). Mit folgender Formel ließ sich die Menge an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe berechnen:

$$[13] \quad \text{Org. Kohlenstoff (\%)} = 0,003 \text{ g} \times \text{N} \times 10 \text{ mL} \times (1-\text{T}/\text{S}) \times 100 / \text{T}_\text{P}$$

- N Normalität der $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Lösung
- T Volumen der verbrauchten Eisensulfatlösung bei der Proben titration
- S Volumen der verbrauchten Eisensulfatlösung bei der Blank Titration
- T_P Trockengewicht der eingesetzten Bodenmenge (Gesamtboden bzw. Fraktion)

3.15 Extraktion von Ergosterol

Ergosterol wurde sowohl aus mit nicht radioaktiv markierten Metalaxyl applizierten, auf 60 % WHK eingestellten Partikelgrößenfraktionen (Schluff und Ton) extrahiert. Hierzu erfolgte die Vermischung von jeweils 3-mal 2 g Boden in Rundkolben (250 mL) mit 2 g KOH, 20 mL Methanol (wasserfrei) und 5 mL Ethanol (wasserfrei). Die Proben wurden erhitzt und für 5 min bei 70 °C unter mehrmaligem Schütteln belassen, dann nach Abkühlen auf Raumtemperatur 5 mL Reinstwasser zugegeben und die Proben erneut bei Raumtemperatur für 30 min belassen bis der Boden sedimentiert war. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt und der verbliebene Boden mit 20 mL Methanol (wasserfrei) gewaschen. Nach erneuter Sedimentation (30 min) wurde die Waschlösung mit dem ersten Überstand vereinigt und diese Lösung mit 30 mL Hexan extrahiert. Es erfolgte die Abtrennung der Hexanphase und die Entfernung des Lösungsmittels durch Rotationsverdampfung. Dann wurde der Trockenrückstand in 2 mL Methanol (reinst.) bei

einer Beschallung im Ultraschallbad (5 min) gelöst. Die Proben wurden in HPLC Probengefäße steril filtriert und bis zur Analyse mit HPLC verschlossen im Dunkeln bei 4 °C verwahrt. Nach Analyse der Extrakte wurde der Gehalt von Ergosterol im Versuchsboden und den isolierten Korngrößenfraktionen bestimmt (siehe Abschnitt 3.18.2).

3.16 Inkubation von ¹⁴C-Metalaxyl und Resorcinol oder Huminsäuren mit Laccase oder Lignin-Peroxidase im Modellsystem

Es wurde ¹⁴C-Metalaxyl einem wässrigen Puffer mit Phenoloxidase bzw. Peroxidase und organischem Material (Resorcinol bzw. technische Huminsäuren) zugegeben, um eine mögliche Einbindung des Fungizids bei der Polymerisation (*in vitro*) zu untersuchen. Das Verfahren folgte einer publizierten Vorschrift von Kang et al. (2002).

Hierzu wurden jeweils 3-mal 1 mg Laccase aus *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 10 mL Phosphatpuffer (pH 7) gelöst (entspricht 20 Units). Die Lösungen wurden in Falconreaktionsgefäße (50 mL) überführt und ¹⁴C-Metalaxyl (1548547,8 dpm) sowie 1 mg ABTS als Mediator zugegeben. Das Gemisch wurde für 48 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm im Dunkeln bei 27 °C geschüttelt. Jeweils 3 Ansätze mit gleicher Menge an Puffer und ¹⁴C-Metalaxyl wurden mit 10 mg Lignin-Peroxidase (Sigma-Aldrich, Steinheim) (entspricht 1 Unit) vermischt und zusätzlich 140 µL Wasserstoffperoxidlösung (38 %) zugegeben. Das Gemisch wurde für 48 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm im Dunkeln bei 27 °C geschüttelt. Diese Gemische stellten die ersten Kontrollen des Experimentes dar.

Jeweils 3 Ansätze mit gleicher Menge an Puffer und ¹⁴C-Metalaxyl wurden mit 5 mg Resorcinol gemischt und für 48 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm im Dunkeln bei 27 °C geschüttelt. Zusätzlich wurden gleiche Mengen an Puffer und ¹⁴C-Metalaxyl mit 5 mg Huminsäuren (techn.) vermischt und für 48 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm im Dunkeln bei 27 °C geschüttelt. Dies war eine zweite Kontrolle des Experimentes.

Jeweils 6 Ansätze wurden mit analogen Mengen Laccase (20 Units) und ¹⁴C-Metalaxyl angefertigt. Von diesen wurden 3 mit jeweils 5 mg Resorcinol und 3 mit jeweils 5 mg Huminsäuren (techn.) für 48 h auf einem Horizontalschüttler bei 170 rpm im Dunkeln bei 27 °C inkubiert.

Jeweils 6 weitere Ansätze wurden anstatt Laccase je 10 mg Lignin-Peroxidase zugesetzt und die Ansätze dann analog behandelt.

Alle Proben wurden nach Inkubation bei 3900 x g für 30 min zentrifugiert. Die Radioaktivität der Überstände wurde in Aliquoten mit LSC quantifiziert. Die in den Falcons verbliebenen Pellets wurden 4-mal mit je 5 mL Phosphatpuffer gewaschen, die Waschlösung nach Zentrifugation (3900 x g, 30 min) abdekantiert und dann je Ansatz die Waschlösungen vereinigt und ihre Radioaktivität in Aliquoten mit LSC quantifiziert. Die nach den Waschzyklen verbliebenen Pellets wurden in 5 mL Reinstwasser gelöst und in einen Dialyseschlauch (Spectra Por, Typ Spectra/Por6) mit einem Volumen von 6,4 mL/cm und einer Durchlässigkeit von 1000 MWCO (engl.: molecular weight cut off) eingefüllt. Das untere Ende des Schlauchs war mit einer Metallklammer verschlossen. Das obere Ende des Dialyseschlauchs wurde mit einer zweiten Klammer verschlossen und dieser dann in ein Becherglas mit 50 mL Reinstwasser gehängt. Das Reinstwasser wurde mit einem Magnetrührer und Rührfisch für 24 h vermischt, ausgetauscht und erneut für 24 h vermischt. Es erfolgte die Vereinigung des Reinstwassers beider Zyklen und die Bestimmung ihrer Radioaktivität in Aliquoten mit LSC. Die nach Dialyse verbliebene Radioaktivität in den Pellets wurde mathematisch berechnet, indem die Radioaktivität in den Waschlösungen und dem Dialysewasser jeder Probe summiert und von der zu Versuchsbeginn eingesetzten Radioaktivität abgezogen wurde. Die final im Pellet verbliebene Menge Radioaktivität wurde dann als Anteil nicht extrahierbarer Radioaktivität des jeweiligen Ansatzes bei der Auswertung des Experiments bezeichnet.

3.17 Inkubation von ¹⁴C-Metalaxyl und Laccase und isolierten Huminstoff-Fractionen mit Laccase oder Lignin-Peroxidase im Modellsystem

Eine von Laccase und Lignin-Peroxidase katalysierte Einbindung von ¹⁴C-Metalaxyl in Huminstoff-Fractionen des Bodens wurde wie folgt untersucht. Aus nicht appliziertem Gesamtboden isolierter Schluff (20 g) wurde in eine Huminstoff-Fraktionierung eingesetzt (siehe Abschnitt 3.9). Jeweils 5 mg der lyophilisierten Nicht-Humine, Humine, Fulvinsäuren und Huminsäuren wurden mit ¹⁴C-Metalaxyl (1109726 dpm) und Laccase (1 mg) beziehungsweise Lignin-Peroxidase (10 mg) und 10 mL Phosphatpuffer (pH 7) in Falconreaktionsgefäßen (50 mL) gemischt und für 48 h bei 27 °C und 170 rpm im Dunkeln geschüttelt. Alle Proben wurden dann bei 3900 x g für 30 min zentrifugiert. Die Radioaktivität der Überstände wurde in Aliquoten mit LSC quantifiziert. Die in den Falconreaktionsgefäßen verbliebenen Huminstoff-Fractionen wurden 2-mal mit je 10 mL Phosphatpuffer gewaschen, der Puffer nach Zentrifugation (3900 x g, 30 min) abdekantiert und mit LSC vermessen. Die Waschlösung wurde mit Ethylacetat extrahiert und mit HPLC analysiert. Die nach dem letzten Waschritt mit Zentrifugation abgetrennten, festen Huminstoff-Fraktion, wurde je Probe in 4 gleiche Teile aufgeteilt und deren Radioaktivität

mit Verbrennungsanalyse bestimmt. Als Kontrollansätze wurde ^{14}C -Metalaxyl (1109726 dpm) mit gleichen Mengen der Huminstoff-Fractionen ohne Enzyme inkubiert und mit diesen Proben analog verfahren.

3.18 Analytische Methoden

Zur Analyse aller Extrakte und der Analyse der Referenzsubstanzen wurden verschiedene chromatographische Methoden genutzt.

3.18.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Extrakte der Inkubationsansätze wurden zusätzlich zur Analyse mittels HPLC mit einer Dünnschichtchromatographie (DC) vermessen. Die jeweiligen Extrakte (jeweils ca. 5000 dpm) wurden überwiegend mittels einer Linomat IV Auftragsmaschine (Camag, Berlin) auf Kieselgelplatten (Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen. Als Standards für die Co-Chromatographie wurden Metalaxyl und Metalaxylsäure separat aufgetragen. Fließmittel war Ethylacetat + 0,1 % Essigsäure (v/v). Nach dem Lauf wurden die Platten unter einer UV Lampe (254 nm) betrachtet und die Lage der Standards markiert. Die Kieselgelplatten wurden dann mit einem Tracemaster 40 (Berthold, Bad Wildbad) und einem Bioimager (Fujifilm/Raytest, Straubenhardt) analysiert. Mittels der Bas Software konnten somit die prozentualen Verteilungen der Radioaktivität je Probe berechnet werden. Nach Verwendung wurde jeder Fotofilm in einem Eraser für weitere Verwendungen gelöscht.

3.18.2 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC Analyse der Extrakte von Inkubationsansätzen:

Die qualitative und quantitative Analyse der Extrakte erfolgte an einer Agilent HPLC mit UV RAD Detektor sowie Flüssigszintillationsmesszelle (Radiodetektor). Desweiteren wurde eine Beckman HPLC Anlage mit UV/VIS Detektor und Feststoffszintillatormesszelle (Radiodetektor) genutzt. Die Trennung erfolgte jeweils unter Einsatz einer C_{18} Nucleosil Trennsäule (Macherey-Nagel, Düren) und den Laufmitteln Reinstwasser (A) und Acetonitril (B). Beide Laufmittel enthielten 0,1 % Ameisensäure (v/v). Die Einspritzmenge des vorab steril filtrierten Extrakts (gelöst in Anfangseluent der HPLC Messung) in das System betrug je Probe 100 μL (entsprach 50000 dpm). Die Absorption der Substanzen wurden bei den Wellenlängen 205 nm und 217 nm gemessen. Bei der Analytik mittels Agilent HPLC mit Flüssigszintillationsmesszelle wurde ab Einspritzung für 30 min des Laufs kontinuierlich Flüssigszintillator (Lumasafe) in einer Rate von 1,8 mL/min zugepumpt. Mit einer Flussrate von 1 mL/min wurde folgendes Zeitprogramm der Gradientenelution gewählt:

0 - 10 min B: 10% ; A:90%
10 - 25 min B: linear von 10 % auf 90 % ; A: linear von 90 % auf 10 %
25 - 35 min B: 90 % ; A: 10 %
35 - 40 min B: linear von 90 % auf 10 % ; A: linear von 10 % auf 90 %
40 - 45 min B: 10 % ; A: 90 %

Das aufgeführte Zeitprogramm der Gradientenelution und die genutzten Laufmittel entsprachen einer Versuchsvorschrift aus einer Studie von Sukul und Spittler (2001b). Als Referenzsubstanzen wurden nicht markierte Standards: Metalaxyl und Metalaxylsäure (je 100 µg/mL in Anfangseluent) eingesetzt. Vor Analyse wurde geprüft, dass die in das System injizierte Radioaktivität nach Messung wieder vollständig im Lösungsmittelausfluss enthalten war. Somit wurde sichergestellt, dass keine Radioaktivsubstanz im System im Messgerät zurückgehalten wurde.

Aufreinigung von Metalaxylsäure mittels HPLC:

Die aus Synthese gewonnene Referenzsubstanz Metalaxylsäure (siehe Abschnitt 3.1) wurde mit der Beckman HPLC mit UV/VIS Detektor bei analogen Bedingungen präparativ über die C₁₈ Nucleosil Trennsäule (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt.

HPLC Analyse der Ergosterol-Extrakte:

Je 100 µL der Extrakte der Bodenproben wurden in das HPLC System (Agilent HPLC mit UV RAD Detektor) injiziert und die Absorption des Ergosterols bei den Wellenlängen 282 nm und 292 nm detektiert. Als Laufmittel wurde 95% Methanol (in Reinstwasser) isokratisch zugepumpt. Als Säule wurde eine C₁₈ Nucleosil Trennsäule (Macherey-Nagel, Düren) verwendet; die Flussrate des Laufmittels betrug 1 mL/min. Zur Quantifizierung der im Boden befindlichen Ergosterolmenge wurden Ergosterol-Standards (1 mg/mL, 100,200 und 300 µg/mL) zur Kalibration genutzt. Über die Peakflächen und die Konzentrationen wurde die Kalibrationsgerade erstellt.

3.18.3 Hochdruckflüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektroskopie (LC-MS)

Ausgewählte Extrakte wurden mit LC-MS/MS qualitativ analysiert. Die Trennung erfolgte jeweils unter Einsatz einer C₁₈ Nucleosil Trennsäule (Macherey-Nagel, Düren) und den Laufmitteln Reinstwasser (A) und Acetonitril (B) (jeweils 0,1 % Ameisensäure (v/v)). Die Einspritzmenge des vorab steril filtrierten Extrakts (gelöst in Anfangseluent der HPLC Messung) in das System betrug je Probe 20 µL. Bei einer Flussrate von 0,4 mL/min und 25 °C Säulentemperatur wurde folgendes Zeitprogramm der Gradientenelution gewählt:

0 - 5 min B: 10% ; A:90%
5 - 23 min B: linear von 10 % auf 50 % ; A: linear von 90 % auf 50 %
23 - 25 min B: : linear von 50 % auf 90 % ; A: linear von 50 % auf 10 %
25 - 37 min B: 90 % ; A: 10 %
37 - 45 min B: linear von 90 % auf 10 % ; A: linear von 10 % auf 90 %
80

Als Detektor diente eine LTQ Iontrap (Thermo Fisher, Dreieich) mit einer H-ESI II Ionenquelle, die im positiven Modus betrieben wurde. Die Analyse der Proben erfolgte bei folgend aufgeführten Parametern:

| | |
|--|---------|
| Heizblocktemperatur: | 150 °C |
| Gasfluss in Injektionskapillare: | 25 arb. |
| Zusätzlicher Gasfluss des Trägergases: | 10 arb. |
| Ionensprayladung: | 8 kV |
| Kapillartemperatur: | 350 °C |
| Kapillarspannung: | 24 V |

Als Abschirmungs- und Auxillary Gas wurde Stickstoff verwendet. Helium diente mit einem Druck von 0,1 Pa als Kollisionsgas. Die Detektion der Substanzen erfolgte nach SIM (engl.: Single Ion Monitoring) bei den angegebenen Retentionszeiten und Masseladungsbereichen (siehe Tabelle 3.5).

Tab. 3.4: Single Ion Monitoring Daten zur Auswertung der LC-MS/MS Analyse inklusive Retentionszeiten, Verbindungen, korrespondierenden Masseladungszahlen und Masseladungszahlen der Fragmentionen.

| Verbindung | Retentionszeit (min) | [M+H⁺] (m/z) | Fragment-Ion (m/z) |
|---|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Metalaxyl | | | |
| [N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanin-methyl ester] | 28,64 | 280,09 | 266,15 |
| Metalaxylsäure | | | |
| N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanin | 26,54 | 266,13 | 198,14 |
| N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxylacetamide | 26,26 | 194,08 | 162,97 |

3.18.4 Gasschromatographie mit Massenspektroskopie (GC-MS)

Metalaxyl wurde mit einem Gaschromatographen analysiert, um eine Übersicht über die Fragmentierung der Substanz und der Struktur der Fragmente zu erhalten (Parameter der Messung sind in Tabelle 3.4 aufgeführt). Es wurden 1 mg Metalaxyl in 10 mL Methanol (reinst.) gelöst, 1 µL der Lösung (100 ng Metalaxyl) in den Gaschromatographen injiziert und

unter den in Tabelle 3.4 aufgeführten Parametern analysiert. Das Ergebnis dieser Messung ist im Anhang der vorliegenden Arbeit aufgeführt (Abbildung A1).

Tab. 3.5: Parameter für die Messung von Metalaxyl mit Gaschromatographie.

| Säulenofen | |
|---|------------------------------|
| Anfangstemperatur des Säulenofens | 50 °C |
| Dauer des Analyselaufes | 33 min |
| Temperaturübergang zum MS | 250 °C |
| Temperaturgradient | |
| 0 bis 5 min | 50 °C |
| 5 bis 23 min | von 50 °C auf 280 °C |
| 23 bis 33 min | 280 °C |
| Einlass | |
| Temperatur | 250 °C |
| Säulenkopfdruck | 0,528 bar |
| Gesamtflussrate | 53,8 mL/min |
| Splitless Injektion | |
| Trägergas | Helium |
| Kapillarsäule | |
| Typ | M&N 726154.30V3 OPTIMA 35-MS |
| Max. Temperatur | 340 °C |
| Länge | 30 m |
| Durchmesser | 0,25 mm |
| Filmdicke | 0,25 µm |
| Massenspektrometer | |
| Ionisierungsenergie | 70 eV |
| Elektronenmultiplier-Spannung | 1294,1 V |
| Temperatur der Ionenquelle | 220 °C |
| Temperatur des Quadrupol | 150 °C |
| Detektierter Massenbereich (Scan-Modus) | 50,0 – 550 m/z |

3.19 Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung

Alle in der vorliegenden Studie dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte paralleler Versuchsansätze, die mit ihrer Standardabweichungen und der Stichprobenanzahl (n) der untersuchten Proben angegeben sind. Signifikante Abweichungen wurden mit der Software SigmaStat 32 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) für ausgewählte Messwerte ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Inkubationen in Modellsystemen

Eine enzymtisch katalysierte Polymerisation von Resorcinol und technischen Huminsäuren als Vertretern organischer Bodenbestandteile und die gleichzeitige mögliche Co-Polymerisation von ^{14}C -Metalaxyl bei diesem Prozess sollte anhand von *in vitro* Inkubationen im Modellsystem untersucht werden (siehe Abschnitt 3.16). Aus Schluff nicht applizierten Versuchsbodens isolierte Huminstoff-Fractionen wurden mit Laccase aus *Trametes versicolor* und Lignin-Peroxidase und ^{14}C -Metalaxyl ebenfalls im Modellsystem inkubiert, um eine mögliche enzymatisch katalysierte Einbindung des Fungizids in diesen Fraktionen zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.17)

4.1.1 Inkubation von ^{14}C -Metalaxyl und Resorcinol oder Huminsäuren mit Laccase oder Peroxidase

In Abbildung 4.1 ist die wiedergefundene Radioaktivität der *in vitro* Ansätze (Triplikate), die nach den Waschschritten im Puffer und nach der Dialyse im Wasser quantifiziert wurde, sowie die danach rechnerisch im Polymer, d.h. im Pellet gebundene Radioaktivität, die als ^{14}C -Metalaxyl eingebracht wurde, aufgezeigt. Die Anteile sind jeweils auf die zum *in vitro* Ansatz applizierte Radioaktivität (1548548 dpm) bezogen.

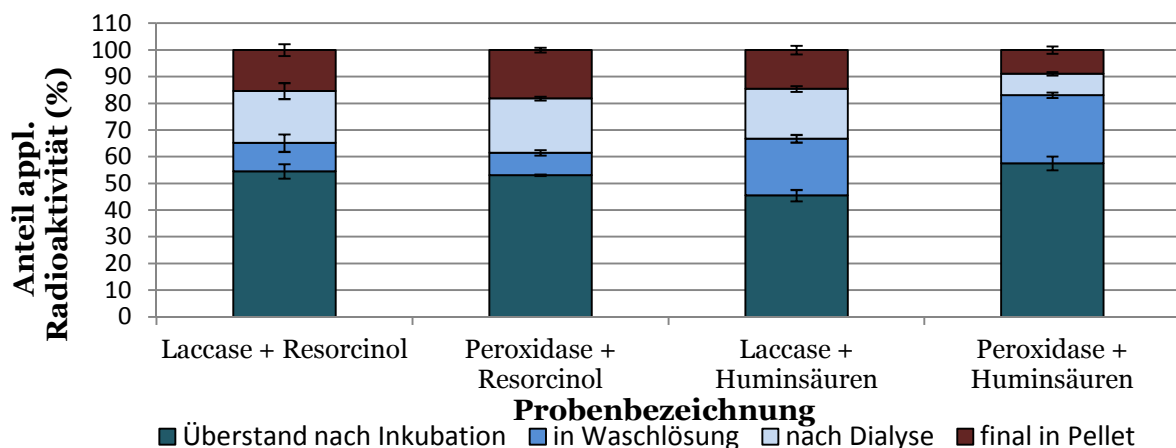


Abb. 4.1: Wiederfindung der applizierten Radioaktivität in Modellsystemen (jeweils $n=3$) mit ^{14}C -Metalaxyl und Resorcinol oder technischen Huminsäuren mit Laccase oder Lignin-Peroxidase in Mittelwerten inklusive Standardabweichung.

Mit Ausnahme der Kontrollen (siehe Abschnitt 3.16) konnte in allen Ansätzen beobachtet werden, dass sich die Inkubationslösung nach der Inkubation verfärbt hatte. Im Fall der Proben mit Resorcinol war diese bräunlich, in den Proben mit technischen Huminsäuren schwärzlich gefärbt. Nach Zentrifugation waren die Lösungen nur noch schwach gefärbt und

es bildeten sich Pellets, die folgend gewaschen wurden. Nach Inkubation lag im Überstand in diesen Proben jeweils mehr als 40 % der applizierten Radioaktivität vor. Die folgenden Waschschrte lösten signifikant weniger Radioaktivität aus den Pellets als im Überstand nach Inkubation gemessen wurde, wobei in den Proben mit technischen Huminsäuren mehr der applizieren Radioaktivität aus dem Pellet gewaschen wurde (> 20%) als in den Proben mit Resorcinol (ca. 10 %). Nach Dialyse verblieb in den Pellets ein signifikanter Anteil der applizierten Radioaktivität. Dieser Anteil betrug nach enzymatischer Polymerisation von Resorcinol durch die Enzyme jeweils etwas mehr als 15 %. Weniger Radioaktivität (< 15 %) wurde in technische Huminsäuren eingebunden, wobei nach Inkubation mit Laccase etwa 14,5 % und nach Inkubation mit Lignin-Peroxidase etwa 8,8 % der Radioaktivität im Pellet nach Dialyse verblieb. In den Kontrollansätzen ohne Zugabe von Laccase und Lignin Peroxidase wurde kein Pellet gebildet. Des Weiteren ließ sich nach Inkubation beider Enzyme mit dem Fungizid ohne Resorcinol oder Huminsäuren nach Extraktion des Inkubationspuffers anhand von HPLC-Analysen feststellen, dass nur ¹⁴C-Metalaxyl in den Extrakten vorlag.

4.1.2 Inkubation von ¹⁴C-Metalaxyl und isolierten Huminstoff-Fraktionen mit Laccase oder Lignin-Peroxidase

Nach Inkubation von ¹⁴C-Metalaxyl und isolierten Huminstoff-Fraktionen mit Laccase aus *Trametes versicolor* oder Lignin-Peroxidase wurden die Huminstoff-Fraktionen durch Zentrifugation sedimentiert und mehrfach mit Puffer gewaschen. Es ist festzustellen, dass die größten Anteile der applizierten Radioaktivität sowohl in den Ansätzen mit Laccase als auch denen mit Lignin-Peroxidase im Puffer (Überstand nach der Zentrifugation) vorlag. In den Überständen der Ansätze mit Fulvinsäuren, Nicht-Huminen und Huminen betrug diese Anteile etwa 40 bis 50 % während in den Überständen der Ansätze mit Huminsäuren signifikant mehr Radioaktivität im Überstand vorlag (etwa 65-70 %). Nach einem ersten Waschschrte mit Phosphatpuffer lagen in den Ansätzen mit Fulvinsäuren, Nicht-Huminen und Huminen etwa 25 bis maximal 40 % der applizierten Radioaktivität in der Waschlösung vor. In der Waschlösung der Ansätze mit Huminsäuren war dieser Anteil geringer und betrug etwa 15 %. Dies galt sowohl für die Proben mit zugesetzter Laccase als auch für die mit zugesetzter Lignin-Peroxidase. In allen Ansätzen lagen nach dem zweiten Waschschrte maximal 5 % der applizierten Radioaktivität in der Waschlösung vor. Nach HPLC-Analyse wurde festgestellt, dass die Radioaktivität im Extrakt der Waschlösungen allein auf ¹⁴C-Metalaxyl beruhte. In allen Proben verblieb ein Anteil der applizierten Radioaktivität in den festen Huminstoffen. In den Ansätzen mit zugesetzter Laccase verblieben in den Huminen etwa 14 % und in den Huminsäuren etwa 7 % der applizierten Radioaktivität wohingegen in den Nicht-Huminen und Fulvinsäuren weniger als 3 % verblieben. In den Ansätzen mit zugesetzter Lignin-Peroxidase verblieben in den Huminen etwa 21 % und in den Nicht-

Huminen etwa 15 % der applizierten Radioaktivität. In den Huminsäuren und Fulvinsäuren verbleiben jeweils etwa 6 % der applizierten Radioaktivität. Die Mittelwerte der wiedergefundenen Radioaktivität im Puffer nach den drei Waschschrritten und der in den Fraktionen danach noch gebundenen Radioaktivität sind bezogen auf die applizierte Radioaktivität in Abbildung 4.2 aufgezeigt.

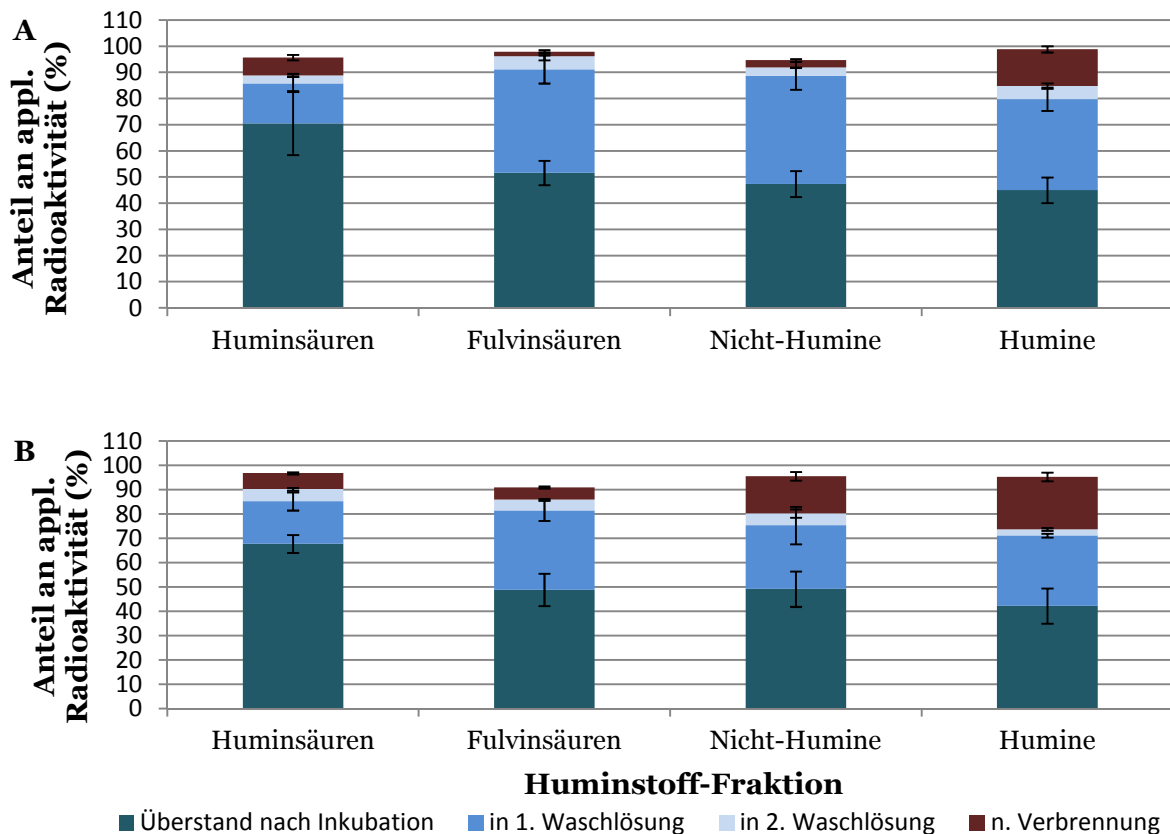


Abb. 4.2: Mittelwerte der wiedergefundenen Radioaktivität in *in vitro* Ansätzen (jeweils n = 3) mit ^{14}C -Metalaxyl und isolierten Huminstoff-Fractionen und Laccase (A) oder Lignin-Peroxidase (B) inklusive Standardabweichung. Die Radioaktivität wurde nach Inkubation im Überstand nach der jeweiligen Fraktion, in der Waschlösung nach 1-maligen und 2-maligen Waschen und in den sedimentierten Huminstoffen nach dem letzten Waschschrtritt (gebundene Radioaktivität) quantifiziert.

In den Kontrollansätzen ohne Zugabe von Enzymen konnte in allen Ansätzen mehr als 95 % der applizierten Radioaktivität mit den ersten zwei Waschschrritten aus den Huminstoffen freigesetzt werden.

4.2 Vergleich der Extraktionsmethoden

Vor Beginn aller Inkubationsexperimente sollte eine erschöpfende Extraktionsmethode für ^{14}C -Metalaxyl aus dem Boden unter Einsatz verschiedener Methoden der Extraktion ermittelt werden (in Abschnitt 3.6 erläutert). Da in der vorliegenden Studie zum einen Bodenproben nach Inkubation in ihre Partikelgrößenfraktionen aufgetrennt werden sollten und zu anderen diese Methode auch genutzt wurde, um isolierte Fraktionen in Inkubationsexperimenten

einzusetzen, musste auch der Einfluss dieser Methode untersucht werden. Abbildung 4.3 zeigt die Anteile extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität (ER; NER) in diesen Proben (Triplikate).

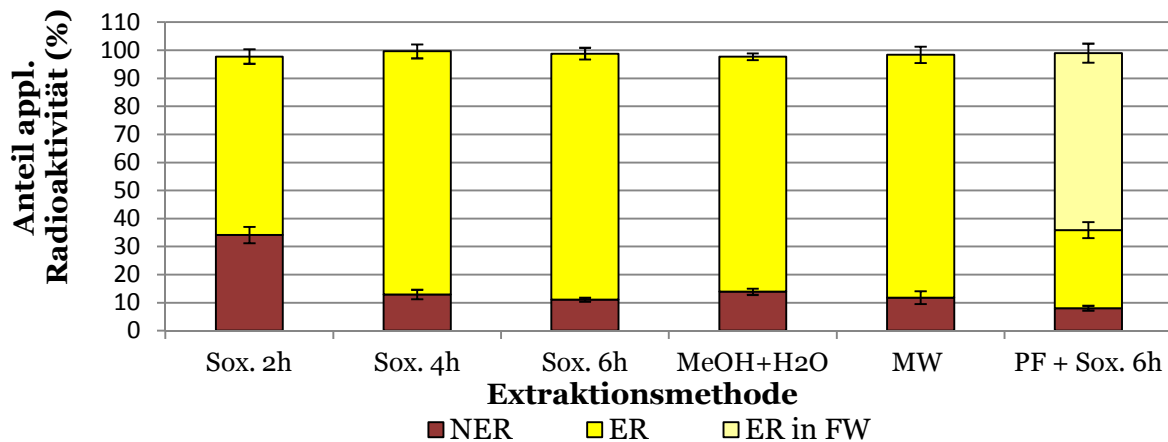


Abb. 4.3: Wiederfindung von ^{14}C in Bodenproben ($n=3$) nach 10 Tagen Inkubation mit ^{14}C -Metalaxyl nach verschiedener Extraktion der Proben. Dargestellt ist die extrahierbare Radioaktivität ER (dunkelgelb) und nicht extrahierbarer Radioaktivität NER (dunkelrot) in Mittelwerten bezogen auf die applizierte Radioaktivität inklusive Standardabweichung. Sox. = Soxhlet Extraktion für 2h, 4h, 6h; MeOH+H₂O = Extraktion mit Methanol und Wasser; MW = Mikrowellenextraktion mit Acetonitril/H₂O; PF + Sox. 6h = Partikelgrößenfraktionierung und anschließende Soxhlet-Extraktion der Fraktionen für jeweils 6h. In diesen Proben (PF+Sox. 6h) setzte sich der ER Anteil aus der Radioaktivität im Fraktionswasser (hellgelb) und der Radioaktivität in den Soxhlet-Extrakten der Fraktionen (dunkelgelb) zusammen.

Die Wiederfindung lag bei allen Proben zwischen 95 und 105 %. Der Anteil der nicht extrahierbaren Radioaktivität (NER) nach Soxhlet Extraktion (2 h) war mit 34,11 % am höchsten. Eine längere Extraktionsdauer (4 h) erniedrigte den Anteil auf 12,9 % und nach Extraktion für 6 h verblieben 11 % der Radioaktivität als NER im Boden. Der Anteil an NER nach Extraktion mit Methanol und Methanol/Wasser-Gemisch lag nur geringfügig höher bei 13,9 %. Nach einer Mikrowellenextraktion mit Acetonitril/Wasser wurden 11,8 % der applizierten Radioaktivität als NER quantifiziert. Nach Partikelgrößenfraktionierung und anschließender Soxhlet-Extraktion der Fraktionen lagen bereits große Anteile der insgesamt extrahierbaren Radioaktivität im Fraktionswasser vor (63,1 %) und der Anteil der NER in diesen Proben war am kleinsten (8 %). Dieser setzte sich aus den NER in Ton (2 %), Schluff (5 %) und Sand (1 %) zusammen. Das Fraktionswasser dieser Proben war bräunlich gefärbt. Nach Zentrifugation dieser Partikel lag jedoch in allen drei parallelen Ansätzen mehr als 97 % der Radioaktivität im Überstand des Fraktionswassers vor.

4.3 Prozentuale Verteilung der Korngrößenfraktionen

Die prozentualen Anteile von Sand, Schluff und Ton am Versuchsboden sind als Mittelwerte nach insgesamt 46 in dieser vorliegenden Studie vorgenommenen Partikelgrößen-

fraktionierungen (Aufarbeitungen der Gesamtbodenproben, Aufarbeitung Ansätze mit/ohne Enzymzugabe und der Gewinnung der Fraktionsproben; siehe Abschnitt 3.8) folgend angegeben:

Sand: 27,6 (+/-) 1,5 %, **Schluff** 45,3 (+/-) 2,2 % und **Ton** 24,9 (+/-) 2,6 %

Die Effizienz der Partikelgrößenfraktionierung wurde anhand von Sedimentationsexperimenten (siehe Abschnitt 3.8) untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass nach Partikelgrößenfraktionierung weniger als 3 % (+/-) 0,4 der Schlufffraktion noch aus Tonpartikeln bestand.

4.4 Kontrolle der Sterilisationsmethoden

Die Sterilisation der Bodenproben der vorliegenden Studie sollte genutzt werden, um eine Differenzierung biotischer und abiotischer Einflüsse auf das Schicksal von ¹⁴C-Metalaxyl im Boden zu ermöglichen und auch zwischen den Quellen enzymatischer Aktivität unterscheiden zu können (in Abschnitt 3.3.2 erläutert). Im Vorfeld aller Inkubationsversuche wurde deshalb die Effizienz jeder verwendeten Sterilisationstechnik von Bodenproben geprüft (siehe Abschnitt 3.3.3). Nach Sterilisation wurden im Boden möglicherweise verbliebene intakte Mikroorganismen extrahiert und im Extraktionspuffer auf Vollmedienplatten für Pilze (Czapeck-Dox; CZ) und Bakterien (Standard Nährmedium I; S1) ausgebracht und diese 48 h bei 37 °C inkubiert. Zum Vergleich wurden auch Mikroorganismen aus nicht sterilem Boden extrahiert und auf Vollmedienplatten ausgebracht. Das Wachstum wurde auf den Platten dokumentiert und ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Der Bewuchs, beziehungsweise fehlende Bewuchs auf den beiden Vollmedienplatten ist exemplarisch in Fotografien in Abbildung 4.4 dargestellt.

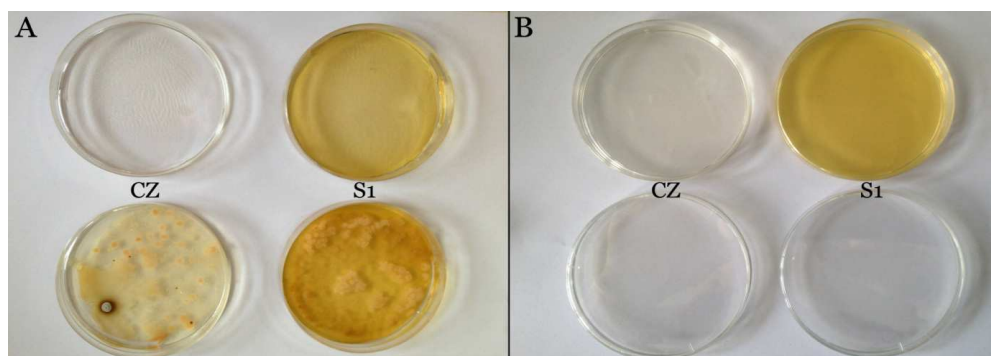


Abb. 4.4: Fotografische Dokumentation des Plattenbewuchses auf Vollmedienplatten Czapeck-Dox (CZ) und Standardnährmedium 1 (S1) vor Beimpfen mit Extraktionspuffer (oben) und nach Beimpfen und Inkubation für 48 h und 37 °C (unten). Die Platten wurden nach Extraktion von Mikroorganismen aus einer nicht sterilen Bodenprobe (A) und einer sterilen Bodenprobe (γ -bestrahlt; B) beimpft.

Tab. 4.1: Kontrolle der Sterilisation von Bodenproben nach 92 Tagen Inkubation. Ein bakterieller Bewuchs auf Vollmedienplatten (Standard Nährmedium I = S1) und ein Pilzbewuchs auf den Vollmedienplatten (Czapeck-Dox = CZ) ist mit einem (+) angegeben. Wurde kein Bewuchs beobachtet ist dies mit einem (-) angezeigt. Probenanzahl n = 3.

| Sterilisation des Bodens | Bewuchsauf S1-Platten | Bewuchs auf CZ-Platten |
|---|------------------------------|-------------------------------|
| keine | + | + |
| γ -Bestrahlung | - | - |
| Quecksilberchlorid + Fumigation | - | - |
| Autoklavieren + γ -Bestrahlung + Natriumazid und Phenylhydrazin | - | - |

Ein Bewuchs auf den Vollmedienplatten ließ sich nur nach Extraktion von Mikroorganismen aus nicht sterilisiertem Boden feststellen. Jede der verwendeten Sterilisationstechniken bewirkte, dass in dem jeweiligen Bodenextrakt keine lebensfähigen Mikroorganismen mehr vorhanden waren, die auf den verwendeten Vollmedienplatten wachsen konnten (Tabelle 4.1). Die Sterilität der Inkubationsansätze wurde nach der jeweiligen Inkubationsdauer zusätzlich mit DMSO-Reduktion überprüft, die gleichzeitig der Messung der mikrobiellen Aktivität diene.

4.5 Biologische und chemische Charakteristika der Inkubationsansätze im stationären System

4.5.1 Gesamtbodenproben

Nicht sterile und auf verschiedene Art sterilisierte Proben des Gesamtbodens wurden mit ^{14}C -Metalaxyl inkubiert und folgende biologische und chemische Charakteristika gemessen: die mikrobielle Aktivität mit DMSO-Reduktion (siehe Abschnitt 3.12), der Gehalt organischer Substanz (mit Glühverlust, siehe Abschnitt 3.14) und der Gehalt organischen Kohlenstoffs (mit nasser Oxidation, siehe Abschnitt 3.14), der pH-Wert (siehe Abschnitt 3.11.1) und die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen (siehe Abschnitt 3.13).

4.5.1.1 Mikrobielle Aktivität

Die mikrobielle Aktivität in nicht sterilen und auf verschiedene Weise sterilisierten Gesamtbodenproben wurde nach 10 und 92 Tagen Inkubation bestimmt. Da jeder der Proben vor Applikation mit ^{14}C -Metalaxyl mit Seesand zur besseren Aufarbeitung vermischt war, wurde dessen mikrobielle Aktivität anhand von Kontrollen gemessen. Die mittels

DMSO-Reduktion bestimmte mikrobielle Aktivität der Gesamtbodenproben und Kontrollen (jeweils Triplikate) ist in ihren Mittelwerten und Standardabweichung in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tab. 4.2: Die DMSO-Reduktion der Gesamtbodenproben und Kontrollen (Seesand), jeweils (n=3), nach 10 und 92 Tagen Inkubation mit ihrer jeweiligen Standardabweichung. DMS = Dimethylsulfid; TG = Trockengewicht Boden. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | DMSO-Reduktion (ng DMS/ h * g TG) |
|---|------------------------------------|--|
| Ultuna (nativ) | 10 | 252,6 (+/-) 95,4 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 333,4 (+/-) 15,0 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 10 | 35,4 (+/-) 19,6 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 92 | 48,4 (+/-) 7,1 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 21,6 (+/-) 4,0 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 42,5 (+/-) 8,6 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 10 | 13,9 (+/-) 2,0 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 92 | 16,0 (+/-) 3,1 |
| Kontrolle | 10 | 19,6 (+/-) 4,5 |
| Kontrolle | 92 | 16,2 (+/-) 6,9 |

Es ließ sich feststellen dass die größte mikrobielle Aktivität zu beiden Zeitpunkten in den nicht sterilen Gesamtbodenproben gemessen wurde. Nach 10 Tagen Inkubation betrug die Menge gebildeten DMS je Stunde und g Trockengewicht Boden 252,6 ng und nach 92 Tagen Inkubation 333,4 ng. Die Menge gebildeten DMS war in den sterilen Ansätzen Ultuna (Ultuna_γ-bestrahlt, Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}) deutlich geringer und betrug zu beiden Zeitpunkten weniger als 50 ng. In den Ansätzen Ultuna_{SE.ST.} und den Kontrollen wurde sowohl nach 10 als auch nach 92 Tagen Inkubation weniger als 20 ng DMS gebildet. Mit Ausnahme der Kontrollen ließ sich jedoch eine Zunahme der DMSO-Reduktase Aktivität in allen Ansätzen mit zunehmender Inkubationsdauer feststellen.

4.5.1.2 Gehalt organischen Bodenmaterials und pH-Wert

Die Mittelwerte der Bestimmungen organischen Kohlenstoffs und des organischen Bodengehalts der Gesamtbodenproben sowie der Kontrollen (Seesand) sind in Tabelle 4.3 inklusive ihrer Standardabweichung aufgeführt. Generell war festzustellen, dass die Menge des organischen Kohlenstoffs sich zwischen sterilen und nicht sterilen Proben nicht unterschied. Mit Glühverlust wurden jeweils Werte von etwa 51 g/kg organischer Substanz im Boden bei allen Proben bestimmt. Die Werte nach Bestimmung mit nasser Oxidation waren geringer und betragen minimal 26,4 (Ultuna_γ-bestrahlt nach 10 Tagen Inkubation) bis maximal 28,9 g/kg (Ultuna (nativ) nach 92 Tagen Inkubation). Des Weiteren konnte keine signifikante Zu- oder Abnahme dieser Gehalte nach der Inkubation für 92 Tage festgestellt werden.

Tab. 4.3: Durch Glühverlust bestimmte Mittelwerte der Menge organischer Substanz in Gesamtbodenproben (n=3), sowie die Menge organischen Kohlenstoffs jeweils in g/kg Trockengewicht (TG) Boden nach 10 und 92 Tagen Inkubation inklusive Standardabweichungen. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | Org. Substanz (g/kg TG) (nach Glühverlust) | Org. Kohlenstoff (g/kg TG) (nach Titration) |
|---|------------------------------------|---|--|
| Ultuna (nativ) | 10 | 51,3 (+/-) 0,4 | 27,8 (+/-) 3,8 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 51,5(+/-) 1,3 | 28,9 (+/-) 1,4 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 10 | 51,1(+/-) 2,0 | 27,1 (+/-) 2,8 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 92 | 51,3(+/-) 1,6 | 26,4 (+/-) 3,7 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 51,2(+/-) 1,1 | 26,8 (+/-) 7,7 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 51,3(+/-) 1,4 | 27,5 (+/-) 8,6 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 10 | 51,4(+/-) 0,9 | 28,0 (+/-) 7,1 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 92 | 51,3(+/-) 0,8 | 27,3 (+/-) 6,4 |

Die ermittelten pH-Werte der Gesamtbodenproben (Triplikate) sind in Tabelle 4.4 in Mittelwerten inklusive Standardabweichungen gezeigt.

Tab. 4.4: Die Mittelwerte der pH-Messungen der Gesamtbodenproben (n=3) nach 10 und 92 Tagen Inkubation inklusive Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | pH-Wert |
|---|------------------------------------|----------------|
| Ultuna (nativ) | 10 | 5,4 (+/-) 0,1 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 5,5 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 10 | 5,9 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 92 | 6,0 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 6,1 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 6,0 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 10 | 6,2 (+/-) 0,1 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 92 | 6,2 (+/-) 0,1 |
| Kontrolle | 10 | 6,5 (+/-) 0,1 |
| Kontrolle | 92 | 6,5 (+/-) 0,1 |

Die pH-Werte der nicht sterilen Ansätze betragen 5,4 nach 10 Tagen Inkubation beziehungsweise 5,5 nach 92 Tagen Inkubation. Der Seesand (Kontrollen) wies sowohl nach 10 Tagen als auch nach 92 Tagen Inkubation einen pH-Wert von 6,5 auf. Die pH-Werte der sterilen Proben betragen minimal 5,9 (Ultuna_γ-bestrahlt nach 10 Tagen Inkubation) und maximal 6,2 (Ultuna_{SE.ST.} nach 10 als auch 2 Tagen Inkubation.) Generell waren die Schwankungen der pH-Werte der parallelen Ansätze nur gering. Es ließ sich jedoch feststellen, dass alle sterilen Ansätze einen geringfügig höheren pH-Wert aufwiesen als die nicht sterilen Proben.

4.5.1.3 Messungen der Aktivitäten extrazellulärer Phenoxidasen und Peroxidasen

Im Vorfeld der Enzymaktivitätsmessungen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten von ABTS⁺ und TMB⁺ mit Kalibrationsmessungen am Photometer ermittelt (in Abschnitt 3.13 beschrieben). Es war festzustellen, dass der Umsatz von ABTS und auch TMB bei den gewählten Konzentrationen der Substratlösungen und der eingesetzten Menge an Laccase beziehungsweise Lignin-Peroxidase linear erfolgte. Das Bestimmtheitsmaß betrug jeweils

mehr als 0,9) und es waren nur geringe Standardabweichungen der Messwerte festzustellen. Die molaren Extinktionskoeffizienten von ABTS^+ beziehungsweise TMB^+ wurden gemäß Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Diese betragen für ABTS^+ $13,05 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für TMB^+ $44,37 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Extinktionen der Substratlösungen von ABTS und TMB (Triplikate) sind mit deren Konzentration (mM) inklusive linearer Regression, der Steigung der Regressionsgeraden (y) und den Bestimmtheitsmaßen (R^2) in Abbildung 4.5 dargestellt.

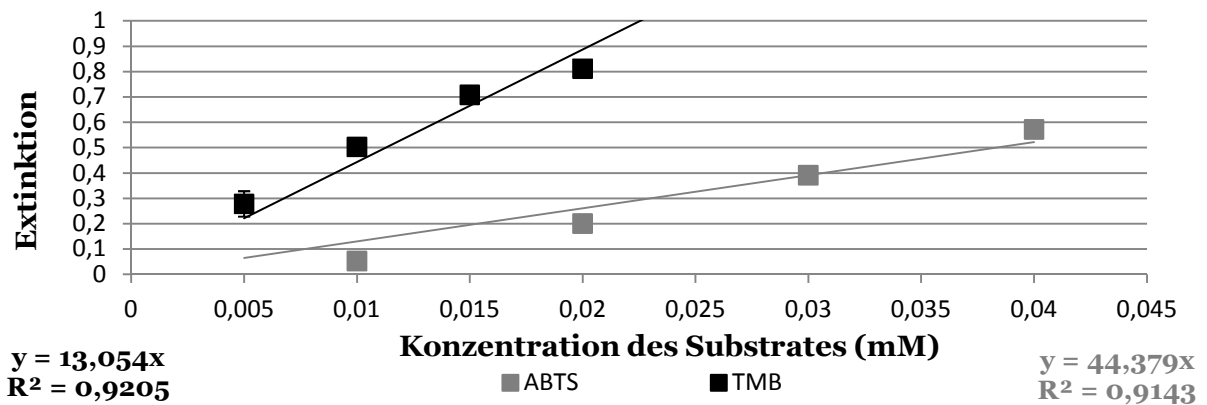


Abb. 4.5: Lineare Regression der Extinktionen der Substratlösungen ABTS (grau) und TMB (schwarz) in unterschiedlicher Konzentration (jeweils $n=3$) nach Inkubation mit Laccase beziehungsweise Lignin-Peroxidase bis zum vollständigen Substratumsatz. Die Steigung der beiden Regressionsgeraden (y), die Bestimmtheitsmaße (R^2) und die Standardabweichung der Messwerte sind angegeben.

Die höchsten Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen (PO) und Peroxidasen (PERO) wurden in nicht sterilen Gesamtbodenproben (Ultuna nativ) sowohl 10 als auch 92 Tage nach Applikation mit ^{14}C -Metalaxyl gemessen. Die Phenoloxidaseaktivität betrug zu beiden Zeitpunkten etwa 13 mU/g TG (Trockengewicht) Boden. Die Aktivität extrazellulärer Peroxidasen betrug $36,1 \text{ mU/g TG}$ nach 10 Tagen und $42,0 \text{ mU/g TG}$ nach 2 Tagen Inkubation. Die Enzymaktivitäten im γ -bestrahltem Boden (Ultuna $_{\gamma}$ -bestrahlt) betragen für die PO $5,1$ und $7,3 \text{ mU/g TG}$ und für die PERO $24,9$ und $17,2 \text{ mU/g TG}$. Im mit Fumigation und Quecksilberchloridzugabe sterilisierten Boden (Ultuna $_{\text{CHCl}_3/\text{HgCl}_2}$) betragen die Aktivitäten $5,0$ und $5,2 \text{ mU/g TG}$ (PO) und $23,4$ und $19,8 \text{ mU/g TG}$ (PERO). Somit waren die Enzymaktivitäten in diesen beiden sterilen Ansätzen noch etwa halb so groß wie im nicht sterilen Boden (50 % der Gesamtaktivität). Die niedrigsten Enzymaktivitäten wurden in den sequentiell sterilisierten Proben (Ultuna $_{\text{SE,ST}}$) gemessen ($0,7$ und $1,1 \text{ mU/g TG}$ PO; $3,4$ und $4,5 \text{ mU/g TG}$ PERO). Diese Werte lagen nahezu im gleichen Größenbereich der Aktivitäten in den Kontrollen (jeweils etwa $1,0 \text{ mU/g TG}$ Phenoloxidaseaktivität sowie $2,9$ und $3,1 \text{ mU/g TG}$ Peroxidaseaktivität) und trugen zu weniger als 10 % zur Gesamtaktivität bei. Die Aktivität extrazellulärer Peroxidasen lag bei allen Proben höher als die Aktivität der extrazellulären Phenoloxidasen. Die Mittelwerte der extrazellulären Phenoloxidase- und Peroxidaseaktivität

in den Gesamtbodenproben sind in mUnits/g Trockengewicht Boden mit ihren Standardabweichungen ($\alpha=0,05$) in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tab. 4.5: Die Aktivitäten der extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen in den Gesamtbodenproben nach 10 und 92 Tagen Inkubation (n=3) mit ihren jeweiligen Standardabweichungen in mUnits pro Gramm Trockengewicht (TG) Boden. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen (mUnits/g TG) | Aktivität extrazellulärer Peroxidasen (mUnits/g TG) |
|---|------------------------------------|---|--|
| Ultuna (nativ) | 10 | 13.2 (+/-) 1.3 | 36.1 (+/-) 3.8 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 13.3 (+/-) 0.6 | 42.0 (+/-) 8.1 |
| Ultuna _{γ} -bestrahlt | 10 | 5.1 (+/-) 0.3 | 24.9 (+/-) 4.0 |
| Ultuna _{γ} -bestrahlt | 92 | 7.3 (+/-) 0.9 | 17.2 (+/-) 5.3 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 5.0 (+/-) 0.1 | 23.4 (+/-) 6.8 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 5.2 (+/-) 0.2 | 19.8 (+/-) 0.9 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 10 | 0.7 (+/-) 0.2 | 3.4 (+/-) 0.3 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 92 | 1.1 (+/-) 0.1 | 4.5 (+/-) 0.3 |
| Kontrolle | 10 | 1.0 (+/-) 0.2 | 2.9 (+/-) 1.7 |
| Kontrolle | 92 | 1.0 (+/-) 0.2 | 3.1 (+/-) 1.2 |

4.5.2 Fraktionsproben

Nicht sterile und auf verschiedene Art sterilisierte Proben von Ton und Schluff wurden mit ¹⁴C-Metalaxyl inkubiert und folgende biologische und chemische Charakteristika gemessen: die mikrobielle Aktivität mit DMSO-Reduktion (siehe Abschnitt 3.12), Gehalt organischen Kohlenstoffs (mit nasser Oxidation, siehe Abschnitt 3.14), der pH-Wert (siehe Abschnitt 3.11.1), die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen (siehe Abschnitt 3.13) und die Ergosterolkonzentration (siehe Abschnitt 3.15). Die gemessene mikrobielle Aktivität, der Gehalt organischen Kohlenstoffs und die Enzymaktivitäten wurden zusätzlich bezüglich der Masseanteile von Schluff und Ton am Gesamtboden umgerechnet und sind im Vergleich zu diesen exemplarisch aufgezeigt.

4.5.2.1 Mikrobielle Aktivität

Die mikrobielle Aktivität der Fraktionsproben (Ton und Schluff) wurde nach 10 und 92 Tagen Inkubation bestimmt und zusätzlich auf die prozentualen Anteile dieser Fraktion am Gesamtboden umgerechnet. Die Mittelwerte der DMSO-Reduktion sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tab. 4.6: Ermittelte Mittelwerte der DMSO-Reduktion in Ton und Schluff (n=2) nach 10 und 92 Tagen Inkubation und die Mittelwerte nach Umrechnung der DMSO-Reduktion bezüglich der Mengenanteile von Ton und Schluff im Gesamtboden inklusive Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubations- dauer (Tage) | DMSO-Reduktion (gemessen) (ng DMS/h * g TG) | DMSO-Reduktion (nach Umrechnung) (ng DMS/ h * g TG) |
|--|--|--|--|
| Ton (nativ) | 10 | 304,7 (+/-) 10,7 | 75,8 (+/-) 2,6 |
| Ton (nativ) | 92 | 293,4 (+/-) 32,3 | 73,0 (+/-) 8,0 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 13,6 (+/-) 1,2 | 3,4 (+/-) 0,4 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 19,2 (+/-) 7,9 | 6,1 (+/-) 1,5 |
| Schluff (nativ) | 10 | 495,8 (+/-) 28,2 | 224,5 (+/-) 12,9 |
| Schluff (nativ) | 92 | 416,8 (+/-) 15,0 | 188,8 (+/-) 6,8 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 19,6 (+/-) 2,0 | 8,8 (+/-) 3,3 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 13,2 (+/-) 6,0 | 6,0 (+/-) 2,3 |

Es ist festzustellen, dass die mikrobielle Aktivität im Schluff (nativ) zu beiden Zeitpunkten (495,8 ng DMS/ h* TG nach 10 Tagen Inkubation; 416,8 ng DMS/h*g TG nach 92 Tagen) signifikant größer war als im nicht sterilen Ton (304,7 ng DMS/h * g TG nach 10 Tagen Inkubation; 293, 4 ng DMS/h*g TG nach 92 Tagen Inkubation). Desweiteren ist ersichtlich dass die mikrobielle Aktivität in den sterilen Fraktionen (Ton_{CHCl₃/HgCl₂}, Schluff_{CHCl₃/HgCl₂}) deutlich reduziert wurde und weniger als 20 ng DMS/h in diesen Proben gebildet wurde. Es ist zudem festzustellen, dass der nicht sterile, isolierte Schluff eine höhere mikrobielle Aktivität besaß als eine vergleichbar große Menge nicht sterilen Gesamtbodens. Ebenso wies der nicht sterile isolierte Ton ein etwa gleich hohes Maß an mikrobieller Aktivität auf wie eine vergleichbar große Menge nicht sterilen Gesamtbodens (vergleiche mit Tabelle 4.2). Nach Umrechnung der mikrobiellen Aktivität in den isolierten Fraktionen auf deren Masseanteil

am Gesamtboden (siehe Abschnitt 3.12) ergaben sich für den nicht sterilen Ton etwa 75 ng DMS/h g TG nach 10 Tagen Inkubation und etwa 73 ng DMS/h g TG nach 92 Tagen Inkubation. Für den Schluff ergaben sich nach Umrechnung etwa 224 ng DMS/h nach 10 Tagen Inkubation und etwa 188 ng DMS/h g TG nach 92 Tagen Inkubation. Nach Summation dieser Werte ergeben sich Gesamtanteile mikrobieller Aktivität von etwa 299 ng DMS/h g TG nach 10 Tagen und etwa 255 ng DMS/h g TG nach 92 Tagen Inkubation.

4.5.2.2 Gehalt organischen Bodenmaterials und pH-Wert

Die Mittelwerte des mit nasser Oxidation bestimmten organischen Kohlenstoffgehaltes im sterilen und nicht sterilen Ton sowie Schluff (jeweils Duplikate) nach 10 und 92 Tagen Inkubation sind mit den pH-Werten und ihren Standardabweichungen in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tab. 4.7: Gehalte organischen Kohlenstoffs in den sterilen und nicht sterilen Fraktionsproben (n=2), sowie die Mittelwerte der bestimmten pH-Werte in diesen Proben nach 10 und 92 Tagen Inkubation inklusive ihrer Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | Org. Kohlenstoffanteil (g/kg TG) | pH-Wert |
|--|------------------------------------|---|----------------|
| Ton (nativ) | 10 | 22,5 (+/-) 2,3 | 5,6 (+/-) 0,1 |
| Ton (nativ) | 92 | 23,9 (+/-) 0,7 | 5,4 (+/-) 0,2 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 23,2 (+/-) 1,4 | 5,9 (+/-) 0,1 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 22,6 (+/-) 1,0 | 5,9 (+/-) 0,1 |
| Schluff (native) | 10 | 30,7 (+/-) 0,4 | 4,8 (+/-) 0,1 |
| Schluff (native) | 92 | 31,6 (+/-) 2,1 | 4,6 (+/-) 0,1 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 30,9 (+/-) 2,0 | 6,0 (+/-) 0,1 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 31,5 (+/-) 2,5 | 6,1 (+/-) 0,1 |

Die Gehalte organischer Substanz waren in den sterilen sowie nicht sterilen isolierten Schluffproben signifikant höher als in den in den sterilen sowie nicht sterilen isolierten Tonproben. Die Gehalte blieben während der Inkubationsdauer nahezu konstant. Im Ton (steril und nativ) betragen sie etwa 22 bis 23 g/kg TG Boden zu beiden Zeitpunkten, während

im Schluff (steril sowie nativ) deutlich höhere Gehalte organischen Kohlenstoffs nach 10 und 92 Tagen festgestellt wurden (etwa 30 bis 31 g/kg) TG Boden.

Es war zusätzlich festzustellen, dass in den Tonansätzen weniger organischer Kohlenstoff enthalten war (etwa 23 g/kg TG) als in einer entsprechenden Menge Gesamtbodens (etwa 28 g/kg TG, vergleiche mit Tabelle 4.3). Der Schluff enthielt jedoch etwa gleich viel organischen Kohlenstoff wie der Gesamtboden (etwa 31 g/kg TG). In zusätzlichen Experimenten wurde auch der Gehalt in isoliertem Sand bestimmt, der nach Umrechnung etwa 1 -2 g/kg organischen Kohlenstoffs enthielt. Die Gesamtmenge organischen Kohlenstoffs im Gesamtbodenproben Ultuna (nativ) der vorliegenden Studie nach 92 Tagen Inkubation (etwa 28 g/kg TG, bestimmt mit nasser Oxidation; siehe Tabelle 4.3) kann mit der Summe der Anteile organischer Substanz in den isolierten Fraktionen nach deren Umrechnung auf ihren Masseanteil am Boden (Gehalte siehe Abschnitt 3.14) verglichen werden. Demnach entfielen etwa 5 – 6 g/kg TG organischen Kohlenstoffs auf die Tonfraktion, etwa 13 - 14 g/kg TG auf die Schlufffraktion und etwa 1,5 g/kg auf die Sandfraktion. Nach Summation der umgerechneten Anteile organischen Kohlenstoffs in den Fraktionen ergibt sich ein Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs von etwa 20 g/kg. Dieser ist signifikant niedriger als der Gehalt organischen Kohlenstoffs der in den Gesamtbodenproben bestimmt wurde (etwa 28 g/kg). Die Verteilung organischen Kohlenstoffs in den Fraktionen (nach Umrechnung) im Vergleich zum bestimmten Gehalt organischen Kohlenstoffs in Gesamtbodenproben (Ultuna (nativ) nach 92 Tagen Inkubation) ist exemplarisch in Abbildung 4.6 dargestellt.

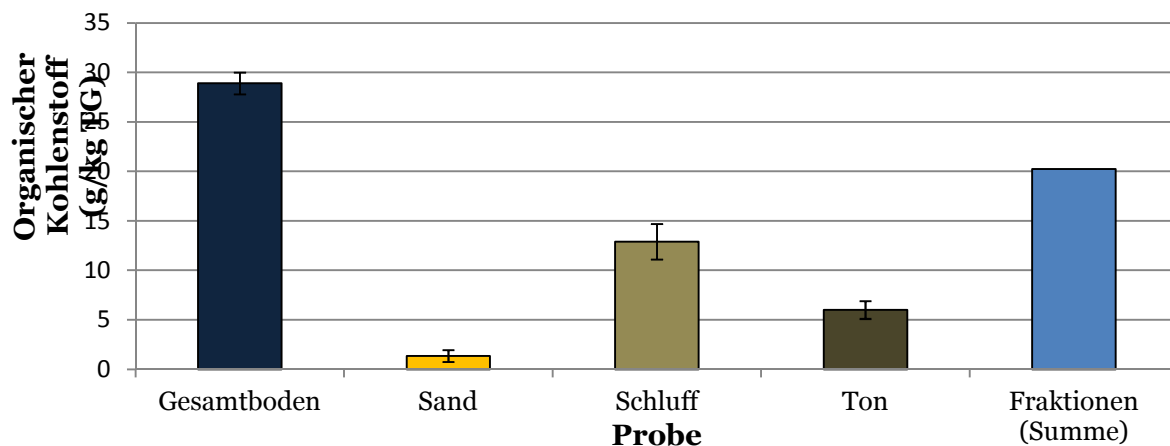


Abb. 4.6: Vergleich der Mittelwerte der Gehalte organischen Kohlenstoffs im Gesamtboden (dunkelblau; n=3) und in den Partikelgrößenfraktionen Sand (gelb), Schluff (hellbraun) und Ton (dunkelbraun) bezogen auf ihren Anteil am Gesamtboden (je n=2) inklusive Standardabweichung und der Summe dieser Anteile (blau).

Bezüglich der pH-Messungen der Fraktionsproben ließ sich feststellen, dass die pH-Werte der sterilen Schluff- und Tonproben sich nicht wesentlich von denen steriler Gesamtbodenproben unterschieden: sie lagen jeweils zwischen 5,9 und 6,1. Die pH-Werte

der nicht sterilen Fraktionsproben lagen jeweils zwischen 4,6 (Schluff nativ) und 5,6 (Ton nativ). Jedoch ließ sich auch bei den isolierten Fraktionen feststellen, dass die sterilen Fraktionen etwas höhere pH-Werte aufwiesen als die nicht sterilen Fraktionen.

4.5.2.3 Messung der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen

Die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen betrug im nicht sterilen Schluff nach 10 Tagen Inkubation 23,2 mUnits/g TG und 21,6 mUnits/g TG nach 92 Tagen Inkubation. Die Aktivität der Peroxidasen betrug in diesen Proben 51,5 nach 10 Tagen und 52,2 mUnits/g TG nach 92 Tagen Inkubation. Im nicht sterilen Ton betrug die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen nach 10 Tagen Inkubation 8,9 und nach 92 Tagen Inkubation 9,2 mUnits/g TG. Die Aktivität extrazellulärer Peroxidasen in diesen Proben betrug 29,8 nach 10 Tagen Inkubation und 34,4 mUnits/g TG nach 92 Tagen Inkubation. Die enzymatische Aktivität der sterilen Fraktionsproben war jeweils signifikant geringer. In den sterilen Tonproben betrugen diese nach 10 Tagen 3,0 und nach 92 Tagen 3,3 mUnits/g TG (Phenoloxidasen) und 13,6 sowie 14,1 mUnits/g TG für die Peroxidasen. In den sterilen Schluffproben betrugen diese nach 10 Tagen 5,2 und nach 92 Tagen 5,0 mUnits/g TG (Phenoloxidasen) und 23,7 sowie 24,1 mUnits/g TG für die Peroxidasen.

Generell ist festzustellen, dass die Aktivität der extrazellulären Peroxidasen in den Fraktionsproben zu beiden Zeitpunkten höher war als die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen. Dies war auch in den Gesamtbodenproben festgestellt worden. Desweiteren waren alle ermittelten Aktivitäten im nicht sterilen Schluff zu beiden Zeitpunkten größer als im nicht sterilen Gesamtboden; die Enzymaktivitäten im nicht sterilen Ton waren etwas geringer als im nicht sterilen Gesamtboden (siehe Tabelle 4.5). Die Mittelwerte der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen in den Fraktionsproben sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tab. 4.8: Mittelwerte der ermittelten Aktivitäten (gemessen) extrazellulärer Phenoloxidasen (PO) und Peroxidasen (PERO) und die Mittelwerte dieser Aktivitäten bezogen auf die Masseanteile von Ton und Schluff im Gesamtboden (nach Umrechnung) inklusive ihrer Standardabweichung in mUnits/g Trockengewicht (TG) Boden. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubations-dauer (Tage) | PO (gemessen) (mUnits/ g TG) | PO (Umrechnung) (mUnits/ g TG) |
|--|-------------------------------------|---|---|
| Ton (nativ) | 10 | 8,9 (+/-) 0,2 | 2,2 (+/-) 0,1 |
| Ton (nativ) | 92 | 9,2 (+/-) 0,4 | 2,3 (+/-) 0,2 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 3,0 (+/-) 0,4 | 0,7 (+/-) 0,2 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 3,3 (+/-) 0,3 | 0,8 (+/-) 0,1 |
| Schluff (native) | 10 | 23,2 (+/-) 0,8 | 10,5 (+/-) 0,3 |
| Schluff (native) | 92 | 21,6 (+/-) 0,7 | 9,7 (+/-) 0,2 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 5,2 (+/-) 0,3 | 2,4 (+/-) 0,1 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 5,0 (+/-) 0,3 | 2,4 (+/-) 0,1 |

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | PERO (gemessen) (mUnits/ g TG) | PERO (Umrechnung) (mUnits/ g TG) |
|--|------------------------------------|---|---|
| Ton (nativ) | 10 | 29,8 (+/-) 3,4 | 7,4 (+/-) 0,8 |
| Ton (nativ) | 92 | 34,4 (+/-) 1,0 | 8,4 (+/-) 0,4 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 13,6 (+/-) 1,7 | 3,3 (+/-) 0,4 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 14,1 (+/-) 1,6 | 3,7 (+/-) 0,4 |
| Schluff (native) | 10 | 51,5 (+/-) 2,0 | 23,3 (+/-) 0,9 |
| Schluff (native) | 92 | 52,2 (+/-) 3,6 | 23,6 (+/-) 1,6 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 23,7 (+/-) 1,8 | 10,7 (+/-) 0,8 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 24,1 (+/-) 1,1 | 8,4 (+/-) 0,5 |

Nach Umrechnung der Enzymaktivitäten in den isolierten Fraktionen bezüglich ihres Masseanteils am Gesamtboden ergaben sich für den nicht sterilen Ton 2,2 und 2,3 mUnits/g

TG (nach 10 bzw. 92 Tagen, Phenoloxidaseaktivität) und 7,4 und 8,4 mUnits/g TG (nach 10 bzw. 92 Tagen, Peroxidaseaktivität). Für den nicht sterilen Schluff ergaben sich 10,5 und 9,7 mUnits/g TG (nach 10 bzw. 92 Tagen, Phenoloxidaseaktivität) und 23,3 und 23,6 mUnits/g TG (nach 10 bzw. 92 Tagen, Peroxidaseaktivität). In zusätzlichen Experimenten wurden die Phenoloxidase- und Peroxidaseaktivität auch in aus dem Gesamtboden isolierter, nicht steriler Sandfraktion bestimmt. Diese betragen in Bezug auf den Mengenanteil des Sandes im Gesamtboden weniger als 0,3 mUnits /g TG (PO) und weniger als 1 mUnits/g TG (PERO). Die Enzymaktivitäten in den Fraktionen bezogen auf den jeweiligen Mengenanteil dieser am Gesamtboden (siehe Abschnitt 3.13) ist exemplarisch für eine nicht sterile Bodenprobe nach 10 Tagen Inkubation berechnet worden und in Abbildung 4.7 aufgeführt. Demgemäß betrug die Phenoloxidaseaktivität im Sand 0,2 mUnits/g TG und die Peroxidaseaktivität im Sand 0,9 mUnits/g TG. Im Schluff betrug die Phenoloxidaseaktivität 10,2 und die Peroxidaseaktivität 22,7 mUnits/g TG. Im Ton betrug die Phenoloxidaseaktivität 2,1 und die Peroxidaseaktivität 6,6 mUnits/g TG. Nach Summation der jeweiligen Aktivitäten der Fraktionen ergab sich für die Phenoloxidasen eine Gesamtaktivität von 12,5 mUnits/g TG und für die Peroxidasen eine Gesamtaktivität von 30,3 mUnits/g TG. Diese Werte sind geringer als die bestimmten Gesamtaktivitäten der Phenoloxidasen (13,2 mUnits/g TG) und der Peroxidasen der nicht sterilen Gesamtbodenprobe (36,1 mUnits/g TG). Rein abiotische oxidative Aktivitäten wurden aufgrund ihres geringen Anteils an der Aktivität eines Gesamtbodens (siehe Abbildung 4.7) in den Fraktionsproben nicht untersucht.

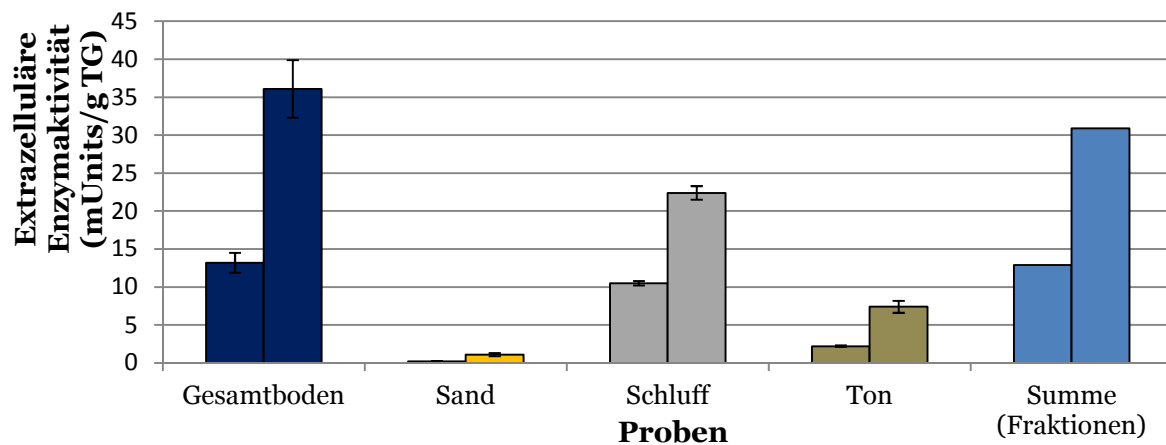
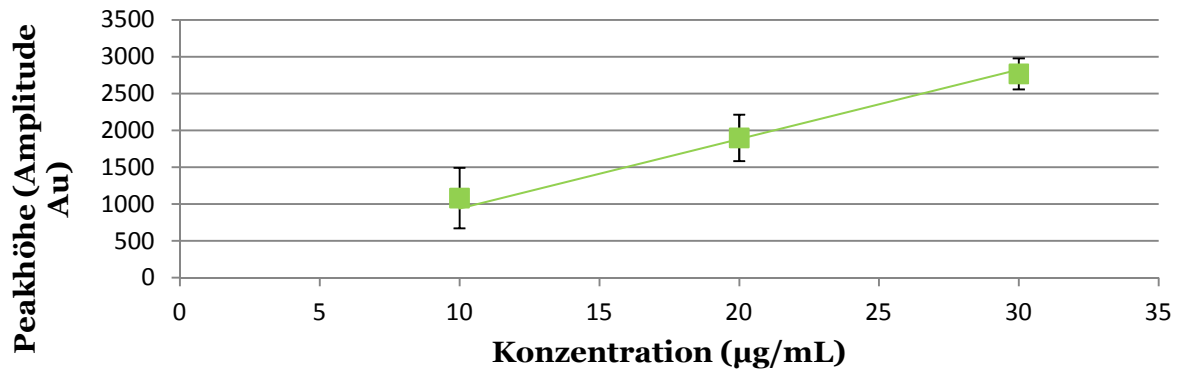


Abb. 4.7: Mittelwerte der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen (linke Balken) und extrazellulärer Peroxidasen (rechte Balken) im nicht sterilen Gesamtboden (dunkelblau) (n=3), sowie Fraktionsproben Schluff (hellbraun) und Ton (dunkelbraun) sowie im Sand (gelb), (jeweils n=2) inklusive ihrer Standardabweichungen und der Summe dieser Anteile (blau) nach Umrechnung auf den Masseanteil der Fraktion am Gesamtboden.

4.5.2.4 Ergosterolkonzentration

Ergosterol wurde als Indikator der Pilzbiomasse im Boden aus isoliertem Schluff und Ton extrahiert (in Abschnitt 3.15 beschrieben) und die jeweilige Menge Ergosterol in den Fraktionen dann durch HPLC-Analyse der Extrakte unter Verwendung von Standards bekannter Konzentration (Kalibration) ermittelt. Die Kalibration der Ergosterolstandards ist mit linearer Regression und Bestimmtheitsmaß in Abbildung 4.8 gezeigt.



$R^2 = 0,9834$

Abb. 4.8: Lineare Regression der Peakhöhe nach Detektion von Ergosterol verschiedener Konzentration und Standardabweichung. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) ist angegeben. In das HPLC System wurden jeweils 100 µL Standards entsprechend jeweils 10, 15 und 30 µg Ergosterol.

Nach Kalibration ließ sich ermitteln, dass im Ton 38,4 (+/-) 3,6 µg/g Boden (TG) nach 10 Tagen Inkubation und 53,2 (+/-) 1,2 µg/g Boden (TG) nach 92 Tagen Inkubation Ergosterol vorlagen. Im Schluff lagen höhere Ergosterolkonzentrationen vor: 172 µg/g (+/-) 4,8 µg/g Boden (TG) nach 10 Tagen und 196,2 (+/-) 8,2 µg/g Boden (TG) nach 92 Tagen Inkubation.

4.5.3 Boden mit/ohne Enzymzugabe

Proben von mit γ -Bestrahlung sterilisierten Gesamtbodens wurden mit auf Alginat immobilisierter Laccase versetzt (innerhalb eines Polyamidbeutels) und zusammen mit gleichsam sterilisiertem Boden (außerhalb des Polyamidbeutels) in stationären Systemen inkubiert (Boden mit Enzymzugabe, siehe Abschnitt 3.3.1). Als parallele Kontrollansätze dienten analog inkubierte Proben γ -bestrahlten Gesamtbodens denen nur Alginat ohne Laccase zugesetzt wurde (innerhalb eines Polyamidbeutels), die zusammen mit gleichsam sterilisiertem Boden (außerhalb des Polyamidbeutels) in stationären Systemen inkubiert wurden (Boden ohne Enzymzugabe, siehe Abschnitt 3.3.1). Folgende biologische und chemische Charakteristika wurden gemessen: die mikrobielle Aktivität mit DMSO-Reduktion (siehe Abschnitt 3.12) und die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen (siehe Abschnitt 3.13)

4.5.3.1 Mikrobielle Aktivität

Nach 10 Tagen Inkubation wurden in allen Ansätzen mit und ohne Enzymzugabe weniger als 10 ng gebildetes DMS pro Stunde und Gramm Trockengewicht gemessen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Tab. 4.9: Ermittelte Mittelwerte der DMSO-Reduktion in Proben mit und ohne Enzymzugabe (n=3) nach 10 Tagen Inkubation inklusive Standardabweichung.

| Probe | PO (ng DMS/ h * g TG) (im Polyamidbeutel) | PO (ng DMS/ h * g TG) (außerhalb Polyamidbeutel) |
|------------------|--|---|
| Mit Enzymzugabe | 7,2 (+/-) 2,2 | 8,1 (+/-) 0,6 |
| Ohne Enzymzugabe | 9,4 (+/-) 0,4 | 7,6 (+/-) 1,4 |

4.5.3.2 Messungen der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen

Die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen wurde im Boden im Polyamidbeutel sowie auch im diesen umgebenden Boden (außerhalb des Polyamidbeutes) gemessen. Die Mittelwerte der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen in den Ansätzen mit Enzymzugabe sowie Zugabe von Alginat ohne Laccase nach 10 Tage Inkubation sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tab. 4.10: Mittelwerte der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen (PO) in Böden nach Zugabe von auf Alginat immobilisierter Laccase (mit Enzymzugabe; n=3) sowie nach Zugabe von Alginat ohne Laccase (ohne Enzymzugabe; n=3) in mUnits / g Trockengewicht (TG) Boden nach 10 Tagen Inkubation inklusive Standardabweichung. Das Alginat wurde jeweils mit einem Teil des Bodens in einem Polyamidbeutel vermischt.

| Probe | PO (mUnits/g TG Boden (im Polyamidbeutel) | PO (mUnits/g TG Boden) (außerhalb Polyamidbeutel) |
|------------------|--|--|
| Mit Enzymzugabe | 130,8 (+/-) 26,1 | 7,4 (+/-) 0,6 |
| Ohne Enzymzugabe | 6,4 (+/-) 1,1 | 6,6 (+/-) 1,4 |

Nach Zugabe von auf Alginat immobilisierter Laccase (Boden im Polyamidbeutel) betrug die Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen etwa 130 mUnits/g TG. Im den Polyamidbeutel umgebenden Boden war die Aktivität deutlich geringer und betrug etwa 7,4 mUnits/g TG). Somit war die Phenoloxidaseaktivität im Boden innerhalb des Polyamidbeutels etwa zehnmal so groß wie in nicht sterilem Boden (vergleiche mit Tabelle 4.5) während sie in dem umgebenden Boden in etwa so groß war wie in identisch sterilisiertem Gesamtboden

(Ultuna_γ-bestrahlt, 5,1 mUnits/g TG nach Tage Inkubation, siehe Tabelle 4.5). Die Aktivität der Phenoxidasen in den Kontrollproben (Boden ohne Enzymzugabe) betrug innerhalb und außerhalb des Beutels etwa 6,4 – 6,6 mUnits/g TG.

4.6 Der Verbleib von ¹⁴C-Metalaxyl in den Inkubationsansätze in stationären Systemen

4.6.1 Gesamtbodenproben

Der Verbleib und das Stoffschicksal des Fungizids ¹⁴C-Metalaxyl wurden in verschieden sterilisierten und nicht sterilen Gesamtbodenproben nach 10 und 92 Tagen Inkubation untersucht. Hierzu wurden die Anteile mineralisierter, extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität bilanziert (siehe Abschnitt 3.5.2). Anschließend wurde die extrahierbare Radioaktivität der Ansätze mit DC und HPLC analysiert (siehe Abschnitt 3.18.1, 3.18.2). Die Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Korngrößenfraktionen der Gesamtbodenproben und ihre Verteilung in den Huminstoff-Fractionen wurden untersucht (siehe Abschnitt 3.7.1; 3.9). Anschließend wurden die NER in Huminstoff-Fractionen des Ton und Schluffs der Gesamtbodenproben nach 10 Tagen mit Dichlormethan extrahiert und die Extrakte mit DC analysiert (siehe Abschnitt 3.7.1). Nach 92 Tagen wurden die Huminstoff-Fractionen der Proben mit alkalischer Hydrolyse degradiert und die freigesetzte Radioaktivität aus den NER mit DC untersucht (siehe Abschnitt 3.10; 3.18.1).

4.6.1.1 Bilanzierung der Radioaktivität

Die extrahierbare Radioaktivität (ER) und nicht extrahierbare Radioaktivität (NER) wurden auf die Menge applizierter Radioaktivität nach Entnahme von jeweils 20 g Boden (7388858 dpm = 100 %) bezogen, die Anteile der Mineralisation wurden auf die applizierte Radioaktivität vor Entnahme von 20 g Boden bezogen (9246475 dpm = 100 %). Die Wiederfindung der Radioaktivität lag bei allen Gesamtbodenproben nach 10 und 92 Tagen Inkubation zwischen 95 und 105 %. Die Mineralisation in den Proben Ultuna (nativ) betrug nach 10 Tagen Inkubation 0,22 % und stieg im Verlauf der Inkubation auf 4,77 % an. Im Vergleich war die Mineralisation in allen sterilen Proben zu beiden Zeitpunkten signifikant geringer und betrug jeweils weniger 0,2 % in den Proben (Ultuna_γ-bestrahlt) und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}. Die geringste Mineralisation wurde in den Proben Ultuna_{SE,ST} quantifiziert (0 % nach 10 Tagen und 0,02 % nach 92 Tagen Inkubation. Es lässt sich feststellen, dass der überwiegende Anteil der wiedergefundenen Radioaktivität aller Proben zu beiden Zeitpunkten extrahierbar war (> 70%). Die Menge an NER und die Mineralisation stieg im Verlauf der Inkubationszeit bei allen Proben an während gleichzeitig die extrahierbaren Anteile sanken. Der Anteil an NER im nicht sterilen Boden (Ultuna nativ) war nach 10 Tagen

(7,7 %) und 92 Tagen Inkubation (24,6 %) signifikant höher als in allen sterilen Ansätzen. Der nicht sterile Boden wies auch zu beiden Zeitpunkten die größten Anteile Mineralisation auf (0,19 % nach 10 Tagen; 4,7 % nach 92 Tagen). Die NER in den Proben Ultuna_γ-bestrahlt (3,4% nach 10 Tagen; 5,6 % nach 92 Tagen) als auch die NER in den Proben Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} (4,1 % nach 10 Tagen; 8,7 % nach 92 Tagen) waren zu beiden Zeitpunkten signifikant größer als die NER in den Proben Ultuna_{SE.ST} (2,8 % nach 10 Tagen; 3,1 % nach 92 Tagen). Die Kontrollen (Seesand) wiesen zu beiden Zeitpunkten die geringsten Mengen an nicht extrahierbarer Radioaktivität auf (1,2% nach 10 Tagen; 1,4 % nach 92 Tagen). Die Bilanzierung der wiedergefundenen Radioaktivität in den Gesamtbodenproben (Triplikate) ist in Mittelwerten inklusive Standardabweichungen ($\alpha=0,05$) in Tabelle 4.11 dargestellt.

Tab. 4.11: Bilanzierung der wiedergefundenen Radioaktivität in Anteilen der extrahierbaren Radioaktivität (ER), der Summe nicht extrahierbaren Radioaktivität (NER) in den Partikelgrößenfraktionen und der Mineralisation in den Gesamtbodenproben (n=3) bezogen auf die jeweilige applizierte Radioaktivität in % inklusive Standardabweichung. Die Summe der Radioaktivität (ER, NER und Mineralisation) ergibt insgesamt wiedergefundene Radioaktivität der Gesamtbodenprobe. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubations- dauer (Tage) | ER (%) | NER (%) | Mineralisation (%) |
|---|--------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| Ultuna (nativ) | 10 | 90,5 (+/-) 1,8 | 7,7 (+/-) 0,6 | 0,22 (+/-) 0,01 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 74,5 (+/-) 2,0 | 24,6 (+/-) 1,6 | 4,70 (+/-) 0,10 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 10 | 99,3 (+/-) 0,4 | 3,4 (+/-) 1,3 | 0,04 (+/-) 0,01 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 92 | 96,1 (+/-) 1,1 | 5,6 (+/-) 0,7 | 0,17 (+/-) 0,10 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 99,0 (+/-) 2,5 | 4,1 (+/-) 0,2 | 0,02 (+/-) 0,01 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 90,2 (+/-) 1,1 | 8,7 (+/-) 0,5 | 0,15 (+/-) 0,02 |
| Ultuna _{SE.ST} | 10 | 98,9 (+/-) 0,5 | 2,8 (+/-) 0,1 | 0,00 (+/-) 0,00 |
| Ultuna _{SE.ST} | 92 | 95,1 (+/-) 0,8 | 3,1 (+/-) 0,1 | 0,02 (+/-) 0,01 |
| Kontrolle | 10 | 98,7 (+/-) 0,1 | 1,2 (+/-) 0,1 | 0,00 (+/-) 0,00 |
| Kontrolle | 92 | 98,5 (+/-) 1,2 | 1,4 (+/-) 1,2 | 0,01 (+/-) 0,02 |

Die extrahierbare Radioaktivität der Gesamtbodenproben setzte sich aus der Radioaktivität im Fraktionswasser und den Soxhlet-Extrakten der Partikelgrößenfraktionen zusammen. Die

Verteilung der ER in den Gesamtbodenproben wurde miteinander verglichen (siehe Abbildung 4.9).

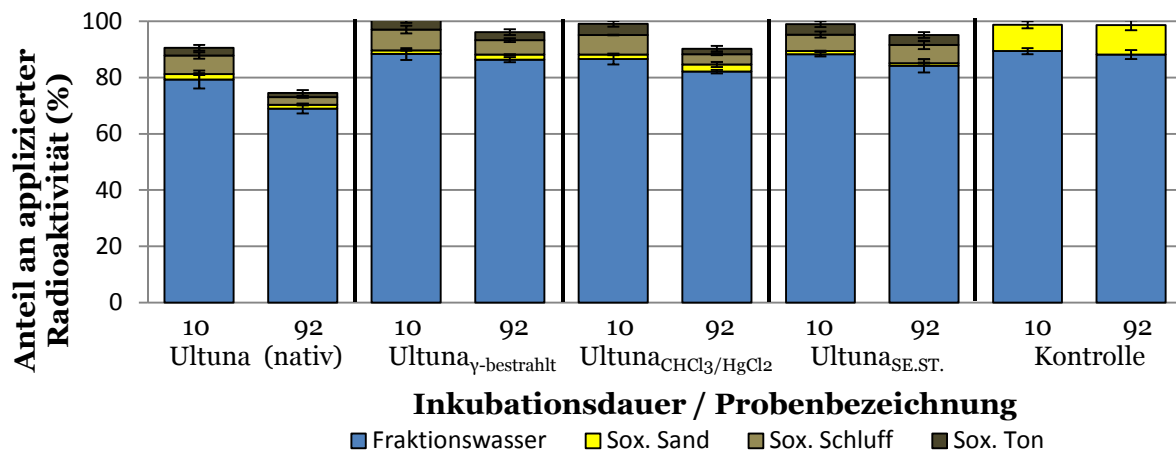


Abb. 4.9: Extrahierbare Radioaktivität (ER) bestehend aus der Radioaktivität im Fraktionswasser (blau) und der Radioaktivität in den Soxhlet-Extrakten der Partikelgrößenfraktionen Sand (gelb), Schluff (hellbraun) und Ton (dunkelbraun) der Gesamtbodenproben (n=3) bezogen auf die applizierte Radioaktivität, nach 10 und 92 Tagen Inkubation in Mittelwerten mit ihren jeweiligen Standardabweichungen. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

Es ist festzustellen, dass die größte Menge der extrahierbaren Radioaktivität in allen Proben zu beiden Zeitpunkten im Fraktionswasser vorlag ($\geq 70\%$). Die Summe der Radioaktivität in den Soxhlet-Extrakten betrug bei allen Proben zu beiden Zeitpunkten nur maximal etwa 10 %, wobei die Soxhlet-Extrakte aus Schluff mehr Radioaktivität beinhalteten als die Extrakte aus Ton und Sand. Die extrahierbare Radioaktivität der Kontrollen (Seesand) setzte sich aus etwa 90 % Radioaktivität im Fraktionswasser und etwa 10 % Radioaktivität im Soxhlet-Extrakt zusammen. Desweiteren konnte nach Zentrifugation des Fraktionswassers festgestellt werden, dass nahezu die gesamte Radioaktivität im Fraktionswasser der sterilen Proben frei vorlag ($> 98\%$) und nicht an ausgeschwemmte Huminstoffe gebunden war. In den nicht sterilen Proben nach 92 Tagen Inkubation war dieser Anteil jedoch auf etwa 95 % reduziert.

Die nicht extrahierbare Radioaktivität wurde analog zu den Anteilen extrahierbarer Radioaktivität in allen Gesamtbodenansätzen miteinander verglichen. Mit Ausnahme der Proben Ultuna_{SE.ST.} lagen die NER in allen Gesamtbodenproben zu überwiegenderem Anteil zu beiden Zeitpunkten im Schluff vor. Im nicht sterilen Boden erhöhte sich dieser Anteil von etwa 6 % auf etwa 17 % während der Inkubation. In den Ansätzen Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} erhöhte sich der NER Anteil im Schluff nicht in diesem Ausmaß und stieg von etwa 4 % auf maximal 8 % an. In den sequentiell sterilisierten Proben Ultuna_{SE.ST.} waren etwa gleich große Anteile (etwa 2 %) NER im Ton und Schluff festzustellen. In den nicht sterilen Proben stieg der Anteil von NER im Ton von etwa 2 % auf etwa 6 % während der

Inkubationszeit an. In allen anderen Proben erhöhte sich dieser Anteil nicht mit der Inkubationszeit und lag bei maximal 2 %. Im Sand waren die niedrigsten Mengen an NER aller Proben festzustellen (< 1 %). Die Verteilung der NER in den Partikelgrößenfraktionen der Gesamtbodenproben ist Abbildung 4.10 gezeigt.

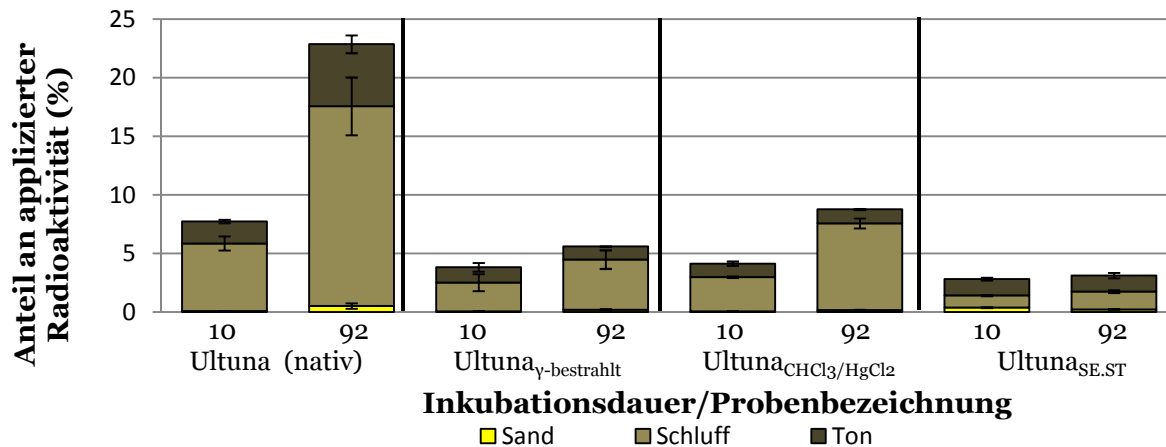


Abb. 4.10: Nicht extrahierbare Radioaktivität (NER) bestehend aus den Anteilen NER in den jeweiligen Partikelgrößenfraktionen Sand (gelb), Schluff (hellbraun) und Ton (dnkelbraun) der Gesamtbodenproben (n=3) bezogen auf die applizierte Radioaktivität in % in Mittelwerten mit ihren Standardabweichungen. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

4.6.1.2 Analyse der extrahierbaren Radioaktivität

Die mögliche Metabolisierung und abiotische Transformation von ^{14}C -Metalaxyl wurde anhand der Analytik der Extrakte nach der Aufarbeitung der Gesamtbodenproben untersucht. Metalaxyl und Metalaxylsäure, wurden als Referenzsubstanzen zur Analyse der Extrakte der Inkubationsansätze mittels Co-Chromatographie genutzt. Hierzu wurden die beiden nicht radioaktiv markierten Referenzsubstanzen im Vorfeld der Analysen in gleichem Konzentrationsanteil (jeweils 100 μg ; gelöst in Methanol) in das HPLC System injiziert und im UV Kanal bei 266 nm vermessen, um ihre Retentionszeiten zu ermitteln. Dieses Chromatogramm ist im Anhang der vorliegenden Studie aufgeführt (Abbildung A2). Die Extrakte aus dem Fraktionswasser der Gesamtbodenproben sowie alle Soxhlet-Extrakte der Partikelgrößenfraktionen wurden mit HPLC analysiert (in Abschnitt 3.18.2 erläutert). In Abbildung 4.11 ist ein Beispielchromatogramm einer Gesamtbodenprobe Ultuna (nativ) gezeigt welches nach HPLC-Analyse erhalten wurden.

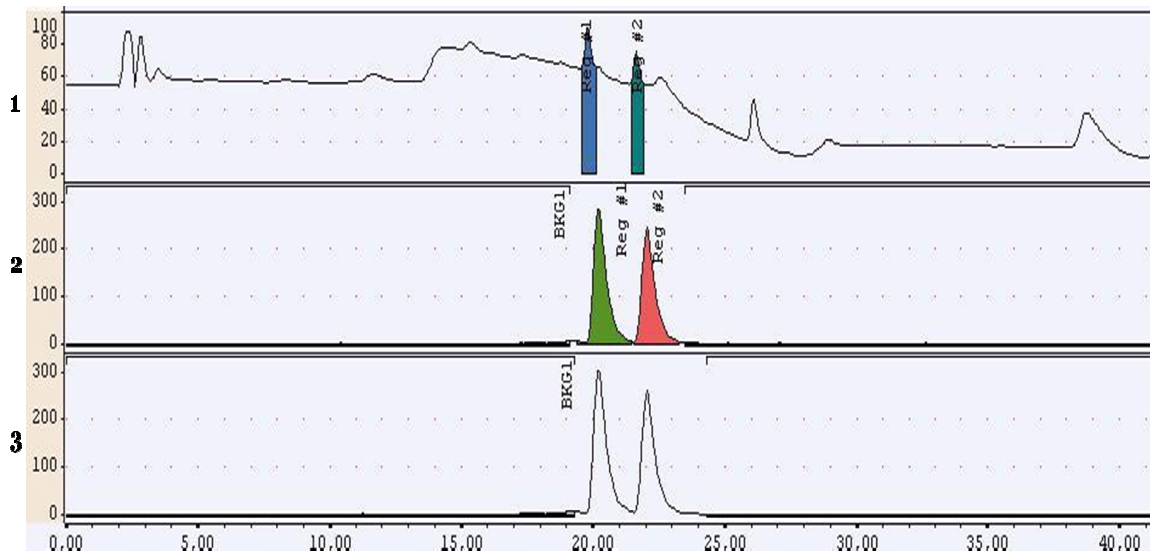


Abb. 4.11: Beispiel eines HPLC-Chromatogramms des Fraktionswassers nicht sterilen Gesamtbodens (Ultuna nativ) 92 Tagen Inkubation. 1: Detektion im UV Kanal bei 266 nm, Reg#1 (blau) co-chromatographiert mit Referenzsubstanz Metalaxylsäure, Retentionszeit 19,98 min; Reg#2(türkis) co-chromatographiert mit Referenzsubstanz Metalaxyl, Retentionszeit 21,8 min. 2: Detektion im Radiokanal B, Reg#1 (grün) co-chromatographiert mit Referenzsubstanz Metalaxylsäure, Retentionszeit 20,8 min; Reg#2 (rot) co-chromatographiert mit der Referenzsubstanz Metalaxyl, Retentionszeit 22,8 min. 3: Detektion im Radiokanal A. Die Verschiebung zwischen UV Kanal und Radiokanal A und B betrug jeweils 1 min. BKG: Background.

Bei der analysierten Probe handelte es sich um einen Extrakt des Fraktionswassers nach 92 Tagen Inkubation (Ultuna_γ-bestrahlt). Die detektierten Radiosignale konnten mittels Co-Chromatographie mit den Referenzsubstanzen als Metalaxylsäure (Retentionszeit 20,8 min) und Metalaxyl (Retentionszeit 22,8 min) identifiziert werden. Die Retentionszeiten der Substanzen waren im Vergleich zur Detektion der Referenz im UV-Kanal etwas größer was auf einen Laufunterschied des Lösungsmittels zwischen den beiden Detektoren von etwa 1 min zurückzuführen ist. Die hohen Hintergrundsignal bei der Vermessung im UV Kanal sind auf organische Bodensubstanzen im Extrakt zurückzuführen. Zusätzlich zur HPLC-Analyse wurden alle Extrakte mit Dünnschichtchromatographie untersucht. Das Beispielchromatogramm der DC-Analyse einer Gesamtbodenprobe Ultuna (nativ) ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Bei der analysierten Probe handelte es sich um einen Extrakt des Fraktionswassers nach 92 Tagen Inkubation.

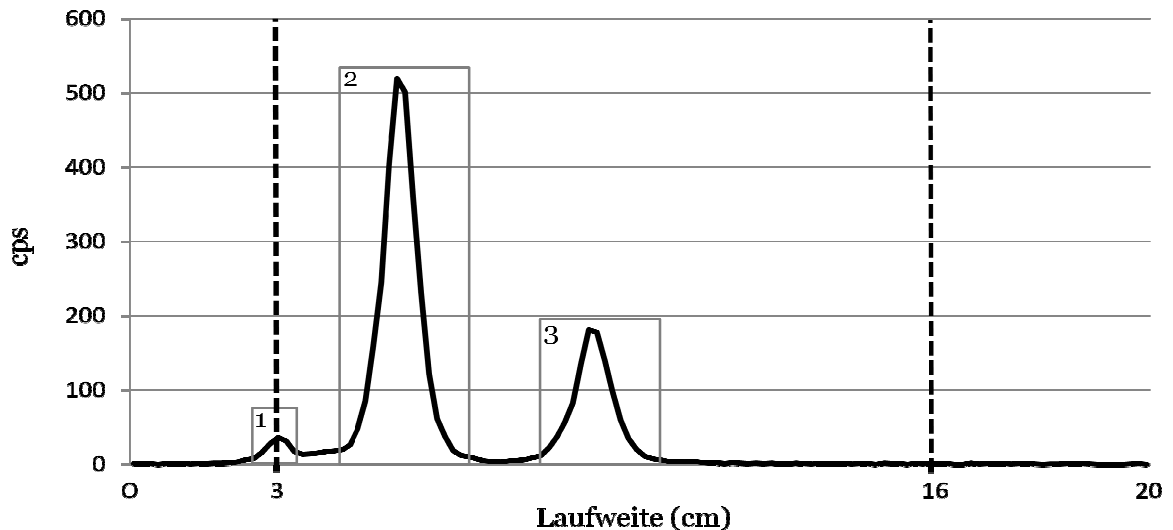


Abb. 4.12: Beispiel-Radio-Chromatogramm eines mit DC Tracemaster 40 analysierten Extraktes des Fraktionswassers nicht sterilen Gesamtbodens nach 92 Tagen Inkubation; Peak 1 (Startaktivität am Auftragungspunkt), Peak 2 (co-chromatographiert mit der Referenzsubstanz Metalaxylsäure (R_f -Wert: 0,21), Peak 3 (co-chromatographiert mit der Referenzsubstanz Metalaxyl (R_f -Wert: 0,34). Start und die maximale Flussweite des Laufmittels sind mit gestrichelten Linien markiert.

Da DC Analysen nahezu identische Werte zu denen der HPLC Analysen ergaben sind im Folgenden nur die ausgewerteten Daten der HPLC-Analysen aufgeführt.

Die HPLC Analyse der Soxhlet-Extrakte der Ton und Sandfraktion zeigte auf, dass in diesen sowohl nach 10 als auch 92 Tagen Inkubation keine Metalaxylsäure vorlag. Gleiches galt auch für die Extrakte der Schlufffraktion der Gesamtbodenproben; lediglich im Extrakt des Schluffs der Proben Ultuna nativ lagen nach 92 Tagen etwa 3,6 % Metalaxylsäure vor. ^{14}C -Metalaxyl und Metalaxylsäure als einziges Transformationsprodukt wurden im Fraktionswasser des Versuchsbodens detektiert. Die Anteile der Metalaxylsäure im Fraktionswasser nahmen bei allen Proben mit steigender Inkubationsdauer zu. In den Proben Ultuna (nativ) wurde im Vergleich zu allen anderen Gesamtbodenproben die höchste Menge an Metalaxylsäure zum jeweiligen Zeitpunkt detektiert gemessen (21,9 % nach 10 Tagen; 68,7 % nach 92 Tagen). In allen sterilen Ansätzen lagen jeweils weniger als 10 % Metalaxylsäure nach 10 Tagen im Fraktionswasser vor. Diese Anteile stiegen auf minimal etwa 45,2 % (Ultuna_{SE,ST.}) und maximal etwa 52,2 % (Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}) nach 92 Tagen Inkubation an. In den Kontrollen wurde keine Metalaxylsäure detektiert. In Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse der Analytik der Extrakte des Fraktionswassers aufgeführt und zusammengefasst.

Tab. 4.12: Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des Fraktionswassers der Gesamtbodenproben und der Kontrollen (Seesand), jeweils n=3, nach 10 und 92 Tagen Inkubation in % inklusive Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubations- dauer (Tage) | Metalaxyl (%) | Metalaxylsäure (%) |
|---|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Ultuna (nativ) | 10 | 78,0 (+/-) 6,1 | 21,9 (+/-) 6,0 |
| Ultuna (nativ) | 92 | 26,6 (+/-) 1,4 | 68,7 (+/-) 1,6 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 10 | 90,4 (+/-) 2,6 | 9,5 (+/-) 2,6 |
| Ultuna _γ -bestrahlt | 92 | 46,9 (+/-) 2,6 | 50,6 (+/-) 4,6 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 91,5 (+/-) 1,6 | 6,4 (+/-) 1,6 |
| Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 47,0 (+/-) 3,3 | 52,2 (+/-) 3,3 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 10 | 90,9 (+/-) 0,4 | 9,0 (+/-) 0,4 |
| Ultuna _{SE.ST.} | 92 | 57,7 (+/-) 3,1 | 45,2 (+/-) 3,1 |
| Kontrolle | 10 | 100 | 0 |
| Kontrolle | 92 | 100 | 0 |

4.6.1.3 Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fractionen

Im Wasser der nach Trocknung der jeweiligen Huminstoff-Fractionen (Lyophilisation) lag keine Radioaktivität vor. Die insgesamt wiedergefundene Radioaktivität in den Huminstoff-Fractionen entsprach nicht exakt der zuvor bestimmten Menge an NER in den jeweiligen Partikelgrößenfraktionen und lag im Bereich von 85 bis 100 %. In den Proben Ultuna_{SE.ST.} wurde die Menge der NER in den Huminen rechnerisch nach Abzug der NER in den anderen Huminstoff-Fractionen von der insgesamt bestimmten NER Menge bestimmt. Somit ergaben sich in diesen Proben genau 100 % Wiederfindung der Radioaktivität. Es waren keine signifikanten Unterschiede der Verteilungsmuster der NER zwischen Ton und Schluff zu erkennen. Es ließ sich jedoch feststellen, dass in den nicht sterilen Gesamtbodenproben nach 10 Tagen signifikant mehr größere Anteile der NER in den Huminen vorlagen (etwa 25 % der NER im Ton, etwa 30 % der NER im Schluff) als in allen sterilen Proben. In diesen lagen

jeweils weniger als 10 % der NER in Huminen des Tons vor. Im Ton der sequentiell sterilisierten Proben $Ultuna_{SE,ST}$ waren nur etwa 5 % der NER in den Huminen lokalisiert. Dies entsprach der auch der NER Menge in den Huminen aller sterilen Schluffproben. Geringe Anteile der NER lagen in allen Proben in den Huminsäuren vor (jeweils weniger oder gleich 5 % der insgesamt quantifizierten NER Menge). Lediglich in den Huminsäuren des Tons nicht steriler Gesamtbodenproben lagen etwa 10 % der NER in den Huminsäuren vor. In den Proben $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ und $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ lagen vergleichbare Mengen der NER in den Nicht-Huminen aus Ton und Schluff vor (jeweils etwa 40 %). In den Nicht-Huminen der Proben $Ultuna$ (nativ) lagen etwa 35 in den Nicht-Huminen des Tons und etwa 25 % in den Nicht-Huminen des Schluffs vor. Dieser Anteil betrug im Schluff und Ton der Proben $Ultuna_{SE,ST}$ etwa 50 bis 55 %. In den Fulvinsäuren aus Ton und Schluff der Proben $Ultuna$ (nativ) sowie auch den Proben $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ und $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ lagen etwa 30 bis 35 % der NER vor. Dieser Anteil war im Ton und Schluff der Proben $Ultuna_{SE,ST}$ höher und lag bei etwa 52 %. Die prozentuale Verteilung der NER in den Huminstoff-Faktionen im Ton und Schluff der Gesamtbodenproben (Triplikate) nach 10 Tagen Inkubation ist in Mittelwerten in Abbildung 4.13 aufgeführt.

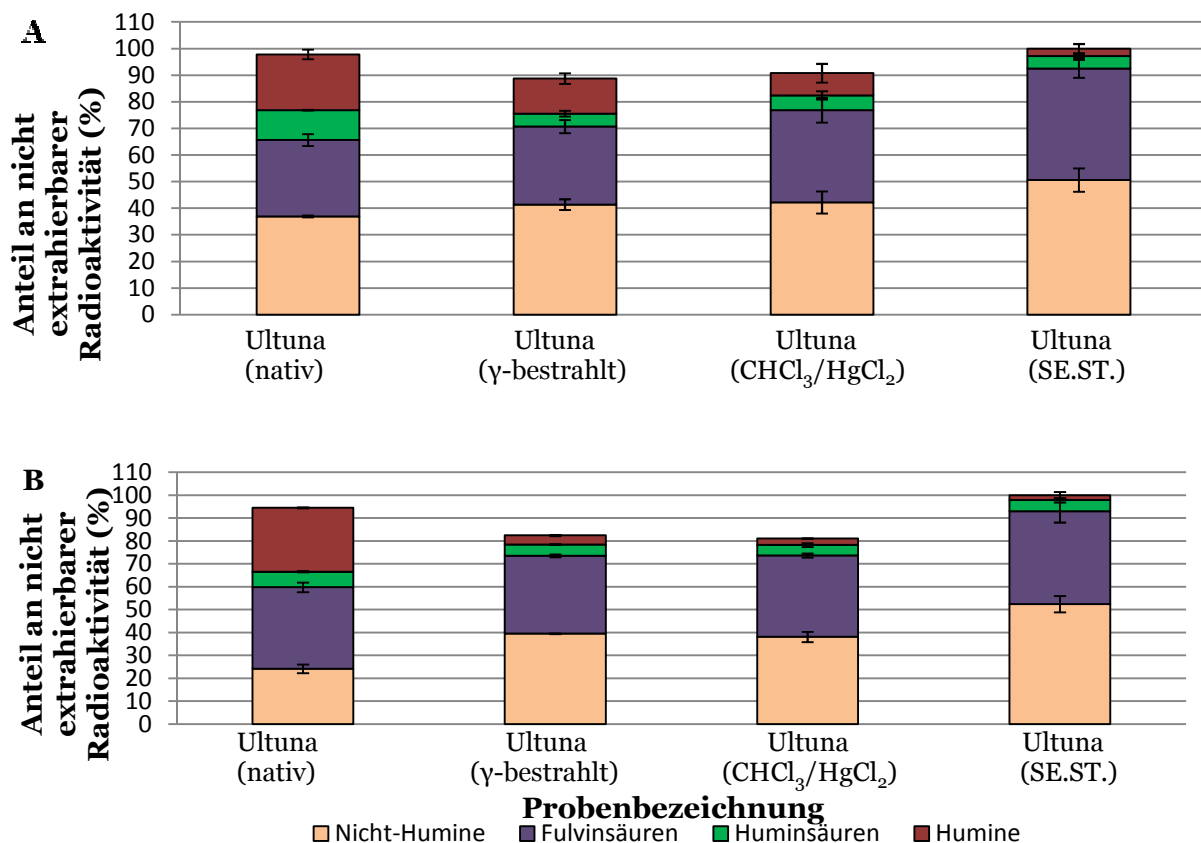


Abb. 4.13: Die Mittelwerte der in den Huminstoff-Faktionen in Ton (A) und Schluff (B) quantifizierten nicht extrahierbaren Radioaktivität der Gesamtbodenproben (n=2) nach 10 Tagen Inkubation mit ihrer jeweiligen Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

Die prozentuale Verteilung der NER im Ton und Schluff der Gesamtbodenproben nach 92 Tagen Inkubation in Abbildung 4.14 dargestellt.

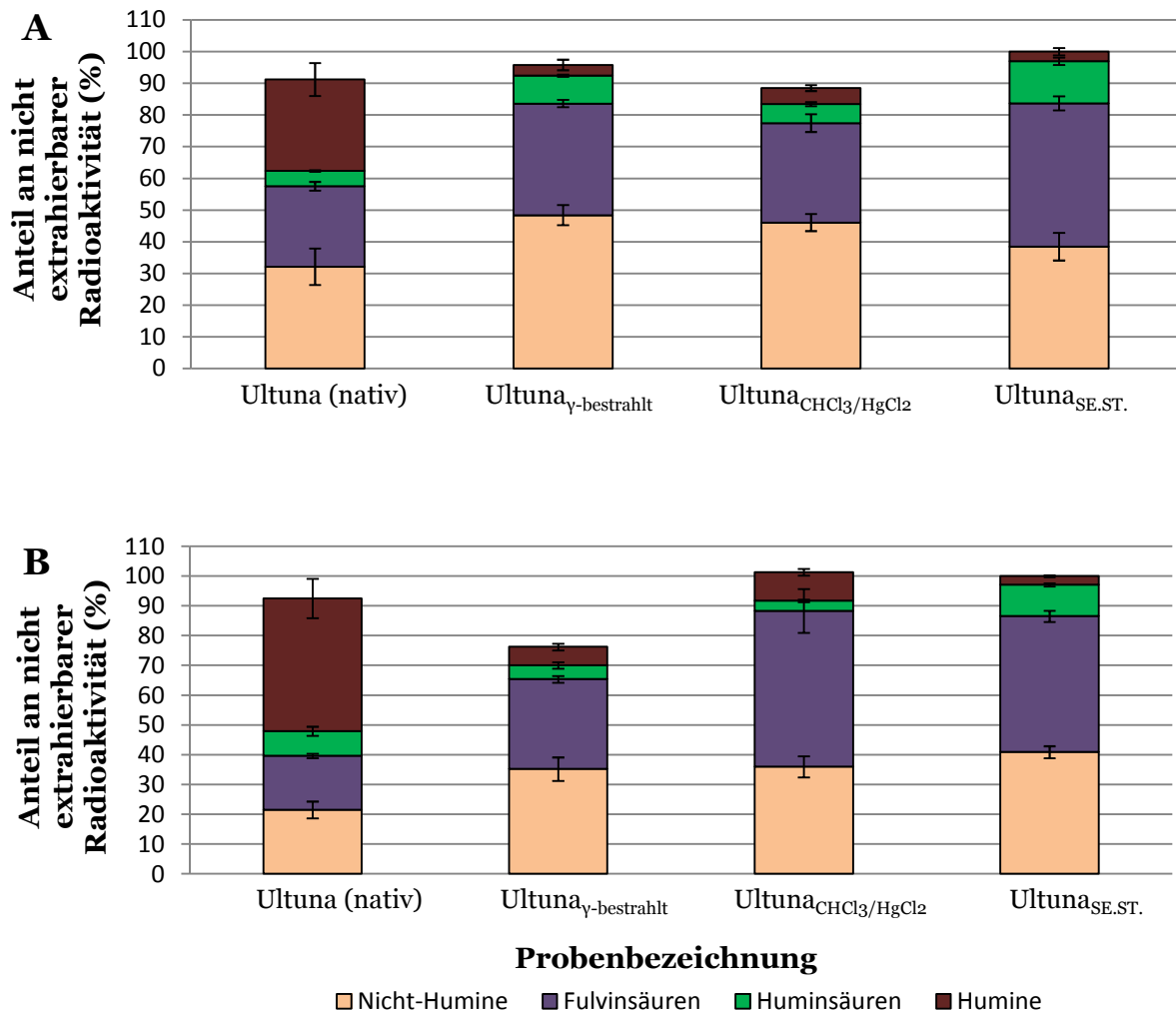


Abb. 4.14: Die Mittelwerte der in den Huminstoff-Fractionen in Ton (A) und Schluff (B) quantifizierten nicht extrahierbaren Radioaktivität der Gesamtbodenproben (n=3) nach 92 Tagen Inkubation mit ihrer jeweiligen Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

Die insgesamt wiedergefundene Radioaktivität in den Huminstoff-Faktionen nach 92 Tagen Inkubation entsprach nicht exakt der zuvor bestimmten Menge an NER in den jeweiligen Partikelgrößenfraktionen und lag im Bereich von 75 bis 100 %. In den Huminen der nicht sterilen Gesamtbodenproben lagen wie auch nach 10 Tagen mehr NER vor (etwa 30 % in Huminen des Tons, etwa 45 % in Huminen des Schluffs) vor als in den sterilen Gesamtbodenproben. Dort lagen jeweils in den Huminen des Tons und Schluffs weniger als 10 % der NER vor. Der Anteil an NER in den Huminsäuren lag bei allen Ansätzen unter 15 %. In den Nicht-Huminen des Tons der Proben Ultuna (nativ) lagen etwa 32 % und in denen des Schluffs etwa 22 % der NER vor. Diese Anteile waren größer in den sterilen Ansätzen. Im Ton der Proben Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} lagen mehr als 40 % der NER vor und im Schluff dieser Proben jeweils etwa 35 %. In den Proben Ultuna_{SE.ST.} lagen sowohl in den

Nicht-Huminen des Tons als auch in denen des Schluffs etwa 35 % der NER vor. In den Fulvinsäuren des Tons nicht steriler Gesamtbodenproben lagen etwa 28 % der NER und in denen des Schluffs etwa 21 % der NER vor. In allen sterilen Ansätzen waren diese Anteile sowohl in Fulvinsäuren des Tons als auch des Schluffs größer gleich 30 %.

4.6.1.4 Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse

Nach 10 Tagen wurden die isolierten Huminstoff-Fractionen mit Dichlormethan extrahiert (in Abschnitt 3.7.1 erläutert). In den Extrakten der nicht sterilen Ansätze Ultuna (nativ) lagen in den Huminen etwa 9-10 % der nicht extrahierbaren Radioaktivität der Humine vor. Dies galt sowohl für Humine aus dem Schluff als auch des Tons. In den Nicht-Huminen und Fulvinsäuren aus Ton und Schluff dieser Proben lagen etwa 20-30 % der NER im Dichlormethanextrakt vor, in den Huminsäuren des Tons und des Schluffs jeweils etwa 20 %. In den Extrakten der sterilen Ansätze Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} lagen in den Huminen etwa 60 % der nicht extrahierbaren Radioaktivität der Humine vor. Dies galt sowohl für Humine aus dem Schluff als auch des Tons der Ansätze. In den Nicht-Huminen, Fulvinsäuren und Huminsäuren aus Ton und Schluff dieser Proben lagen etwa 35-45 % der NER im Dichlormethanextrakt vor. In den Extrakten der sequentiell sterilisierten Proben Ultuna_{SE,ST} lagen Nicht-Huminen und Fulvinsäuren aus Ton und Schluff jeweils 80-85 % der nicht extrahierbaren Radioaktivität dieser Fraktionen vor. Die Extrakte wurden mit DC analysiert. Es ließ sich feststellen, dass die Radioaktivität in allen Extrakten der Huminstoff-Fractionen der Proben Ultuna (nativ) sowie auch der Proben Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} zu nahezu gleichen Prozentanteilen auf Metalaxyl (etwa 45 %) und Metalaxylsäure (etwa 55 %) beruhte. In den Extrakten aller Huminstoff-Fractionen der Proben Ultuna_{SE,ST} lag nur Metalaxyl vor. Eine Abbildung eines mittels Bioimager gescannten Radiofilms einer DC Platte bei der Analyse der Dichlormethan-Extrakte ist als Beispiel im Anhang der vorliegenden Arbeit aufgeführt (Abbildung A3).

Die Huminstoff-Fractionen der Gesamtbodenproben nach 92 Tagen Inkubation (Triplikate) wurden einer alkalischen Hydrolyse unterzogen (siehe Abschnitt 3.10). Danach konnte zunächst der Anteil der durch die Degradation freigesetzten Radioaktivität bezogen auf die Gesamtmenge an NER in den Huminstoff-Fractionen quantifiziert werden. Aufgrund der geringen NER Anteile in den Huminsäuren und Huminen der Proben Ultuna_{SE,ST} wurden diese nicht einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Es war festzustellen, dass sich durch die alkalische Hydrolyse signifikant weniger Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der nicht sterilen Proben freigesetzten ließ als aus den Huminstoff-Fractionen der sterilen Proben. Dies betraf insbesondere alle Huminstoff-Fractionen im Schluff und die Humine im Ton aus denen jeweils weniger als etwa 25 % der NER wieder freigesetzt wurden. In den

sterilen Proben Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} konnten aus allen Huminstoff-Fractionen (sowohl aus Ton als auch aus Schluff) etwa 40 % bis 60 % der NER wieder freigesetzt werden. In den Proben Ultuna_{SE,ST} wurden etwa 90 % der NER aus den Nicht-Huminen und Fulvinsäuren durch Degradation frei. Die aus den Huminstoff-Fractionen freigesetzten Mengen Radioaktivität sind in ihrem Anteil an der insgesamt in der jeweiligen Partikelgrößenfraktion quantifizierten NER Menge in Tabelle 4.13 dargestellt.

Tab. 4.13: Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der Tonfraktion (A) und der Schlufffraktion (B) der Gesamtbodenproben (n=3) nach 92 Tagen Inkubation in % bezogen auf die Gesamtmenge der NER in der jeweiligen Huminstoff-Fraktion inklusive ihrer Standardabweichungen. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| A | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | | |
|----------|---|--|-----------------------|---------------------|--------------------|----------------|
| | | (Ton) | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine |
| | Ultuna (nativ) | | 40,3 (+/-) 2,0 | 49,6 (+/-) 7,0 | 33,4 (+/-) 6,4 | 22,0 (+/-) 0,8 |
| | Ultuna _γ -bestrahlt | | 55,5 (+/-) 1,6 | 47,3 (+/-) 3,9 | 54,9 (+/-) 11,0 | 72,4 (+/-) 5,3 |
| | Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | | 61,4 (+/-) 3,4 | 56,2 (+/-) 7,7 | 45,7 (+/-) 9,3 | 44,9 (+/-) 8,0 |
| | Ultuna _{SE,ST} | | 95,9 (+/-) 1,3 | 93,9 (+/-) 2,1 | - | - |
| B | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | | |
| | (Schluff) | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine | |
| | Ultuna (nativ) | | 20,2 (+/-) 1,2 | 20,8 (+/-) 6,5 | 15,7 (+/-) 2,5 | 25,5 (+/-) 5,7 |
| | Ultuna _γ -bestrahlt | | 62,2 (+/-) 10,3 | 65,4 (+/-) 10,3 | 65,3 (+/-) 11,5 | 61,6 (+/-) 9,9 |
| | Ultuna _{CHCl₃/HgCl₂} | | 55,0 (+/-) 4,8 | 41,3 (+/-) 3,6 | 45,7 (+/-) 0,9 | 39,6 (+/-) 1,4 |
| | Ultuna _{SE,ST} | | 88,7 (+/-) 4,6 | 90,0 (+/-) 4,2 | - | - |

Die durch die Degradation freigesetzte Radioaktivität wurde mit Dünnschichtchromatographie analysiert. Bei allen Extrakten nach alkalischer Hydrolyse ließen sich unterschiedliche Mengen an Startaktivität, also radioaktiver Substanz, die nach Auftragung am Auftragungspunkt auf der Platte verblieb, quantifizieren. Metaloxylsäure

konnte durch Co-Chromatographie als einziges Transformationsprodukt identifiziert werden. Es ließ sich feststellen, dass sowohl die prozentualen Anteile der Startaktivität als auch die der Metalaxylsäure bezogen auf die insgesamt pro Extrakt auf die DC-Platte ausgebrachte Radioaktivität sich nicht zwischen Huminstoff-Fractionen aus Ton und Schluff unterschied aber Unterschiede zwischen den Proben $Ultuna_{SE,ST}$, $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ und $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ und $Ultuna$ (nativ) feststellbar waren. Die Startaktivität in der Analyse der Huminstoff-Fractionen nach alkalischer Hydrolyse der Proben $Ultuna_{SE,ST}$ betrug etwa 2 %; 98 % konnten der Metalaxylsäure zugeordnet werden. In den Proben $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ und $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ wurden etwa 12 % Startaktivität gemessen; 88 % der auf die DC-Platte ausgebrachten Radioaktivität konnten Metalaxylsäure zugeordnet werden. In den Proben $Ultuna$ (nativ) war die Startaktivität nochmals höher (etwa 20%) und etwa 80 % konnten der Metalaxylsäure zugeordnet werden. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass bei den DC-Analysen der Extrakte aus dem Fraktionswasser und der Soxhlet-Extrakte nahezu keine Startaktivität auf den Platten detektiert wurde (< 1 %).

Abbildung 4.15 zeigt ein Beispielchromatogramm, welches sich nach DC-Analyse der degradierten Humine des Schluffs der Probe $Ultuna_{SE,ST}$ ergab.

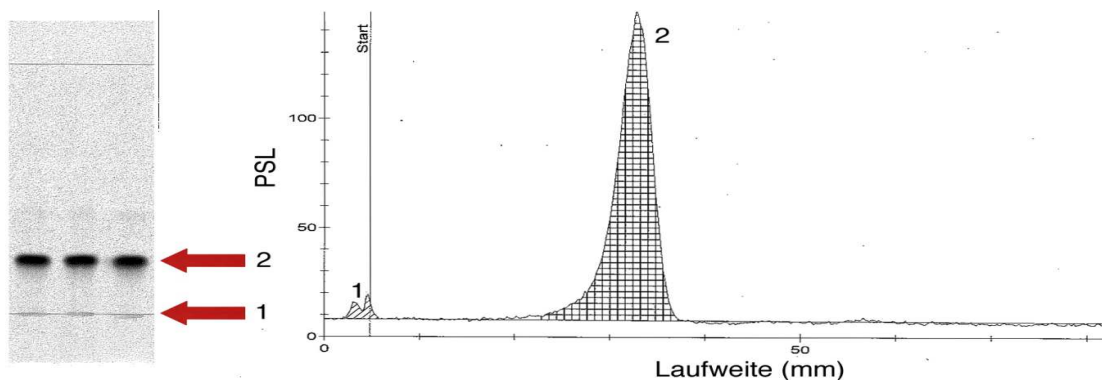


Abb. 4.15: Beispiel einer mittels Bioimager analysierten DC-Platte (links). Auswertung eines Extraktes nach alkalischer Hydrolyse der Huminfraction des Schluffs einer Gesamtbodenprobe ($Ultuna_{SE,ST}$) durch die Bioimager-Software (rechts). Peak 1: Startaktivität; Peak 2: co-chromatographiert mit der Referenzsubstanz Metalaxylsäure.

In zusätzlichen Versuchen wurde ^{14}C -Metalaxyl mit Degradationslösung versetzt, inkubiert und diese mit DC analysiert (siehe Abschnitt 3.10). Hierbei ließ sich bei allen Proben feststellen, dass nur noch Metalaxylsäure in den Extrakten vorlag.

4.6.2 Fraktionsproben

Der Verbleib und das Stoffschicksal des Fungizids ^{14}C -Metalaxyl wurden in sterilem und nicht sterilem Ton und Schluff nach 10 und 92 Tagen Inkubation untersucht. Hierzu wurden die Anteile mineralisierter, extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität bilanziert (siehe Abschnitt 3.5.2). Anschließend wurde die extrahierbare Radioaktivität der Ansätze mit

DC und HPLC analysiert (siehe Abschnitt 3.18.1, 3.18.2). Die Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Fraktionsproben wurde untersucht (siehe Abschnitt 3.7.2) und diese nach 10 und 92 Tagen mit alkalischer Hydrolyse degradiert und die freigesetzte Radioaktivität aus den NER mit DC untersucht (siehe Abschnitt 3.10).

4.6.2.1 Bilanzierung der Radioaktivität

Die wiedergefundene Radioaktivität wurde bezogen auf die zu den Fraktionsproben applizierte Radioaktivität (4500064 dpm) bezogen. Die Bilanzierung der wiedergefundenen Radioaktivität nach 10 und 92 Tagen Inkubation ist in Mittelwerten in Tabelle 4.14 dargestellt.

Tab. 4.14: Mittelwerte der wiedergefundenen Radioaktivität in Anteilen der extrahierbaren Radioaktivität (ER), nicht extrahierbaren Radioaktivität (NER) Mineralisation der Fraktionsproben (n=2) bezogen auf die jeweilige applizierte Radioaktivität in % inklusive Standardabweichung. Die Summe der Radioaktivität (ER, NER und Mineralisation) entspricht jeweils der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität einer Probe. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | ER (%) | NER (%) | Mineralisation (%) |
|--|------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| Ton (nativ) | 10 | 98,8 (+/-) 1,2 | 5,5 (+/-) 0,1 | 0,1 (+/-) 0,01 |
| Ton (nativ) | 92 | 84,2 (+/-) 0,3 | 11,2 (+/-) 1,7 | 4,0 (+/-) 0,2 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 101,5 (+/-) 2,0 | 3,2 (+/-) 0,6 | 0,01 (+/-) 0,008 |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 86,6 (+/-) 1,1 | 4,6 (+/-) 1,1 | 0,02 (+/-) 0,004 |
| Schluff (native) | 10 | 97,5 (+/-) 1,4 | 7,9 (+/-) 0,7 | 0,4 (+/-) 0,1 |
| Schluff (native) | 92 | 89,2 (+/-) 0,5 | 16,5 (+/-) 0,1 | 9,3 (+/-) 0,4 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 98,0 (+/-) 0,5 | 3,9 (+/-) 2,5 | 0,01 (+/-) 0,003 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 84,0 (+/-) 2,2 | 7,9 (+/-) 0,1 | 0,04 (+/-) 0,01 |

Die Mineralisation und die Anteile extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität der Fraktionsproben (Duplikate) wurden nach 10 und 92 Tagen Inkubation nach erschöpfender Extraktion quantifiziert. Die wiedergefundene Radioaktivität wurde jeweils auf die applizierte Radioaktivität (45000064 dpm) bezogen. Die Wiederfindung der applizierten Radioaktivität lag für alle Proben zu beiden Zeitpunkten in einem Bereich von 90 bis 105 %.

Die Mineralisation betrug in den nicht sterilen Schluffproben nach 10 Tagen 0,4 und nach 92 Tagen 9,3 %. Die Mineralisation in den nicht sterilen Tonproben war geringer und betrug nach 10 Tagen Inkubation 0,1 und nach 92 Tagen 4,0 %. Dies entsprach ungefähr der Mineralisation nicht steriler Gesamtbodenproben während die Mineralisation in den nicht sterilen Schluffproben höher war als in nicht sterilen Gesamtbodenproben (vergleiche Tabelle 4.11). Die Mineralisation in den sterilen Fraktionsproben betrug jeweils nach beiden Inkubationszeiträumen weniger als 0,1 %.

Generell war festzustellen, dass die Menge an nicht extrahierbarer Radioaktivität und Mineralisation in allen Fraktionsproben mit Dauer der Inkubation anstieg, während die Menge extrahierbarer Radioaktivität sank. Allgemein betrachtet waren die größten Anteile wiedergefundener Radioaktivität zu beiden Zeitpunkten in allen Proben extrahierbar (> 70 %). Da die isolierten Fraktionen mit Seesand gemischt wurden und analog zur Partikelgrößenfraktionierung der Gesamtbodenproben zuerst mit Reinstwasser und Ultraschall extrahiert wurden (in Abschnitten 3.7.2; 3.8 erläutert) setzte sich die extrahierbare Radioaktivität aus den Anteilen der Radioaktivität im „Fraktionswasser“ und den Soxhlet-Extrakten des Seesandes und des Tons bzw. Schluffs zusammen. Die Anteile der extrahierbaren Radioaktivität in diesen unterschiedlichen Extrakten sind in Abbildung 4.16 gezeigt.

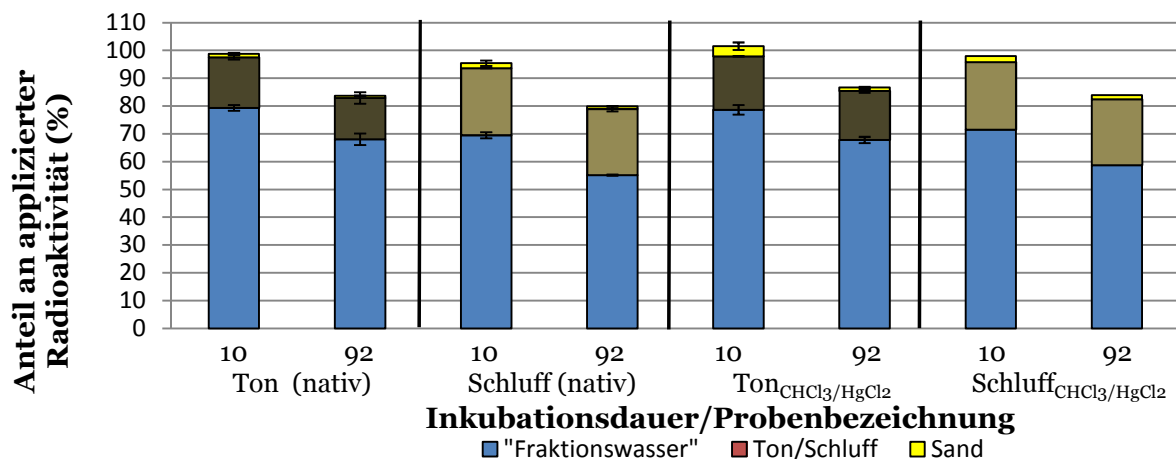


Abb. 4.16: Extrahierbare Radioaktivität bestehend aus der Radioaktivität im „Fraktionswasser“ der Fraktionsproben sowie den Soxhlet-Extrakten aus Seesand und Ton beziehungsweise Schluff der Fraktionsproben (n=2) bezogen auf die applizierte Radioaktivität in % nach 10 und 92 Tagen Inkubation in Mittelwerten und ihrer Standardabweichung.

Hierbei lagen im „Fraktionswasser“ der Fraktionsproben (Schluff nativ sowie steril) nach 10 Tagen Inkubation jeweils etwa 70 % und nach 92 Tagen Inkubation weniger als 60 % der Radioaktivität vor. Im „Fraktionswasser“ der isolierten sterilen und nicht sterilen Tonproben betrug dieser Anteil nach 10 Tagen etwa 80 % und nach 92 Tagen etwa 70 %. Aus nicht

sterilem Ton konnten nach 10 etwa 20 % nach 92 Tagen etwa 14 % mittels Soxhlet-Extraktion extrahiert werden. In Soxhlet-Extrakten aus nicht sterilem Schluff lagen nach 10 Tagen etwa 26 % und nach 92 Tagen etwa 24 % der applizierten Radioaktivität vor. In den Soxhlet-Extrakten aller Proben wurden jeweils weniger als 3,5 % der Radioaktivität im Sandextrakt quantifiziert.

Die Menge der NER in den nicht sterilen Schluffproben betrug nach 10 Tagen etwa 7,9 und nach 92 Tagen etwa 16,5 %. In den nicht sterilen Tonproben betrug die NER Menge nach 10 Tagen etwa 5,5 und nach 92 Tagen etwa 11,2 %. Diese Werte waren geringer als die NER Mengen in nicht sterilen Gesamtbodenproben zu beiden Zeitpunkten (siehe Tabelle 4.11). Die NER Mengen in den sterilen Fraktionsproben waren signifikant geringer als in den nicht sterilen Fraktionsproben und betrugen im Ton 3,2 (nach 10 Tagen) und 4,6 (nach 92 Tagen). Im sterilen Schluff lagen nach 10 Tagen etwa 3,9 und nach 92 Tagen etwa 7,9 % der applizierten Radioaktivität als NER vor. Diese waren geringfügig kleiner als die NER Mengen in identisch sterilisiertem Gesamtboden Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} (siehe Tabelle 4.11). Im Seesand der aller Fraktionsproben wurden die geringsten NER Mengen quantifiziert. Diese lagen bei maximal 1,6 % (Probe Ton_{CHCl₃/HgCl₂}, 10 Tage Inkubation).

4.6.2.2 Analyse der extrahierbaren Radioaktivität

Die Extrakte des „Fraktionswassers“ der Fraktionsproben und die Soxhlet-Extrakte wurden mit DC und HPLC analysiert. Da die ermittelten Werte der DC Analyse nahezu denen der HPLC Analyse entsprachen, sind im Folgenden nur die Daten der HPLC-Analyse der Extrakte aufgeführt. Da in allen Soxhlet-Extrakten der Fraktionsproben nur Metalaxyl vorlag, sind im Folgenden nur die Daten der Analytik des „Fraktionswassers“ in Tabelle 4.15 zusammengefasst. Es ließ sich feststellen, dass zu beiden Zeitpunkten in den Extrakten des „Fraktionswassers“ nicht steriler Schluffproben jeweils mehr Metalaxylsäure vorlag (etwa 8,0 % nach 10 Tagen, etwa 65,9 % nach 92 Tagen) als im „Fraktionswasser“ nicht steriler Tonproben (5,6 % nach 10 Tagen, 58,7 % nach 92 Tagen). Die Menge gebildeter Metalaxylsäure in den sterilen Tonproben war geringer (5,6 % nach 10 Tagen, 17,7 % nach 92 Tagen) als in den nicht sterilen Tonproben. Ebenfalls wurde auch in den sterilen Schluffproben weniger Metalaxylsäure gebildet (12,4 % nach 10 Tagen, 38,0 % nach 92 Tagen) als in den nicht sterilen Schluffproben.

Tab. 4.15: Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure sowie eines zweiten Metaboliten an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des „Fraktionswassers“ der Fraktionsproben (n=2) nach 10 und 92 Tagen Inkubation in % inklusive Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| Probe | Inkubationsdauer (Tage) | Metalaxyl (%) | Metalaxylsäure (%) | 2.Metabolit (%) |
|--|----------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| Ton (nativ) | 10 | 94,3 (+/-) 3,9 | 8,8 (+/-) 3,9 | - |
| Ton (nativ) | 92 | 48,18 (+/-) 3,0 | 58,7 (+/-) 2,6 | - |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 91,2 (+/-) 1,2 | 5,6 (+/-) 0,9 | - |
| Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 82,2 (+/-) 12,2 | 17,7 (+/-) 12,2 | - |
| Schluff (native) | 10 | 91,9 (+/-) 0,7 | 8,0 (+/-) 0,7 | - |
| Schluff (native) | 92 | 30,0 (+/-) 0,8 | 65,9 (+/-) 0,8 | 4,0 (+/-) 0,1 |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 10 | 87,6 (+/-) 1,3 | 12,4 (+/-) 3,1 | - |
| Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 92 | 61,9 (+/-) 17,3 | 38,0 (+/-) 17,3 | - |

In Abbildung 4.17 ist ein Beispielchromatogramm der HPLC-Analyse einer nicht sterilen Schluffprobe nach 92 Tagen Inkubation gezeigt.

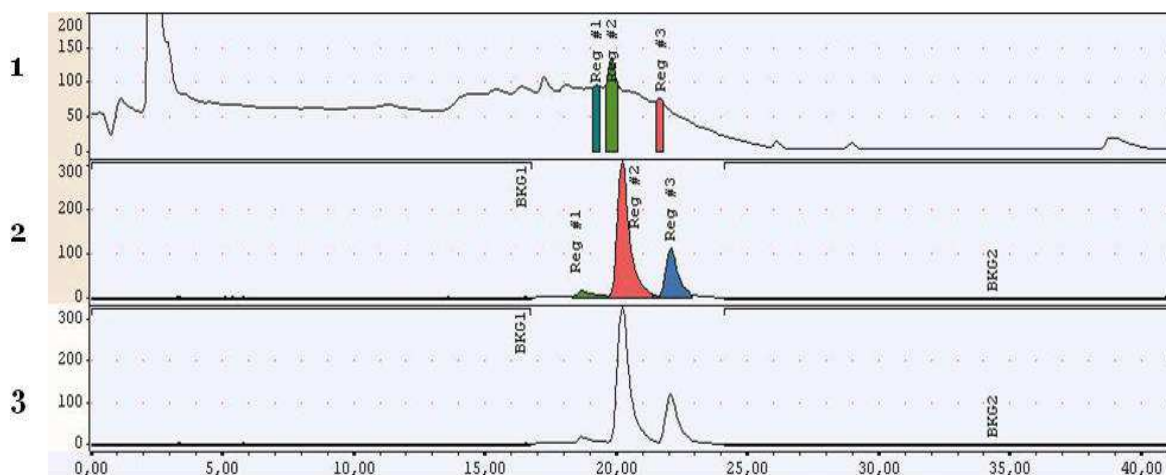


Abb. 4.17: Beispiel eines HPLC-Chromatogramms des „Fraktionswassers“ der Fraktionsprobe Schluff (nativ) nach 92 Tagen Inkubation. 1: Detektion im UV Kanal bei 266 nm. 2: Detektion im Radiokanal B, Reg#1 (grün) beschrieben als 2. Metabolit, Retentionszeit 18,9 min; Reg#2 (rot) co-chromatographiert mit Referenzsubstanz Metalaxylsäure, Retentionszeit 20,8 min; Reg#3 (blau) co-chromatographiert mit der Referenzsubstanz Metalaxyl, Retentionszeit 22,8 min. 3: Detektion im Radiokanal A. Die Verschiebung zwischen UV Kanal und Radiokanal A und B betrug jeweils 1 min. BKG 1,2: Background.

Es wurde in nicht sterilen Schluffproben nach 92 Tagen Inkubation ein zweiter Metabolit gefunden dessen Anteil an der in das HPLC-System injizierten Radioaktivität etwa 4 % betrug. Dieser Metabolit wurde in keinem anderen Extrakt der vorliegenden Studie gefunden. Um diesen Metaboliten zu identifizieren wurden die „Fraktionswasser“ Extrakte mit präparativer HPLC aufgereinigt und mit LC-MS/MS analysiert (siehe Anhang, Abbildung A4).

4.6.2.3 Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen

Die Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Fraktionsproben wurde nach 10 sowie 92 Tagen untersucht. Im Wasser nach Lyophilisation lag analog zu den Gesamtbodenproben keine Radioaktivität vor. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die größten NER Mengen in den Huminen der nicht sterilen Fraktionsproben zu beiden Zeitpunkten befanden (30 % in den Huminen des Tons nach 10 Tagen und etwa 45 % in den Huminen des Schluffs nach 10 Tagen. Diese Anteile stiegen im Lauf der Inkubation an. Nach 92 Tagen lagen etwa 50 % der NER in den Huminen des Tons und etwa 65 % der NER in den Huminen des Schluffs vor. In allen Proben lagen zu beiden Zeitpunkten weniger als 10 % der NER in den Huminsäuren vor. Der Anteil der NER in den Nicht-Huminen des nicht sterilen Tons und Schluffs (etwa 25 % nach 10 Tagen, etwa 10 bis 15 % nach 92 Tagen) war signifikant geringer als die NER Mengen in den Nicht-Huminen der sterilen Fraktionen. Im sterilen Ton lagen diese nach 10 Tagen bei 42 % und nach 92 Tage bei 25 %. Im sterilen Schluff lagen diese nach 10 Tagen bei etwa 55 % und nach 92 Tagen bei etwa 25 %. In den Fulvinsäuren der nicht sterilen Fraktionsproben lagen im Ton etwa 20 bis 25 % der NER, in den Fulvinsäuren des nicht sterilen Schluffs etwa 15 bis 20 % der NER vor zu beiden Zeitpunkten vor. In den sterilen Fraktionsproben lagen diese Anteile höher und waren zu beiden Zeitpunkten größer oder gleich 30 %. Die Mittelwerte der Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität an dem Gesamtanteil der NER in den jeweiligen Huminstoff-Fraktionen der Fraktionsproben (Duplikate) nach 10 und 92 Tagen Inkubation sind in Abbildung 4.18 aufgeführt.

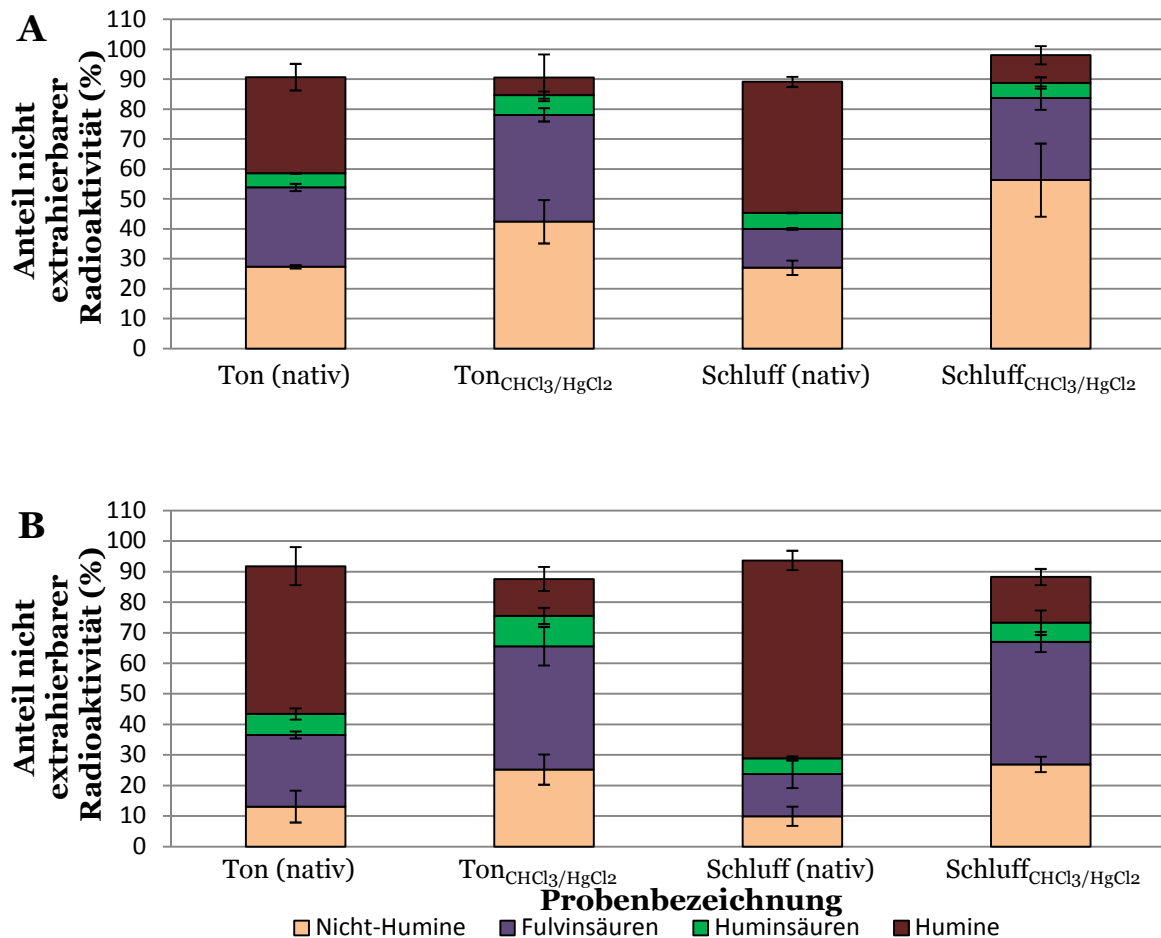


Abb. 4.18: Mittelwerte der in den Huminstoff-Fractionen der Fraktionsproben (n=2) quantifizierten nicht extrahierbaren Radioaktivität nach 10 Tagen Inkubation (A) und 92 Tagen Inkubation (B) inklusive ihrer Standardabweichung. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

4.6.2.4 Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse

Huminstoff-Fractionen aus Ton und Schluff wurden einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und die sich ergebenden Extrakte nachfolgend mit DC analysiert. In nicht sterilen Ton und Schluff wurden etwa 43 bis maximal 58 % der Radioaktivität aus Nicht-Huminen, Fulvinsäuren und Huminsäuren freigesetzt. Aus sterilem Ton und Schluff betrugen diese Anteile etwa 61 bis maximal 86 %. Die geringsten Mengen Radioaktivität konnten aus den Huminen im nicht sterilen Schluff und Ton freigesetzt werden (etwa 20 %) wobei aus sterilem Ton und Schluff etwa 59 % beziehungsweise 69 % aus den Huminen freigesetzt wurde. Es wurde ersichtlich, dass aus den nicht sterilen Fraktionen immer signifikant weniger Radioaktivität freigesetzt werden konnte als aus den sterilen Fraktionen. Die

Mittelwerte der durch Degradation freigesetzten Radioaktivität sind in Tabelle 4.16 aufgeführt.

Tab. 4.16: Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der Fraktionsproben (n=2) Ton (A) und Schluff (B) nach 92 Tagen Inkubation in % bezogen auf die Gesamtmenge der NER der jeweiligen Huminstoff-Fraktion inklusive ihrer Standardabweichungen. Nomenklatur der sterilen Ansätze siehe Tabelle 3.1.

| A | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | |
|----------|--|--|---------------------|--------------------|----------------|
| | | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine |
| | Ton (nativ) | 50,8 (+/-) 5,2 | 58,2 (+/-) 3,6 | 45,2 (+/-) 1,0 | 20,0 (+/-) 1,2 |
| | Ton _{CHCl₃/HgCl₂} | 76,3 (+/-) 3,4 | 72,3 (+/-) 3,5 | 86,8 (+/-) 1,9 | 69,7 (+/-) 8,0 |
| B | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | |
| | | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine |
| | Schluff (nativ) | 43,2 (+/-) 2,6 | 48,4 (+/-) 3,8 | 47,6 (+/-) 1,0 | 18,0 (+/-) 3,4 |
| | Schluff _{CHCl₃/HgCl₂} | 61,7 (+/-) 3,3 | 66,7 (+/-) 1,4 | 82,1 (+/-) 1,4 | 59,4 (+/-) 4,1 |

Nach DC-Analyse konnte in den Extrakten der Proben nur Metalaxylsäure identifiziert werden. Jedoch waren die Startaktivitäten in der DC-Analyse der Extrakte aus nicht sterilen Fraktionsproben noch größer (etwa 30 %) als dies in den nicht sterilen Gesamtbodenproben nach alkalischer Hydrolyse der Fall war (etwa 20 %, siehe Abschnitt 4.6.1.4).

4.6.3 Boden mit/ohne Enzymzugabe

Der Verbleib und das Stoffschicksal von ¹⁴C-Metalaxyl wurden in den Ansätzen mit und ohne Enzymzugabe untersucht. Hierzu wurde nach jeweils 10 Tagen Inkubation die wiedergefundene Radioaktivität bilanziert, die extrahierbaren Anteile mit DC und HPLC analysiert und die Verteilung der NER in den Huminstoff-Fractionen von Ton und Schluff der Proben untersucht. Anschließend wurden diese Fraktionen mit alkalischer Hydrolyse degradiert und die freigesetzte Radioaktivität mit DC analysiert.

4.6.3.1 Bilanzierung der Radioaktivität

Die Mineralisation und die Anteile extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität der Bodenansätze mit/ohne Enzymzugabe (Triplikate) wurden nach 10 Tagen Inkubation quantifiziert. Der Boden wurde vor Enzymzugabe mit ^{14}C -Metalaxyl appliziert (9246475 dpm) und folgend in zwei gleiche Anteile getrennt. Eine Hälfte wurde im Polyamidbeutel mit auf Alginatkugeln immobilisierter Laccase versetzt und der Rest nicht mit Enzymen versetzt. Des Weiteren wurden als Kontrollen (Boden ohne Enzymzugabe) Ansätze mit Alginat versetzt auf welches keine Laccase immobilisiert wurde. Auch hier wurde Boden in einem Beutel und außerhalb des Beutels im stationären System zusammen inkubiert (in Abschnitt 3.4 erläutert). Aus diesem Grund ist die wiedergefundene Radioaktivität jeweils auf die applizierte Radioaktivität zum Gesamtboden im Polyamidbeutel und außerhalb des Polyamidbeutels bezogen (jeweils 45000064 dpm). Aufgrund des Versuchsaufbaus ließ sich die Mineralisation nur für das gesamte stationäre System inklusive Boden innerhalb und außerhalb des Beutels bestimmen. Die Bilanzierung der wiedergefundenen Radioaktivität ist in Mittelwerten inklusive Standardabweichungen ($\alpha=0,05$) in Tabelle 4.17 dargestellt.

Tab. 4.17: Mittelwerte der wiedergefundenen Radioaktivität in Anteilen der extrahierbaren Radioaktivität (ER), nicht extrahierbaren Radioaktivität (NER) und Mineralisation der Bodenansätze mit und ohne Enzymzugabe (n=3) bezogen auf die jeweilige applizierte Radioaktivität in % inklusive Standardabweichung. Die Summe der Radioaktivität (ER, NER und Mineralisation) entspricht jeweils der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität einer Probe.

| Probe | ER (%) | NER (%) | Mineralisation (%) |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| Gesamtboden (mit Enzymzugabe) | | | |
| (im Polyamidbeutel) | 84,5 (+/-) 2,2 | 6,3 (+/-) 0,3 | |
| (außerhalb Polyamidbeutel) | 89,4 (+/-) 3,8 | 4,0 (+/-) 0,2 | 0,05 (+/-) 0,01 |
| Gesamtboden (ohne Enzymzugabe) | | | |
| (im Polyamidbeutel) | 80,4 (+/-) 1,4 | 3,4 (+/-) 0,1 | |
| (außerhalb Polyamidbeutel) | 77,3 (+/-) 5,8 | 3,8 (+/-) 0,6 | 0,05 (+/-) 0,02 |

Analog zu den Gesamtbodenproben setzte sich die insgesamt extrahierbare Radioaktivität aus der Radioaktivität im Fraktionswasser und den Soxhlet-Extrakten der

Partikelgrößenfraktionen zusammen. Die nicht extrahierbare Radioaktivität setzt sich aus der Summe der in Sand, Ton und Schluff und Seesand verbliebenen Radioaktivität zusammen. Die Wiederfindung der Radioaktivität lag jeweils zwischen 90 und 100 %. Es ist ersichtlich, dass der überwiegende Anteil der Radioaktivität sowohl im Boden innerhalb und auch außerhalb des Polyamidbeutels bei allen Proben extrahierbar war (jeweils mehr als 77 %). Die Mineralisation aller Proben mit Enzymzugabe betrug etwa 0,05 %. Die Ergebnisse zeigen, dass im Boden mit Enzymzugabe innerhalb des Polyamidbeutels signifikant mehr Radioaktivität nach Extraktion im Boden als NER verblieb (etwa 6,3 %) als im Boden außerhalb des Beutels (etwa 4,0 %). In den Ansätzen mit Alginatzugabe ohne Laccase war kein signifikanter Unterschied der NER Mengen innerhalb des Beutels (3,4 %) und außerhalb des Beutels (3,8 %) festzustellen. Jedoch waren im Fraktionswasser nach Partikelgrößenfraktionierung des Bodens im Polyamidbeutel mehr als 13 % der Radioaktivität an die Partikel gebunden während im Fraktionswasser nach Fraktionierung des den Beutel umgebenden Bodens nur etwa 3 % der Radioaktivität an die ausgeschwemmten Huminstoffe gebunden war.

4.6.3.2 Analyse der extrahierbaren Radioaktivität

Das Fraktionswasser der Ansätze mit Enzymzugabe wurde nach Partikelgrößenfraktionierung des Bodens im Polyamidbeutel und des umgebenden Bodens mit HPLC-Analyse untersucht. Die Daten dieser HPLC-Analyse sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst.

Tab. 4.18: Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des Fraktionswassers der Bodenansätze mit Enzymzugabe (Boden im Polyamidbeutel und außerhalb, jeweils n=3) nach 10 Tagen Inkubation in % inklusive Standardabweichung.

| Probe | Metalaxyl (%) | Metalaxylsäure (%) |
|------------------------|----------------------|---------------------------|
| Boden mit Enzymzugabe | | |
| Boden innerhalb Beutel | 93,5 (+/-) 1,4 | 6,5 (+/-) 1,1 |
| Boden außerhalb Beutel | 94,7 (+/-) 0,4 | 5,3 (+/-) 0,2 |
| Boden ohne Enzymzugabe | | |
| Boden innerhalb Beutel | 92,5 (+/-) 2,1 | 7,5 (+/-) 1,8 |
| Boden außerhalb Beutel | 96,1 (+/-) 1,9 | 3,9 (+/-) 1,5 |

Es ist festzustellen, dass analog zu den Gesamtbodenproben Ultuna_γ-bestrahlt auch in beiden Kompartimenten der Ansätze mit und ohne Enzymzugabe (jeweils innerhalb und außerhalb des Polyamidbeutels) jeweils mehr als 90 % der detektierbaren Radioaktivität im Fraktionswasser auf ¹⁴C-Metalaxyl beruhte. Die restliche Radioaktivität beruhte auf Metalaxylsäure.

4.6.3.3 Verteilung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fractionen

Die Verteilung der NER in den Bodenproben mit und ohne Enzymzugabe wurde jeweils für Ton und Schluff des Bodens im und außerhalb des Polyamidbeutels untersucht (Triplikate). Analog zu den Gesamtbodenproben und Fraktionsproben lag keine Radioaktivität im Wasser nach Lyophilisation der Huminstoff-Fractionen vor. Die Verteilung der NER in den Huminstoff-Fractionen der Proben mit Enzymzugabe Proben ist in Abbildung 4.19 gezeigt.

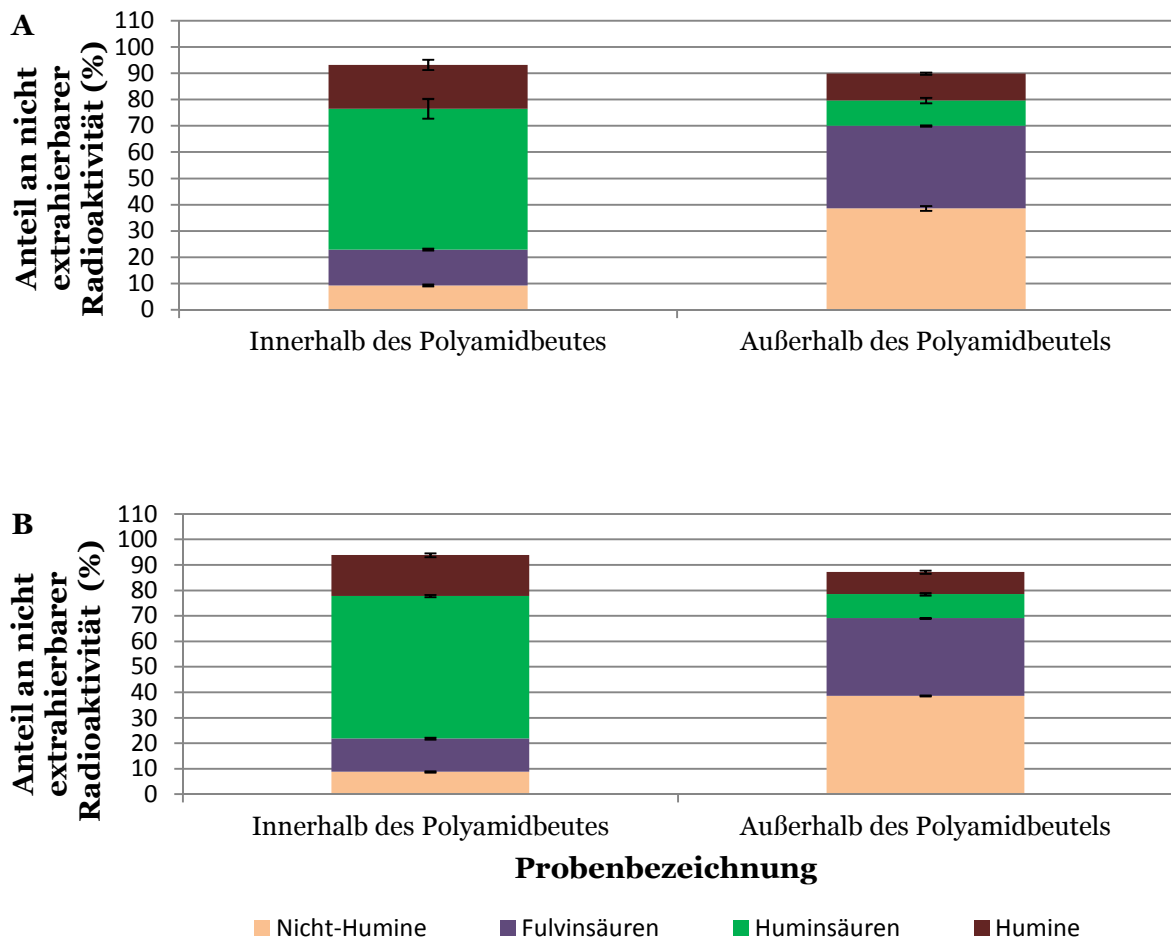


Abb. 4.19: Die Mittelwerte der in den Huminstoff-Fractionen in Ton (A) und Schluff (B) quantifizierten nicht extrahierbaren Radioaktivität in Boden innerhalb und außerhalb des Polyamidbeutels der Inkubationsansätze mit Enzymzugabe nach 10 Tagen Inkubation inklusive Standardabweichung.

Die Verteilung der NER unterschied sich sowohl in den Huminstoff-Fractionen des Tons als auch des Schluffs der Proben mit Enzymzugabe im Polyamidbeutel von der außerhalb des Beutels. Außerhalb des Beutels wurden sowohl im Schluff als auch im Ton etwa 40 % der NER in den Nicht-Huminen, etwa 30 % der NER in den Fulvinsäuren, etwa 10 % der NER in den Huminsäuren und etwa 10 % der NER in den Huminen quantifiziert. Im Ton und Schluff des Bodens innerhalb des Beutels wurden etwa 10 % der NER in den Nicht-Huminen, etwa 12 % in den Fulvinsäuren und etwa 17 % in den Huminen quantifiziert. In den Huminsäuren des Tons sowie des Schluffs des Bodens innerhalb des Beutels lag der Anteil der NER in den Huminsäuren bei 52 bis 60 % und war somit signifikant größer als der Anteil der NER in den Huminsäuren des Bodens außerhalb des Beutels. Bei der Verteilung der NER in Huminstoff-Fractionen des Tons und Schluffs der Proben ohne Enzymzugabe konnten keine Unterschiede zwischen Boden innerhalb und außerhalb des Beutels festgestellt werden. Die Verteilung entsprach nahezu der Verteilung der NER in den Huminstoff-Fractionen des Tons und Schluffs der Proben mit Enzymzugabe außerhalb des Polyamidbeutels und ist nicht gesondert aufgeführt.

4.6.3.4 Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität und alkalische Hydrolyse

Nur die Huminstoff-Fractionen aus Ton und Schluff der Proben mit Enzymzugabe wurden einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Nach Quantifizierung der durch Degradation freigesetzten Radioaktivität der Ansätze mit Enzymzugabe ergaben sich unterschiedliche Mengen freigesetzter Radioaktivität aus den NER. Aus den Nicht-Huminen und Huminen des Tons und des Schluffs des Bodens innerhalb sowie außerhalb des Polyamidbeutels wurde durch die alkalische Hydrolyse jeweils mehr als 65 % der Radioaktivität aus den NER freigesetzt. Aus den Fulvinsäuren wurden jeweils mehr als 40 % freigesetzt. Ein signifikanter Unterschied ließ sich bei den Huminsäuren feststellen. Aus den Huminsäuren des Tons sowie des Schluffs des Bodens innerhalb des Beutels wurden nach alkalischer Hydrolyse etwa 20,9 % der Radioaktivität frei wohingegen aus den Huminsäuren des Tons und Schluffs außerhalb des Beutels etwa 80 % der Radioaktivität aus den NER freigesetzt wurde.

Nach DC-Analyse der Extrakte nach alkalischer Hydrolyse konnte festgestellt werden, dass die Startaktivität der Extrakte aus den Huminsäuren innerhalb des Beutels etwa 30 % betragen wohingegen diese in den Extrakten aus Nicht-Huminen, Fulvinsäuren und Huminen des Beutels innerhalb des Beutels sowie auch außerhalb des Beutels nur etwa 5 % betrug. Die restlich aufgetragene Radioaktivität basierte in allen Extrakten nur auf Metalaxylsäure. Die Mittelwerte der durch Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität der Ansätze mit Enzymzugabe sind in Tabelle 4.19 aufgeführt.

Tab. 4.19: Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der Tonfraktion (A) und der Schlufffraktion (B) der Bodenansätze mit Enzymzugabe (Boden innerhalb Polyamidbeutel sowie außerhalb des Polyamidbeutels (jeweils n=3) nach 10 Tagen Inkubation in % bezogen auf die Gesamtmenge nicht extrahierbarer Radioaktivität in der jeweiligen Huminstoff-Fraktion inklusive ihrer Standardabweichungen.

| A | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | | |
|----------|------------------|--|-----------------------|---------------------|--------------------|----------------|
| | | (Ton) | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine |
| | Gesamtboden | | | | | |
| | innerhalb | | 71,1 (+/-) 2,8 | 42,4 (+/-) 2,1 | 20,9 (+/-) 2,5 | 72,4 (+/-) 3,0 |
| | Polyamidbeutels | | | | | |
| | Gesamtboden | | | | | |
| | außerhalb | | 75,4 (+/-) 2,2 | 43,9 (+/-) 4,1 | 79,6 (+/-) 5,3 | 67,2 (+/-) 1,7 |
| | Polyamidbeutels | | | | | |
| B | Probe | Freigesetzte Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen (%) | | | | |
| | (Schluff) | Nicht - Humine | Fulvinsäuren | Huminsäuren | Humine | |
| | Gesamtboden | | | | | |
| | innerhalb | | 75,5 (+/-) 7,1 | 43,9 (+/-) 6,4 | 21,7 (+/-) 2,7 | 66,8 (+/-) 4,3 |
| | Polyamidbeutels | | | | | |
| | Gesamtboden | | | | | |
| | außerhalb | | 72,1 (+/-) 5,7 | 40,4 (+/-) 3,0 | 82,6 (+/-) 7,4 | 69,2 (+/-) 8,1 |
| | Polyamidbeutels | | | | | |

5 Diskussion

Der Verbleib und das Stoffschicksal von ^{14}C -Metalaxyl im Boden und insbesondere der mögliche Einfluss von extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände des Fungizids wurden in verschiedenen Ansätzen untersucht. Hierzu wurde der Fremdstoff zum einen mit Vertretern organischen Bodenmaterials sowie mit isolierten Huminstoff-Fractionen und den Enzymen *in vitro* untersucht (Modellsysteme zur Inkubation). Zum anderen wurden sterilisierte und nicht sterilisierte Bodenproben nach Applikation mit ^{14}C -Metalaxyl für 10 beziehungsweise 92 Tagen inkubiert und folgend untersucht (Inkubationsansätze im stationären System).

5.1 *In vitro* Inkubationen in Modellsystemen

Da sich nach Inkubation der *in vitro* Ansätze mit Resorcinol als auch in denen mit technischen Huminsäuren und Enzymen eine Trübung feststellen ließ und nach Zentrifugation jeweils ein Pellet vorlag (siehe Abschnitt 4.1.1), kann man von einer teilweisen Polymerisierung der Substanzen ausgehen. Diese muss auf den Einfluss der Laccase und Lignin-Peroxidase zurückgehen, da in den Kontrollansätzen ohne Enzyme keine Pellets vorlagen (siehe Abschnitt 4.1.1). Wenn eine Polymerisierung im Ansatz stattfand, konnte ein Anteil der applizierten Radioaktivität (^{14}C -Metalaxyl) nicht mehr aus den Pellets durch Waschen mit Phosphatpuffer und Dialyse (Porenweite des Dialyseschlauchs: 1000 MWCO (engl. Molecular Weight Cut Off)) freigesetzt werden (siehe Abbildung 4.1). Es ist also zu vermuten, dass dieser Anteil der Radioaktivität entweder kovalent an Polymere von mindestens 1000 g/mol Molekulargewicht gebunden, fest an diese adsorbiert oder in diesen inkorporiert war. Da jedoch ein mehrmaliges Resuspendieren der Pellets (Waschschritte mit Phosphatpuffer) immer noch signifikante Mengen der Radioaktivität im Pellet zurückließ und nur nach Polymerisation die Radioaktivität in Pellets verblieb, ist eine kovalente Einbindung aufgrund oxidativer Kopplungsreaktion (Polymerisationsreaktion) als wahrscheinlicher anzusehen als eine bloße Inkorporation oder Adsorption des Fungizids. Die Polymerisierung des Resorcinols verläuft in einem Radikal-Prozess (oxidative Kopplung), wie es in Abbildung 1.3 gezeigt ist. Die entstandenen Radikale haben somit vermutlich nicht nur Resorcinol (Monomer) aneinander gekoppelt, sondern auch mit dem Fungizid reagiert und dieses kovalent gebunden (Co-Polymerisation). Unter Rückbezug auf publizierte Studien lassen sich die Ergebnisse noch weiter interpretieren. Beispielsweise gelang es bereits Bollag et al. (1992) eine kovalente Bindung zwischen verschiedenen Xenobiotika wie 2,4- und 2,6-Dichlorphenol und einem monomeren Vertreter von Huminstoffen (Syringasäure) und dessen Polymerisation in vergleichbaren Modellsystemen nachzuweisen. Dieser Prozess konnte sowohl von Laccase, Peroxidase und auch Tonmineralen katalysiert werden. Die Fremdstoffe wurden bei diesem Prozess zu verschiedenen Oligomeren transformiert.

Gleiches wurde auch in Modellsystem-Versuchen von Kang et al. (2002) festgestellt, die das Fungizid ^{14}C -Cyprodinil mit anderen Vertretern der natürlichen Huminstoffe wie Catechol, Vanillin, Syringaldehyd und Ferulasäure mit Laccase inkubierten. Abhängig vom jeweils eingesetzten Vertreter der organischen Bodensubstanz fielen verschiedene Mengen der applizierten Radioaktivität zusammen mit dem polymerisierten Substanzen aus. Bollag et al. (1992) sahen eine enzymatisch-katalysierte, kovalente Einbindung insbesondere bei Xenobiotika mit Phenol- und Anilingruppen als wahrscheinlich an, wie es von bereits Klibanov et al. (1983) vermutet wurde. Dies wurde auf die strukturelle Ähnlichkeit dieser Fremdstoffe zu natürlich vorkommenden Inhaltsstoffen der huminen Substanzen zurückgeführt (Kang et al., 2002), die gleichfalls im Boden durch oxidative Kopplung kovalent verbunden und teilweise polymerisiert werden können (Dec und Bollag, 1997). Eine kovalente Bindung von aromatischen Aminen an Huminstoffe durch nukleophile Additionsreaktionen, konnte zusätzlich zu der durch freie Radikale katalysierten Einbindung, von Thorn et al. (1996) mit ^{15}NMR Studien bestätigt werden. Da auch Metalaxyl ein tertiäres, aromatisches Amin darstellt, sind beide Prozesse der kovalenten Einbindung in den Modellsystemen der vorliegenden Studie denkbar. In den Studien von Bollag et al. (1992) und auch Kang et al. (2002) fungierten die Vertreter der Huminstoffe als Mediatoren der enzymatischen Reaktion (in Abschnitt 1.5 erläutert) und wurden nicht nur polymerisiert, sondern induzierten gleichfalls Radikale in den Fremdstoffmolekülen selbst. Dies führte zu deren Verknüpfung zu Oligomeren. Dieser Prozess konnte für ^{14}C -Metalaxyl in Anwesenheit des Mediators ABTS nicht beobachtet werden; in den Extrakten der Kontrollen ohne Resorcinol beziehungsweise technische Huminsäuren jedoch in Anwesenheit des Mediators ABTS, konnte nur die Ausgangssubstanz ^{14}C -Metalaxyl detektiert werden (siehe 4.1.1). Es ist also davon auszugehen, dass die Enzyme, unter den gegebenen Bedingungen im Modellsystem, keine Radikalbildung in ^{14}C -Metalaxyl selbst induzieren konnten. Wäre dies der Fall gewesen, hätte ^{14}C -Metalaxyl im Extrakt vermutlich nicht nur als Monomer vorgelegen, sondern die einzelnen Fungizidmoleküle hätten während der Inkubation miteinander reagiert und wären zumindest teilweise aneinander gebunden worden. Möglicherweise ist Metalaxyl ein zu großes Molekül, um in das katalytische Zentrum der Enzyme aufgenommen werden zu können oder das Redoxpotential der Enzyme und des Mediators waren nicht ausreichend, um das Fungizid zu transformieren. Es ist somit als wahrscheinlich anzusehen, dass die im Pellet verbliebene Radioaktivität durch Radikalbildungen im Resorcinol und den Huminsäuren eingebunden wurde. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf, dass der Einbindungsprozess von ^{14}C -Metalaxyl an Huminsäuren in Gegenwart der Laccase aus *Trametes versicolor* verstärkt stattfindet, während die Lignin-Peroxidase eine signifikant geringere Bindung an die Huminsäuren katalysiert. Somit ist anzunehmen, dass die Redoxpotentialdifferenzen zwischen den Enzymen und dem jeweiligen Substrat unterschiedlich groß waren und somit

eine unterschiedliche starke Polymerisierung und somit Einbindung bewirkt haben, wie es von Kang et al. (2002) bezüglich des Cyprodinils vermutet wurde.

In weiteren Modellsystemen wurden aus dem Boden isolierte Huminstoff-Fractionen mit ^{14}C -Metalaxyl und Laccase oder Lignin-Peroxidase inkubiert (siehe Abschnitt 4.1.2). Da aus den Huminsäuren mit dem ersten Waschschrift signifikant mehr Radioaktivität freigesetzt werden konnte als aus den anderen Fraktionen (siehe Abbildung 4.2), kann von einer geringeren Adsorption des Fungizids an die Huminsäuren ausgegangen werden. Dennoch verblieb in allen Ansätzen noch Radioaktivität in den Huminstoffen, die nicht mit wässrigem Puffer herausgelöst werden konnte. Analog zu den Versuchen mit Resorcinol und technischen Huminsäuren lässt sich auch hier eine mehrheitlich enzymatisch katalysierte Einbindung des Fungizids vermuten, da in den Kontrollen ohne Enzymzusatz weniger als 5 % der applizierten Radioaktivität in den Huminstoffen verblieb. Es ist hervorzuheben, dass diese Einbindung in Gegenwart der Laccase verstärkt in Huminsäuren und Humine stattfindet und in Gegenwart von Lignin-Peroxidase eine Einbindung in Humine und Nicht-Humine befördert wird. Es verblieben auch generell größere Mengen Radioaktivität in den Huminstoffen nach katalytischer Einwirkung der Lignin-Peroxidase als in Gegenwart der Laccase (siehe Abbildung 4.2). Somit interagieren die sich strukturell unterscheidenden Huminstoff-Fractionen offenbar unterschiedlich stark mit den Enzymen. Dies kann möglicherweise erneut mit Unterschieden der Redoxpotentialdifferenz zwischen Enzym und Substrat erklärt werden. Da Lignin-Peroxidase ein größeres Redoxpotential aufweist als Laccase (siehe Abschnitt 1.5), wurden vermutlich mehr Radikale in den Huminstoffen induziert und folglich mehr Radioaktivität eingebunden. Jedoch lassen die Ergebnisse vermuten, dass ein kleinerer Anteil Teil der applizierten Radioaktivität nicht kovalent gebunden war, sondern nicht kovalent in Form von beispielsweise ionischen, hydrophoben Wechselwirkungen mit den Huminstoffen interagierte und oder in die Huminstoffe inkorporiert war und somit nicht mit Waschen freigesetzt werden konnte (Kontrollen). Es kann jedoch analog zu den Modellsystemen mit Resorcinol und technischen Huminsäuren ausgeschlossen werden, dass das Fungizid selbst in Gegenwart der Huminstoffe und der Enzyme transformiert wurde. In den Extrakten lag erneut nur die Ausgangssubstanz vor. Die Kapazität der enzymatischen Transformation wird vermutlich durch die Art und Position der substituierten Reste am aromatischen Ring des Metalaxyls herabgesetzt wie es von Dec und Bollag (1990) und Filazzola et al. (1999) für andere Xenobiotika gezeigt werden konnte.

Fazit

Zusammenfassend geben die *in vitro* Experimente in Modellsystemen einen ersten Hinweis darauf, dass ein enzymatischer Einfluss auf eine kovalente Einbindung von ^{14}C -Metalaxyl in Gegenwart organischer Bodenbestandteile zu vermuten ist. Diese beruht wahrscheinlich auf

dem Prozess der oxidativen Kopplung durch freie Radikale, der auch bei der Humifizierung im Boden auftritt, und von Bollag und Loll (1983) als relevant für das Stoffschicksal eines Xenobiotikums im Boden angesehen wurde, oder auch auf Prozessen der nukleophilen Addition. Bei den Untersuchungen wurde das Fungizid durch beide Enzyme nicht selbst transformiert. Es ist aber zu berücksichtigen, dass in den untersuchten Modellsystemen jeweils ideale Bedingungen für die katalytische Aktivität der Enzyme vorlagen (pH-Wert, Temperatur). Somit können diese zwar Hinweise auf eine enzymatisch katalysierte Bindung liefern, aber nur bedingt mit dem Stoffschicksal des Fungizids im komplexen Bodensystem verglichen werden. Ob ¹⁴C-Metalaxyl auch in Bodensystemen tatsächlich kovalent an organische Bodenbestandteile gebunden werden kann und ob dies auf biotischen und oder abiotischen Einflüssen beruht, sollte folgend mit verschiedenen Inkubationsansätzen in stationären Systemen untersucht werden. Im Vorfeld musste jedoch eine Extraktionsmethode etabliert werden, die möglichst nur kovalent gebundene Radioaktivität im Bodensystem nach Extraktion zurückließ.

5.2 Etablierung einer erschöpfenden Extraktionsmethode unter Einsatz der Partikelgrößenfraktionierung

Die Auswahl einer Extraktionsmethode hat einen bedeutenden Einfluss auf die Risikobewertung des Fremdstoffs als auch die Untersuchung der gebundenen Radioaktivität (in Abschnitt 1.7 erläutert). Dementsprechend wurden vor Beginn aller Inkubationsexperimente mit ¹⁴C-Metalaxyl verschiedene Extraktionsmethoden miteinander verglichen (in Abschnitt 3.6 erläutert). Da in der vorliegenden Studie zum einen Bodenproben nach Inkubation in ihre Partikelgrößenfraktionen aufgetrennt werden sollten und zum anderen diese Methode auch genutzt wurde, um isolierte Fraktionen in Inkubationsexperimenten einzusetzen, musste auch der Einfluss dieser Methode auf die Extraktion untersucht werden.

Einerseits ließ sich beobachten, dass die Dauer der Soxhlet-Extraktion mit Methanol einen wesentlichen Einfluss auf den Erschöpfungsgrad der Extraktion ausübt. Erst nach einer Extraktionsdauer von 4 h und 6 h wurde der Wert der resultierenden NER soweit erniedrigt, dass er in etwa dem der Proben entsprach, die mit einer Mikrowellenextraktion und einem Acetonitril-Wasser-Gemisch extrahiert wurden (siehe Abbildung 4.3). Der erhöhte Druck und die erhöhte Temperatur während der Mikrowellenextraktion gewährleisteten also vermutlich einen hohen Grad der Extraktion, der in einer Soxhlet-Apparatur nur nach längerer Extraktionsdauer erreicht wird. Eine von Sukul (2006) publizierte Methode zur Extraktion, welche ein mehrmaliges Ausschütteln der Probe mit Methanol und einem Methanol/Wasser-Gemisch und eine Ultraschallbehandlung vorschlägt, erzielte einen vergleichbar großen Erschöpfungsgrad wie die Mikrowellenextraktion. Obwohl in dieser kein erhöhter

Druck und keine erhöhte Temperatur die Extraktion unterstützen, ist ihre Effizienz damit zu erklären, dass die Ultraschallbehandlung und das Ausschütteln der Proben die Interaktion des Lösungsmittels mit den Bodenoberflächen unterstützt, weil die Oberfläche zur Extraktion erhöht wird. Insbesondere ist die Polarität des Extraktionsmittels durch den Wasseranteil, wie auch bei der Mikrowellenextraktion, erhöht und somit die Löslichkeit des relativ hydrophilen Fungizids (Wasserlöslichkeit: 26 g/L bei pH 7) im Extraktionsmittel erhöht worden. Es ist daher zu vermuten, dass Wasser bereits an sich ein geeignetes Extraktionsmittel für Metalaxyl darstellt. Diese Annahme wird durch Untersuchungen von Triantafyllidis et al. (2013) unterstützt, die feststellten, dass das Fungizid nur geringfügig mit Bindestellen an Bodenoberflächen interagiert und es eine hohe Mobilität in der wässrigen Bodenphase aufweist.

Die Methode der Partikelgrößenfraktionierung, die in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde, folgte einer publizierten Vorschrift von Stemmer et al. (1998), da diese für eine Messung von Enzymaktivitäten in Partikelgrößenfraktionen etabliert wurde. Jedoch wurde die Wassermenge bei den Partikelgrößenfraktionierungen der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Experimenten von Stemmer et al. (1998) erniedrigt. Generell erfolgte die Ultraschallbehandlung bei niedrigerer Energie als es in Untersuchungen zur Trennung der Partikelgrößenfraktionen von beispielsweise Morra et al. (1991) beschrieben ist. Dies hat den Nachteil, dass die geringe Ultraschallenergie in Böden mit hohem Anteil organischen Materials nicht ausreicht, um dessen Aggregate vollständig aufzubrechen und somit Schluff und Tonpartikel nicht völlig voneinander getrennt werden können (Stemmer et al., 1998). Die Prozentanteile der Partikelgrößenfraktionen der vorliegenden Studie (siehe Abschnitt 4.3) lagen aber im Bereich der publizierten Literaturwerte für den Boden aus Ultuna (siehe Tabelle 2.3). Des Weiteren bestand der Schluff nur noch zu etwa 3 % aus Tonpartikeln (siehe Abschnitt 4.3) und die Effizienz der Partikelgrößenfraktionierung wurde somit als ausreichend effizient angesehen.

Hinsichtlich eines Nutzens der Partikelgrößenfraktionierung als Extraktionsmethode (Proben PF+Sox. 6 h, siehe Abbildung 4.3) muss folgendes berücksichtigt werden: Erstens werden durch die Ultraschallbehandlung Makroaggregate im Boden aufgebrochen (in Abschnitt 3.8 erläutert), wodurch die Oberfläche zur Extraktion erhöht wird. Zweitens werden während der Fraktionierung auch größere Wassermengen genutzt, als es in der von Sukul (2006) publizierten Vorschrift zur Extraktion vorgesehen ist (Proben MeOH-H₂O, siehe Abbildung 4.3). Somit kann angenommen werden, dass insbesondere wasserlösliche Fremdstoffanteile während der Partikelgrößenfraktionierung ins Fraktionswasser gelöst wurden. Anhand einer folgenden Soxhlet-Extraktion der Partikelgrößenfraktionen mit Methanol konnte der Anteil der NER auf insgesamt etwa 8 % pro Probe (PF+Sox. 6 h) und somit auf den geringsten Wert im Vergleich zu den anderen Extraktionsmethoden erniedrigt

werden (siehe Abbildung 4.3). Vermutlich wurde im Verlauf der Soxhlet-Extraktion die noch an Bodenoberflächen adsorbierte Radioaktivität extrahiert. Diese kann auf nicht kovalente Bindungen wie hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte und ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Bodenoberflächen beruhen, die von Gevaio et al. (2000) für Fremdstoffe allgemein und speziell für Metalaxyl von Komarek et al. (2010) beschrieben wurden. Es ist also zu vermuten, dass nach dem ersten Extraktionsschritt (Partikelgrößenfraktionierung) und dem zweiten Schritt (Soxhlet-Extraktion mit Methanol) nur noch tief in die Bodenmatrix inkorporierte und oder kovalent an diese gebundene Radioaktivität im Boden verblieb und die Extraktionsmethode als erschöpfend angesehen werden kann. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Ultraschallbehandlung organisches Bodenmaterial von Bodenoberflächen (beispielsweise Tonmineralen) ablösen und folgend seine Ausschwemmung und Umverteilung im Boden zur Folge haben. Dies wurde beispielsweise von Whitbread, (1995) beschrieben. Dies würde also auch Fremdstoffe betreffen, die kovalent an die organische Bodensubstanz gebunden sind und als NER nach erschöpfender Extraktion im Boden verbleiben sollten. Folgend würden somit Aussagen über die tatsächliche Verteilung der NER vor Partikelgrößenauflösung und zudem auch eine klare Trennung extrahierbarer und nicht extrahierbarer Radioaktivität erschwert. Dieser Sachverhalt wurde in der Forschergruppe in weiteren Experimenten mit ^{14}C -Metalaxyl untersucht und hierbei festgestellt, dass durch eine intensivere Einwirkung des Ultraschalls ($> 170 \text{ J/g}$ Boden) und größere Wassermengen, optisch sichtbare Fragmente organischer Bodensubstanz und daran gebundene Radioaktivität in erheblichem Anteil in die Sandfraktion ausgeschwemmt werden und dort als NER verbleiben (Diplomarbeit T. Zegarski, RWTH Aachen, 2013). Dies wurde in den Proben der vorliegenden Studie aber nicht beobachtet und im Sand verblieb nur etwa 1 % der NER, weil erstens die Ultraschallenergie geringer war, den Protokollen von Stemmer et al. (1998) entsprach, und zweitens weniger Wasser verwendet wurde als von Stemmer et al. (1998) vorgeschlagen. Das Verhältnis Boden/Wasser betrug in der vorliegenden Studie 1:1,5 während in der publizierten Methode 1: 3 als geeignet angesehen wurde. Die Reduktion der Menge des Übertragungsmediums für den Ultraschall (Wasser) kann somit ebenfalls die Auswirkung der Beschallung reduziert und somit eine Ausschwemmung größerer Mengen organischer Bodensubstanz und daran gebundener Radioaktivität in den Sand verhindert haben.

Trotz dieser Modifikation der Methode wies das Fraktionswasser nach Fraktionierung der Proben der vorliegenden Studie eine bräunliche Färbung auf, die vermutlich auf eine kleine Menge aus dem Boden ausgelöster Huminstoffe zurückzuführen ist. Somit kann eine geringfügige Ausschwemmung der organischen Substanz aus dem Boden und auch dessen Umverteilungen zwischen Schluff und Ton in der vorliegenden Studie nicht völlig ausgeschlossen werden. Da jedoch mehr als 97 % der Radioaktivität im Fraktionswasser der

Proben PF+Sox 6 nach Zentrifugation frei vorlag (siehe Abschnitt 4.2), kann davon ausgegangen werden, dass diese mehrheitlich nicht an Partikel gebunden war. Somit hat die Partikelgrößenfraktionierung vermutlich in überwiegendem Anteil die frei löslichen Fremdstoffanteile und nur geringfügige Mengen gebundener Radioaktivität aus dem Boden herausgelöst.

Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Partikelgrößenfraktionierung gemäß Stemmer (1998) nach den vorgenommenen Modifikationen als ein erster Extraktionsschritt genutzt werden kann und nach einer anschließenden Soxhlet-Extraktion der Fraktionen Sand, Schluff und Ton mit organischem Lösungsmittel vermutlich nur noch tief inkorporierte oder kovalent gebundene Fremdstoffe im Boden verbleiben. Ein weiterer Nutzen dieser Extraktionstechnik liegt zusätzlich darin, dass der wasserlösliche Anteil des Fremdstoffs direkt quantifiziert werden kann. Dies ist insbesondere hinsichtlich der Risikobewertung eines Fremdstoffs wichtig, weil nach einer Einschätzung in der Literatur dieser Anteil dem bioverfügbaren Anteil gleichzusetzen ist (Stokes et al., 2006). Als Folge der beschriebenen Ergebnisse wurde somit zur Extraktion aller Inkubationsansätze eine Partikelgrößenfraktionierung mit anschließender Soxhlet-Extraktion der Fraktionen genutzt, um die NER zu untersuchen. Im Vorfeld der Inkubationsexperimente wurde die Effizienz der jeweils angewandten Sterilisationstechnik überprüft.

5.3 Kontrolle der Sterilisationen des Versuchsbodens

Die Ergebnisse dieser Experimente lassen vermuten, dass alle verwendeten Sterilisationstechniken (in Abschnitt 3.3.2 erläutert) die Mikroben im Boden nahezu quantitativ abtöten konnten, da auf keinem Vollmedium nach Beimpfen mit Extrakt aus sterilem Boden ein Bewuchs festgestellt werden konnte (siehe Abschnitt 4.4). Jedoch kann aufgrund dieser Testmethode nicht geschlussfolgert werden, dass tatsächlich sämtliche Bodenmikroorganismen abgetötet wurden, weil eine Vielzahl dieser als nicht kultivierbar gilt Kirk et al. (2004). Auf Wachstumsmedien im Labor lassen sich nicht die geeigneten Umwelt- und Nährstoffbedingungen für ein Wachstum der Organismen reproduzieren, die im Boden vorhanden sind. Somit musste eine weitere Methode genutzt werden, um die Sterilität des Bodens zu überprüfen. Es wurde vor etwa 20 Jahren bereits gezeigt, dass über 95 % aller bekannten Mikroorganismen im Boden DMSO (Dimethylsulfoxid) zu gasförmigem DMS (Dimethylsulfid) reduzieren können (Griebler, 1997). DMSO selbst entsteht als Zwischenprodukt des globalen Schwefelkreislauf durch Photooxidation von DMS in der Atmosphäre (Bentley et al., 1972; Andreae, 1980). Durch die Zugabe von wasserlöslichem DMSO zu Bodenproben und folgender Quantifizierung des gebildeten DMS, kann somit die

Aktivität von nahezu allen bekannten Bodenmikroorganismen gemessen werden. Da aufgrund der Methode weder der physiologische Zustand noch die Anzahl der Organismen verändert werden (Alef und Kleiner, 1989), ist sie als besonders geeignet anzusehen und wurde nicht nur zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in allen Inkubationsansätzen der vorliegenden Studie verwendet, sondern diente gleichzeitig als ein weiterer Test der Effizienz der jeweiligen Sterilisationsmethode.

5.4 Gesamtbodenproben im stationären System

Mikroorganismen nehmen in ihrer Funktion als Destruenten organischen Ausgangsmaterials im Boden einen entscheidenden Einfluss auf dessen Transformation und Humifizierung (Gisi et al., 1997; Miltner et al. 2011). Sie beeinflussen auch maßgeblich den Verbleib und die Transformation von Xenobiotika (Gianfreda und Rao, 2008) und gelten als Produzenten extrazellulärer Enzyme im Boden (Sinsabaugh, 2010). Somit nehmen sie eine Schlüsselposition bezüglich der Fragestellung der vorliegenden Arbeit ein und ihre Aktivität wurde anhand der DMSO-Reduktion gemessen. Die generellen Schwankungen der DMSO-Reduktion in den sterilen und nicht sterilen Gesamtbodenproben (siehe Tabelle 4.2) sind damit zu erklären, dass die Mikroorganismen offenbar nicht homogen im Boden verteilt waren. Die DMSO-Reduktase Aktivität in den nicht sterilen Ansätzen stieg während der Inkubationszeit in deutlich höherem Ausmaß an als in den sterilen Proben. Da solch große Standardabweichungen aber nur explizit in diesen Proben festgestellt wurden, beruhen sie höchstwahrscheinlich auf Schwankungen in den Messungen dieser Proben und nicht alleine auf einer inhomogenen Verteilung der Mikroben.

Im Vergleich zu den nicht sterilen Bodenproben wird deutlich, dass sowohl die Sterilisation mittels γ -Bestrahlung (Ultuna $_{\gamma}$ -bestrahlt) als auch mit Fumigation und Quecksilberchloridzugabe (Ultuna $_{\text{CHCl}_3/\text{HgCl}_2}$) nahezu die gesamte Anzahl an Mikroorganismen abtötete, und somit die DMSO-Reduktase Aktivität fast der des Seesandes (Kontrollen) entsprach, in welchem nur wenige oder keine Mikroorganismen vorliegen sollten (siehe Tabelle 4.2). Die sequentielle Sterilisation durch γ -Bestrahlung, autoklavieren und Zugabe von Phenylhydrazin und Natriumazid (Ultuna $_{\text{SE.ST.}}$) erniedrigte die DMSO Reduktase Aktivität in diesen Proben vollends auf diejenige des Seesandes. Es ist somit anzunehmen, dass jede Sterilisation der Ansätze erfolgreich verlief und der nahezu sterile Bodenzustand für die gesamte Inkubationsdauer von 92 Tagen aufrecht erhalten werden konnte. Der geringe Anstieg der DMSO-Reduktion in den sterilen Ansätzen ist vermutlich auf wenige Mikroorganismen zurückzuführen, die die Sterilisation überlebten (möglicherweise in Überdauerungsstadien) und sich danach aktiv vermehren konnten. Die Anzahl dieser Mikroben war in den Ansätzen Ultuna $_{\text{SE.ST.}}$ noch geringer als in den Proben Ultuna $_{\gamma}$ -bestrahlt und Ultuna $_{\text{CHCl}_3/\text{HgCl}_2}$, da diese mit verschiedenen Methoden sequentiell und somit vermutlich

besonders effektiv sterilisiert wurden. Es ist ersichtlich, dass DMSO auch im geglühten und gereinigten Seesand – vermutlich überwiegend - abiotisch reduziert wurde. Dies kann als eine Basisaktivität der DMSO-Reduktion beschrieben werden, die zu beiden Zeitpunkten konstant blieb. Der abiotische Umsatz von DMSO ist anhand publizierter Studien zu erklären, die auf eine Bildung von DMS aufgrund photolytischen Zerfalls von DMSO (Alef und Kleiner (1989) sowie andererseits auf einen Zerfall aufgrund von Reaktionen mit Sulfid-Mineralen (Jonkers et al., 2006) hinweisen. Der Gehalt organischen Bodenmaterials steht in enger Beziehung zur mikrobiellen Aktivität (Six et al., 2002), extrazellulären Enzymaktivitäten (Sinsabaugh, 2010) und zum Schicksal und dem Verbleib von Xenobiotika im Boden (Senesi, 1992). In diesem Zusammenhang ist auch der pH-Wert eines Bodens ein wesentlicher Einflussfaktor, da er u.a. Auswirkungen auf die Protonierung eines Fremdstoffs hat, die seine Adsorption im Boden beeinflussen kann (Shaw et al., 1999).

Nach der vorliegenden Untersuchung dieser Parameter war festzustellen, dass die Mengen organischen Kohlenstoffs in den Gesamtbodenproben geringfügig höher waren als es von Gerzabeck et al. (2006) und Kirchmann et al. (1994) für denselben Versuchsboden ermittelt wurde (siehe Tabelle 4.3, vergleiche mit Tabelle 2.3). Die Werte der mittels Glühverlust bestimmten Mengen organischen Materials waren in der vorliegenden Studie immer höher als die Mengen organischen Kohlenstoffs in den Gesamtbodenproben. Dies ist erstens damit zu erklären, dass organische Substanz nicht vollständig aus organischem Kohlenstoff entsteht, sondern dieser nur etwa 58 % des SOM bildet, wie es von Page (1982) berichtet wurde. Zweitens verlieren Tonminerale bei der Veraschung (Glühverlust) Kristallwasser und somit erniedrigt sich das Gewicht der Probe nach Glühen und es wird mehr organische Substanz vermutet als tatsächlich vorhanden ist (Schumacher, 2002). Es ist aber ersichtlich, dass sich die Mengen organischen Kohlenstoffs in den nicht sterilen Proben nicht signifikant von denen in den sterilen Proben unterscheiden (siehe Tabelle 4.3). Somit kann ein Einfluss der Sterilisationstechniken auf die Gesamtmenge des organischen Kohlenstoffs ausgeschlossen werden. Dennoch können die Sterilisationstechniken zu Veränderungen der Struktur und der Zusammensetzung des organischen Materials geführt haben, wie es von Trevors et al. (1996) berichtet wurde. Solche Veränderungen waren mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht untersuchbar und können somit nicht ausgeschlossen werden. Der pH-Wert der Gesamtbodenproben (Tabelle 4.4) lag im Bereich der von Gerzabeck et al. 2006 publizierten pH-Messwerte des Versuchsbodens aus Ultuna (siehe Tabelle 2.3). Dennoch ist eine geringfügige Erhöhung des pH-Werts in allen sterilen Ansätzen gemessen worden. Dies ist damit zu erklären, dass jede Sterilisationsmethode die physiko-chemischen Parameter des Bodens und die Zusammensetzung der wässrigen Bodenphase und somit auch den pH-Wert verändern haben können, wie es von Trevors (1996) beschrieben wurde. Ein Anstieg der pH-Werte in sterilen Bodenproben wurde auch von Berns et al. (2008) auf eine

Akkumulation von Ammonium und die Abtötung von Ammonium-oxidierenden Bakterien zurückgeführt, die ebenfalls in den sterilen Gesamtbodenproben aufgetreten sein können.

Extrazelluläre Phenoloxidasen und Peroxidasen spielen eine wichtige Rolle bei der Transformation xenobiotischer Substanzen im Boden (Rabinovich et al., 2004) und der Humifizierung organischen Bodenmaterials (Sinsabaugh, 2010). Desweiteren können sie auch eine Polymerisierung organischer Substanz im Boden durch oxidative Kopplung bewirken (Zavarzina et al., 2011) und somit auch die kovalente Einbindung von Fremdstoffen katalysieren, die folgend als gebundene Rückstände im Boden verbleiben (Gevao et al., 2000; Kang et al., 2002). Somit stehen sie in engem Zusammenhang mit der mikrobielle Aktivität und dem Gehalt organischer Bodensubstanz. Um diese zentralen Sachverhalte zu untersuchen, wurden die Aktivitäten beider Enzymfamilien in allen Inkubationsansätzen bestimmt. Es muss bei jedoch berücksichtigt werden, dass alle Enzymaktivitäts-Messungen unter idealen Umgebungsbedingungen für extrazelluläre Phenoloxidasen und Peroxidasen durchgeführt wurden. Dies betrifft den pH-Bereich, die Temperatur und die Konzentration des jeweiligen Substrats, beziehungsweise die bereitgestellte Menge an Wasserstoffperoxid als Cosubstrat. Die gemessenen Enzymaktivitäten in der vorliegenden Studie stellen also potentielle Enzymaktivitäten dar. Diese sind generell höher als die *in situ* Enzymaktivitäten im Boden, weil dort oft nicht die idealen Bedingungen für den enzymatischen Substratumsatz bestehen (Wallenstein und Weintraub, 2008).

Die Standardabweichungen zeigen auf, dass die Messwerte der Enzymaktivitäten bei nahezu allen Gesamtbodenproben schwankten (siehe Tabelle 4.5). Schwankungen der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen in Bodenexperimenten sind bereits von Sinsabaugh (2010) beschrieben worden, der sie u.a. auf die Konzentration gelöster phenolischer Substanzen, den Ligningehalt von Pflanzenresten im Boden, den pH-Wert und die Verfügbarkeit von Stickstoff zurückführte, welche je nach Bodentyp, Bodentiefe und Bodenherkunft unterschiedlich sind. Diese Faktoren könnten durch die verschiedenen Sterilisationsprozesse in der vorliegenden Studie zusätzlich verändert worden sein. Des Weiteren können Schwankungen der Messwerte durch die angewandten Techniken der Enzymaktivitätsmessung erklärt werden. Da Aliquote des Bodens mit Puffer versetzt wurden und die Mikroorganismen als Produzenten der Enzyme nicht homogen im Boden verteilt sind (siehe Abschnitt 1.3), sind auch Schwankungen zwischen den Messwerten aufgetreten. Die Unterschiede zwischen den Ansätzen Ultuna (nativ), Ultuna_γ-bestrahlt, Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} und Ultuna_{SE,ST} waren in der vorliegenden Studie trotz dieser Schwankungen der Messwerte jedoch signifikant. Die gemessenen Aktivitäten basieren auf exozellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen, da die von Floch et al. (2007) bzw. Johnsen und Jacobsen (2008) verwendeten Enzymaktivitätsmessungen für die Messung extrazellulärer Enzymaktivität

beschrieben wurden. Ein Substratumsatz durch intrazelluläre PO und PERO in den Gesamtbodenproben kann also ausgeschlossen werden.

Die hohen Aktivitäten extrazellulärer PO und PERO im nicht sterilen Boden zu beiden Zeitpunkten lassen sich folglich damit erklären, dass in diesen Ansätzen alle von Burns (2013) beschriebenen Quellen exozellulärer Enzymaktivität im Boden zur gemessenen Gesamtaktivität beitragen konnten (in Abschnitt 1.5 erläutert). Zu ihnen zählen sowohl von vitalen Zellen sekretierte als auch davon unabhängig im Boden vorkommende immobilisierte PO und PERO. Zusätzlich geht eine oxidative Aktivität von Aluminium- und vor allem Eisenoxiden,- und hydroxiden in Tonmineralen aus (Sinsabaugh, 2010), die beispielsweise von Cheng et al (2008) untersucht wurde. Diese trug vermutlich in allen Proben zur Gesamtaktivität bei.

Es ist ersichtlich, dass nach γ -Bestrahlung von Proben (Ultuna $_{\gamma}$ -bestrahlt) noch ein Umsatz beider Substrate gemessen werden konnte. Dies ist damit zu erklären, dass Enzymaktivitäten im Boden nach γ -Bestrahlung nur in geringem Maß beeinträchtigt werden (McLaren, (1963); McNamara et al. (2003); Allison (2006). Obwohl eine Chloroform Fumigation die Lyse mikrobieller Zellen und somit eine Freisetzung von intrazellulären Enzymen und eine Denaturierung von Proteinen während der Begasung zur Folge hat (Renella et al., 2002; Margon und Fornasier, 2008) und Quecksilberchlorid mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen interagiert, diese folgend inhibiert (Trevors, 1996), waren die gemessenen Enzymaktivitäten in den Ansätzen Ultuna $_{\text{CHCl}_3/\text{HgCl}_2}$ in etwa in etwa gleich groß wie im γ -bestrahltem Boden. Es ist daher zu vermuten, dass die Fumigation und Zugabe von Quecksilberchlorid vergleichbar zur γ -Bestrahlung die Mikroorganismen abtöteten und somit die Sekretion von PO und PERO verhinderte aber noch Oxidasen im Boden verblieben, um etwa 50 % des Substratumsatzes der Gesamtbodenproben zu katalysieren. Diese verbliebene Aktivität in beiden Ansätzen Ultuna $_{\gamma}$ -bestrahlt und Ultuna $_{\text{CHCl}_3/\text{HgCl}_2}$ geht angesichts der Inkubationsdauer vermutlich nicht auf vormals intrazelluläre PO und PERO zurück, die nach Sterilisation aus den lysierten Zellen freigesetzt wurden (Botterweck et al., 2014). Dies ist damit zu begründen, dass intrazelluläre Enzyme im Boden nicht durch Modifikationen wie die Glykosylierung geschützt sind und in der Bodenumgebung schnell denaturieren und ihre katalytische Aktivität verlieren (Burns, 2013). Es kann somit vermutet werden, dass die verbliebene enzymatische Aktivität auf immobilisierten Phenoxidasen und Peroxidasen beruht. Diese sind aufgrund ihrer Immobilisation auf Tonmineralen und oder organischem Bodenmaterial vor Denaturierung geschützt und behalten somit ihre katalytische Aktivität, wie es von Tietjen und Wetzel (2003) beschrieben wurde. Zusätzlich könnten auch auf Zellfragmenten immobilisierte Phenoxidasen und Peroxidasen eine mögliche Quelle der verbliebenen Enzymaktivitäten sein, da auch die Zellbestandteile an Bodenoberflächen binden und folgend ebenfalls vor Denaturierung geschützt sein können (Tabatabai und Fu, 136

1992). Aufgrund der Experimente in der vorliegenden Studie ist es jedoch nicht möglich, zu unterscheiden, welche Teile der Aktivität auf Enzyme an Bodenoberflächen und welche auf an Zellfragmente gebundene Enzyme zurückzuführen ist.

Angesichts der im Vergleich zu den Proben $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ und $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ nochmals reduzierten Enzymaktivitäten und nahezu vollständig reduzierten mikrobiellen Aktivität in den Ansätzen $Ultuna_{SE,ST}$. (siehe Tabelle 4.5), kann vermutet werden dass die Kombination von γ -Bestrahlung, Autoklavieren und einer Zugabe von Enzyminhibitoren nicht nur die Mikroorganismen abtötete sondern auch zusätzlich die immobilisierten PO und PERO denaturierte. Ausgehend von publizierten Studien von Maire et al. (2012) ist anzunehmen, dass insbesondere der Autoklavierprozess immobilisierte Enzyme in hohem Maße denaturiert. Da die Substratumsätze in den Proben $Ultuna_{SE,ST}$ der vorliegenden Studie nach 92 Tagen Inkubation etwa größer waren als nach 10 Tagen, ist zu vermuten, dass dennoch in diesen Proben ein kleiner Anteil immobilisierter Enzyme katalytisch aktiv blieb. Würden die Substratumsätze alleine auf chemischen Prozessen an mineralischen Oberflächen beruhen, wären die Aktivitäten zu beiden Zeitpunkten vermutlich konstant geblieben. Dies konnte in den Kontrollen festgestellt werden. Trotz dieses geringfügigen Anstiegs der Aktivität lagen die Umsätze der Substrate in den Proben $Ultuna_{SE,ST}$ jedoch nahezu im gleichen Größenbereich wie in den Kontrollen (Seesand). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sie zumindest in deutlich überwiegendem Anteil auf abiotischen Reaktionen beruhen (Botterweck et al., 2014). Diese abiotischen Substratumsätze wurden bereits in Studien von Nannipieri et al. (2002) als „Pseudoenzymaktivität“ beschrieben, die unabhängig von Mikroflora und Mikrofauna im Boden vorkommen. Die „Pseudoenzymaktivität“ ist also analog zur Basisaktivität der DMSO-Reduktion als ein abiotischer Vorgang anzusehen. Im Vergleich zur Aktivität der immobilisierten PO und PERO waren die „Pseudoenzymaktivitäten“ in den Ansätzen sehr gering. Ihr Beitrag zur Gesamtaktivität betrug weniger als 10 %. Da dieser auch in den sterilen Ansätzen $Ultuna_{CHCl_3/HgCl_2}$ beziehungsweise $Ultuna_{\gamma\text{-bestrahlt}}$ zur Aktivität beitrug, beläuft sich der Beitrag der immobilisierten Enzyme zur der Gesamtaktivität nach Abzug der abiotischen Substratumsätze auf etwa 40 %. Dies entspricht Studien von Kandeler et al. (1999), in welchen festgestellt wurde, dass ein wesentlicher Anteil der im Boden vorherrschenden Enzymaktivitäten auf immobilisierten Enzymen beruht. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die gewählten Sterilisationsmethoden, unter Berücksichtigung der beschriebenen Einflüsse der jeweiligen Sterilisationstechnik auf das Bodensystem, eine Unterscheidung der Lokalisation von exozellulärer Phenoloxidase- und Peroxidaseaktivitäten im Versuchsboden ermöglichten. Des Weiteren konnte somit festgestellt werden, welchen Anteil die jeweiligen Quellen des Substratumsatzes (sekretierte Enzyme, immobilisierte Enzyme und abiotische

Faktoren) an der insgesamt gemessenen Aktivität einer nativen Bodenprobe haben. Dies ist schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt.

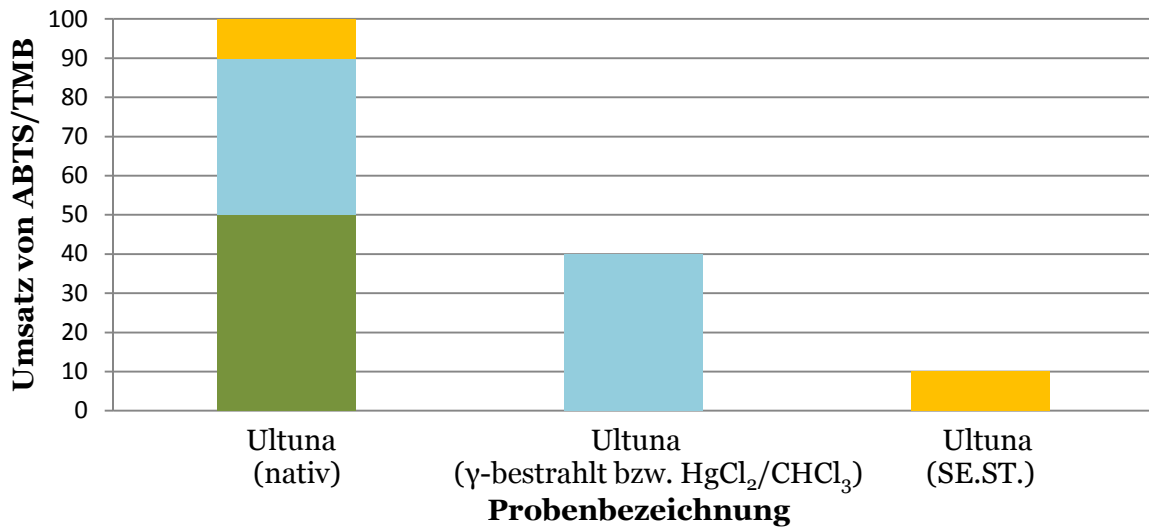


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Größenanteile und Quellen des Substratumsatzes von ABTS und TMB durch Oxidation in den Gesamtbodenproben beruhend auf der jeweiligen Behandlung des Bodens. grün = Aktivität basierend auf Enzymsekretion durch lebende Mikroorganismen; hellblau = Aktivität basierend auf immobilisierten Enzymen; orange = Aktivität basierend auf abiotischen Einflüssen.

Demgemäß setzt sich die oxidative Aktivität der Gesamtbodenproben Ultuna (nativ) aus der Pseudoenzymaktivität im Boden (entspricht der Aktivität der Proben Ultuna_{SE.ST.}), der Aktivität immobilisierter Phenoloxidasen und Peroxidasen (entspricht der Aktivität der Proben Ultuna_{γ-bestrahlt} und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}) und der Aktivität sekretierter PO und PERO zusammen. Die Aktivität sekretierter PO und PERO entsprach somit der Aktivität der Proben Ultuna (nativ) abzüglich der Aktivität in Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} beziehungsweise Ultuna_{γ-bestrahlt} und Ultuna_{SE.ST.}

Somit boten die biologischen und chemischen Charakteristika der Gesamtbodenproben die Möglichkeit, den Einfluss der mikrobiellen Aktivität, der unterschiedlichen Formen enzymatischer Aktivität und der abiotischen Inkubationsumgebung auf den Verbleib und das Stoffschicksal von ¹⁴C-Metalaxyl selektiv zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass ein Großteil der Radioaktivität auch nach 92 Tagen Inkubation extrahierbar war (siehe Tabelle 4.11) und zudem noch überwiegend frei im Fraktionswasser vorlag (siehe Abbildung 4.9). Somit ist zu vermuten, dass ¹⁴C-Metalaxyl und möglicherweise auch seine Transformationsprodukte nur schwach mit den Bodenoberflächen interagieren und hauptsächlich in der wässrigen Bodenphase vorlagen. Dies wurde bereits bei der Etablierung einer Extraktionsmethode vermutet (siehe Abschnitt 5.2). Für Metalaxyl ist dies mit seiner hohen Wasserlöslichkeit und geringen Adsorptionskoeffizienten im Boden zu erklären, die u.a. von Warsaw et al. (2012) und Sukul und Spiteller (2001a) beschrieben wurden. Eine geringe Interaktion von Metalaxyl und Bodenoberflächen wurde zudem auch

von Triantafyllidis et al. (2013) festgestellt. Somit unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auch Untersuchungen von Sukul (2013), der eine hohe Gefahr der Auswaschung und Versickerung des Fungizids in das Grund- und Oberflächenwasser beschrieb. Desweiteren deutet der große wasserlösliche Anteil der ER daraufhin, dass ¹⁴C-Metalaxyl und mögliche Transformationsprodukte im Boden auch nach 92 Tagen Inkubation noch bioverfügbar gewesen sind.

Es ist festzustellen, dass ¹⁴C-Metalaxyl in den nicht sterilen Gesamtbodenproben teilweise komplett bis hin zu anorganischen Endprodukt CO₂ abgebaut worden ist. Generell war die Mineralisation des Fungizids im Vergleich zu Studien anderen Xenobiotika in Böden jedoch gering. Beispielsweise lag die Mineralisation des strukturverwandten Fungizids Benalaxyl in Bodenstudien nach 100 Tagen Inkubation bei etwa 26 % (Barriuso et al., 2008). Da die Mineralisation mikrobiell bewirkt wird (Müller et al., 2007), lässt sich vermuten, dass nur eine geringe Anzahl von Mikroorganismen im Versuchsboden aus Ultuna das Fungizid komplett durch eine Aufspaltung des Phenylrings und weiteren Transformationsreaktionen zu anorganischen Endprodukten wie CO₂ und oder Biomasse abbauen konnten. Der Abbau des Fungizids verläuft also hauptsächlich cometabolisch, was in begleitenden Experimenten zu der vorliegenden Studie in der Forschergruppe nachgewiesen werden konnte (Diplomarbeit C. Gottfroh, RWTH Aachen, 2012). Dies entspricht auch Ergebnissen aus früheren Studien zu Metalaxyl welche zum einem eine geringe Mineralisation im Boden (Sukul und Spittler, 2001a) und einen cometabolischen Abbau des Fungizids (Zheng et al., 1989) feststellten. Eine geringe Mineralisation eines Fremdstoffs im Boden wird in vielen publizierten Studien auch darauf zurückgeführt, dass die xenobiotische Ausgangssubstanz oder ihre Metaboliten im Boden schnell gebundene Rückstände bilden und somit dem mikrobiellen Abbau entzogen werden. Angesichts des hohen wasserlöslichen Anteils der ER (Bioverfügbarkeit) kann dies jedoch als hauptsächliche Ursache der geringen Mineralisation in den Proben der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Die niedrige Mineralisation in den sterilen Ansätzen zeigt zudem erneut die Effizienz der verwendeten Sterilisationstechniken auf. Analog zur Messung der DMSO-Reduktion ist jedoch auch aufgrund ansteigender Werte der Mineralisation in den sterilen Ansätzen Ultuna (enzymatisch 1,2) zu vermuten, dass einige wenige Mikroorganismen die Sterilisation überlebt haben und diese ¹⁴C-Metalaxyl ebenfalls mineralisieren konnten. Eine Mineralisation im Seesand und den sequentiell sterilisierten Proben (Ultuna abiotisch) blieb angesichts der extrem geringen mikrobiellen Aktivität aber nahezu vollständig aus.

Hinsichtlich der als erschöpfend angesehenen Extraktionsmethode kann vermutet werden, dass die NER in allen Gesamtbodenproben nach Extraktion auf stark inkorporierte und oder kovalent eingebundene radioaktive Substanz zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 5.2). Die Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität stiegen im Laufe der Inkubationszeit in den

Proben Ultuna (nativ) und Ultuna_γ-bestrahlt sowie Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} signifikant an (7,7 % auf 24,6 %, 3,4 % auf 5,6 %, 4,1 % auf 8,7 %). Da jedoch keine Proben für einen Zeitraum zwischen 10 und 92 Tagen inkubiert wurden, kann die Kinetik dieses Anstieges nicht ermittelt werden. Dennoch können aufgrund der Bildung der NER folgende Schlussfolgerungen getroffen werden:

Erstens hat eine zunehmende Verweildauer die Wahrscheinlichkeit der Interaktion des Fremdstoffs mit Bodenoberflächen erhöht und somit die NER Bildung begünstigt. Dieser Prozess wird als „Ageing“ bezeichnet. Aufgrund dieses Prozesses werden Fremdstoffe und ihre Transformationsprodukte im Boden zunehmend weniger bioverfügbar und extrahierbar (Barraclough et al., 2005). Da in den Proben Ultuna_{SE,ST} kein signifikanter Anstieg der NER Menge festgestellt wurde, ist anzunehmen, dass dieser Prozess ohne Anwesenheit vitaler Mikroben oder immobilisierter Enzyme keine wichtige Rolle bei der NER Bildung des Fungizids im Boden spielt. Es ist aber vorstellbar, dass ¹⁴C-Metalaxyl direkt nach Applikation in Feinporen und Zwischenschichten von Tonmineralen und oder in Huminstoffe eingeschlossen wurde und somit als nicht extrahierbar verblieb, wie es für Fremdstoffe u.a. von Gevaio et al. (2000) und Katayama et al. (2010) beschrieben wurde. Ein Einschluss von Metalaxyl in Feinporen mit einem Porenradius kleiner als 100 nm konnte bereits von Celis et al. (2013) beobachtet werden. Da im Seesand (Kontrollproben der vorliegenden Studie, siehe Tabelle 4.10) vermutlich keine Tonminerale vorliegen, war dort auch die NER Menge am kleinsten (< 1%).

Zweitens könnte mit ansteigender Verweildauer aber auch das Ausmaß der Transformation des Fungizids erhöht worden sein und die Abbauprodukte fester im Boden gebunden werden als die Ausgangssubstanz. Dies wurde insbesondere bei Transformationsprodukten von Fremdstoffen festgestellt, die Hydroxylgruppen oder Amingruppen tragen, welche eine Einbindung fördern können (Barriuso et al., 2008). Dies wird nach Analyse der extrahierbare Radioaktivität der Gesamtbodenproben diskutiert.

Drittens war festzustellen, dass die Menge an NER mit der mikrobielle Aktivität und der Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen in der vorliegenden Studie korrelierte und aufgrund einer längeren Verweildauer der Fremdstoffe im Boden vermutlich auch diese Parameter länger einen Einfluss auf die NER Bildung ausüben konnten. Die Menge der NER nahm somit in den Gesamtbodenproben in folgender Abfolge zu: Ultuna (abiotisch) < Ultuna (enzymatisch 1,2) < Ultuna (nativ). Somit können die in Abbildung 5.1 gezeigten Beiträge der Art exozellulärer Enzymaktivität auf die Gesamtaktivität einer nicht sterilen Bodenprobe auch so gedeutet werden, dass sie in gleicher Weise zu hohen NER Anteilen (Ultuna nativ), geringeren NER Anteilen (Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂} beziehungsweise Ultuna_γ-bestrahlt) und niedrigen NER Anteilen (Ultuna_{SE,ST}) beitragen. Dies bestätigt Studien von Sukul

und Spiteller (2001a), welche ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der mikrobiellen Aktivität und der Bildung von NER des Fungizids im Boden feststellten. Da eine NER Bildung ohne Anwesenheit von Mikroorganismen aber in Gegenwart immobilisierter Phenoloxidasen und Peroxidasen (Proben Ultuna_γ-bestrahlt sowie Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}) stattfand, ist der Einbindungsmechanismus vermutlich enzymatisch katalysiert. Dies kann auf eine Einbindung durch oxidative Kopplung an Huminstoffe hindeuten, die beispielsweise von Gevaio et al. (2000); Dec und Bollag (1997) und Xu und Bhandari (2003) sowie Rao et al. (2010) beschrieben wurde und bereits nach den Experimenten in Modellsystemen der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 5.1) vermutet wurde. Man kann also schlussfolgern, dass Phenoloxidasen und Peroxidasen vergleichbar zur Humifikation organischen Bodenmaterials stabile Radikale im organischen Material gebildet haben, welche für die kovalente Einbindung verantwortlich sein können. Der Mechanismus kovalenter Einbindung wird vermutlich insbesondere durch die Anwesenheit sekretierter Phenoloxidasen und Peroxidasen in den nicht sterilen Proben Ultuna (nativ) verstärkt. Da ein größerer Anteil an Radioaktivität im Fraktionswasser dieser Proben an Huminstoffe gebunden war als in den sterilen Proben, wird die Hypothese einer oxidativer Kopplung der Fremdstoffe an die Huminstoffe noch zusätzlich unterstrichen. Neben dem Mechanismus eines Einschlusses der Fremdstoffe in Bodenporen ist eine mögliche kovalente Einbindung auch in den sequentiell sterilisierten Ansätzen (Ultuna abiotisch) ohne intakte Enzyme vorstellbar. Sie könnte in diesen Proben, so wie auch der Umsatz von ABTS und TMB, auf der katalytische Einwirkung von Aluminium-, Eisen- und Manganoxiden und Tonmineralen beruhen, die laut Bollag et al. (1992) und Zavarzina (2006) organische Substanzen im Boden kovalent aneinander binden können. Da jedoch in den abiotischen Proben kein Anstieg der NER Menge im Verlauf der Inkubation festzustellen war, ist es unwahrscheinlich, dass diese Prozesse einen große Bedeutung auf die NER Bildung ausübten, und die NER in diesen Proben wie oben beschrieben vermutlich mehrheitlich auf einem Einschluss der Fremdstoffe in die Feinporen des Bodensystems, die Huminstoffe oder die Zwischenschichten von Tonmineralen nach deren Quellung basieren.

Viertens kann davon ausgegangen werden, dass das Fungizid nur in den nicht sterilisierten Proben metabolisiert und mineralisiert werden konnte und somit ein Teil der NER biogen, beispielsweise in Form von Biomasse, in das organische Bodenmaterial eingebunden worden ist. Angesichts der dennoch insgesamt geringen NER Menge in den Gesamtbodenproben, die selbst nach 92 Tagen Inkubation in den Proben Ultuna (nativ) weniger als 25 % betrug (siehe Tabelle 4.11), werden auch Schlussfolgerungen von Barraclough et al. (2005) bestätigt. Demzufolge besitzt ein Fremdstoff insbesondere die Tendenz hohe Mengen an NER zu bilden, wenn die Mineralisation groß ist, jedoch nur geringe NER Mengen bei geringer Mineralisation, deren Bildung dann vornehmlich enzymatisch-katalysiert ist. Aufgrund der

vergleichsweise geringen Mineralisation von ^{14}C -Metalaxyl ist also davon auszugehen, dass der biogene Anteil der NER gering ist und sie überwiegend aus der Ausgangssubstanz und oder ihren primären Transformationsprodukten besteht. Sie sind also gemäß der Klassifikation von Kästner et al. (2013) dem Typ I oder Typ II zuzuordnen.

Generell waren die Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität auch in den nicht sterilen Gesamtbodenproben im Vergleich zu den bestimmten NER Mengen in anderen Inkubationsexperimenten gering. Barriuso et al. (2008) berichteten beispielsweise von 60 % bis 70 % NER in Bodenstudien mit Metalaxyl und auch von höherer Mineralisation (22% - 33%) jeweils nach 82 Tagen Inkubation. Hier ist jedoch hervorzuheben, dass diese Werte eine Zusammenstellung von Messergebnissen aus einer Vielzahl von Studien gemäß europäischer Richtlinien zur Chemikalien-Registrierung darstellen. Abweichungen zu den in der vorliegenden Studie aufgezeigten Werten können auf den Einsatz anderer Bodenarten und auch vor allem dem Einsatz anderer Extraktionsmethoden in diesen Studien der Industrie zurückzuführen sein.

Die nicht extrahierbare Radioaktivität war in den Partikelgrößenfraktionen der Gesamtbodenproben unterschiedlich verteilt und konnte analog zu den Anteilen extrahierbarer Radioaktivität aufgrund gleicher Massenanteile der Fraktionen in allen Gesamtbodenansätzen ebenfalls miteinander verglichen werden. Da im Schluff die Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität größer waren als im Ton und sie im Sand am geringsten waren (siehe Abbildung 4.10), kann ausgehend von der beschriebenen Korrelation zwischen NER Menge und PO- sowie PERO-Aktivität sowie mikrobieller Aktivität angenommen werden, dass im Schluff mehr Mikroben und eine größere Enzymaktivität vorherrschte als im Ton und Sand. Dies kann jedoch erst nach Untersuchung der Fraktionsproben schlussendlich gefolgert werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass keine anderen Enzymaktivitäten außer denen der Phenoloxidasen und Peroxidasen in der vorliegenden Studie gemessen wurden. Es ist also möglich, dass auch andere Enzyme nach Sterilisation katalytisch aktiv verblieben sein können und folgend einen Einfluss auf den Einbindungsmechanismus nahmen. Des Weiteren geben die Ergebnisse keinen Aufschluss darüber, ob tatsächlich eine kovalente Einbindung der NER vorlag. Somit ist der Einfluss extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die NER Bildung noch nicht endgültig bewiesen und bedarf der Analyse der nicht extrahierbaren Radioaktivität. Vor dieser Analyse wurde gleichfalls die extrahierbare Radioaktivität in den Gesamtbodenproben untersucht.

Metalaxylsäure ist als primäres Transformationsprodukt von Metalaxyl im Boden bereits in Studien von Droby und Coffey (1991), Sukul und Spittler (2001b), Pesaro et al. (2004) und Baker et al. (2010) nachgewiesen worden. Die Bildung des Metaboliten erfolgt durch eine Hydrolyse des Propionsäuremethylesters des Fungizids. Die Ergebnisse der vorliegenden

Studie zeigten einerseits auf, dass die mikrobielle Aktivität in den Gesamtbodenproben die Bildung der Metalaxylsäure im Boden erhöhte (siehe Tabelle 4.12). Sie ist also zumindest teilweise biologisch katalysiert. Andererseits entsteht Metalaxylsäure auch ohne die Anwesenheit vitaler Mikroorganismen (alle sterilen Gesamtbodenproben). Dieser abiotische Prozess in sterilen Bodenproben der Studien von Sukul et al. (1992) wurde auf einen photolytischen Zerfall von Metalaxyl zurückgeführt. Ein solcher Prozess ist in den Proben der vorliegenden Studie jedoch auszuschließen, da alle Inkubationssysteme im Dunkeln aufbewahrt wurden. Somit haben offensichtlich andere (abiotische) Faktoren als der Lichteinfluss die Bildung von Metalaxylsäure im Boden bedingt, wie es auch in Experimenten von Sukul und Spiteller (2001b) als auch Baker et al. (2010) festgestellt wurde. Eine Spezifizierung dieser Faktoren ist bislang nicht erfolgt. Es ist jedoch bekannt, dass zusätzlich zur Photolyse auch die Hydrolyse in der wässrigen Bodenphase sowie eine Oxidation- und Reduktion an katalytischen Tonmineraloberflächen die maßgeblichen Faktoren einer abiotischen Transformation von Fremdstoffen in Böden darstellen (Kästner et al., 2013; Yaron et al., 2010). Angesichts der hohen Mengen Metalaxylsäure in den sterilen Proben der vorliegenden Studie ist zu vermuten, dass das Fungizid verhältnismäßig leicht hydrolysierbar war, obwohl die Substanz als hydrolysestabil in einem weiten pH-Bereich gilt. Möglicherweise haben Tonminerale eine Transformation des Fungizids bewirkt oder unterstützt. Des Weiteren ist es möglich, dass Hydroxyradikale den Prozess bewirkt haben. Diese können sowohl im organischen Bodenmaterial lokalisiert sein (Yaron et al. 2010) als auch durch γ -Bestrahlung gebildet werden (Trevors, 1996) und somit auch in den sterilen Bodenproben der vorliegenden Studie vorhanden gewesen sein. Jedoch dürften die durch Bestrahlung gebildeten Radikale nach der Sterilisation rasch mit Bodenbestandteilen vor der Applikation reagiert haben und haben vermutlich keinen Einfluss auf die Transformation des Fungizids ausgeübt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass beispielsweise Esterasen nach Sterilisation im Boden katalytisch aktiv verblieben und Metalaxyl zu Metalaxylsäure transformieren konnten. Hierbei wäre davon auszugehen, dass es zu einem enantioselektiven Abbau des Fungizids kommt, wie er von Monkiedje (2007) beschrieben wurde (siehe auch Abschnitt 1.8). Da jedoch keine enantioselektive Analyse in der vorliegenden Studie vorgenommen wurde, kann dies nur vermutet werden. In den Kontrollen (Seesand) wurde keine Metalaxylsäure gefunden (siehe Tabelle 4.12). So ist anzunehmen, dass die abiotische Esterhydrolyse des Fungizids in den Proben Ultuna_{SE.ST.} wahrscheinlich an Tonmineralen und dem organischen Bodenmaterial stattfand, welche im Seesand nicht vorhanden sind.

Obwohl Metalaxylsäure in allen Proben mit Ausnahme der Kontrollen gebildet wurde, war die Mineralisation gering (siehe Abschnitt 4.6.1.1). Die Transformation zur Säure hatte also keinen raschen Abbau der Substanz zur Folge, und es lässt sich somit schlussfolgern, dass sowohl Metalaxylsäure als auch Metalaxyl nur schwer mikrobiell abbaubar sind. Zudem war

festzustellen, dass die Metalaxylsäure bereits während der Partikelgrößenfraktionierung nahezu komplett mit dem Reinstwasser extrahiert wurde. Metalaxylsäure besaß somit eine größere Wasserlöslichkeit und Mobilität in der wässrigen Bodenphase als die Ausgangssubstanz selbst, wie es auch in publizierten Studien beschrieben wurde (Datenbank der Universität von Hertfordshire; Pesticide Properties Database Hertfordshire, 2013). Somit interagiert auch Metalaxylsäure nur gering mit den Bodenoberflächen und trägt vermutlich nicht maßgeblich zur NER Bildung in Form von nicht kovalenten Wechselwirkungen bei. Die Bildung des primären Metaboliten beschleunigt somit nicht den kompletten Abbau des Fremdstoffs zu anorganischen Endprodukten. Da von einem enzymatischen Einflusses auf die NER Bildung in Form der oxidativen Kopplung ausgegangen wird, könnte aber sowohl Metalaxyl als auch Metalaxylsäure nach Reaktion mit gebildeten Radikalen in den Huminstoffen kovalent an diese gebunden worden sein. Diesbezüglich wurde die Verteilung der NER in den Huminstoff-Fractionen der Gesamtbodenproben untersucht.

Generell stellt das Verfahren zur Auftrennung der huminen Substanzen in Böden in Nicht-Humine, Fulvinsäuren, Huminsäuren und Humine (Huminstoff-Fractionen) ein konventionelles Verfahren in der Bodenwissenschaft dar (in Abschnitt 1.4 erläutert). Dieses wird aktuell jedoch stark kritisiert, da eine Artefaktbildung bei der Fraktionierung Rückschlüsse auf die tatsächlich im Boden befindliche Vergemeinschaftung der organischen Inhaltsstoffe erschwert oder verfälscht. Geht man jedoch von einer kovalenten Bindung zwischen Fremdstoff und Huminstoff aus, kann diese Methode jedoch nach wie vor in der Pestizidforschung nützlich sein, da sie eine gesonderte Betrachtung der Einbindung an die verschiedenen Inhaltsstoffe wie u.a. die Phenole, polymere Konglomerate, Proteine, Zucker und organische Säuren ermöglicht. Die Wahrscheinlichkeit der Einbindung eines organischen Materials oder organischen Fremdstoffs im Boden steht generell in Zusammenhang mit der Zugänglichkeit funktioneller Gruppen an den organo-mineralischen Oberflächen und den Hohlräumen in der dreidimensionalen Struktur dieser Stoffe (Thiele-Brun et al., 2004). Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der Inhaltsstoffe der Huminstoff-Fractionen können somit auch unterschiedliche Mechanismen der Einbindung von ¹⁴C-Metalaxyl und oder seinen Transformationsprodukten in den Fractionen vermutet werden. Diese können als Konkurrenzreaktionen verstanden werden können. Zusätzlich beeinflusst auch die Wasserlöslichkeit und Struktur der Ausgangssubstanz und ihrer Transformationsprodukte eine Bindung an die Huminstoffe (Chilom und Rice, 2009). Generell wurde keine Radioaktivität im Wasser nach Trocknung durch Lyophilisation der Huminstoff-Fractionen aller Inkubationsansätze gemessen. Somit war davon auszugehen, dass die als NER deklarierte Radioaktivitätsmenge auch tatsächlich an die Huminstoffe gebunden oder nicht löslich in diese inkorporiert war.

Über die Verteilung der NER von ^{14}C -Metalaxyl und anderer Phenylamid-Fungizide in den Huminstoff-Fractionen von Böden ist bislang nur wenig bekannt. Somit können lediglich Vergleiche zu anderen Fremdstoffen in Böden zur Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 4.13, 4.14) herangezogen werden. Diesbezüglich ist festzustellen, dass die NER in den Huminstoff-Fractionen der nicht sterilen Ansätze der vorliegenden Studie anteilmäßig so verteilt waren wie es in einer Bodenstudie von Dec et al. (1997) mit Cyprodinil, einem Anilinopyrimidin Fungizid, festgestellt wurde. In dieser Studie konnte mittels einer Größenaufschlusschromatographie ermittelt werden, dass die NER von Cyprodinil teilweise kovalent an Huminstoffe gebunden war (Kästner et al., 2013). Dies konnte in späteren *in vitro* Studien mit Cyprodinil auf die katalytische Einwirkung von Laccase an Vertretern des organischen Bodenmaterials von Kang et al. (2002) bestätigt werden, wie es auch in Abschnitt 5.1 beschrieben ist. Die ähnliche Verteilung der NER kann somit ein weiterer Hinweis darauf sein, dass ihre Bildung in der vorliegenden Studie auch auf enzymatisch katalysierte Reaktionen beruht. Eine enzymatisch katalysierte Polymerisation des organischen Bodenmaterials kann in Folge einer Radikalbildung auch zur Bildung von Ester-, Ether- oder auch C-C Bindungen zwischen den Huminstoffen und dem Fungizid und oder seinen Transformationsprodukten führen. Somit steht eine Polymerisation des organischen Materials in direktem Zusammenhang zur kovalenten Einbindung.

Die Anwesenheit vitaler Mikroorganismen hatte in der vorliegenden Studie einen wesentlichen Einfluss auf die Verteilung der NER in den organischen Fractionen und führt zu einer verstärkten NER Bildung in den Huminen (siehe Abbildung 4.13, 4.14). Dies kann zum einen damit erklärt werden, dass in diesen Proben auch die eine höhere Mineralisation festzustellen war und dadurch biogene NER als End- und oder Beiprodukte des mikrobiellen Abbaus gebildet wurden. Diese gehen beim Abbau organischen Materials wie andere Endprodukte des Abbaus überwiegend in die Fraction der Humine ein, wie es von Stevenson (1994) für natürlich vorkommende organische Stoffe in Böden angenommen wurde. Zum anderen waren auch die enzymatischen Aktivitäten in diesen Ansätzen am größten und führten somit vermutlich auch zu einer weitreichenderen Polymerisation des organischen Materials und somit zu einer kovalenten Einbindung der NER in die Humine, weil diese gemäß der angewendeten Technik der Fractionierung insbesondere die polymeren und somit höhermolekularen und unlöslichen Huminstoffe beinhaltet, wie es von Piccolo (2002) beschrieben wurde. Andererseits kann eine oxidative Kopplung aber auch an Fettsäuren, die ein Bestandteil der Nicht-Humine sind (Pettit, 2013), katalysiert werden wie es beispielsweise von Martin et al. (2009) beschrieben wurde. Zudem ist diese Reaktion auch an Phenolstrukturen in den Fulvin- und Huminsäuren vorstellbar, die eine Vielzahl funktioneller Sauerstoffgruppen enthalten (Stevenson, 1994). Oxidative Kopplungsreaktionen mit Fulvinsäuren wurden bereits von Bialk et al. (2005) und mit

Huminsäuren von Zavarzina (2011) beschrieben. Die Einbindung in Nicht-Humine und Fulvinsäuren wird nach den Daten der vorliegenden Studie vermutlich überwiegend von immobilisierten PO und PERO katalysiert, wohingegen sekretierte PO und PERO eine Einbindung in die Humine befördern. Demnach hat die Lokalisation extrazellulärer Enzyme nicht nur einen Einfluss auf die Menge der NER sondern auch auf deren Verteilung im organischen Bodenmaterial. Unter Rückbezug auf die Versuche in Modellsystemen (siehe Abschnitt 5.1) ist anzunehmen, dass Laccase eine Einbindung an Huminsäuren und Humine katalysiert und Peroxidasen vermutlich den Einbau in Humine und Nicht-Humine befördern.

Zusätzlich zu diesen kovalenten Bindungen könnte ¹⁴C-Metalaxyl und oder seine Transformationsprodukte auch in der Suprastruktur der Huminstoffe (in Abschnitt 1.4 beschrieben) nicht kovalent eingebunden vorliegen, aber aufgrund der Stabilisation dieser Strukturen im Boden nach erschöpfender Extraktion verblieben sein. Es ist zum Beispiel vorstellbar, dass Metalaxyl und Metalaxylsäure aufgrund ihrer amphiphilen Struktur und ihrer strukturchemischen Ähnlichkeit zu der Aminosäure Phenylalanin als Teil der Micellenstruktur der Huminstoffe und oder in deren Hohlräume inkorporiert war. Unter Säureeinwirkung und Temperaturerhöhung während der Extraktion der Huminstoffe könnten die Fremdstoffstrukturen somit nach Aufbrechen der Suprastruktur in die Nicht-Humin Fraktion und die Fulvinsäurefraktion wieder in Lösung gegangen sein. Generell ist zu berücksichtigen, dass die angewandte Fraktionierungstechnik keine vollständige Trennung der Huminstoff-Fraktionen ermöglicht. Es können also säurelösliche Fulvinsäuren in die mit HCl extrahierte Nicht-Huminfraktion übergegangen sein. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Nicht-Humine eine leicht gelbliche Färbung aufwiesen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die verschiedenen Sterilisationsprozesse einen Einfluss auf die Struktur und funktionellen Gruppen im organischen Bodenmaterial hatten, wie es von Trevors (1996) berichtet wurde, und somit auch die Einbindung der Fremdstoffe beeinflusste. Obwohl eine Vielzahl funktioneller Gruppen in den Huminsäuren lokalisiert ist, wurden in dieser Fraktion die geringsten NER Mengen quantifiziert. Dies kann gleichfalls mit den Modellsystem-Versuchen (siehe Abschnitt 5.1) erklärt werden. Vermutlich adsorbierte das Fungizid oder Metalaxylsäure stärker an Nicht-Humine, Fulvinsäuren und Humine als an Huminsäuren. Dies könnte eine geringere Einbindung oder Inkorporation in diese Fraktion bewirkt haben. Des Weiteren ist es möglich, dass polarere Pestizide wie Metalaxyl und auch der Metabolit Metalaxylsäure eher in den Huminen und Fulvinsäuren verbleiben, wie es für Atrazin von Barriuso et al. (1991) beschrieben wurde, wohingegen lipophilere Fremdstoffe eher in den Huminsäuren verbleiben, wie es von Niema et al. (1999) für Pyrene beschrieben wurde. Die Untersuchung der nicht extrahierbaren Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen aller Inkubationsansätze sollte Aufschluss darüber geben, ob eine kovalente Einbindung der

Fremdstoffe vorlag und somit den vermuteten enzymatischen Einfluss auf die NER Bildung schließlich beweisen.

Nach 10 Tagen Inkubationszeit konnten aus den isolierten Huminstoff-Fractionen Anteile der NER mit Dichlormethan extrahiert werden (siehe Abschnitt 4.6.1.4). Da sich durch diese Extraktion keine kovalente Bindung trennen lässt, ist davon auszugehen, dass die freigesetzte Radioaktivität in den Huminstoff-Fractionen nicht-kovalent inkorporiert war und nach der zuvor durchgeführten, erschöpfenden Extraktion (mit Wasser und organischem Lösungsmittel) im Boden verblieb. Nach DC Analyse der Extrakte hatte sich die Vermutung bestätigt, dass die NER in den Gesamtbodenproben teilweise auf der Ausgangssubstanz und dem primärem Transformationsprodukt (Metalaxylsäure) beruhte. Die nach erschöpfender Extraktion verbleibenden NER, die anschließend durch Dichlormethan extrahierbar werden konnten, sind also dem Typ I (Kästner et al., 2013) zuzuordnen und können somit ein deutliches Risiko für das Ökosystem Boden bei Remobilisation zur Folge haben. Da nach 10 Tagen Inkubation in den Gesamtbodenproben $Ultunase_{ST}$ nur wenig Metalaxylsäure gebildet wurde (siehe Abschnitt 4.6.1.4), wurde auch nur Metalaxyl inkorporiert und detektiert. Da jedoch in den Dichlormethan-Extrakten nach 10 Tagen insbesondere aus den Proben mit hoher Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen (*Ultuna* nativ) und auch denen mit immobilisierter Enzymaktivität (*Ultuna*_γ-bestrahlt und *Ultuna*_{CHCl₃/HgCl₂}) die NER nicht vollständig im Extrakt vorlagen, sind sie vermutlich also nicht vollständig nicht-kovalent inkorporiert gewesen und eine enzymatisch katalysierte, kovalente Einbindung ist weiterhin zu vermuten.

Nach 92 Tagen wurden die Huminstoff-Fractionen mit einer alkalischen Hydrolyse degradiert. Die alkalische Hydrolyse trennt gezielt Esterbindungen, unter Umständen auch Amidbindungen, zwischen Fremdstoff und Huminstoff sowie auch im Huminstoffmolekül selbst auf. Dies ist schematisch in Abbildung 5.2 für einen Ester dargestellt.



Abbildung 5.2: Prozess der alkalische Hydrolyse. R= chem. Rest

Da das Verfahren der alkalischen Hydrolyse gezielt Esterbindungen spaltet und hierbei Carboxylate und Alkohole entstehen, sind verschiedene Strukturen freigesetzter Substanz denkbar. Erstens kann davon ausgegangen werden, dass die alkalische Degradation Esterbindungen direkt zwischen den Fremdstoffen und der Matrix der Huminstoffe auftrennt (Northcott und Jones, 2000). In diesem Fall würden die Fremdstoffe frei in dem Extrakt nach Hydrolyse vorliegen. Zweitens können auch Esterbindungen in der

Huminstoffstruktur aufgetrennt werden (Riefer et al., 2010). Dies würde zu einer teilweisen Freisetzung von vormals nicht-kovalent inkorporierten Fremdstoffen führen (frei im Extrakt vorliegend) oder auch die Freisetzung von Fremdstoffen bewirken, die noch mit Bestandteilen der Huminstoffe kovalent verbunden sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass Metalaxylsäure entweder kovalent über Esterbindungen an die Huminstoffe gebunden oder auch nur in diese inkorporiert war und nach Hydrolyse somit frei vorlag. Eine Unterscheidung dieser Anteile ist mit der durchgeführten Degradationstechnik nicht möglich.

Geht man von einem enzymatischen Einfluss auf die NER Bildung aus, kann anhand der Ergebnisse vermutet werden, dass die Präsenz immobilisierter Enzyme (Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}), eine einfache chemische Reaktion oder abiotische Faktoren, wie beispielsweise katalytisch wirkende Mineraloberflächen (Ultuna_{SE.ST.}), eine Einbindung von ¹⁴C-Metalaxylsäure durch Esterbindungen bedingen können (siehe Tabelle 4.13); eine analoge Reaktion ist für das intakte Metalaxyl-Molekül allenfalls durch Umesterung (Methyl gegen geeignete chemische Gruppen in Huminstoffen) denkbar. Insgesamt entspräche dies Vermutungen von Senesi (1992), der diese Bindungsform als eine Grundlage kovalenter Einbindung von Fremdstoffen im Boden beschrieb, und von Gevaio (2000) mit enzymatischer Polymerisierung der Huminstoffe in Verbindung gebracht wurde. Der geringere Anteil freigesetzter NER in den Proben Ultuna (nativ) in der vorliegenden Untersuchung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Präsenz vitaler Mikroorganismen eine kovalente Einbindung anderer Art mit höherer Bindungsstärke als Esterbindungen, wie beispielsweise C-C- oder Etherbindungen, ermöglicht haben (siehe auch Abbildung 1.9). Diese werden nicht durch die Hydrolyse gespalten. Da in diesen Proben die enzymatische Aktivität doppelt so groß war wie in den Proben (Ultuna_γ-bestrahlt und Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}), weil neben freien, immobilisierten auch permanent sekretierte Enzyme vorlagen, ist auch anzunehmen, dass dort mehr Radikale in den Huminstoffen induziert wurden und somit eine stärkere Polymerisierung von Huminstoffen stattfand. Somit boten sich vermutlich mehr Möglichkeiten der kovalenten Einbindung (Co-Polymerisation) sowohl des Fungizids als auch seiner Transformationsprodukte. Des Weiteren ist zu vermuten, dass die enzymatische und mikrobielle Aktivität im Schluff höher war, da dort aus allen Huminstoff-Fractionen die geringsten Anteile der NER freigesetzt werden konnten. Sind keine Mikroorganismen als Einfluss nehmender Faktor vorhanden oder die extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen ganzheitlich denaturiert, wirken andere Mechanismen der Einbindung (Konkurrenzreaktionen) und es ergeben sich somit auch andere Mengen freigesetzter Radioaktivität wie es für die sterilen Proben Ultuna_{SE.ST.} festgestellt wurde (siehe Tabelle 4.13). Da in den Extrakten nach Degradation nur Metalaxylsäure vorlag (siehe Abschnitt 4.6.1.4), würde dies bedeuten, dass die alkalische Hydrolyse ausschließlich die Esterbindung

zwischen Huminstoff und Fremdstoffmolekülen getrennt hat. Dies ist aber als unwahrscheinlich anzusehen. Somit ist auch unter Rückbezug auf die Dichlormethan-Extraktion der Proben mit 10 Tagen Inkubationszeit anzunehmen, dass nur ein Anteil der Säure kovalent gebunden war. Diese NER würden laut Kästner et al. (2013) dem Typ II entsprechen und besitzen ein geringeres Umweltrisiko als die des Typ I. Eine kovalente Einbindung kann möglicherweise mit den unterschiedlich großen Startaktivitäten nach der DC-Analyse der Extrakte aus alkalischer Hydrolyse erklärt werden. Die Startaktivität, die gleichsam mit enzymatischer und mikrobieller Aktivität in den Proben zunahm (siehe Abschnitt 4.6.1.4), ist möglicherweise auf ^{14}C -Metalaxyl oder Transformationsprodukte des Fungizids zurückzuführen, die noch an organisches Material kovalent gebunden waren. Aufgrund der Derivatisierung der Fremdstoffmoleküle mit Huminstoff-Resten unterschiedlicher Größe und Polarität kam es zur Immobilität dieser Anteile der Radioaktivität. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass alle Extrakte eine tiefbraune bis schwärzliche Färbung aufwiesen und als Flecken am Startpunkt nach Chromatographie immer noch sichtbar waren.

Im Gegensatz zu den mit Dichlormethan extrahierten Huminstoffen (gewonnen nach 10 Tagen Inkubation) konnte nach alkalischer Hydrolyse allein (92 Tage Inkubation) nur Metalaxylsäure freigesetzt werden. Entweder wurde also kovalent gebundenes beziehungsweise inkorporiertes Metalaxyl im Verlauf der Inkubation zu Metalaxylsäure transformiert, oder diese bildete sich aus frei gelöstem Metalaxyl. Dies wurde mit zusätzlichen Experimenten geprüft (in Abschnitt 3.10 erläutert). Hierbei ließ sich feststellen, dass ^{14}C -Metalaxyl unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse quantitativ zu Metalaxylsäure hydrolysiert wurde. Es kann also aufgrund der Ergebnisse der alkalischen Hydrolyse nicht geschlussfolgert werden, wie viel der freigesetzten Radioaktivität vor Degradation tatsächlich auf Metalaxylsäure oder auf Metalaxyl beruhte. Aus der Analyse der Dichlormethan-Extrakte der Proben Ultuna_{SE,ST} kann aber vermutet werden, dass auch Metalaxyl und nicht nur Metalaxylsäure zu der NER beitrug. Ob wirklich eine kovalente Bindung zwischen NER und Huminstoffen vorliegt, könnte möglicherweise durch eine NMR Analyse der Substanzen, von denen die Startaktivität auf den DC Platten ausging, aufgeklärt werden. Dies war aber aus Zeitgründen leider nicht möglich.

Fazit

Anhand von erfolgreich sterilisierten Gesamtbodenproben und nicht sterilen Gesamtbodenproben konnte der Einfluss und die Lokalisation sekretierter und immobilisierter Phenoxidasen und Peroxidasen sowie einer abiotischen Inkubationsumgebung auf den Verbleib und das Schicksal von ^{14}C -Metalaxyl untersucht werden. Der Einsatz der unterschiedlichen Sterilisationstechniken ermöglichte eine

Unterscheidung der Quellen oxidativen Substratumsatzes im Gesamtboden und erlaubte somit Rückschlüsse über die Lokalisation der Phenoloxidasen und Peroxidasen im Versuchsboden. Es ließ sich feststellen, dass im Gesamtboden insbesondere sekretierte zu etwa 50 % und immobilisierte Enzyme zu etwa 40 % am Substratumsatz beteiligt waren, während ein abiotischer Substratumsatz nur in geringem Ausmaß erfolgte (≤ 10 %). Aufgrund einer geringen Interaktion mit Bodenoberflächen wies das Fungizid, sowie das unter sterilen und nicht sterilen Bedingungen gebildete Transformationsprodukt Metalaxylsäure, eine hohe Mobilität in der wässrigen Bodenphase auf. Die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände der Substanz korrelierte mit der mikrobiellen Aktivität sowie auch den Aktivitäten exozellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen. Die gebildeten NER sind aufgrund der geringen Mineralisation der Radiochemikalie nur zu geringem Anteil biogen und bestehen vornehmlich aus der Ausgangssubstanz und Metalaxylsäure, die teilweise inkorporiert und vermutlich kovalent gebunden vorlag. Die NER entsprachen also in großem Anteil dem Typ I und II. Die Anteile der NER waren analog zu den Substratumsätzen von ABTS und TMB im Schluff größer als im Ton und im Sand am geringsten. Die Anwesenheit vitaler Mikroben und sekretierter Oxidasen bewirkte eine Inkorporation und auch vermutlich kovalente Einbindung der Substanzen in Form der oxidativen Kopplung in die Humine des Bodens, wohingegen immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen vermutlich eine Einbindung in Nicht-Humine und Fulvinsäuren katalysierten. In den Huminsäuren waren die geringsten NER Mengen lokalisiert. Dies kann mit einer geringeren Adsorption des Fungizids an diese Inhaltsstoffe des SOM erklärt werden, die eine folgende enzymatisch-katalysierte Einbindung erschwert haben könnte. Generell ist es wichtig hervorzuheben, dass keine anderen Enzymaktivitäten als die der Phenoloxidasen und Peroxidasen gemessen wurden und somit nicht sichergestellt werden konnte, ob auch andere Enzymfamilien an der NER Bildung Anteil nahmen. Ein Rückbezug auf die Feldsituation wurde dadurch erschwert, dass die angewendeten Sterilisationstechniken in dieser Studie möglicherweise die Struktur des organischen Materials verändert und somit die NER Bildung beeinflusst haben. Des Weiteren ist hervorzuheben, dass der Versuchsboden in der vorliegenden Studie zwecks besserer Aufarbeitung mit Seesand gestreckt wurde. Obwohl dessen Einfluss auf die NER Bildung nur minimal war, sind die Gesamtbodenproben prinzipiell nicht mit dem aus dem Versuchsfeld in Ultuna entnommenem Boden direkt vergleichbar. Da die Verteilung der NER in den Fraktionen aber nur nach einer Partikelgrößenfraktionierung der Gesamtbodenproben bestimmt werden konnte, musste der Einfluss dieser Methode auf die biologischen und chemischen Charakteristika, die die NER Bildung bedingen, anhand von Fraktionsproben näher untersucht werden.

5.5 Fraktionsproben im stationären System

Anhand der Daten, die aus der Messung der DMSO-Reduktion resultierten (siehe Tabelle 4.6), kann erstens analog zu den Gesamtbodenproben von einer erfolgreichen Sterilisation der isolierten Fraktionen ausgegangen werden, wobei der sterile Bodenzustand für die gesamte Inkubationszeit nahezu aufrecht erhalten werden konnte. Im Schluff waren gemäß dieser Ergebnisse mehr Mikroorganismen vorhanden als in der Tonfraktion (siehe Tabelle 4.6). Da alle Fraktionsproben aufgrund mehrerer Partikelgrößenfraktionierungen gewonnen wurden, wurde die Mikroorganismenanzahl in den Fraktionsproben im Vergleich zu einer gleich großen Menge Gesamtbodens, der nur zu 24,9 % aus Ton und zu 45,3 % aus Schluff bestand (siehe Abschnitt 4.3), erhöht. Es war erkennbar, dass die Summe der mikrobiellen Aktivität im isolierten Ton und Schluff bezogen auf deren Anteil am Gesamtboden (Umrechnung siehe Abschnitt 3.12) nur geringfügig kleiner war als dessen gesamte mikrobielle Aktivität. Der Verlust an mikrobieller Aktivität während der Partikelgrößenfraktionierung betrug somit deutlich weniger als 20 %. Es ist also anzunehmen, dass die Mikroben während der Partikelgrößenfraktionierung nicht in überwiegender Anzahl aus dem Boden ausgeschwemmt worden sind oder ihre Zellen durch den Ultraschall zerstört wurden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein größerer Anteil der Mikroben fest an die Bodenpartikel gebunden war. Hier ist insbesondere die Einbindung in durch Zucker verkittete Mikroaggregate zu nennen (in Abschnitt 1.3 erläutert), die bei der eingesetzten Ultraschallenergie nicht vollständig aufgebrochen wird und die Mikroben somit nicht in das Fraktionswasser der Proben ausgewaschen werden konnten. Des Weiteren ist anzunehmen, dass Mikroben, die ins Fraktionswasser gelangten, durch die mehrfache Zentrifugation der Proben während der Partikelgrößenfraktionierung zurück in den pelletierten Boden gelangten. Zusätzlich erfolgte die Partikelgrößenfraktionierung nach einem modifizierten publizierten Protokoll (Stemmer et al., 1998), welches eine schonende Beschallung des Bodens beinhaltete, die vermutlich die Mikroorganismen wenig schädigte. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Mikroorganismen nach Partikelgrößenfraktionierung vermutlich nur zu geringem Anteil im Sand, jedoch zu größtem Anteil im Schluff und Ton lokalisiert waren. Ob dies auf Umverteilungen aufgrund der Partikelgrößenfraktionierungen zurückzuführen ist, oder ob die Mikroben auch vor der Fraktionierung derart verteilt waren, kann aufgrund der DMSO-Reduktionsmessung noch nicht bewertet werden. Einen Hinweis auf die tatsächliche Verteilung kann jedoch der Anteil organischer Substanz in den jeweiligen Fraktionen geben, da dieser ein wichtiges Nährstoffreservoir der Mikroben ist und so Aufschluss über ihre Lokalisierung geben kann, wie es von Nannipieri et al. (2003) beschrieben wurde.

Bei der Bestimmung der Gehalte organischen Kohlenstoffs in den isolierten Fraktionen ist im Gegensatz zu den Gesamtbodenproben analog zur mikrobiellen Aktivität zu berücksichtigen, dass die Fraktionsproben das Resultat von Partikelgrößenfraktionierungen darstellen (siehe Abschnitt 3.3) und somit der Einfluss dieser Methode auf die ermittelten Werte diskutiert werden muss. Es war erkennbar, dass im Schluff höhere Mengen organischen Kohlenstoffs vorlagen als im Ton (Tabelle 4.7). Somit enthielten isolierter Ton weniger und isolierter Schluff etwas mehr organisches Material als eine vergleichbare Menge Gesamtbodens, weil dieser ja nur zu 24,9 % aus Ton und zu 45,3 % aus Schluff besteht. Nach Umrechnung der Gehalte auf die Prozentanteile der Fraktionen (siehe Abbildung 4.6) wurde ersichtlich, dass während der Partikelgrößenfraktionierung analog zur mikrobiellen Aktivität, Verluste von etwa 30 % an organischer Bodensubstanz auftraten. Dies ist vermutlich auf das Aufbrechen von Aggregaten durch die Ultrabeschallung zurückzuführen, wodurch Teile der organischen Substanz von den Partikeln gelöst und aus dem Boden ausgeschwemmt wurden. Vergleicht man die bestimmten Gehalte organischen Kohlenstoffs in den Korngrößenfraktionen nach Umrechnung mit publizierten Literaturwerten (siehe Tabelle 2.3) wurde deutlich, dass trotz der Verluste die Verteilung der Gehalte organischen Kohlenstoffs in den Fraktionen den Literaturangaben entsprechen. Im Schluff lagen so mehr organischer Kohlenstoff vor als im Ton; im Sand waren die Gehalte am niedrigsten. Diese Unterschiede der Verteilung der organischen Substanz in Bezug auf die Textur des Versuchsbodens aus Ultuna wurde von Sessitsch et al. (2001) auf eine größere mikrobielle Aktivität und Diversität in den feinkörnigeren Bodenfraktionen zurückgeführt. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Partikelgrößenfraktionierung zur Gewinnung der Fraktionsproben in der vorliegenden Studie zwar organischer Kohlenstoff aus dem Boden herauslöste, seine Verteilung in den Fraktionen nicht maßgeblich beeinflusst wurde. Es ist also anzunehmen, dass keine wesentliche Umverteilung des organischen Materials zwischen Ton und Schluff während der Partikelgrößenfraktionierung (in Abschnitt 5.2 beschrieben) stattfand. Es lag demnach auch vor Fraktionierung im Schluff mehr organisches Material vor als im Ton und Sand. Dies erklärt auch, warum im Schluff mehr mikrobielle Aktivität gemessen wurde als im Ton, da diese in enger Beziehung zum Gehalt an organischer Substanz steht, der ein Nährstoffreservoir für die Mikroorganismen darstellt, wie es von Sessitsch et al. (2001) bereits vermutet wurde. Es kann also auch davon ausgegangen werden, dass es trotz der Verluste an mikrobieller Aktivität keine wesentliche Umverteilung der Mikroben während der Partikelgrößenfraktionierung stattfand. Somit lagen vermutlich vor Fraktionierung im Schluff mehr Mikroben vor als im Ton, wohingegen im Sand die geringste mikrobielle Aktivität vorherrschte. Dies bestätigt auch die bei der Untersuchung der Gesamtbodenproben festgestellte Verteilung der NER in den Korngrößenfraktionen und ihre Korrelation mit der mikrobiellen Aktivität.

Des Weiteren kann ein Einfluss der Sterilisation auf die Verteilung organischen Materials ausgeschlossen werden, da sich die Gehalte des organischen Kohlenstoffs zwischen sterilen und nicht sterilen Fraktionen nicht wesentlich unterscheiden. Jedoch kann die Struktur des SOM durch die Sterilisationstechnik verändert worden sein, wie es bei der Untersuchung der Gesamtbodenproben bereits erwähnt wurde. Die Erhöhung der pH-Werte in den sterilen Fraktionsproben ist wie in Abschnitt 5.4 beschrieben auf die Sterilisationstechnik zurückzuführen.

Zur enzymatischen Aktivität der Fraktionsproben war festzustellen, dass die extrazelluläre Peroxidase-Aktivität zu beiden Zeitpunkten höher war als die extrazelluläre Phenoloxidase-Aktivität. Dies war auch in den Gesamtbodenproben der Fall. Alle ermittelten enzymatischen Aktivitäten waren im nicht sterilisierten Schluff zu beiden Zeitpunkten größer als im nicht sterilisierten Gesamtboden; die Aktivitäten im nicht sterilisierten Ton waren dagegen leicht geringer als im entsprechenden Gesamtboden (siehe Tabelle 4.8). Analog zur mikrobiellen Aktivität waren auch im Sand die niedrigsten Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen lokalisiert, wohingegen sie aufgrund der offenbar höherer Anzahl an Mikroben im Ton und Schluff höher waren (siehe Abbildung 4.7). Die Anzahl der Mikroorganismen bedingte somit die Anzahl sekretierter Enzyme und somit auch die unterschiedlich hohe enzymatische Aktivität in den nicht sterilen Partikelgrößenfraktionen. Derart unterschiedliche Verteilungen enzymatischer Aktivität in Partikelgrößenfraktionen wurden bereits in einer Vielzahl von publizierten Studien beschrieben (Stemmer et al, 1998). Sie wurden damit erklärt, dass die Menge und Diversität der Mikroorganismen in den verschiedenen Partikelgrößenfraktionen unterschiedlich sind und dort auch unterschiedliche Bedingungen für die Immobilisation ausgeschiedener Enzyme sowie unterschiedliche Substratverfügbarkeit vorherrschen (Caldwell, 2005). Geht man von dieser Korrelation aus, kann geschlussfolgert werden, dass analog zur mikrobiellen Aktivität und dem Gehalt organischen Kohlenstoffs auch vor Partikelgrößenfraktionierung die Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen im Schluff größer waren als im Ton und sie im Sand sehr gering waren. Dennoch wurde ersichtlich, dass die Summe der auf die Masseanteile der Fraktionen umgerechneten Enzymaktivitäten in den nicht sterilen Fraktionen zu beiden Zeitpunkten leicht geringer war, als die insgesamt im nicht sterilen Gesamtboden bestimmten Aktivitäten. Bei den sterilisierten Fraktionen war also analog zur mikrobiellen Aktivität und zum organischen Kohlenstoffgehalt ein Verlust der enzymatischen Aktivität nach der Partikelgrößenfraktionierung feststellbar. Es ist anzunehmen, dass sekretierte und auch immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen dabei aus dem Boden ausgewaschen wurden. Dieser Verlust konnte in den nicht sterilen Proben vermutlich aufgrund der Sekretion neuer Enzyme durch die Mikroben während der Inkubation nahezu wieder ausgeglichen werden. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die

Fraktionsproben vor ihrer Applikation etwa 2 Monate gelagert wurden, und die Sterilisation der Proben Ton_{CHCl₃/HgCl₂} und Schluff_{CHCl₃/HgCl₂} schon vor der Lagerung erfolgte. Durch das Abtöten der Mikroben während der Sterilisation wurde aber eine Produktion neuer Enzyme in den sterilen Proben verhindert und es verblieben vermutlich nur noch immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen. Im Schluff entsprach deren Aktivität etwa den Werten der Enzymaktivitäten in den sterilisierten Gesamtbodenproben (Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}, siehe Tabelle 4.5). Somit waren sie auch größer als die verbliebenen Enzymaktivitäten in den sterilen Tonproben. Es ist daher anzunehmen, dass die Oberflächenbeschaffenheit der Schluffpartikel möglicherweise eine größere Immobilisation von Enzymen begünstigte als dies an Tonpartikeln der Fall war. Dies war vermutlich auf den größeren Gehalt organischer Bodensubstanz im Schluff zurückzuführen. Je mehr organisches Material vorlag, desto mehr immobilisierte Enzyme lagen auch vor. Diese konnten ihre katalytische Aktivität behalten aber auch durch die Immobilisation verlieren, wie es u.a. von George et al. (2005) beschrieben wurde. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlich hohen Enzymaktivitäten in den Partikelgrößenfraktionen kann die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Fraktionen bieten. Deshalb wurde der Ergosterolgehalt der Fraktionen untersucht, um Aufschluss darüber zu erhalten, welche Beitrag Pilze zur mikrobiellen und enzymatischen Aktivität in den Fraktionsproben lieferten. Aufgrund der Ergebnisse nach Bestimmung der Ergosterolmenge in den Fraktionen (siehe Abschnitt 4.5.2.2) waren im nicht sterilen Versuchsboden, insbesondere in der Schlufffraktion, die meisten pilzlichen Organismen lokalisiert. Dort wurde etwa viermal so viel Ergosterol wie im Ton nachgewiesen, obwohl die mikrobielle Aktivität im Schluff nur etwa doppelt so groß war (siehe Tabelle 4.6). Die vermehrte Anwesenheit von Bodenpilzen in den grobkörnigeren Bodenpartikelfraktionen (Sand und Schluff) wurde bereits von Koele et al. (2011) für Podsole und von Sessitsch et al. (2001) für den Versuchsboden aus Ultuna beschrieben und auf dort vorherrschenden Nährstoff- und Wachstumsbedingungen für die Pilze und ihre Myzelien zurückgeführt. Da Pilze auch als die wesentlichen Produzenten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen gelten (Sinsabaugh, 2010), erklären diese Resultate die höheren Enzymaktivitäten in den Schluffproben.

Bezüglich des Verbleibs des Fungizids war festzustellen, dass der überwiegende Teil der Radioaktivität analog zu den Gesamtbodenproben mit Wasser extrahierbar, also bioverfügbar, war. Im Fraktionswasser aller Gesamtbodenproben wurden ≥ 70 % der Radioaktivität im Fraktionswasser quantifiziert (siehe Abbildung 4.9) in den Fraktionsproben mehr als 50 %. So ist anzunehmen, dass in den isolierten Fraktionen größere Mengen Radioaktivität adsorbiert waren und erst mittels Soxhlet-Extraktion extrahierbar wurden. Diese Anteile wurden mit zunehmender Inkubationsdauer kleiner (siehe Abbildung 4.16). Angesichts des höheren Gehalts organischen Kohlenstoffs im Schluff

kann geschlussfolgert werden, dass dort eine größere Adsorption von ^{14}C -Metalaxyl und oder seiner Transformationsprodukte stattfand als im Ton, die erst mittels Soxhlet-Extraktion extrahiert werden konnten, wie es in Abschnitt 5.2 vermutet wurde. Somit steht die Adsorption der Fremdstoffe in engem Zusammenhang mit dem Gehalt organischen Kohlenstoffs der jeweiligen Fraktion. Dies bestätigt Untersuchungen von Fernandes et al. (2003) und Rodriguez-Cruz (2008), die nicht den Tongehalt sondern den Gehalt organischer Bodensubstanz als wesentlich für die Adsorption von Metalaxyl im Boden ansahen.

Angesichts der mikrobiellen Aktivität, die im nicht sterilen isolierten Ton in etwa so groß war wie in einer vergleichbaren Menge Gesamtboden war auch die Mineralisation in diesen Fraktionsproben nur geringfügig höher als in einer gleichen Menge Gesamtboden (siehe Tabelle 4.14). Entsprechend war die Mineralisation im nicht sterilen Schluff etwa doppelt so groß wie im Ton, da dort auch die mikrobielle Aktivität doppelt so hoch war. Die Korrelation der Mineralisation und der mikrobiellen Aktivität konnte also auch in isolierten Fraktionen bestätigt werden. Zudem lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Mikroorganismen, welche das Fungizid und oder seine Transformationsprodukte vollständig zu CO_2 abbauen, nicht in an eine spezielle Art von Partikelgröße assoziiert sind. Da im Schluff vorwiegend Pilze zur mikrobiellen Aktivität beitragen, sind diese vermutlich also nicht für die Mineralisation verantwortlich, da sonst im Schluff eine höhere Mineralisation stattgefunden hätte. Die Mineralisation wird im Boden aus Ultuna vermutlich überwiegend durch Bakterien durchgeführt, welche die Fremdstoffe sowohl im Ton und Schluff cometabolisch abbauen. Die geringe Mineralisation in den nicht sterilen Proben bestätigt zudem erneut den Erfolg der Sterilisation der Fraktionsproben.

Ähnlich wie in den Gesamtbodenproben stieg die Menge der NER im Laufe der Inkubationszeit in den Fraktionsproben an. Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Transformation des Fungizids und den enzymatischen beziehungsweise mikrobiellen Einfluss zurückzuführen (in Abschnitt 5.4 erläutert). Nach Verbrennungsanalyse der Fraktionsproben ließ sich feststellen, dass die Menge nicht extrahierbarer Radioaktivität in allen Proben zu beiden Zeitpunkten zu weniger als 1,6 % im Seesand vorlag. Die restliche nicht extrahierbare Radioaktivität wurde im Schluff und Ton gefunden, vermutlich auf Grund der dort höheren mikrobiellen und enzymatischen Aktivität. Somit bestätigten diese Resultate, dass die NER Bildung des Fungizids ^{14}C -Metalaxyl mit der mikrobiellen Aktivität und den Aktivitäten von exozellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen korreliert. Zusätzlich weisen sie aber auch daraufhin, dass die NER gleichsam mit dem Gehalt organischer Bodensubstanz korrelieren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf dass die NER auf kovalente Einbindung an Huminstoffe durch Phenoloxidasen und Peroxidasen und oder auf Inkorporation in diese zurückzuführen sind. Die geringe NER Bildung im Sand und die nur geringen Enzymaktivitäten in dieser Fraktion, sind nach Literatur dadurch zu erklären, dass

Phenoloxidasen und Peroxidasen nach Immobilisation auf Sandoberflächen meistens ihre katalytische Aktivität verlieren. Dies wurde u.a. von Grandy et al. (2008) beschrieben. Unter der Annahme, dass die auf die NER Bildung Einfluss nehmenden lebenden und toten Bodenbestandteile nicht durch die Partikelgrößenfraktionierung im Boden umverteilt wurden, ist anzunehmen, dass auch die NER selbst durch die Methode nicht im Boden umverteilt wurden. Somit ergaben sich in den Gesamtbodenproben, die vor der Inkubation keiner Partikelgrößenfraktionierung unterlagen, dort die größten NER Mengen, wo auch die darauf Einfluss nehmenden Bestandteile am stärksten vertreten waren.

Da auch die Adsorption von ^{14}C -Metalaxyl und seinen Transformationsprodukten mit dem Gehalt organischer Bodensubstanz in den Fraktionen korrelierte, ist davon auszugehen, dass eine enzymatisch katalysierte Einbindung insbesondere dann stattfand, wenn die darauf Einfluss nehmende Mikroorganismen, extrazellulären Enzyme und Huminstoffe zusammen mit den Fremdstoffen im Boden aufgrund deren Adsorption an Bodenoberflächen lokalisiert waren. Dies entspricht Vermutungen von Senesi (1992) und Gevaio et al. (2000), die NER Bildung als Resultat dieser sich gegenseitig bedingenden Bodenbestandteile ansahen. Nimmt man also eine enzymatisch katalysierte Einbindung an, erscheint es plausibel, dass diese von der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Fremdstoffs an der Matrix abhing und nicht über weite Distanzen im Boden verteilt auftrat. Warum in den Huminsäuren der Gesamtbodenproben nur wenige Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität quantifiziert wurden, wäre dann erklärbar, wenn man annimmt, dass der Fremdstoff oder sein Transformationsprodukt Metalaxylsäure nicht bevorzugt an Huminsäuren adsorbierten. Dies wurde bereits nach Untersuchung der Modellsystemversuche der vorliegenden Arbeit vermutet (siehe Abschnitt 5.1).

Generell liegen bislang keine Forschungsergebnisse zum Stoffschicksal des Fungizids in isolierten Korngrößenfraktionen vor. Die Bilanzierung der Radioaktivität in den Fraktionsproben und daraus getroffene Schlussfolgerungen sind also nicht mit publizierten Daten vergleichbar. Jedoch konnte in begleitenden Experimenten der Forschergruppe die beschriebene Korrelation von Phenoloxidase- und Peroxidaseaktivität und mikrobieller Aktivität mit der NER Bildung auch in isolierten Fraktionen eines anderen Versuchsbodens nach Inkubation mit ^{14}C -Metalaxyl festgestellt werden (Diplomarbeit D.Claßen, RWTH Aachen, 2012). Da im isolierten, sterilisierten Schluff die enzymatische Aktivität so groß war wie in entsprechend sterilisierten Gesamtbodenproben (Ultuna_{CHCl₃/HgCl₂}), wurden in diesen Fraktionsproben auch gleich große NER Mengen gebildet; der sterile Ton wies geringere enzymatische Aktivität als der Schluff und somit auch geringere NER Mengen auf (siehe Tabelle 4.14). In den nicht sterilen Schluffproben war die enzymatische Aktivität größer als im Gesamtboden (Ultuna nativ) und beruhte auch in größerem Anteil auf sekretierten Enzymen, die vermutlich mehrheitlich von Pilzen produziert wurden. Dennoch führte dies

zwar zu einer deutlich höheren NER Bildung als in den sterilen Fraktionsproben, was auf einen bedeutenden Einfluss sekretierter Phenoloxidasen und Peroxidasen hinweist, aber nur zu etwas geringeren NER Mengen im Vergleich zu den nicht sterilen Gesamtbodenproben. Dies ist damit zu erklären, dass in den nicht sterilen Fraktionsproben auch deutlich mehr Mikroorganismen vorlagen als in den Gesamtbodenproben und somit die Prozesse der NER Bildung und die Mineralisation zu $^{14}\text{CO}_2$ stärker miteinander konkurrierten. In Folge dessen wurden mehr Anteile der Radiochemikalie zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert als eingebunden. Dies widerspricht den Vermutungen von Barraclough et al. (2005), die erhöhte NER Mengen von Xenobiotika im Boden mit einer hohen Mineralisation der Xenobiotika in Verbindung brachten. Jedoch wurde der Zusammenhang einer gesteigerten Mineralisation und einer gleichzeitigen gesteigerten NER Bildung auch von dieser Forschergruppe nur vermutet. Nach eingehender Analyse der Daten von publizierten Daten von Barriuso et al. (2008) ist diese Korrelation auch nicht eindeutig zu belegen und wird in der Forschung noch kontrovers diskutiert. Obwohl die Untersuchung der Fraktionsproben erneut Hinweise auf den Einfluss von Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die NER Bildung gibt, insbesondere in sekretierter Form, konnte dieser Prozess noch nicht bewiesen werden. Somit wurde erneut die Verteilung und die Einbindung der nicht extrahierbaren Radioaktivität überprüft. Gleichfalls wurde die extrahierbare Radioaktivität analysiert, um den Abbau des Fungizids in den Fraktionsproben zu untersuchen.

Es konnte in Analogie zu den Gesamtbodenproben Metalaxylsäure auch in den isolierten Fraktionen ohne Einfluss von intakten Mikroorganismen gebildet werden (siehe Tabelle 4.15). Dies ist auf abiotische Parameter zurückzuführen (in Abschnitt 5.4 erläutert). Da jedoch der Anteil adsorbierter Radioaktivität in den Fraktionsproben nach 10 Tagen Inkubation höher war als nach 92 Tagen und in den Soxhlet-Extrakten weniger beziehungsweise keine Metalaxylsäure vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass Metalaxyl stärker an die organische Bodensubstanz adsorbiert als Metalaxylsäure die im Verlauf der Inkubation zunehmend gebildet wird. Es ist ersichtlich, dass nur in Proben mit höherer mikrobieller Aktivität (Schluff nativ) ein zweiter Metabolit des Fungizids gebildet wurde. Der Metabolit wurde im Verlauf dieser Studie und in begleitenden Studien (Diplomarbeit T. Zegarski, RWTH Aachen, 2013) durch HPLC aufgereinigt und anschließend mit LC-MS/MS Analyse als N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamid (CGA 67868, Abbildung 5.3) identifiziert (siehe Anhang der vorliegenden Arbeit, Abbildung A4). Diese Substanz wurde bereits als Transformationsprodukt des Fungizids von Pesaro (2004) beschrieben, der gleichfalls feststellte, dass Metalaxylsäure im Boden zwar abiotisch gebildet wird aber der folgende Abbau des Propionmethoxylsäureesters hin zur Bildung von N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamide nur biotisch aus der Metalaxylsäure erfolgt. Da in der vorliegenden Studie der zweite Metabolit in den Proben mit der höchsten mikrobiellen

Aktivität (Fraktionsprobe Schluff nativ) nur in niedriger Menge gebildet wurde, ist dies ein auch weiterer Beleg für die schwere Abbaubarkeit von Metalaxylsäure. Da im Schluff die Mineralisation nach 92 Tagen jedoch mehr als 9 % betrug kann davon ausgegangen werden, dass der komplette Abbau des Fremdstoffs nach der Bildung von N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamid beschleunigt wird und die Bildung des zweiten Metaboliten den geschwindigkeitsbestimmenden Schritts des Abbau darstellen könnte.

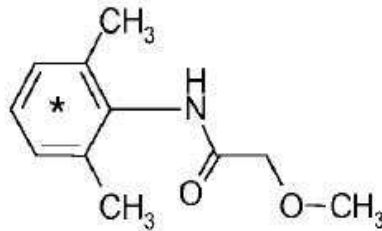


Abb. 5.3: Strukturformel des Metalaxyl-Metaboliten N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamid (*= radioaktive Markierung in der Ringstruktur ausgehend von ^{14}C -Metalaxyl).

Analog zur Untersuchung der NER in Huminstoff-Fraktionen der Gesamtbodenproben kann auch in den Fraktionsproben davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen die Radioaktivität insbesondere in die Humine einbinden (siehe Abbildung 4.18). Diese mikrobiell katalysierte Einbindung ist angesichts der größeren mikrobiellen Aktivität in den Fraktionsproben bereits nach 10 Tagen Inkubation festzustellen und intensiviert sich im Lauf der Inkubationszeit und führt schließlich zu höheren NER Mengen in den Huminen der Fraktionsproben als in denen der Gesamtbodenproben. Zusätzlich war auch die Mineralisation in den Fraktionsproben insbesondere in den Schluffproben höher als in den Gesamtbodenproben. Somit kann erneut davon ausgegangen werden, dass die Anteile biogener Rückstände größer waren und diese als Endprodukte mikrobiellen Stoffwechsels vermutlich hauptsächlich in den Huminen vorlagen. Des Weiteren ist es vorstellbar, dass nach vollständigem Abbau der Ringsubstituenten des Phenylamidfungizids eine Anilingruppe am Ring verblieb und diese eine kovalente Einbindung begünstigte, wie es in Studien von Bollag et al. (1992) für andere Xenobiotika mit ähnlicher Teilstruktur bereits vermutet wurde. Eine verstärkte kovalente Einbindung aufgrund einer Anilingruppe im Fremdstoff wurde auch beispielsweise in *in vitro* Experimenten sowohl mit Sulfonamiden als auch einfachen Anilinen und Huminstoffen von Bollag et al. (1983) und Bialk et al. (2005) festgestellt. Würde also ein derartiger Metabolit aus Metalaxyl entstehen und dieser verstärkt kovalent gebunden werden, würde er auch dem weiteren Abbau entzogen. Dies verdeutlicht, dass Mineralisation und der kovalente Einbau sich einerseits bedingen können, aber auch als ebenfalls miteinander konkurrierende Reaktionswege verstanden werden können. Die immobilisierten Enzyme katalysieren in den Fraktionsproben hingegen vermutlich, wie

bereits für die Gesamtbodenproben beschrieben, insbesondere die Einbindung an Nicht-Humine und Fulvinsäuren. Nicht auszuschließen ist, dass die NER in den Huminstoff-Fractionen auch auf die frühere Lokalisation der Fremdstoffe in der Suprastruktur der Huminstoffe zurückzuführen sein können (in Abschnitt 5.4 erläutert).

Die Ergebnisse der alkalischen Hydrolyse der Huminstoff-Fractionen der Fraktionsproben bestätigen die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Gesamtbodenproben. Somit wurde die Radioaktivität vermutlich durch immobilisierte Enzyme teilweise in Form von Esterbindungen eingebunden. Die Anwesenheit vitaler Mikroorganismen verstärkte diesen Prozess und führte gleichzeitig zu einer stärkeren Einbindung in Form von C-C Bindungen oder Etherbindungen oder Inkorporation in die Humine (siehe Tabelle 4.16). Es muss hierbei erneut hervorgehoben werden, dass die NER Bildung insbesondere dann verstärkt auftritt wenn die darauf Einfluss nehmenden Faktoren zusammen im Bodensystem lokalisiert sind. Somit kann auch vermutet werden, dass eine unterschiedlich starke Adsorption der Fremdstoffe an die unterschiedlichen Inhaltstoffe der Huminstoff-Fractionen im Boden während der Inkubation, die NER Bildung begünstigt und somit die Unterschiede in ihrer Verteilung bewirkt hat.

Jedoch kann auch analog zur Degradation der Huminstoffe aus den Gesamtbodenproben nicht festgestellt werden, in welchem Anteil die freigesetzte Radioaktivität aus den NER vor der Degradation kovalent gebunden oder in die Huminstoffe inkorporiert war. Eine Inkorporation ist, wie in Abschnitt 5.4 beschrieben, sowohl in den Suprastrukturen der Huminstoffe als auch in komplexere, polymere Inhaltstoffe der huminen Substanzen möglich. Nach DC-Analyse konnte in den Extrakten der Proben gleichfalls nur Metaloxylsäure identifiziert werden (siehe Abschnitt 4.6.2.4). Jedoch waren die Startaktivitäten ($R_f = 0,00$) in der DC-Analyse der Extrakte aus nicht sterilen Fraktionsproben noch größer (etwa 30 %) als dies in den nicht sterilen Gesamtbodenproben nach alkalischer Hydrolyse der Fall war (etwa 20 %, siehe Abschnitt 4.6.1.4). Somit führte die erhöhte mikrobielle und somit enzymatische Aktivität auch vermutlich zu einer größeren Menge von radioaktiv markiertem Fremdstoff, der mit verschiedenen großen organischen Resten aus den Huminstoffen substituiert war, was wiederum für eine enzymatische Einbindung spricht. Um den Einfluss der Phenoloxidasen auf die NER Bildung weiterhin zu erhärten, wurde sterilen Gesamtbodenproben direkt immobilisierte Laccase zugesetzt, um den Einfluss dieses Vertreters aus der Familie der Phenoloxidasen auf die NER Bildung selektiv zu untersuchen (Boden mit Enzymzugabe).

Fazit

Nach Untersuchung der Fraktionsproben war festzustellen, dass die Methode der Partikelgrößenfraktionierung sowohl Verluste an mikrobieller, extrazellulärer Enzymaktivität als auch an organischer Bodensubstanz bewirkte. Dennoch waren diese Verluste nie größer als 30 % und die Verteilung der organischen Bodensubstanz, mit der die mikrobielle und enzymatische Aktivität korrelierte, entsprach publizierten Literaturdaten. Es konnte festgestellt werden, dass im Schluff mehr mikrobielle Aktivität, mehrheitlich Pilze, organischer Kohlenstoffgehalt und enzymatische Aktivität vorlagen als im Ton. Im Sand waren diese Charakteristika am geringsten vorhanden. Es konnte die Korrelation der NER Bildung mit mikrobieller Aktivität, der Aktivitäten exozellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen erneut bestätigt werden und zusätzlich um das Charakteristikum des Gehalts organischer Bodensubstanz erweitert werden. Dies legte erneut eine kovalente Einbindung des Fungizids oder seiner Transformationsprodukte in die Huminstoffe aufgrund oxidativer Kopplung unter enzymatischem Einfluss nahe. Dementsprechend entsprach die Verteilung der NER generell der der Gesamtbodenproben. Nach alkalischer Hydrolyse konnte erneut nur Metalaxylsäure freigesetzt werden. Es ist erneut gezeigt worden, dass die NER aus inkorporierter und kovalent gebundener Ausgangssubstanz und dem primären Transformationsprodukt Metalaxylsäure bestehen. Bei Analyse der extrahierbaren Radioaktivität zeigte sich, dass neben Metalaxylsäure, die ebenso wie Metalaxyl selbst nur gering mit Bodenoberflächen interagiert, auch ein weiterer Metabolit gebildet wurde. Dies geschah jedoch nur in Anwesenheit vitaler Mikroben. Der Metabolit N-(2,6-dimethylphenyl)-2-methoxyl-acetamid, der mit LC-MS/MS identifiziert werden konnte, ist womöglich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Abbauprozess von Metalaxyl. In den Proben, in denen der Metabolit gebunden wurde, stieg die Mineralisation und auch der NER Anteil an. Es ist erneut hervorzuheben, dass auch andere Enzyme als Phenoloxidasen und Peroxidasen nach Sterilisation katalytisch aktiv verblieben sein könnten und ebenfalls einen Einfluss auf das Stoffschicksal von ^{14}C -Metalaxyl ausübten.

5.6 Boden mit/ohne Enzymzugabe im stationären System

Auch in den Ansätzen mit und ohne Enzymzugabe kann von einer erfolgreichen Sterilisation mittels γ -Bestrahlung nach den Messergebnissen der DMSO-Reduktion ausgegangen werden. Der sterile Bodenzustand konnte für die Inkubationszeit dieser Proben (10 Tage) aufrecht erhalten werden und wurde offensichtlich nicht durch die Zugabe von Alginat beeinträchtigt (siehe Tabelle 4.9). Die DMSO-Reduktion erfolgte hier analog zu den sterilen Ansätzen der Gesamtbodenproben und Fraktionsproben vermutlich durch abiotische Reaktionen oder eine geringe Anzahl überlebender Mikroben.

Da die Aktivität der Peroxidasen sowohl im Gesamtboden als auch in isolierten Fraktionen größer war als die der Phenoloxidasen (siehe Abschnitt 4.5.1.3, 4.5.2.3), sollte im Vorfeld der Inkubation von Boden mit Enzymzugabe auch Lignin-Peroxidase auf Alginat immobilisiert und dem Boden zugesetzt werden, um ihren Einfluss zu untersuchen. Lignin-Peroxidase konnte jedoch nicht erfolgreich auf Alginat immobilisiert werden und somit wurde nur der Einfluss der Laccase untersucht. Es kann geschlussfolgert werden, dass die immobilisierte Laccase auch nach 10 Tagen Inkubation noch katalytisch aktiv war. Laccase löste sich vermutlich nicht wesentlich vom Alginat ab und diffundierte anschließend in den Boden außerhalb des Polyamidbeutels, so dass dort keine erhöhte Phenoloxidaseaktivität gemessen wurde (siehe Tabelle 4.10). Da die Alginatkugeln in einer Enzymlösung ausgehärtet wurden deren Aktivität etwa 100 Units betrug (in Abschnitt 3.4 erläutert) muss aber geschlussfolgert werden, dass entweder die Laccase nicht komplett auf das Alginat immobilisiert werden konnte, oder ein wesentlicher Anteil im Boden während der Inkubation denaturierte. Dennoch war die verbliebende Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen im Polyamidbeutel etwa 10 mal so hoch wie in einer vergleichbar großen Menge Gesamtboden während die Aktivität außerhalb des Beutels in etwa gleich groß war wie im γ -bestrahlten Gesamtboden (Ultuna γ -bestrahlt, siehe Tabelle 4.5). Somit konnte erfolgreich ein System mit erhöhter immobilisierter Phenoloxidaseaktivität zur Inkubation mit ^{14}C -Metalaxyl etabliert werden.

Der größte Anteil der Radioaktivität war analog zu den anderen Inkubationsansätzen der vorliegenden Studie mit Wasser extrahierbar und somit wohl auch bioverfügbar. Entscheidend war aber, dass die NER Bildung durch die Zugabe immobilisierter Laccase signifikant erhöht werden konnte. Dies erbrachte einen direkten ersten Beweis des enzymatischen Einflusses auf die enzymtisch katalysierte Einbindung des Fremdstoffs oder seiner Transformationsprodukte im komplexen Bodensystem und erklärt auch den größeren Anteil Partikel-gebundener Radioaktivität im Fraktionswasser. Jedoch wurde ersichtlich, dass trotz einer zehnfach höheren Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen im Boden mit Enzymzugabe im Vergleich zu den Gesamtbodenproben (Ultuna nativ nach 10 Tagen) und einer vierfach größeren Aktivität im Vergleich zu den Fraktionsproben (Schluff nativ), die NER Menge nur 6,3 % betrug (siehe Tabelle 4.17). Im Vergleich zu den sterilen Ansätzen war sie so zwar signifikant erhöht, wurde aber nicht in deutlicherem Ausmaß gesteigert. Da sich das Substratspektrum der verwendeten Laccase nicht stark von dem anderer Phenoloxidasen im Boden unterschied, können so zwei Schlussfolgerungen getroffen werden: Erstens tragen Phenoloxidasen im Gesamtboden zwar zur NER Bildung bei, aber der Einfluss von Peroxidasen auf diesen Prozess ist vermutlich größer. Dies kann mit den größeren Redoxpotentialen der Peroxidasen erklärt werden, die eine Aufspaltung organischen Bodenmaterials während der Humifizierung und somit die maßgebliche Radikalinduktion für eine oxidative Kopplung auch ohne Anwesenheit von Mediatoren katalysieren können (siehe

Abschnitt 1.5). Zudem waren die Aktivitäten extrazellulärer Peroxidasen in den Gesamtbodenproben und Fraktionsproben größer als die der Phenoloxidasen und leisteten somit vermutlich einen größeren Beitrag zur NER Bildung. Zweitens können die Phenoloxidasen die NER Bildung in immobilisierter Form nicht so stark beeinflussen wie in sekretierter Form. Dies entspräche der Vermutung, dass sekretierte Enzyme einen größeren Einfluss auf die NER Bildung ausüben als immobilisierte (siehe Abschnitt 5.4, 5.5). Womöglich ist die Wahrscheinlichkeit der Interaktion mit organischem Bodenmaterial nicht immobilisierter Enzyme aufgrund ihrer Diffusion in der Bodenlösung größer als die immobilisierter Enzyme. Bei der Untersuchung der Proben der Ansätze mit Enzymzugabe ist möglicherweise zusätzlich zu berücksichtigen, dass das Alginat im Boden einen Einfluss auf die Adsorption und somit Mobilität von ^{14}C -Metalaxyl haben könnte und folglich die Einbindung des Fremdstoffes beeinflusste. Dies ist jedoch nach den vorliegenden Daten auszuschließen, da in den Kontrollansätzen (Boden ohne Enzymzugabe) nicht mehr NER gebildet wurden als dies in Gesamtbodenproben ohne Alginat nach 10 Tagen beobachtet wurde (Proben: Ultuna γ -bestrahlt, siehe Tabelle 4.11).

Die Immobilisation von Oxidoreduktasen, welche Fremdstoffe transformieren und somit ihren Abbau im Boden beschleunigen können, wurde in zahlreichen publizierten Studien untersucht und von Gianfreda und Rao (2004) sowie Rao et al. (2010) als Bioremediationstechnik von Schadstoff belasteten Böden zusammenfassend beschrieben. Aufgrund der Ergebnisse kann aber geschlossen werden, dass die durch Zugabe von immobilisierter Laccase deutlich erhöhte Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen keinen Einfluss auf die Transformation des Fungizids im Boden hatte. Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* Experimente (Inkubation von ^{14}C -Metalaxyl mit Phenoloxidase beziehungsweise Peroxidase ohne organische Bodensubstanz), da auch in diesen Proben keine enzymatische Transformation des Fungizids festgestellt werden konnte (siehe Abschnitt 5.1). Der Abbau des Fremdstoffs erfolgt also vielmehr als ein zeitabhängiger Prozess durch andere biotische und auch abiotische Einflüsse wie es in Abschnitt 5.4 und 5.5 erläutert ist. Ebenso kann aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen werden, dass das Alginat an sich einen Einfluss auf die Transformation von ^{14}C -Metalaxyl ausübte, da in den Proben ohne Enzymzugabe nicht mehr Metalaxylsäure gebildet wurde als in einem gleichsam sterilisierten Boden ohne Alginat.

Es ist ersichtlich, dass der Boden ohne Laccasezugabe eine vergleichbare NER Verteilung aufwies (Abbildung 4.19) wie der γ -bestrahlte Gesamtboden nach 92 Tagen Inkubation (Ultuna γ -bestrahlt, siehe Abbildung 4.14). Die immobilisierte Laccase hat jedoch eine Einbindung von ^{14}C -Metalaxyl und möglichen Transformationsprodukten in die Huminsäuren verstärkt. Dies war weder bei den Gesamtbodenproben, noch bei den Fraktionsproben und auch nicht bei den Proben ohne Enzymzugabe festzustellen. Dies

bestätigt die Annahme, dass eine mögliche kovalente Einbindung des Fungizids oder seiner Transformationsprodukte von deren Struktur sowie der Struktur der jeweiligen Huminstoffe und den jeweiligen auf die Einbindung Einfluss nehmenden Faktoren abhängig ist. Demzufolge würde insbesondere die immobilisierte Laccase aus *Trametes versicolor* eine Einbindung in Huminsäuren katalysieren, wie es im Modellsystem ebenfalls gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 5.1). Ein Einfluss des Alginats als Matrixbestandteil in den untersuchten Proben ist auszuschließen, da die Verteilung der NER in den Kontrollproben ohne Enzymzugabe sehr ähnlich zu der in den Proben Ultuna_γ-bestrahlt war, in denen kein Alginat vorlag. Eine kovalente Einbindung von Sulfonamiden in Huminsäuren durch Laccase konnte von Gulkowska et al. (2013) nachgewiesen werden. Dieser Forschergruppe zufolge katalysiert die Laccase unreaktive Hydrochinone in den Huminsäuren zu reaktiven, elektrophilen Chinonen, an die der Fremdstoff durch nukleophile Addition bindet. Dies ist auch bei der Inkubation des Versuchsbodens und ¹⁴C-Metalaxyl und immobilisierter Laccase in den Experimenten der vorliegenden Studie vorstellbar und wurde auch bei Untersuchung der Modellsysteme (siehe Abschnitt 5.1) diskutiert.

Jedoch ist ersichtlich, dass Laccase in immobilisierter Form nicht hauptverantwortlich für die NER Einbindung im Versuchsboden aus Ultuna sein kann, da sich auch sonst auch in den Huminsäuren der Proben Ultuna_γ-bestrahlt deutlich mehr NER befunden hätten. Zugleich wird deutlich, dass die Einbindung in die Humine nur dann verstärkt auftrat wenn Mikroorganismen anwesend waren und dieser Prozess durch immobilisierte Laccase nicht katalysiert werden konnte. Die Untersuchung der Fraktionsproben und Gesamtbodenproben zeigte, dass immobilisierte Enzyme insbesondere einen Einbau der Radiochemikalie in die Nicht-Humine und Fulvinsäuren bewirkten. Dieser Prozess wurde aber trotz verstärkter Aktivität immobilisierter Laccase nicht gesteigert und basiert vermutlich mehr auf der Aktivität immobilisierter Peroxidasen.

Die Ergebnisse der alkalischen Hydrolyse der Ansätze mit Enzymzugabe lassen darauf schließen, dass die auf Alginat immobilisierte Laccase vermutlich C-C Bindungen zwischen den Huminsäuren und dem Fungizid katalysiert, die nicht durch eine alkalische Hydrolyse gebrochen werden können. Somit wurde auch weniger Radioaktivität aus den NER der Huminsäuren freigesetzt als aus den anderen Huminstoff-Fraktionen aus Ton und Schluff der Proben mit Enzymzugabe. Da jedoch auch in diesen Proben nur Metalaxylsäure nach Analyse der Extrakte der alkalischen Hydrolyse detektiert wurde, ist es analog zu den Fraktionsproben und Gesamtbodenproben unwahrscheinlich, dass die NER gänzlich kovalent gebunden waren. Jedoch unterstützt die Analyse der Proben mit Enzymzugabe die Vermutung, dass ein enzymatischer Einfluss die Startaktivität der Proben in der DC-Analyse erhöhte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Radioaktivität, die bei Analyse am

Auftragungspunkt verblieb, vermutlich darauf beruhte, dass die Fungizidstruktur an verschiedene organische Reste aus den Huminsäuren gebunden war.

Fazit

Es konnte erfolgreich ein System zur Inkubation von ¹⁴C-Metalaxyl im Boden mit erhöhter Aktivität immobilisierter Phenoloxidaseaktivität etabliert werden. Sie war 10-fach höher als in einem gleichartig sterilisierten Gesamtboden. Hierzu diente eine Immobilisierung von Laccase auf Alginat, die nach 10 Tagen noch katalytisch aktiv war. Dies bewirkte eine signifikante Erhöhung der NER Menge in Anwesenheit der Laccase wohingegen im Vergleichsboden die NER und die Phenoloxidaseaktivitäten im selben Größenbereich lagen wie in einem entsprechend sterilisierten Gesamtboden. Dies erbrachte einen ersten direkten Beweis auf eine enzymatisch katalysierte NER Bildung im komplexen Bodensystem, die nach Untersuchung der Gesamtbodenproben und Fraktionsproben bislang nur vermutet werden konnte. Das Alginat selbst bewirkte aber keine Erhöhung der NER oder eine andere Verteilung der NER in den Huminstoff-Fraktionen von Ton und Schluff des Bodens mit Enzymzugabe. Im Gegensatz zu den Gesamtbodenproben und Fraktionsproben katalysierte die immobilisierte Laccase vermutlich eine kovalente Einbindung des Fungizids und oder der Metalaxylsäure in Form von C-C Bindungen an die Huminsäuren. Somit nehmen im Gesamtboden aus Ultuna vermutlich die Peroxidasen eine bedeutendere Rolle beim kovalenten Einbau der Fremdstoffe in die Huminstoffe ein als die Phenoloxidasen. Eine C-C Bindung zwischen Huminstoff und Fremdstoff, die von vitalen Mikroben in Gesamtbodenproben und Fraktionsproben in den Huminen anzunehmen ist, konnte nicht durch eine erhöhte Aktivität immobilisierter Laccase reproduziert werden. Analog zu Gesamtbodenproben und Fraktionsproben kann ein Einfluss anderer Enzyme, welche die Sterilisation intakt überstanden, nicht ausgeschlossen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Stoffschicksal und die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände des Fungizids ¹⁴C-Metalaxyl wurde in der vorliegenden Studie anhand von *in vitro* Studien in Modellsystemen und Inkubationsansätzen mit sterilem und nicht sterilem Versuchsboden aus Ultuna (nahe Uppsala, Schweden) in stationären Systemen untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei darauf den Einfluss extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen auf die NER Bildung aufzuklären. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente lassen eine kovalente Einbindung des Fungizids an Vertreter des organischen Bodenmaterials wie Resorcinol sowie auch an direkt aus dem Versuchsboden isolierten Huminstoff-Fractionen vermuten. Diese wird durch Phenoloxidasen, repräsentiert durch Laccase aus *Trametes versicolor*, sowie Peroxidasen, repräsentiert durch Lignin-Peroxidase, bewirkt. Diese Enzyme katalysieren oxidative Kopplungsreaktionen des organischen Bodenmaterials und somit nach derzeitigen Modellen auch die Einbindung des Fremdstoffs durch Co-Polymerisation in einem radikalischen Prozess.

Unter Zuhilfenahme effizienter Sterilisationstechniken konnten somit erfolgreich Bodenproben (Gesamtboden sowie isolierte Fraktionen) für die Inkubation mit ¹⁴C-Metalaxyl für 10 beziehungsweise 92 Tage eingesetzt werden in denen folgende Charakteristika gegeben waren:

- (a) Proben mit mikrobieller Aktivität und sämtlichen Formen oxidativer Aktivität (sekretierte Phenoloxidasen und Peroxidasen, immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen sowie abiotische Faktoren).
- (b) Proben ohne vitale Mikroorganismen aber katalytisch aktiven, immobilisierten Phenoloxidasen Peroxidasen.
- (c) Probe ohne enzymatische Aktivität aber verbliebenen abiotischen Einflussfaktoren.

Anhand dieser Proben konnte zwischen den unterschiedlichen Quellen oxidativer Aktivität unterschieden werden. Ihr Beitrag und Einfluss auf den Verbleib und das Schicksal des Fungizids im Boden konnte erfolgreich untersucht werden. Es konnte eine erschöpfende Extraktionsmethode unter Nutzung des Verfahrens zum Partikelgrößenauflusses von Bodenproben etabliert werden, nach deren Anwendung nur noch kovalent gebundene oder tief in die Bodenmatrix inkorporierte Anteile der Radiochemikalie verblieben. Generell war der Großteil der applizierten Radioaktivität (mehr als 70 %) extrahierbar, da Metalaxyl und das gebildete erste Transformationsprodukt Metalaxylsäure in der wässrigen Bodenphase hoch mobil sind und wenig mit den Bodenoberflächen interagieren. Beide Substanzen waren nur schwer mikrobiell abbaubar und die Mineralisation der Ansätze somit gering. In nicht

sterilen Gesamtbodenproben betrug sie nach 92 Tagen nur etwa 4,7 %. Die Anteile nicht extrahierbarer Radioaktivität korrelierten mit der mikrobiellen Aktivität, dem Gehalt organischen Bodenmaterials und der Aktivität extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen im Boden. Somit verblieben nach 92 Tagen in den Gesamtbodenproben des Typs (a) etwa 24, 6, in den Proben des Typs (b) zwischen 5 und 9 % und in den Proben des Typs (c) etwa 3 % der applizierten Radioaktivität nach erschöpfender Extraktion. Diese NER basierten in Teilen auf Metalaxyl und Metalaxylsäure (inkorporiert und kovalent gebunden) und nur zu geringem Anteil biogene Rückstände dar und besitzen ein hohes (Inkorporation) beziehungsweise geringeres (kovalente Bindung) Umweltrisiko. Es ist analog zu den *in vitro* Experimenten anzunehmen, dass ein Anteil der Radiochemikalie und des ersten Transformationsproduktes kovalent aufgrund von enzymatisch-katalysierter, oxidativer Kopplung an organische Bodenbestandteile gebunden wurde. Hierbei basiert die Einbindungsform und Lokalisation der NER in den Huminstoffen auf der Struktur von Metalaxyl und Metalaxylsäure, der Quelle enzymatischer Aktivität und auch der Adsorption der Fremdstoffe im komplexen Bodensystem. Hierbei üben insbesondere sekretierte Peroxidasen einen entscheidenden Einfluss aus aber auch immobilisierte Phenoloxidasen und Peroxidasen waren ebenfalls an der NER Bildung beteiligt. Der abiotische Einfluss auf die NER Bildung ist vergleichsweise gering und die nicht extrahierbare Radioaktivität in den Proben des Typs (c) basiert vermutlich auf dem Einschluss des Fungizids in Bodenfeinporen.

Nach Inkubation isolierter Ton- und Schluff-Fraktion des Versuchsbodens konnten diese Vermutung bestätigt werden. Obwohl die Partikelgrößenfraktionierung Verluste an mikrobieller Aktivität und organischem Material sowie enzymatischer Aktivität zur Folge hatte, war die enge Korrelation der NER Bildung mit diesen Faktoren weiterhin zu beobachten. Aufgrund einer erhöhten mikrobiellen Aktivität konnte die Bildung eines zweiten Metaboliten im Boden nachgewiesen werden. Erneut zeigte sich, dass eine enzymatisch-katalysierte Einbindung der Radioaktivität insbesondere dann stattfand, wenn alle darauf Einfluss nehmenden Faktoren gemeinsam im Bodensystem vorhanden waren. Der enzymatische Einfluss auf die NER Bildung konnte schlussendlich in stationären Systemen mit sterilem Boden nach Zugabe einer auf Alginat immobilisierten Laccase bewiesen werden. In den Proben mit Laccase verblieben nach Tagen Inkubation etwa 6,3 % der applizierten Radioaktivität nicht extrahierbar, wohingegen im Boden ohne Laccase nur zwischen 3 bis 4 % der applizierten Radioaktivität nach erschöpfender Extraktion verblieb. Es ist aufgrund der sich ergebenden Verteilung der NER in den Huminstoff-Fractionen dieser Proben und ihrer Gesamtmenge anzunehmen, dass immobilisierte Laccase im natürlichen Versuchsboden nur in geringem Maß zur NER Bildung beiträgt und dieser Prozess vornehmlich von sekretierten Peroxidasen katalysiert wird. Insbesondere

Pilzorganismen könnten einen wesentlichen Einfluss als Produzenten der Peroxidasen ausüben.

Vergleichbare Inkubationsexperimente zu denen in der vorliegenden Studie sollten mit anderen Radiochemikalien durchgeführt werden, um den enzymatischen vermittelte NER Bildung weiter zu untersuchen. Der Einsatz anderer Xenobiotika könnte insbesondere den Einfluss der Struktur des Fremdstoffs auf diesen Prozess weitergehend aufklären. In diesen Experimenten sollten zusätzlich auch andere Enzymaktivitäten gemessen werden, wie beispielsweise die der Esterasen und Hydrolasen, um deren Einfluss bemessen zu können. Die Verteilung der NER könnte mit Hilfe einer Methylisobutylketon-Fraktionierung der Huminstoffe inklusive NER noch näher untersucht werden. Des Weiteren wäre eine Trimethylsilylierung der Huminstoffe nützlich, um exakt den Anteil inkorporierter und dem enzymatisch eingebundener, also kovalent gebundener, NER zu bestimmen. Die Form kovalenter Einbindung könnte möglicherweise insbesondere mit NMR Analysen schlussendlich verifiziert und untersucht werden. Es wäre auch möglich, eine Größenaufschlusschromatographie der Huminstoffe durchzuführen und somit die Inkorporation und Einbindung der NER näher zu untersuchen. Da die in der vorliegenden Studie verwendeten Sterilisationstechniken das organische Material und somit auch die Matrix der Einbindung verändert haben könnten, ist es wichtig, den Einfluss der jeweiligen Sterilisation exakt zu ermitteln, um sie in analogen Experimenten erneut einzusetzen. Des Weiteren ist es sinnvoll, eine Methode zur erfolgreichen Immobilisierung der Peroxidasen auf eine Alginatmatrix zu etablieren, um diese analog zur Laccase in der vorliegenden Studie in den Boden einzubringen und ihren Einfluss zu untersuchen. Schlussendlich sollten analoge Studien mit anderen Versuchsböden mit unterschiedlichen Charakteristika durchgeführt werden, um den bedeutsamen enzymatischen Einfluss auf die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände im Boden weiter zu untersuchen. Diese Untersuchungen könnten schlussendlich eine Wissensbasis für einen nachhaltigeren Einsatz von Pestiziden in der Zukunft und einen stärkeren Umweltschutz bilden und diesen ermöglichen.

6 Summary and Outlook

The fate and the formation of non-extractable residues of the fungicide ^{14}C -metalaxyl has been observed in *in vitro* experiments as well as in incubation experiments using non-sterile and sterile soil from Ultuna (Uppsala, Sweden). The main focus of the present study laid on the influence of extracellular phenoloxidases and peroxidases on the NER formation. The results from the *in vitro* experiments leads to the assumption that a covalent linkage between the fungicide and representatives of the humic substances like resorcinol as well as humic matter fractions which were directly isolated from the soil before incubation is likely. These linkages have been catalyzed by phenoloxidases, represented by laccase from *Trametes versicolor*, and peroxidases, represented by lignin-peroxidase. Based on actual conceptions, these enzymes catalyze oxidative coupling reactions of the soil organic matter. Additionally, they drive the incorporation of the xenobiotic substance by co-polymerisation in a radical mediated process.

The use of efficient sterilization techniques allowed the establishment of soil samples for the incubation with ^{14}C -metalaxyl including the following characteristics:

- (a) samples with microbial activity and all forms of oxidative activities (secreted phenoloxidases and peroxidases, immobilized phenoloxidases and peroxidases as well as abiotic factors).
- (b) samples without living microbes but immobilized phenoloxidases and peroxidases with remaining catalytic activity.
- (c) samples without enzymatic activities but remaining abiotic influencing factors.

The use of these samples enabled the possibility to differentiate between the different sources of oxidative activity. Their amount and influence on the destination and fate of the fungicide in soil has been studied successfully. An exhaustive soil extraction technique has been established by use of the particle size fractionation procedure. Only covalently bound or deeply incorporated amounts of the radio-labeled substance remained in soil as residues after usage of this technique. In all samples, the major part of the applied radioactivity remained extractable (> 70 %) because metalaxyl and its first major transformation product metalaxyl acid were highly mobile within the soil water phase and did not interact with the surfaces in soil very much. The microbial decomposition of both substances was very low and therefore only a low mineralization has been detected in the samples (~ 4,7 % within non-sterile soil after 92 days of incubation). The amounts of non-extractable radioactivity correlated with the microbial activity, the organic matter content and the activities of extracellular phenoloxidases and peroxidases in the soil. Therefore about 24,6 % of the

applied radioactivity remained unextractable in type (a) bulk soil samples, between 5 and 9% remained in type (b) bulk soil samples and about 3 % remained in type (c) bulk soil samples after 92 days of incubation and exhaustive extraction. These NER consist partly of metalaxyl and metalaxyl acid and were therefore incorporated and covalently bound xenobiotic substances. Only minor amounts of the NER can be biogenic residues. These xenobiotic NER have a high environmental risk (incorporated NER) or rather a low environmental risk (covalently bound NER). Analogous to the *in vitro* experiments, it can be assumed that a portion of the applied radio-labeled fungicide and its first transformation product were covalently bound to the soil organic matter as a consequence of enzymatically mediated oxidative coupling. The form of linkage and localization of the NER within the humic substances based on the structures of metalaxyl and metalaxyl acid, on the source of enzyme activity and on the adsorption of the xenobiotics in the complex soil system. Especially the secreted peroxidases play a major role in the NER formation but immobilized phenoloxidases and peroxidases were involved in NER formation as well. The abiotic influence on the NER formation on the other hand is negligible and the non-extractable radioactivity in the type (c) samples based mainly on the inclusion of the fungicide in fine pores.

After incubation of clay and silt fractions which have been isolated from the soil, it was possible to confirm these suggestions. Although the particle size fractionation procedure led to losses of microbial activity, organic soil material and enzymatic activities, the described close correlation of NER formation and these factors was verified. Because of a higher microbial activity it was possible to identify a second metabolite of metalaxyl in soil. Again the enzymatically mediated incorporation of radioactivity took place if factors influencing this process are located together in the soil. The enzymatic influence was finally proofed in incubation systems including sterile soil, and laccase that has been immobilized on alginate. In these samples about 6,3 % of the applied radioactivity remained unextractable after exhaustive extraction compared to soil without immobilized laccase (3 – 4 %). Because of the distribution of the NER within the humic matter fractions and their total amount it becomes obvious that immobilized laccase plays a minor role in enzymatically mediated NER formation within the soil and that this process is mainly mediated by secreted peroxidases. Especially fungi as producers of the peroxidases may play a major role in NER formation.

Similar incubation experiments as the ones presented here should be performed with other radio-labeled xenobiotic substances to study the enzymatically mediated NER formation. Especially, the structure of the xenobiotic molecule and how it influences this process could be further investigated. In these experiments also other enzyme activities should be measured like esterases and hydrolases to study their influence too. The distribution of the

NER in the humic matter could be observed in more detail by use of the methylisobutylketone fractionation procedure. Additionally, a trimethylilylation of the humic substances could be useful to quantify the exact amounts of incorporated and enzymatically incorporated - covalently bound - NER. The kind of covalent linkage may possibly be determined and finally proofed by use of NMR techniques of samples obtained from alkaline degradation procedures. Additionally, it could be possible to perform a size exclusion chromatography of the humic substances including NER and thus study their incorporation and linkage to the humic substances. The sterilization techniques used within the present study might have induced changes in the soil organic matter structure and therefore altered their role as matrix for NER formation. Therefore it is important to study the influence of each sterilization technique in more detail before the performance of analogous experiments. To investigate the influence of immobilized peroxidases on NER formation it would be wise to establish a technique to immobilize peroxidase successfully on alginate in order to introduce it into the soil, similar to the laccase in the present study. Finally, similar studies should be performed with other soil from different locations and characteristics. The experiments may finally enable the knowledge for a more sustainable use of pesticides in the future and an increasing environmental protection.

Literaturverzeichnis

Agnihotri, N.P.; Baraoah, A.K., Bound Residues of Pesticides in Soil and Plant: a Review. *Journal of scientific and industrial research (india)* **1994**, 53, 850-861.

Aiken, G.R.; McKnight, D.M.; Wershaw, R.L.; MacCarthy, P., Introductory remarks. In: Aiken, G.R.; McKnight, D.M.; Wershaw, R.L.; MacCarthy, P., (Hrsg.): Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. *Wiley-VCH, New York*, 1-12, **1985**.

Alef, K.; Kleiner, D., Rapid and Sensitive Determination of Microbial Activity in Soils and Soil Aggregates by Dimethylsulfoxide Reduction. *Biology and Fertility of Soils* **1989**, 8, 349-355.

Alef, K.; Nannipieri, P., Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. *Academic Press, San Diego, USA*. **1995**.

Allison, L.E., Organic Carbon. In: Black, C.A. (Hrsg.): Methods of soil analysis. *Agronomy* **1965**, 9, 1367-1389.

Allison, S.D., Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* **2006**, 81, 361-373.

Allison, S.D.; Jastrow, J.D., Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* **2006**, 38, 3245-3256.

Allison, S.D.; Weintraub, M.N.; Gartner, T.B.; Waldrop, M.P., Evolutionary economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. In: Shukla, G.; Varma, A. (Hrsg.): Soil Enzymology. *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg*, 229-243. **2011**.

Andrea, M.O., Dimethylsulfoxide in marine and freshwaters. *Limnology and Oceanography* **1980**, 25, 1054-1063.

Andreu, V.; Pico, Y., Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23, 772-789.

Ariens, E.J.; van Rensen, J.J.S.; Welling, W., Stereoselectivity of Pesticides, Biological and Chemical Properties. *Chemicals in Agriculture, Elsevier, Amsterdam*, Auflage: 1, **1988**.

Bailey, A.M.; Coffey, M.D., Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Canadian Journal of Microbiology* **1986**, 32, 562-569.

Baker, K.L.; Marshall, S.; Nicol, G.W.; Campbell, C.D.; Nicollier, G.; Ricketts, D.; Kilham, K.; Prosser, J.I., Degradation of metalaxyl-M in contrasting soils is influenced more by differences in physicochemical characteristics than in microbial community composition after re-inoculation of sterilized soils. *Soil Biology and Biochemistry* **2010**, 42, 1123-1131.

Baldock, J.A.; Nelson, P.N., Soil Organic Matter. In: Huang, P.M.; Li, Y.; Sumner, M.E. (Hrsg.): Handbook of Soil Science. *CRC Press, Boca Raton*, 25-84, **2000**.

Baldock, J.A.; Skjemstad, J.O., Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry* **2000**, 31, 697-710.

Baldrian, P., Fungal Laccases- occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, 30, 215-242.

Bank, T.L.; Kukkadapu, R.K.; Madden, A.S.; Ginder-Vogel, M.A.; Baldwin, M.E.; Jardine, P.M., Effects of gamma-sterilization on the physiko-chemical properties of natural sediments. *Chemical Geology* **2008**, 251, 1-7.

Barraclough, D.; Kearney, T.; Croxford, A., Bound residues: environmental solution or future problem? *Environmental Pollution* **2005**, 133, 85-90.

Barriuso, E.; Benoit, P., State-of-the-art-review on bound residues. Report DL#5 of the FP6 EU-funded FOOTPRINT project [www.eu-footprint.org] **2006**.

Barriuso, E.; Benoit, P.; Dubus, I.G., Formation of Pesticide Nonextractable (Bound) Residues in Soil: Magnitude, Controlling Factors and Reversibility. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42, 1845-1854.

Bentley, M.D.; Douglass, I.B.; Lacadie, J.A.; Whittier, D.R., The photolysis of dimethylsulfoxide in the air. *Journal of Air Pollution* **1972**, 22, 359-363.

Berns, A.E.; Philipp, H.; Narres, H-D., Burauel, P.; Vereecken, H.; Tappe, W., Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science* **2008**, 59, 540-550.

Bialk, H.M.; Simpson, A.J.; Pedersen, J.A., Cross-coupling of a sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environmental Science and Technology* **2005**, 39, 4463-4473.

Bialk, H.M.; Pedersen, J.A., NMR investigation of enzymatic coupling of sulfonamide antimicrobials with humic substances. *Environmental Science and Technology* **2008**, 42, 106-112.

Börner, H.; Schlüter, K.; Aumann, J., Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. *Springer Verlag, Berlin*, Auflage: 8, **2009**.

Bollag, J-M., Cross-coupling of humus constituents and xenobiotics substances. In: Christman, R.F.; Gjessing, E.T. (Hrsg.): Aquatic and Terrestrial Humic Materias. *Annual Arbor Science, Michigan*. **1983**.

Bollag, J-M., Minard, R.D.; Liu, S.Y., Cross-linkage between anilines and phenolic humus constituents. *Environmental Science and Technology* **1983**, 17, 72-80.

Bollag, J-M.; Liu, S-Y., Biological transformation processes of pesticides. In: Cheng, H.H. (Hrsg.): Pesticides in the environment: process, impact and modeling. *Soil Science Society of America Journal* **1990**, 169-185.

Bollag J-M.; Myers, C.J.; Minard, R.D., Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment* **1992**, 123/124, 205-217.

Boyd, S.A.; Mortland, M.M., Selective effects of smectite-organic complexes on the activities of immobilized enzymes. *Journal of Molecular Catalysis* **1986**, 34, 1-8.

Brent, K.J.; Hollomon, D.W., Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed? *FRAC Monograph No. 1*, Auflage: 2, **2007**.

Bronick, C.J.; Lal, R., Soil structure and management: a review. *Geoderma* **2005**, 124, 3-22.

Bugg, T.D.H.; Ahmad, M.; Hardiman, E.M.; Singh, R., The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-products transformation. *Current opinion in Biotechnology* **2011**, 22, 394-400.

Buerge, I.; Poiger, T.; Müller, M.D.; Buser, H-R., Enantioselective Degradation of Metalaxyl in Soils: Chiral Preferences Changes with Soil pH. *Environmental Science and Technology*. **2003**, 37, 2668-2674.

Burdon J., Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Science* **2001**, 166, 752-769.

Burns, R.G., Enzyme activity in soil: Location and a Possible Role in Microbial Ecology. *Soil Biology and Biochemistry* **1982**, 14, 423-427.

Burns, R.G., Interaction of Enzymes with soil mineral and organic colloids. In: Huang, P.M.; Schnitzer, M. (Hrsg.): Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. *Soil Science Society of America Journal*, 429-451. **1986**.

Burns, R.G.; Dick, R.P., Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. *Marcel Dekker Verlag, New York*, Auflage: 1, **2002**.

Burns, R.G.; DeForest, J.L.; Marxsen, J.; Sinsabaugh, R.L.; Stromberger, M.E.; Wallenstein, M.E.; Weintraub, M.N.; Zoppini, A., Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* **2013**, 58, 216-234.

Buser, H-R.; Müller, M.D.; Poiger, T.; Balmer, M.E., Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: enantioselective degradation and chiral stability in soil. *Environmental Science and Technology* **2002**, 36, 221-226.

Calderbank, A., The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **1989**, 108, 71-102.

Caldwell, B.A., Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* **2005**, 49, 637-644.

Camarero, S.; Ibarra, D.; Martinez, M.J.; Martinez, A.T., Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 1775-1784.

Cambardella C.A.; Elliott, E.T., Carbon and Nitrogen Dynamics of Soil Organic-Matter Fractions from Cultivated Grassland Soils. *Soil Science Society of America Journal* **1994**, 58, 123-130.

Celis, R.; Gamiz, B.; Adelino, M.A.; Hermosin, M.C.; Cornejo, J., Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils. *Science of the Total Environment* **2013**, 444, 288-297.

Chaplain V.; Mamy, L.; Vieuble-Gonod, L.; Mongin, C.; Benoit, P.; Barriuso, E.; Nelieu, S., Fate of pesticides in soils: towards an integrated approach of influential factors. In: Stoytchera, M., (Hrsg.): Pesticides in the modern world – risks and benefits, *InTech University Campus, Rijeka, Kroatien* **2011**, 519-560.

Chen, S.; Liu, W., Enantioselective degradation of metalaxyl in anaerobic activated sewage sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2009**, 82 (3), 327-331.

Cheng, M.; Song, W.; Ma, W.; Chen, C.; Zhao, J. Lin, J.; Zhu, H., Catalytic activity of iron species in layered clays for photodegradation of organic dyes under visible irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* **2008**, 77, 355-363.

Chilom, G.; Rice, J.A., Organo-clay complexes in soil and sediments. In: Senesi, N.; Xing, B.; Huang, P.M. (Hrsg.): Biophysico-chemical processes involving nonliving natural organic matter in the environment. *Wiley and sons, Inc., New Jersey, USA* **2009**, 111-145.

Claßen, Daniela, The enzymatic influence on the formation of non-extractable residues of ¹⁴C-labelled metalaxyl in soil. *Diplomarbeit, RWTH Aachen*, **4.08.2012**.

- Courtesy, P.E.; Hoegger, P.J.; Kilaru, S.; Kohler, A.; Buee, M.; Garbaye, J.; Martin, F.; Kues, U., Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* **2009**, 182, 736-750.
- Costerton, W.J., Pivotal role of biofilms in the focused attack of bacteria on insoluble substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1992**, 30, 123-133.
- Crosby, J., Manufacture of optically active materials: an agrochemicals perspective. *Pesticide Science* **1996**, 46, 11-31.
- Dankward, A., Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids. *Environmental Science and Technology* **1996**, 30, 3493-3500.
- Dankwardt, A.; Hock, B., Inhibition of endogenous peroxidase activity in soil samples. Application to the analysis of soil-bound triazine residues by enzyme immunoassays with peroxidase tracer. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. **2000**, 163, 279-283.
- Dec, J.; Bollag, J-M., Determination of covalent and non-covalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Science* **1997**, 162, 858-874.
- Dec, J.; Haider, K.; Bollag, J-M., Decarboxylation and demethoxylation of naturally occurring phenols during coupling reactions and polymerization. *Soil Science* **2001**, 166, 660-671.
- Dick, W.A.; Tabatabai, M.A., Kinetics and activities of phosphatase-clay-complexes. *Soil Science* **1987**, 143, 5-15.
- Droby, S.; Coffey, M.D., Biodegradation process and nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology* **1991**, 118, 543-553.
- Dureja, P.; Tanwar, R.S.; Choudhary, P.P., Identification of impurities in technical metalaxyl. *Chemosphere* **2000**, 41, 1407-1410.
- Eichlerova, I.; Snajdr, J.; Baldrian, P., Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity. *Chemosphere* **2012**, 88, 1154-1160.
- Ellerbrock, R.H.; Gerke, H.H., Interactions between SOM composition, polyvalent cations and clay content investigated by using FTIR. *Geophysical research abstracts* **2007**, 9, SRef-ID: 1607-7962/gra/EGU2007-A-09551.
- Engbretson, R.; Wandruszka, R., Microorganization in dissolved organic acids. *Environmental Science and Technology*. **1994**, 28, 1934-1941.
- EU Commission Health Consumer Directorate, E3, Sanco 10476, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/docs/list1-metalaxyl_en.pdf, **2010**.
- Fent, K., Ökotoxikologie. *Thieme*, Stuttgart, Auflage: 2, **1998**.
- Filip, Z.; Preusse, T., Phenoloxidierende Enzyme – ihre Eigenschaften und Wirkungen im Boden. *Pedobiologica* 1985, 28, 133-142.
- Fisher, D.J.; Hayes, A.C., Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl, and ofurace. *Pesticide Science* **1982**, 13, 330-339.
- Fernandes, M.C.; Cox, L.; Hermosin, M.C.; Cornjeo, J., Adsorption-desorption of metalaxyl as affecting dissipation and leaching in soils: role of mineral and organic components. *Pest Management Science* **2003**, 59, 545-552.

Flessa, H.; Amelung, W.; Helfrich, M.; Wiesenberg, G.L.B.; Gleixner, G.; Brodowski, S.; Rethemeyer, J.; Kramer, C.; Grootes, P.-M., Storage and stability of organic matter and fossil carbon in a Luvisol and Phaeozem with continuous maize cropping: A synthesis. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2008**, 171, 36-51.

Floch, C.; Alarcon-Guierrez, E.; Criquet, S., ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiol. Methods* **2007**, 71, 319-324.

Förster, M.; Laabs, V.; Lamshöft, M.; Pütz, T.; Amelung, W., Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391, 1029-1038.

Fontem, D.A.; Olanya, O.M.; Tsopmbeng, G.R.; Owona, M.A., Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potatoe, and tomatoe in Cameroon. *Crop Protection* **2005**, 24, 449-456.

Führ, F., Kloskowskis R.; Burrauel, P., Bedeutung der gebundenen Rückstände. „Pflanzenschutzmittel im Boden“ Berichte über Landwirtschaft, SH 198, *Paul Parey Verlag, Hamburg-Berlin*, 106-115, Auflage: 1, **1985**.

Führ, F.; Ophoff, H.; Burrauel, P.; Wanner, U.; Haider, K., Modification of definition of bound residues. In: Führ, F.; Ophoff, H. (Hrsg.): Pesticide Bound Residues in Soil, Report 2. *Wiley-VCH, Weinheim*, 175-176, Auflage: 1, **1998**.

Gauvrilescu, M., Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, **2005**, 5 (6), 497-526.

George, T.S.; Richardson, A.E.; Simpson, R.J., Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* **2005**, 37, 977-978.

Gerzabeck, M.H.; Antil, R.S.; Kögel-Knabner, I.; Knicker, H.; Kirchmann, H.; Haberhauer, G., How are soil use and management reflected by soil organic matter characteristics: a spectroscopic approach. *European Journal of Soil Science* **2006**, 52, 485-494.

Gestis Stoffdatenbank des IFA (Institut für Arbeitsschutz der deutschen gesetzlichen Unfallversicherung, **25.3.2013**

Gevao, B.; Semple, K.T.; Jones, K.C., Bound pesticide residues in soil: a review. *Environmental Pollution* **2000**, 108, 3-14.

Gianfreda, L.; Nannipieri, P., Basic principles, agents and feasibility of bioremediation of soil polluted by organic compounds. *Minerva Biotechnology* **2001**, 13, 5-12.

Gianfreda, L.; Rao, M.A., Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, 35, 339-354.

Gianfreda, L.; Rao, M.A., Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Critical reviews in environmental science and technology* **2008**, 38, 269-310.

Gisi, U.; Cohen, Y., Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Reviews in Phytopathology* **1996**, 34, 549-572.

Gisi, U.; Schenker, R.; Schulin, R.; Stadelmann, F.X.; Sticher, H., Bodenökologie, *Thieme Verlag, Stuttgart (Deutschland), New York (USA)*, Auflage: 2, **1997**.

Gottfroh, Christian., Untersuchungen zum Abbau des Fungizids Metalaxyl durch Bodenmikroorganismen. *Diplomarbeit, RWTH Aachen*, **4.10.2012**.

Grandy, A.S.; Sinsabaugh, R.L.; Neff, J.C.; Stursova, M.; Zak, D.R., Nitrogen deposition effects on soil organic matter chemistry are linked to variation in enzymes, ecosystems and size fractions. *Biogeochemistry* **2008**, 91, 37-49.

Griebler, C., Dimethylsulfoxide (DMSO) reduction: a new approach to determine microbial activity in freshwater sediments. *Journal of Microbiological Methods* **1997**, 29, 31-40.

Gulkowska, A.; Sander, M.; Hollender, J.; Krauss, M., Covalent Binding of Sulfamethazine to natural and synthetic humic acids: assessing laccase catalysis and covalent bond stability. *Environmental Science and Technology* **2013**, 47, 6916-6924.

Gustavson, K.H., The function of the basic groups of collagen in its reaction with vegetable tannins. *Journal of Social Leather Traditional Chemistry*. **1966**, 50, 144-160.

Hagerman, A.E., Fifty years of polyphenol-protein complexes. In: Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P.; Quideau, S. (Hrsg.): Recent Advances in Polyphenol Research, Wiley&Sons, New York, Auflage: 3. **2012**.

Haider, K.; Martin, J.P., Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccus nigrum* in relation to humic acid transformation. *Soil Science Society of America Journal* **1967**, 31, 766-772.

Haider, K.; Martin, J.P., Humic acid-type phenolic polymers from *Aspergillus sydowi* culture medium, *Stachbotrys* ssp. Cells and autooxidized phenols mixtures. *Soil Biology and Biochemistry* **1970**, 2, 145-156.

Haider, K.; Schäffer, A., Umwandlung und Abbau von Pflanzenschutzmitteln in Böden: Auswirkungen auf die Umwelt. *Thieme, Stuttgart, Auflage: 1. 2000*.

Haider, K.; Schäffer, A., Soil biochemistry. *Science publishers*, Endfield, Jersey, Plymouth, Auflage: 1, **2009**.

Haider, K.; Spiteller, M.; Dec, J.; Schäffer, A., Silylation of organic matter: Extraction of Humic Compounds and Soil-Bound Residues. In: Bollag, J-M.; Stotzky, G. (Hrsg.): Soil Biochemistry. *Marcel Dekker Verlag, New York, Auflage: 10. 2000*.

Hamilton, D., Metalaxyl M. In: Pesticide residues in food – 2004 Evaluations, *FAO Plant Production and Protection Paper and WHO Toxicology* **2004**, 405-476.

Handley, W.R.C., Further evidence for the importance of leaf protein complexes in litter decomposition and the supply of nitrogen for plant growth. *Plant and Soil* **1961**, 15, 37-73.

Haslam, E., Plant polyphenols: Vegetable Tannins, Revisited. *Cambridge University Press* **1989**.

Hassal, K.A., Systematic fungicides. In: The Biochemistry and Uses of Pesticides: Structure, Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection. *VCH Verlag, Weinheim. 1990*.

Hayes, M.H.B., Emerging concepts of the compositions and structures of humic substances. In: Hayes, M.H.B.; Wilson, W.S (Hrsg.): Humic Substances in Peats and Sludges. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge* **1997**, 3-30.

Henningsen, M., Moderne Fungizide: Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft. *Chemie in unserer Zeit* **2003**, 37 (2), 98-111.

Higuchi, T., Lignin biochemistry- biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology* **1990**, 24, 23-63.

Hobbie, E.A.; Horton, T.R., Evidence that saprotrophic fungi mobilize nitrogen during litter decomposition. *New Phytologist* **2007**, 173, 447-449.

Hobson, R.P.; Page, H.J., Studies on the carbon and nitrogen cycles in soil. VII. The nature of the organic nitrogen compounds of the soil: "humic" nitrogen. *Journal of Agricultural Science Cambridge* **1932**, 22, 497-515.

Hoegger, P.J.; Kilaru, S.; James, T.Y.; Thacker, J.R.; Kues, U., Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* **2006**, 273, 2308-2326.

Huang, P-M.; Wang, M-K.; Chiu, C-Y., Soil mineral-organic-matter-microbe interactions: Impacts on the biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia* **2005**, 49, 609-635

Huang, P-M.; Hardie, A.G., Formation mechanisms of humic substances in the environment. In: Senesi, N.; Xing, B.; Huang, P.M. (Hrsg.): Biophysico-chemical processes involving nonliving natural organic matter in the environment. *Wiley-VCH, New York*, Auflage: 2. **2009**.

Jablonoswi, N.D.; Koepchen, S.; Hofmann, D.; Schäffer, A.; Burauel, P., Persistence of ¹⁴C-labeled Atrazine and its residues in field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution* **2009**, 157, 2126-2131.

Jahnke, J.; Priefer, U., Phototropic biofilms of restored fields in the rhenish lignit mining area: development of soil algal, bacterial, and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, 34, 1157-1165.

Jenkinson, D.S.; Ladd, J.N., Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Jenkinson, D.S.; Ladd, J.N. (Hrsg.): Soil Biochemistry. *Marcel Dekker Verlag New York*, 415-471, Auflage: 1, **1981**.

Johnsen, A.R.; Jacobson, O.S., A quick and sensitive method for the quantification of peroxidase activity of organic surface soil from forests. *Soil Biology and Biochemistry* **2008**, 40, 814-821.

Jonkers, H.M.; van der Maarel, M.J.E.C.; van Gemenka, H.; Hausen, T.A., DMSO reduction by marine-ulfats reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **2006**, 136, 283-287.

Junge, T.; Classen, N.; Schäffer, A.; Schmidt, B., Fate of the veterinary antibiotic 14-C-difloxacin in soil including simultaneous amendment of pig manure with focus on non-extractable residues. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **2012**, 47, 858-868.

Junge, Thorsten, Abbau und Rückstandsdynamik von Tierarzneimitteln in Boden-Pflanzen Systemen. *Dissertation, RWTH Aachen*. **20.08.2012**.

Kästner, M., "Humification" Process or formation of refractory soil organic matter. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. (Hrsg.): Biotechnology, *Wiley-VCH, Weinheim*, Auflage: 2, **2000**

Kästner, M.; Nowak, K.M.; Miltner, A.; Trapp, S.; Schäffer, A., Classification and modelling of non-extractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil - a synthesis. Akzeptiert als Veröffentlichung in: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2013**.

Kaiser, K.; Guggenberger, G., Mineral surfaces and organic matter. *European Journal of Soil Science* **2003**, 54 (2), 219-236.

Kandeler, E., Characterization of free and adsorbed phosphatases in soils. *Biology and Fertility of Soils* **1990**, 9, 199-202.

Kandeler, E.; Stemmer, M.; Palli, S.; Gerzabek, M.H., Xylanase, and urease activity in particle-size fractions of soils. In: Berthelin, J.; Huang, P.M.; Bollag, J-M.; Andreux, F. (Hrsg.): Effect of mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments, *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg*, 275-286, Auflage: 1, **1999**,

Kang, K.H.; Dec, J.; Park, H.; Bollag, J.M., Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Research* **2002**, 36, 4907-4915.

Katayama, A.; Burns, G.R.; Carazo, E.; Felsot, A.; Hamilton, D.; Harris, C.; Kim, Y.H.; Kleter, G.; Ködel, W.; Linders, J.; Peijnenburg, J.G.; Sabljic, A.; Stephenson, R.G.; Racke, D.K.; Rubin, B.; Tanaka, K.; Unsworth, J.; Wauchope, R.D., Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. In: Whitacre, D.M. (Hrsg.): Reviews of environmental contamination and toxicology, *Springer Verlag, New York, USA*, **2010**, 1-86.

Kelleher, B.P.; Simpson, A.J., Humic substances in soils: are they really chemically distinct? *Environmental Science and Technology* **2006**, 40, 4605-4611.

Kellner, H.; Luis, P.; Zimdars, B.; Kiesel, B.; Buscot, F., Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland cambisols. *Soil Biology and Biochemistry* **2008**, 40, 638-648.

Kerkenaar, A., On the antifungal mode of action of metalaxyl, an inhibitor of nucleic acid synthesis in *Phytophthora blight*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1981**, 16, 1-13.

Kersten, P.J.; Kalyanaraman, B.; Hammel, K.E.; Reinhammar, B.; Kirk, T.K., Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal* **1990**, 268, 475-480.

Kirchmann, H.; Persson, J.; Carlgren, K., The Ultuna Long-Term Soil Organic Matter Experiment, 1956-91. *Reports and Dissertations* **1994**, 17, Department of Soil Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Kirk, J.L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.N.; Lee, H.; Trevors, J.T., Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **2004**, 58, 169-188.

Kleber, M.; Mikutta, R.; Torn, S.; Jahn, R., Poorly crystalline mineral phases protect organic matter in acid subsoil horizons. *European Journal of Soil Science* **2005**, 56, 717-725.

Koehle, N.; Storch, F.; Hildebrand, E.E., The coarse-soil fraction is the main living space of fungal hyphae in the BhBs horizon of a Podzol. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2011**, 174, 750-753.

Kögel-Knabner, I., The macromolecular composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, 34, 139-162.

Kögel-Knabner, I.; Guggenberger, G.; Klber, M.; Kandeler, E.; Kalbiz, S.; Scheu, K., Organomineral associations in temperate soils: Integration biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2008**, 171 (1), 61-82.

Kohl, S.D.; Rice, J.A., The binding of contaminants to humin: A mass balance. *Chemosphere* **1998**, 36, 251-261.

Komarek, M.; Cadkova, E.; Chrastny, V.; Bordas, F.; Bollinger, J-M., Contaminantion of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **2010**, 36, 138-151.

Konova, M.M., Soil Organic Matter. *Pergamon Press, New York*, Auflage: 1, **1966**.

Koschorek, K., Charakterisierung und Optimierung mikrobieller Laccasen für die Biokatalyse. *Dissertation an der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart*, 22.01.2009.

Ladd, J.N.; Butler, J.H.A., Comparison of some properties of soil humic acids and synthetic phenolic polymers incorporating amino derivatives. *Australian Journal of Soil Research* **1966**, 4, 41-54.

Leonowicz, A.; Cho, N.S.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D.; Rogalski, J., Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* **2001**, 41, 185-227.

Loll, M.J.; Bollag, J-M., Protein transformations in soil. *Advanced Agronomy* **1983**, 36, 351-382.

Louiseau, L.; Barriuso, E., Characterization of Atrazine's Bound (Nonextractable) Residues Using Fractionation Techniques for Soil Organic Matter. *Environmental Science and Technology* **2002**, 36, 683-689.

Maire, V.; Alvarez, G.; Colombet, J.; Comby, A.; Despinasse, R.; Dubreucq, E.; Joly, M.; Lehours, A-C.; Perrier, V.; Shahzad, T.; Fontaine, S., A unknown respiration pathway substantially contributes to soil CO₂ emissions. *Biogeosciences Discussions* **2012**, 9, 8663-8691.

Makoi, J.H.J.R.; Ndakidemi, P.A., Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in ecosystems. *African Journal of Biotechnology* **2008**, 7 (3), 181-191.

Margon, A.; Fornasier, F., Determining soil enzyme location and related kinetics using fumigation and high-yield extraction. *Soil Biology and Biochemistry* **2008**, 40, 2178-2181.

Marschner, B.; Brodowski, S.; Dreves, A.; Gleixner, G.; Gude, A.; Grootes, P.M., How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2008**, 171, 91-110.

Martin, J.P.; Haider, K., Influence of intimate associations with humic polymers on biodegradation of ¹⁴C – labeled organic substrates in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **1978**, 10, 483-486.

Martin, C.; Corvini, P.F.X.; Vinken, R.; Junghanns, C.; Krauss, G.; Schlosser, D., Quantification of the influence of extracellular laccase and intracellular reactions on the isomer-specific biotransformation of xenoestrogen technical nonylphenol by the aquatic hyphomycete *clavariopsis aquatica*. *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, 75, 4398-4409.

Marucchini, C.; Zadra, C., Stereoselective degradation of metalaxyl and metalaxyl-Min soil and sunflower plants. *Chirality* **2002**, 14, 32-38.

Marx, R.B.; Aitken, M.D., Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environmental Science and Technology* **2000**, 34, 3379-3383.

Masai, E.; Katayama, Y.; Fukuda, M., Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2007**, 71, 1-15.

McGrath, M.T., What are fungicides? *The Plant Health Instructor*. **2004**, DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

McLaren, A.D., McLaren, A.D. Enzyme activity in soils sterilized by ionizing radiation and some comments on micro-environments in nature. In: Fibbons, G.N.E., (Hrsg.). Recent Progress in Microbiology,; *University of Toronto Press, Toronto, Canada*, **1963**, 221-229.

McManus, J.P.; Davis, K.G.; Liley, T.H.; Haslam, E., The associations of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society* **1981**, 7, 309-311.

McNamara, N.P.; Black, H.I.J.; Beresford, N.A.; Parekh, N.R., Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* **2003**, 24, 117-132.

Mester, T.; Tien, M., Oxidation mechanism of lignolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* **2000**, 46, 51-59.

Miller, G.T., Sustaining the earth. *Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California, USA, Auflage: 6*, **2004**.

Miltner, A.; Kindler, R.; Knicker, H.; Richnow, H-H.; Kästner, M., Fate of microbial biomass-derived amino acids in soil and their contribution to soil organic matter. *Organic Geochemistry* **2009**, 40, 978-985.

Miltner, A.; Bombach, P.; Schmidt-Brücken, B.; Kästner, M., SOM genesis: microbial biomass as significant source. *Biogeochemistry* **2011**, DOI 10.1007/s10533-011-9658-z

Monkiedje, A.; Ilori, M.O.; Spiteller, M., Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, 34, 1939-1948.

Monkiedje, A.; Zuehlke, S.; Maniepi, S.J.N.; Spiteller, M., Elimination of racemic and enantioenriched metalaxyl based fungicides under tropical conditions in the field. *Chemosphere* **2007**, 69, 655-663.

Morra, M.J.; Blank, R.R.; Freeborn, L.L.; Shafii, B., Size Fractionation of Soil Organo Mineral Complexes Using Ultrasonic Dispersion. *Soil Science* **1991**, 152, 294-303.

Morton, V.; Staub, T., A Short History of Fungicides. *Online APSnet Features*. **2008**, DOI: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308.

Müller, K.; Magesan, G.N.; Bolan, N.S., A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2007**, 120, 93-116.

Nannipieri, P.; Kandeler, E.; Ruggiero, P., Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G.; Dick, R.P. (Hrsg.): Enzymes in the environment *Marcel Dekker Verlag, New York* **2002**, 1-33.

Nannipieri, P.; Giagnoni, L.; Landi, L.; Renella, G., Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann, E.K. (Hrsg.): Phosphorus in Action, *Soil Biology* 26. *Springer Verlag, Berlin-Heidelberg*, **2011**.

Nebbioso, A.; Piccolo, A., Advances in humeomics: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of soil humic acid. *Analytica chimica acta* **2012**, 720, 77-90.

Northcott G.L.; Jones, K.C., Experimental approaches and analytical techniques for determining of organic compound bound residues in soil and sediment. *Environmental Pollution* **2000**, 108, 19-43.

- Nowak, K.; Miltner, A.; Gehre, M.; Schäffer, A.; Kästner, M., Formation and Fate of „Bound“ Residues from Microbial Biomass during Biodegradation of 2,4-D in Soil. *Environmental Science and Technology* **2011**, 45, 1127-1132.
- Oh, H.I.; Hoff, J.E.; Armstrong, G.S.; Haff, L.A., Hydrophobic interactions in tanninprotein complexes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1980**, 28, 934-398.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Desiderio, B.; Marzulla, L.; Giamberini, M.; Sannia, G., A new immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microbiology and Technology* **1994**, 16, 151-158.
- Papini, S.; Andrea, M.M., Enhanced degradation of metalaxyl in agricultural soils of Sao Paulo State, Brazil. *Pesq. agropec. bras. Brasilia* **2001**, 36, 1-5.
- Park, O-J.; Lee, S-H.; Park, T-Y; Lee, S-W.; Cho, K-C., Enzyme-catalyzed preparation of methyl (R) –N-(2,6-dimethylphenyl)alaninate: a key intermediate for (R)-metalaxyl. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 1221-1225.
- Paul, E.A.; Clark, F.E., Soil microbiology and biochemistry. *Academic Press, San Diego* **1996**.
- Paul, E.A. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. *Academic Press Oxford, U.K.* **2007**
- Pena-Mendez, E.M.; Havel, J.; Patocka, J., Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of Applied Biomedical Science* **2005**, 3, 13-24.
- Perotti, E.B.; Pidello, A., Effect of Azospirillum brasilense inoculation on urease activity in soil and gamma-sterilized soil. *Revista Argentina de Microbiologia* **1999**, 31, 36-41.
- Pesaro, M.; Nicollier, G.; Zeyer, J.; Widmer, F., Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70, 2577-2587.
- Petrovic, A.M.; Barret, W.C.; Larsson-Kovach, I.M.; Reid, C.M.; Lisk, D.J., The influence of a peat amendment and turf density on downward migration of metalaxyl fungicide in creeping bentgrass sand lysimeters. *Chemosphere* **1996**, 33, 2335-2340.
- Pettit, R.E., Organic matter, humus, humate, humic acids, fulvic acids and humin: their importance in soil fertility and plant health. *Texas A&M University*: http://www.calciumproducts.com/articles/Dr._Pettit_Humate.pdf. **2013**.
- Piccolo, A., The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* **2001**, 166, 810-832.
- Piccolo, A., The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Advances in Agronomy* **2002**, 75, 57-134.
- Pignatello, J.J.; Xing, B., Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology*. **1989**, 31, 1-11.
- Powlson, D.S.; Jenkinson, D.S., The effects of biocidal treatments on metabolism in soil: Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochemistry* **1976**, 8, 167-177.
- Prescott, C.E.; Maynard, D.G.; Laiho R., Humus in boreal forests: friend or foe? *For Ecological Management* **2000**, 133, 23-36
- Quiquampoix, H.; Burns, R.G., Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* **2007**, 3, 401-406.

Raber, B., Verteilungsverhalten von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und deren Desorption aus Böden unter dem Einfluss von gelöster organischer Substanz (DOM) unterschiedlicher Herkunft. Dr. Wigbert *Maraun Wissenschaftsverlag, Frankfurt. 1996.*

Rabinovich, M.L.; Bolobova, A.V.; Vasilchenko, L.G., Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2004**, 40, 1-17.

Rao, M.A.; Scelza, R.; Scotti, R.; Gianfreda, L., Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **2010**, 10, 333-353.

Renella, G.; Landi, L.; Nannipieri, P., Hydrolase activities during and after the chloroform fumigation of soils as affected by protease activity. *Soil Biology and Biochemistry* **2002**, 34, 51-60.

Richnow, H-H.; Seifer, R.; Hefter, J.; Link, M.; Francke, W.; Schäfer, G.; Michaelis, W., Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter: Mode of binding. *Organic Geochemistry* **1997**, 26, 745-758.

Riefer, J.; Klausmayer, T.; Schwarzbauer, J.; Schäffer, A.; Schmidt, B.; Corvini, P.F.X., Rapid incorporation and short-term distribution of a nonylphenol isomer and the herbicide MCPA in soil-derived organo-clay complexes. *Environmental Chemistry Letters* **2010**, 903, 411-415.

Roberts, T.R.; Hutsons, D.H., Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides. *RSC Publishing, Cambridge. 1999.*

Rockström, J.; Steffen, W.; Noone, K.; Persson, A.; Chapin, F.S.; Lambin, E.F.; Lenton, T.M.; Scheffer, M.; Folke, C.; Schellnhuber, H.J.; Nykvist, B.; de Wit, C.A.; Hughes, T.; van der Leeuw, S.; Rodhe, H.; Sörlin, S.; Snyder, P.K.; Constanza, R.; Svedin, U.; Falkenmark, M.; Karlberg, L.; Corell, R.W.; Fabry, V.J.; Hansen, J.; Walker, B.; Liverman, D.; Richardson, K.; Crutzen, P.; Foley, J.A., A safe operating space for humanity. *Nature* **2009**, 461, 472-475.

Rodriguez-Cruz, M.S.; Andrades, M.J.; Sanchez-Martin, M.J., Significance of the long-chain organic cation structure in the sorption of the penconazole and metalaxyl fungicides by organo clays. *Journal of hazardous chemicals* **2008**, 160, 200-207.

Russel, P.E., A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Sciences* **2005**, 143 (1), 11-25.

Sarkar, J.M.; Malcolm, R.L.; Bollag, J-M., Enzymatic coupling of 2,4-dichlorophenol to stream fulvic acid in the presence of oxidoreductases. *Soil Science Society of America Journal* **1989**, 52, 688-694.

Schmidt, B.; Ebert, J.; Lamshoft, M.; Thiede, B.; Schumacher-Buffel, R.; Ji, R.; Corvini, P.F.X.; Schäffer, A., Fate in soil of C-14-sulfadiazine residues contained in the manure of young pigs treated with a veterinary antibiotic. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **2008**, 43, 8-20.

Schmidt, M.W.; Torn, M.S.; Abiven, S.; Dittmar, T.; Guggenberger, G.; Janssens, I.A.; Klber, M.; Kögel-Knabner, I.; Lehmann, J.; Manning, D.A.; Nannipieri, P.; Rasse, D.P.; Weiner, S.; Trumbore, S.E., Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* **2011**, 478, 49-56.

Schnitzer, M.; Kahn, S.U., Humic Substances in the Environment. *Marcel Dekker Verlag New York. 1972.*

- Schulte, E.E.; Hoskins, B., Recommended Soil Organic Matter Tests. *Recommended Soil Testing Procedures for the Northeastern United States, Cooperative Bulletin* **2009**, 493, 63-74.
- Schulten, H.R.; Leinweber, P., Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1996**, 38, 1-53.
- Schulze, M., Bedeutung des gelösten organischen Kohlenstoffs für das Schicksal hydrophober Verbindungen in ungesättigten Bodenzonen. *Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland*, 36-12. **1998**.
- Schumacher, B.A., Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. *Ecological Risk Assessment Support Center of the United States Environmental Protection Agency (EPA)* **2002**, NCEA-C- 1282 - EMASC-001, 1-23.
- Schurig, C.; Smittenberg, R.H.; Berger, J.; Kraft, F.; Woche, S.K.; Goebel, M.O.; Heipieper, H.J.; Miltner, A.; Kästner, M., Microbial cell-envelope fragments and the formation of organic matter: a case study from a glacier forefield. *Biogeochemistry* **2012**, 113, 595-612.
- Schwarz, W.H.; Zerlov, V.V., Protease inhibitors in bacteria; an emerging concept for the regulation of bacterial protein complexes? *Molecular Microbiology* **2006**, 60, 1323-1326.
- Senesi, N., Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *The Science of the total environment* **1992**, 123/124, 63-76.
- Sessitsch, A.; Weilharter, A.; Gerzabek, M.H.; Kirchman, H.; Kandeler, E., Microbial populations in soil particle-size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and environmental microbiology* **2001**, 67, 4215-4224.
- Setia, R.; Smith, P.; Marschner, P., Introducing a Decomposition Rate Modifier in the Rothamsted Carbon Model to Predict Soil Organic Carbon Stocks in Saline Soils. *Environmental Science and Technology* **2011**, 15, 6396-6403.
- Sharma, D.; Awasthi, M.D., Adsorption and movement of metalaxyl in soils under unsaturated flow conditions. *Plant and Soil* **1997**, 195, 293-298.
- Simpson, A.J.; McNally, D.J.; Simpson M.J., NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2011**, 58, 97-175.
- Shaw, L.J.; Beaton, Y.; Glover, L.A.; Killham, K.; Meharg, A.A., Re-inoculation of autoclaved soil as a non-sterile treatment for xenobiotic sorption and biodegradation studies. *Applied Soil Ecology* **1999**, 11, 217-226.
- Shindo, H.; Huang, P.M., Role of Mn(IV) oxide in abiotic formation of humic substances in the environment. *Nature* **1982**, 298, 363-365.
- Singh, U.S.; Tripathi, R.K., Physicochemical and biological properties of metalaxyl. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* **1982**, 12, 287-294.
- Sinsabaugh, R.L., Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* **2010**, 42, 391-404.
- Six, J.; Feller, C.; Deneff, K.; Ogle, S.M.; de Moares, J.C.; Albrecht, A., Soil organic matter, biota, and aggregation in temperate and tropical soils – effects of no-tillage. *Agronomy* **2002**, 22, 755-775.

- Six, J.; Bossuyt, H.; Degryze, S.; Denef, K., A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, **2004**, 79, 7-31.
- Sollins, P.; Homann, P.; Caldwell, B.A., Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* **1996**, 74, 65-105.
- Spesoto, A.M.; Melo, I.S.; Ferracini, V.L., Behavior of the fungicide metalaxyl in some brazilian sandy and clayey soils. *Pesticidas R. Ecotoxicol. e meio Ambiente. Curitiba* **2006**, 16, 13-20.
- Stemmer, M.; Gerzabek, M.H.; Kandeller, E., Organic matter and enzyme activity in particle - size fractions of soils obtained after low-energy sonification. *Soil Biology and Biochemistry* **1998**, 1, 9-17.
- Stevenson, F.J., Humus chemistry, genesis, composition, reactions. *Wiley-VCH, New York* **1994**.
- Stokes, J.D.; Paton, G.I.; Semple, K.T., Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. *Soil Use and Management* **2006**, 21, 475-486.
- Sukop, M.; Cogger, C.G., Adsorption of carbofuran, metalaxyl and simazine: K_{oc} evaluation and relation to soil transport. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **1992**, 27, 565-590.
- Sukul, P.; Moza, P.N.; Hustert, K.; Kettrup, A., Photochemistry of Metalaxyl. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1992**, 40, 2488-2492.
- Sukul, P.; Spiteller, M., Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism and analytical methods. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicity* **2000**, 164, 1-26.
- Sukul, P.; Spiteller, M., Persistence, fate and metabolism of (^{14}C) metalaxyl in typical Indian soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2001**(a), 49, 2352-2358.
- Sukul, P.; Spiteller, M., Influence of biotic and abiotic factors on dissipating metalaxyl in soils. *Chemosphere* **2001**(b), 45, 941-947.
- Sukul, P., Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. *Soil Biology and Biochemistry* **2006**, 38, 320-326.
- Sukul, P.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Spiteller, M., Evaluation of sorption-desorption processes for metalaxyl in natural and artificial soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **2013**, 48, 431-441.
- Sutton, R.; Sposito, G., Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science and Technology* **2005**, 39, 9009-9015.
- Tabatabai, M.A.; Fu, M., Extraction of enzymes from soil. In: Stotzky, G.; Bollag, J.M. (Hrsg.): *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker Verlag, New York, USA, 197-227, Auflage: 7, **1992**,
- Tabatabai, M.A., Soil enzymes. In: Weaver, R.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdick, D.; Smith, S.; Tabatabai, M.; Wollum, A. (Hrsg.): *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbial and Biochemical Properties*. *Soil Science Society of America* **1994**, 903-947.
- Talbot, J.M.; Allison, S.D.; Treseder, K.K., Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* **2008**, 22, 955-963.

Theng, B.K.G., Humic Substances. In: Theng, B.K.G. (Hrsg.): Formation and properties of clay-polymer-complexes. *Developments in clay science* **2012**, 4, 391-456.

Theuerl, S.; Buscot, F., Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biology and Fertility of Soils* **2010**, 46, 215-225.

Thiele-Brun, S.; Seibicke, T.; Schulten, H.R.; Leinweber, P., Sorption of Sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality* **2004**, 33, 1331-1342.

Tisdall, J.M.; Oades, J.M., Organic-Matter and Water-Stable Aggregates in Soil. *Journal of Soil Science* **1982**, 33, 141-163.

Tietjen, T.; Wetzel, R.G., Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration, of enzyme activity and protection from photodegradation. *Aquatic Ecology* **2003**, 37, 331-339.

Totsche, K.U.; Danzer, J.; Kögel-Knabner, I., Dissolved organic matter-enhanced retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil miscible displacement experiments. *Journal of Environmental Quality* **1997**, 26, 1090-1100.

Totsche, K.U.; Rennert, T.; Gerzabeck, M.; Kögel-Knabner, I.; Smalla, K.; Spiteller, M.; Vogel, H.J., Biogeochemical Interfaces in Soil: The interdisciplinary challenge for soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2010**, 173, 88-99.

Trevors, J.T.; van Elsass, J.D., Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications. *Springer Verlag, Heidelberg Berlin* **1995**.

Trevors, J.T., Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* **1996**, 26, 53-59.

Triantafyllidis, V.; Hela, D.; Patakioutas, G., Environmental behavior of the fungicide metalaxyl in experimental tobacco field. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **2013**, 48, 747-757.

Tuomela, M.; Hatakka, A., Oxidative Fungal Enzymes for Bioremediation. *Environmental Biotechnology and Safety* **2011**, 6, 183-196.

Tuominen, L.; Kairesalo, T.; Hartikainen, H., Comparison of methods for inhibiting bacterial activity in sediment. *Applied Environmental Microbiology* **1994**, 60, 3454-3457.

Waksman, S.A.; Iyer, K.R.N., Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus. I: On the synthesis of the "humus nucleus". *Soil Science* **1932**, 34, 43-69.

Thevenor, M.; Dignac, M-F.; Rumpel, C., Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **2010**, 42, 1200-1211.

Wallenstein, M.E.; Weintraub, M.N., Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* **2008**, 40, 2098-2106.

Wanner, U.; Führ, F.; Burauel, P., Influence of the amendment of corn straw on the degradation behavior of the fungicide dithianon in soil. *Environmental Pollution* **2005**, 133, 63-70.

Warsaw, A.L.; Fernandez, R.T.; Kort, D.R.; Gregg, B.M.; Rowe, B.; Vandervoort, C., Remediation of metalaxyl, trifluralin, and nitrate from nursery runoff using container-grown woody ornamental and phytoremediation areas. *Ecological engineering* **2012**, 47, 254-263.

Weissenfels, W.D.; Klewer, H.J.; Langhoff, J., Adsorption of polyaromatic hydrocarbons (PAH) by soil particles: Influence and biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1992**, 36, 689-696.

Wershaw, R.L., A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology* **1986**, 1, 29-45.

Wershaw, R.L., Model for humus in soils and sediments. *Environmental Science and Technology*. **1993**, 27, 814-816.

Whitbread, A.M., Soil Organic Matter: Its fractionation and Role in Soil Structure. In: Lefroy, R.D.B.; Blair, G.J.; Craswell, E.T. (Hrsg.): Soil Organic Matter Management For Sustainable Agriculture **1995**, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australien, 124-164.

Wolf, D.C.; Skipper, H.D., Soil Sterilization. In: Methods of Soil Analysis Part 2: Microbial and Biochemical Properties. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, USA **1994**, 41-51.

Vereecken, H.; Nitzsche, O.; Schulze, M., Analysis of the transport of hydrophobic organic xenobiotics in the presence of dissolved organic carbon using soil column experiments. *Humic Substances and Contaminant* **2001**, 22, 449-470.

Von Lützw, M.; Kögel-Knabner, I.; Ekschmitt, I.; Matzner, E.; Guggenberger, G.; Marschner, B.; Flessa, H., Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review. *European Journal of Soil Science* **2006**, 57, 426-445.

Xie, H.; Guetzloff, T.; Rice, J.A., Fractionation of Pesticide Residues Bound to Humin. *Soil Science* **1997**, 6, 421-429.

Xu, F.; Bhandari, A., Retention and extraction of phenol, cresol, and dichlorophenol exposed to two surfaces in soil in the presence of horseradish peroxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2003**, 51, 183-188.

Yang, X.B.; Tschanz, A.T.; Dowler, W.M.; Wang, T.C., Development of yield loss models in relation to reduction of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology* **1991**, 81, 1420-1426.

Yaron, B.; Dror, I.; Berkowitz, B., Contaminant geochemistry – a new perspective. *Naturwissenschaften* **2010**, 97, 1-17.

Young, I.M.; Crawford, J.W., Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* **2004**, 304, 1634-1637.

Zavarzina, A.G., A mineral support and biotic catalystars essential in the formation of highly polymeric soil humic substances. *Eurasian Soil Science* **2006**, 39, 548-553.

Zavarzina, A.G., Heterophase Synthesis of Humic Acids in Soils by Immobilized Phenol Oxidases. In: Shukla, G.; Varma, A. (Hrsg.): *Soil Enzymology*. *Soil Biology* **2011**, 22, 187-206.

Zavarzina, A.G.; Lisov, A.A.; Zavarzin, A.A.; Leontievsky, A.A., Fungal Oxidoreductases and Humification in Forest Soils. In: Shukla, G.; Varma, A. (Hrsg.): *Soil Enzymology*. *Soil Biology* **2011**, 22, 187-206.

Zhang, L.; Ten Hagen, K.G., The cellular microenvironment and cell adhesion: a role of O-glycosylation. *Biochemical Society Transactions* **2011**, 39, 378-382.

Zheng, Z.; Liu, S-Y.; Freyer, A.J.; Bollag, J-M., Transformation of Metalaxyl by the fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Applied and environmental microbiology* **1989**, 55, 66-71.

Ziechman, W., Huminstoffe. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, Auflage: 1, **1980**.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ABTS | (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz |
| ACS | American Chemical Society |
| Ap | Pflughorizont |
| BL | Blindprobe |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CAS | Chemical Abstracts Service |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DIN | Deutsche Industrienorm |
| DMS | Dimethylsulfid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dpm | desintegrations per minute, Zahl der registrierten Zerfallsergebnisse pro Minute |
| EC | Enzyme Commission |
| EN | Europäische Norm |
| ER | Extrahierbare Radioaktivität |
| eV | Elektronenvolt |
| GC | Gaschromatographie |
| GR | Gebundene Rückstände |
| h | Stunde(n) |
| ha | Hektar |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| Hrsg. | Herausgeber |
| ISO | International Organization for Standardization |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| kd | kilo Dalton |
| KF | Korrekturfaktor |
| kGy | kilo Grey |
| LC-MS/MS | Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LSC | Liquid Scintillation Counting, Flüssigszintillationszählung |
| Lsg. | Lösung |
| LV | Leerverbrennung |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| mUnits | Milli Units |
| MUB | Modified Universal Buffer, Universalpuffer MUB |
| MWCO | Molecular Weight Cut-Off |
| n | Stichprobenanzahl |
| NER | Nicht Extrahierbare Radioaktivität |
| OC | Organic Carbon, organischer Kohlenstoff |
| PERO | Peroxidase |
| PO | Phenoxidase |
| POM | Particulate Organic Matter, partikuläre organische Bodensubstanz |
| R | Bestimmtheitsmaß |
| RNA | Ribonukleinsäure |

| | |
|-------|---|
| rpm | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| SOM | Soil Organic Matter, organische Bodensubstanz |
| Sox. | Soxhlet |
| ST | Standard |
| STV | Standardverbrennung |
| Tab. | Tabelle |
| TG | Trockengewicht |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| u.a. | unter anderem |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volume per Volume |
| WHK | Wasserhaltekapazität |
| WRS | World Reference Base for Soil Resources |
| z.B. | zum Beispiel |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 2.1 | Verwendete Geräte und Zubehör bei der Probenaufarbeitung | 46 |
| 2.2 | Verwendete Geräte und Zubehör bei der Probenaufarbeitung (Fortsetzung) | 47 |
| 2.3 | Kenndaten des untersuchten Versuchsbodens aus Ultuna (Schweden) | 52 |
| 3.1 | Überblick über die verwendeten sterilen Ansätze mit ihrer jeweiligen Nomenklatur | 56 |
| 3.2 | Die für Applikation verwendeten Volumina der ¹⁴ C-Metalaxyl Stammlösung und die Mengen Bodenmaterial (g), Wasser (mL) und Radioaktivität (dpm) | 60 |
| 3.3 | Parameter zur Messung der DMSO-Reduktion von Bodenproben und Detektion von DMS in den Kalibrationsproben | 71 |
| 3.4 | Single Ion Monitoring Daten zur Auswertung der LC-MS/MS Analyse | 81 |
| 3.5 | Parameter für die Messung von Metalaxyl mit Gaschromatographie | 82 |
| 4.1 | Kontrolle der Sterilisation von Bodenproben nach 92 Tagen Inkubation | 88 |
| 4.2 | Die DMSO Reduktion der Gesamtbodenproben und Kontrollen | 89 |
| 4.3 | Durch Glühverlust bestimmte Mittelwerte organischer Substanz in Gesamtbodenproben sowie die Menge organischen Kohlenstoffs | 90 |
| 4.4 | Die Mittelwerte der pH-Messungen der Gesamtbodenproben | 91 |
| 4.5 | Die Aktivitäten der extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen in den Gesamtbodenproben | 93 |
| 4.6 | DMSO-Reduktion in Ton und Schluff nach 10 und 92 Tagen Inkubation und Umrechnung der Werte der DMSO-Reduktion | 94 |
| 4.7 | Gehalte organischen Kohlenstoffs in den sterilen und nicht sterile Fraktionsproben und ihre pH-Werte Fraktionsproben | 95 |
| 4.8 | Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen und Peroxidasen in Ton und Schluff mit ihrer Umrechnung | 98 |
| 4.9 | DMSO-Reduktion in Proben mit und ohne Enzymzugabe | 101 |
| 4.10 | Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen (PO) in Proben mit und ohne Enzymzugabe | 101 |
| 4.11 | Bilanzierung der Radioaktivität der Gesamtbodenproben | 103 |
| 4.12 | Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des Fraktionswassers der Gesamtbodenproben | 108 |
| 4.13 | Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fraktionen der Gesamtbodenproben | 112 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.14 | Bilanzierung der Radioaktivität der Fraktionsproben | 114 |
| 4.15 | Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure sowie eines zweiten Metaboliten an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des „Fraktionswassers“ der Fraktionsproben | 117 |
| 4.16 | Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der Fraktionsproben | 120 |
| 4.17 | Bilanzierung der Radioaktivität in Proben mit und ohne Enzymzugabe | 121 |
| 4.18 | Mittelwerte der Anteile von Metalaxyl und Metalaxylsäure sowie eines zweiten Metaboliten an detektierbarer Radioaktivität in den Extrakten des Fraktionswassers der Proben mit Enzymzugabe | 122 |
| | Mittelwerte der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten Radioaktivität aus den Huminstoff-Fractionen der Proben mit und ohne Enzymzugabe | 125 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Schema der heterogenen Struktur eines Bodenkörpers | 14 |
| 1.2 | Schema der Assoziation von organischer Bodensubstanz im Mikro- und Makroaggregaten in Böden der gemäßigten Breiten | 15 |
| 1.3 | Oxidation von Phenoxyradikalen mit anschließender Radikalkopplung | 18 |
| 1.4 | Lokalisation von extrazellulären Enzymen im Boden | 22 |
| 1.5 | Umsetzung von ABTS zum Radikalkation ABTS ⁺ | 24 |
| 1.6 | Umsatz von TMB zu TMB ⁺ und dessen Reaktion zum Diimin | 25 |
| 1.7 | Reaktionen sekretierter Phenoloxidasen und Peroxidasen in Böden | 26 |
| 1.8 | Stoffschicksal eines radioaktiv markierten Pestizids im Boden und darauf Einfluss nehmende Prozesse | 28 |
| 1.9 | Assoziationsformen zwischen Huminstoffen und Fremdstoffen mit ihrer Bindungsstärke | 30 |
| 1.10 | Verbleib einer xenobiotischen Ausgangssubstanz im Boden | 31 |
| 1.11 | Die chemische Strukturen von S (+) Metalaxyl und R (-) Metalaxyl | 34 |
| 1.12 | Chemische Struktur von Metalaxylsäure | 35 |
| 2.1 | Standort der Versuchsflächen in Ultuna, nahe Uppsala in Schweden | 50 |
| 3.1 | Schema der Synthese von Metalaxylsäure | 53 |
| 3.2 | Stationäres System zur Inkubation von ¹⁴ C-Metalaxyl im Boden | 54 |
| 3.3 | Das stationäre System mit sterilem Gesamtboden und mit auf Alginat immobilisierter Laccase | 55 |
| 3.4 | Schema der Aufarbeitung der Gesamtbodenproben | 64 |
| 3.5 | Schema der Aufarbeitung der Fraktionsproben | 65 |
| 3.6 | Schema der Huminstoff-Fraktionierung | 68 |
| 4.1 | Wiederfindung der applizierten Radioaktivität in mit ¹⁴ C-Metalaxyl und Resorcinol oder technischen Huminsäuren mit Laccase oder Lignin-Peroxidase | 83 |
| 4.2 | Wiedergefundenen Radioaktivität in in vitro Ansätzen mit ¹⁴ C-Metalaxyl und isolierten Huminstoff-Fractionen und Laccase oder Lignin-Peroxidase | 85 |
| 4.3 | Wiederfindung von ¹⁴ C in Bodenproben nach 10 Tagen Inkubation mit ¹⁴ C-Metalaxyl nach verschiedener Extraktion | 86 |
| 4.4 | Fotografien des Plattenbewuchses auf Vollmedienplatten zur Kontrolle der Sterilisation | 87 |
| 4.5 | Lineare Regression der Extinktionen der Substratlösungen ABTS und TMB | 92 |
| 4.6 | Vergleich organischer Kohlenstoffgehalte in Gesamtbodenproben und Fraktionsproben nach Umrechnung | 96 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.7 | Vergleich der Aktivitäten extrazellulärer Phenoloxidasen in Gesamtbodenproben und Fraktionsproben nach Umrechnung | 99 |
| 4.8 | Lineare Regression der Peakhöhe nach Detektion von Ergosterol | 100 |
| 4.9 | Zusammensetzung der extrahierbaren Radioaktivität der Gesamtbodenproben | 104 |
| 4.10 | Zusammensetzung der nicht extrahierbaren Radioaktivität der Gesamtbodenproben | 105 |
| 4.11 | HPLC-Chromatogramms des Fraktionswassers nicht sterilen Gesamtbodens (Ultuna nativ) 92 Tagen Inkubation | 106 |
| 4.12 | Radio-Chromatogramm eines Extraktes des Fraktionswassers nicht sterilen Gesamtbodens nach 92 Tagen Inkubation | 107 |
| 4.13 | Nicht extrahierbare Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Gesamtbodenproben nach 10 Tagen Inkubation | 109 |
| 4.14 | Nicht extrahierbare Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Gesamtbodenproben nach 92 Tagen Inkubation | 110 |
| 4.15 | DC Platte und Auswertung eines Extraktes nach alkalischer Hydrolyse der Huminfraction des Schluffs einer Gesamtbodenprobe (Ultuna _{SE.ST.}) | 113 |
| 4.16 | Zusammensetzung der extrahierbaren Radioaktivität der Fraktionsproben | 115 |
| 4.17 | HPLC-Chromatogramms des „Fraktionswassers“ der Fraktionsprobe Schluff (nativ) nach 92 Tagen Inkubation | 117 |
| 4.18 | Nicht extrahierbare Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Fraktionsproben nach 10 und 92 Tagen Inkubation | 119 |
| 4.19 | Nicht extrahierbare Radioaktivität in den Huminstoff-Fraktionen der Fraktionsproben in Proben mit Enzymzugabe | 123 |
| 5.1 | Größenanteile und Quellen des Substratumsatzes von ABTS und TMB durch Oxidation in den Gesamtbodenproben beruhend auf der jeweiligen Behandlung des Bodens | 138 |
| 5.2 | Prozess der alkalischen Hydrolyse | 147 |
| 5.3 | Strukturformel des Metalaxyl-Metaboliten N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamid | 158 |
| A1 | Fragmentierung und ausgewählte Fragment-Ionen des Fungizids Metalaxyl in der massenspektrometrischen Analyse | 195 |
| A2 | HPLC Chromatogramm nach Injektion von Metalaxyl und Metalaxylsäure | 195 |
| A3 | Beispiel eines mittels Bioimager gescannten Radiofilms, der mit einer DC-Platte entwickelt wurde | 196 |
| A4 | LC-MS Chromatogramm des mit HPLC aufgereinigten 2.Metaboliten | 197 |

Formeln zur Berechnung

| | | |
|------|--|----|
| [1] | Berechnung des Korrekturfaktors für die Verbrennungsanalyse | 61 |
| [2] | Berechnung des Tongehalts in der Schlufffraktion | 68 |
| [3] | Bestimmung der Wasserhaltekapazität einer Bodenprobe | 70 |
| [4] | Berechnung der DMSO-Reduktionsrate | 72 |
| [5] | Umrechnung der mikrobiellen Aktivität einer Fraktion auf den jeweiligen Masseanteil dieser Fraktion am Gesamtboden | 72 |
| [6] | Berechnung der extrazellulären Phenoloxidaseaktivität | 73 |
| [7] | Berechnung der extrazellulären Peroxidaseaktivität | 74 |
| [8] | Lambert-Beersches Gesetz | 74 |
| [9] | Umrechnung der extrazellulären Enzymaktivität einer Fraktion auf den jeweiligen Masseanteil dieser Fraktion am Gesamtboden | 74 |
| [10] | Bestimmung der Gewichts Differenz nach Glühverlust | 75 |
| [11] | Bestimmung des organischen Bodenanteils durch Glühverlust | 75 |
| [12] | Umrechnung der organischen Bodenanteils einer Fraktion auf den jeweiligen Masseanteil dieser Fraktion am Gesamtboden | 75 |
| [13] | Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehaltes | 76 |

Anhang

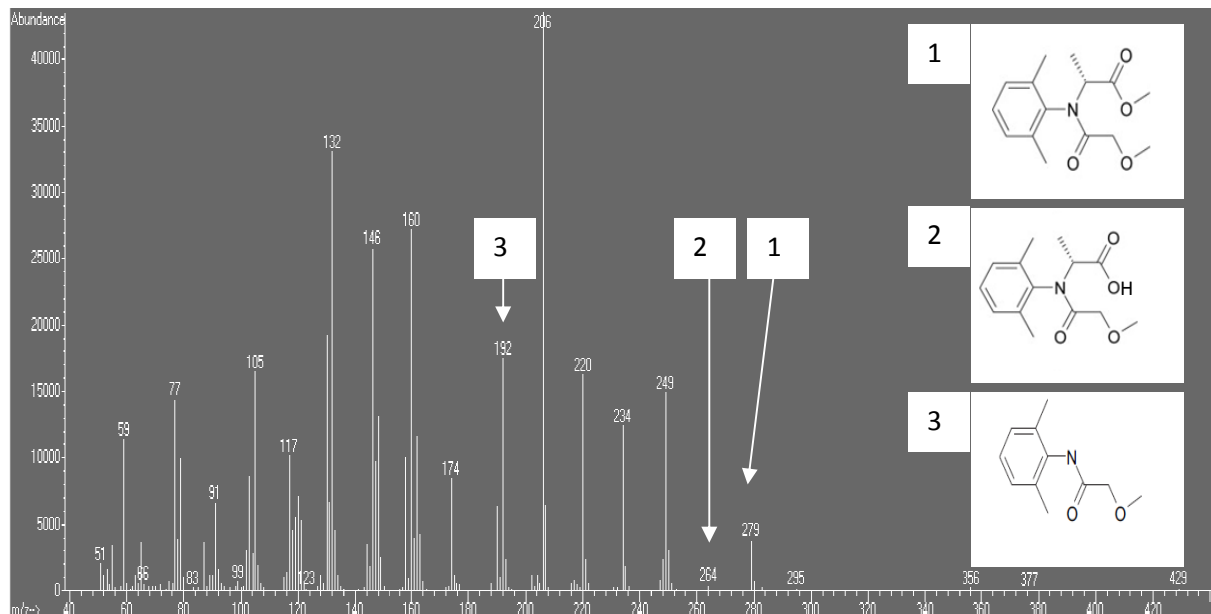


Abb. A1: Fragmentierung und ausgewählte Fragment-Ionen des Fungizids Metalaxyl in der massenspektrometrischen Analyse. Die den mit 2 und 3 bezeichneten Fragment-Ionen zu Grunde liegenden chemischen Strukturen wurde in der vorliegenden Studie als tatsächliche Metaboliten des Fungizids (1) detektiert. 1= Metalaxyl ([N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanin-methyl ester]); 2= Metalaxylsäure (N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanin); 3 = 2. Metabolit (N-(2,6-dimethyl-phenyl)-2-methoxyl-acetamide).

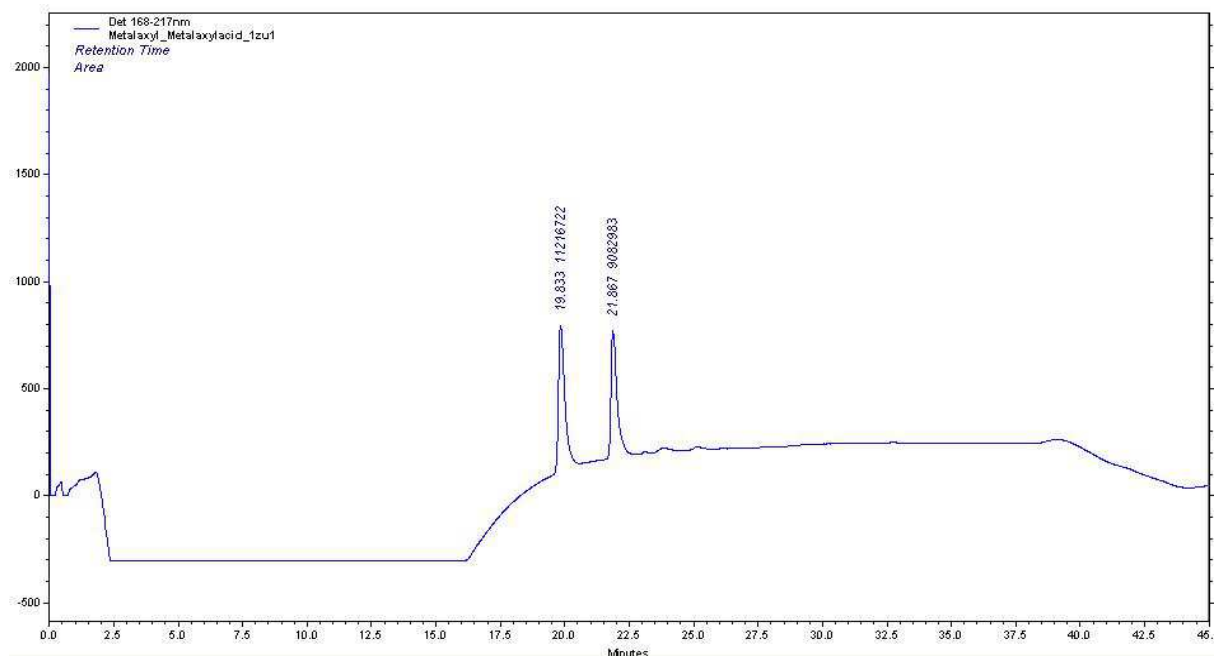


Abb. A2: HPLC Chromatogramm nach Injektion von Metalaxyl und Metalaxylsäure (jeweils 100 µg, gelöst in Methanol). Metalaxyl wurde bei einer Retentionszeit von 19,83 min, Metalaxylsäure wurde bei einer Retentionszeit von 21,8 min im UV-Kanal bei 266 nm detektiert.

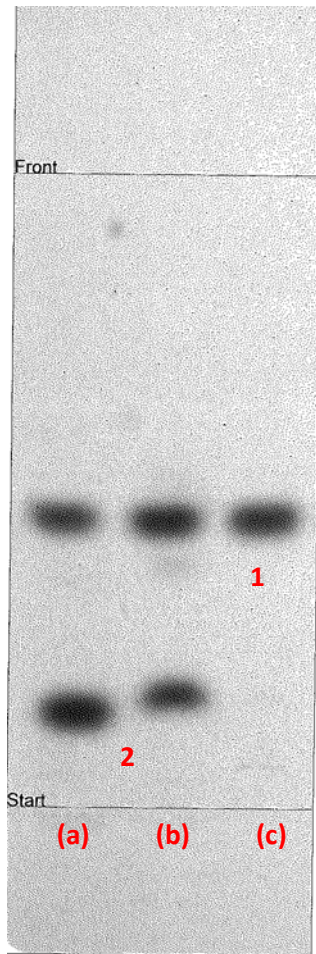
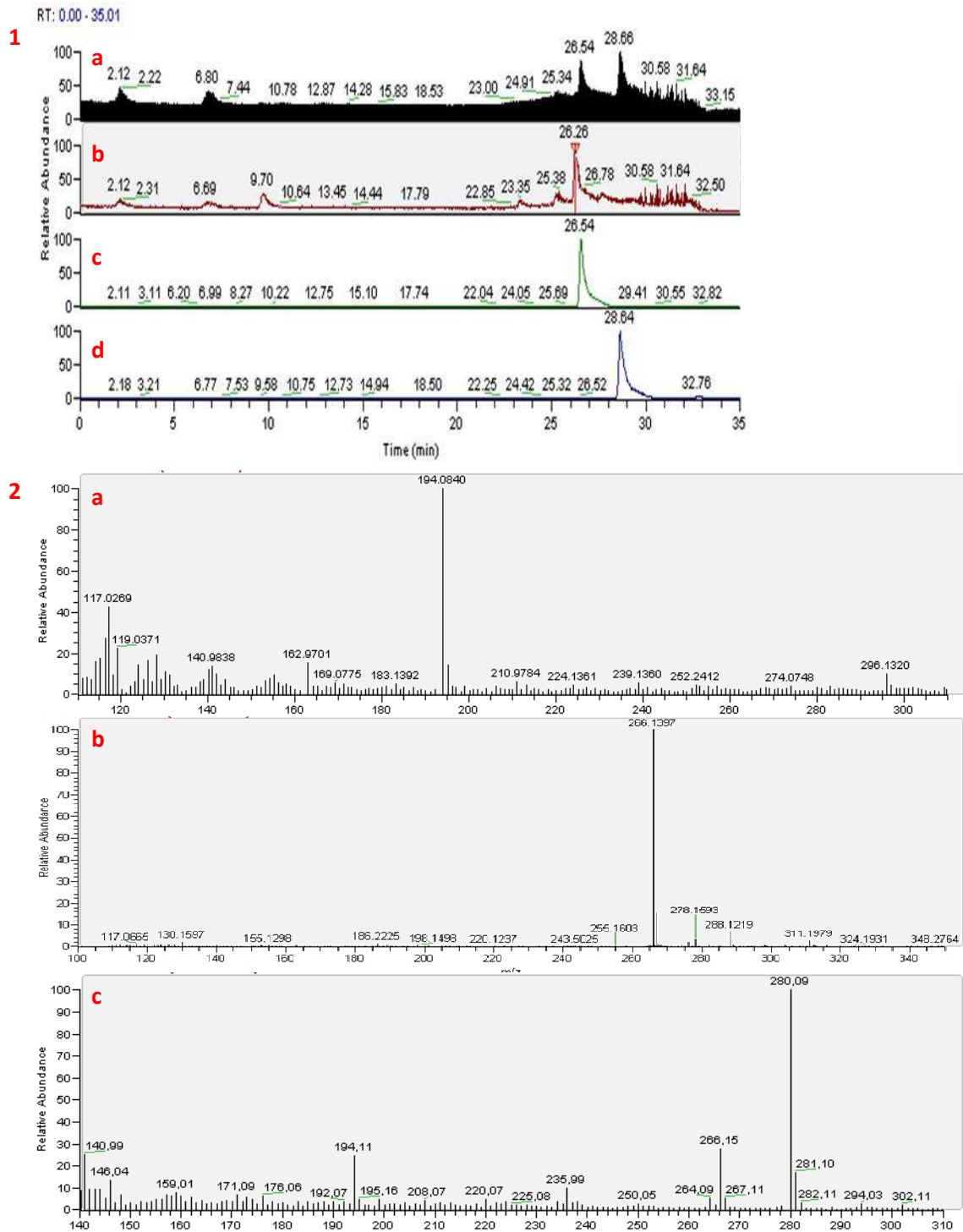


Abb. A3: Beispiel eines mittels Bioimager gescannten Radiofilms, der mit einer DC-Platte entwickelt wurde. Aufgetragen wurden Dichlormethanextrakte der Humine der Gesamtbodenproben Ultuna (nativ) auf Spur (a), Ultuna_γ-bestrahlt auf Spur (b) und Ultuna_{SE.ST.} auf Spur (c) nach 10 Tagen Inkubation. Mit Co-Chromatographie wurden die detektierten Substanzen als Metalaxyl (1) und Metalaxylsäure (2) identifiziert.





Danksagung

Ich danke vielmals....

Herrn Prof. Andreas Schäffer für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit an seinem Lehrstuhl und zahlreiche Hilfestellungen, Ratschläge und Diskussionen.

Frau Professor Ursula Prierer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Burkhard Schmidt für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine unermüdliche Bereitschaft zur Betreuung, hilfreichen Diskussionen und zahlreichen Ratschlägen, die die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Professor Paolo Nannipieri für hilfreiche Anregungen und eine rege Kommunikation.

für die Finanzierung des Schwerpunktprogramms SPP1315 durch die deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und allen Teilnehmern des Programms für hilfreiche Diskussionen.

Frau Brigitte Thiede und Hilde Patti für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie zahlreiche heitere Momente.

Frau Daniela Claßen, Frau Thordis Zegarski und Herrn Christian Gottfroh für ihre tatkräftige Anteilnahme am Forschungsprojekt.

Dem gesamten Team des Instituts Biologie 5 der RWTH Aachen und insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Burkhard Schmidt für eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt...

... meinen Eltern und der ganzen Familie für ihre Unterstützung

... meinen Freunden für die schöne Zeit

... Laura für alles.