



Projektleitung: Dr. Dieter Hennecke
Projektbearbeitung: Dipl.-Ing. Agr. Karlheinz Weinfurtner
Dr. Kerstin Derz

Zuwendungsempfänger: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
Ausführende Stelle: Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME)
Förderkennzeichen: 01DH20011A

Abschlussbericht

Vorhabenbezeichnung:

Verbundprojekt: Verminderung des durch chemischer Rückstände entstehenden Risikos für Böden und Kulturpflanzen – Auswirkungen des zur Bewässerung verwendeten Abwassers“ (RESIDUE)

Teilvorhaben: “Verbleib und Risikoanalyse für relevante organische Schadstoffe”

Laufzeit des Vorhabens: 01.06.2020 – 31.07.2024

Berichtszeitraum: 01.06.2020 – 31.07.2024

Zusammenfassung

In einer Kooperation mit Partnern aus Israel, Spanien, Italien und Deutschland wurde in RESIDUE ein Substrat aus Abfallstoffen entwickelt, welches zur Bodenverbesserung in der Landwirtschaft in Gebieten mit Wassermangel verwendet werden kann. Neben einer Düngung bewirkt die Zusammensetzung des Substrats auch eine Verbesserung der Rückhaltefunktionen des Bodens und verringert die Aufnahme von organischen Schadstoffen, die in solchen Gebieten oft mit dem Beregnungswasser auf die Pflanzen appliziert werden. Aufgrund des Wassermangels erfolgt die Beregnung oft mit ungeklärten oder wenig geklärten Abwässern. Die Einführung von Triggerwerten zur Wasserqualität führt nicht zum Ziel, da die Landwirtschaft keine Wahl hat, auf anderes Wasser auszuweichen, sollten Grenzwerte überschritten sein. Daher war es das Ziel des Projekts, ein Substrat zu entwickeln, das die Bodenfunktionen – hier Rückhalt und Abbaukapazität – stärkt und damit zu einer verbesserten Produktqualität führen kann. Zentraler Punkt war dabei, dass die Rohstoffe Abfälle sind, die ohnehin nicht anders zu verwerten sind. Ein Nebenaspekt ist die Verbesserung der „Carbon Sequestration“ in Böden durch die Verwendung von Biokohle für das Substrat.

Das Fraunhofer IME hatte in dem Vorhaben die Rolle der Koordination. Zudem wurden Gewächsexperimente mit ¹⁴C-radioaktiv markierten Referenzsubstanzen durchgeführt, um die Pflanzenaufnahme der Substanzen in eine ausgewählte Kulturpflanze (Lucerne) abhängig vom aufgebrauchten Substrat zu untersuchen.

Als Substrat wurde Klärschlamm vom Israelischen Partner zu Biokohle verarbeitet und diese Biokohle einem Klärschlammkompost während der Kompostierung zugegeben. Die Biokohle zeigte dabei einen Einfluss auf den Rotteprozess, der mit technischen Maßnahmen reduziert werden konnte. Das Rotteprodukt dagegen wurde als Verbesserung gegenüber einer Rotte ohne Biokohle beschrieben.

Als Referenzsubstanzen wurden Carbamazepin und Lamotrigin auf der Grundlage einer Auswertung der vorhandenen Literatur ausgewählt. Beide wurden als ¹⁴C-Testsubstanzen für das Projekt eingesetzt.

Der Spanische Partner CSIC untersuchte die Bioverfügbarkeit der Referenzsubstanzen in Gegenwart des entwickelten Substrats. Die Arbeiten des CSIC wurden zusammen mit dem IME in einem wissenschaftlichen Journal als open access Manuskript veröffentlicht: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168460>

In Gewächshausversuchen mit Boden aus Israel und Substraten mit verschiedenen Anteilen Biokohle wurde die Aufnahme der Referenzsubstanzen, die mit dem Beregnungswasser eingetragen wurden, in Pflanzen untersucht. Es konnte ein deutlicher Effekt der Biokohle auf die Pflanzenaufnahme der untersuchten Schadstoffe im Vergleich mit einer Kompostzugabe ohne Biokohle beobachtet werden. Bei den verschiedenen Anteilen an Biokohle gab es dann praktisch keine Unterschiede mehr.

1. Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse:

AP 1 - Akquise und Charakterisierung der Ausgangsstoffe für Karbonisierung und Kompostierung:

Im Mai 2021 wählte Phytor Lab die Firma Compost Or, die größte Klärschlammbehandlungsanlage in Israel, aus, um für Israel repräsentativen Klärschlamm für die weitere Projektarbeit zu gewinnen. Mit Unterstützung des Fraunhofer IME konnte eine sterilisierte größere Probenmenge nach Deutschland importiert werden und wurde von dort zu großen Teilen an die FU Berlin weitergeschickt. Dort wurde das Material für die Carbonisierung verwendet.

Für die Gewinnung von Bodenproben für WP4 wurde das Gebiet von Nir Oz (Südisrael) ausgewählt. Der gewählte Boden ist ein sandiger Boden (83% Sand) mit sehr geringem Gehalt an organischem Kohlenstoff.

Im Juli 2021 wurde der Transport des Bodens von Israel nach Deutschland von Phytor Lab und Fraunhofer IME organisiert. Phytor Lab organisierte die Probenahme, Verpackung und den Transport der Materialien, Fraunhofer kümmerte sich um die erforderlichen Einfuhrgenehmigungen des Pflanzenschutzdienstes. Nach Eintreffen des Materials am Fraunhofer IME wurden die 9 Tonnen Bodenmaterial in Lysimeterbehälter mit einer Fläche von je 0,5 m² gefüllt und ins Gewächshaus verbracht. Die Lysimeter wurden bis zum Start von AP 4 im Gewächshaus des IME gelagert.

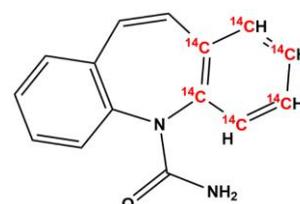


Abbildung 1: Probenahme Boden in Israel und Vorbereitung WP4 im Fraunhofer IME nach Ankunft

Die Auswahl der Testsubstanzen für den Gewächshausversuch (AP 4) erfolgte in Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern. Carbamazepin und Lamotrigin wurden auf der Grundlage einer Auswertung der vorhandenen Literatur ausgewählt. Ebenso wurde die optimale Position der ^{14}C -Markierung anhand der Literatur ausgewählt. Nach Einholen der entsprechenden Angebote bei unterschiedlichen kommerziellen Syntheselaboren (Pharmaron (UK), Moravek (US), Hartmann (D), ARC (USA), Selcia (UK)) wurden beide Substanzen beim günstigsten Anbieter bestellt und bezogen. Folgende Substanzen wurden beschafft:

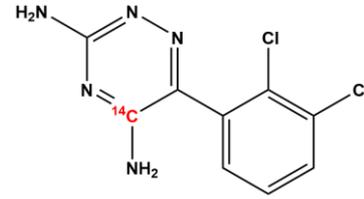
Für Carbamazepin wurde die Phenyl-Markierungsposition ausgewählt. Das beste Angebot aus fünf Syntheselabors kam von Moravek. Am 29.03.2021 gingen 10 mCi der Substanz mit einer spezifischen Radioaktivität von 11,67 MBq/mg beim Fraunhofer IME ein.

Chemische Struktur und Position des ^{14}C von ^{14}C -Carbamazepine:



Für Lamotrigin wurde die Triazinyl-Markierungsposition ausgewählt. Das beste Angebot aus fünf Syntheselabors kam von Moravek. Am 03.11.2021 trafen 10 mCi der Substanz mit einer spezifischen Radioaktivität von 7,77 MBq/mg beim Fraunhofer IME ein.

Chemische Struktur und Position des ^{14}C von ^{14}C -Lamotrigine:



Jeweils 0,5 mCi wurden vom Fraunhofer IME an den Projektpartner CSIC nach Spanien für die Durchführung von AP3 geschickt. Die Arbeiten des IME im AP 1 waren zum 1.5.2022 abgeschlossen.

AP 2 - Herstellung (Karbonisierung und Kompostierung) von Pflanzenkohle und Pflanzenkohlekomposten/Pflanzenkohlesubstraten und Charakterisierung der resultierenden Produkte:

In 2022 wurden Rotteversuche in der Bioreaktoranlage des Fraunhofer IME unter wissenschaftlicher Leitung der FU Berlin durchgeführt, die optimale Rottebedingungen bei der für das Projekt benötigten Substratmenge bietet. Dazu wurden 3 verschiedene Zumischungen von Biokohle zur Kompostmischung angesetzt und in einem System platziert, in dem Selbsterhitzungsprozesse erfasst und dokumentiert werden können. Eine durch interne Temperaturfühler gesteuerte Heizung der Außenwand sorgt dabei dafür, dass die Ansatzgröße eine eher untergeordnete Rolle spielt. Dennoch waren die Rotteversuche nicht erfolgreich. Die Versuche wurden unter der Leitung der FU Berlin in Kooperation mit Compost Or in Israel wiederholt und es bestätigte sich, dass die Zugabe von Biokohle den Kompostierungsprozess verändert. In weiteren Versuchen mit Zwangsbelüftung konnte schließlich eine Kompostierung bei Compost Or erfolgreich abgeschlossen werden. Das Rotteprodukt wies dabei sogar nach Angabe von Compost Or verbesserte Eigenschaften gegenüber dem normalen Kompost auf. Da die Rotteversuche sehr langwierig sind (mindestens 3 Monate pro Versuch) und alle späteren APs mit dem Rotteprodukt als Substrat arbeiteten, trat dadurch eine Verzögerung der weiteren APs ein.

Die erzeugten Biokohle-Kompost Substrate wurden anschließend in ausreichender Menge importiert, um die geplanten Gewächshausversuche in AP 4 durchzuführen. Es wurden 3 Mischungen mit dem Boden aus AP 1 hergestellt, Boden mit Kompost ohne Biokohle als Referenz und Boden mit Biokohle-Kompost mit 10%, 20% und 30% Substrat. Aliquots davon wurden an die Partner FU Berlin und CSIC für die weiteren Untersuchungen geschickt (Bioverfügbarkeit, Säulenversuche).

Ein Mitarbeiter des IME, K. Weinfurter, wurde mit eigenem Mittel des IME für 3 Monate zum Projektpartner nach Israel abgeordnet und hat von dort die Arbeiten der Partner koordiniert. Ohne diese Unterstützung wäre es kaum möglich gewesen, die finalen Substrate erfolgreich herzustellen und zu versenden. Insbesondere hinsichtlich Kommunikation zwischen den Partnern war der Aufenthalt von Herrn Weinfurter extrem erfolgreich.

AP 3 - Bioverfügbarkeitsuntersuchungen:

Durch CSIC wurden Versuche zur Bioverfügbarkeit durchgeführt. Das Fraunhofer IME hat dafür die Referenzsubstanzen zur Verfügung gestellt und den unerwartet komplexen Versand organisiert und finanziert. Darüber hinaus wurden die finalen Substrate und der Boden durch das IME zur Verfügung

gestellt. Die Arbeiten des CSIC wurden zusammen mit dem Koordinator vom IME in einem wissenschaftlichen Journal als open access Manuskript veröffentlicht:

Rosa Posada-Baquero, Carmen Fernández-López, Dieter Hennecke, Jose-Julio Ortega-Calvo, Integrating bioavailability measurements in persistence testing of partially biodegradable organic chemicals in soil, *Science of The Total Environment*, Volume 909, 2024, 168460, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168460>

AP 4 - Gewächshausversuche:

Das Versuchsssetup im Gewächshaus wurde mit Boden aus Israel eingerichtet, sobald der Boden verfügbar war (siehe WP1). Bis zum Start der Gewächshausversuche, die erst nach dem Eintreffen des Substrates beginnen konnten, wurden die Experimente im Labor vorbereitet.

Zur Vorbereitung der Gewächshausuntersuchungen wurden radio-HPLC und radio-TLC Analysenverfahren für die ¹⁴C-markierten Referenzsubstanzen entwickelt. Zu den analytischen Verfahren wurden auch Extraktionsverfahren aus den relevanten Matrices Boden und Pflanze entwickelt. Die Wiederfindung bei Boden betrug dabei 94,6 % (Carbamazepin) und 102,6 % (Lamotrigin) bezogen auf die applizierte Radioaktivität (Mittelwerte von zwei Wiederholungen).

Neben der Extraktion von Testsubstanzen aus dem Boden mussten die Testsubstanzen auch aus Pflanzenmaterial extrahiert werden. Um ein geeignetes Extraktionsverfahren zu entwickeln, wurde Luzerne (Luzerne, *Medicago sativa* L.) als Pflanzenmatrix gewählt. Die Pflanzen wurden in Perlit angezogen und für den Versuch vorsichtig aus den Saatschalen entfernt und restliches Perlitgranulat wurde von den Wurzeln entfernt.

Für eine möglichst realistische Simulation von Pflanzenmaterial wurden die Pflanzen mit ihren Wurzeln in ein Reagenzglas eingebracht, das mit einer Stammlösung von ¹⁴C-markiertem Carbamazepin (4,5 kBq) oder ¹⁴C-Lamotrigin (5,0 kBq) in Wasser gefüllt war (siehe Abbildung 2). Aufgrund der Wasserverdunstung der Luzerneblätter durch die Spaltöffnungen wurde die ¹⁴C-Prüfsubstanzlösung in die Pflanzen eingesaugt. Nach Inkubation über Nacht in einer Abzugshaube wurden die Pflanzen aus dem Teströhrchen entfernt. Die Wurzeln wurden mit Reinstwasser gewaschen und die Spüllösung mit der restlichen ¹⁴C-Prüfsubstanzlösung im Röhrchen vereinigt. Die resultierende Testsubstanzlösung wurde mittels LSC analysiert, um die von der Pflanze absorbierte Menge von entweder ¹⁴C-Carbamazepin oder ¹⁴C-Lamotrigin zu bestimmen. Unter Berücksichtigung der Radioaktivität in den restlichen Stammlösungen wurden die Luzernepflanzen mit 4,38 kBq (¹⁴C-Carbamazepin) und 4,82 kBq (¹⁴C-Lamotrigin) appliziert.

Das Pflanzenmaterial wurde in Zentrifugenröhrchen aus Glas überführt und mit einer Schere in Stücke geschnitten. 50 ml Methanol wurden in die Glaszentrifugenröhrchen gegeben und die Extraktionsmischung wurde mit einem Ultraturax-Mixer für 3 Minuten homogenisiert. Danach wurden die Proben 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und anschließend filtriert. Das Verfahren wurde zweimal unter Verwendung von 50 ml Methanol wiederholt. Die organischen Phasen aller Extraktionsschritte wurden vereinigt. Die Gesamtradioaktivität in den einzelnen und kombinierten Extrakten wurde durch LSC bestimmt.



Abbildung 2: Pflanzenmaterial in ^{14}C -Lösung zum Aufziehen in die Pflanze

Bei Anwendung dieses Extraktionsverfahrens betrug die Wiederfindung der aufgetragenen Radioaktivität 96,2 % (^{14}C -Carbamazepin) und 42,9 % (^{14}C -Lamotrigin). Die Ergebnisse zeigen, dass das Extraktionsverfahren unter Verwendung von Methanol für Carbamazepin geeignet ist, für Lamotrigin wurde das Verfahren noch einmal modifiziert, um eine bessere Wiederfindung zu erzielen. Dafür wurde Pflanzenmaterial, das mit ^{14}C -Lamotrigin im künstlichen Abwasser versetzt war, mit methanol:wasser (80:20, v:v) und methanol:wasser (80:20, v:v) mit 0.1% Ameisensäure extrahiert (20 g Pflanzenmaterial mit 1 x 184 mL methanol:wasser (80:20), 1 x 100 mL methanol:wasser (80:20) und 1 x 100 mL methanol:wasser (80:20) mit 0.1% Ameisensäure).

- Bestimmung der radiochemischen Reinheit der ^{14}C -Testsubstanzen

Beide Radiochemikalien wurden als Feststoffe gekauft und nach Lieferung in organischem Lösungsmittel gelöst. Carbamazepin wurde in Dichlormethan und Lamotrigin in Aceton gelöst. Beide Stammlösungen wurden bei $\leq -18\text{ °C}$ im Dunkeln gelagert.

Die radiochemische Reinheit von ^{14}C -Carbamazepin wurde mittels TLC und HPLC mit Radiodetektion bestimmt. Als Referenzstandard wurde unmarkiertes Carbamazepin verwendet (Analyse durch UV-Detektion). Die radiochemische Reinheit des verfügbaren ^{14}C -Carbamazepins wurde mit 71,5 % (TLC) und 73,4 % (HPLC) bestimmt.

Die Analyseergebnisse zeigten, dass radioaktiv markiertes Carbamazepin in der Stammlösung nicht stabil ist. Da bekannt ist, dass Carbamazepin im Allgemeinen stabil ist, wird angenommen, dass dies auf Radiolyse zurückzuführen ist. Um eine weitere Radiolyse zu verhindern, wurde die Stammlösung verdünnt und auf vier separate Glasgefäße verteilt und bei $\leq -18\text{ °C}$ im Dunkeln gelagert, was aber letztlich nur wenig Erfolg gezeigt hat (s.u.).

Die radiochemische Reinheit von ^{14}C -Lamotrigin wurde mittels TLC und HPLC mit Radiodetektion bestimmt. Als Referenzstandard wurde unmarkiertes Lamotrigin verwendet (Analyse durch UV-Detektion). Die ermittelte radiochemische Reinheit von ^{14}C -Lamotrigin betrug 100 % (TLC und HPLC), was mit der angegebenen Reinheit auf dem CoA übereinstimmt.

Desweiteren wurden Wachstumsversuche in dem gelieferten Boden im geplanten Versuchssetup durchgeführt. Die Bewässerung wurde bereits mit dem im Hauptversuch geplanten System installiert, um etwas Erfahrung damit zu sammeln. Das folgende Foto zeigt das Versuchssetup in diesem Vorversuch:



Abbildung 3: Vorversuch Pflanzenzucht (Luzerne) in Boden aus Israel mit und ohne Kompostmischung 47 Tage nach der Aussaat im Setup des Hauptversuchs



Abbildung 4: Vorversuch Pflanzenzucht (Luzerne) in Boden aus Israel mit und ohne Kompostmischung nach dem ersten Schnitt im Setup des Hauptversuchs

Insgesamt 8 Container, die mit Nir Oz Boden befüllt waren, wurden für den Hauptversuch mit den

Kompost- bzw. Biokohle/Kompost-Mischungen nach den Vorgaben der israelischen Projektpartner vorbereitet. Dazu wurden folgende Mischungen für je zwei Container verwendet:

- Kompost (ohne Biokohle-Zumischung)
- Kompost mit 10% Biokohle
- Kompost mit 20% Biokohle
- Kompost mit 30% Biokohle

Jeder Edelstahl-Container umfasste eine Fläche von 0.5 m². Der Kompost bzw. die Biokohle/Kompost-Mischungen wurden in einer Menge von 2,5 kg Trockenmasse pro Container (entspricht 5 kg/m²) gleichmäßig auf die Container verteilt und dann anschließend in die oberen 5 cm des Bodens eingearbeitet. Anschließend erfolgte nach einer Wassergabe von je 30 L pro Container nach 2 Tagen die Einsaat der Luzerne (*Medicago sativa* L., 2 g pro Container). Dieses Vorgehen sowie die eingestellten Gewächshausbedingungen wurden den Experimenten der israelischen Partner angepasst. Jedoch wurden die Temperaturbedingungen modifiziert, um eine bessere Keimung der Luzerne zu erreichen.

Das Bewässerungssystem wurde nach dem Auflaufen der Luzerne etabliert. Es wurden ca. 2,3 L Leitungswasser pro Tag und Container (entspricht 4,6 L/m²) auf die Container verbracht.



Abbildung 5: Kultivierung der Luzerne mit Hilfe eines Tröpfchenbewässerungssystem im Hauptversuch (7 Tage nach Einsaat)



Abbildung 6: Kultivierung der Luzerne mit Hilfe eines Tröpfchenbewässerungssystem im Hauptversuch (45 Tage nach Einsaat)

Um die Ergebnisse der beiden Testsubstanzen ^{14}C -Lamotrigine und ^{14}C -Carbamazepine in Boden und Pflanze mit den Ergebnissen der nicht-markierten Substanzen, die in Israel erzielt wurden, vergleichen zu können, wurden die Versuchsbedingungen - also die Bewässerung mit Leitungswasser für einen bestimmten Zeitraum bei und nach der Keimung sowie der Start der Bewässerung mit gereinigtem Abwasser, d.h. hier den Start der Applikation mit den radioaktiv-markierten Testsubstanzen - den von den israelischen Partnern gewählten Bedingungen soweit möglich angeglichen.

Da in Arbeitspaket 4 nicht mit realem gereinigtem Abwasser gearbeitet werden kann, da ja vergleichbar hohe Konzentrationen als radioaktiv-markierte Testsubstanzen substituiert werden sollen, wurden zudem Vorversuche zu künstlich hergestelltem Abwasser durchgeführt. In diesen Vorversuchen wurden die Parameter des künstlichen Abwassers bestimmt und weitestgehend denen des in Israel verwendeten, gereinigten Abwassers angepasst.

Für den Hauptversuch wurden die vorbereiteten Container mit dem Kompost bzw. den Biokohle/Kompost-Mischungen beaufschlagten Nir Oz Boden, auf denen die Luzerne-Pflanzen (*Medicago sativa* L.) angezogen worden waren, mit den radioaktiv-markierten Testsubstanzen ^{14}C -Lamotrigin und ^{14}C -Carbamazepin in künstlichem Abwasser und Tröpfchenbewässerung beaufschlagt. Mit diesem Testdesign sollten die experimentellen Bedingungen bei den israelischen Partnern im Gewächshaus in Schmallenberg nachempfunden werden.

Bei den vorbereitenden Reinheitsuntersuchungen der radioaktiv-markierten Testsubstanzen ergab sich für ^{14}C -Carbamazepin eine unzureichende radiochemische Reinheit von nur noch $< 20\%$. Daher mussten für ^{14}C -Carbamazepin sehr aufwendige zusätzliche Laborarbeiten durchgeführt werden, um

die Substanz mittels Fraktionierung über radio-HPLC aufzureinigen. Dadurch stand eine geringere Menge des ^{14}C -Carbamazepins für den Hauptversuch zur Verfügung als geplant. Durch die Arbeiten entstand ein zusätzlicher finanzieller Aufwand von 2 Monaten Techniker und 2 Wochen Laborleitung sowie ein Verzug der Arbeiten im Gewächshaus von 2 Monaten. Eine derart starke Radiolyse ist sehr ungewöhnlich, da die Substanz eigentlich sehr stabil gegenüber Abbau ist, was ja im Prinzip der Grund für die Verwendung im Projekt ist. Sie ist aber auch durch fachgerechte Lagerung (Lichtausschluss bei -20°C im geschlossenen Behälter) nicht zu verhindern. Es kann spekuliert werden, dass die fortgesetzte Radiolyse auch auf die oben beschriebene Verzögerung der Arbeiten aufgrund der Befunde bei der Kompostierung zurückzuführen ist, aufgrund derer die Lagerungsdauer um ein Jahr verlängert werden musste. Für ^{14}C -Lamotrigin konnte auch vor dem Hauptversuch eine ausreichend hohe radiochemische Reinheit festgestellt werden, so dass es ohne weitere Aufarbeitung in den Hauptversuch eingesetzt wurde.

Die Beaufschlagung des künstlichen gereinigten Abwassers mit radioaktiv-markierten Testsubstanzen begann nach dem 1. Schnitt der oberirdischen Pflanzenteile der Luzerne („1. Ernte“) 90 bzw. 97 Tage nach der Einsaat. Das künstliche Abwasser wurde mit 800 ng Carbamazepin/L oder mit 650 ng Lamotrigin/L appliziert und die Container pro Tag mit ca. 3 L bewässert. Da weniger ^{14}C -Carbamazepine zur Verfügung stand als geplant, wurden die entsprechenden Container in einem Zeitraum von 99 Tagen mit der Testsubstanz beaufschlagt und in dieser Zeit 2 Ernten durchgeführt. Die Container wurden anschließend bis zu 357 Tagen nach Einsaat mit Leitungswasser weiterkultiviert und die Pflanzen weiterhin geerntet (weitere 3 Ernten). Bei den Lamotrigin-Containern erfolgte eine Bewässerung mit ^{14}C -Lamotrigin beaufschlagtem Abwasser über einen Zeitraum von 219 Tagen, in dem 4 Erntezeitpunkte lagen. Anschließend wurden die Lamotrigin-Container weiter mit Leitungswasser bewässert und noch eine weitere Ernte der Luzerne durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Probenahmen der oberirdischen Pflanzenteile ist somit für beide Testsubstanzen gleich. Die Kultivierung wurde Ende März – Anfang April abgeschlossen und im Anschluss daran Bodenproben entnommen.



Abbildung 7: Ansetzen des mit radioaktiv-markiertem Lamotrigin beaufschlagten künstlichen Abwassers separat für die einzelnen Container



Abbildung 8: Kultivierung der Luzerne mit Hilfe eines Tröpfchenbewässerungssystems im Hauptversuch (161 Tage nach Einsaat, 14 Tage nach der 2. Ernte)

Nach der Ernte wurde das Pflanzenmaterial eingefroren und im gefrorenen Zustand mit Trockeneis gemahlen. Von diesem so zerkleinerten und homogenisierten Pflanzenproben wurden jeweils 5 Aliquots entnommen und die radioaktiven Rückstände zur Verbrennungsanalyse bestimmt. Pflanzenproben, die eine ausreichend hohe Radioaktivität für eine spezifischen Analytik aufwiesen, wurden Aliquots à 20 g entnommen und extrahiert. Der Extrakt wurde mittels radio-DC analysiert und die nicht-extrahierbare Radioaktivität in dem zurückbleibenden Probenmaterial erneut durch Verbrennungsanalyse bestimmt.

Insgesamt wurden 40 Pflanzenproben nach Bewässerung mit künstlichem Abwasser, versetzt mit ^{14}C -Carbamazepin oder ^{14}C -Lamotrigin, auf radioaktive Rückstände untersucht. Die durch Verbrennung in den verschiedenen Anlagenproben ermittelten radioaktiven Rückstände sind in den folgenden Abbildungen dargestellt:

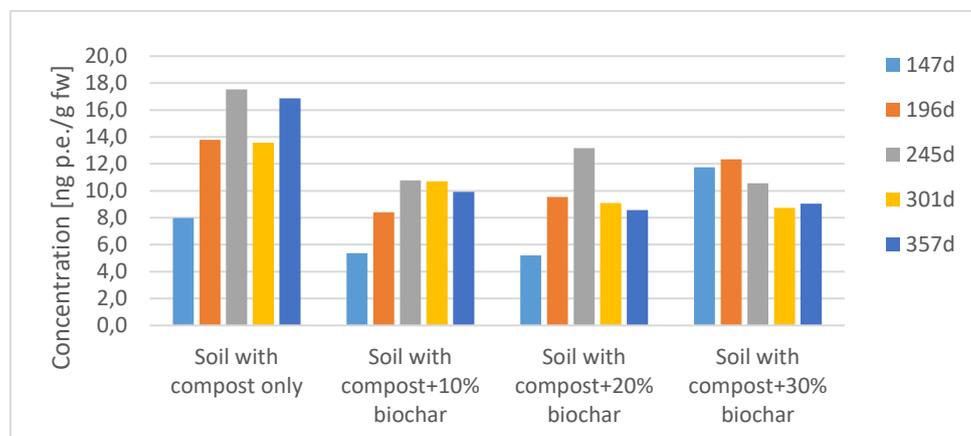


Abbildung 9: Radioaktive Rückstände als „parent equivalents“ (p.e.) in Pflanzenmaterial, das in mit unterschiedlichen Substraten angereicherten Böden kultiviert und zu verschiedenen Erntezeitpunkten nach Bewässerung mit künstlichem, mit ^{14}C -Carbamazepin versetztem Abwasser beprobt wurde (die Zugabe von ^{14}C -Carbamazepin erfolgte während des Zeitraums von Tag 97 bis Tag 196).

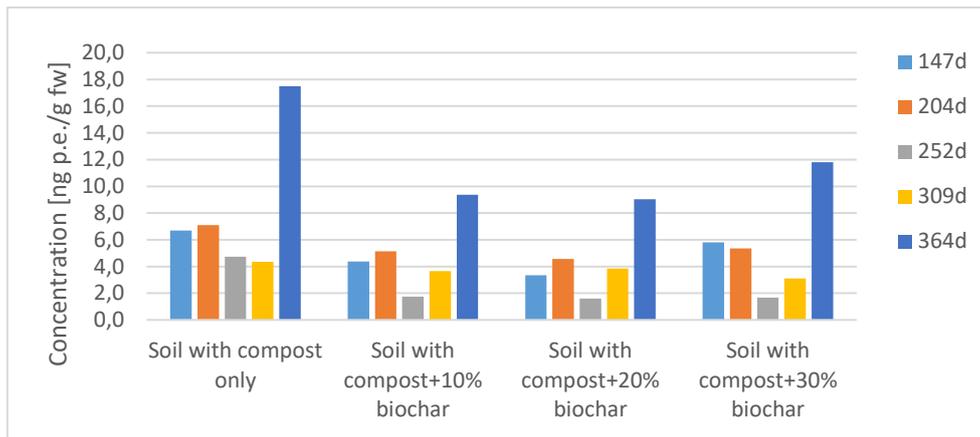


Abbildung 10: Radioaktive Rückstände als „parent equivalents“ (p.e.) in Pflanzenmaterial, das in mit unterschiedlichen Substraten angereicherten Böden kultiviert und zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten nach Bewässerung mit künstlichem, mit ^{14}C -Lamotrigin versetztem Abwasser beprobt wurde (die Zugabe von ^{14}C -Lamotrigin erfolgte von Tag 90 bis Tag 309)

In den Analysen lagen die radioaktiven Rückstände in Pflanzenproben, die aus ^{14}C -Carbamazepin stammten, zwischen 5,2 ng parent equivalents (PE)/kg Frischgewicht (FG) und 17,5 ng PE/kg KG. Da die Menge an radioaktiv markiertem Carbamazepin im Bewässerungswasser für jeden Erntezeitpunkt bekannt ist, können die gefundenen Mengen an radioaktiven Rückständen als Prozentsatz der angewendeten Radioaktivität ausgedrückt werden. Somit entsprachen die in das Pflanzenmaterial aufgenommenen radioaktiven Rückstände 0,5 – 3,0 % der eingesetzten Radioaktivität, was auf eine Aufnahme sehr geringer Radioaktivität in die oberirdischen Pflanzenteile hinweist. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, konnte bei Pflanzen mit längerer Kultivierungsdauer kein eindeutiger Trend zu steigenden radioaktiven Rückständen beobachtet werden. Interessanterweise nahmen die radioaktiven Rückstände nach 196 Tagen nicht ab, als die Bewässerung wieder auf Leitungswasser umgestellt wurde und kein weiteres ^{14}C -Carbamazepin über das Bewässerungswasser hinzugefügt wurde. Das bedeutet, dass Carbamazepin bzw. seine bereits im Boden vorhandenen Abbauprodukte weiterhin verfügbar waren und von den Pflanzen aufgenommen wurden. Allerdings deuten die Ergebnisse auf eine Tendenz zu höheren radioaktiven Rückständen im Boden hin, der nur mit Kompost bearbeitet wurde, im Vergleich zu Behältern mit Kompost/Pflanzenkohle-Mischungen (mit Ausnahme der Erntezeit von 147 Tagen). Dies bedeutet, dass Pflanzenkohle als organische Ergänzung die Aufnahme von Schadstoffen im Vergleich zum Ergänzungskompost allein reduzierte, in diesem Fall die Aufnahme von ^{14}C -Carbamazepin in Luzernepflanzen.

Bezüglich radioaktiver Rückstände in Pflanzenproben, die mit ^{14}C -Lamotrigin versetztem künstlichem Abwasser bewässert wurden, lagen die Konzentrationen in den oberirdischen Pflanzenteilen zwischen 1,6 ng PE/kg KG und 17,6 ng PE/kg KG (siehe Abbildung 10), was 0,2 – 2,0 % der eingesetzten Menge Radioaktivität entspricht. Im Vergleich zu den radioaktiven Rückständen der mit ^{14}C -Carbamazepin versetzten Behälter waren die radioaktiven Rückstände in den mit ^{14}C -Lamotrigin versetzten Behältern im Allgemeinen niedriger, mit Ausnahme des letzten Erntezeitpunkts. Interessanterweise verringerten sich auch in den mit ^{14}C -Lamotrigin versetzten Behältern die radioaktiven Rückstände nicht, als die Bewässerung auf Leitungswasser ohne Kontamination umgestellt wurde (letzte Ernte). Im Gegensatz dazu enthielt das Pflanzenmaterial bei der letzten Ernte nach 364 Tagen die höchsten radioaktiven Rückstände, was darauf hindeutet, dass Lamotrigin oder seine im Boden vorhandenen Abbauprodukte noch verfügbar waren und von den Pflanzen aufgenommen wurden. Beim Vergleich der verschiedenen Experimente zeigten die Ergebnisse eine Tendenz zu höheren Rückständen in Böden, die nur mit Kompost behandelt wurden, im Vergleich zu den Behandlungen mit Kompost/Pflanzenkohle-Mischungen während der gesamten 364-tägigen Wachstumsperiode. Es wurde jedoch kein signifikanter

Unterschied in der Schadstoffaufnahme zwischen den Kompost-/Pflanzenkohlemischungen (10 % – 30 % Pflanzenkohle in der Mischung) beobachtet.

Die Summe der aufgenommenen Radioaktivität in den verschiedenen Versuchen ist in der folgenden Tabelle 1 noch einmal zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 1: Summe aufgenommene Radioaktivität in die oberirdischen Pflanzenteile

Probe	Carbamazepin	Radioaktivität in Pflanzenmaterial		Lamotrigin	Radioaktivität in Pflanzenmaterial	
	Radioaktivität eingesetzt [kBq]	[kBq]	[%]	Radioaktivität eingesetzt [kBq]	[kBq]	[%]
Boden + Kompost	2764,5	246,8	8,9	3248,7	123,9	3,8
Boden + Kompost + 10% Biokohle	2765,8	183,8	6,6	3248,1	72,7	2,2
Boden + Kompost + 20% Biokohle	2763,6	180,0	6,5	3249,3	72,1	2,2
Boden + Kompost + 30% Biokohle	2763,6	171,0	6,2	3247,9	80,0	2,5

Die Tabelle zeigt noch einmal deutlich den Effekt der Biokohle auf die Pflanzenaufnahme der untersuchten Schadstoffe im Vergleich mit einer Kompostzugabe ohne Biokohle. Bei den verschiedenen Anteilen an Biokohle sind dann praktisch keine Unterschiede mehr zu erkennen.

Bodenproben aus einer Tiefe von 0–10 cm wurden nach Extraktion und Verbrennung mit anschließender LSC-Analyse auf radioaktive Rückstände untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

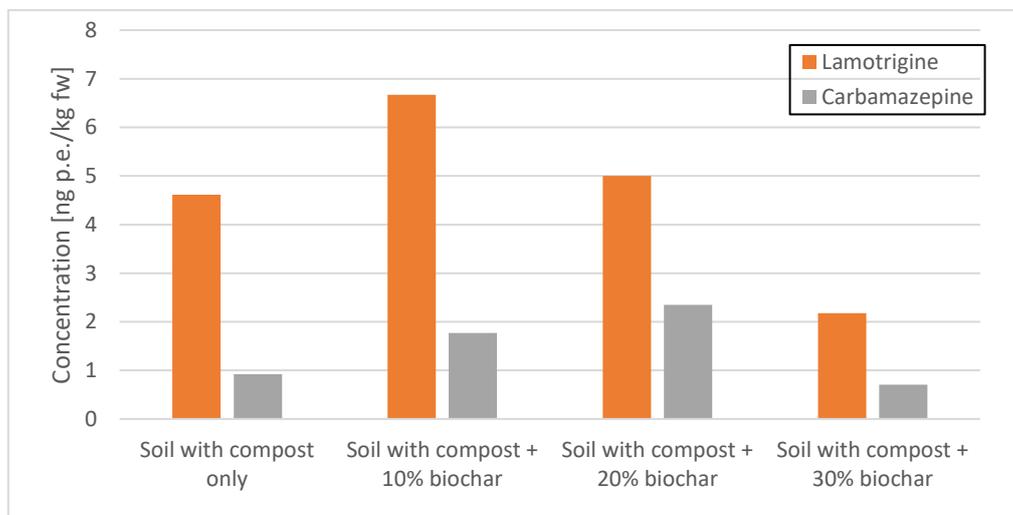


Abbildung 11: Radioaktive Rückstände als parent equivalents (PE) im Boden nach Bewässerung mit künstlichem Abwasser, versetzt mit ¹⁴C-Carbamazepin und ¹⁴C-Lamotrigin, zum Ende der Experimente.

Die radioaktiven Rückstände in der oberen Bodenschicht, die mit Substrat vermischt war (0–10 cm), lagen zwischen 0,7 ng parent equivalents (PE)/g FG und 2,3 ng PE/g FG für Behälter, die mit ¹⁴C-Carbamazepin appliziert wurden, und zwischen 2,2 ng PE/g FG und 6,7 ng PE/g FG für Behälter, die mit ¹⁴C-Lamotrigin appliziert wurden. Die höheren radioaktiven Rückstände in den mit ¹⁴C-Lamotrigin versetzten Behältern im Vergleich zu den mit ¹⁴C-Carbamazepin versetzten Behältern spiegeln die etwas höhere Menge an ¹⁴C-Lamotrigin wider, die den Behältern über das Bewässerungswasser zugeführt wurde (insgesamt 3,2 MBq/Behälter) im Vergleich zu ¹⁴C-Carbamazepin-Behälter (insgesamt 2,8 MBq/Behälter). Es wurde keine Korrelation zwischen den Mengen an radioaktiven Rückständen beider Referenzsubstanzen und den verschiedenen Substraten beobachtet, was zunächst so aussieht, als hätten die Substrate keinen signifikanten Einfluss auf den

Verbleib der Schadstoffe Carbamazepin und Lamotrigin in der oberen Bodenschicht.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, es sich hier nur um die Summe Radioaktivität handelt, die keine Aussage zur Identität der zurückgehaltenen Substanzen erlaubt. Insbesondere bei Lamotrigin kann aufgrund der Befunde der Analyse der in den Pflanzen enthaltenen Radioaktivität davon ausgegangen werden, dass die Radioaktivität im Wesentlichen auf Abbauprodukte der Substanz zurückgeführt werden kann. Leider war aufgrund der insgesamt extrem geringen Radioaktivität keine Identifizierung der im Boden detektierten Radioaktivität möglich. Darüber hinaus muss auch berücksichtigt werden, dass die Probenahme homogener Bodenproben aufgrund der sehr lokalen Tropfbewässerung und der damit erwartbaren höheren Konzentrationen der Radioaktivität um die „Tropfer“ herum schwierig ist. Da die radioaktiven Rückstände höchstwahrscheinlich ungleichmäßig über die Behälterfläche verteilt sind, sind die entnommenen Bodenproben möglicherweise nicht repräsentativ für den Gesamtplot.

Die Analyse repräsentativer Pflanzenextrakte aus mit ^{14}C -Carbamazepin bewässertem Pflanzenmaterial wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Ergebnisse belegen das Vorhandensein der unveränderten Ausgangsverbindung Carbamazepin in allen Pflanzenextrakten der oberirdischen Luzerne-Pflanzenteile zu den verschiedenen Erntezeitpunkten (147 Tage – 301 Tage) im Bereich von 1,6 – 5,5 ng/g Feuchtgewicht. Zusätzlich zur Ausgangsverbindung wurde in allen analysierten Extrakten Epoxycarbamazepin in etwas höheren Mengen im Bereich von 3,6 ng PE/g FG – 6,8 ng PE/g FG nachgewiesen. Dihydroxycarbamazepin wurde in vier der neun analysierten Extrakten in niedrigeren Konzentrationen zwischen 0,3 ng PE/g FG und 1,2 ng PE/g FG gefunden. Da die künstlichen Abwässer ausschließlich mit ^{14}C -Carbamazepin versetzt wurden, spiegeln die in den Pflanzen nachgewiesenen Abbauprodukte den Stoffwechselprozess im Boden und in den Luzernepflanzen wider. Da die radioaktiven Rückstände in Pflanzenextrakten aus Pflanzenmaterial, das mit ^{14}C -Lamotrigin bewässert wurde, zu den Erntezeitpunkten 147 – 309 Tage sehr gering waren, konnte eine Analyse nur mit zwei Pflanzenextrakten des letzten Erntedatums durchgeführt werden. In beiden Extrakten war keine Ausgangsverbindung Lamotrigin nachweisbar, was auf einen vollständigen Abbau von Lamotrigin im Boden und/oder in den Pflanzen hinweist.

Tabelle 2: Identifizierung von Carbamazepin, Epoxycarbamazepin (Epoxy-CBZ) und Dihydroxycarbamazepin (CBZ-OH) in Pflanzenextrakten von Luzerne-Pflanzenmaterial, das zu verschiedenen Erntezeitpunkten nach Bewässerung mit künstlichem Abwasser, versetzt mit ^{14}C -Carbamazepin, geerntet wurde.

Substrat	Erntezeitpunkt [d]	Konzentration [ng PE/g FG]		
		Carbamazepin	Epoxy-CBZ	CBZ-OH
Kompost	196	1.6	3.4	0.3
Kompost	245	2.7	6.8	1.2
Kompost	301	4.0	6.1	<i>n.d.</i>
Kompost + 10% Biokohle	245	2.4	5.2	<i>n.d.</i>
Kompost + 10% Biokohle	301	2.6	4.6	<i>n.d.</i>
Kompost + 20% Biokohle	245	2.2	4.7	<i>n.d.</i>
Kompost + 30% Biokohle	147	5.5	5.3	<i>n.d.</i>
Kompost + 30% Biokohle	196	2.1	4.7	0.5
Kompost + 30% Biokohle	245	1.9	4.7	0.6

AP 7 - Öffentlichkeitsarbeit:

Dr. JJ Ortega vom Projektpartner CSIC war Vorsitzender des wissenschaftlichen und lokalen Komitees der 31. Jahrestagung von SETAC Europe, 3.-6. Mai 2021. Der Kongress sollte in Sevilla stattfinden, wurde aber aufgrund der COVID-19-Gesundheitskrise vollständig virtuell durchgeführt. Etwa 1.600 Delegierte nahmen an der Konferenz teil. Dr. JJ Ortega leitete zusammen mit Prof. D. Barceló die PRIMA Sondersession auf der 31. Jahrestagung SETAC Europe 2021 mit dem Titel „Umweltqualität, die die Agrar- und Ernährungssysteme und Wasserressourcen im gesamten Mittelmeerraum beeinflusst“, in der der Koordinator von RESIDUE (D. Hennecke) das Projekt in einer Präsentation vorstellte.

Auf der 32. Jahrestagung von SETAC Europe, die im Mai 2022 in Kopenhagen stattfand, wurden insgesamt 2 Poster über aktuelle Arbeiten aus dem RESIDUE-Projekt von Partnern des Konsortiums präsentiert. Auf der 33. Jahrestagung der SETAC Europe im Mai 2023 in Dublin wurde ein weiteres Poster präsentiert.

Am 26.4.2022 wurde durch den Projektpartner Italbiotech eine Springschool (virtuell) ausgerichtet, an der alle Projektpartner des RESIDUE Projekts mit Beiträgen beteiligt waren. Am 23/24.5.2023 wurde durch den Projektpartner Italbiotech eine weitere International Springschool als Hybrider Workshop in Mailand ausgerichtet, an der neben anderen auch alle Projektpartner des RESIDUE Projekts mit Beiträgen beteiligt waren.

Die Projekthomepage wird regelmäßig durch Italbiotech nach Zuarbeit durch die Projektpartner auf dem neusten Stand gehalten.

Gegen Ende der Projektlaufzeit wurde das „Manual for the transfer of project results to their practical use in the Mediterranean agriculture“ durch Italbiotech entwickelt, um die praktische Anwendung von Projektergebnissen in der mediterranen Landwirtschaft zu erleichtern. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse des RESIDUE-Projekts effektiv im Agrarsektor genutzt werden können, hat Italbiotec zusammen mit den Projektpartnern einen benutzerfreundlichen Leitfaden erstellt, der Strategien zur Umsetzung der Forschungsergebnisse in die Praxis beschreibt. Das Dokument steht auf der RESIDUE-Website zum Herunterladen zur Verfügung (https://www.residue.it/Project_results.html). Das Handbuch dient für Landwirte und Agrarfachleute und bietet klare Anweisungen und bewährte Verfahren für die Integration der innovativen Lösungen in ihre Betriebe.

Italbiotec hat das „Position Paper to harmonize policies and practices linked to wastewater and sewage sludge treatment and improve local, national and international policies to promote sustainable farming systems and business“ ausgearbeitet, das auf den Ergebnissen des RESIDUE Forschungsprojekts basiert. Das Positionspapier steht auf der RESIDUE-Website zum Herunterladen bereit. https://www.residue.it/Project_results.html

Zum Abschluss des Projekts wurde eine Abschlussveranstaltung organisiert, um die durchgeführten Experimente und die Ergebnisse vorzustellen. Leider konnte die Veranstaltung aufgrund der aktuellen Situation in Israel nicht wie ursprünglich geplant in Präsenz stattfinden, sondern konnte nur als online-Veranstaltung am 1. Juli 2024 durchgeführt werden.

PRIMA
IN THE MEDITERRANEAN AREA

Residue

Residue Final Event:

**The benefits of biochar
in sustainable agriculture practices**

**Monday 1 July 2024
h 10:00 CEST**

Online Event

Please register here

Fraunhofer IME **PHYTOR** **CSIC** **Consorzio Italbiotec** **THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM** **Freie Universität Berlin**

AP 8 - Projektmanagement:

Aufgrund der Covid-19-Pandemie und der daraus folgenden Einschränkungen, vor allem hinsichtlich der Reiseaktivitäten fanden alle Projekttreffen virtuell via *Webex* statt.

Das geplante erste Projektmeeting in Präsenz im Rahmen des Workshops in Mailand konnte leider nicht stattfinden, da die Anreise des Projektkoordinators aufgrund von kurzfristigen Flugausfällen erst einen Tag später erfolgen konnte. Dennoch war im Rahmen des Workshops ein intensiver Austausch der Projektpartner möglich.

Eine unerwartete – und nicht vorab bekannte – Herausforderung war die Einrichtung des Projekts auf der MEL-Plattform. Aufgrund der sehr komplexen und nicht selbsterklärenden Nutzung der Plattform musste – und muss immer noch - viel Zeit für diese Aufgabe aufgewendet werden, die in der Projektkalkulation nicht berücksichtigt wurde. Unterstützung und Training wurden von PRIMA angeboten, konnten den zusätzlichen nicht finanzierten Aufwand für die Projektkoordination aber letztendlich nicht wesentlich reduzieren. Erst April 2022 konnte die Einrichtung von RESIDUE in MEL abgeschlossen werden.

Am 20. Juli 2022 erfolgte die vorgesehene Midterm Evaluation des Vorhabens durch einen externen Prüfer. Dazu wurde ein Midterm Technical Report durch das Projektmanagement im April 2022 erstellt, sowie der Response zum Evaluation Report im September 2022 erstellt sowie die gesamte anhängende Kommunikation mit dem PRIMA-Büro durchgeführt. Dazu gehörten unter anderem die Beantragung einer kostenneutralen Verlängerung beim PRIMA Office, die Verteilung der entsprechenden Antwort zu den Projektpartnern für die Beantragung bei den jeweiligen Nationalen Förderstellen der Projektpartner und die Erstellung und Diskussion eines modifizierten Zeitplans. Zusätzlich wurden durch den Koordinator neue Deadlines für die Deliverables mit dem PRIMA-Office verhandelt und beantragt.

In 2022 wurde zudem der Data Management Plan (DMT) sowie der Dissemination and Exploitation Plan (DEP) unter Federführung des Koordinators mit den entsprechenden Partnern erstellt und auf MEL hochgeladen.

Die in Israel stattfindenden Arbeiten zu AP 5 und AP 6 waren ab Oktober 2023 sehr stark beeinflusst durch den Überfall auf Israel im Oktober 2023, der leider genau die Gemeinde getroffen hat, in dem die Bodenprobenahmen für das Projekt durchgeführt wurden. Aus diesem Grund konnten auch die

geplanten Feldversuche des Israelischen Partners nicht stattfinden und wurden durch erweiterte Gewächshausversuche ersetzt. Auch nach den Ereignissen in Israel fanden 2024 regelmäßige online-Meetings mit den Projektpartnern statt, um die Berichterstellung und den fristgerechten Abschluss des Vorhabens sicher zu stellen.

Zum Zeitpunkt des Abschlussberichts haben alle Projektpartner ihre Ergebnisse dem Koordinator zur Verfügung gestellt. Wie bereits angemerkt ist die eigentliche Herausforderung die Eintragung der Berichte und Ergebnisse in die MEL Plattform. Diese ist sehr kompliziert aufgebaut und es ist leider nicht transparent kommuniziert, was wann an welcher Stelle eingetragen werden muss. Nur die Projektkoordination darf Zugriff auf die Plattform haben und es ist davon auszugehen, dass noch weitere, bislang nicht bekannte, Anforderungen zu erfüllen sein werden, die zu einer Verzögerung des formellen Projektabschluss führen könnten.

Wissenschaftlich wurde das Projekt erfolgreich abgeschlossen.

2. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des ZG geänderten) Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung:

Durch die unerwarteten Herausforderungen bei der Optimierung des Kompostierungsprozesses wurden etwa die weiteren Arbeiten (WP 4-6) um etwa 3 Monate verzögert. In dieser Zeit wurden notwendige Prozedere entwickelt (siehe WP4). Aufgrund der Covid-Herausforderungen und insbesondere der unerwarteten Ergebnisse der Rotteversuche kam es aber insgesamt zu einer Verzögerung der Projektbearbeitung, die in 2022 die Beantragung und Bewilligung einer kostenneutralen Verlängerung zur Folge hatte. In dem entsprechenden Antrag wurde auch ein überarbeiteter Zeitplan erstellt und unter anderem dem nationalen Projektträger zur Verfügung gestellt.

Die Bodenprobenahme musste um etwa 4 Wochen verschoben werden, da es zum geplanten Zeitpunkt der Probenahme in dem Gebiet zu kriegerischen Auseinandersetzungen kam.

Durch die beschriebene Radiolyse und die dadurch notwendige Aufreinigung der Testsubstanz wurden die Arbeiten zu AP 4 um 2 Monate gegenüber dem im Rahmen der kostenneutralen Verlängerung aktualisierten Zeitplan verzögert. Es entstanden für die Aufreinigung zudem signifikante Zusatzkosten. Ein entsprechender Antrag auf Mittelaufstockung wurde dem Projektträger vor Abschluss des Vorhabens eingereicht.

Dennoch konnten die experimentellen Arbeiten fristgerecht zum 31.07.2024 abgeschlossen werden.

3. Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?

Keine Änderungen

4. Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Nein

5. Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?

Nein

6. Jährliche Fortschreibung des Verwertungsplans:

Im Rahmen des Projekts wurden keine Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen gemacht oder in Anspruch genommen. Gegenüber der Antragstellung ergaben sich keine Änderungen des Verwertungsplans.