

Abschlussbericht

Studie zur Bedeutung von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren für die Roh- und Trinkwasserbeschaffenheit in Deutschland

Mai 2014

Dr. Marco Scheurer

Dr. Frank Sacher

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Brauch

DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Karlsruhe

Herausgeber

DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e. V.
Technisch-wissenschaftlicher Verein
Josef-Wirmer-Straße 1–3
53123 Bonn

T +49 228 91885
F +49 228 9188990
info@dvwg.de
www.dvgw.de

**Studie zur Bedeutung von
Nitrifikations- und
Ureaseinhibitoren für die Roh- und
Trinkwasserbeschaffenheit in
Deutschland**

Abschlussbericht
DVGW-Förderkennzeichen W 1/01/12

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	8
2	ANWENDUNG, EIGENSCHAFTEN UND UMWELTVERHALTEN VON NITRIFIKATIONS- UND UREASEINHIBITOREN.....	14
2.1	NITRIFIKATIONSINHIBITOREN	14
2.1.1	1H-1,2,4-Triazol	15
2.1.2	Dicyandiamid (DCD).....	16
2.1.3	3,4-DMPP	20
2.1.4	3-Methylpyrazol.....	22
2.1.5	Nitrapyrin.....	23
2.2	UREASEINHIBITOREN	23
2.2.1	NBPT	24
2.2.2	2-NPT.....	25
3	ETABLIERUNG EINER MULTIMETHODE ZUR SPURENANALYTISCHEN ERFASSUNG VON NITRIFIKATIONS- UND UREASEINHIBITOREN	26
3.1	FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHE METHODE FÜR DEN NACHWEIS DER IN DEUTSCHLAND ZUGELASSENEN VERBINDUNGEN	26
3.2	GASCHROMTOGRAPHISCHE NACHWEISMETHODE FÜR NITAPYRIN	37
4	ERGEBNISSE EINES MONITORING-PROGRAMMS ZUM VORKOMMEN VON NITRIFIKATIONS- UND UREASEINHIBITOREN.....	38
4.1	UNTERSUCHUNGEN AN GRÖßEREN FLIEßGEWÄSSERN	38
4.1.1	1H-1,2,4-Triazol	38
4.1.2	DCD	40
4.2	UNTERSUCHUNGSPROGRAMM IN EINEM LANDWIRTSCHAFTLICH GENUTZTEN EINZUGSGEBIET	43
4.3	UNTERSUCHUNG VON GRUND- UND TRINKWÄSSERN	47
5	ABBAUBARKEIT UND MOBILITÄT VON NITRIFIKATIONS- UND UREASEINHIBITOREN	49
5.1	HYDROLYSE.....	49
5.2	FESTBETTBIOREAKTOR (TESTFILTER)	50

5.3	ADSORPTION AN BODENPARTIKEL.....	52
6	AUSWIRKUNG VON NITRIFIKATIONSHEMMERN AUF DEN ABBAU VON ORGANISCHEN SPURENSTOFFEN.....	54
7	ZUSAMMENFASSUNG	60
8	LITERATUR	62
9	ANHANG.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs.....	9
Abbildung 2: Strukturformeln von NBPT und seines Metaboliten NBPTO, der in Böden durch den biologischen Abbau von NBPT entsteht.	25
Abbildung 3: Extrahierte Chromatogramme eines 50 ng/L Standards der Zielanalyten in Reinstwasser.	31
Abbildung 4: Durchbruch in % der untersuchten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren durch zwei unterschiedliche Festphasenkartuschen. Konzentration 1 µg/L in Reinstwasser.	32
Abbildung 5: Wiederfindung der Zielanalyten in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer mit Stickstoff.	33
Abbildung 6: Wiederfindung der Zielanalyten in Reinst- und Trinkwasser nach Anreicherung mit einem Rotations-Vakuum-Konzentrator.	34
Abbildung 7: Wiederfindung der Analyten nach Filtration mittels 0,45 µm PTFE-Spritzenfilter, Matrix Reinstwasser.	35
Abbildung 8: Wiederfindungen von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren bei der Direktinjektion von Trink- und Oberflächenwasser (Rhein).	36
Abbildung 9: Boxplots der 1H-1,2,4-Triazol Messwerte im Rhein (Anzahl der Messungen/Positivbefunde).	38
Abbildung 10: 1H-1,2,4-Triazol Einzelwerte vom April 2013 im Rheinverlauf.	39
Abbildung 11: Boxplot-Darstellung aller DCD-Messwerte im Rheinverlauf.	40
Abbildung 12: Probenahmestellen (rot) an Oberrhein, Neckar, Jagst, Kocher und Main sowie ausgewählte DCD-Messwerte (Mittelwerte und Standardabweichung) zur Verdeutlichung des Einflusses des Jagst-Einzugsgebiets.	42
Abbildung 13: Probenahmestellen 5 (links) und 7 (rechts) im Untersuchungsgebiet.	44
Abbildung 14: Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung für Acesulfam, Hydrochlorothiazid, DCD und 1H-1,2,4-Triazol in einem landwirtschaftlich genutzten Flusseinzugsgebiet. Nicht beprobte Fließgewässer sind nicht eingezeichnet. Konzentrationen in µg/L.	46
Abbildung 15: Messwerte für Acesulfam, Hydrochlorothiazid, DCD und 1H-1,2,4-Triazol an den Fließgewässern 1 und 2 im August 2013. Für Acesulfam sind 1/10 der gemessenen Konzentrationen dargestellt.	47
Abbildung 16: Gehalte an 1H-1,2,4-Triazol und DCD in 81 untersuchten Grundwasserproben.	48

Abbildung 17: Gehalte an 1H-1,2,4-Triazol und DCD in 23 untersuchten Trinkwasserproben.	49
Abbildung 18: Verhalten von 1H-1,2,4-Triazol (links) und Dicyandiamid (rechts) in Standversuchen. Matrix Reinstwasser; Konzentration 2 µg/L.	50
Abbildung 19: Zylinder mit Sinterglasperlen (links) und schematischer Aufbau des Festbettbioreaktors (rechts).	50
Abbildung 20: Verhalten von 1H-1,2,4-Triazol (links) und Dicyandiamid (rechts) im Festbettbioreaktor. Matrix: Rheinwasser; dotierte Konzentration: 2 µg/L.	51
Abbildung 21: Adsorption von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren an Bodenpartikel (LUFA 2.1) bei zwei verschiedenen Boden-zu-Wasser-Verhältnissen (links 1:25, rechts 1:5).	53
Abbildung 22: Batchansätze in Anlehnung an den Zahn-Wellens-Test zur Untersuchung der Auswirkungen von Nitrifikationshemmern auf den Abbau anderer organischer Spurenstoffe.	57
Abbildung 23: Einfluss von Nitrifikationshemmern auf den Konzentrationsverlauf von organischen Spurenstoffen in Batchansätzen mit Belebtschlamm (modifizierter Zahn-Wellens-Test) über eine Testlaufzeit von sieben Tagen.	58
Abbildung 24: Konzentrationsverlauf von 1H-1,2,4-Triazol und DCD in Batchansätzen mit Belebtschlamm (modifizierter Zahn-Wellens-Test) über eine Testlaufzeit von sieben Tagen.	59
Abbildung A1: Extrahierte Chromatogramme von Thioharnstoff und 1H-1,2,4-Triazol zur Verdeutlichung der Totzeit der verwendeten flüssigchromatographischen Säule.	72
Abbildung A2: Extrahierte Chromatogramme von 1H-1,2,3-Triazol und 1H-1,2,4-Triazol zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Retentionszeiten.	72
Abbildung A3: Verhalten von 3,4-DMPP in Standversuchen. Matrix. Reinstwasser; Dotierkonzentration 2 µg/L.	79
Abbildung A4: Verhalten von 3,4-DMPP im Festbettbioreaktor. Matrix. Rheinwasser; Dotierkonzentration 2 µg/L.	79
Abbildung A5: Adsorption von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren an Bodenpartikel (LUFA 2.4) bei einem Boden-zu-Wasser-Verhältnissen von 1:5.	80
Abbildung A6: Konzentrationsverlauf des gelösten organischen Kohlenstoffs in einem modifizierten Zahn-Wellens-Test.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren mit CAS-Nummer und Strukturformel. Die in Deutschland nicht zugelassenen Wirkstoffe sind mit * gekennzeichnet.	13
Tabelle 2: Optimierte Interface Parameter.....	27
Tabelle 3: MS/MS-Parameter der untersuchten Analyten	28
Tabelle 4: Parameter der chromatographischen Trennung	30
Tabelle 5: Errechnete Bestimmungsgrenzen der Zielanalyten. Die angewendete Bestimmungsgrenze ist hervorgehoben.	36
Tabelle A1: Größere Fließgewässer mit $n>1$, die auf 1H-1,2,4-Triazol untersucht wurden, inkl. Anzahl Messungen (n), Positivbefunden ($n>BG$) sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen.....	73
Tabelle A2: Messergebnisse für organische Spurenstoffe, die begleitend in einem Einzugsgebiet mit landwirtschaftlicher Nutzung gemessen wurden.	74
Tabelle A2: Fortsetzung	75
Tabelle A2: Fortsetzung	76
Tabelle A2: Fortsetzung	77
Tabelle A2: Fortsetzung	78
Tabelle A3: Charakterisierung der Standardböden LUFA 2.1 und LUFA 2.4.	80

Abkürzungsverzeichnis

2-NPT	N-(2-Nitrophenyl)phosphorsäuretriamid
3,4-DMPP	3,4-Dimethyl-1 <i>H</i> -pyrazolphosphat
3-MP	3-Methylpyrazol
AOB	Ammonium oxidierende Bakterien
ATU	Allylthioharnstoff
DCD	Dicyandiamid
CMP	1-Carbamoyl-3-methylpyrazol
EE2	17 α -Ethinylestradiol
NBPT	N-(n-Butyl)-thiophosphortriamid
NBPTO	N-(n-butyl)phosphorsäuretriamid
TS	Trockensubstanz

1 Einleitung

Eine der größten Herausforderungen, denen sich die Menschheit im 21. Jahrhundert zu stellen hat, ist es, einer stark ansteigenden Nachfrage nach Nahrungsmitteln und Energie gerecht zu werden, ohne dabei die Umwelt weiter zu belasten. Eine Strategie, um die Versorgung mit Lebensmitteln langfristig sicher zu stellen, ist es, die Erträge bereits landwirtschaftlich genutzter Flächen zu steigern und somit den Umbruch von Grünland und die Zerstörung von Ökosystemen zu minimieren.

Dem Element Stickstoff kommt bei der Pflanzenproduktion sowohl hinsichtlich ökonomischer als auch hinsichtlich ökologischer Aspekte eine entscheidende Rolle zu. Stickstoff ist unerlässlich für die Bildung von Proteinen, Chlorophyll und Phytohormonen und beeinflusst wie kein anderer Pflanzennährstoff Ausbeute und Qualität der Ernte (Zerulla et al., 2001). Er wird deshalb in der Landbewirtschaftung mittels Düngung in organischer oder anorganischer Form ausgebracht. Die obersten 15 cm Bodenschicht enthalten zwischen 0,1% und 0,6% Stickstoff (Cameron et al., 2013), was einer Menge von 2.000 bis 12.000 kg N/ha entspricht. Stickstoff liegt als Bestandteil von organischem Material (Pflanzenreste, Pilze, Humus) und Bodenlebewesen, als gebundenes Ammonium und als Stickstoffverbindungen in Bodenlösung vor. Stickstoffverluste sind hauptsächlich in der Verflüchtigung von Ammoniak oder Stickstoff und in der Auswaschung von Ammonium oder Nitrat begründet (Cameron et al., 2013). Pflanzen nutzen überwiegend Nitrat- und Ammonium-Stickstoff, aber auch kleine organische Moleküle, die Stickstoff enthalten, wie beispielsweise Harnstoff, können assimiliert werden.

Die Effizienz von Stickstoffdüngern ist gering und oftmals wird weniger als die Hälfte des ausgebrachten Stickstoffs von den Pflanzen aufgenommen (Wiesler, 1998), so dass eine Stickstoffdüngung immer mit unerwünschten Effekten auf Hydrosphäre und Atmosphäre verbunden ist. Gasförmige Verluste entstehen durch Nitrifikations- und Denitrifikationsprozesse im Boden. Dabei wird Ammonium über die Zwischenstufen Nitrit und Nitrat zu elementarem Stickstoff, Stickoxiden (NO_x) und Lachgas (N_2O) und damit auch zu Treibhausgasen transformiert (Abbildung 1). Der in diesen Verbindungen enthaltene Stickstoff steht der Pflanze nicht mehr zur Verfügung. Durch die Verluste ändert sich auch das Stickstoff-zu-Phosphor-Verhältnis in ausgebrachter Gülle. Während frische Gülle ein Verhältnis von 5:1 aufweist, sind in gealterter Gülle beide Elemente zu gleichen Anteilen zu finden, was ungünstiger für das Pflanzenwachstum ist (Varel et al., 1999).

Die Oxidation von Ammonium zu Nitrat über die Zwischenstufe Nitrit hat zunächst den Vorteil, dass Nitrat aus der Bodenlösung leicht von Pflanzen aufgenommen werden kann. Allerdings ist Nitrat als Anion auch deutlich mobiler als Ammonium, das durch

elektrostatische Kräfte an die negativ geladenen Oberflächen von Tonmineralen oder organischem Material gebunden ist. Nitrat kann von der Bodenoberfläche, z. B. bei Starkregenereignissen, ausgewaschen und in Fließgewässer eingetragen werden. Auch eine Verlagerung in tiefere Bodenhorizonte bis hin in das Grundwasser ist möglich. Eine unerwünschte Eutrophierung von Fließgewässern und hohe Nitratgehalte im Grundwasser sind die Folge. Wünschenswert ist folglich, dass der Ammonium-Stickstoff adsorptiv an Bodenpartikel gebunden bleibt und den Pflanzen zur Aufnahme zu Verfügung steht, ohne dass eine Umwandlung zu Nitrat erfolgt.

Nitrifikationsinhibitoren verzögern die bakterielle Oxidation des Ammonium-Ions (NH_4^+), indem die Aktivität von *Nitrosomonas spp.* im Boden über einen bestimmten Zeitraum unterdrückt wird. Bakterien vom Typ *Nitrosomonas* wandeln Ammonium in Nitrit (NO_2^-) um, das wiederum von *Nitrobacter* und *Nitrosobulus* weiter zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert wird. Stickstoff wird folglich länger in der Ammonium-Form gehalten, um die Zeit für eine Aufnahme durch die Pflanzen zu verlängern. Außerdem kann die Entstehung von N_2O durch Inhibierung der Nitrifikation und der darauf folgenden Denitrifikation reduziert werden. Einige Nitrifikationsinhibitoren werden deshalb auch als Ammoniumstabilisatoren bezeichnet. Allerdings kann es dadurch zu einer erhöhten Emission von Ammoniak (NH_3) kommen (Kim et al., 2012).

Ureaseinhibitoren greifen noch früher in den Nitrifikationsprozess ein. Durch die Unterdrückung des Enzyms Urease wird die Umwandlung von Amid-Stickstoff zu Ammoniak verzögert. Hierdurch werden die gasförmigen Verluste von Ammonium und die Verluste bei der weiteren Umwandlung zu Nitrat, z. B. durch Versickerung, verringert.

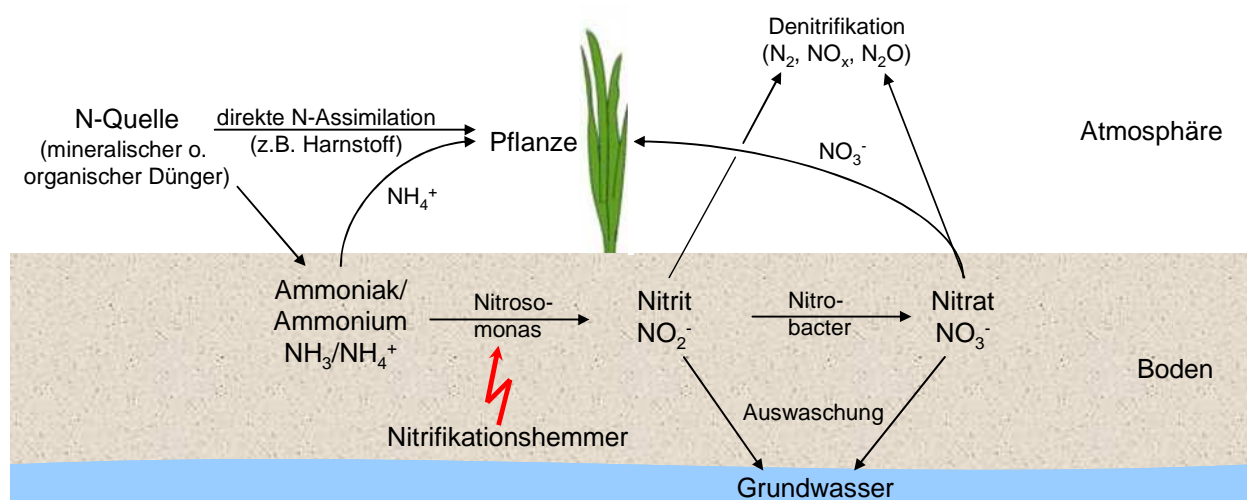


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs.

Die praktischen Vorteile von Nitrifikationsinhibitoren sind folglich (Zerulla et al., 2001 und darin zitierte Referenzen):

- eine deutliche Reduzierung der Nitrat auswaschung verglichen mit herkömmlichen Stickstoffdüngern,
- eine Reduzierung von Treibhausgasen, insbesondere von N_2O ,
- geringere Stickstoffverluste und eine bessere Stickstoffausnutzung durch die Pflanzen,
- eine längere Nährstoffverfügbarkeit, die zu Mehrerträgen bei Ernten führt, und
- eine Reduzierung des Arbeitsaufwands für Landwirte durch eine erhöhte zeitliche Flexibilität bei der Düngung.

Für Hunderte von Chemikalien ist bekannt, dass sie den Vorgang der Nitrifikation unterdrücken können (Zerulla et al., 2001). Viele wirken auf Grund ihrer bioziden Aktivität oder durch ihre Toxizität gegenüber bestimmten Mikroorganismen, die Ammonium oxidieren, einer Nitrifikation entgegen. (Huber et al., 1977). Allerdings ist der praktische Nutzen vieler Verbindungen auf Grund ihrer unzureichenden Wirkzeitraums, ihrer Phytotoxizität oder aus Umweltschutzgründen bedenklich. So wirken beispielsweise viele aromatische Verbindungen als Nitrifikationshemmer. In Laborversuchen mit 12 Nitroaromaten, 15 Amidoaromaten und 20 Hydroxyaromaten wurde für die meisten untersuchten Verbindungen ein inhibitorischer Effekt festgestellt. Die größte Wirksamkeit hatten 3-Nitroanilin, 4-Aminophenol und 3-Nitrophenol (Zhang et al., 2010). Auch Pflanzenbehandlungsmittel, die zur Bekämpfung von Unkraut oder Krankheiten und Schädlingen in der Landwirtschaft ausgebracht werden, können einen Einfluss auf nitrifizierende Bakterien haben. Bei der Applikation der empfohlenen Mengen haben Fungizide i. d. R. einen größeren inhibitorischen Effekt als Herbizide oder Insektizide (Huber et al., 1977). Für das Herbizid Simazin wurde bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden eine komplette Hemmung des Nitrifikationsprozesses und eine Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft Ammonium oxidierender Bakterien (AOB) festgestellt (Hernandez et al., 2011).

Insbesondere viele heterozyklische Stickstoffverbindungen wirken sehr effektiv einer Nitrifikation entgegen, besitzen aber bislang keine praktische Bedeutung oder keine Zulassung (McCarty und Bremner, 1989; McCarty, 1999). Die inhibitorischen Eigenschaften einiger Pyrazole auf die Nitrifikation von Ammonium wurden von Shi und Koautoren bestätigt (Shi et al., 2012). Die größte Wirkung hatten dabei 3-Methylpyrazol, 3,4-Dimethylpyrazol sowie 4-Chlor-3-methylpyrazol. Wichtig für die Wirksamkeit von

Pyrazolen ist die Anzahl und Anordnung der Stickstoffatome im Molekül. Verbindungen mit zwei oder drei benachbarten Stickstoffatomen hemmen die Nitrifikation am besten, wohingegen Verbindungen ohne benachbarte oder mit nur einem Stickstoffatom kaum eine oder keine Wirkung aufwiesen (McCarty und Bremner, 1989).

Auch Kaliumazid erwies sich in Laborversuchen als Substanz, die die Nitrifikation in Böden effektiv hemmen kann (Hughes und Welch, 1970). Thioharnstoff inhibierte das Wachstum von *Nitrosomonas* ebenfalls und verhinderte eine Nitrifikation, bis seine Konzentration durch Bodenorganismen auf ein Minimum reduziert wurde (Hays und Forbes, 1974). Auch natürlich vorkommende, pflanzliche Nitrifikationshemmer sind bekannt. In einigen Fällen geben die Pflanzenwurzeln direkt Verbindungen ab, die auf die Nitrifikation Einfluss nehmen. Das tropische Weidegras *Brachiaria humidicola* setzt Verbindungen frei, die bakterielle Enzyme blockieren und nitrifizierende Bakterien hemmen, aber keinen negativen Einfluss auf andere Bodenorganismen haben (Gopalakrishnan et al., 2009). Im Falle von Karanja (*Millettia pinnata*) ergaben Untersuchungen zu dem im Samen enthaltenen Wirkstoff Karanjin, dass der Furan-Ring des Moleküls für den inhibitorischen Effekt verantwortlich ist. Karanjin erwies sich in Topfkulturen mit Reis ähnlich effektiv wie der synthetisch hergestellte Nitrifikationshemmer Nitrapyrin (Sahrawat und Mukerjee, 1977). Für die Landwirtschaft macht man sich diese Eigenschaft zu Nutze, indem der Dünger eingekapselt oder mit einem entsprechenden „coating“ überzogen wird, das aus den Wurzeln, den Samen oder dem daraus gewonnenem Öl hergestellt wird. In vielen Fällen wirken diese natürlichen Verbindungen nicht nur einer Nitrifikation, sondern auch der Hydrolyse von Harnstoff entgegen. Insbesondere in Entwicklungs- oder Schwellenländern wird dieser Ansatz aus Kostengründen verfolgt. Darüber hinaus sind die Ausgangsprodukte in ländlichen Gegenden verfügbar und können in die landwirtschaftliche Produktion als umweltfreundliche Alternative integriert werden. Einen guten Überblick zur Thematik geben die Übersichtsartikel von Upadhyay et al., 2011 und Subbarao et al., 2007 und 2012.

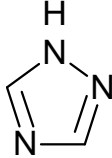
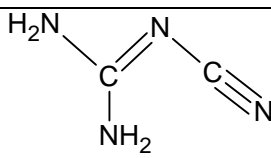
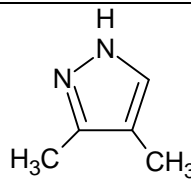
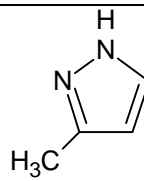
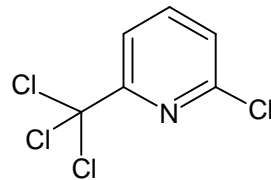
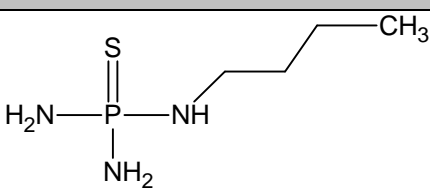
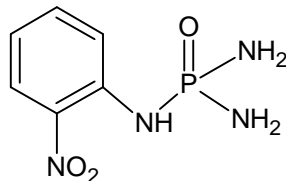
Auch Verbindungen wie 1H-Benzotriazol, eine Verbindung glykolbasierter Flugzeugenteisungsmittel und Korrosionsschutzmittel, und einige seiner Derivate wie 5-Chlor-1H-benzotriazol, 1-Hydroxybenzotriazol und 5-Methylbenzotriazol, von denen einige in den vergangenen Jahren als ubiquitär vorkommenden Spurenstoffe identifiziert wurden, wirken als Nitrifikationshemmer (McCarty und Bremner, 1989). Eine Hemmung der Nitrifikation ist allerdings in Kompartimenten, in denen eine Ammoniumentfernung durch eine Kombination aus Nitrifikation und Denitrifikation erwünscht ist, beispielsweise in Kläranlagen, unerwünscht (Callender und Davis, 2002). 1H-Benzotriazol und 5-Methylbenzotriazol wurden bereits in Konzentrationen im zweistelligen µg/L-Bereich in Kläranlagenzuläufen nachgewiesen (Voutsas et al., 2006), scheinen aber auf diesem

Konzentrationsniveau keine negativen Effekte auf die biologische Reinigungsstufe zu haben.

Die zielgerichtete Suche nach einem spezifischen Nitrifikationshemmer, der einen kommerziellen Einsatz in der Landwirtschaft erlaubt, begann gegen Ende der 1950er Jahre. 1962 wurde dann Nitrapyrin in den USA eingeführt. In Europa erlangte hauptsächlich Dicyandiamid (DCD) Bedeutung (Zerulla et al., 2001 und darin zitierte Referenzen). In Deutschland sind Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren in der Düngemittelverordnung (DüMV) geregelt. Die zugelassenen Verbindungen besitzen lediglich einen bakteriostatischen Effekt. Die am Nitrifikationsprozess beteiligten Bakterien werden selbst bei wiederholter Anwendung nicht abgetötet, sondern ihre Aktivität wird lediglich unterdrückt bzw. gehemmt. Die Wirkung von Nitrapyrin beruht dagegen auf seiner bioziden Aktivität, d. h. seiner Toxizität gegenüber Bodenorganismen. Die in dieser Studie untersuchten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Datenblätter mit Informationen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen sind im Anhang dieses Berichts zu finden. Die Informationen darin wurden aus verschiedenen Datenbanken und Bibliotheken zusammengetragen oder entstammen Fachartikeln. Sind mehrere Werte angegeben, waren die gesammelten Informationen nicht einheitlich.

Ziel dieser Studie zur Bedeutung von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren für die Roh- und Trinkwasserbeschaffenheit in Deutschland war es, zunächst durch eine intensive Literaturstudie Informationen über Anwendung, Wirkung, physikalisch-chemische Eigenschaften und Umweltverhalten der wichtigsten Verbindungen dieser Stoffklasse zu erhalten. Des Weiteren sollte eine spurenanalytische Nachweismethode für die Bestimmung von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren aus Wasser entwickelt werden. Um einen Überblick über die Bedeutung der Stoffklasse in Deutschland zu erhalten, sollte ein Monitoringprogramm zum Vorkommen der wichtigsten Verbindungen in Grund- und Oberflächenwässern durchgeführt werden. Außerdem sollten Laborversuche zur Abbaubarkeit und Mobilität von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren durchgeführt und die Auswirkungen der Verbindungen auf den Abbau anderer organischer Spurenstoffe untersucht werden.

Tabelle 1: Untersuchte Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren mit CAS-Nummer und Strukturformel. Die in Deutschland nicht zugelassenen Wirkstoffe sind mit * gekennzeichnet.

Name CAS-Nummer	Strukturformel
Nitrifikationsinhibitoren	
1H-1,2,4-Triazol 288-88-0	
Dicyandiamid (DCD) 461-58-5	
3,4-Dimethylpyrazol (3,4-DMPP) 2820-37-3	
3-Methylpyrazol (3-MP) 1453-58-3	
Nitrapyrin* 1929-82-4	
Ureaseinhibitoren	
N-(n-Butyl)thiophosphortriamid (NBPT)* 94317-64-3	
N-(2-Nitrophenyl)phosphorsäuretriamid (2-NPT) 874819-71-3	

2 Anwendung, Eigenschaften und Umweltverhalten von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Sichtung von wissenschaftlicher Literatur sowie sog. „grauer Literatur“ (Internetseiten, Unternehmensbroschüren, Berichte, Diplom- und Doktorarbeiten) dargestellt. Ziel war es, Informationen über die Anwendung der in Deutschland eingesetzten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren zu erhalten. Im Rahmen der Recherche sollten Daten zu den wichtigsten Anwendungsgebieten, Anwendungsmengen sowie den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen erhoben werden. Es wurden auch Informationen über bisher eingesetzte analytische Nachweismethoden gesammelt, die in Kapitel 3 kurz vorgestellt werden.

Die zur Thematik vorhandene Literatur ist umfangreich, beschäftigt sich allerdings hauptsächlich mit der Wirksamkeit der Verbindungen und kaum mit dem Verhalten oder dem Vorkommen in der aquatischen Umwelt. Für eine ganzheitliche Betrachtung der Thematik „Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren“ ist eine Darstellung der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Wirkung der Substanzen aber dennoch von Relevanz, da sie indirekt auch Einfluss auf die Nitratauswaschung und somit auf die Rohwasserqualität nehmen.

2.1 Nitrifikationsinhibitoren

Nitrifikationsinhibitoren finden Verwendung in flüssigen und granulierten Mineraldüngern, in Flüssigmistdüngern und Biogasgülle (Flessa et al., 2012). Sie wirken inhibierend auf das Kupferenzym Ammonium-Monooxygenase, das die Oxidation von Ammonium katalysiert. Es wird angenommen, dass Nitrifikationshemmer dabei als Chelatbildner mit dem Kupfer im Enzym einen Komplex bilden und dieses so deaktivieren. Dafür spricht auch, dass die Zugabe von Cu(II) die inhibierende Wirkung von Nitrifikationshemmern auf das Enzym aufhebt (Vandevivere et al., 1998).

Das Verhalten von Nitrifikationshemmern in der Umwelt wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. So sind beispielsweise die Ausbringungsmenge, der Verbleib auf der Bodenbedeckung und in den oberen Bodenschichten und das Verlagerungspotenzial in Grund- und Oberflächenwässer von zahlreichen Faktoren abhängig.

2.1.1 1H-1,2,4-Triazol

1H-1,2,4-Triazol wird weltweit in großen Mengen hergestellt. Im Jahr 2002 lag die Produktionsmenge in den USA zwischen 500.000 und 5 Millionen Kilogramm (NCBI, 2014). Die Verbindung ist nach der Verwaltungsvorschrift für wassergefährdende Stoffe (VwVwS) mit der Stoff-Nr. 1341 in die Wassergefährdungsklasse 2 (wassergefährdend) eingestuft. Es wird eine reproduktionstoxische Wirkung vermutet und die Verbindung wurde in die Negativliste der deutschen Kosmetikverordnung aufgenommen (KosmetikV, 1997). 1H-1,2,4-Triazol ist darüber hinaus auch ein Metabolit, der beim Abbau von Azolfungiziden entstehen kann.

Nach den Ergebnissen der Literaturrecherche spielt 1H-1,2,4-Triazol als Nitrifikationshemmer international keine bedeutende Rolle. In Deutschland scheint die Verbindung allerdings neben DCD und 3,4-DMPP der wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse zu sein. Sie wird jedoch nur in Kombination mit anderen Nitrifikationshemmstoffen eingesetzt. Gemäß Düngemittelverordnung (DüMV) ist ein Gemisch aus DCD und 1H-1,2,4-Triazol im Verhältnis 10:1 oder ein Gemisch aus 1H-1,2,4-Triazol und 3-Methylpyrazol im Verhältnis 2:1 zulässig (DüMV, 2008). 1H-1,2,4-Triazol wird beispielsweise von der Firma SKW Stickstoffwerke Piesteritz GmbH unter den Markennamen ALZON®flüssig und PIADIN® im Gemisch mit 3-Methylpyrazol vertrieben. Diese Mischungen erlauben die deutliche Reduzierung der DCD-Ausbringungsmenge, mindern die schädlichen Nebenwirkungen von 3-Methylpyrazol und erhöhen die Toleranz der Pflanzen gegen 1H-1,2,4-Triazol (Trenkel, 2010). Der größte Vorteil resultiert allerdings auf der synergistischen Wirkung mit anderen Nitrifikationshemmern. In Labor- und Freilandversuchen mit DCD und 1H-1,2,4-Triazol verblieben im Boden hohe Ammoniumgehalte und die N₂O-Emissionen wurden um bis zu 83 % reduziert (Weber et al., 2004). Untersuchungen mit zwölf nicht-substituierten heterozyklischen Stickstoffverbindungen zeigten, dass insbesondere Verbindungen mit zwei oder drei benachbarten Stickstoffatomen, wie 1H-1,2,4-Triazol oder Benzotriazol, die Nitrifikation in Böden hemmten. Dagegen hatten Verbindungen mit nur einem (z. B. Pyridin) sowie Verbindungen mit zwei oder drei nicht benachbarten Stickstoffatomen (z. B. Imidazol) wenig oder keinen Einfluss auf die Ammoniak-Oxidation. Auch einige substituierte Pyrazol-, Triazol- oder Pyridin-Verbindungen können die Nitrifikation in Böden unterdrücken (McCarty und Bremner 1989).

Umweltverhalten

Eine Adsorption an Schwebstoffe oder Sedimente ist auf Grund der chemisch-physikalischen Eigenschaften von 1H-1,2,4-Triazol unwahrscheinlich und die Verbindung wird als Substanz mit geringer Adsorptionsneigung und hoher Mobilität eingestuft (US EPA, 2009). Das Potential zur Anreicherung in Wasserorganismen ist mit einem Biokonzentrationsfaktor von 3 ebenfalls gering (US EPA, 2009). Auch eine Hydrolyse ist auf Grund des Fehlens entsprechender funktioneller Gruppen ohne Bedeutung. Es findet weder eine direkte Photolyse durch Sonnenlicht noch eine indirekte Photolyse bei Vorhandensein von Huminsäuren statt. Berechnete Halbwertszeiten für Modellfließgewässer und Seen betragen 20 bzw. 150 Tage (NCBI, 2014). In einer Studie zum biologischen Abbau gemäß OECD-Richtlinie 302B wurde ein minimaler Abbau von 1 % festgestellt. Bei aeroben Abbauversuchen in drei verschiedenen Böden mit einer 1H-1,2,4-Triazol-Konzentration von 60 µg/kg lagen die Halbwertszeiten zwischen sechs und zwölf Tagen (US EPA, 2009). Bei einem positiven Nachweis von 1H-1,2,4-Triazol in der Umwelt ist zu beachten, dass die Verbindung auch als Metabolit beim biologischen Abbau von Triazol-Fungiziden wie beispielsweise Ipconazol gebildet werden kann (Schermerhorn et al., 2005; Eizuka et al., 2003).

2.1.2 Dicyandiamid (DCD)

Das weltweite Produktionsvolumen für DCD wurde für das Jahr 2002 auf ca. 40.000 t geschätzt. Neuere Daten sind nicht verfügbar. DCD wird neben dem Einsatz in der Landwirtschaft als Ausgangsverbindung in chemischen Prozessen in der Papier-, Zellstoff- und Textilindustrie eingesetzt. Außerdem findet die Verbindung Verwendung in der Pharmaindustrie und in Galvanikbetrieben (OECD, 2003b).

Die Wirksamkeit von DCD als Nitrifikationshemmer wurde in zahlreichen Studien belegt. In einem Feldversuch in Neuseeland, bei dem 1.000 kg N/ha ausgebracht wurden, konnte die Auswaschungsmenge an Nitrat-Stickstoff durch den Einsatz von 10 kg DCD/ha um ca. 36 % reduziert werden. Die Emissionen von Lachgas wurden mehr als halbiert (Di und Cameron, 2012). In Lysimeter-Tests mit zwei unterschiedlichen Böden und drei Bepflanzungen konnte die Auswaschung von Nitrat um bis zu 59 % und die N₂O-Emission um bis zu 84 % durch den Einsatz von 10 kg DCD/ha reduziert werden (Cui et al., 2011). Bei der gleichen Ausbringungsmenge erhöhte sich die Trockensubstanz der Bepflanzung um ca. 40 % gegenüber den ausschließlich gedüngten Flächen. Darüber hinaus wurden die Nitrat-Konzentrationen signifikant reduziert (Moir et al., 2012). In anderen Studien wird von wenig konsistenten Ergebnissen bei der Anwendung von DCD berichtet. Als Ursache

wurde vermutet, dass das ausgebrachte DCD durch Regenfälle in Bereiche unterhalb der Wurzelzone der Pflanzen ausgewaschen wurde, und dadurch dessen Effektivität reduziert war. Auch hohe Boden- und Lufttemperaturen werden als mögliche Faktoren angeführt, die die Halbwertszeit von DCD verringern können (O'Connor et al., 2012). Die Vorteile von DCD werden folglich vom Zeitpunkt der Applikation beeinflusst, da seine Wirksamkeit temperaturabhängig ist und von starken Regenfällen negativ beeinflusst werden kann. Über einen Beobachtungszeitraum von 4 Jahren wurde beispielsweise eine sehr variable jährliche Reduzierung der Stickstoffauswaschung zwischen 21 % und 56 % beobachtet (Monaghan et al., 2009). Die Abhängigkeit der Wirksamkeit von DCD von den vorherrschenden Standortbedingungen wurde auch in einer neuseeländischen Studie aufgezeigt. Hier wurden die N₂O-Emissionen auf einer der untersuchten Flächen über einen Zeitraum von 5 Jahren zwischen 61 % und 70 % reduziert. Dagegen war an einem sehr feuchten Standort überhaupt kein positiver Effekt von DCD festzustellen (de Klein et al., 2011).

Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit von DCD wurde in der Vergangenheit auch auf Nachteile der Verbindung hingewiesen. DCD wird von einigen Autoren als zu teuer für großflächige Anwendungen angeführt. Auf Grund der relativ geringen Effektivität wird eine vergleichsweise hohe Einsatzmenge notwendig, um eine ausreichende Hemmung der Nitrifikation zu erreichen. Für DCD wird, ähnlich wie für Nitrapyrin (siehe 2.1.7), eine gewisse Giftigkeit gegenüber Pflanzen beschrieben. Bei Sojabohnensetzlingen wurde eine Chlorose an älteren Blättern, ein verringertes Wurzelwachstum sowie ein geringeres Trockengewicht beobachtet (Maftoun und Sheibany, 1979). Auf die Menge der Mikroorganismen im Boden und die enzymatische Aktivität wirkte sich die Anwendung von DCD über einen Zeitraum von 7 Jahren nicht negativ aus. DCD kann also als spezifischer Enzyminhibitor für die Ammonium-Oxidation angesehen werden und beeinflusst keine anderen Zielorganismen (Guo et al., 2013). Eine weitere Risikobewertung von Tindaon und Koautoren kommt zu einem ähnlichen Ergebnis. In Böden mit drei unterschiedlichen Texturen wurde die Auswirkung von DCD auf die Dehydrogenase-Aktivität untersucht. Negative Effekte wurden nur bei Konzentrationen festgestellt, die 40 bis 100 Mal über den empfohlenen Ausbringungsmengen lagen (Tindaon et al., 2012).

Umweltverhalten

Der Verbleib von DCD im Boden wird von der Wasserdurchlässigkeit und der Bodentemperatur bestimmt. Bei Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren handelt es sich bis auf Nitrapyrin um meist kleine und sehr polare Moleküle mit log K_{OW}-Werten im Bereich von -1 bis 1. Für DCD wird eine hohe Mobilität und eine entsprechend schnelle Verlagerung in tiefere Bodenschichten in Feldversuchen berichtet. Durch die hohe

Wasserlöslichkeit von DCD kann bei Starkregenereignissen eine Translokation innerhalb des Bodenprofils und damit eine Separierung vom zu stabilisierenden Ammonium erfolgen (Teske und Matzel, 1988). Perkolationsversuche mit drei verschiedenen Böden zeigten, dass sich DCD leichter als Ammonium-Stickstoff in tiefere Bodenschichten verlagert und so nicht mehr mit diesem gemeinsam vorliegt. Dies schränkt die Wirksamkeit von DCD ein. Für Harnstoff wurde in zwei von drei Böden die gleiche Beobachtung gemacht. In einem sandigen Lehm mit niedriger Kationenaustauscherkapazität bewegte sich DCD etwas langsamer fort, was auf eine bessere Wirksamkeit schließen lässt (Abdel-Sabour et al., 1990). Vergleichsweise hohe Verluste an DCD (55 % bis 69 %) in Bodentiefen von mehr als 60 cm stellen eine wichtige auslaugbare Stickstoffquelle dar. Bei Applikationsmengen zwischen 10 und 60 kg DCD/ha entsprach dies in Freilandversuche 4 bis 27 kg N/ha (Welten et al., 2013). Aus diesem Grund wurden bereits Versuche unternommen, DCD grasenden Tieren direkt zu verabreichen, um eine großflächige Ausbringung zu reduzieren. DCD wurde dabei zu ca. 90 % über den Urin ausgeschieden und führte zu einer mehr als 90 %igen Hemmung der Nitrifikation über einen Zeitraum von 70 Tagen (Ledgard et al., 2008). Bei der Ausbringung von mit DCD versetzter Gülle im November und März verlief der DCD-Abbau nach der Märzapplikation deutlich schneller. Bei Versuchsende im Mai war in beiden Fällen noch ca. 30 % des ausgebrachten DCDs nachweisbar (Vilsmeier und Amberger, 1987). In Laborversuchen wurde beobachtet, dass offensichtlich eine Adaptation der DCD-abbauenden Mikroorganismen stattfindet. So lag die durchschnittliche Halbwertszeit bei 20 °C in Böden, die vorher bereits mit DCD behandelt worden waren, bei 7 Tagen, in unbehandelten Böden bei 19 Tagen. Die Abbauraten korrelierten positiv mit der Bodentemperatur, wobei bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C eine Verdoppelung der Abbauraten festzustellen war (Rajbanshi et al., 1992).

Da verschiedene Publikationen von einer Auswaschung in tiefere Bodenschichten von mehr als 50 % des eingesetzten DCD berichten (Menneer et al., 2008; Welten et al., 2013) ist bei dränierten Flächen ein Eintrag von DCD in Drainagen und in die Vorfluter dieser Systeme denkbar. Das Konzentrationsmuster von DCD im Drainage-Wasser von verschiedenen Bodentypen wurde als Hinweis auf einen hauptsächlich konvektiv-dispersiven Transport gewertet (Shepherd et al., 2012). Die Autoren verweisen auch hier auf einen Einfluss der Bodentypen und der Niederschlagsmenge auf die Auswaschung von DCD (12 % bis 46 %). Bei einer Anwendungsmenge von 10 kg DCD/ha wurden Maximalkonzentrationen von 2,9 mg/L im Ablauf der Lysimeter gemessen. Dabei wurde DCD noch 15 Monate nach der Ausbringung nachgewiesen. Dies verdeutlicht die Langlebigkeit der Verbindung. In Feldversuchen mit einem Bodentyp mit schlechter Wasserdurchlässigkeit und der gleichen Ausbringungsmenge DCD wurden über vier Jahre

ca. 7 % des eingesetzten DCD ausgewaschen. Das Muster der detektierten DCD-Konzentrationen entsprach dem von Nitrat, was die Mobilität des Nitrifikationshemmers unterstreicht. Im Drainagewasser wurden hier Höchstkonzentrationen von bis zu 4,5 mg/L DCD gemessen, die als hoch genug beurteilt wurden, um einen Einfluss auf die Stickstoff-Prozesse in Feuchtgebieten und Fließgewässern zu haben (Monaghan et al., 2009).

Literaturangaben über Mobilität und Persistenz von DCD sind sehr heterogen und offensichtlich stark von den vorherrschenden Umweltbedingungen abhängig. In Feldstudien mit sandigem Boden wurde ein verzögerter Abbau von DCD in der kalten Jahreszeit beobachtet. In tieferen Bodenschichten (90-100 cm) war der Abbau selbst in den Sommermonaten verzögert, so dass im Sickerwasser DCD noch ein Jahr nach Anwendung nachgewiesen wurde. Eine Auswaschung in flache, Grundwasser leitende Schichten wurde angenommen und von einer Ausbringung im Herbst abgeraten. (Corré und Zwart, 1995).

Die OECD schätzt DCD als nicht leicht abbaubare Verbindung ein, erwähnt aber Studien, die von einem kompletten Abbau innerhalb neun Monaten unter aeroben und zwölf Monaten unter anaeroben Bedingungen berichten. Eine Verlagerung von der Wasserphase in andere Umweltkompartimente ist unwahrscheinlich. Das Potential zur Bioakkumulation wird als gering eingeschätzt (OECD, 2003a).

Die einzige Studie zum Vorkommen von DCD in Oberflächengewässern wurde in Neuseeland durchgeführt, von wo auch zahlreiche Veröffentlichungen zu landwirtschaftlichen Feldversuchen zur Wirksamkeit von DCD stammen. Es wurden 15 Oberflächengewässer im Einzugsgebiet von landwirtschaftlich genutzten Flächen beprobt. An 14 Probenahmestellen konnte DCD nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Positivbefunde lag in einem Konzentrationsbereich von 200 µg/L bis 500 µg/L (Höchstkonzentration ca. 1 mg/L). Die DCD-Konzentrationen korrelierten positiv mit den Konzentrationen an Ammonium, der elektrischen Leitfähigkeit und dem Ammonium-zu-Nitrat-Verhältnis, wohingegen eine negative Korrelation mit dem Gehalt an gelöstem Sauerstoff festgestellt wurde (Smith und Schallenberg, 2013). In Laborversuchen mit Sediment-Wasser-Mesokosmen wurden kürzere Halbwertszeiten für DCD als in Böden beobachtet. Diese lagen abhängig vom Konzentrationsniveau des Nitrifikationshemmers zwischen sieben und elf Tagen. Bei Konzentration von 100 µg/L und 600 µg/L DCD wurden in den Mesokosmen keine Unterschiede zu den Kontrollproben hinsichtlich des Ammoniumabbaus festgestellt. Diese wurden erst bei der höchsten Testkonzentration von 1,4 mg/L DCD sichtbar. Ein Schwellenwert zur Nitrifikationshemmung in der aquatischen Umwelt müsste folglich dazwischen liegen und damit höher sein, als die bislang durchschnittlich nachgewiesenen Umweltkonzentrationen (Smith und Schallenberg, 2013).

Untersuchungen zum Abbau von Stickstoffverbindungen in einem stark mit Harnstoff belasteten Industrieabwasser (21,5 g/L) ergaben, dass das ebenfalls enthaltene DCD selbst nach einer hydraulischen Aufenthaltszeit von sechs Tagen noch mit der Ausgangskonzentration nachgewiesen wurde. Selbst bei einer Halbierung der DCD-Konzentration auf 0,22 mg/L durch Verdünnung, war noch eine starke Hemmung der Nitrifikation festzustellen (Rittstieg et al., 2001). Estermaier und Koautoren berichteten dagegen, dass DCD biologisch abgebaut werden kann, da es als Substrat für Urease dienen kann (Estermaier et al., 1992). Es findet dabei eine äquimolare Hydrolyse zu Cyan-Harnstoff und Ammoniak statt.

Durch die Untersuchungen von Rittstieg und Koautoren wird deutlich, dass eventuelle Befunde von DCD in der aquatischen Umwelt nicht nur in einer Verlagerung bei der gezielten Ausbringung von DCD in der Landwirtschaft begründet sein können. DCD ist ebenfalls ein wichtiger Baustein für die Synthese von Kunststoffen und vieler weiterer Industrieprodukte. Auch über Befunde in Nahrungsmitteln wurde bereits berichtet. So wurde DCD beispielsweise in 7 von 17 untersuchten Kreatin-Proben mit Konzentration von bis zu 710 mg/kg nachgewiesen. Synthetisch hergestelltes Kreatin wird von Sportlern als leistungssteigerndes Mittel eingesetzt und kann je nach Herstellungsverfahren mit DCD verunreinigt sein (CVUA Karlsruhe, 2001). Anfang 2013 wurden auch in Molkereiprodukten aus Neuseeland DCD-Rückstände nachgewiesen. Hier wurde vermutet, dass diese Befunde auf die tatsächliche Verwendung als Nitrifikationshemmer zurückzuführen sind. Grundsätzlich erscheint somit ein Eintrag von DCD über industrielles und kommunales Abwasser ebenso möglich wie durch diffuse Einträge aus der landwirtschaftlichen Anwendung.

2.1.3 3,4-DMPP

3,4-DMPP besitzt gegenüber DCD den Vorteil, dass es, abhängig von der ausgebrachten Stickstoffmenge, schon bei geringeren Anwendungsmengen von 0,5–1,5 kg DMPP/ha die Nitrifikation hemmt (Zerulla et al., 2001). In vergleichenden Studien mit DCD wird von ähnlichen Lachgas-Emissionen und Nitrat-Auswaschungen bei nur ca. einem Zehntel der Aufwandsmenge berichtet (Di und Cameron, 2012; Weiske et al., 2001).

Wie für andere Nitrifikationshemmer bereits kurz beschrieben, ist auch im Falle von 3,4-DMPP eine negative Korrelation zwischen Wirksamkeit und steigender Bodentemperatur festzustellen. Bei Inkubationsstudien bei 5 °C und bei Zugabe von 3,4-DMPP war nach 140 Tagen praktisch keine Nitrifikation von Ammoniumsulfat festzustellen. Bei 20 °C und sonst unveränderten Bedingungen war mit 3,4-DMPP die Nitrifikation nach 40 Tagen

komplett, ohne 3,4-DMPP waren es nur zwischen 7 und 21 Tage (Zerulla et al., 2001). In einer spanischen Studie wurde hinsichtlich der N₂O-Emissionen ebenfalls die größte Wirksamkeit von 3,4-DMPP bei kalten und feuchten Bedingungen festgestellt. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass die Effektivität von 3,4-DMPP nicht nach der absoluten Reduzierung von Emissionen beurteilt werden kann, sondern dass bei höheren Porenwassergehalten auch eine Denitrifikation stattfindet, die die Wirksamkeit von Nitrifikationshemmern maskieren kann (Menendez et al., 2012).

Eine Risikoeinschätzung zu 3,4-DMPP ergab negative Einflüsse auf die mikrobielle Aktivität in Böden erst bei Konzentrationen, die 25 bis 90 Mal über der empfohlenen Anwendungsmenge lagen. Dabei waren die Konzentrationen, bei denen keine Effekte mehr festgestellt werden konnten (NOEL, no observable effect levels), in Tonböden am höchsten, was mit einer rascheren Immobilisierung des Nitrifikationshemmers durch Tonminerale begründet wurde (Tindaon et al., 2012).

In Feldversuchen wurde eine deutliche Reduktion von AOB im Oberboden und im Wurzelraum nach der Anwendung von 3,4-DMPP festgestellt. Dagegen konnte keine negative Beeinflussung auf Ammonium oxidierende Archeen festgestellt werden, die als Nitrifizierer ebenfalls eine wichtige Rolle spielen und somit die Wirkung von 3,4-DMPP maskieren können (Kleineidam et al., 2011). Von Yang und Koautoren wurde ein Rückgang der AOB-Diversität bei der Anwendung von 3,4-DMPP beobachtet. Als mögliche Ursache wird nicht die Wirkung von 3,4-DMPP, sondern eine geringe Toleranz bei starker Ammonium-Akkumulation genannt (Yang et al., 2013). Allerdings ist über spezifische Wirkmechanismen von 3,4-DMPP auf Bakterien wenig in der Literatur beschrieben. So wurde beispielsweise bereits vermutet, dass 3,4-DMPP auch hemmend auf die denitrifizierenden Bakterienpopulationen wirkt (Pfab et al., 2012).

Umweltverhalten

In einer dreijährigen Studie wurde an Freilandlysimetern die Auswaschung von ¹⁴C-markiertem 3,4-DMPP untersucht. Die Verbindung wurde in den ersten beiden Jahren mit 0,85 kg/ha bzw. mit 1,1 kg/ha appliziert. Bei jährlichen Niederschlagsmengen enthielt das Sickerwasser in allen drei Jahren jeweils nur ca. 1 % des markierten Kohlenstoffs. Die 3,4-DMPP-Gehalte lagen immer unter 0,1 µg/L. Die Aufnahme von 3,4-DMPP und seinen Metaboliten in die Pflanzen lag deutlich unter 1 %, wohingegen zwischen 34 % und 51 % im Boden wiedergefunden wurden. Die fehlenden Anteile wurden einer kompletten Mineralisierung und daraus folgenden Verlusten an ¹⁴CO₂ zugeschrieben. Diese Annahme wird durch Abbaueversuche bekräftigt, bei denen Mineralisierungsraten von bis zu 1 % pro Tag für 3,4-DMPP beobachtet wurden (Fettweis et al., 2001). Eine deutliche Abnahme der

3,4-DMPP-Konzentrationen von durchschnittlich mehr als 30 % zwischen Tag 11 und 23 nach Applikation wird auch von anderen Autoren beschrieben. Dabei wurde keine Abhängigkeit von der Bodentemperatur festgestellt. Allerdings wirkte sich ein höherer Wassergehalt des Bodens positiv auf die Stabilität von 3,4-DMPP aus (Menendez et al., 2012).

Das geringe Verlagerungspotential von 3,4-DMPP im Verhältnis zu Ammonium in den ersten Zentimetern der Bodenschicht wurde auch in Laborversuchen festgestellt. Im Gegensatz zu DCD wurde 3,4-DMPP langsamer als Ammonium in tiefere Bodenschichten verlagert. Ein Einfluss der Bodenfeuchte wurde nicht beobachtet. Vielmehr wurde die unterschiedliche Molekülgröße der beiden Verbindungen als Grund für die Separierung angeführt (Azam et al., 2001).

2.1.4 3-Methylpyrazol

3-Methylpyrazol ist gemäß DüMV nur als Gemisch mit 1H-1,2,4-Triazol im Verhältnis 1:2 oder mit DCD im Verhältnis 1:15 zugelassen. Diese Mischungen werden in Deutschland unter den Handelsnamen ALZON[®] und PIADIN[®] vertrieben. 3-Methylpyrazol ist auch der Hauptmetabolit des Nitrifikationshemmers 1-Carbomoyl-3-methylpyrazol (CMP), der früher in der ehemaligen DDR und in Osteuropa Verwendung fand. CMP hat, abhängig vom Bodentyp, nur eine Halbwertszeit von 24 bis 48 Stunden und wird nach Ausbringung rasch zu 3-Methylpyrazol umgesetzt.

Die Wirksamkeit der Wirkstoffkombination 1H-1,2,4-Triazol/3-Methylpyrazol wurde in Freilandversuchen bewiesen. Ertrag und Stickstoffeffizienz konnten bei verschiedenen Kulturen signifikant erhöht werden, wobei eine Reduktion von Lachgas um 60-75 % erreicht wurde (Fuchs et al., 2011). In Freilandversuchen mit Mais führte eine Ausbringungsmenge von 5-6 Liter PIADIN[®]/ha zu einer deutlich erkennbaren Nitrifikationshemmung bei Gülle sowie zu einer verbesserten Stickstoffaufnahme und einem erhöhten Ertrag (Schmidhalter et al., 2011). Bei Untersuchungen mit 12 nicht substituierten und 33 substituierten heterozyklischen Stickstoffverbindungen zeigte 3-Methylpyrazol mit die beste nitrifikationshemmende Wirkung, die durch eine weitere Ringsubstitution zu 3-Methylpyrazol-1-carboxamid nicht weiter verstärkt werden konnte. Ähnlich Beobachtungen wurden auch für andere Verbindungen gemacht, so dass geschlossen werden kann, dass der inhibitorische Effekt durch benachbarte Stickstoffatome im Ring hervorgerufen wird (McCarty und Bremner, 1989).

Untersuchungen zum Umweltverhalten von 3-Methylpyrazol sind nicht bekannt.

2.1.5 Nitrapyrin

Nitrapyrin wird unter dem Handelsnamen N-Serve® vertrieben. Es handelt sich bei Nitrapyrin um eine Organochlorverbindung, die in Deutschland gemäß DüMV nicht als Nitrifikationshemmer zugelassen ist. Sie findet ausschließlich in den USA Anwendung. Nitrapyrin muss wegen seiner Flüchtigkeit in den Boden eingearbeitet oder injiziert werden (Trenkel, 2010). In Feldversuchen wurde bei oberflächiger Ausbringung eine über 80 %ige Verflüchtigung innerhalb eines Tages beobachtet, wohingegen bei einer Einarbeitung in 3 cm Bodentiefe eine Wirksamkeit über mindestens neun Wochen beobachtet wurde (Briggs, 1975). Nitrapyrin besitzt eine gewisse Phytotoxizität, die sich beispielsweise in einer verringerten Wurzellänge oder einem reduzierten Trockengewicht äußern kann (Chambers et al., 1980). Die Phytotoxizität ist höher als bei anderen Nitrifikationshemmern, z. B. DCD (Maftoun und Sheibany, 1979). Nitrapyrin kann auch inhibierend auf Methanbildner in Sedimenten wirken. Diese Wirkung ist wahrscheinlich im Trichlormethylrest des Moleküls begründet, da keine Hemmung der Methanogenese nach alkalischer Hydrolyse der Verbindung und der Abspaltung von drei Chloräquivalenten mehr festzustellen war (Salvas und Taylor, 1980).

Umweltverhalten

Nitrapyrin besitzt einen $\log K_{OW}$ -Wert >3 und ist daher in Böden wenig mobil, auch wenn die Voraussetzung für eine Auswaschung gegeben ist. Seine Effektivität als Nitrifikationshemmer ist deshalb deutlich größer als die von ähnlich wirksamen Verbindungen, die leichter mit dem Sickerwasser verlagert werden (Briggs, 1975; Cochran et al., 1973). In der Literatur werden Halbwertszeiten von bis zu 50 Tagen beschrieben, die positiv mit dem Anteil an organischem Material im Boden korrelierten (Briggs, 1975). Nitrapyrin kann in der Umwelt durch Hydrolyse, aerob sowie anaerob abgebaut werden. Dies führt zusammen mit seinen Sorptionseigenschaften und seiner Flüchtigkeit dazu, dass eine Verlagerung in Grund- und Oberflächenwasser bei vorgeschriebener Anwendung begrenzt ist (Wolt, 2000).

2.2 Ureaseinhibitoren

Die Hydrolyse von Harnstoff und die Bildung von Ammoniak werden in der Umwelt häufig durch das von Mikroorganismen gebildete Enzym Urease katalysiert. Alle bekannten Ureasen weisen zwei Nickel-Atome auf, die über eine Carboxylat-Gruppe miteinander verbunden sind (Dominguez et al., 2008; Font et al., 2008). Die maximale Umwandlungsrate bei hohen Harnstoffkonzentration wird als Ureaseaktivität bezeichnet.

Neben der Harnstoffkonzentration ist die Temperatur ein wichtiger Einflussfaktor. Unter Praxisbedingungen kann die Harnstoffhydrolyse bereits nach wenigen Stunden abgeschlossen sein. Ureaseinhibitoren sollen der Umwandlung von Harnstoff durch Inhibierung des Enzyms Urease entgegenwirken. Unter den bekannten Ureasehemmstoffen sind die Derivate von Phosphordiamiden und -triamiden am effektivsten. Es wird angenommen, dass die den Phosphor umgebenden Stickstoff- oder Sauerstoffatome an die Nickelionen binden (Dominguez et al., 2008) und so die Ureaseaktivität hemmen.

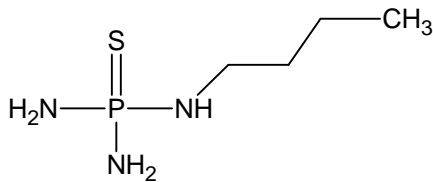
2.2.1 NBPT

N-(n-Butyl)-thiophosphortriamid (NBPT) wird unter dem Handelsnamen Agrotain® vertrieben. In den USA ist es seit 1997 erhältlich (Varel et al., 1999). Die Wirksamkeit von NBPT als Ureaseinhibitor wurde in zahlreichen Studien belegt. In Versuchen zur Harnstoffverwertung stieg die Stickstoffaufnahme von Naßreis um mehr als das Doppelte, was zu einem Kornmehrtrag von fast 40 % führte (Byrnes et al., 1989). Die Effektivität von NBPT verringert sich mit niedrigem pH-Wert und korrelierte folglich auch negativ mit dem Calciumcarbonat-Gehalt des Bodens. Eine Korrelation mit dem Anteil an organischem Kohlenstoff im Boden wurde nicht festgestellt (San Francisco et al., 2011). Da Harnstoff nicht nur gezielt als synthetischer Dünger eingesetzt wird, sondern auch in der Viehhaltung entsteht, ist seine Konservierung bis zum Zeitpunkt der Gülleausbringung wichtig. Bei einer Einsatzmenge von 20 mg NBPT pro kg Gülle in Fütterungsställen wurde eine deutliche Akkumulation von Harnstoff in der Gülle im Vergleich zur Kontrollprobe nachgewiesen (Varel et al., 1999). Viele Erkenntnisse zu NBPT wurden durch vergleichende Untersuchungen mit Nitrifikationshemmern, meist DCD, gewonnen. Kawakami und Koautoren berichteten von einer verbesserten Stickstoffaufnahme beim Einsatz von NBPT. Dieser positive Effekt konnte allerdings beim gleichzeitigen Einsatz von NBPT und DCD nicht beobachtet werden. Die Autoren führen eine mögliche Phototoxizität oder die Verlängerung des Zeitraums einer möglichen Verflüchtigung von Ammonium als Gründe an (Kawakami et al., 2012). Auch in anderen Studien konnte eine Reduzierung der Stickstoffverluste nur dann beobachtet werden, wenn NBPT und DCD nicht in Kombination angewendet wurden (Menneer et al., 2008).

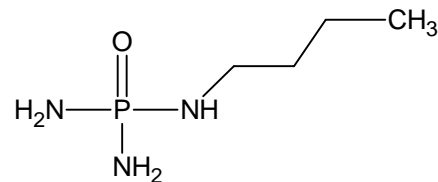
Umweltverhalten

Während sich viele Studien zur Wirksamkeit von NBPT mit der Verringerung von Harnstoff-N beschäftigen, ist bereits seit mehr als zwei Jahrzehnten bekannt, dass NBPT in Böden offensichtlich sehr rasch durch Mikroorganismen abgebaut wird. Die Halb-

wertszeit in einem nicht-sterilisierten Boden lag bei 7,5 Tagen, wohingegen in einem sterilisierten Boden die Verbindung nach 22 Tage noch mit der Hälfte der Ausgangskonzentration nachzuweisen war (Tao et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass NBPT selbst kaum inhibitorische Eigenschaften gegenüber Urease besitzt (Creason et al., 1990; Kot et al., 2001). Die Aktivität wurde wenige Stunden nach der Ausbringung auf Böden nachgewiesen und ist der Bildung des Sauerstoffanalogons von NBPT, dem N-(n-Butyl)-phosphorsäuretriamid (NBPTO), zuzuschreiben (Creason et al., 1990; Font et al., 2008). Für beide Verbindungen wurde ein schnellerer Abbau in sauren Böden als in Böden mit neutralem pH-Wert beobachtet (Hendrickson und Douglass, 1993). Die Effektivität der Ureasehemmung korrelierte in diesen Versuchen sehr stark mit der Konzentration an NBPTO.



N-(n-Butyl)thiophosphortriamid (NBPT)



N-(n-Butyl)phosphorsäuretriamid (NBPTO)

Abbildung 2: Strukturformeln von NBPT und seines Metaboliten NBPTO, der in Böden durch den biologischen Abbau von NBPT entsteht.

2.2.2 2-NPT

N-(2-Nitrophenyl)phosphorsäuretriamid (2-NPT) ist der einzige in Deutschland gemäß DüMV zugelassene Ureasehemmstoff. Seine Einsatzmenge beträgt, bezogen auf den Carbamidstickstoff, 0,04 % bis 0,15 % (DüMV, 2008). Die Literaturrecherche ergab, dass sowohl Daten zur Stabilität, Mobilität und Toxizität als auch zum Umweltverhalten bisher nicht in der Fachliteratur beschrieben sind.

3 Etablierung einer Multimethode zur spurenanalytischen Erfassung von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren

Ziel der Methodenentwicklung war es, eine Multimethode zu etablieren, welche die Bestimmung aller ausgewählter Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren aus Grund- und Oberflächenwässern in einem chromatographischen Lauf ermöglicht. Dabei sollte die Probenvorbereitung möglichst minimiert werden, um den zeitlichen Aufwand und die Analysenkosten gering zu halten.

3.1 Flüssigchromatographische Methode für den Nachweis der in Deutschland zugelassenen Verbindungen

Die bisher publizierten Methoden zum Nachweis der Zielverbindungen genügen den beschriebenen Anforderungen nicht, da hier der Fokus auf einem qualitativen Nachweis der Nitrifikationshemmung lag oder nur einzelne Vertreter der in Deutschland zugelassenen Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren analysiert wurden. Iizumi und Koautoren (1998) entwickelten einen Biotest mit *Nitrosomonas europaea*, der auf der Messung der Biolumineszenz beruht. Wurden die Bakterien nitrifikationshemmenden Substanzen ausgesetzt, nahm die Lichtemission abhängig von Zeit und Dosis ab. Bereits nach einer Versuchsdauer von zehn Minuten wurde eine deutliche Hemmung von 80 % bzw 40 % bei 0,1 µM Allylthioharnstoff und Nitrapyrin festgestellt (Iizumi et al., 1998). Damit kann der Test für die Überwachung des Nitrifikationsprozesses in Kläranlagen geeignet sein. Im Störfall liefert er jedoch keine Informationen über die verursachende Verbindung und kann nicht zur Identifizierung des Einleiters beitragen. Bereits in den 1970er Jahren wurde eine kolorimetrische Methode zur Analyse von DCD in Bodenextrakten vorgestellt. DCD bildet dabei mit 1-Naphtol und Diacetyl einen rötlichen Farbkomplex, der zwischen 535 und 540 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Eine Beeinflussung der Farbreaktion durch DCD verwandte Verbindungen und natürliche Aminosäuren wurde nicht festgestellt. Allerdings liegt die Bestimmungsgrenze der Methode im unteren mg/L-Bereich und ist somit für einen spurenanalytischen Nachweis ungeeignet (Vilsmeier, 1979). Eine ähnliche Bestimmungsgrenze für DCD von 0,5 mg/L wurde durch die Trennung auf einer Kationentauscher-Säule mit 0,025 M Schwefelsäure und UV-Detektion bei 210 nm erreicht (Schwarzer und Haselwandter, 1996). Die kolorimetrische Methode nach Vilsmeier wurde auch in einer kürzlich publizierten Studie aus Neuseeland angewendet, um erstmalig DCD in Oberflächengewässern nachzuweisen (Smith und Schallenberg, 2013). Mit einer 10 cm Küvette konnte eine Nachweisgrenze von 25 µg/L erreicht werden.

Die amerikanische Umweltschutzbehörde EPA entwickelte eine flüssig-chromatographische Trennmethode mit massenspektrometrischer Detektion zum Nachweis von 22 Triazol-Verbindungen in festen Lebensmitteln und Wasser. Im Fokus standen drei Metabolite, die allen 14 untersuchten Fungiziden gemein sind, u. a. 1H-1,2,4-Triazol, das auch Gegenstand dieser Studie ist. Bei der entwickelten Methode konnte mittels Festphasenextraktion von 50 mL Wasser mit einem Mixed-Mode-Kationenaustauscher eine Bestimmungsgrenze von 300 ng/L für 1H-1,2,4-Triazol erreicht werden. Die Trennung erfolgt mit einer 250 mm C18-Säule. Aus der Studie wird die Herausforderung deutlich, für polare und kleine Verbindungen wie 1H-1,2,4-Triazol akzeptable Wiederfindungen bei der Festphasenextraktion und eine Retention bei der chromatographischen Trennung zu erreichen (Schermerhorn et al., 2005).

Innerhalb dieses Forschungsvorhabens erfolgte die Detektion der Zielanalyten mit einem API 5500 Tandem-Massenspektrometer von AB Sciex im MRM-Modus (engl. multiple reaction monitoring) bei positiver Ionisation mittels Electrospray Interface. Die optimierten Interface-Parameter sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Optimierte Interface Parameter

Collision gas	medium
Curtain gas	40 psi
Ion source gas 1	60 psi
Ion source gas 2	70 psi
Ion spray voltage	5.500 V
Ionisation mode	positive
Temperatur	600 °C
Entrance potential	10 V

Falls möglich, wurden für jede Substanz zwei geeignete Massenübergänge mit möglichst hoher Intensität ausgewählt und die optimalen Einstellungen im Tune Modus ermittelt. Tabelle 3 fasst die verwendeten Massenübergänge sowie die optimalen Bedingungen für die Fragmentierung der Analyten zusammen. Produktionen, die in Klammern angegeben sind, besitzen eine sehr geringe Intensität und können nur bei hohen Konzentrationen für eine Auswertung genutzt werden.

Tabelle 3: MS/MS-Parameter der untersuchten Analyten

Analyt	Vorläuferion	Produktion	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	CXP ^c (V)
1H-1,2,4-Triazol	70,0	43,0	150	27	8
	70,0	28,1	150	41	10
DCD	85,0	68,0	66	27	6
	85,0	42,9	66	21	20
3,4-Dimethylpyrazol	97,0	56,1	116	23	10
	97,0	42,0	116	37	18
3-Methylpyrazol	83,0	42,0	156	25	8
	83,0	56,1	156	23	10
NBPT	168,1	95,0	56	25	10
	168,1	74,0	56	15	10
2-NPT	217,0	199,9	51	13	16
	217,0	121,0	51	23	18
¹⁵ N ₄ -DCD	89,0	71,0	86	25	12

^a DP = declustering potential in Volt, ^b CE = collision energy in Elektronenvolt, ^c CXP = cell exit potential in Volt

Eine chromatographische Trennmethode sollte eine ausreichende Retention der Zielanalyten und somit eine Abtrennung von der im Totvolumen eluierenden Salzfracht ermöglichen. Zudem ist auch bei einer massenspektrometrischen Detektion eine Basislinientrennung aller Signale wünschenswert. Bei einigen Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren handelt es sich um sehr polare Verbindungen, für die keine zufriedenstellende Retention auf klassischen Umkehrphasen, die auf apolaren Wechselwirkungen beruhen, erreicht werden kann. Vorversuche mit der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) lieferten vielversprechende Ergebnisse für 1H-1,2,4-Triazol und Dicyandiamid. Bei

dieser Trenntechnik werden polare stationäre Phasen verwendet, auf denen sich zusätzlich eine Puffer- bzw. Wasserschicht befindet, in die polare Verbindungen migrieren können und so retardiert werden. Allerdings ist diese Trenntechnik nur für sehr polare Analyten geeignet. Des Weiteren bedingt der spezielle Trennmechanismus oftmals breitere Peaks und die Säulen bedürfen einer verhältnismäßig langen Equilibrierzeit. Bei HILIC-Säulen werden zwar die gleichen Gradientensysteme wie bei der Umkehrphasenchromatographie verwendet, allerdings werden die Analyten mit zunehmendem Wasseranteil von der Säule eluiert, d. h. Gradientensysteme beginnen mit einem hohen Anteil an organischem Lösemittel, i. d. R. Acetonitril. Dies hat zur Folge, dass die injizierten Proben einen hohen Anteil Acetonitril enthalten sollten, um eine Retention zu fördern und einer unerwünschten Peakverbreiterung entgegenzuwirken. Bei einer Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion (SPE) ist solch ein Lösemittelwechsel nach der Elution die Regel und bedeutet keine Verschlechterung der Methodenperformance. Wird allerdings bei einer HILIC-Trennung eine Direktinjektion der Probe angestrebt (siehe unten), muss diese mit Acetonitril entsprechend verdünnt werden, was sich negativ auf die erreichbaren Bestimmungsgrenzen auswirkt.

Da aus den oben genannten Gründen eine Chromatographie mit klassischen silicabasierten Umkehrphasen sowie mit HILIC-Säulen nur unter Einschränkungen geeignet war, wurde die Möglichkeit einer Auftrennung der Zielverbindungen mit einer Hypercarb-Chromatographiesäule untersucht. Diese ist insbesondere zur Retention und Separation sehr polarer und strukturell ähnlicher Analyten geeignet. Die Säule ist mit porösem graphitierten Kohlenstoff gepackt, der im molekularen Maßstab eine flache Struktur besitzt. Die Retention wird dabei von der Hydrophobizität und der Interaktion von polarisierbaren Gruppen der Analyten mit dem Packungsmaterial bestimmt. Die Stärke der Interaktion hängt von der Fläche des Moleküls und der Art seiner funktionellen Gruppen ab, die mit dem graphitierten Kohlenstoff in Kontakt sind. Je planarer ein Molekül beschaffen ist, desto mehr Stellen können mit dem Säulenmaterial interagieren. Für die Retention spielen auch freie Elektronenpaare und Elektronen an aromatischen Ringen eine Rolle, durch die es zu einer Überlappung von Molekülorbitalen des Kohlenstoffgerüsts kommen kann, die die Retention verbessern können (Knox und Ross, 1997).

Teutenberg weist auf Limitierungen hinsichtlich des Säulenmaterials hin, die darin bestehen, dass unpolare Analyten bei der Verwendung gebräuchlicher HPLC-Puffersysteme nicht mehr von der stationären Phase eluieren. Aus diesem Grund wird die Säule nur für Proben mit geringer Matrixbelastung empfohlen (Teutenberg, 2004).

Da die Analyse von Nitrifikations- und Ureasehemmern in Trink-, Roh- und Oberflächenwässern erfolgen sollte, erschien die Verwendung der Hypercarb-Säule vor dem Hintergrund der Limitierungen anderer Säulen bzw. Trennmechanismen als vielversprechender Ansatz. Mit einem Gradienten aus Reinstwasser und Methanol konnte eine gute Auftrennung der Analyten mit zufriedenstellenden Intensitäten erreicht werden (Tabelle 4 und Abbildung 3).

Tabelle 4: Parameter der chromatographischen Trennung

Säule	Hypercarb 150 mm x 2,1 mm, 5 µm (Thermo Scientific)		
Laufmittel	A: Reinstwasser + 0,01% Ameisensäure		
	B: Methanol + 0,01% Ameisensäure		
Säulentemperatur	40 °C		
Flussrate	250 µL/min		
Injektionsvolumen	120 µL		
Gradient*	Zeit in min	Laufmittel A in %	Laufmittel B in %
	0	95	5
	12	5	95
	16	5	95
	17	95	5

*Equilibrierzeit der Säule: 6 min

Die ersten drei Minuten des chromatographischen Laufs werden in den Lösemittelabfall geleitet, um das Interface des Massenspektrometers vor einer vermeidbaren Kontamination durch Salze zu schützen. Die erste Zielverbindung 1H-1,2,4-Triazol eluiert nach ca. 4,8 Minuten und damit mindestens eine Minute nach dem Totvolumen der Säule, was durch die parallele Injektion einer Thioharnstofflösung bewiesen wurde (Abbildung A1 im Anhang). Mit der chromatographischen Methode wird auch eine Abtrennung des Isomers 1H-1,2,3-Triazol von 1H-1,2,4-Triazol erreicht (Abbildung A2 im Anhang). 1H-1,2,3-Triazol ist in Deutschland nicht als Nitrifikationshemmer zugelassen, ein industrieller Einsatz als Synthesebaustein ist jedoch denkbar.

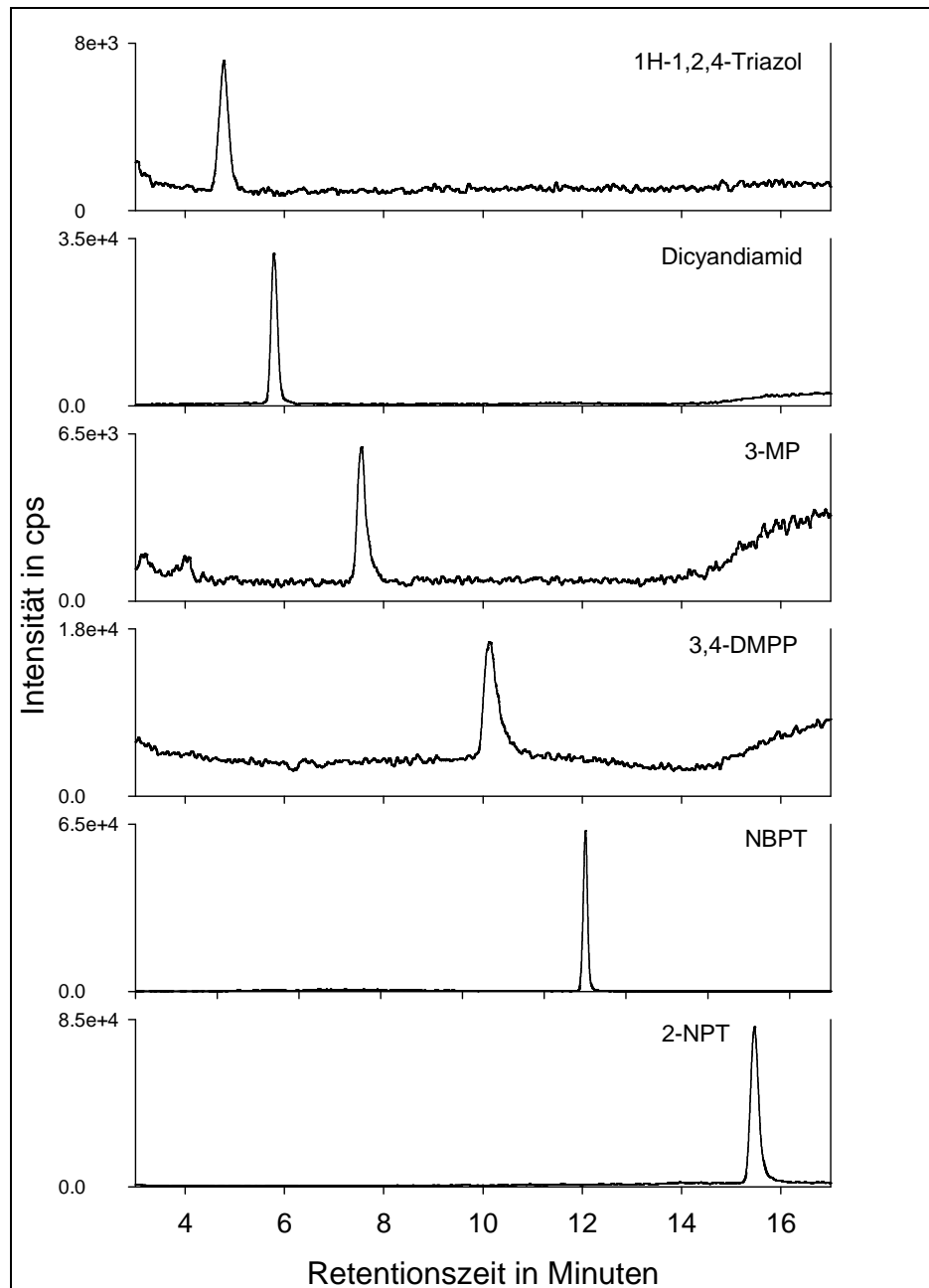


Abbildung 3: Extrahierte Chromatogramme eines 50 ng/L Standards der Zielanalyten in Reinstwasser.

Nach Etablierung der chromatographischen Trennmethode wurden verschiedene Festphasenkartuschen unterschiedlicher Hersteller auf ihre Eignung zur Aufreinigung der Proben und Anreicherung der Zielanalyten getestet. Neben klassischen C18-Kartuschen wurden auch andere, auf unpolaren Wechselwirkungen beruhende Sorbensmaterialien, wie Styrol-Divinylbenzol oder Aktivkohle, getestet. Die Wiederfindungen für Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren waren bei allen getesteten Materialien insbesondere für die sehr polaren Verbindungen 1H-1,2,4-Triazol und DCD unbefriedigend. Um zwischen einem Durchbruch der Analyten durch das Sorbensmaterial und einer unzureichenden Elution

unterscheiden zu können, wurden 10 mL Reinstwasser mit einer Konzentration von 1 µg/L aufdotiert, über die Kartusche gegeben und aufgefangen. Das Eluat und ein externer Standard gleicher Ausgangskonzentration wurden anschließend mittels LC/MS/MS vermessen und die Peakflächen verglichen. Abbildung 4 verdeutlicht, dass klassische Festphasenmaterialien mit apolaren Wechselwirkungen nicht zur Anreicherung aller Nitrifikationshemmer geeignet sind. Insbesondere 1H-1,2,4-Triazol und DCD brachen zu ca. 80 % durch das Sorbensmaterial.

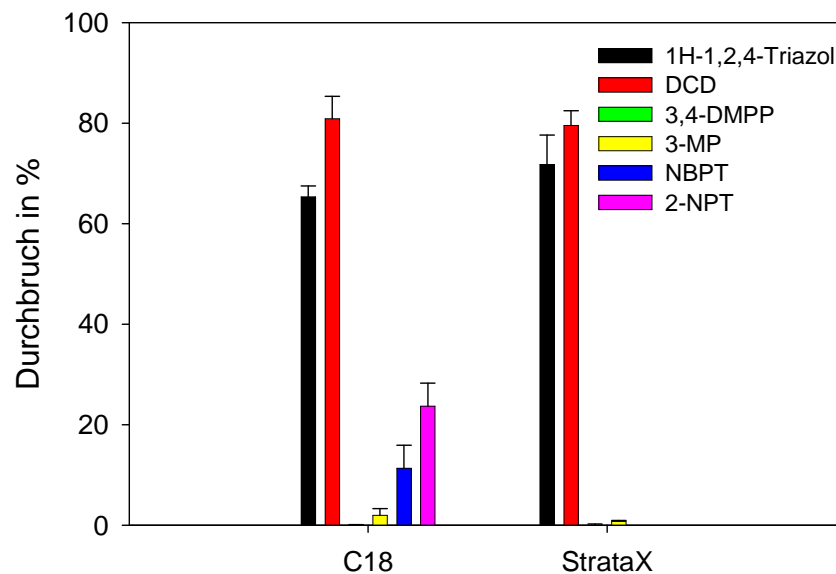


Abbildung 4: Durchbruch in % der untersuchten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren durch zwei unterschiedliche Festphasenkartuschen. Konzentration 1 µg/L in Reinstwasser.

Aus diesem Grund wurde versucht, die von Schermerhorn und Koautoren vorgeschlagene Anreicherung für 1H-1,2,4-Triazol mit einem Kationenaustauschermaterial (OASIS MCX von Waters) nachzustellen (Schermerhorn et al., 2005). Das Sorbensmaterial wurde mit Methanol und Wasser konditioniert. Anschließend wurde die Probe aufgegeben, das Kartuschenmaterial im Stickstoffstrom getrocknet und mit ammoniakalischem Methanol eluiert. Da für 1H-1,2,4-Triazol kein interner Standard vorhanden war, wurde das Eluat abweichend von der Literaturvorschrift bis zur Trockne eingeeengt. Die absoluten Wiederfindungen in Reinstwasser lagen für die beiden polarsten Verbindungen 1H-1,2,4-Triazol und DCD bei 38 % bzw. 2 %. Schermerhorn und Koautoren geben nur eine relative Wiederfindung (94 %) an, also nach einem rechnerischen Ausgleich mit einem entsprechenden isotonenmarkierten Standard, die nicht als Vergleich herangezogen werden kann.

Im Rahmen der Optimierung der Probenvorbereitung wurden auch Versuche durchgeführt, die mögliche Analytverluste bei der Trocknung des Sorbensmaterial und beim Einengen

des SPE-Eluats zur Trockne ausschließen sollten. Hierzu wurden jeweils 0,25 ng der Zielverbindungen in ein Autosampler-Vial dotiert und 30, 60 und 120 min mit Stickstoff zur Trockne abgeblasen. Anschließend wurden die Zielverbindungen mit 0,5 mL Reinstwasser rückgelöst, mit LC/MS/MS vermessen und die Peakflächen mit einem externen Standard gleicher Konzentration (500 ng/L) verglichen. Ein starker Einfluss der Trocknungsdauer war insbesondere für die beiden Pyrazol-Derivate 3,4-DMPP und 3-MP zu erkennen (Abbildung 5). Bereits nach 30 min konnten diese beiden Verbindungen mit nur noch $60\pm 1\%$ bzw. $43\pm 2\%$ der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Die Festphasenextraktion, bei der das SPE-Material immer vor der Elution getrocknet werden muss und das Eluat mit Stickstoff eingengt wird, ist daher nur eingeschränkt für die Anreicherung der Zielverbindungen geeignet.

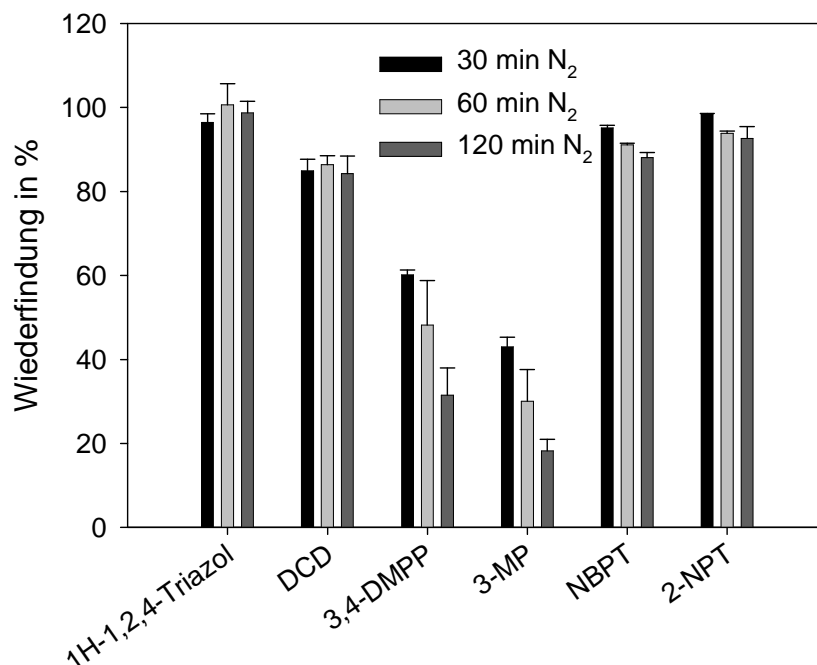


Abbildung 5: Wiederfindung der Zielanalyten in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer mit Stickstoff.

Als weitere Möglichkeit der Probenanreicherung wurde ein Rotations-Vakuum-Konzentrator (CHRIST SpeedDry 2-33IR, Christ, Osterode) eingesetzt. Bei einer Temperatur von 50 °C und bei Unterdruck (10 mbar) wird ein Verdampfen der Wasserprobe erreicht, ohne die Analyten thermisch zu stark zu belasten. Der Konzentrator bietet die Möglichkeit, zahlreiche Proben simultan einzuengen und kann mit unterschiedlichen Probengefäßen (10 mL und 50 mL) bestückt werden, um definierte Anreicherungs-faktoren zu realisieren. Für die Versuche zur Eignung dieser Anreicherungs-methode wurden 10 mL Reinst- und Trinkwasser mit einer Konzentration von 100 ng/L mit den Zielverbindungen dotiert. Während die Wiederfindungen der

Analyten in Reinstwasser noch zwischen ca. 65 % und 90 % lagen (Abbildung 6), wies in Trinkwasser nur noch DCD eine Wiederfindung >50 % auf. Dies ist darin begründet, dass die Vakuumkonzentration nicht nur die Zielverbindungen, sondern auch Matrixkomponenten wie Salze aufkonzentriert, die die Signalintensitäten unterdrücken können und so zu scheinbaren Minderbefunden führen.

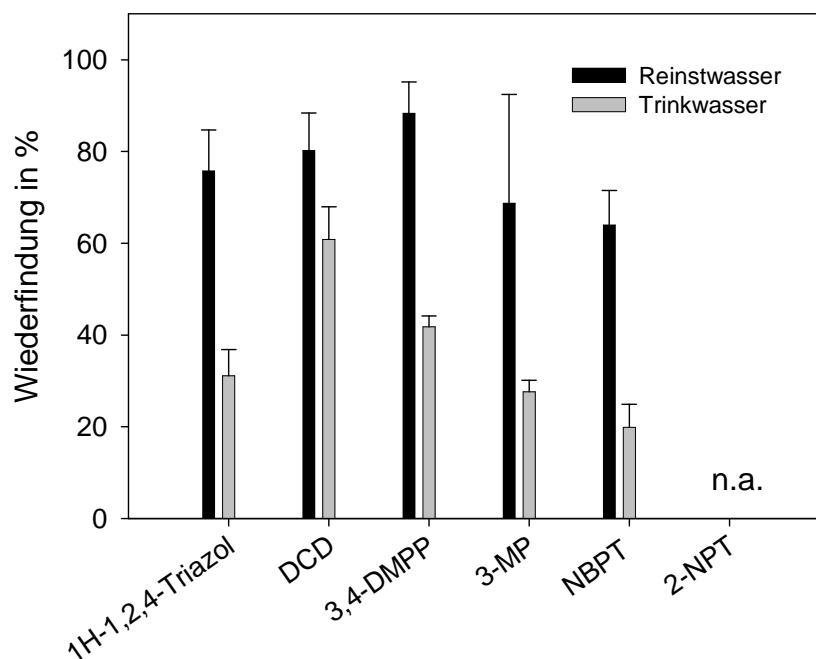


Abbildung 6: Wiederfindung der Zielanalyten in Reinst- und Trinkwasser nach Anreicherung mit einem Rotations-Vakuum-Konzentrator.

Auf Grund der unbefriedigenden Ergebnisse zur Probenanreicherung mittels Festphasenextraktion und Vakuumanreicherung wurde eine Direktinjektion der wässrigen Proben angestrebt. Eine Voraussetzung, um das Probenaufgabesystem des Flüssigchromatographen und die Trennsäule bei schwebstoffhaltigen Oberflächenwässern vor suspendierten Stoffen zu schützen, ist die vorherige Filtration der Proben. Wie von Hebig und Koautoren in einer kürzlich erschienen Studie gezeigt wurde, können das Material von Flaschen, Schläuchen und Filtern einen großen Einfluss auf die Wiederfindung von Analyten haben. Alle getesteten Flaschenmaterialien wiesen für einige der 43 in der Studie untersuchten Spurenstoffe schlechtere Wiederfindungen als Glas auf (Hebig et al., 2014). Die besten Alternativen zu Glas stellen Acrylglas und Polytetrafluorethylen (PTFE) dar. Es wird in der Studie allerdings darauf hingewiesen, dass keine eindeutige Korrelation zwischen Substanzeigenschaften, den untersuchten Materialien und den Substanzverlusten besteht und folglich diese der jeweiligen Fragestellung angepasst werden müssen. In der hier vorgestellten Studie wurden für Proben transport und -lagerung von

Umweltproben ausschließlich Glasflaschen verwendet. Für die Filtration von Oberflächenwasserproben kamen 1 mL BD Plastipack™ Spritzen (Becton Dickinson, Madrid, Spanien) zum Einsatz, die mit 0,45 µm-PTFE-Membranfiltern (Millipore, Billerica, U.S.A.) bestückt wurden. Die Wiederfindung aller untersuchten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren lag bei diesen Filtern zwischen 91 % und 102 % (Abbildung 7).

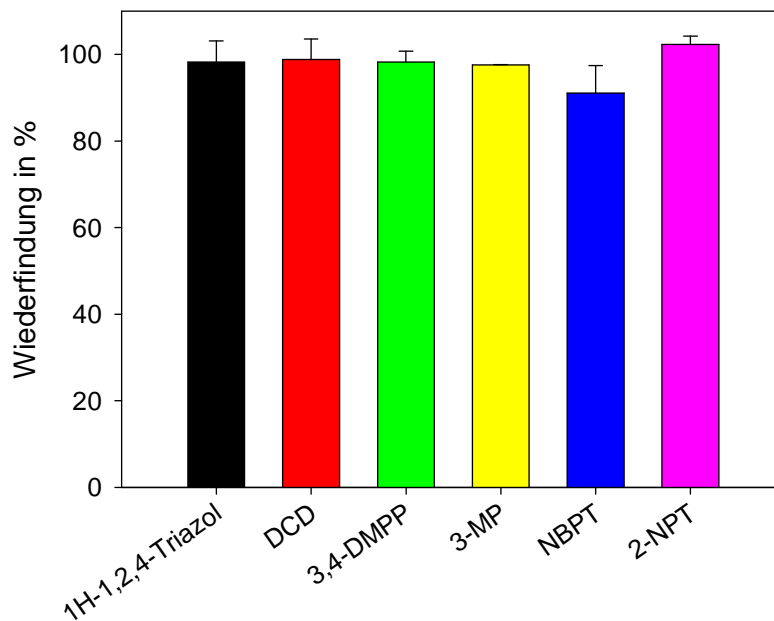


Abbildung 7: Wiederfindung der Analyten nach Filtration mittels 0,45 µm PTFE-Spritzenfilter, Matrix Reinstwasser.

Für die beiden Leitverbindungen 1H-1,2,4-Triazol und DCD konnten die Messwerte nur bei hohen Konzentrationen durch einen zweiten Massenübergang abgesichert werden (siehe Tabelle 3). Deshalb wurde für die Berechnung der Bestimmungsgrenzen zwei Verfahren angewandt:

1. Es wurde eine äquidistante 10 Punkt-Kalibriergerade vermessen, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit P=95% wurden gemäß DIN 32 645 errechnet.
2. Die errechnete Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 wurde verworfen, wenn der Peak bei dieser Konzentration nicht mindestens ein Signal-zu-Rausch (S/N) Verhältnis von zehn aufwies. In diesem Falle wurde der erste Punkt der Kalibrierfunktion, der diesem Kriterium entsprach, als Bestimmungsgrenze herangezogen.

Tabelle 5 fasst die nach beiden Verfahren ermittelten Bestimmungsgrenzen zusammen. Der Wert, der im Rahmen dieser Studie verwendet wurden, ist fett markiert.

Tabelle 5: Errechnete Bestimmungsgrenzen der Zielanalyten. Die angewendete Bestimmungsgrenze ist hervorgehoben.

Werte in µg/L	1H-1,2,4-Triazol	DCD	3,4-DMPP	3-MP	NBPT	2-NPT
BG nach DIN 32645	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
S/N > 10 bei	0,1	< 0,01	0,25	0,1	0,03	0,05

Man erkennt, dass bis auf DCD die Methode nach DIN 32 645 Werte für die BG liefert, die nicht den Kriterien des S/N-Verhältnisses von 10 genügen. Deshalb wurden in diesem Falle höhere Bestimmungsgrenzen angesetzt.

Der Einfluss der Probenmatrix wurde durch den Vergleich von dotierten Trink- und Oberflächenwasserproben mit einem Standard in Reinstwasser untersucht. Eine eventuelle Grundbelastung im Oberflächenwasser wurde bei der Berechnung berücksichtigt. Die Wiederfindung lag für fast alle Zielverbindungen in beiden Matrices zwischen 80 % und 110 %. Lediglich bei 2-NPT führte die Trinkwassermatrix zu einer ungewöhnlich starken Signalerhöhung. Nur für 1H-1,2,4-Triazol konnte in Oberflächenwasser eine signifikant bessere Wiederfindung als in Trinkwasser festgestellt werden.

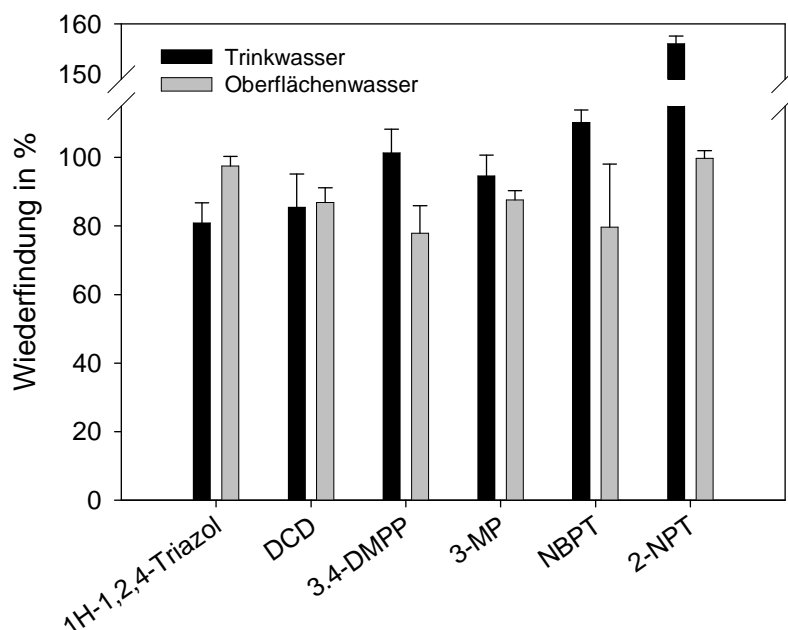


Abbildung 8: Wiederfindungen von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren bei der Direktinjektion von Trink- und Oberflächenwasser (Rhein).

Als weitere Qualitätssicherungsmaßnahme wurde für DCD, das etwas stärker von der Wassermatrix beeinflusst wird, zur Absicherung der Ergebnisse ein isotopenmarkierter Standard mitgeführt. Für 1H-1,2,4-Triazol konnte trotz intensiver Recherche bei zahlreichen Herstellern und Chemikalienvertrieben keine isotopenmarkierte Referenz-

Verbindung ausfindig gemacht werden. Diese ist mittlerweile allerdings verfügbar und wurde bereits erworben, um die bisher erzielten Ergebnisse zu bestätigen.

3.2 Gaschromatographische Nachweismethode für Nitapyrin

Obwohl Nitapyrin in Deutschland nicht als Nitrifikationshemmer zugelassen ist, wurde auch für diese Verbindung eine spurenanalytische Nachweismethode entwickelt. Nitapyrin ist schlecht in Wasser löslich, besitzt eine hohe Flüchtigkeit und ist nicht mittels Elektrosprayionisation ionisierbar. Da für diese Verbindung lediglich ein einmaliges Screening in einem landwirtschaftlich genutzten Einzugsgebiet durchgeführt werden sollte, war es somit vertretbar, eine separate Nachweismethode anzuwenden, die auf einer gaschromatographischen Trennung mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) beruht. Die Methode basiert auf einer Festphasenanreicherung von 500 mL Wasser, das mit Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt wird. Als Sorbens wird 100 mg Polymer-Material (Strata-X, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet, das vor der Anreicherung mit Methanol, Aceton und Reinstwasser konditioniert wird. Die Kartuschen werden anschließend im Stickstoffstrom getrocknet und mit 2 x 4 mL Aceton/Dichlormethan (50/50, v/v) eluiert. Das Eluat wird mit Stickstoff auf 150 µL eingeeengt. Die chromatographische Trennung erfolgt mit einer RTX-502.2-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) von Restek an einem GC/MS-System von Agilent Technologies (GC 5890 mit MSD 5973). Das Temperaturprogramm für die gaschromatographische Trennung beginnt bei 80 °C (0,5 min Halten), wird mit 10 °C/min auf 160 °C erhöht (3 min Halten) und weiter auf 260 °C mit 20 °C/min (2 min Halten). Mit dieser Methode wird eine Bestimmungsgrenze für Nitapyrin von 0,05 µg/L erreicht.

4 Ergebnisse eines Monitoring-Programms zum Vorkommen von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren

4.1 Untersuchungen an größeren Fließgewässern

Im Rahmen des Forschungsprojekts wurden zahlreiche Proben von größeren deutschen Fließgewässern auf Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren untersucht. Als Leitverbindungen der Verbindungsklasse konnten 1H-1,2,4-Triazol und DCD identifiziert werden. Die Ergebnisse des Untersuchungsprogramms sind nachfolgend dargestellt.

4.1.1 1H-1,2,4-Triazol

Für 1H-1,2,4-Triazol ergibt sich über den gesamten Analysenzeitraum ab April 2013 ein sehr heterogenes Bild der Belastungssituation. Im Rhein bei Basel, Karlsruhe und Mainz wurde nur an sehr wenigen Terminen im Frühjahr 2013 1H-1,2,4-Triazol nachgewiesen, dann aber mit Konzentrationen, die im $\mu\text{g/L}$ -Bereich lagen (Abbildung 9).

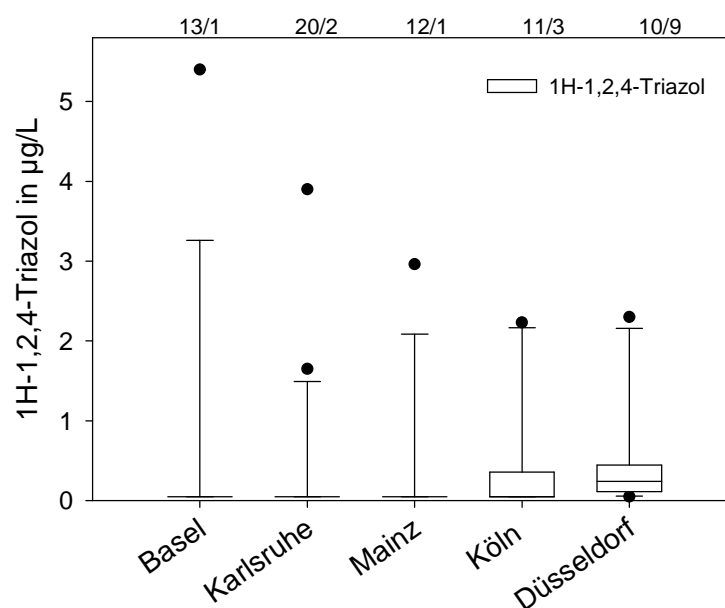


Abbildung 9: Boxplots der 1H-1,2,4-Triazol Messwerte im Rhein (Anzahl der Messungen/Positivbefunde).

Insbesondere am Niederrhein in Düsseldorf konnte die Verbindung häufiger nachgewiesen werden. Hier war sowohl die Anzahl der Positivbefunde als auch das Konzentrationsniveau deutlich höher als in Köln, obwohl beide Probenahmestellen nur wenige Flusskilometer auseinander liegen. In Abbildung 9 wurden zur Berechnung der Boxplots die Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze mit der halben

Bestimmungsgrenze in die Berechnung einbezogen. Auf Grund von nur ein bzw. zwei Positivbefunden liegen an den ersten drei Messstellen unteres und oberes Quartil deckungsgleich übereinander und bilden keine Box aus. Deutlich zu erkennen sind allerdings die Ausreißerwerte. Diese hohen Konzentrationen wurden ausschließlich im April 2013 gemessen.

In Abbildung 10 sind die Einzelwerte dieser Probenahme nochmals für alle fünf Probenahmestellen dargestellt. Man erkennt deutlich das abnehmende Konzentrationsniveau im Rhein-Längsverlauf, das offensichtlich nur durch den punktuellen Eintrag am Oberrhein bestimmt und mit zunehmendem Abfluss nivelliert wird. Dieser Verlauf ist gegenläufig der Belastungssituation, die sich für abwasserbürtige Stoffe im Rhein ergibt. Das Konzentrationsniveau von Arzneimitteln wie Carbamazepin oder Diclofenac steigt im Rheinverlauf durch einen zunehmenden Abwasseranteil stetig an (Sacher et al., 2008). Somit ist davon auszugehen, dass es sich in diesem Fall eher um eine punktuelle Einleitung handelt. Hierfür spricht, wie oben bereits erwähnt, zum einen das abnehmende Konzentrationsniveau, aber auch die Tatsache, dass zehn Tage später noch einmal der Rhein bei Karlsruhe und Worms beprobt wurde und dort immer noch erhöhte Konzentrationen festgestellt werden konnten. Ob die Einleitung tatsächlich aus einem Eintrag aus der Landwirtschaft stammt oder industriell bedingt ist, kann an dieser Stelle nicht abschließend beantwortet werden. Allerdings nutzen die meisten ackerbaulichen Kulturen den ausgebrachten Stickstoff am besten in den Monaten März und April aus (Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), 1999), was die Ausbringung von Gülle und anderen Düngern (und damit auch Nitrifikationshemmern) in diesem Zeitraum bedingt.

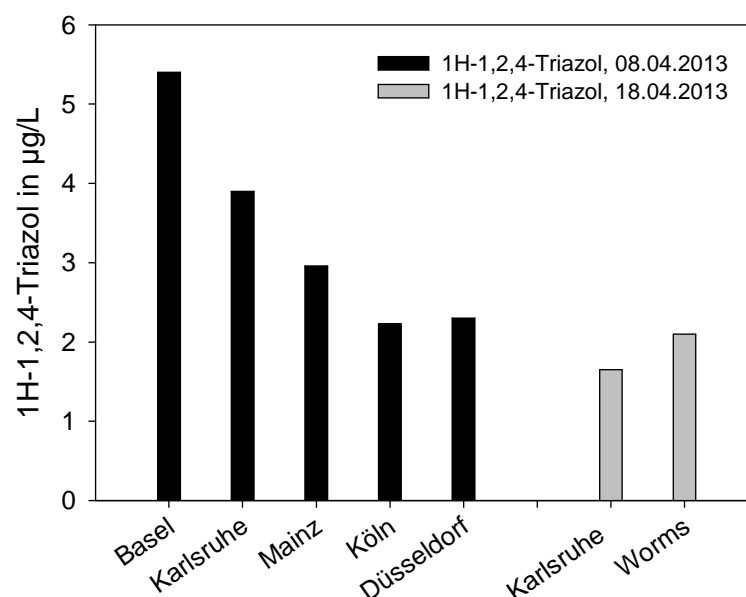


Abbildung 10: 1H-1,2,4-Triazol Einzelwerte vom April 2013 im Rheinverlauf.

Neben dem Rhein wurden noch weitere größere Fließgewässer beprobt. In vielen konnte 1H-1,2,4-Triazol nicht über der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden (Tabelle A1 im Anhang). Im Main bei Frankfurt wurde bei zwölf Analysen nur ein Positivbefund von 0,21 µg/L verzeichnet. Auffällig war lediglich die Körsch in Baden-Württemberg, an der bei mehr als 80 % der Analysen (n=6) Werte über 0,1 µg/L gemessen wurden. Die Körsch ist ein Gewässer, das einen relativ hohen mittleren Abwasseranteil aufweist und hinsichtlich der Belastung mit organischen Spurenstoffen als überdurchschnittlich belastet eingestuft werden kann (Maier, 2012). Allerdings lassen der Nachweis von sowohl Pflanzenschutzmitteln als auch Indikatorsubstanzen für häusliches und industrielles Abwasser keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Eintragsquellen von 1H-1,2,4-Triazol zu.

4.1.2 DCD

Für DCD waren im Rheinverlauf steigende Konzentration zu verzeichnen (Abbildung 11). Während in Basel und Karlsruhe (Rheinkilometer 359) noch Mittelwerte um 0,1 µg/L gemessen wurden, stiegen die mittleren Konzentrationen im weiteren Verlauf ungewöhnlich stark an. So war bereits in Mainz (Rheinkilometer 498) im Mittel 1 µg/L zu messen. Auffallend waren die ab der Probenahmestelle Mainz stark schwankenden Werte und die Tatsache, dass in Köln und Düsseldorf im Mittel geringere Konzentrationen nachgewiesen wurden. Dies ist als Hinweis zu werten, dass im Rhein unterhalb von Mainz kein konstanter abwasserbürtiger Eintrag von DCD erfolgt. Die Höchstkonzentrationen der gemessenen Stichproben lagen in Köln und Düsseldorf über 2 µg/L, in Mainz über 6 µg/L.

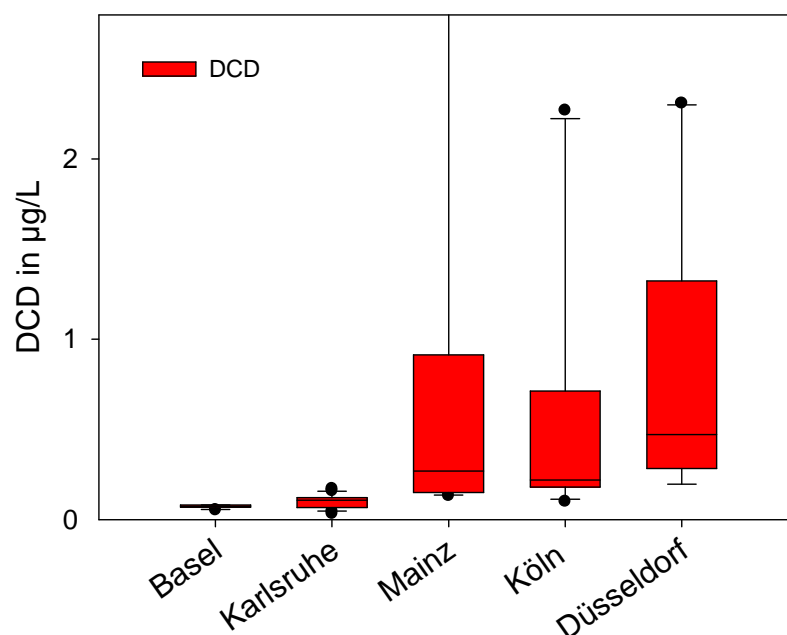


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung aller DCD-Messwerte im Rheinverlauf.

Bei Untersuchungen am Neckar wurden an der Messstelle Mannheim, d. h. direkt vor der Einmündung in den Rhein, in der Mehrzahl der Proben Konzentrationen von mehreren $\mu\text{g/L}$ DCD gemessen (Abbildung 12), während die weiter flussaufwärts gelegenen Neckar-Probenahmestellen Kochendorf und Deizisau eher schwach belastet waren (Mittelwert $0,3 \mu\text{g/L}$ bzw. $0,08 \mu\text{g/L}$). Der mittlere Abfluss an der Neckarmündung in Mannheim beträgt ca. $145 \text{ m}^3/\text{s}$, der mittlere Abfluss in Mainz am Rhein ca. $1.520 \text{ m}^3/\text{s}$ (Faktor 10,5). Dies plausibilisiert vor den Annahmen, dass i) der Rhein bis zur Einmündung des Neckars kaum eine Grundbelastung an DCD mitführt und ii) andere Rheinzuflüsse bis zur Messstelle Mainz keine nennenswerte DCD-Belastung beitragen, gut die an beiden Messstellen gemessenen Konzentrationen von $14 \pm 15 \mu\text{g/L}$ bzw. $1,0 \pm 1,5 \mu\text{g/L}$. Allerdings streuen die Werte an beiden Probenahmestellen stark.

Da im Projektverlauf die Konzentrationsunterschiede zwischen den Neckar-Probenahmestellen Kochendorf und Mannheim deutlich wurden, erschien es naheliegend, auch Proben anderer in den Neckar mündender Fließgewässer zu analysieren. In einer Probe der Kocher wurden $1,2 \mu\text{g/L}$ DCD nachgewiesen ($n=1$). In der Jagst bei Jagstfeld konnten dagegen im Mittel $140 \pm 48 \mu\text{g/L}$ nachgewiesen werden. Der Stichprobenumfang für beide Neckarzuflüsse ist allerdings zu gering, um valide Aussagen über die grundsätzliche Belastungssituation von Kocher und Jagst treffen zu können. Aber auch in diesem Fall liegen die in Mannheim gemessenen Konzentrationen in einem plausiblen Bereich, wenn man die mittleren Abflüsse der Jagstmündung ($19 \text{ m}^3/\text{s}$) und des Neckars an der Messstelle Mannheim ($145 \text{ m}^3/\text{s}$) in Relation zu den gemessenen Konzentrationen setzt. Nach momentanem Kenntnisstand sind die hohen Konzentrationen, die z. T. in Mannheim und im Rhein ab der Probenahmestelle Mainz gemessen wurden, einem Einfluss des Jagst-Einzugsgebietes zuzuschreiben. Dieser Aspekt sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, um Kenntnis darüber zu erlangen, welche Art von Eintrag (Landwirtschaft oder Industrie) für die Belastung der Oberflächengewässer verantwortlich ist und wie dieser minimiert werden kann.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass bei einem Einsatz von DCD als Nitrifikationshemmer der Zeitpunkt der Probenahme eine wichtige Rolle spielt. Es ist grundsätzlich davon auszugehen, dass die Verbindung in der Landwirtschaft nur wenige Male im Jahr ausgebracht wird. Bei wenigen Stichproben ist somit das beprobte Zeitfenster entscheidend für die Erfassung eines potenziellen Eintrags von landwirtschaftlichen Flächen durch eine oberflächige Abschwemmung der Verbindung. Ob bei drainierten Flächen durch das Entwässerungssystem ein kontinuierlicher Eintrag von DCD erfolgen kann, ist nicht bekannt. In einem Untersuchungsprogramm zum Pflanzenschutzmittelwirkstoff Isoproturon im Kocher- und Jagsteinzugsgebiet des Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) wurde deutlich, dass es bei

Flächen mit Hanglage zum Gewässer zu massiven Konzentrationsspitzen kommen kann (LTZ, 2012). Dagegen wurden in einem Gebiet mit vielen drainierten Ackerflächen länger anhaltende Einträge mit geringeren Maximalkonzentrationen an Isoproturon beobachtet. Erwähnenswert ist, dass es beim Messprogramm des LTZ an der Jagst fast ausschließlich Positivbefunde an Isoproturon unterhalb der Messstelle Mockmühl gab. Ob dies auch auf DCD zutrifft, ist unklar, da die Jagst nur an ihrer Mündung auf Nitrifikationshemmer untersucht wurde.

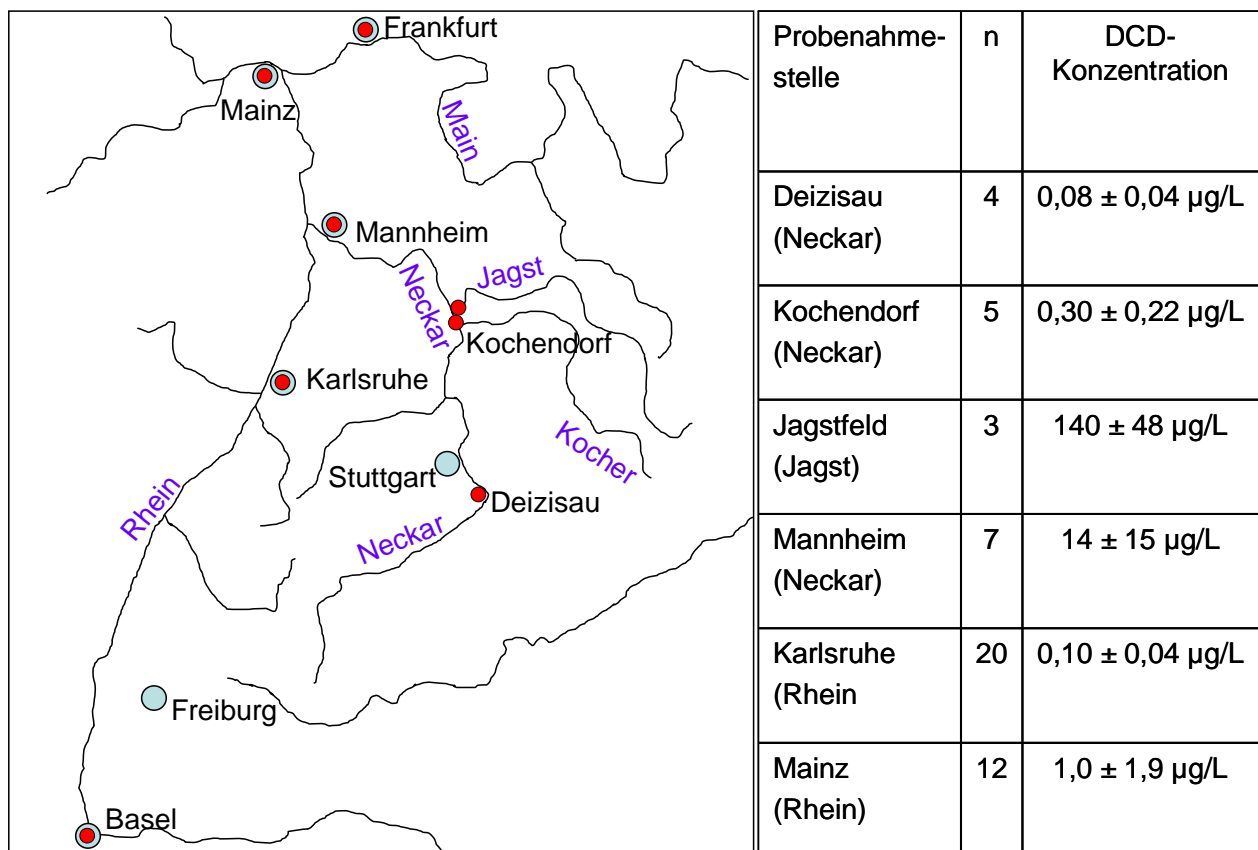


Abbildung 12: Probenahmestellen (rot) an Oberrhein, Neckar, Jagst, Kocher und Main sowie ausgewählte DCD-Messwerte (Mittelwerte und Standardabweichung) zur Verdeutlichung des Einflusses des Jagst-Einzugsgebiets.

In anderen untersuchten Fließgewässern konnte DCD ebenfalls in allen Proben nachgewiesen werden (Tabelle 6). Auffallend waren hier relativ hohe Konzentrationen von bis zu 1,5 µg/L in der Argen (n=2), die grundsätzlich als eher unbelastetes Referenzgewässer hinsichtlich der Belastung mit organischen Spurenstoffen gilt. Dagegen war DCD in der Körsch zwar in jeder Probe (n=6) nachzuweisen, allerdings nur mit einer Maximalkonzentration von 0,41 µg/L, obwohl die Körsch einen relativ hohen Abwasseranteil mitführt (siehe oben). Dies kann ein Hinweis auf einen Eintrag durch die Anwendung in der Landwirtschaft sein.

Tabelle 6: Größere Fließgewässer mit $n > 1$, die auf DCD untersucht wurden, inkl. Anzahl Messungen (n), Positivbefunden ($n > BG$) sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen.

DCD					
Gewässer	Messstelle	n	$n > BG$	Minimalkonzentration	Maximalkonzentration
Aare	vor Mündung	4	4	0,04	0,07
Argen	Oberau	2	2	0,49	1,5
Donau	Ulm-Wiblingen	7	7	0,02	0,06
Jagst	Jagstfeld	3	3	179	84
Körsch	Friedrichsmühle	6	6	0,08	0,41
Main	Frankfurt	12	12	0,14	1,1
Neckar	Deizisau	4	4	0,05	0,13
	Kochendorf	4	4	0,08	0,58
	Mannheim	7	7	0,36	42
Rhein	Basel	15	15	0,05	0,11
	Karlsruhe	20	20	0,03	0,17
	Mainz	12	12	0,13	6,5
	Koblenz	2	2	1,5	2,6
	Köln	11	11	0,10	2,3
	Düsseldorf	10	10	0,15	2,3
	Lobith	5	5	0,07	2,9
Schussen	Eriskirch	2	2	0,09	0,36

4.2 Untersuchungsprogramm in einem landwirtschaftlich genutzten Einzugsgebiet

Neben der regelmäßigen Messung von Wasserproben größerer deutscher Fließgewässer wurde in Zusammenarbeit mit einem Wasserversorger im Südwesten Deutschlands ein Messprogramm initiiert. Das Untersuchungsgebiet liegt in einem landwirtschaftlich genutzten Tal, das von mehreren kleineren Bächen durchzogen wird. Es bietet zudem die Möglichkeit, einige Pegel zu beproben (Abbildung 13). Im Talgrund herrscht hauptsächlich Acker- und Grünlandnutzung vor, was bei der Ausbringung von Gülle auch einen potenziellen Einsatz von Nitrifikations- und Ureasehemmern und deren Verlagerung in angrenzende Fließgewässer denkbar erscheinen lässt. Das Untersuchungsgebiet wurde insgesamt vier Mal zwischen Juli und Dezember 2013 beprobt. Insbesondere Kulturen wie Wiesen und Mähweiden besitzen bis in den September hinein noch eine gute Ausnutzung des ausgebrachten Stickstoff (LAWA, 1999). Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass Landwirte Kapazitäten in ihren Güllebehältern vor Beginn der Sperrfrist zur Düngemittelausbringung schaffen wollen (01.11. bis 31.01. auf Ackerland, 15.11. bis 31.01. auf Grünland gemäß (DüMV, 2008)).



Abbildung 13: Probenahmestellen 5 (links) und 7 (rechts) im Untersuchungsgebiet

In eines der untersuchten Fließgewässer entwässert zudem eine kommunale Kläranlage mit 4.600 Einwohnergleichwerten. Somit war durch die gleichzeitige Analyse von abwasserbürtigen Spurenstoffen eine Unterscheidung möglich, ob bei Positivbefunden von Nitrifikations- und Ureasehemmern eine landwirtschaftliche Ausbringung oder sonstige Anwendungen die Ursache sind. Neben den Zielverbindungen wurden daher 27 weitere organische Spurenstoffe (Arzneimittel und deren Metabolite, künstliche Süßstoffe, Röntgenkontrastmittel, Industriechemikalien und Pflanzenbehandlungsmittel) untersucht. Die künstlichen Süßstoffe wurden bei allen vier Probenahmen analysiert, die restlichen Spurenstoffe bei den ersten beiden Messkampagnen.

Für die Interpretation der Messergebnisse für Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren und die Erstellung von Abbildung 14 wurden der Süßstoff Acesulfam und das Diuretikum Hydrochlorothiazid als Abwasserindikatoren herangezogen. Die Ergebnisse für eine Messstelle sind nur dargestellt, wenn mehr als die Hälfte der untersuchten Proben über der Bestimmungsgrenze lagen. Bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung wurden in diesem Fall verbliebene Werte unter der Bestimmungsgrenze mit der Hälfte der Bestimmungsgrenze in die Berechnung einbezogen. Für 1H-1,2,4-Triazol lagen keine Positivbefunde über der Bestimmungsgrenze vor. Der bei Probenahmestelle 9 angegebene Wert in Klammern setzt sich für diese Verbindung aus Messwerten zusammen, die zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen. In Tabelle A2 im Anhang sind die Anzahl der Messungen, die Anzahl der Befunde über der Bestimmungsgrenze, die Mittelwerte aller Positivbefunde sowie deren Standardabweichung für alle untersuchten Spurenstoffe detailliert aufgelistet. An den Messwerten von Acesulfam und Hydrochlorothiazid ist eindeutig die Einleitung der oben erwähnten Kläranlage zwischen den Probenahmestellen 9 und 10 zu erkennen. Die Konzentrationen nehmen unterhalb der Kläranlage kontinuierlich flussabwärts durch Verdünnung ab. Die hohen Standardabweichungen sind der zweiten Messkampagne geschuldet, bei der für

alle untersuchten Spurenstoffe ein deutlich erhöhtes Konzentrationsniveau festzustellen war. Eine Beeinflussung der drei untersuchten Grundwasserpegel (PN 2, 4 und 5) war während der Probenahmekampagnen nicht vorhanden. Die Konzentrationen von DCD lagen an Fliessgewässer 1 immer deutlich unter $0,1 \mu\text{g/L}$ (Maximalkonzentration $0,07 \mu\text{g/L}$) und die Verbindung konnte nur an den zwei Messstellen ober- und unterhalb der Kläranlage nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den abwasserbürtigen Verbindungen war kein deutlicher Einfluss der Kläranlage auf das DCD-Konzentrationsniveau erkennbar.

Obwohl für 1H-1,2,4-Triazol im gesamten Untersuchungsgebiet keine Befunde über der Bestimmungsgrenze vorlagen, scheint hier dennoch ein Abwassereinfluss erkennbar, da bei jeder Probenahme Werte über der Nachweisgrenze an Probenahmestelle 10 unterhalb der Kläranlage vorhanden waren.

Zur Verdeutlichung eines möglichen Einflusses der Landwirtschaft auf den Nachweis von Nitrifikationshemmern im Untersuchungsgebiet sind die Messwerte für die Fliessgewässer 1 und 2 der August-Probenahme in Abbildung 15 dargestellt. Deutlich wird auch der Einfluss der Kläranlageneinleitung an der Probenahmestelle 10 und die Verdünnung bis zur Probenahmestelle 8. Die Konzentrationen von Acesulfam und Hydrochlorothiazid an Probenahmestelle 8 sind im Vergleich zur Entnahme direkt unterhalb der Kläranlage um 76 % bzw. 79 % geringer. Aus diesem Grund können 1H-1,2,4-Triazol und DCD hier bereits nicht mehr nachgewiesen werden. Am selben Probenahmetermin wurden erhöhte Konzentrationen an DCD an Probenahmestelle 6 an Fliessgewässer 2 von $0,2 \mu\text{g/L}$ gemessen. An dieser Stelle waren keine Positivbefunde von anderen untersuchten organischen Spurenstoffen zu verzeichnen, so dass ein Abwassereinfluss weitgehend ausgeschlossen werden kann. An zwei weiteren Terminen wurden hier $0,13 \mu\text{g/L}$ und $0,06 \mu\text{g/L}$ DCD gemessen, wohingegen im Dezember 2013 die Substanz nicht nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache eines Nachweises von DCD an einem kleinen Fliessgewässer ohne Abwassereinfluss und die stark schwankenden Konzentrationen an der Messstelle sprechen in diesem Fall für einen Eintrag aus den umliegenden landwirtschaftlichen Flächen.

Für dieses Untersuchungsgebiet wurde auch die entwickelte GC/MS-Methode für Nitapyrin angewendet. Allerdings konnten sowohl für Nitapyrin als auch für alle anderen Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren in keiner der untersuchten Proben Werte über der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden.

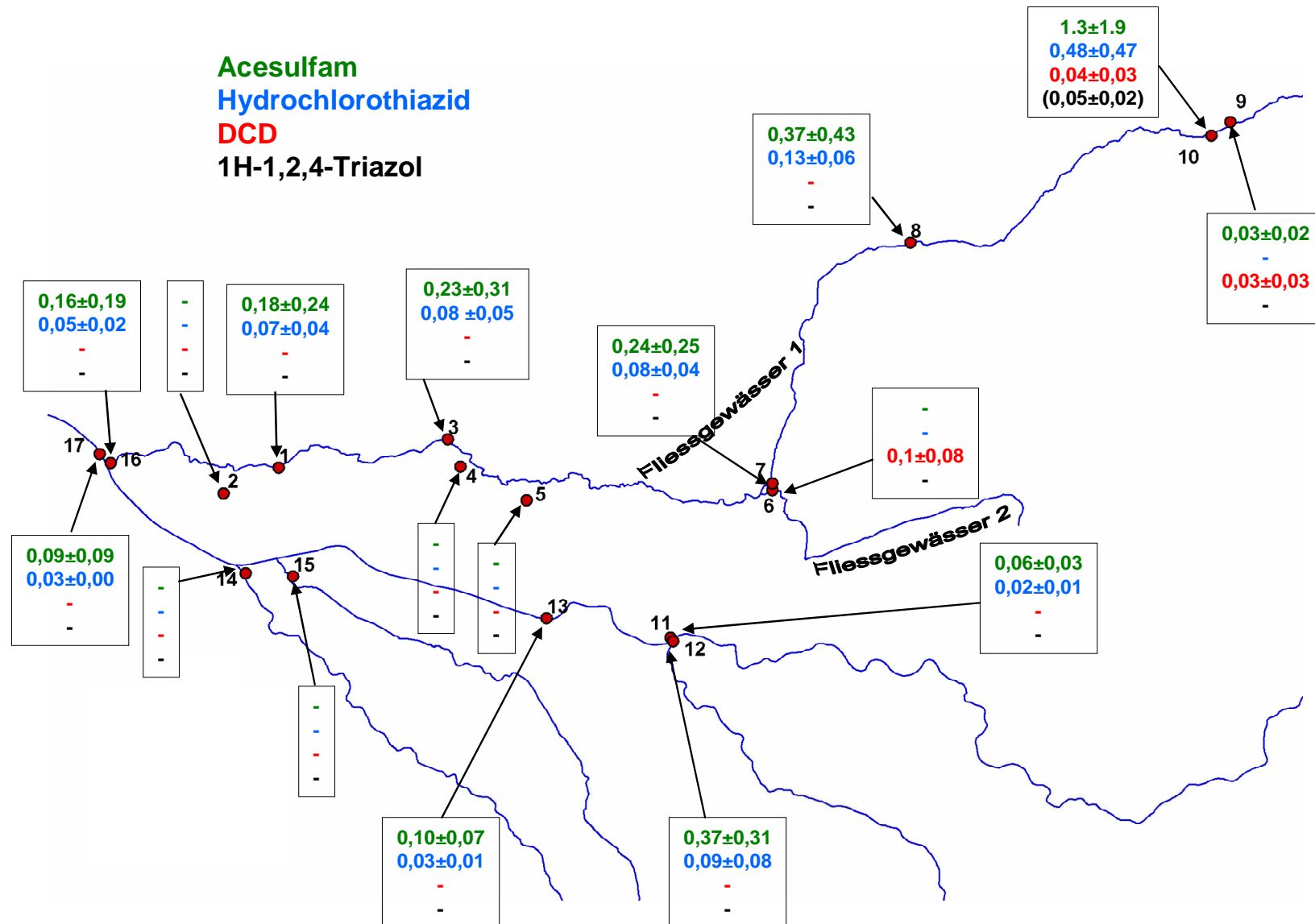


Abbildung 14: Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung für Acesulfam, Hydrochlorothiazid, DCD und 1H-1,2,4-Triazol in einem landwirtschaftlich genutzten Flusseinzugsgebiet. Nicht beprobte Fließgewässer sind nicht eingezeichnet. Konzentrationen in µg/L.

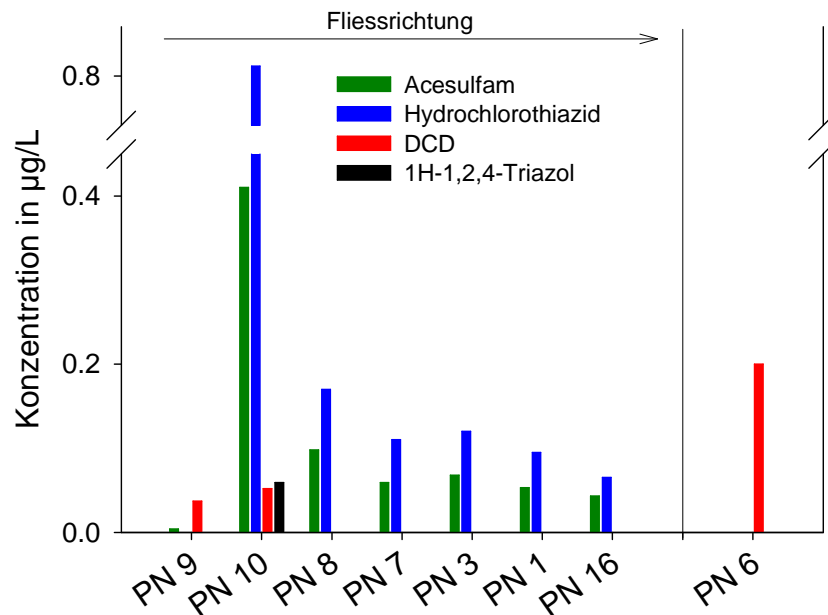


Abbildung 15: Messwerte für Acesulfam, Hydrochlorothiazid, DCD und 1H-1,2,4-Triazol an den Fließgewässern 1 und 2 im August 2013. Für Acesulfam sind 1/10 der gemessenen Konzentrationen dargestellt.

4.3 Untersuchung von Grund- und Trinkwässern

Im Rahmen des Projekts wurden auch 81 Grundwasserproben untersucht. Für die beiden Leitsubstanzen gab es jeweils nur zwei Positivbefunde (Abbildung 16). Dies entspricht lediglich 2,5 % der Gesamtprobenanzahl. 1H-1,2,4-Triazol konnte an zwei Messstellen mit 0,20 bzw. 0,34 µg/L nachgewiesen werden. Diese Messstellen befinden sich beide auf industriell genutzten Flächen, weshalb ein landwirtschaftlicher Einfluss weitgehend ausgeschlossen werden kann. DCD wurde hingegen in zwei Grundwassermessstellen am Rhein und im Jagst-Kocher-Einzugsgebiet nachgewiesen.

Neben Grundwässern wurden auch 23 Trinkwässer untersucht (Abbildung 17). 1H-1,2,4-Triazol war in keiner der Proben nachzuweisen. DCD wurde in drei Proben mit einer Maximalkonzentration von 0,1 µg/L detektiert. Das korrespondierende Rohwasser stammt aus einer Talsperre, was dahingehend plausibel ist, dass DCD in nahezu allen untersuchten Oberflächenwässern, aber nur sehr vereinzelt in Grundwasserproben nachweisbar war. Hinweise auf eine genotoxische Wirkung von DCD liegen nicht vor. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) identifizierte DCD als Verunreinigung von Guanidinessigsäure, die in der Geflügelmast als Futtermittelzusatz eingesetzt wird (EFSA, 2009). Auf Grund der vorgelegten Studien zur Toxizität wurde ein

PTDI-Wert (engl. provisional tolerable daily intake) von 1 mg DCD pro kg Körpergewicht und Tag genannt. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der ADI-Wert (acceptable daily intake) für einige künstliche Süßstoffe, die als Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen sind. Es wurde in diesem Zusammenhang auch darauf hingewiesen, dass Konsumenten neben dem Einsatz als Futtermittelzusatz auch durch das Vorhandensein in Nahrungsmitteln, Medikamenten und Pestiziden mit DCD in Kontakt kommen können.

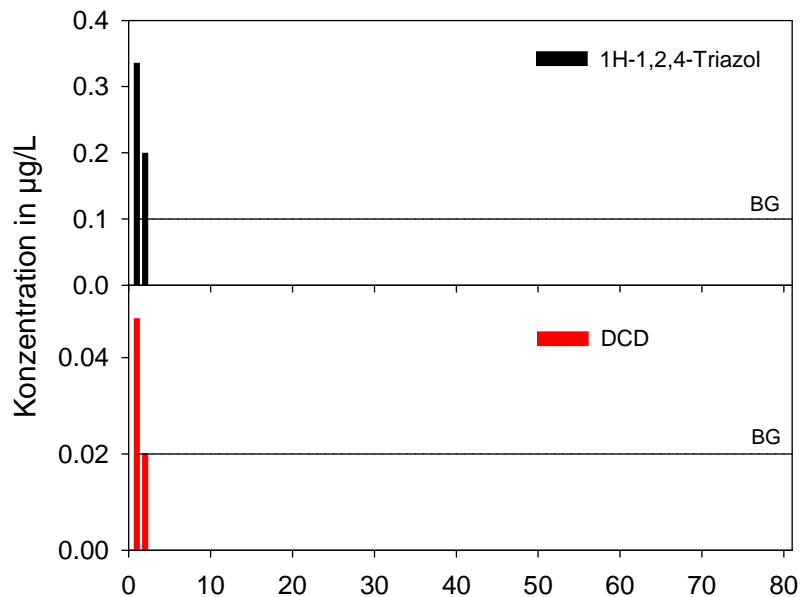


Abbildung 16: Gehalte an 1H-1,2,4-Triazol und DCD in 81 untersuchten Grundwasserproben.

Zur Entfernbarkeit dieser beiden Leitsubstanzen bei der Trinkwasseraufbereitung gibt es bisher sehr wenige Erkenntnisse. Laboruntersuchungen zur Elimination von 1H-1,2,4-Triazol mittels Fällung und Flockung ergaben, dass diese Methode nicht zur Entfernung der Verbindung aus Rohwässern geeignet ist (Soares et al., 2013). Amorim und Koautoren (2013) kommen zu dem Ergebnis, dass 1H-1,2,4-Triazol deutlich besser mit Aktivkohle auf Holzkohlebasis als mit Aktivkohle aus Rinderknochen zu entfernen ist. Allerdings wurden bei den Untersuchungen sehr hohe Konzentrationen des Nitrifikationshemmers (100 mg/L) sowie beider Aktivkohlen (5 g/L und 24 g/L) eingesetzt, die um mehrere Größenordnungen über den in dieser Studie gemessenen Werten liegen. Bei der höheren Konzentration an Aktivkohle wurden, bei einer Kontaktzeit von 60 min, maximal 76 % des eingesetzten 1H-1,2,4-Triazols adsorbiert (Amorim et al., 2013).

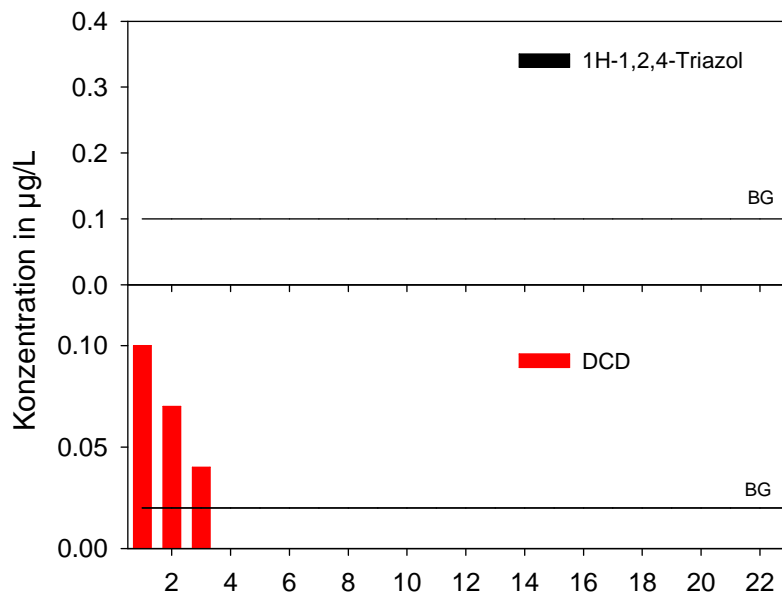


Abbildung 17: Gehalte an 1H-1,2,4-Triazol und DCD in 23 untersuchten Trinkwasserproben.

5 Abbaubarkeit und Mobilität von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren

5.1 Hydrolyse

Zur Überprüfung der Stabilität von 1H-1,2,4-Triazol, DCD und 3,4-DMPP in Wasser wurden Standversuche bei zwei verschiedenen pH-Werten (3 und 7) durchgeführt. Um Hinweise auf einen photolytischen Abbau zu erhalten, wurden die Testansätze in Braun- und in Weissglasflaschen für 41 Tage bei diffusem Licht und Raumtemperatur exponiert. Die Testkonzentration lag bei 2 µg/L. Als Matrix wurde Reinstwasser verwendet. Die Ergebnisse sollten auch als Negativ-Kontrolle für die nachfolgend durchgeführten Versuche im Festbettbioreaktor dienen. Für 1H-1,2,4-Triazol konnte keine Konzentrationsabnahme während der Testlaufzeit, ungeachtet vom Flaschentyp, beobachtet werden (Abbildung 18). Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturwerten (US EPA, 2009 und darin zitierte Referenzen): Bei pH-Werten von 5, 7 und 9 und einer Temperatur von 25 °C konnten für die Verbindung nach einer Testdauer von 30 Tagen zwischen 90 % und 98 % der Anfangskonzentration nachgewiesen werden. In der Bewertung von 1H-1,2,4-Triazol der US amerikanischen Umweltbehörde wird außerdem angeführt, dass die Verbindung weder durch direkte noch durch indirekte Photolyse bei Zugabe von Huminsäuren nennenswert abgebaut wird (US EPA, 2009). Auch die beiden anderen untersuchten Nitrifikationshemmer DCD und 3,4-DMPP konnten nach der Testlaufzeit von 41 Tagen

noch in den Anfangskonzentrationen nachgewiesen werden. In einem Datenblatt der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit (OECD) wird DCD, unabhängig vom pH-Wert, als abiotisch stabil beschrieben (OECD, 2003 und darin zitierte Referenzen).

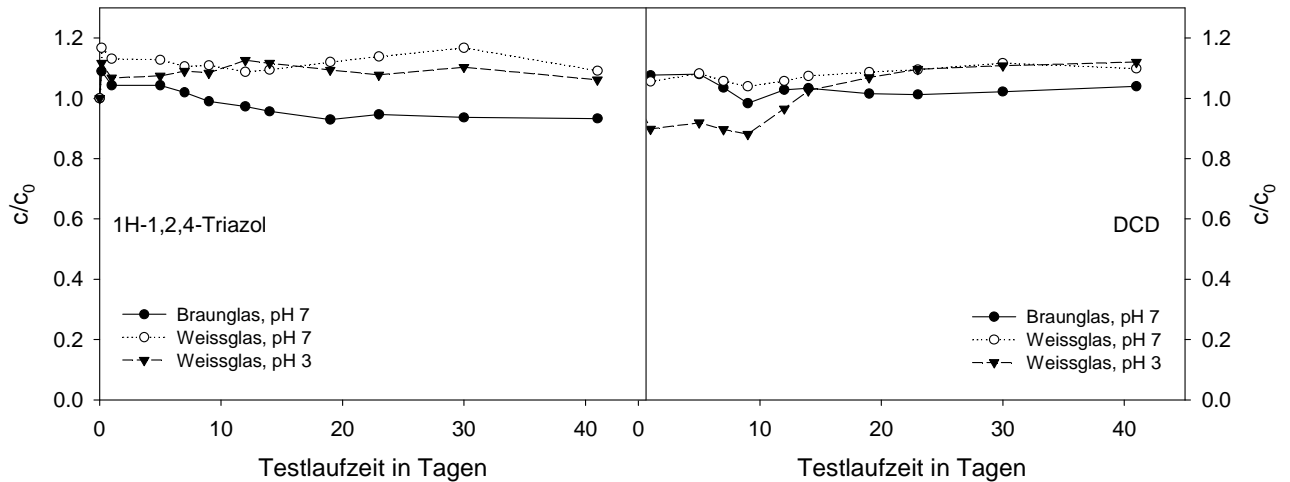


Abbildung 18: Verhalten von 1H-1,2,4-Triazol (links) und Dicyandiamid (rechts) in Standversuchen. Matrix Reinstwasser; Konzentration 2 µg/L.

5.2 Festbettbioreaktor (Testfilter)

Mit dem Festbettbioreaktor (Abbildung 19) wird der biologische Abbau von organischen Spurenstoffen bei der aeroben Uferfiltration simuliert (Karrenbrock et al., 1999; Knepper et al., 1999a; Knepper et al., 1999b).

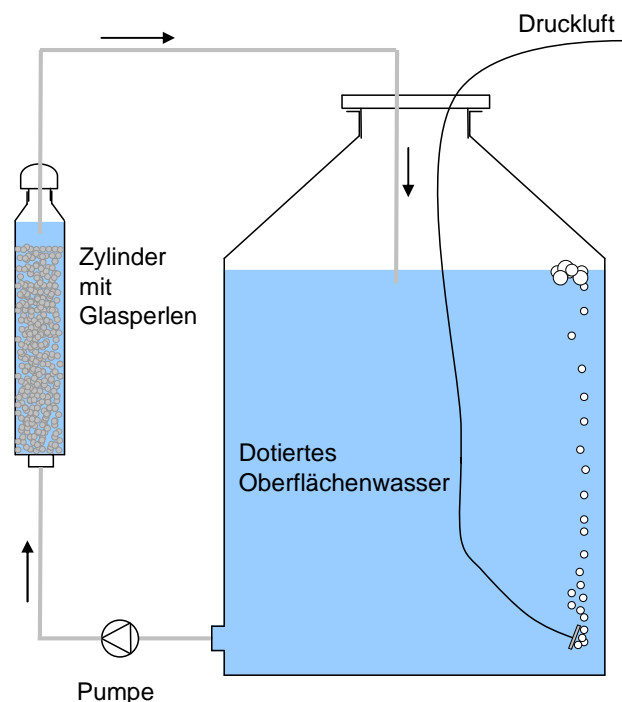


Abbildung 19: Zylinder mit Sinterglasperlen (links) und schematischer Aufbau des Festbettbioreaktors (rechts).

Dieser Laborversuch erlaubt Aussagen über die generelle Abbaubarkeit eines Spurenstoffs und ermöglicht einen Vergleich mit anderen Verbindungen, die schon auf die gleiche Weise untersucht wurden. Dotiertes Oberflächenwasser (Rheinwasser, $2 \mu\text{g/L}$) wurde im Kreislauf durch einen mit Sinterglasperlen gefüllten Zylinder gepumpt. Die Glasperlen besitzen eine große Oberfläche und bieten somit ideale Aufwuchsbedingungen für Mikroorganismen. Der Zylinder wird von unten nach oben durchströmt, um wassergesättigte Bedingungen zu garantieren. Der Ansatz wurde mit Druckluft belüftet und abgedunkelt, um die aerobe Uferfiltration möglichst realitätsnah zu simulieren. Untersucht wurde der Abbau von 1H-1,2,4-Triazol, DCD und 3,4-DMPP. Es wurden zwei Testfilteransätze parallel betrieben. Für die beiden Leitsubstanzen 1H-1,2,4-Triazol und DCD konnte kein Abbau bei einer Testlaufzeit von mehr als fünf Wochen festgestellt werden (Abbildung 20). Beim Vergleich der beiden Verlaufskurven fällt die deutlich geringere Standardabweichung für DCD auf, da bei dieser Verbindung Matrix bedingte Signalschwankungen durch das Vorhandensein des isotoopenmarkierten Standards ausgeglichen wurden. Bei 3,4-DMPP war während der Testlaufzeit ein leicht ansteigendes Konzentrationsniveau zu erkennen (Abbildung A5 im Anhang). Der Grund hierfür ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar. Der biologische Abbau von ^{14}C -markiertem 1H-1,2,4-Triazol wurde unter aeroben Bedingungen bereits in drei verschiedenen Böden untersucht (US EPA, 2009). Die Tests wurden im Dunkeln bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Applikationsmenge von $0,06 \text{ mg/kg}$ 1H-1,2,4-Triazol durchgeführt. Die Anfangskonzentrationen in den drei Böden nahmen innerhalb eines Zeitraums zwischen 6 und 12 Tagen um die Hälfte ab. Als Abbauprodukte wurden [1,2,4]Triazol-1-yl-essigsäure (max. 7 %), $^{14}\text{CO}_2$ (<33 %) und Hydroxy-1,2,4-triazol (<2,6 %) identifiziert. 65 % der eingesetzten Verbindung konnten nicht wiedergefunden werden.

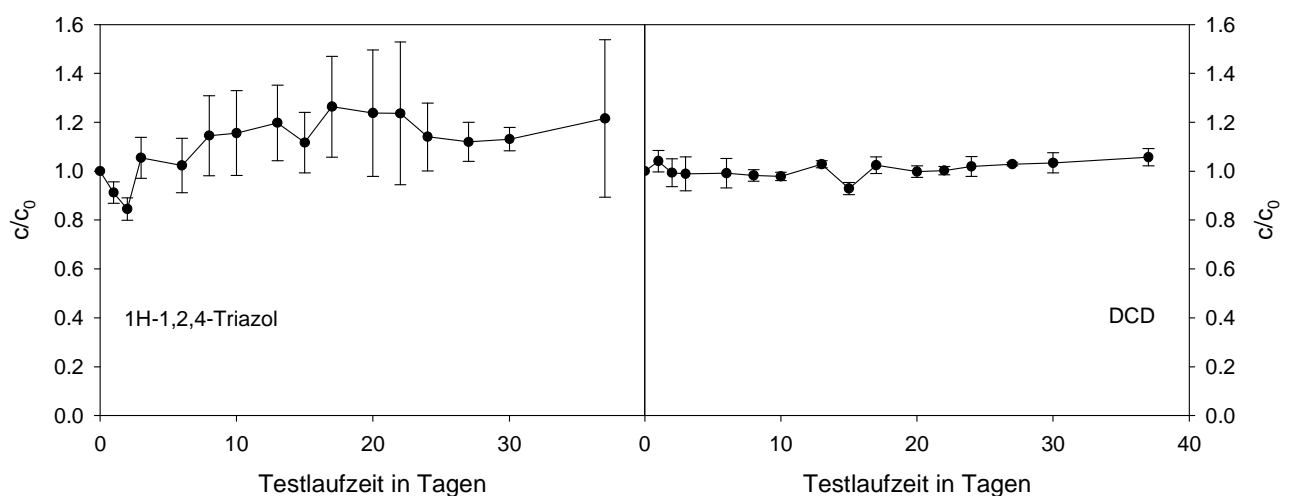


Abbildung 20: Verhalten von 1H-1,2,4-Triazol (links) und Dicyandiamid (rechts) im Festbettbioreaktor. Matrix: Rheinwasser; dotierte Konzentration: $2 \mu\text{g/L}$.

5.3 Adsorption an Bodenpartikel

Um das Adsorptionsverhalten von Substanzen an Böden abschätzen zu können, wurden Versuche gemäß OECD-Richtlinie 106 durchgeführt (OECD, 2000). Der Test soll grundsätzlich durch die Ermittlung eines Adsorptionskoeffizienten Voraussagen zur Substanzverteilung unter verschiedensten Umweltbedingungen ermöglichen. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Böden vorgesehen, die möglichst viele Interaktionen abdecken. Die Böden sollten hinsichtlich TOC-Gehalt, Ton-Gehalt, Textur und pH-Wert gut charakterisiert sein. Für die Versuche wurden zwei luftgetrocknete Standardböden von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA) Speyer erworben, die sich hinsichtlich ihres Gehalts an organischem Kohlenstoff, Kationenaustauschkapazität und Partikelverteilung deutlich unterscheiden. Die Böden wurden gedämpft geliefert, d. h. mit einer weitgehenden Unterdrückung der biologischen Aktivität, um zwischen Adsorption und biologischem Abbau der Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren unterscheiden zu können. Eine genaue Charakterisierung der verwendeten Böden ist in Tabelle A3 im Anhang zu finden.

Die Versuche wurden bei zwei unterschiedlichen Boden-zu-Wasser-Verhältnissen durchgeführt (1:5 und 1:25). Die wässrige Phase enthielt gemäß Richtlinie 0,01 M CaCl_2 und wurde vor Dotierung der Zielverbindungen mindestens zwölf Stunden mit dem verwendeten Boden equilibriert. Neben den eigentlichen Testansätzen wurden Kontrollen mit dotierter CaCl_2 -Lösung sowie mit wässriger Phase und Boden mitgeführt, um eine Adsorption der Zielverbindungen an die Gefäßwandung und eine Grundbelastung des verwendeten Bodens auszuschließen. Die eingesetzte Bodenmenge wurde durch Verwendung eines Überkopfschüttlers in Suspension gehalten. Die Testansätze wurden zu definierten Zeitpunkten zentrifugiert und die wässrige Phase beprobt. Für Versuche mit dem Boden LUFA 2.1 wurde ein paralleler Ansatz gewählt, bei dem die Anzahl der Testgefäße der Anzahl der Replikate entspricht (für jedes Boden-zu-Wasser-Verhältnis und jeden Beprobungszeitpunkt). Auf Grund der erzielten Ergebnisse wurde für die Tests mit dem Boden LUFA 2.4 nur ein Duplikat für jedes Boden-zu-Wasser-Verhältnis angesetzt, von dem jeweils zum Beprobungszeitpunkt ein Aliquot entnommen wurde (serieller Ansatz). In Abbildung 21 sind die Konzentrationsveränderungen für alle untersuchten Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren für zwei Boden-zu-Wasser-Verhältnisse unter Verwendung des Bodens LUFA 2.1 aufgetragen. In beiden Testansätzen war für keine der Verbindungen eine Adsorption nach einer Testlaufzeit von 48 Stunden festzustellen. Obwohl die Proben nach dem Zentrifugieren filtriert wurden, ist für Substanzen, für die keine internen Standards vorhanden waren, eine höhere Standardabweichung, insbesondere bei dem Ansatz mit mehr Bodenmaterial, festzustellen. Da für die Leitverbindungen keine signifikante Adsorption beobachtet wurde, wurde auf die

Berechnung von Adsorptionskoeffizienten verzichtet. Für 1H-1,2,4-Triazol stimmen die Werte gut mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein, wo der Verbindung eine hohe Mobilität bescheinigt wurde (US EPA, 2009). Es wurden Adsorptionskoeffizienten K_d zwischen 0,23 und 0,83 für verschiedene Bodentypen berechnet. Korrigiert um den Anteil an organischem Kohlenstoff ergab sich ein mittlerer K_{OC} -Wert von 112 ± 58 . und 1H-1,2,4-Triazol (US EPA, 2009). Zhang und Koautoren berichten für DCD über eine positive Korrelation zwischen Sorption und dem Anteil an organischem Kohlenstoff im Boden. DCD sorbierte in dieser Studie am besten an Torf und kaum an einen Boden, bei dem die organische Substanz entfernt wurde (Zhang et al., 2004).

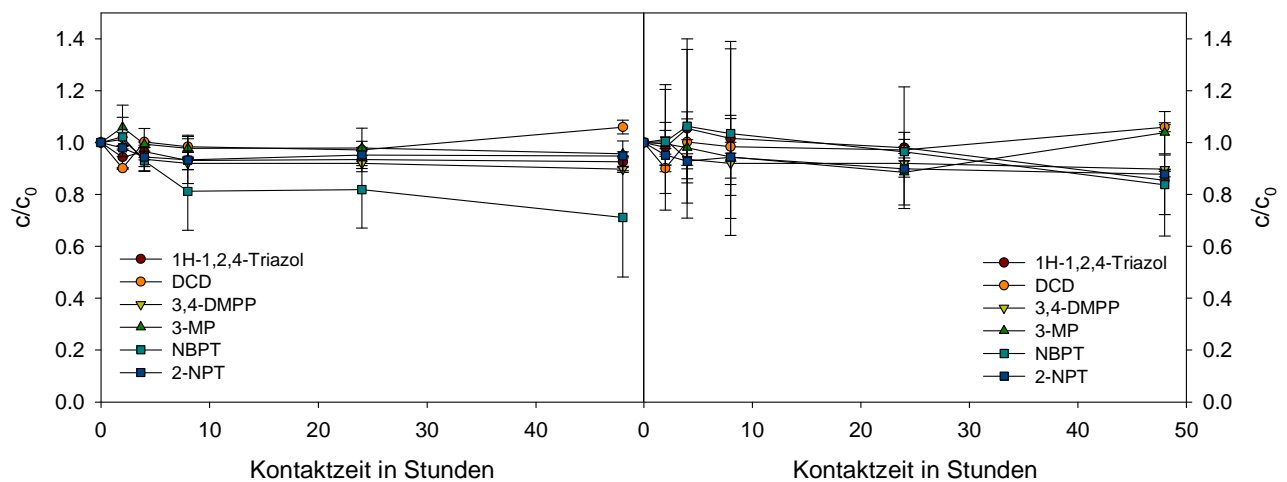


Abbildung 21: Adsorption von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren an Bodenpartikel (LUFA 2.1) bei zwei verschiedenen Boden-zu-Wasser-Verhältnissen (links 1:25, rechts 1:5).

Auf Grund der Ergebnisse mit dem ersten Bodenmaterial (LUFA 2.1) wurden die Sorptionsversuche mit dem LUFA-Boden 2.4 nur mit dem geringeren Boden-zu-Wasser-Verhältnis durchgeführt. Dieser Boden besitzt eine höhere Kationenaustauschkapazität sowie einen höheren Anteil an Partikel $< 0,002$ mm und mehr organischen Kohlenstoff. Die einzige Substanz, für die hier tendenziell eine geringe Adsorption festzustellen war, ist NBPT (Abbildung A5). Dies trifft auch für die Versuche mit dem Boden LUFA 2.1 zu.

Die in Kapitel 5 erzielten Ergebnisse lassen auch Rückschlüsse auf die Stabilisierung von Wasserproben zu. Die untersuchten Verbindungen sind in Wasser stabil, zeigen eine Persistenz gegenüber einem biologischen Abbau und neigen nicht zur Sorption an Glas oder Partikeln. Bei Analysenzeiten von max. zwei Wochen kann somit ein gekühlter Probentransport und eine Lagerung ohne weitere Stabilisierungsmaßnahmen empfohlen werden.

6 Auswirkung von Nitrifikationshemmern auf den Abbau von organischen Spurenstoffen

Eine Unterdrückung der Nitrifikation ist vor allem unerwünscht, wenn hohe Ammoniumkonzentrationen durch eine Kombination von Nitrifikation und Denitrifikation reduziert werden sollen. Dies gilt beispielsweise für die in Kläranlagen ablaufenden biologischen Reinigungsprozesse, die insbesondere der Eutrophierung von Gewässern entgegenwirken sollen. Aufgrund ihrer spezifischen Wirkungen ist es offensichtlich, dass Nitrifikationshemmer diesen Nitrifikationsprozess stören können. Allerdings liegen bisher keine Untersuchungen zu negativen Auswirkungen der in dieser Studie untersuchten Verbindungen auf Mikroorganismen im Belebtschlamm von Kläranlagen vor, die auch für den biologischen Abbau von organischen Spurenstoffen verantwortlich sind. Bekannt ist aber, dass andere Nitrifikationshemmer, wie beispielsweise Thioharnstoff, den Nitrifikationsprozess in Kläranlagen stören können. So wurde für die Jahre 2009 und 2010 von schweren Ausfällen der Nitrifikation in einer Berliner Kläranlage berichtet, für die Thioharnstoff verantwortlich gemacht werden konnte (Stevens et al., 2012). Die Autoren verweisen zudem auf erste Untersuchungen, die das Auftreten von Thioharnstoff auch in anderen Kläranlagen im µg/L-Bereich vermuten lassen. Eine vollständige Elimination der Verbindung während der Abwasserreinigung findet dabei nicht immer statt (Stevens et al., 2012).

Die Auswirkungen des Nitrifikationshemmers Allylthioharnstoff (ATU) auf den Abbau von fünf sauren pharmazeutischen Wirkstoffen wurden bereits in Laborversuchen mit verschiedenen Klärschlämmen untersucht (Falas et al., 2012). Bei Testansätzen mit ATU war nur die Elimination von Ibuprofen in einem nitrifizierenden Schlamm und von Ibuprofen und Naproxen in einem Schlamm mit schwacher Nitrifikationsleistung merklich reduziert. Die Autoren folgerten, dass durch ATU hauptsächlich heterotrophe Bakterien beeinflusst werden, die für den Abbau der pharmazeutischen Wirkstoffe verantwortlich sind, und nicht die in geringer Menge vorhandenen AOB. Eine Studie von Tran und Koautoren (2009) berichtet über einen verringerten Abbau verschiedener pharmazeutischer Wirkstoffe, wenn ATU in einer Konzentration von 10 mg/L zu nitrifizierendem Klärschlamm gegeben wurde (Tran et al., 2009). Die reduzierte biologische Aktivität wurde hier ausschließlich der Beeinflussung von nitrifizierenden und nicht heterotrophen Bakterien zugeschrieben. Die Nitrifikation wurde somit als wichtiger Prozess für den Abbau von organischen Spurenstoffen interpretiert.

In wie weit AOB für den Abbau von Spurenstoffen verantwortlich sind, wurde insbesondere für den Abbau natürlicher und synthetischer Östrogene diskutiert. Versuche mit nitrifizierendem Belebtschlamm zeigten sowohl mit als auch ohne Zusatz des Nitrifikationshemmers ATU einen Abbau von Estron, 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol (EE2) (Shi et al., 2004). Wurde ausschließlich das Ammonium oxidierende Bakterium *Nitrosomonas europaea* eingesetzt, war nur ein Abbau bei Abwesenheit von ATU zu beobachten. Yi und Harper (2007) kommen zu einem ähnlichen Ergebnis. AOB waren in der Lage, EE2 abzubauen, wobei die Elimination von Ammonium und EE2 gut korrelierte. Ob die durch die Nitrifikanten gebildeten Zwischenprodukte als Substrat für heterotrophe Bakterien dienen und ihnen somit eine Schlüsselrolle für den Abbau von EE2 zukommt, konnte nicht abschließend geklärt werden (Yi und Harper, 2007). Die Tatsache, dass die Elimination von Östrogenen durch den Einsatz von ATU gehemmt wird, wurde auch von anderen Autoren als starker Hinweis gewertet, dass die Nitrifikation der Hauptmechanismus des biologische Abbaus für diese Verbindung darstellt (Forez et al., 2008). Obige Ergebnisse werden jedoch durch eine nachfolgend publizierte Studie mit umweltrelevanteren Konzentrationen an EE2 in Frage gestellt, da eine abiotische Reaktion in Form einer Nitrierung von EE2 festgestellt wurde (Gaulke et al., 2008). Diese Möglichkeit wurde in den vorangegangenen Studien nicht ausgeschlossen. Bei einer Hemmung der Nitrifikation durch ATU wäre selbstverständlich auch die Entstehung von NO₂-Stickstoff und somit die Möglichkeit einer Nitrierung inhibiert worden. Außerdem wurde laut den Autoren der Beeinflussung heterotropher Bakterien durch ATU bislang zu wenig Beachtung geschenkt, da durch ATU auch die Enzymaktivität anderer Bakterien unterdrückt werden kann (Robertson et al., 1989).

Unabhängig davon, ob Nitrifikationshemmer und Ureaseinhibitoren selektiv nitrifizierende Bakterien hemmen oder auch inhibitorisch auf heterotrophe Bakterien wirken, ist die Frage zu klären, ob sie den Abbau von anderen organischen Spurenstoffen negativ beeinflussen. Ob die für den Abbau verantwortlichen Mikroorganismen gehemmt werden, wurde in Anlehnung an den OECD Test 302 B (Zahn-Wellens-Test) untersucht (OECD, 1992). Im Zahn-Wellens-Test wird der biologische Abbau von Verbindungen in einem mineralischen Medium untersucht, das mit Klärschlamm angeimpft wird. Die Proben werden normalerweise über 28 Tage bei 20-25 °C im Dunkeln oder bei diffusem Licht belüftet. Die biologische Aktivität des Klärschlammes wird dabei parallel mit einer Referenzsubstanz überprüft. Im Normalfall wird der Abbau der Zielverbindung über die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) ermittelt. Aus diesem Grund wird bei dem Test mit relativ hohen Substanzkonzentrationen gearbeitet und die Testsubstanz muss eine gute Wasserlöslichkeit von >50 mg DOC/L besitzen. Da allerdings bei diesem Testansatz

keine Aussagen über den Primärabbau von organischen Spurenstoffen möglich sind und keine umweltrelevanten Bedingungen vorliegen, wurde der Test leicht modifiziert.

Als Inokulum wurde Klärschlamm der Kläranlage Karlsruhe verwendet, der direkt aus dem Belebtschlammbecken entnommen wurde. Dieser wurde zunächst zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Schlamm drei Mal mit Trinkwasser gewaschen. Der zentrifugierte Schlamm besitzt einen Wasseranteil von ca. 90 %, was bei einer eingesetzten Menge von ca. 8 g einem Anteil an Trockensubstanz (TS) von 0,8 g TS/L entspricht (OECD Vorgabe 0,2 – 1 g TS/L). Zwischen Entnahme des Belebtschlammes und dessen Einsatz in den Batchversuchen lagen weniger als drei Stunden. Dennoch wurde die biologische Aktivität des Schlamm anhand einer Positivkontrolle überprüft. Hierfür wurde Ammoniumacetat in einer Konzentration von 50 mg DOC/L eingesetzt. Die eigentlichen Testansätze enthielten die gleiche Menge an Inokulum und wurden mit einem Mix von organischen Spurenstoffen in einer Konzentration von 20 µg/L bzw. 40 µg/L dotiert. Dies entspricht ungefähr dem Konzentrationsniveau in unbehandeltem Abwasser. Bei den ausgewählten Spurenstoffen handelt es sich um leicht biologisch abbaubare pharmazeutische Wirkstoffe (Metformin, Paracetamol) und künstliche Süßstoffe (Cyclamat, Saccharin). Außerdem wurden die relativ persistenten Röntgenkontrastmittel Iomeprol und Iopromid sowie das Antiepileptikum Gabapentin untersucht. Neben einer Nullprobe wurde den Testansätzen die Nitrifikationshemmer DCD in den Testkonzentrationen 0; 0,01; 0,05; 0,1 und 1 mg/L oder 1H-1,2,4-Triazol mit 0,05 und 1 mg/L zudotiert.

Die Beprobung der Testansätze erfolgte vor der Zugabe des gewaschenen Klärschlammes und dann erstmalig nach 2 h bzw. 3 h, um die Adsorption der dotierten Spurenstoffe an den Klärschlamm abschätzen zu können. Anschließend wurde zwei Mal wöchentlich bis zu einer Testlaufzeit von 28 d beprobt (Testreihe 1). In einer zweiten Testreihe wurde auf Grund des relativen raschen Abbaus von leicht abbaubaren Spurenstoffen im ersten Test eine kürzere Testlaufzeit von einer Woche gewählt und eine tägliche Beprobung durchgeführt. Der Abbau der Positivsubstanz wurde mittels DOC-Analysen bestimmt und der Primärabbau der organischen Spurenstoffe durch Zielanalytik mittels LC/MS/MS.



Abbildung 22: Batchansätze in Anlehnung an den Zahn-Wellens-Test zur Untersuchung der Auswirkungen von Nitrifikationshemmern auf den Abbau anderer organischer Spurenstoffe.

Die biologische Aktivität der angeimpften Testansätze wurde durch die Analyse des DOC durch den Testansatz mit Ammoniumacetat überprüft. Nach Zugabe der Positivsubstanz, aber vor Zugabe des gewaschenen Belebtschlammes wurde eine DOC-Konzentration von $54 \pm 1,4$ mg/L ermittelt. Nach 1 d Testlaufzeit waren nur noch ca. 10 % des DOC-Ausgangsgehaltes nachzuweisen. Dies belegt das Potential des verdünnten Belebtschlammes für einen Spurenstoffabbau. Im weiteren Testverlauf stieg der DOC dann kontinuierlich wieder an, was in der Aktivität des Schlammes und dessen Abbau begründet ist. Unabhängig von der Konzentration konnte bei keinem der beiden Nitrifikationshemmer DCD und 1H-1,2,4-Triazol eine Auswirkung auf den Primärabbau der untersuchten Spurenstoffe festgestellt werden. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der zweiten Testserie dargestellt. Die sehr gut biologisch abbaubaren Verbindungen Cyclamat und Paracetamol waren bereits nach einer Testlaufzeit von wenigen Stunden nicht mehr nachweisbar. Der Primärabbau von Saccharin und Metformin war nach einem bzw. zwei Tagen komplett. Der Abbau von Metformin korrelierte dabei sehr gut mit der Bildung seines biologischen Abbauprodukts Guanylarnstoff. Bei keinem der untersuchten Spurenstoffe wurde ein signifikant unterschiedliches Abbauverhalten im Vergleich zur Nullprobe festgestellt werden. Für die beiden Röntgenkontrastmittel waren in den meisten Testansätzen gegen Ende der siebentägigen Testlaufzeit noch zwischen 60 % und 80 % der Startkonzentration nachweisbar. Gabapentin wurde kaum biologisch abgebaut. Auch für diese mäßig biologisch abbaubaren Spurenstoffe war kein Unterschied zur Probe ohne Nitrifikationshemmer festzustellen.

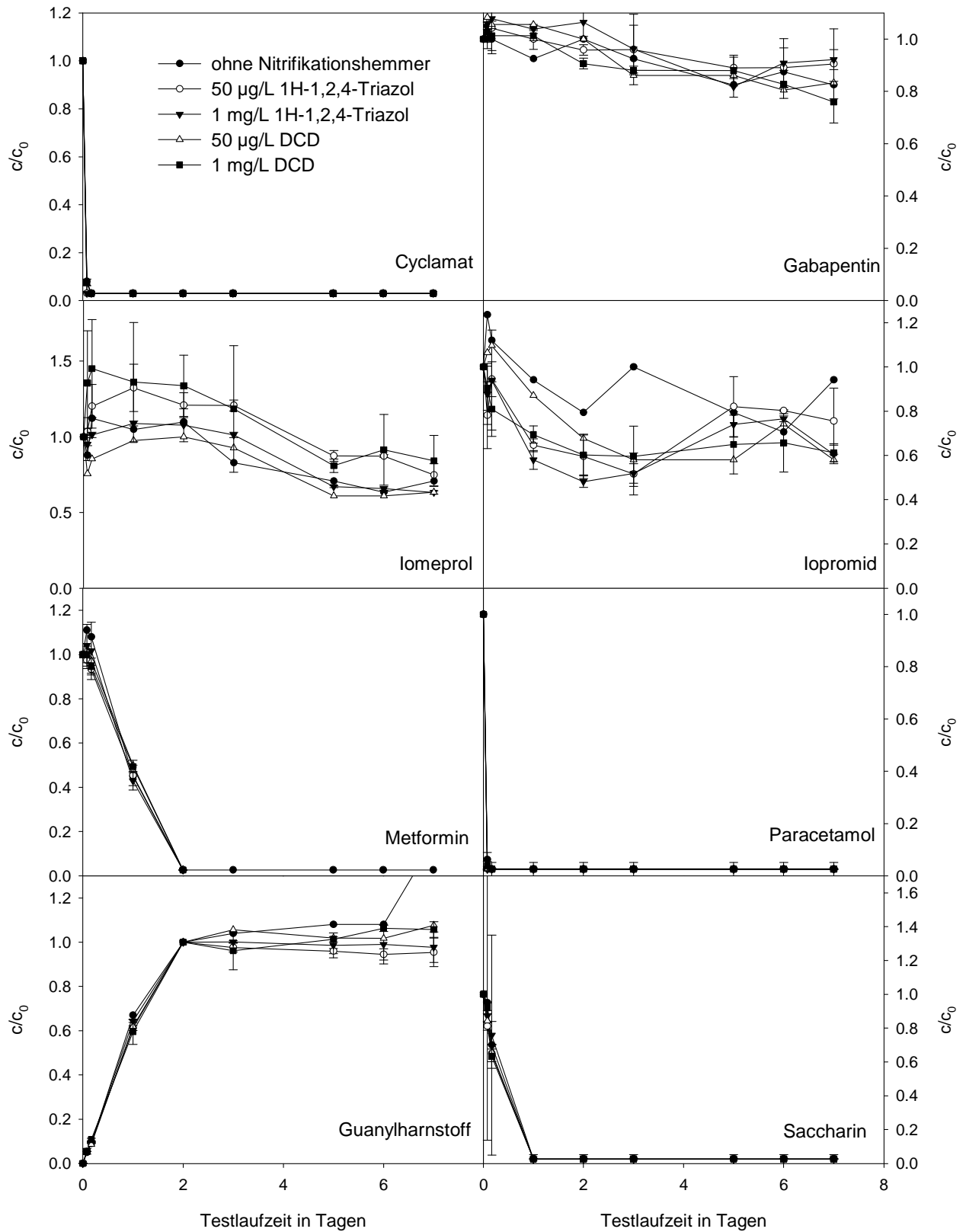


Abbildung 23: Einfluss von Nitrifikationshemmern auf den Konzentrationsverlauf von organischen Spurenstoffen in Batchansätzen mit Belebtschlamm (modifizierter Zahn-Wellens-Test) über eine Testlaufzeit von sieben Tagen.

Der Konzentrationsverlauf für 1H-1,2,4-Triazol und DCD wurden in diesem Laborversuch ebenfalls verfolgt (Abbildung 24). Dargestellt sind Mittelwerte ($n=2$) aus den Batchansätzen mit einer Konzentration von 1 mg/L des jeweils eingesetzten Nitrifikationsinhibitors ab einer Testlaufzeit von 4 h, um eine ausreichende Vermischung zu gewährleisten und eine Adsorption der Verbindungen an den Klärschlamm auszublenden. Beide Verbindungen waren nach einer Woche Testlaufzeit noch mit den zu Testbeginn eingesetzten Konzentrationen nachzuweisen. Dies lässt erste Rückschlüsse auf ihre Stabilität bei der biologischen Abwasserreinigung zu. Ein kompletter Primärabbau in Kläranlagen ist unwahrscheinlich, da Verbindungen, die gut in Kläranlagen eliminiert werden (Cyclamat, Saccharin, Metformin, Paracetamol) auch in diesem Versuch nach kurzer Zeit abgebaut wurden. Für 1H-1,2,4-Triazol wird auch in der Literatur nur von einem minimalen Abbau (1 %) nach einer Testlaufzeit von 28 Tagen in einem modifizierten Zahn-Wellens-Test berichtet (US EPA, 2009).

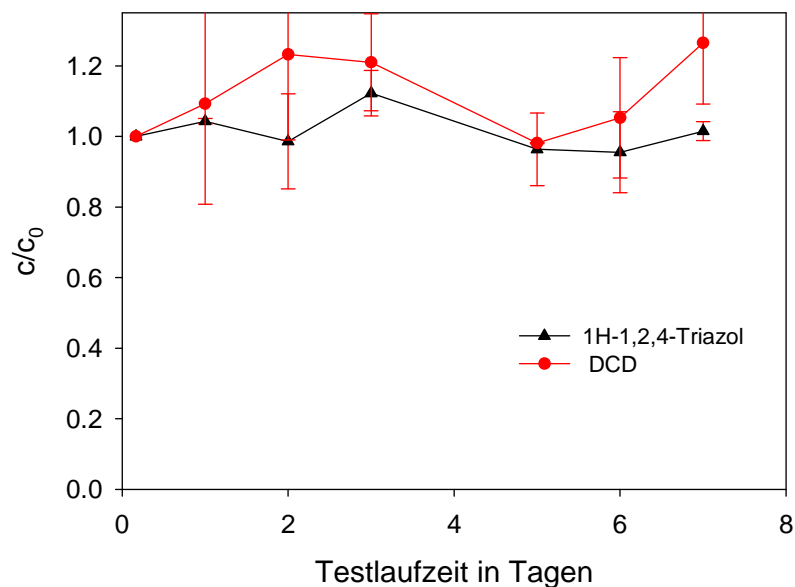


Abbildung 24: Konzentrationsverlauf von 1H-1,2,4-Triazol und DCD in Batchansätzen mit Belebtschlamm (modifizierter Zahn-Wellens-Test) über eine Testlaufzeit von sieben Tagen.

7 Zusammenfassung

Die wissenschaftliche Literatur über Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren ist für einige Vertreter der Substanzgruppe umfangreich, beschäftigt sich jedoch hauptsächlich mit deren Wirksamkeit in der Landwirtschaft. Erkenntnisse zum Umweltverhalten sind gering und basieren weitgehend auf Laborversuchen. Lediglich eine kürzlich erschienene Publikation berichtet über das Vorkommen von DCD in der Umwelt und belegt gleichzeitig die Notwendigkeit zu weiteren Untersuchungen. Die hier vorgestellten Ergebnisse des Forschungsprojekts „Studie zur Bedeutung von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren für die Roh- und Trinkwasserbeschaffenheit in Deutschland“ tragen dazu bei, die vorhandene Wissenslücke zu schließen und stellen eine gute Ausgangsbasis für weitergehende Untersuchungen dar.

Die entwickelte Multimethode zum spurenanalytischen Nachweis der Zielverbindungen erlaubt deren Bestimmung im unteren bis mittleren ng/L-Bereich per Direktinjektion der wässrigen Probe. Eine aufwendige Probenvorbereitung entfällt. Auf Grund der geringen Molekülgrößen der beiden Nitrifikationshemmer 1H-1,2,4-Triazol und DCD entsteht jeweils nur ein intensives Produktion bei der Fragmentierung der Verbindungen im Massenspektrometer. Ein zweites Fragment-Ion kann erst bei höheren Konzentrationen als Qualifizier zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen werden. Es wird deshalb die Verwendung von isotoopenmarkierten Standards empfohlen, die mittlerweile verfügbar sind, um die Ergebnisse abzusichern.

Die Ergebnisse des Monitorings an größeren deutschen Fließgewässern lassen den Schluss zu, dass 1H-1,2,4-Triazol und DCD in Deutschland die Leitverbindungen der Verbindungsklasse sind. Beide wurden selbst in großen Fließgewässern wie dem Rhein in Konzentrationen von mehreren µg/L nachgewiesen. Die Belastungssituation stellt sich allerdings sehr heterogen dar. Für 1H-1,2,4-Triazol konnte eine Belastungswelle ausgehend von Basel im April 2013 festgestellt werden. Im weiteren Jahresverlauf waren dagegen bis einschließlich der Probenahmestelle Köln kaum noch Positivbefunde im Rhein zu verzeichnen, wohingegen nur wenige Flusskilometer abwärts in Düsseldorf in 90% der Proben 1H-1,2,4-Triazol nachgewiesen wurde. Auch in anderen untersuchten Oberflächengewässern war 1H-1,2,4-Triazol nur vereinzelt nachzuweisen. Lediglich in einem Fließgewässer mit relativ hohem Abwasseranteil konnte die Verbindung in fünf von sechs Proben in Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze detektiert werden.

DCD scheint dagegen ubiquitär in großen Flüssen vorhanden zu sein. Auffallend waren hier erhöhte Konzentrationen im Rhein ab der Probenahmestelle Mainz, die offensichtlich

Einträgen aus dem Neckar geschuldet sind. Nahe der Einmündung in den Rhein wurden im Neckar bei Mannheim, bei stark schwankenden Konzentrationen, im Mittel mehr als 10 µg/L DCD gemessen. Flussaufwärts in Kochendorf und Deizisau lagen die Konzentrationen dagegen deutlich darunter. Die hohen Konzentrationen in Neckar und Rhein stammen offenbar aus dem Jagst-Einzugsgebiet. In Proben aus dem Unterlauf der Jagst wurden z. T. über 100 µg/L DCD nachgewiesen. Das Einzugsgebiet der Jagst ist zwar landwirtschaftlich geprägt, es lässt sich zum derzeitigen Zeitpunkt allerdings nicht zweifelsfrei belegen, dass die hohen Konzentration aus der landwirtschaftlichen Anwendung von DCD stammen oder ob eine industrielle Einleitung zu Grunde liegt. Andere Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren wurden in keinem der untersuchten Fließgewässer detektiert.

In Grund- und Trinkwässern konnten lediglich 1H-1,2,4-Triazol und DCD vereinzelt nachgewiesen werden. Die Anzahl der Positivbefunde am Gesamtumfang der untersuchten Proben war jedoch gering und die Konzentrationen lagen nahe den Bestimmungsgrenzen. Systematische Untersuchungen bei Wasserversorgern mit Oberflächenwasser beeinflussten Rohwässern liegen jedoch nicht vor. Da Positivbefunde hier nicht völlig ausgeschlossen werden können, sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, die Entfernungsmöglichkeiten von Nitrifikationshemmern bei der Trinkwasseraufbereitung genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen dieser Studie untermauern dies. Die durchgeführten Untersuchungen verdeutlichen die Stabilität und Mobilität von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren. In Wasser sind die Verbindungen auch bei saurem pH-Wert über mehrere Wochen stabil. Auch eine Adsorption an Glas scheint nicht stattzufinden, so dass aus den Untersuchungen zur Hydrolyse Empfehlungen für Stabilisierung und Lagerung der Proben abgeleitet werden können. Bei der simulierten aeroben Uferfiltration war kein biologischer Primärabbau der Leitsubstanzen 1H-1,2,4-Triazol und DCD festzustellen. Laborversuche mit verschiedenen Standardböden bestätigten die wenigen Literaturwerte zur geringen Sorptionsneigung der Verbindungen. Bei Versuchen mit verdünntem Klärschlamm zum biologischen Primärabbau von organischen Spurenstoffen war kein Einfluss von 1H-1,2,4-Triazol und DCD auf das Abbauverhalten festzustellen. Dies war auch der Fall, wenn die beiden Verbindungen in deutlich höheren Konzentrationen den Batchversuchen zugesetzt wurden, als diese in der Umwelt nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 1H-1,2,4-Triazol und DCD als neue Umweltkontaminanten nachgewiesen werden konnten, deren Nachweis in Oberflächenwasser beeinflussten Rohwässern auf Grund ihrer Mobilität und Persistenz nicht auszuschließen ist. Dies verdeutlicht auch den weiteren Forschungsbedarf hinsichtlich potenzieller Eliminationsmöglichkeiten während der Aufbereitung von Rohwässern.

8 Literatur

Abdel-Sabour, M.F., Massoud, M.A., Baveye, P., 1990. The Effect of Water-Movement on the Transport of Dicyandiamide, Ammonium and Urea in Unsaturated Soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 153 (4), 245-247.

Amorim, C.C., Bottrel, S.E.C., Costa, E.P., Teixeira, A.P.C., Leao, M.M.D., 2013. Removal of ethylthiourea and 1,2,4-triazole pesticide metabolites from water by adsorption in commercial activated carbons. *Journal of Environmental Science and Health Part B- Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 48 (3), 183-190.

Azam, F., Benckiser, G., Müller, C., Ottow, J.C.G., 2001. Release, movement and recovery of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), ammonium, and nitrate from stabilized nitrogen fertilizer granules in a silty clay soil under laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 34 (2), 118-125.

Briggs, G.G., 1975. Behavior of Nitrification Inhibitor N-Serve in Broadcast and Incorporated Applications to Soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26 (8), 1083-1092.

Byrnes, B.H., Gutser, R., Amberger, A., 1989. Greenhouse Study on the Effects of the Urease Inhibitors Phenyl Phosphorodiamidate and N-(n-butyl) Thiophosphoric Triamide on the Efficiency of Urea Applied to Flooded Rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 152 (1), 67-72.

Callender, T., Davis, L.C., 2002. Nitrification inhibition using benzotriazoles. *Journal of Hazardous Substances Research* 4 (2), 1-16.

Cameron, K.C., Di, H.J., Moir, J.L., 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology* 162 (2), 145-173.

Chambers, C.A., Smith, S.E., Smith, F.A., Ramsey, M.D., Nicholas, D.J.D., 1980. Symbiosis of *Trifolium-Subterraneum* with Mycorrhizal Fungi and *Rhizobium-Trifolii* As Affected by Ammonium-Sulfate and Nitrification Inhibitors. *Soil Biology & Biochemistry* 12 (2), 93-100.

Cochran, V.L., Papendic, R.I., Woody, W.M., 1973. Effectiveness of 2 Nitrification Inhibitors for Anhydrous Ammonia Under Irrigated and Dryland Conditions. *Agronomy Journal* 65 (4), 649-653.

Corré, W.J., Zwart, K.B., 1995. Effects of DCD addition to slurry on nitrate leaching in sandy soils. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 43 (2), 195-204.

Creason, G.L., Schmitt, M.R., Douglass, E.A., Hendrickson, L.L., 1990. Urease Inhibitory Activity Associated with N-(Normal-Butyl)Thiophosphoric Triamide Is Due to Formation of Its Oxon Analog. *Soil Biology & Biochemistry* 22 (2), 209-211.

Cui, M., Sun, X.C., Hu, C.X., Di, H.J., Tan, Q.L., Zhao, C.S., 2011. Effective mitigation of nitrate leaching and nitrous oxide emissions in intensive vegetable production systems using a nitrification inhibitor, dicyandiamide. *Journal of Soils and Sediments* 11 (5), 722-730.

CVUA Karlsruhe. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe - Jahresbericht 2001.

de Klein, C.A.M., Kosmrlj, K., Kublik, S., Palmer, I., Pfab, H., Ruser, R., Fiedler, S., Schloter, M., 2011. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 84 (1), 182-186.

Di, H.J., Cameron, K.C., 2012. How does the application of different nitrification inhibitors affect nitrous oxide emissions and nitrate leaching from cow urine in grazed pastures? *Soil Use and Management* 28 (1), 54-61.

Dominguez, M.J., Sanmartin, C., Font, M., Palop, J.A., Francisco, S.S., Urrutia, O., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.M., 2008. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (10), 3721-3731.

Düngemittelverordnung (DüMV) - Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln, 2008.

EFSA, 2009. Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on a request from the European Commission on the safety and efficacy of CreAmino™ (guanidinoacetic acid) as feed additive for chickens for fattening. *The EFSA Journal* 988, 1-30.

Eizuka, T., Ito, A., Chida, T., 2003. Degradation of ipconazole by microorganisms isolated from paddy soil. *Journal of Pesticide Science* 28 (2), 200-207.

Estermaier, L.M., Sieber, A.H., Lottspeich, F., Matern, D.H.M., Hartmann, G.R., 1992. Biochemical Degradation of Cyanamide and Dicyandiamide. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31 (5), 620-622.

Falas, P., Andersen, H.R., Ledin, A., Jansen, J.L., 2012. Impact of solid retention time and nitrification capacity on the ability of activated sludge to remove pharmaceuticals. *Environmental Technology* 33 (8), 865-872.

Fettweis, U., Mittelstaedt, W., Schimansky, C., Fiihr, F., 2001. Lysimeter experiments on the translocation of the carbon-14-labelled nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in a gleyic cambisol. *Biology and Fertility of Soils* 34 (2), 126-130.

Flessa, H., Müller, D., Plassmann, K., Osterburg, B., Techen, A.-K., Nitsch, H., Nieberg, H., Sanders, J., Meyer zu Hartlage, O., Beckmann, E., Anspach, V., 2012. Studie zur Vorbereitung einer effizienten und gut abgestimmten Klimaschutzpolitik für den Agrarsektor. Sonderheft 361, Johann Heinrich von Thünen-Institut Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei.

Font, M., Dominguez, M.J., Sanmartin, C., Palop, J.A., San Francisco, S., Urrutia, O., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.M., 2008. Structural characteristics of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. Requirements for activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (18), 8451-8460.

Fuchs, M., Schuster, C., Kreuter, T., 2011. Verbesserung der N-Effizienz und Verringerung von Umweltbeeinflussungen organischer Dünger durch die gezielte Anwendung von Nitrifikationsinhibitoren in Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften Band 23 - Stickstoff in Pflanze, Boden und Umwelt, Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pflanzenernährung e. V. und der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e. V.

Gaulke, L.S., Strand, S.E., Kalthorn, T.F., Stensel, H.D., 2008. 17 alpha-ethinylestradiol Transformation via Abiotic Nitration in the Presence of Ammonia Oxidizing Bacteria. *Environmental Science & Technology* 42 (20), 7622-7627.

Gopalakrishnan, S., Watanabe, T., Pearse, S.J., Ito, O., Hossain, Z.A.K.M., Subbarao, G.V., 2009. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. *Soil Science and Plant Nutrition* 55 (5), 725-733.

Guo, Y.J., Di, H.J., Cameron, K.C., Li, B.W., Podolyan, A., Moir, J.L., Monaghan, R.M., Smith, L.C., O'Callaghan, M., Bowatte, S., Waugh, D., He, J.Z., 2013. Effect of 7-year application of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on soil microbial biomass, protease and deaminase activities, and the abundance of bacteria and archaea in pasture soils. *Journal of Soils and Sediments* 13 (4), 753-759.

Hays, J.T., Forbes, D.J., 1974. Thiourea Solutions As Nitrification Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22 (3), 468-470.

Hebig, K.H., Nödler, K., Licha, T., Scheytt, T.J., 2014. Impact of materials used in lab and field experiments on the recovery of organic micropollutants. *Science of the Total Environment* 473-474 (0), 125-131.

Hendrickson, L.L., Douglass, E.A., 1993. Metabolism of the Urease Inhibitor N-(N-Butyl) Thiophosphoric Triamide (Nbpt) in Soils. *Soil Biology & Biochemistry* 25 (11), 1613-1618.

Hernandez, M., Jia, Z.J., Conrad, R., Seeger, M., 2011. Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *Fems Microbiology Ecology* 78 (3), 511-519.

Huber, D.M., Warren, H.L., Nelson, D.W., Tsai, C.Y., 1977. Nitrification Inhibitors - New Tools for Food-Production. *Bioscience* 27 (8), 523-529.

Hughes, T.D., Welch, L.F., 1970. Potassium Azide As A Nitrification Inhibitor. *Agronomy Journal* 62 (5), 595-599.

Iizumi, T., Mizumoto, M., Nakamura, K., 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10), 3656-3662.

Karrenbrock, F., Knepper, T.P., Sacher, F., Lindner, K., 1999. Development of a standardized testfilter for the determination of microbial degradability of single compounds. *Vom Wasser* 92, 361-371.

Kawakami, E.M., Oosterhuis, D.M., Snider, J.L., Mozaffari, M., 2012. Physiological and yield responses of field-grown cotton to application of urea with the urease inhibitor NBPT and the nitrification inhibitor DCD. *European Journal of Agronomy* 43, 147-154.

Kim, D.G., Saggari, S., Roudier, P., 2012. The effect of nitrification inhibitors on soil ammonia emissions in nitrogen managed soils: a meta-analysis. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 93 (1), 51-64.

Kleineidam, K., Kosmrlj, K., Kublik, S., Palmer, I., Pfab, H., Ruser, R., Fiedler, S., Schloter, M., 2011. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 84 (1), 182-186.

Knepper, T.P., Kirschhofer, F., Lichter, I., Maes, A., Wilken, R.D., 1999a. Metabolism studies of phenylsulfonamides relevant for water works. *Environmental Science & Technology* 33 (6), 945-950.

Knepper, T.P., Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Karrenbrock, F., Roerden, O., Lindner, K., 1999b. Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management* 19, 77-99.

Knox, J.H., Ross, P., 1997. Carbon-based packing materials for liquid chromatography - Structure, performance, and retention mechanisms, Seiten 73-119 in *Advances in Chromatography, Volume 37*, Brown, P.R., Grushka, E. (Hrsg), Marcel Dekker Inc., New York.

KosmetikV. Kosmetik-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. Oktober 1997 (BGBl. I S. 2410), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 21. Dezember 2012 (BGBl. 2013 I S. 2) geändert worden ist.

Kot, M., Zaborska, W., Orlinska, K., 2001. Inhibition of jack bean urease by N-(n-butyl) thiophosphorictriamide and N-(n-butyl) phosphorictriamide: Determination of the inhibition mechanism. *Journal of Enzyme Inhibition* 16 (6), 507-516.

Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), 1999. Gewässerschützende Landbewirtschaftung in Wassergewinnungsgebieten, Abschlußbericht.

Ledgard, S.F., Menneer, J.C., Dexter, M.M., Kear, M.J., Lindsey, S., Peters, J.S., Pacheco, D., 2008. A novel concept to reduce nitrogen losses from grazed pastures by administering soil nitrogen process inhibitors to ruminant animals: A study with sheep. *Agriculture Ecosystems & Environment* 125 (1-4), 148-158.

LTZ, 2012. Fundaufklärung Isoproturon - Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) Karlsruhe. Abschlussbericht.

Maftoun, M., Sheibany, B., 1979. Comparative Phytotoxicity of Several Nitrification Inhibitors to Soybean Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (6), 1365-1368.

Maier, U., 2012. Belastung der Gewässer mit Mikroschadstoffen - Arzneimitteleintrag in die Gewässer in Baden-Württemberg, 2. Fachsymposium Mikroschadstoffe NRW.

McCarty, G.W., 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29 (1), 1-9.

- McCarty, G.W., Bremner, J.M., 1989. Inhibition of Nitrification in Soil by Heterocyclic Nitrogen-Compounds. *Biology and Fertility of Soils* 8 (3), 204-211.
- Menendez, S., Barrena, I., Setien, I., Gonzalez-Murua, C., Estavillo, J.M., 2012. Efficiency of nitrification inhibitor DMPP to reduce nitrous oxide emissions under different temperature and moisture conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 53, 82-89.
- Menneer, J.C., Ledgard, S., Sprosen, M., 2008. Soil N process inhibitors alter nitrogen leaching dynamics in a pumice soil. *Australian Journal of Soil Research* 46 (4), 323-331.
- Moir, J.L., Malcolm, B.J., Cameron, K.C., Di, H.J., 2012. The effect of dicyandiamide on pasture nitrate concentration, yield and N offtake under high N loading in winter and spring. *Grass and Forage Science* 67 (3), 391-402.
- Monaghan, R.M., Smith, L.C., Ledgard, S.F., 2009. The effectiveness of a granular formulation of dicyandiamide (DCD) in limiting nitrate leaching from a grazed dairy pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 52 (2), 145-159.
- NCBI. 2014. Compound Summary for: CID 9257. National Center for Biotechnology Information, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=9257#x321>, Zugriff 17.12.2013.
- O'Connor, P.J., Hennessy, D., Brophy, C., O'Donovan, M., Lynch, M.B., 2012. The effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on herbage production when applied at different times and rates in the autumn and winter. *Agriculture Ecosystems & Environment* 152, 79-89.
- OECD, 1992. OECD Guideline for Testing Chemicals, Guideline 302B, Zahn-Wellens/EMPA Test.
- OECD, 2000. Guideline for Testing Chemicals, Guideline 106, Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method.
- OECD, 2003. OECD SIDS UNEP Publications (Cyanoguanidin) - SIDS Initial Assessment Report for SIAM 17.
- Pfab, H., Palmer, I., Buegger, F., Fiedler, S., Müller, T., Ruser, R., 2012. Influence of a nitrification inhibitor and of placed N-fertilization on N₂O fluxes from a vegetable cropped loamy soil. *Agriculture Ecosystems & Environment* 150, 91-101.

Rajbanshi, S.S., Benckiser, G., Ottow, J.C.G., 1992. Effects of Concentration, Incubation-Temperature, and Repeated Applications on Degradation Kinetics of Dicyandiamide (Dcd) in Model Experiments with A Silt Loam Soil. *Biology and Fertility of Soils* 13 (2), 61-64.

Rittstieg, K., Robra, K.H., Somitsch, W., 2001. Aerobic treatment of a concentrated urea wastewater with simultaneous stripping of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (5-6), 820-825.

Robertson, L.A., Cornelisse, R., Zeng, R., Kuenen, J.G., 1989. The Effect of Thiosulfate and Other Inhibitors of Autotrophic Nitrification on Heterotrophic Nitrifiers. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 56 (4), 301-309.

Sacher, F., Ehmann, M., Gabriel, S., Graf, C., Brauch, H.J., 2008. Pharmaceutical residues in the river Rhine - results of a one-decade monitoring programme. *Journal of Environmental Monitoring* 10 (5), 664-670.

Sahrawat, K.L., Mukerjee, S.K., 1977. Nitrification Inhibitors, I Studies with Karanjin, A Furanolflavonoid from Karanja (*Pongamia-Glabra*) Seeds. *Plant and Soil* 47 (1), 27-36.

Salvas, P.L., Taylor, B.F., 1980. Blockage of Methanogenesis in Marine-Sediments by the Nitrification Inhibitor 2-Chloro-6-(Trichloromethyl) Pyridine (Nitrapyrin Or N-Serve). *Current Microbiology* 4 (5), 305-308.

San Francisco, S., Urrutia, O., Martin, V., Peristeropoulos, A., Garcia-Mina, J.M., 2011. Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (9), 1569-1575.

Schermerhorn, P.G., Golden, P.E., Krynitsky, A.J., Leimkuehler, W.M., 2005. Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 88 (5), 1491-1502.

Schmidhalter, U., Manhart, R., Heil, K., Schraml, M., von Tucher, S., 2011. Gülle und Gärrestdüngung zu Mais - Einfluss eines Nitrifikationshemmers auf Wachstum, Ertrag und Umwelt. *mais* 2, 1-4.

Schwarzer, C., Haselwandter, K., 1996. Rapid quantification of the nitrification inhibitor dicyandiamide in soil samples, nutrient media and bacterial cell-free extracts. *Journal of Chromatography A* 732 (2), 390-393.

Shepherd, M., Wyatt, J., Welten, B., 2012. Effect of soil type and rainfall on dicyandiamide concentrations in drainage from lysimeters. *Soil Research* 50 (1), 67-75.

Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M., 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research* 38 (9), 2323-2330.

Shi, Y.F., Zhang, L.L., Wu, Z.J., 2012. Inhibitory Effects of Pyrazoles on Soil Nitrification: Effects of Chemical Structure. *Fresenius Environmental Bulletin* 21 (6), 1385-1389.

Smith, I., Schallenberg, M., 2013. Occurrence of the agricultural nitrification inhibitor, dicyandiamide, in surface waters and its effects on nitrogen dynamics in an experimental aquatic system. *Agriculture Ecosystems & Environment* 164, 23-31.

Soares, A.F.S., Leao, M.M.D., Neto, M.R.V., da Costa, E.P., de Oliveira, M.C., Amaral, N.B., 2013. Efficiency of conventional drinking water treatment process in the removal of endosulfan, ethylenethiourea, and 1,2,4-triazole. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 62 (6), 367-376.

Stevens, A., Geißler, D., Dünnbier, U., Reemtsma, T., 2012. Identifizierung und Quantifizierung des Nitrifikationsinhibitors Thioharnstoff in kommunalen Kläranlagen. *Kurzreferate Wasser 2012 (Seiten 58-61) Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, 14.-16. Mai, 2012, Neu-Ulm.

Subbarao, G.V., Rondon, M., Ito, O., Ishikawa, T., Rao, I.M., Nakahara, K., Lascano, C., Berry, W.L., 2007. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294 (1-2), 5-18.

Subbarao, G.V., Sahrawat, K.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I.M., Hash, C.T., George, T.S., Rao, P.S., Nardi, P., Bonnett, D., Berry, W., Suenaga, K., Lata, J.C., 2012. Biological Nitrification Inhibition-A Novel Strategy to Regulate Nitrification in Agricultural Systems. (Seiten 249-302) in *Advances in Agronomy*, Vol. 114, Donald Sparks (Hrsg), Academic Press, Burlington.

Tao, L., Yuanliang, S., Xuewen, L., Guolin, L., 2006. Degradation and its affecting factors of NBPT. *Chinese Journal of Ecology* 25 (9), 1082-1086.

Teske, W., Matzel, W., 1988. The Influence of Decomposition and Translocation of Dicyandiamide in the Soil on Its Nitrification Inhibiting Effect. *Archiv für Acker und Pflanzenbau und Bodenkunde - Archives of Agronomy and Soil Science* 32 (4), 241-246.

Teutenberg, T., 2004. Neue Methodenentwicklung in der Flüssigchromatografie durch Anwendung der Hochtemperaturtechnik mit subkritischen wässrigen mobilen Phasen - Konstruktive Aspekte eines speziellen Heizsystems. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum - Fakultät für Chemie .

Tindaon, F., Benckiser, G., Ottow, J.C.G., 2012. Evaluation of ecological doses of the nitrification inhibitors 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and 4-chloromethylpyrazole (CIMP) in comparison to dicyandiamide (DCD) in their effects on dehydrogenase and dimethyl sulfoxide reductase activity in soils. *Biology and Fertility of Soils* 48 (6), 643-650.

Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O., 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *Journal of Hazardous Materials* 171 (1-3), 1051-1057.

Trenkel, M. E., 2010. Slow- and controlled-release and stabilized fertilizers - An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture. Second Edition. International Fertilizer Industry Association, Paris, France.

Upadhyay, R.K., Patra, D.D., Tewari, S.K., 2011. Natural nitrification inhibitors for higher nitrogen use efficiency, crop yield, and for curtailing global warming. *Journal of Tropical Agriculture* 49 (1-2), 19-24.

US EPA, 2009. US EPA HPV Challenge Program, Test Plan Submission, 1H-1,2,4-Triazol.

Vandevivere, P., Ficara, E., Terras, C., Julies, E., Verstraete, W., 1998. Copper-mediated selective removal of nitrification inhibitors from industrial wastewaters. *Environmental Science & Technology* 32 (7), 1000-1006.

Varel, V.H., Nienaber, J.A., Freetly, H.C., 1999. Conservation of nitrogen in cattle feedlot waste with urease inhibitors. *Journal of Animal Science* 77 (5), 1162-1168.

Vilsmeier, K., 1979. Colorimetric Method for the Determination of Dicyandiamide in Soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 142 (6), 792-798.

Vilsmeier, K., Amberger, A., 1987. Zur nitrifikationshemmenden Wirkung von Dicyandiamid zu Gülle in der Zeit zwischen Spätherbst und Frühjahr. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 150 (1), 47-50.

Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C., Giger, W., 2006. Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol a in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environmental Science and Pollution Research* 13(5), 333-341.

- Weber, A., Gutser, R., Michel, H.-J., Wozniak, H., Chen, G.X., Xu, H., Niclas, H.-J., 2004. Dicyandiamide and 1H-1,2,4-Triazole - a new effective nitrification inhibitor for reducing nitrous oxide emissions from cultivated land (Seiten 273-275). In: A.Weiske: Greenhouse Gas Emissions from Agriculture - Mitigation Options and Strategies, Proceedings, International Conference, February 10-12, 2004, Leipzig, Germany.
- Weiske, A., Benckiser, G., Herbert, T., Ottow, J.C.G., 2001. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils* 34 (2), 109-117.
- Welten, B.G., Ledgard, S.F., Schipper, L.A., Judge, A.A., 2013. Effect of amending cattle urine with dicyandiamide on soil nitrogen dynamics and leaching of urinary-nitrogen. *Agriculture Ecosystems & Environment* 167, 12-22.
- Wiesler, F., 1998. Comparative Assessment of the Efficacy of Various Nitrogen Fertilizers. *Journal of Crop Production* 1 (2), 81-114.
- Wolt, J.D., 2000. Nitrapyrin behavior in soils and environmental considerations. *Journal of Environmental Quality* 29 (2), 367-379.
- Yang, J.B., Li, X.C., Xu, L., Hu, F., Li, H.X., Liu, M.Q., 2013. Influence of the nitrification inhibitor DMPP on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria at microsites with increasing distance from the fertilizer zone. *Biology and Fertility of Soils* 49 (1), 23-30.
- Yi, T., Harper, W.F., 2007. The link between nitrification and biotransformation of 17 alpha-ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology* 41 (12), 4311-4316.
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., von Locquenghien, K.H., Pasda, G., Radle, M., Wissemeier, A.H., 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture - An introduction. *Biology and Fertility of Soils* 34 (2), 79-84.
- Zhang, H.J., Wu, Z.J., Zhou, Q.X., 2004. Dicyandiamide sorption-desorption behavior on soils and peat humus. *Pedosphere* 14 (3), 395-399.
- Zhang, L.L., Wu, Z.J., Shi, Y.F., Chen, L.J., Song, Y.C., Juan, Y.H., 2010. Inhibitory Effects of Aromatic Compounds on Soil Nitrification. *Pedosphere* 20 (3), 326-333.

9 Anhang

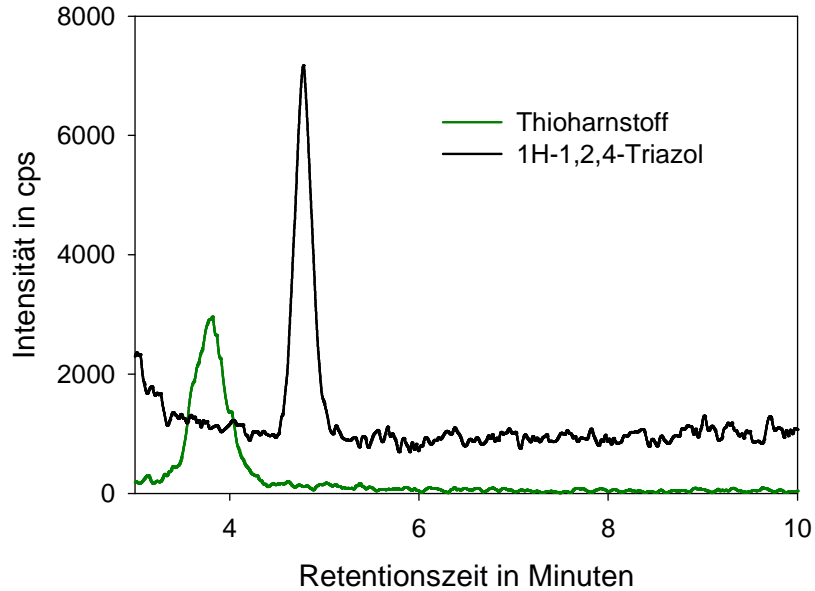


Abbildung A1: Extrahierte Chromatogramme von Thioharnstoff und 1H-1,2,4-Triazol zur Verdeutlichung der Totzeit der verwendeten flüssigchromatographischen Säule.

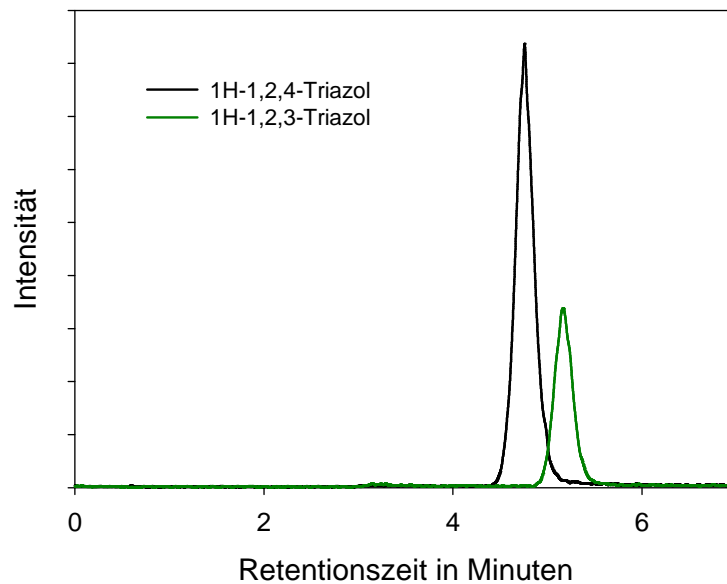


Abbildung A2: Extrahierte Chromatogramme von 1H-1,2,3-Triazol und 1H-1,2,4-Triazol zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Retentionszeiten.

Tabelle A1: Größere Fließgewässer mit n>1, die auf 1H-1,2,4-Triazol untersucht wurden, inkl. Anzahl Messungen (n), Positivbefunden (n>BG) sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen.

1H-1,2,4-Triazol					
Gewässer	Messstelle	n	n>BG	Minimalkonzentration	Maximalkonzentration
Aare	vor Mündung	4	0	<BG	<BG
Argen	Oberau	2	0	<BG	<BG
Donau	Ulm-Wiblingen	7	0	<BG	<BG
Jagst	Jagstfeld	3	1	<BG	0,13
Körsch	Friedrichsmühle	6	5	<BG	0,13
Main	Frankfurt	12	1	<BG	0,21
Neckar	Deizisau	4	0	<BG	<BG
	Kochndorf	4	1	<BG	0,11
	Mannheim	7	0	<BG	<BG
Rhein	Basel	15	3	<BG	5,4
	Karlsruhe	20	2	<BG	3,9
	Mainz	12	1	<BG	3,0
	Koblenz	2	0	<BG	<BG
	Köln	11	3	<BG	2,2
	Düsseldorf	10	9	<BG	2,3
	Lobith	5	4	<BG	0,65
Schussen	Eriskirch	2	0	<BG	<BG

Tabelle A2: Messergebnisse für organische Spurenstoffe, die begleitend in einem Einzugsgebiet mit landwirtschaftlicher Nutzung gemessen wurden.

BG	Künstliche Süßstoffe																Industriechemikalie			
	Acesulfam				Cyclamat				Saccharin				Sucralose				1H-Benzotriazol			
	0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,050 µg/L				0,010 µg/L			
Probenahme- stelle	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,
1	4	4	0,18	0,24	4	2	0,015	0,007	4	1	0,030	-	4	0	-	-	2	2	0,053	0,025
2	3	1	0,33	-	3	0	-	-	3	0	-	-	3	0	-	-	1	1	0,022	-
3	4	4	0,23	0,31	4	2	0,015	0,007	4	1	0,020	-	4	0	-	-	2	2	0,069	0,035
4	3	0	-	-	3	1	0,020	-	3	0	-	-	3	0	-	-	1	1	0,030	-
5	3	0	-	-	3	0	-	-	3	0	-	-	3	0	-	-	1	1	0,014	-
6	4	0	-	-	4	0	-	-	4	2	0,020	0,000	4	0	-	-	2	0	-	-
7	4	4	0,24	0,25	4	2	0,030	0,028	4	2	0,020	0,000	4	0	-	-	2	2	0,075	0,028
8	4	4	0,37	0,43	4	2	0,035	0,021	4	2	0,015	0,007	4	2	0,080	0,028	2	2	0,11	0,04
9	4	3	0,037	0,006	4	2	0,040	0,014	4	1	0,010	-	4	0	-	-	2	2	0,024	0,007
10	4	4	1,28	1,89	4	4	0,083	0,051	4	4	0,065	0,031	4	4	0,18	0,15	2	2	0,34	0,29
11	4	4	0,060	0,027	4	2	0,015	0,007	4	1	0,010	-	4	0	-	-	2	2	0,020	0,006
12	4	4	0,37	0,31	4	3	0,027	0,012	4	3	0,027	0,006	4	1	0,080	-	2	2	0,10	0,07
13	4	4	0,10	0,07	4	2	0,015	0,007	4	1	0,020	-	4	0	-	-	2	2	0,035	0,018
14	4	1	0,030	-	4	1	0,010	-	4	0	-	-	4	0	-	-	2	1	0,010	-
15	4	2	0,080	0,028	4	1	0,020	-	4	0	-	-	4	0	-	-	2	0	-	-
16	4	4	0,16	0,19	4	2	0,020	0,014	4	1	0,010	-	4	0	-	-	2	2	0,049	0,017
17	4	4	0,093	0,085	4	2	0,015	0,007	4	1	0,030	-	4	0	-	-	2	2	0,035	0,006

Tabelle A2: Fortsetzung

		Arzneimittelwirkstoffe																			
		Diclofenac				Ibuprofen und Bezafibrat				Metoprolol				Sulfamethoxazol				Carbamazepin			
BG		0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L			
Probenahme- stelle	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	
1	2	2	0,040	0,022	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
2	1	1	0,028	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
3	2	2	0,054	0,023	2	0	-	-	2	1	0,011	-	2	1	0,011	-	2	1	0,012	-	
4	1	1	0,024	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
5	1	1	0,011	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
6	2	2	0,031	0,018	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
7	2	2	0,076	0,077	2	0	-	-	2	2	0,013	0,000	2	0	-	-	2	0	-	-	
8	2	2	0,055	0,019	2	0	-	-	2	2	0,027	0,005	2	2	0,019	0,002	2	1	0,016	-	
9	2	2	0,023	0,016	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
10	2	2	0,25	0,26	2	0	-	-	2	2	0,20	0,19	2	2	0,018	0,005	2	2	0,051	0,045	
11	2	1	0,047	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
12	2	2	0,054	0,016	2	0	-	-	2	1	0,021	-	2	1	0,018	-	2	1	0,019	-	
13	2	2	0,058	0,025	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
14	2	2	0,025	0,009	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
15	2	1	0,041	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
16	2	2	0,059	0,035	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
17	2	1	0,060	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	

Tabelle A2: Fortsetzung

Arzneimittelwirkstoffe und Metabolite von Arzneimittelwirkstoffen																					
		10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin				Gabapentin				Hydrochlorothiazid				Lamotrigin				Sotalol			
BG		0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L			
Probenahme - stelle	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	
	1	2	2	0,021	0,013	2	2	0,016	0,006	2	2	0,066	0,042	2	1	0,012	-	2	0	-	-
2	1	0	-	-	1	0	-	-	1	1	0,010	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
3	2	2	0,028	0,020	2	2	0,022	0,008	2	2	0,083	0,052	2	1	0,018	-	2	0	-	-	
4	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
5	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	
6	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
7	2	2	0,031	0,016	2	2	0,023	0,008	2	2	0,083	0,039	2	2	0,014	0,004	2	0	-	-	
8	2	2	0,046	0,022	2	2	0,036	0,015	2	2	0,13	0,06	2	2	0,025	0,010	2	0	-	-	
9	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
10	2	2	0,18	0,17	2	2	0,11	0,07	2	2	0,48	0,47	2	2	0,080	0,071	2	1	0,020	-	
11	2	1	0,013	-	2	0	-	-	2	2	0,019	0,009	2	0	-	-	2	0	-	-	
12	2	1	0,070	-	2	2	0,056	0,055	2	2	0,086	0,077	2	1	0,025	-	2	0	-	-	
13	2	1	0,021	-	2	1	0,016	-	2	2	0,027	0,014	2	0	-	-	2	0	-	-	
14	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
15	2	0	-	-	2	1	0,011	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	
16	2	2	0,017	0,007	2	2	0,022	0,013	2	2	0,051	0,021	2	1	0,011	-	2	0	-	-	
17	2	1	0,013	-	2	1	0,016	-	2	2	0,025	0,001	2	0	-	-	2	0	-	-	

Tabelle A2: Fortsetzung

BG	Metabolite von Arzneimittelwirkstoffe								Pflanzenbehandlungsmittel											
	4-AAA				4-FAA				Terbutryn und Isoproturon				Carbendazim				Diuron			
	0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L			
Probenahme- stelle	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,
1	2	2	0,028	0,001	2	2	0,027	0,016	2	0	-	-	2	1	0,016	-	2	0	-	-
2	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
3	2	2	0,036	0,002	2	2	0,034	0,017	2	0	-	-	2	1	0,011	-	2	0	-	-
4	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
5	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
6	2	1	0,012	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,011	-
7	2	2	0,044	0,003	2	2	0,037	0,014	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
8	2	2	0,074	0,013	2	2	0,063	0,026	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
9	2	2	0,013	0,000	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
10	2	2	0,37	0,13	2	2	0,33	0,30	2	0	-	-	2	1	0,018	-	2	0	-	-
11	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
12	2	2	0,11	0,13	2	1	0,067	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
13	2	1	0,026	-	2	1	0,011	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
14	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
15	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
16	2	2	0,033	0,004	2	2	0,026	0,011	2	0	-	-	2	1	0,016	-	2	0	-	-
17	2	2	0,023	0,006	2	2	0,012	0,001	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-

Tabelle A2: Fortsetzung

BG	Röntgenkontrastmittel																			
	Iopamidol				Iopromid				Iomeprol				Iohexol				Amidotrizoesäure			
	0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L				0,010 µg/L			
Probenahme - stelle	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,	n	n>BG	MW	Std,abw,
1	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,015	-
2	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
3	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,015	-	2	1	0,018	-
4	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
5	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-
6	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
7	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,022	-	2	1	0,030	-
8	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,038	-	2	1	0,075	-
9	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
10	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
11	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
12	2	0	-	-	2	0	-	-	2	2	0,012	0,001	2	0	-	-	2	0	-	-
13	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
14	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
15	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-
16	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	1	0,014	-
17	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-	2	0	-	-

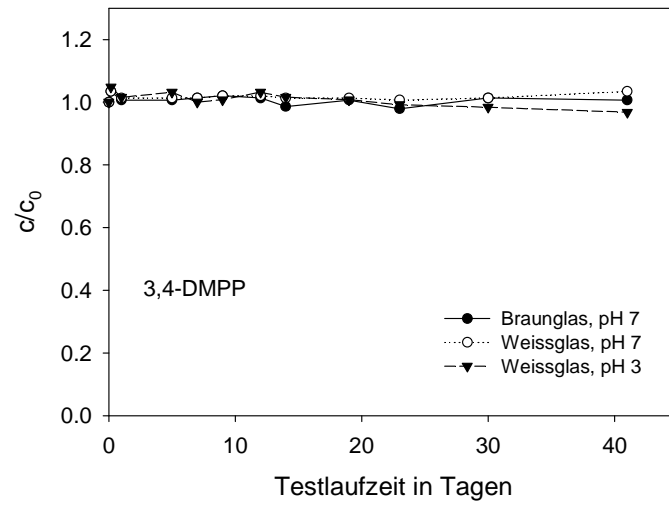


Abbildung A3: Verhalten von 3,4-DMPP in Standversuchen. Matrix. Reinstwasser; Dotierkonzentration 2 µg/L

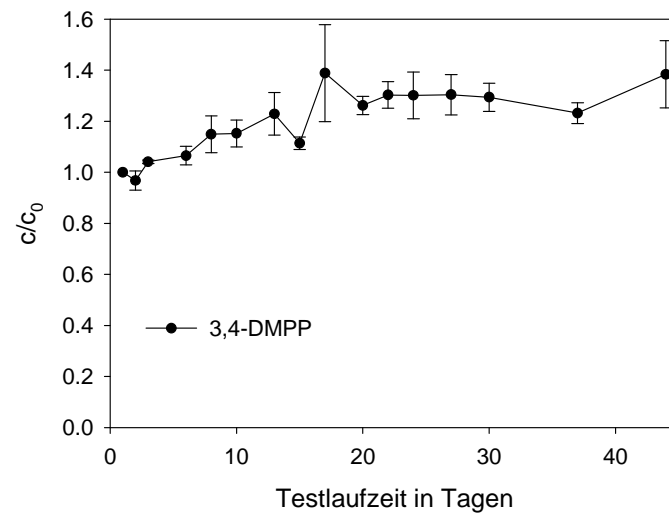


Abbildung A4: Verhalten von 3,4-DMPP im Festbettbioreaktor. Matrix. Rheinwasser; Dotierkonzentration 2 µg/L.

Tabelle A3: Charakterisierung der Standardböden LUFA 2.1 und LUFA 2.4.

Standardboden	2.1	2.4
Datum der Probenahme	12.06.2013	10.06.2013
Organischer Kohlenstoff in % C	0,66±0,10	2,21±0,46
pH-Wert in 0,01 M CaCl ₂	5,2±0,3	7,2±0,2
Kationenaustauschkapazität in meq/100 g	4,1±0,6	32,2±4,4
Partikelgrößenverteilung in %		
<0,002	2,4±0,4	26,5±1,9
0,002 – 0,006	1,6±0,4	8,1±1,0
0,006 – 0,02	3,6±0,4	14,8±1,1
0,2 – 0,063	7,0±0,5	23,0±1,0
0,063 – 0,2	27,2±0,5	19,0±0,3
0,2 – 0,63	55,7±1,5	6,9±2,2
0,63 – 2.0	2,5±0,4	1,7±0,2
Bodentyp	schluffiger Sand	toniger Lehm

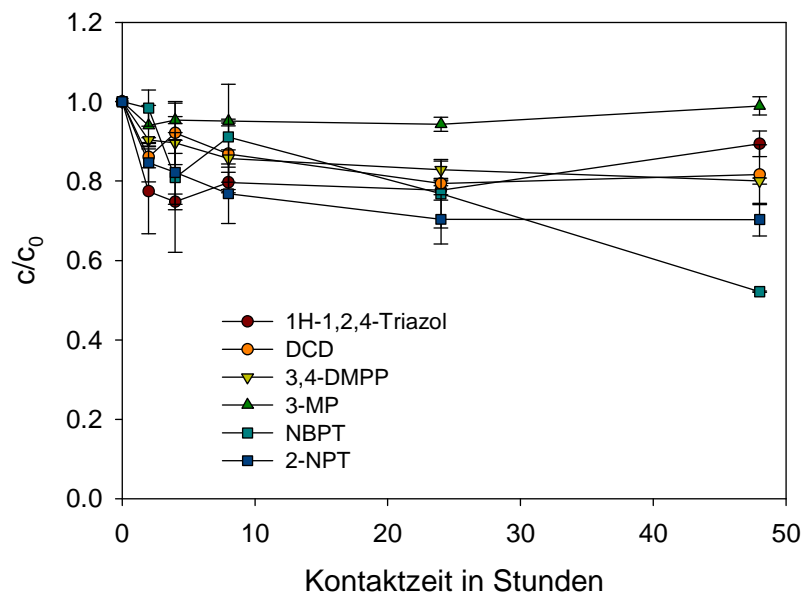


Abbildung A5: Adsorption von Nitrifikations- und Ureaseinhibitoren an Bodenpartikel (LUFA 2.4) bei einem Boden-zu-Wasser-Verhältnissen von 1:5.

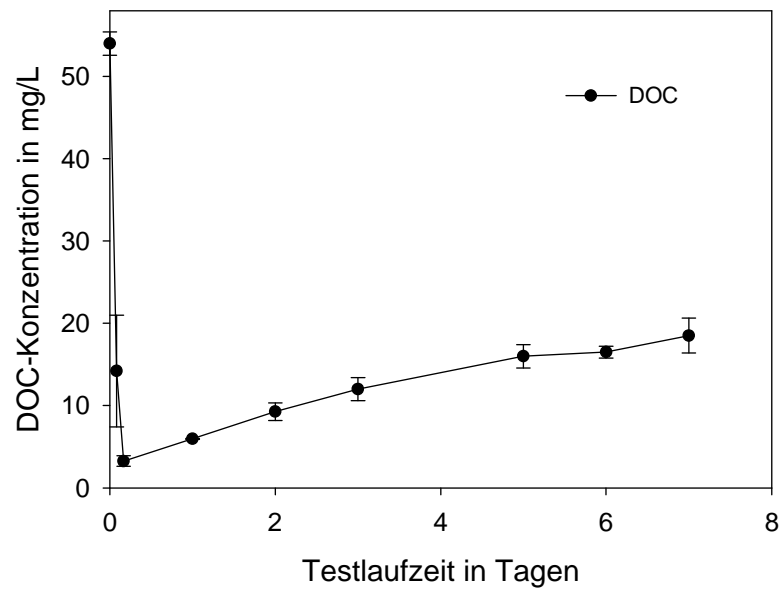
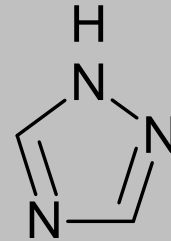


Abbildung A6: Konzentrationsverlauf des gelösten organischen Kohlenstoffs in einem modifizierten Zahn-Wellens-Test.

1H-1,2,4-TRIAZOL

IUPAC-Name: 1H-1,2,4-Triazol

CAS-Nr.: 288-88-0

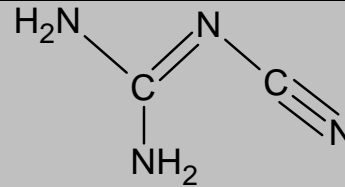


Summenformel	C ₂ H ₃ N ₃
Molekulargewicht	69,07 g/mol
Farbe	weiß
Geruch	schwach
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	120,4 °C
Siedepunkt	260 °C, 270-280 °C
pK_a	2,47 und 9,00 2,88 und 10,18
Wasserlöslichkeit	547 g/L bei 22 °C 700 g/L (20 °C) 128 g/L
log K_{ow}	-0.58 -0.71 (pH 7) -0,89±0,35
Verwendung	Synthesechemikalie, Nitrifikationsinhibitor
Sonstiges	WGK 2 – wassergefährdend gem. VwVwS (Stoff-Nr.1341) Produktionsvolumen >1.000 t/a in mindestens einem Land der EU

DICYANDIAMID

IUPAC-Name: 2-Cyanoguanidin

CAS-Nr.:461-58-5

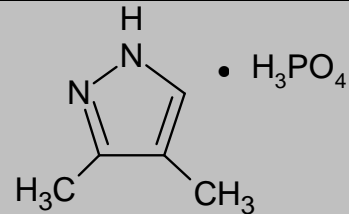


Summenformel	C ₂ H ₄ N ₄
Molekulargewicht	84,08
Farbe	weiß
Geruch	ohne
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	208 °C bis 210 °C 211 °C
Siedepunkt	143±23 °C
pK_a	-1,28
Wasserlöslichkeit	34,6 g/L (20 °C) 69 g/L (pH 7, 25 °C)
log K_{OW}	-1,15 -0,91±0,35
Verwendung	Neben dem Einsatz als Nitrifikationsinhibitor verwendet zur Herstellung von Melamin, Guanidinen, Barbituraten, Aminoplasten.
Sonstiges	WGK 1 - schwach wassergefährdend gem. VwVwS (Stoff-Nr.247), Produktionsvolumen 2007 >1.000 t/a in mindestens einem Land der EU

3,4-DIMETHYLPYRAZOL

IUPAC-Name: 3,4-Dimethyl-1H-Pyrazol-
(Phosphorsäure)

CAS-Nr.: 2820-37-3
202842-98-6

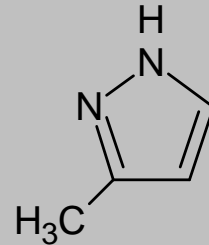


Summenformel	C ₅ H ₈ N ₂ (C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₄ P)
Molekulargewicht	96,13 (194,13)
Farbe	Weiß
Geruch	
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	55 °C
Siedepunkt	220±9 °C
pK_a	3,06 4,06
Wasserlöslichkeit	2,1 g/L (25 °C)
log K_{ow}	0,92 1,36±0,23
Verwendung	Nitrifikationsinhibitor
Sonstiges	H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung

3-METHYLPYRAZOL

IUPAC-Name: 3-methyl-1H-pyrazole

CAS-Nr.: 1453-58-3

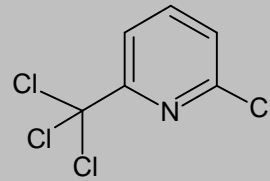


Summenformel	C ₄ H ₆ N ₂
Molekulargewicht	82,105
Farbe	
Geruch	
Aggregatzustand	
Schmelzpunkt	36,5
Siedepunkt	204 °C
pK_a	2,61 3,54±0,1
Wasserlöslichkeit	4,88 g/L (pH 7, 25°C)
log K_{ow}	0,48 0,71±0,23
Verwendung	Nitrifikationsinhibitor
Sonstiges	

NITRAPYRIN

IUPAC-Name: 2-Chlor-6-(trichlormethyl)pyridin

CAS-Nr.: 1929-82-4

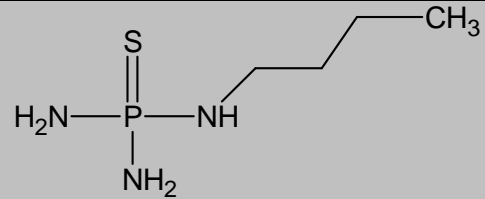


Summenformel	C ₆ H ₃ Cl ₄ N
Molekulargewicht	230,91
Farbe	weiß
Geruch	leicht süßlich
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	63 °C
Siedepunkt	258±35 °C
pK_a	
Wasserlöslichkeit	0,37 g/L (pH 7, 25 °C) 40-60 mg/L (20 °C) 72 mg/L
log K_{OW}	3,41±0,41
Verwendung	Nitrifikationsinhibitor
Sonstiges	WGK 2 - wassergefährdend gem. VwVwS (Stoff-Nr.539). In Deutschland nicht als Nitrifikationsinhibitor zugelassen.

N-(N-BUTYL)-THIOPHOSPHORTRIAMID

IUPAC-Name: Butyl[diamino(sulfanylidene)-{5}-phosphanyl]amin

CAS-Nr.: 94317-64-3

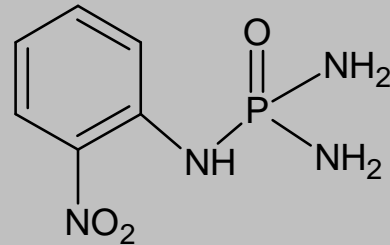


Summenformel	C ₄ H ₁₄ N ₃ PS
	167,22
Farbe	weiß
Geruch	
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	58-60 °C 54 °C (SciFi)
Siedepunkt	277±23 °C
pK_a	6,23±0,7 (SciFi)
Wasserlöslichkeit	4,3 g/L (25 °C) 16 g/L (pH 7, 25 °C)
log K_{ow}	0,31±0,37 (SciFi)
Verwendung	Ureaseinhibitor
Sonstiges	In Deutschland nicht als Ureaseinhibitor zugelassen. Produktionsvolumen 2007 >1.000 t/a in mindestens einem Land der EU.

N-(2-NITROPHENYL)PHOSPHORSÄURETRIAMID

IUPAC-Name:

CAS-Nr.: 874819-71-3



Summenformel	C ₆ H ₉ N ₄ O ₃ P
	216,13
Farbe	weiß
Geruch	
Aggregatzustand	fest
Schmelzpunkt	
Siedepunkt	
pK_a	3.07±0.70
Wasserlöslichkeit	
log K_{OW}	-0.33±0.39
Verwendung	Ureaseinhibitor
Sonstiges	