



Miljø- og
Fødevareministeriet
Miljøstyrelsen

Feltmetoder til bestemmelse af pesticider i jord

Miljøprojekt nr. 1900

November 2016

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Kim Haagensen, Orbicon

Julie Katrine Jensen, Orbicon

ISBN: 978-87-93529-40-3

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Indhold	3
Forord	5
Sammenfatning og konklusion	6
Summary and conclusion	7
1. Indledning	8
2. Formål og baggrund	9
2.1 Formål	9
2.2 Baggrund	9
2.3 Generelt om krav til felt- og screeningsteknikker	10
3. Metode og omfang	11
3.1 Metode.....	11
3.2 Omfang.....	12
4. Resultater af litteratursøgning	14
4.1 Søgetrin 1 og 2: Rapporter fra Miljøstyrelsen/Naturstyrelsen	14
4.2 Søgetrin 3: Søgning på engelsk	15
4.3 Identificerede metoder og produkter	15
4.3.1 Abraxis.....	15
4.3.2 Modern Water	16
4.3.3 ANP.....	16
4.3.4 Teststrips.....	17
4.3.5 Andre oplysninger.....	18
4.4 Samlet resultat	19
5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays)	20
5.1 Beskrivelse af teknikken	20
5.2 Fordele og ulemper samt udfordringer.....	21
5.2.1 Krydsreaktioner	22
5.2.2 Matrix effekter	22
5.2.3 Temperaturfølsomhed	23
5.3 Analyseparametre og detektionsgrænser.....	23
5.4 Priser	24
5.5 Mulige alternativer til ELISA	24
5.5.1 Nanopartikel baseret metode med rhodamin B	24
5.5.2 AgriScreen Ticket, Neogen	24

6. Konklusion.....	25
Referencer	27
Bilag 1 Metode: Bestemmelse af atrazin og metolachlor i jordprøver	29
Bilag 2 Oversigt over immunoassays i litteraturen med tilknyttede detektionsgrænser	32

Forord

Dette projekt er udført som et udredningsprojekt under Miljøstyrelsens Teknologiudviklingsprogram 2016. Udredningsprojektet er gennemført som et samarbejde mellem Region Sjælland og Region Syddanmark, og med tilskud fra Miljøstyrelsen. Region Sjælland har overordnet været projektholder og bygherre på projektet.

Projektet er udført af Orbicon A/S med følgende deltagere.

- Kemiingeniør Kim Haagensen, projektleder og faglig medarbejder
- Forstkandidat, ph.d. Julie Katrine Jensen, faglig medarbejder

Formålet med udredningsprojektet har været at belyse status og muligheder for at foretage bestemmelse af pesticider i jordprøver med feltmetoder, således at fx jordprøver fra en boring kan screenes for indhold af pesticider svarende til feltmetoder som fx PID for flygtige stoffer.

Der har til projektet været tilknyttet en følgegruppe, der har bestået af følgende personer:

- Katrine Smith, Miljøstyrelsen (til 1. maj 2016)
- Preben Bruun, Miljøstyrelsen (fra 1. maj 2016)
- Lisbeth Bergman, Region Sjælland
- Stella Agger, Region Sjælland
- Tove Svendsen, Region Syddanmark

Sammenfatning og konklusion

Der er i dette projekt foretaget en screening af litteraturen for metoder og teknikker til bestemmelse af pesticider i felten. I projektet er der fokuseret på at beskrive kvalitative simple feltteknikker der kan anvendes, eller videreudvikles til at anvendes, i felten som screening forud for valg af prøver til endelig analyse på akkrediteret laboratorium.

Resultaterne af projektet viser, at den mest lovende metode til screening af jordprøver i felten for indhold af pesticider er ELISA-teknikkerne (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Det er tillige konstateret, at der ikke er andre metoder end ELISA metoderne, der på nuværende tidspunkt vurderes som egnede til formålet.

Der er fundet en række produkter og metoder baseret på ELISA teknik, der vil kunne detektere indhold af pesticider i relevante koncentrationsniveauer ved screening af jordprøver for forekomst af pesticider i punktkilder. Metoderne er enten stofspekifikke eller begrænset til bestemmelse af kemiske beslægtede stoffer. Der er i særlig grad udviklet metoder til bestemmelse af atrazin og simazin, samt generelt indhold af triaziner, eller til bestemmelse af Acetylcholinesterase inhiberende stoffer (insekticider). Der er i projektet dog også fundet metoder, der dækker stoffer som fx 2,4-D og glyphosat. Der er ikke fundet oplysninger om metoder til bestemmelse af det for danske forhold relevante stof bentazon.

Metodernes detektionsgrænser er på et koncentrationsniveau, der vurderes relevant i forhold til krav om detektion på niveauer omkring eller lavere end ved laboratorieanalyser. Og metodemæssigt kan der foretages en forholdsvis simpel ekstraktion til vandfase, og filtrering af vandfasen for fjernelse af sedimentpartikler.

Perspektiverne i de identificerede ELISA metoder er anvendelse til at belyse en punktkildes styrke ned gennem et jordprofil eller en punktkildes horisontale udbredelse, men dog med den begrænsning, at den enkelte metode alene dækker enkeltstoffer eller en stofgruppe. Der vurderes at være behov for en afprøvning af konkrete ELISA metoder til dette formål, således at den praktiske anvendelighed og resultaternes brugbarhed ved konkrete undersøgelser af punktkilder med pesticider kan vurderes. En sådan afprøvning kunne eksempelvis foretages i forbindelse med undersøgelser af kildeområder på lokaliteter, hvor sammensætningen af pesticider i kildeområdet er belyst, og hvor der derfor kan foretages et valg af den bedst egnede ELISA metode. Baseret på antallet af tilgængelige testmetoder i form af strips og egentlige ELISA metoder anbefales det, at der fokuseres på punktkilder med stofferne atrazin og simazin.

Der er ved projektet tillige fremkommet oplysninger om mulig anvendelse af tungmetallet kobber som indikator for den horisontale placering af en punktkilde. Dette skyldes, at kobber har været anvendt som indholdsstof i en række svampemidler og derfor typisk kan konstateres hvor bekæmpelse af svampeangreb har været nødvendig som fx på planteskoler, gartnerier og landbrug. Erfaringer med denne fremgangsmetode er ikke vurderet nærmere i dette projekt.

Summary and conclusion

This project describes the results from a screening of literature for methods and techniques used for determination of pesticides in the field. The project has focused on describing qualitative simple field techniques that can be used or developed to be used in the field as screening tools for soil samples prior to selecting samples for final analysis in an accredited laboratory.

The results of the project show that the most promising method for field screening of soil samples for pesticides is the ELISA techniques (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). It is also found that no other methods than ELISA methods is at present considered to be suitable for the purpose.

A number of products and methods based on ELISA technique has been found which will be capable of detecting pesticide residues in appropriate concentration ranges in the screening of soil samples for the presence of pesticides in the point sources. The methods are either substance specific or limited to the determination of chemical related substances. Especially we have found developed methods for determining atrazine, simazine and a general content of triazines, or for determining Acetylcholinesterase inhibitory substances (insecticides). In the project, however, we also found methods covering substances such as 2,4-D and glyphosate. There is no available information on methods for the determination of the substance bentazone relevant in Danish conditions.

The method detection limits are at a concentration level considered relevant in relation to the requirements for detection at levels around or below comparable laboratory analysis. Methodologically the sample preparation is relatively easy and includes only a simple addition of water and extraction to the water phase followed by filtration of the water phase for removal of sediment particles.

The perspectives of the identified ELISA methods are as tools used to illuminate the strength of a source zone down through a soil profile or to delineate a horizontal spread, but with the restriction that each method only covers individual substances or substance groups. There is a need for testing the ELISA methods for this purpose, so that the practical applicability and usefulness of the results from screening soil samples taken from source zones with pesticides can be assessed. Such testing should be undertaken in connection with investigations of source zones at localities where the composition of pesticides is well known, meaning that a choice of the most suitable ELISA method could be taken. Based on the number of available test methods in the form of strips and actual ELISA methods, it is recommended to focus on point sources with the substances atrazine and simazine.

In the project, we also obtained information about a possible use of the heavy metal copper as an indicator of the horizontal location of a pesticide point source. Copper has been used as an active ingredient in a variety of fungicides and therefore typically can be found where the control of fungus attack has been required, such as in nurseries, horticulture and agriculture. Experience with copper as a source zone identifier and delineator has not been further assessed in this project.

1. Indledning

I Danmark er drikkevandsforsyningen udelukkende baseret på indvinding af grundvand (GEUS, 2015), og grundvandsressourcens mængde og kvalitet udgør således en uvurderlig værdi. Indvindingen af grundvand sker fra borerer med varierende dybder, og placeret i forskellige geologiske opbygninger med vekslende beskyttelse over for nedsivning af uønskede stoffer.

Anvendelse af kemiske stoffer og produkter i industri, landbrug, servicevirksomhed og ved boliger mm. har ført til spild og bortskaffelse af rester og affald, der ofte har medført forurening af jord og grundvand.

I landbruget og tilknyttede servicevirksomheder, omkring industribygninger og bebyggelser, samt ved jernbaner og vejanlæg har uønsket plantevækst og angreb af insekter været bekæmpet eller forebygget med sprøjtemidler – også kaldet pesticider. Håndteringen af pesticider knyttet til disse anvendelser kan have medført forurening i punktkilder, hvor der er sket spild ved håndtering eller uheld. Punktkilderne udgør en særlig risiko over for grundvandsressourcen, idet kilderne ofte har stor styrke (koncentration) i forhold til kvalitetskriteriet for grundvand. Punktkilderne kan tillige have placeringer nær kildepladser for indvinding af grundvand til drikkevandsforsyning.

Lokalisering og undersøgelse af gamle punktkilder med pesticider udgør en særlig udfordring for myndighederne. De danske regioner står overordnet for den danske indsats over for disse ”gamle” forureningskilder og forureninger, og udfører arbejdet efter en prioriteret indsats og ud fra de økonomiske midler, der er sat af til opgaven.

Datagrundlaget for identifikation af punktkilder med pesticider på den enkelte lokalitet er oftest yderst mangelfuldt eller nærmest ikke eksisterende, og antallet af lokaliteter er samtidig betydeligt. Endvidere har det tidligere været lovligt og lovpligtigt at bortskaffe rester af pesticider og brugt emballage ved nedgravning lokalt.

Da punktkilderne ikke på forhånd lader sig stedfæste særligt godt, og da pesticider for hovedparten af stoffernes vedkommende ikke giver nogen synlige eller let identificerbare tegn på tilstedeværelse i jorden (som fx udslag ved PID-målinger ved flygtige forureninger), vil der ved undersøgelse af en lokalitet oftest skulle etableres en lang række borerer og analyseres mange jordprøver. I praksis etableres filtersatte borerer for udtagning af grundvandsprøver, hvorved udvaskningen af pesticider fra kildeområdet belyses. Begge dele medfører store omkostninger til identifikation og vurdering af punktkildens placering, styrke og risiko.

I forbindelse med undersøgelser på prioriterede lokaliteter udtages derfor ofte grundvandsprøver fra borerer i det øverste grundvandsmagasin, men her er der imidlertid ingen eller kun få egentlige oplysninger at hente om kildens styrke og placering med mindre kildeområdet er ramt – hvilket kun kan belyses med både mange borerer, og mange ofte dyre, kemiske analyser.

Målet med dette udredningsprojekt er at belyse mulighederne for at foretage felttekniske undersøgelser eller indledende screeninger af jordprøver inden for en billigere ramme end tidligere, således at en eventuel kildes placering i jordsøjlen kan bestemmes kvalitativt med efterfølgende kvantificering ved kemisk analyse af relevante jordprøver på eksternt laboratorium.

2. Formål og baggrund

2.1 Formål

Det overordnede formål med dette projekt er at screene litteraturen og beskrive status for metoder/teknikker til bestemmelse af pesticider i felten. Der er i projektet fokuseret på at beskrive kvalitative simple feltteknikker der kan anvendes, eller videreudvikles til at anvendes, i felten som screening forud for valg af prøver til endelig analyse på akkrediteret laboratorium.

2.2 Baggrund

Baggrunden for projektet er, at undersøgelser af lokaliteter med pesticidpunktkilder ofte er ret omfattende og omkostningsfulde, især fordi en punktkilde ikke lader sig identificere i jorden med hverken visuelle metoder eller simple felttekniske metoder. Det følger heraf, at der til kvantificering af punktkildens styrke og placering skal fremsendes en del jordprøver eller vandprøver til kemisk analyse på eksternt laboratorium, hvilket både er tidskrævende og omkostningsfuldt.

Den analytiske procedure på et akkrediteret laboratorium omfatter ekstraktion fra matrix, oprensning af prøven for fjernelse af urenheder, samt opkoncentrering for opnåelse af en relevant detektionsgrænse efterfulgt af kvantificering på enten Liquid Chromatograph (LC) eller Gas Chromatograph (GC) med Masse Spektrometri (MS). Den omfattende prøvehåndtering (både antal og procedure) gør, at omkostninger og tid til kvantificering af pesticidindhold i et forholdsvis stort antal prøver medfører forholdsvis dyre undersøgelser.

Til gengæld opnås der dog en kvantitativ bestemmelse af ofte mere end 40 stoffer for under 1.200 DKK, svarende til ca. 30 – 50 kr. per stof kvantificeret.

Af Tuxen et al. (2016) fremgår det, at en af de udfordringer der af mange nævnes omkring undersøgelser af pesticidpunktkilder er, at antallet af potentielle punktkilder er meget stort, mens det antal, der udgør en risiko over for grundvandet, formentlig er langt mindre. Der er derfor i branchen arbejdet meget med strategier for design af undersøgelser med henblik på at identificere disse formentlig få punktkilder, der udgør en risiko.

En af udfordringerne ved undersøgelser af kildeområder med pesticider er tillige, at der tilsyneladende ikke er mulighed for en hurtig feltbestemmelse af pesticider med et screeningsværktøj svarende til PID målinger for flygtige stoffer. Dette skyldes overordnet, at pesticiderne hovedsagelig er knyttet til jordens vandfase som mobile og ikke-flygtige stoffer, og derved adskiller sig fra de mobile og flygtige stoffer, der kan bestemmes ved PID screening, og endvidere fra de immobile og ikke-flygtige stoffer, der normalt ikke udgør en risiko for grundvandsressourcen.

Der er i de senere år udviklet en række forholdsvis simple metoder til indledende screening for enkelte pesticider. Her tænkes først og fremmest på metoder baseret på ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) teknikker, der løbende udvikles og forbedres. Omfanget af stoffer, der kan bestemmes med ELISA teknikkerne er således løbende øget. Spørgsmålet er hvilket omfang denne metodik er nået til, og om der udvikles/er udviklet andre smarte metoder til anvendelse i felten.

2.3 **Generelt om krav til felt- og screeningsteknikker**

Metoder til anvendelse i felten og til screening af en lang række prøver er kendetegnet ved at skulle være simple, hårdføre, samt nemme at håndtere under vekslende forhold. Endvidere skal de være billige, hurtige og sikre til formålet. Der er ofte tale om metoder baseret på simple farvereaktioner eller elektrokemiske reaktioner som eksempelvis PID og FID, elektroder eller strips.

Egentlig forbehandling eller opsamling af prøvematerialet må nødvendigvis være simpel men effektiv, således at detektion kan udføres hurtigt og billigt. Udstyr til anvendelse i felten er ofte håndholdt eller udformet som laptop måleudstyr, der kan medbringes til målestedet uden unødigt belastning af feltpersonale og uden større krav til måleudstyr og strømforbrug. Udstyr til screening af prøver skal ligeledes være simpelt at håndtere, samt hurtigt, billigt og med sikker bestemmelse.

Der er i nærværende projekt fokuseret på at frembringe oplysninger om metoder anvendt til bestemmelse af pesticider på relevante koncentrationsniveauer i jord eller ekstraheret vandfase, samt på at belyse metoder der vurderes at kunne være relevante under danske forhold i forbindelse med de udfordringer, der er ved undersøgelse og afværge af punktkilder med pesticider.

3. Metode og omfang

3.1 Metode

For at imødegå projektets formål er der udført en screening af litteratur og marked, herunder også andre sektorer som fx kontrol af vandmiljø og fødevarer m.v. for metoder til at måle og screene for pesticider og nedbrydningsprodukter i felten som et alternativ til traditionelle metoder med ekstraktion, oprensning og separation typisk med HPLC, LC/LC eller GC, samt med efterfølgende kvantitativ bestemmelse ved massespektrometri (MS) i laboratoriet.

Litteraturscreeningen har til formål at vurdere, om der findes cost-effektive metoder til simpel kvalitativ måling af pesticider og nedbrydningsprodukter i jord, der fx kan understøtte valget af relevante jordprøver til efterfølgende kvantitativ bestemmelse ved ovennævnte metoder på eksternt laboratorium.

Den gennemførte screening er foretaget ved søgning på internettet (søgemaskinen Google). Screeningen har været delt op i trin, der ligger i naturlig forlængelse af hinanden. Følgene trin har været fulgt:

Trin 1: En søgning i Miljøstyrelsens og Naturstyrelsens database for at se, hvad state of the art er inden for de projekter, Miljøstyrelsen har fået udarbejdet.

Trin 2: En screening af tilgængelig relevant dansk viden ud over det, der er identificeret i trin 1.

Trin 3: En generel screening på engelsk for at supplere søgningen i trin 2 så den også inddrager viden, der er publiceret på engelsk. Søgningen i trin 3 er udvidet så den også er lavet i google scholar; dog begrænset til perioden 2010-2016.

Trin 4: Søgningerne i trin 1-3 viste overordnet, at der er mest potentiale i de teknikker, der hedder ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), hvorfor der særskilt er søgt på dette med henblik på at finde status for teknikken, teknikkens begrænsninger i forhold til formålet, samt potentielle forhandlere og priser.

De benyttede søgeord for de forskellige søgetrin er sammenfattet i Tabel 1.

TABEL 1 BENYTTETE SØGEORD I LITTERATURSCREENINGEN

Søgetrin	Søgeord
1	"Pesticider"
2	"Feltundersøgelser" OG "pesticider" OG "jord" "Feltanalyser" OG "pesticider" OG "jord" "Feltanalyser" OG "pesticider"
3	"Field Assay" OG "pesticides" OG "soil"
4	Elisa field screening of pesticides in soil

Der er i forbindelse med litteraturscreeningen foretaget opfølgende samtaler med personer, der kunne bidrage med viden på området. De stillede spørgsmål er målrettet således, at de følger op på den udførte litteraturscreening. Således har der i spørgsmålene været fokus på at afdække, om de adspurgte personer har viden om screeningsmetoder i felten, der fx ikke baserer sig på ELISA-teknikker. Og desuden er der spurgt ind til deres erfaringer med ELISA-teknikker i forhold til analyser af pesticider. Sidst er der spurgt ind til ekstraktionsmetoder for pesticider, da det er en af udfordringerne ved at anvende ELISA-teknikker på jordprøver i felten (se også kapitel 5.3).

Resultaterne af litteraturscreeningen samt de opfølgende samtaler præsenteres samlet i kapitel 4.

3.2 **Omfang**

Felttekniske metoder er ofte baseret på egenskaber og reaktioner, der er specifikke for det enkelte stof eller for en kemisk ensartet stofgruppe. Der er derfor søgt tilvejebragt oplysninger om, hvorvidt de identificerede felttekniske metoder dækker enkeltstoffer eller stofgrupper, og dermed om den identificerede metode er i stand til at belyse tilstedeværelsen af et bredt eller smalt udvalg af pesticider i jorden.

Den samlede gruppe af pesticider og nedbrydningsprodukter omfatter en lang række forskellige stoffer, der dog kan grupperes ud fra deres kemiske grundstruktur. En overordnet inddeling af pesticiderne er vist nedenfor.

Phenoxyzyrer

MCPP – mechlorprop, MCPA, Dichlorprop, og nedbrydningsproduktet 4-CP

Triaziner

Atrazin, Simazin, Terbutylazin og deres nedbrydningsprodukter

Triazinoner

Metribuzin, Hexazinon

Organofosphater (Acetylcholinesterase inhiberende) + carbamater (insekticider)

Parathion, malathion, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos,

Organochlorerede pesticider

Hexachlorcyclohexan (HCH), Heptachlor, Aldrin, Dieldrin, Chlordan, Lindan, DDT/DDE

Pyrethroider

Permethrin, Esfenvalerat m.fl.

Pyridazon derivater

Chloridazon + nedbrydningsprodukter

Andre

Bentazon, Glyphosat samt nedbrydningsproduktet AMPA, Dichlobenil samt nedbrydningsprodukterne BAM (2,6-dichlorbenzamid) og 2,6-dichlorbenzoesyre

Af rapporteringen for den danske grundvandsovervågning (Thorling et al. 2015) fremgår det, hvilke pesticider og nedbrydningsprodukter, der hyppigst påvises i hhv. overvågningsprogrammet, samt i indberetningen af kemiske analyser fra vandværksboringer. Tabel 2 nedenfor gengiver fra Thorling et al. (2015), hvilke stoffer der hyppigst er påvist i perioden frem til 2014.

TABEL 2 DE 20 HYPPIGST PÅVISTE STOFFER I GRUMO OG AKTIVE VANDVÆRKERS BORINGER I PERIODEN 1992-2014. GENGIVET FRA THORLING ET AL. (2015).

Grundvandsovervågning 1990-2014			Vandværksboringer 1992-2014		
Stofnavn	% ≥0,01 µg/l	% ≥0,1 µg/l	Stofnavn	% ≥0,01 µg/l	% ≥0,1 µg/l
BAM	20,6	8,1	BAM	19,5	3,9
DEIA	14,8	3,7	Bentazon	3,0	0,4
Atrazin, deisopropyl	11,1	1,7	Mechlorprop	2,4	0,2
4-Nitrophenol	8,4	0,6	CGA 108906	2,3	0,5
Atrazin, deethyl-	7,4	1,4	Dichlorprop	2,0	0,2
Didealk.-hydr.atrazin	7,2	1,0	Atrazin	1,8	0,1
Bentazon	6,8	2,1	DEIA	1,7	0,1
Glyphosat	6,1	1,3	Atrazin, deethyl-	1,6	0,1
Atrazin	5,4	1,2	Hexazinon	1,5	0,1
Metribuz-deamino-diketo	5,2	1,9	Atrazin, deisopropyl-	1,4	0,0
Triklorodikesyre	4,7	1,2	2,6-Dichlorbenzosyre	1,1	0,0
Dichlorprop	4,6	1,3	4CPP	1,0	0,2
AMPA	4,3	1,0	Metribuzin-deamino-	0,9	0,0
Mechlorprop	4,0	1,0	Simazin	0,8	0,0
Metribuzin-diketo	3,8	1,2	Dichlobenil	0,7	0,0
Deisopr.-hydr.atrazin.	3,7	0,2	MCPA	0,7	0,1
2,6-Dichlorbenzosyre	2,9	0,4	Atrazin, hydroxy-	0,6	0,1
Simazin	2,8	0,4	4-Nitrophenol	0,6	0,0
4CPP	2,5	0,8	Chlorsulfuron	0,5	0,0
MCPA	2,4	0,4	2,6-DCPP	0,5	0,0

Oversigten i tabel 2 viser, at de oftest identificerede stoffer (pesticider) i programmerne for overvågning af grundvandsressourcen og af grundvandet i vandværksboringer er stofferne BAM, bentazon, triaziner, samt flere af phenoxyzyerne.

Der er i screeningen af metoder til feltanalyser fokuseret på at belyse metoder, der kan håndtere og analysere de pesticider og nedbrydningsprodukter, der er relevante under danske forhold. Desuden er der søgt vurderet, hvorvidt de detektionsgrænser, der kan opnås med målemetoderne, er relevante i henhold til de grænseværdier, der er for enkelte pesticider i grundvand, og de koncentrationer i jorden og særligt jordvæsken, der må forventes at være udtryk for en grundvandsrisiko.

4. Resultater af litteratursøgning

Dette kapitel præsenterer resultaterne af litteraturscreeningen og de opfølgende samtaler med branchen. Kapitlet er delt op så det svarer til de søgetrin, der er nævnt ovenfor. De svar, der er givet fra relevante kontaktpersoner er indarbejdet i de enkelte afsnit, således at de understøtter de resultater, der foreligger for de enkelte søgetrin.

4.1 Søgetrin 1 og 2: Rapporter fra Miljøstyrelsen/Naturstyrelsen

Der er generelt mange rapporter fra Miljøstyrelsen, der omhandler pesticider, mens der kun er et fåtal i Naturstyrelsens database (og ingen af disse skønnes relevante i denne sammenhæng). Især fra midten af år 2000 og frem til i dag findes der mange rapporter. Dette understreger den store fokus, der er på pesticiderne i vores miljø. Det fremgår dog tydeligt, at fokus er rettet mod pesticider i vandmiljø og grundvand, da det er langt størstedelen af rapporterne, der beskæftiger sig med forekomsten og bestemmelse af pesticider i vandige medier (fx. Knudsen et al. 2004; Falkenberg et al. 2011; Bjerg et al. 2007).

For de rapporter, der også beskæftiger sig med pesticider i jord, beskæftiger samtlige rapporter sig med analyser, der udføres i laboratoriet (fx Stubsgaard et al. 2005; Tuxen et al. 2016; Bay og Rügge 2007).

Det fremgår af Tuxen et al. (2016), at udfordringen ved anvendelse af jordprøver bl.a. er, at der ikke findes en screeningsmetode der kan bruges til at foretage en hurtig og billig udvælgelse af, hvilke prøver, der bør analyseres i laboratoriet. De skriver endvidere at *"en standard jordanalyse for pesticider ved de danske miljølaboratorier har en detektionsgrænse for fx phenoxysyrer på 0,05 mg/kg TS (ved anvendelse af en estimeret sorptionskoefficient for dichlorprop). Da phenoxysyrer sorberer i meget ringe grad til jorden, svarer en sådan jordkoncentration til ca. 300 µg/l i vandfasen. Det betyder, at koncentrationer af pesticider i jorden under detektionsgrænsen kan give anledning til udvaskning af pesticider til grundvandet i høje koncentrationer, hvilket betyder, at analysemetoden for indhold i jord ofte ikke er sensitiv nok. Hvis analyser af jordprøver skal kunne detektere, hvad der svarer til fx en vandkoncentration på 10 µg/l, skal detektionsgrænsen være på ca. 2 µg/kg TS"*.

Den beskrevne udfordring (Tuxen et al. 2016) er baseret på, at hovedparten af pesticiderne er vandopløselige og sorberer svagt til jordmatrixen. Derved kan koncentrationen af et pesticid i jordvæsken være forholdsvis høj uden at den samlede koncentration i jorden er væsentlig. Dette kan tydeliggøres ved, at hovedparten af de godt 70 pesticider nævnt i Miljøstyrelsens værktøj til risikovurdering af jordforureninger (JAGG) har en opløselighed i vand der medfører, at et indhold på op til 100 – 300 µg/l i jordvæsken ikke vil føre til påvisning i jordprøver med laboratoriernes sædvanlige detektionsgrænser på 0,01 – 0,05 mg/kg TS for pesticider i jord. Et sådant indhold af pesticider i jordvæsken vil være en overskridelse af kvalitetskriteriet for pesticider i grundvand med op til en faktor 3.000.

Der er altså dels behov for en hurtig og billig screeningsmetode, men samtidig et behov for en metode der har relativt lave detektionsgrænser.

Der er på lerede jorder en tendens til en forsinket frigivelse af pesticider til infiltrationsvandet fra pesticider i jordmatrixens vandfase, hvorfra stofferne frigives løbende. Derved kan en sådan punktkildeforurening i lerede jorder ikke med det samme detekteres i grundvandet, men til gengæld bidrage til en grundvandsforurening i mange år (Tuxen et al. 2016). Det følger heraf, at en feltmetode med stor sikkerhed skal kunne bestemme pesticider i lerede aflejringer, således at punktkilders overordnede styrke og omfang kan bestemmes med sikkerhed.

I søgningens trin 2 er søgningen i Naturstyrelsens og Miljøstyrelsens databaser udvidet således, at der generelt er søgt på danske publikationer. Denne søgning gav dog ikke relevante resultater, men understreger blot det, der fremstår efter gennemgangen af rapporter fra Miljøstyrelsen: at fokus er på pesticider i grundvand, og at de analyser der udføres for pesticider i jord, udføres med specialudstyr af akkrediterede laboratorier.

4.2 **Søgetrin 3: Søgning på engelsk**

Ved en søgning på engelsk fremkommer der væsentlig flere resultater angående analyser af pesticider i felten, end ved den tilsvarende søgning foretaget på dansk.

Litteraturscreeningen på engelsk viser, at den hyppigst brugte metode til analyse af pesticider i felten, er de såkaldte ELISA-teknikker (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Der er også fundet forslag til eller beskrivelser af andre metoder, men disse er typisk på forsøgs- eller udviklingsstadier, og vurderes derfor ikke at være tilgængelige for anvendelse på kort sigt.

Som konsekvens heraf er der udført endnu en søgning med fokus på at skaffe viden om ELISA-teknikken (trin 4). Eksempler på anvendelse af ELISA teknikker er gennemgået i kapitel 5, idet der her er fokuseret på fordele og ulemper ved metoderne.

Litteraturscreeningen har tillige omfattet en søgning i den amerikanske miljøstyrelses (US-EPA) database over metoder anvendt og accepteret til miljøundersøgelser (National Environmental Methods Index (NEMI)). I databasen findes en række beskrevne metoder til bestemmelse af pesticider, hvoraf hovedparten er de velkendte metoder som HPLC, LC og GC anvendt på kemiske laboratorier, mens der herudover alene nævnes forskellige ELISA teknikker typisk anvendt til bestemmelse af pesticider i vand. De i denne database nævnte metoder for bestemmelse af pesticider med ELISA teknikker er knyttet til specifikke producenters produkter. Producenterne omfatter Abraxis og Modern Water, og begge disse firmaers hjemmesider er besøgt.

4.3 **Identificerede metoder og produkter**

Der er ved den udførte litteratursøgning frembragt oplysninger om en række markedsførte metoder og produkter, der kan forventes at kunne anvendes som feltmetode eller indledende screening af jordprøver for indhold af pesticider. Metoderne er beskrevet i det følgende.

4.3.1 **Abraxis**

Det amerikanske firma Abraxis tilbyder en lang række testmetoder til bestemmelse af pesticider og nedbrydningsprodukter (www.abraxiskits.com). Testmetoderne omfatter bestemmelse af pesticider i vandige medier, men der er tillige udarbejdet procedurer for ekstraktion af enkelte pesticider fra jordprøver.

Firmaet forhandler testkit til bestemmelse af atrazin og glyphosat, samt en mere bredspektret bestemmelse af triaziner. Der er ikke truffet oplysninger om bestemmelse af phenoxysyrer eller stofferne bentazon og BAM.

Ved henvendelse til Abraxis er der modtaget metodeforskrifter for bestemmelse af atrazin og glyphosat i jordprøver. Metodeforskriften er vedlagt i bilag 1.

Metodeforskrifterne omfatter simple ekstraktioner fra en afvejet jordprøve til vandfase med enten en metanol/vand opløsning (atrazin) eller en basisk opløsning (glyphosat). Efter omrystning og filtrering/centrifugering bestemmes indholdet af det ønskede stof enten kvalitativt eller kvantitativt efter standardkurve. Metoderne er beskrevet med detektionsgrænser på henholdsvis 0,015 mg/kg TS for atrazin og på 0,01875 mg/kg TS for glyphosat.

4.3.2 Modern Water

Det amerikanske firma Modern Water tilbyder ligeledes testkit af typen ELISA til bestemmelse af pesticider i vand og jord (www.modernwater.com).

På firmaets hjemmeside er der truffet oplysninger om bestemmelse af stofferne pentachlorphenol, atrazin, chlordane, DDT, triaziner og 2,4-D. Detektionsgrænsen er angivet til omkring 0,1 ppb for bestemmelse af atrazin formentlig relateret til den vandige opløsning, hvorved der typisk skal korrigeres for fortynding ved ekstraktion og omregnes til indhold i jord. Herved opnås en forventelig detektionsgrænse omkring 0,001 - 0,01 mg/kg TS. For pentachlorphenol og 2,4-D er detektionsgrænserne noget højere og angivet til 0,1 mg/kg TS.

Der er ikke truffet oplysninger om bestemmelse af de i dansk sammenhæng relevante stoffer bentazon, BAM og glyphosat.

4.3.3 ANP

Det amerikanske firma ANP Technology Inc. tilbyder et testkit i flere udgaver til bestemmelse af Acetylcholinesterase (ACE) inhiberende pesticider (www.anptinc.com). Metoden bestemmer indhold af en række pesticider – typisk insekticider, samt tilstedeværelsen af en række tungmetaller. Metoden er i modsætning til ovennævnte ELISA teknikker væsentlig mere bredspektret, idet der måles på stoffernes påvirkning af et specifikt enzymssystem.

Eksempler på pesticider og tungmetaller, der inhiberer AChE fremgår af tabel 3 nedenfor.

TABEL 3 STOFFER DER INHIBERER ACE /WWW.ANPTINC.COM/

EXAMPLES OF COMPOUNDS AND METALS DETECTED				
Acephate	Diazinon	Furadan/Carbofuran	Omethoate	Arsenic
Aldicarb	Dichlorvos	Isocarbophos	Phosmet	Cadmium
Aziniphos	Diclotophos	Isofenphos-methyl	Phoxim/Valaxon	Copper
Cadusafos	Dimethoate	Malathion	Oxamyl	Lead
Carbaryl	Dipterex/Trichlorphon	Methamidophos		Mercury
Carbosulfan/Methomyl	Ethyl Parathion	Methyl Parathion		Zinc
Chlorpyrifos	Fenamiphos	Monocrotophos		

Der tilbydes testkit i tre detaljeringsniveauer. En hjemmeudgave, der er billig men ikke så sensitiv. En medium udgave, der er udviklet til brug i fødevarerindustrien. Og en udgave der er udviklet til brug i militæret (den mest præcise udgave, med den mest sensitive detektor, der desuden er sensitiv over for flest stoffer). Sidstnævnte kaldes også ACE1-modellen og er godkendt af US-EPA og det amerikanske militær.

Den mest præcise udgave anvender en fluorimetrisk bestemmelse af prøvens indhold af de nævnte pesticider, og med en analysetid på 20-30 minutter for første prøve, mens de lidt billigere udgaver er baseret på henholdsvis strips med fluorescens bestemmelse og strips med farveudvikling.

ACE1 modellen kan fx også detektere de i tabel 4 angivne stoffer i vand, idet der tillige er opgivet detektionsgrænser for de enkelte stoffer.

TABEL 4 STOFFER DER INHIBERER ACHE /WWW.ANPTINC.COM/

Compound	Detection	Compound	Detection
Aldicarb	78 ppb	Fenamiphos	35 ppb
Aziniphos	25 ppm	Malathion	50 ppm
Acephate	5 ppm	Methamidophos	0.16 ppm
Cadusafos	1 ppm	Methyl Parathion	1.05 ppm
Carbaryl	0.63 ppm	Monocrotophos	5 ppm
Carbofuran	6 ppb	Omethoate	1.25 ppm
Carbosulfan	39 ppb	Oxamyl	39 ppb
Chloropyriphos	100 ppm	Phosmet	50 ppm
Diazinon	25 ppm	Phoxim	5 ppm
Dichlorvos	<78 ppb	Cadmium	1000 ppm
Dicrotophos	10 ppm	Copper	52 ppm
Dimethoate	1.25 ppm	Lead	1000 ppm
Dipterex	<78 ppb	Mercury	12.5 ppm
Ethyl Parathion	0.16 ppm	Zinc	1000 ppm
		Arsenic	30 ppm

Det ses af tabel 4, at der for de viste stoffer er forholdsvis høje detektionsgrænser med enkelte stoffer med lave detektionsgrænser.

4.3.4 Teststrips

Firmaet Hach (www.hach.com) forhandler et bredt spektrum af forskelligt feltteknisk måleudstyr, og blandt andet indeholder firmaets Eclox Rapid Response Water Test Kit en teststrip til bestemmelse af Acetylcholinesterase inhiberende pesticider. Testen er en positiv/negativ test, og firmaet oplyser detektionsgrænser på følgende koncentrationsniveauer i vand:

- Carbamater: 0,1 – 5 ppm (mg/kg TS)
- Thiophosphater: 0,5 – 5 ppm
- Organophosphater: 1 – 5 ppm

Der er ikke anvist fremgangsmåder for bestemmelse af disse stoffer i andet medie end vand.

Det amerikanske firma Abraxis forhandler ligeledes teststrips til bestemmelse af atrazin og simazin i vand. Bestemmelsen er hurtig og sker ved placering af teststrippen i en vandprøve i 10 minutter, hvorefter et positivt eller negativt resultat kan aflæses. Detektionsgrænsen er oplyst til henholdsvis 3 µg/l for atrazin og 4 µg/l for simazin.

Der er fundet yderligere et eksempel på hvor simpel en test der kan udvikles med disse teknikker. Firmaet Industrial Test Systems Inc. forhandler en pakke med 2 teststrips til bestemmelse af ovennævnte pesticider atrazin og simazin. Detektionsgrænsen er ligeledes her oplyst til henholdsvis 3 µg/l for atrazin og 4 µg/l for simazin. Produktet er vist nedenfor i figur 1.



FIGUR 1 PRODUKT MED TESTSTRIPS TIL BESTEMMELSE AF ATRAZIN OG SIMAZIN I VAND

Produktet indeholder 2 teststrips og forhandles på nettet til en pris af omkring 185 DKK uden fragt.

4.3.5 Andre oplysninger

I forbindelse med projektet er der fremkommet oplysninger om mulig anvendelse af tungmetallet kobber som en indikator for lokaliseringen af områder med håndtering og spild af pesticider. Der er i den forbindelse taget kontakt til Abelone Christensen fra Region Midt, der i flere sammenhænge har beskrevet sammenhænge mellem forekomsten af dette tungmetal og anvendelsen af fx arsen baserede pesticider og kobber baserede svampemidler.

Ved opslag i middeldatabasen (www.middeldatabasen.dk) fremgår det, at der tidligere har været anvendt knap 10 forskellige produkter med indhold af kobber til bekæmpelse af svampeangreb. Det må derfor vurderes sandsynligt, at der på lokaliteter hvor anvendelse af pesticider har omfattet bekæmpelse af svampeangreb i plantevæksten, der vil der være stor sandsynlighed for også at kunne konstatere lettere forhøjede indhold af tungmetallet kobber.

Det skal her bemærkes, at der i landbruget ligeledes anvendes kobber og zink til behandling af maveproblemer i smågrise. Det anvendte kobber vil i høj grad findes i gyllen, og på denne baggrund kan der være andre kilder til forhøjede forekomster af kobber. Det bemærkes, at kobber bindes til

jorden og derfor vil kunne påvises i overfladejord på disse lokaliteter. Påvisning af lettere forhøjede indhold af kobber vil kunne udføres ved anvendelse af feltudstyr som fx en håndholdt XRF (røntgen fluorescens detektor).

4.4 **Samlet resultat**

Den udførte søgning efter metoder, der kan anvendes til feltmåling eller indledende screening af jordprøver for indhold af pesticider viser, at der findes en række metoder til bestemmelse af pesticider i vandprøver, og for visse produkter også metoder til ekstraktion af pesticider forud for bestemmelse ligeledes på vandprøver. Metoderne tager udgangspunkt i ELISA teknikkerne, som er beskrevet nærmere i næste kapitel.

Generelt er der konstateret forholdsvis lave detektionsgrænser, og detektionsgrænser på et niveau, hvor metoderne bliver interessante i forhold til den fortynding der må forventes ved en simpel ekstraktion af pesticiderne fra en jordprøve til en vandfase.

Det kan tillige konstateres, at de udviklede metoder er specifikke for enkeltstoffer eller stofgrupper. Der er dog udviklet metoder, der dækker gruppen af Acetylcholinesterase inhiberende stoffer.

5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays)

Litteraturscreeningen, der er foretaget med fokus på at etablere viden om ELISA i relation til feltundersøgelser af pesticider i jord, indeholder dels videnskabelige artikler og rapporter, dels oplysninger fra forhandlernes hjemmesider. Sidstnævnte er meget brugbare og et godt supplement til artikler og rapporter, da de indeholder oplysninger om, hvordan det enkelte testkit anvendes i praksis og typisk også oplysninger om hvilke stoffer, det er rettet mod, og hvilke detektionsgrænser, der opereres med.

I de følgende afsnit er ELISA-teknikken gennemgået med fokus på:

- Beskrivelse af teknikken og metoden.
- Fordele og ulemper samt udfordringer ved metoden.
- Parametre, der kan måles for og detektionsgrænser, der typisk kan opnås.

5.1 Beskrivelse af teknikken

ELISA-teknikkerne er en forkortelse for Enzyme Linked Immunosorbent Assay. I hovedtræk bygger teknikken på binding mellem et antistof (et enzym udvalgt til formålet) og et antigen (i de her tilfælde et pesticid) (Dankwardt 2001).

ELISA er en type af de såkaldte immunoassays, hvoraf der findes en række forskellige typer. Immunoassays inddeles efter typen af antistoffer, der anvendes. Oftest er der tale om enzymbaserede systemer, men der er tillige fundet eksempler på anvendelse af radioisotoper i RIA og på anvendelse af kemiluminescens i CLIA. ELISA-teknikkerne anvender enzymer, hvorved kemiske reaktioner med fx farveudvikling kan øges betragteligt, og derved medføre øget følsomhed og lave detektionsgrænser (Mingtao Fan og Jiang He, 2011). Studier har desuden vist, at de såkaldte non-competitive immunoassays (som ELISA) overgår de competitive immunoassays både når det kommer til analysens sensitivitet, præcision, og den koncentrationsradius, der kan arbejdes indenfor (Jackson og Ekins, 1986).

Litteratursøgningerne viser, at de fleste kilder vedr. ELISA beskriver teknikernes brug på prøver, der er på væskeform. Ved brug af ELISA-metoderne på jordprøver skal pesticiderne først ekstraheres fra jordprøverne og bringes i vandig opløsning inden analyse. Hovedparten af de i Danmark anvendte pesticider har stor vandopløselighed, og kan derfor ekstraheres fra jordmatrix med vand eventuelt med hjælpepestoffer (co-ekstraktionsmiddel) eller pH regulerende stoffer. Her har fx acetone, methanol eller ethylacetat været anvendt (Dankwardt 2001).

Et praktisk eksempel på ekstraktion i felten er givet i Garcia (2004), der analyserer for carbendazim. En jordmængde på ca. 10 g fyldes i en 30 ml plastflaske sammen med lidt natriumbikarbonat (for at opnå alkalinitet) og lidt metanol (ekstraktionsmiddel). Der lægges et par stålkugler i flasken, hvorefter den rystes med håndkraft i to minutter, og stilles til sedimentering i 5 minutter. Herefter filtreres den flydende fase gennem filterpapir med opsamling. Prøven fortyndes med en buffer (der er forberedt hjemmefra og som består af en række salte opløst i vand), alt efter hvor meget carbendazim der forventes i prøven.

Denne metode for ekstraktion må beskrives som simpel og mulig at gennemføre hurtigt for mange prøver.

Af de forskellige forhandlernes hjemmesider fremgår en række forskellige typer af ELISA test såsom: Microtiter plate, coated tube, magnetic particle, high sensitivity magnetic particle og strip test.

Der forekommer mindre forskelle mellem de forskellige metoder, der blandt andet betyder, at prøvehåndterings- og analysetid adskiller sig lidt, ligesom detektionsgrænse og præcision også kan adskille sig, men analysetyperne bruger det samme grundprincip: At man har en testtube, der behandles med et enzym, hvorefter der tilsættes prøve. Opløsningens farveintensitet vurderes enten visuelt eller måles med et spektrofotometer.

Teststrips adskiller sig herfra, ved at de blot dyppes i prøven. Der er ved screeningen af litteratur og forhandlere fundet teststrimler for atrazin og simazin. Der er tale om semikvantitative tests, der kan vise, om der er atrazin hhv. simazin i vandprøven eller ej. Således gælder, at testen efter 10 min viser positiv, hvis der er over 3 µg/l atrazin i prøven, eller over 4 µg/l simazin (www.abraxikits.com og www.sensafe.com). Da atrazin og simazin kan ekstraheres fra jord ved at ryste jordprøven med vand, skønnes det, at denne metode nemt kan bruges til screening af, om jorden indeholder atrazin/simazin i koncentrationer, der giver ophav til koncentrationer i ekstraktet, der ligger over de nævnte værdier.

5.2 Fordele og ulemper samt udfordringer

En af de helt store fordele ved ELISA-testkit er at de er relativt billige. At de er forholdsvis nemme at anvende i felten. Samt at de hurtigt kan screene for forekomst af enkeltstoffer, hvorved man kan skaffe sig viden om, hvorvidt det er nødvendigt at følge op med laboratorieanalyser. Fx angiver Abraxis på deres hjemmeside (www.abraxikits.com), at der for Microtiter plate metoden kan køres op til 40 prøver ad gangen. Det tager mindre end 1 time at analysere disse prøver.

En anden fordel er ELISA teknikernes store følsomhed og dermed de relativt lave niveauer for detektionsgrænsen. Det er muligt at operere med så lave detektionsgrænser fordi de enkelte analyser er meget specifikke og typisk kun er rettet mod et enkelt stof. Der er i flere tilfælde lavet direkte sammenligninger af ELISA-teknikkerne og laboratorieteknikkerne. For eksempel har Rubio et al. (2003) sammenlignet ELISA metode med HPLC til brug for kvantificering af glyphosat beriget vand. ELISA havde en detektionsgrænse på 0.6 ng/ml, mens HPLC-metoden havde en detektionsgrænse på 50 ng/ml.

At ELISA-teknikkerne er så specifikke kan også betragtes som en af de helt store svagheder ved metoden. Ved undersøgelse af punktkilder med et forventet bredt spektrum af anvendte pesticider vil der skulle anvendes flere forskellige ELISA metoder, og det følger heraf at omkostninger til felttest øges væsentligt. Der foreligger en række Miljøstyrelsens projekter, hvor oplysninger om hvilke pesticider, der typisk vil være at finde ved forskellige typer af punktkilder er belyst nærmere (fx Bay & Rügge, 2007; Tuxen et al. 2016).

På grund af udfordringen med at de fleste ELISA-kits netop er rettet mod et (eller få) stoffer, pågår der også megen forskning med henblik på at gøre analyserne bredere så de kan bruges på flere stoffer på én gang, uden at sensitiviteten og de lave detektionsgrænser påvirkes i negativ retning (Xiao Liang et al. 2013; Xu Yana et al. 2012). Fx er der udviklet en ELISA til at detektere O,O-dimethyl-organofosfater samlet under et (Mingtao Fan og Jiang He, 2011).

En anden måde at imødegå denne problemstilling på, kunne være ved at udvælge såkaldte indikatorpesticider, som man måler på. Dvs. at man måler på et mindre og nøje udvalgt antal af pesticider, for hvilke det gælder, at når de er tilstede, så ved man med høj grad af sikkerhed også om en række andre pesticider er tilstede.

Knudsen et al. (2004) har undersøgt denne tilgang for vandprøver. Således har de undersøgt 649 datasæt fra små vandforsyningsanlæg. Prøverne repræsenterer et bredt spænd i geologi og geografi

og stammer fra de øvre grundvandsmagasiner. De finder, at en reduceret pesticidpakke bestående af 10 indikator pesticider (Indikatorpakke 4): 2,6-dichlorbenzamid (BAM), desisopropylatrazin, desethylatrazin, atrazin, simazin, desethylterbutylazin, terbutylazin, diuron, bentazon og AMPA vil kunne "fange" 97% af alle de forventede positive prøver.

Det er ikke nødvendigvis sådan, at der vil gælde de samme korrelationer for forekomst af pesticider i jord. Hvis denne tilgang skal adapteres til at gælde for screeninger af jord, så bør der laves et studie, der kigger på korrelationer mellem forekomster af pesticider i jord, ved at kigge på et bredt udsnit af eksisterende jordprøver.

5.2.1 Krydsreaktioner

En af de udfordringer, der også er med de traditionelle ELISA-teknikker, er, at der kan ske krydsreaktioner. I praksis betyder dette, at andre stoffer, end det der analyseres for, bindes til enzymet. Der efterlades altså større mængder af pesticid i den prøve, der skal analyseres, end det havde været tilfældet, hvis der ikke havde været en krydsreaktion. Det betyder også at krydsreaktionerne i alle tilfælde hvor de forekommer, er skyld i falsk positive prøver og en potentiel overestimering af forureningssituationen. Krydsreaktionerne sker ofte med stoffer der har strukturel lighed med det stof, der analyseres for. Fx angives det for analyse af atrazin, at der kan være krydsreaktioner med andre triaziner, men der kendes ikke til krydsreaktioner med andre stofgrupper.

De fleste forhandlere har tabeller tilknyttet deres analysesæt, hvoraf det fremgår, hvilke stoffer der har det med at krydsreagere, således at man inden analysens opstart har en ide om, hvorvidt man kan forvente krydsreaktioner. For at få en ide om, hvorvidt dette kan forventes, er det dog nødvendigt at vide, om det stof man kigger efter, tit forekommer sammen med andre stoffer. Dette kan enten ske ud fra en viden om, hvilke stoffer, der typisk findes ved de forskellige typer af punktkilder (fx Bay & Rügge, 2007; Tuxen et al. 2016). I visse tilfælde kan krydsreaktionerne også være positive, da det betyder, at testkits ikke er helt så specifikke, og derfor kan favne flere stoffer end et enkelt. Fx nævner Knudsen et al. (2004) at et atrazin kit ligeledes vil bestemme mange af nedbrydningsprodukterne såsom DE-atrazin og DIP-atrazin, og derved dækkes et bredere felt end lige navnet antyder.

Problemet med krydsreaktion kan reduceres med en grundigere prøveforberedelse som fx SPE (solid phase extraction) efterfulgt af sequentiell eluering af det pesticid man ønsker at kigge på, og det stof der er skyld i krydsreaktionen (Aga et al. 1994). En besværliggørelse af prøveforberedelsen gør dog metoderne mindre attraktive i denne sammenhæng, da formålet med denne rapport netop er at pege på metoder, der er relativt simple. At der i visse tilfælde forekommer krydseffekter bør dog ikke udelukke brug af metoderne. Da der sjældent findes falske negative prøver, synes det oplagt at anvende dem som screeningsmetoder i felten. Der bør dog efterfølgende følges op med traditionelle laboratorieanalyse som HPLC eller GC/MS.

5.2.2 Matrix effekter

En anden problematik, der er knyttet til ELISA-testkits er matrixeffekten. Som nævnt er det nødvendigt at ekstrahere pesticiderne fra jordprøverne før der kan analyseres for pesticider med ELISA. Typisk bruges der et organisk ekstraktionsmiddel så som acetone, æter, petroleums æter, metanol, acetonitril eller hexan (Mingtao Fan og Jiang He, 2011). Ekstraktionen kan føre til, at der også frigives andre stoffer fra jordprøven. I fødevarerprøver er det hyppigst stoffer som lipider, proteiner og polyfenoler, der co-ekstraheres. I jordprøver kan især humussyrer udgøre et problem (Dankwardt 2001). Problemet består både i humussyrernes egen farve, der forstyrrer aflæsning af resultatet, og at humussyrerne for nogle typer af analyser krydsreagerer med enzymerne. Problemer med matrixeffekt kan i mange tilfælde imødegås med en fortynding af prøven.

Firmaerne, der fremstiller testkits håndterer problemstillingen med matrixeffekt og krydsreaktioner ved at tilsætte bufferopløsninger til prøverne samt anbefale fortynding. Mingtao Fan og Jiang He (2011) nævner også dette, idet de skriver at mange forskningsgrupper har sammenlignet ELISA-resultater med resultater målt med GC/MS eller HPLC, og der findes korrelationskoefficienter på >0,9, hvilket viser god overensstemmelse mellem de to tilgange. Dankwardt (2001) skriver, at der i sammenligningerne typisk findes en smule højere resultater med ELISA end med GC-MS/HPLC, når prøverne sammenlignes. Dette skyldes netop påvirkningen med krydsreaktion og matrix-effekt ved brug af ELISA.

5.2.3 Temperaturfølsomhed

En sidste ting, der bør nævnes som noget man skal være opmærksom på er, at flere forhandlere nævner at analysekits er temperaturfølsomme. De skal således sikres opbevaring ved 4-8 grader celsius, og skal opvarmes til stuetemperatur umiddelbart inden brug. Hvis et analysekit skal fragtes over længere afstande skal man være opmærksom på, at forhandleren pakker forsendelsen således at temperaturkrav kan overholdes.

5.3 Analyseparametre og detektionsgrænser

Der er i bilag 2 vist en samlet oversigt over, hvilke pesticider og nedbrydningsprodukter, der er nævnt i forbindelse med immunokemiske analyser i litteraturen. Af bilaget fremgår også, hvilke detektionsgrænser der forventeligt kan opnås med de enkelte analyser. Bilaget består af en "sammenfatning" af en tabel fra Dankwardt (2001), der har lavet en oversigt, der gælder frem til 2001, og en tabel fra Goel (2013), der har suppleret tabellen med oplysninger fra perioden 2001-2013. Det bemærkes, at de i tabellen i bilag 2 nævnte stoffer ikke nødvendigvis er udviklet til kommercielle produkter og metoder.

Der er ved søgning på forhandlersider fundet testkits til en række stoffer som fx 2,4-D; Acetochlor, Alachlor; Atrazin; Azoxystrobin; Carbendazim; Benomyl; Cyclodene; Triazinmetabolitten DACT; DDE/DDT; Diuron; Fluridon; Glyphosat; imidachloprid/chlothianidin; metolachlor; organophosphate/carbamate; penoxsulan; pyrachlostrobin; pyrethroider; spinosyn; trifluralin (www.Abraxikits.com). Simazin (www.sensafe.com). Ethoxyquin (www.bioscientific.com).

I Knudsen et al. (2004) er der desuden givet et overblik over kommercielle immunokemiske kits frem til 2004.

Der synes fx ikke endnu at være udviklet ELISA testkits til bestemmelse af BAM, der ellers som det fremgår af tabel 2 er det stof, der hyppigst registreres i grundvand og indvindingsboringer i Danmark. Der er heller ikke udviklet metoder til at detektere moderstoffet Dichlobenil med ELISA testkits. Der er ikke fokus på disse stoffer i USA, og da de fleste ELISA testkit er udviklet til det amerikanske marked, så er der formentlig ikke udviklet testkit til disse stoffer endnu.

Knudsen et al. (2004) angiver at detektionsgrænsen for de kommercielle testkit til pesticidanalyse ligger i området 0,005 µg/l til 1,4 µg/l. Det har vist sig, at det ved at udskifte de engangspipetter, der typisk følger med testkit, med mere præcise hel- og halvautomatiske pipetter og desuden forøge antallet af punkter på standardkurven, så er det muligt at sænke detektionsgrænsen med en faktor 10 (Meulenberg og Stoks, 1995). Det vil sige, at EU-kravet om en detektionsgrænse på 0,1 µg/l for pesticider i vand (Knudsen et al 2004) vil kunne være overholdt i nogle tilfælde. Det bemærkes dog, at det af Knudsen et al. (2004) angivne interval er ret bredt.

Hvis der kigges på de stoffer, der hyppigst findes i grundvandsovervågningen/boringerne (tabel 2), så angives der i bilag 2 metoder for syv af stofferne (Atrazin, desethylatrazin, bentazon, dichlorprop, simazin, hexazon, chlorsulfuron). Det fremgår af tabellen i bilag 2, at der for alle de nævnte stoffer angives detektionsgrænser, der ligger lavere end 0,1 µg/l. Kigges der på tabellerne i bilag 1, så er

der en tendens til at detektionsgrænserne i den nyeste del af tabellen synes at være lavere, da man i flere tilfælde er nede i ng-området.

5.4 **Priser**

Det kan umiddelbart være svært at opgøre prisen per prøve, da det er forskelligt hvad de enkelte priser indeholder. Eksempler på priser er fx Industrial test systems (www.sensafe.com) der har kits til atrazin og simazin. Koster ca. 185 dkk eksklusiv udgifter til fragt (svarende til 27.49 USD). www.hach.dk har på deres danske underside et ELISA testkit til atrazin i vand. Her er prisen 8.880 dkk for 100 analyser, men prisen er inklusiv et "pocket colorimeter II".

Der findes en del producenter og forhandlere af testkit til feltmåling af pesticider via ELISA-teknikken (et udpluk af dem fremgår af litteraturlisten). Der er dog ikke så mange danske forhandlere. De enkelte danske forhandlere der er, synes at have testkit der er rettet mod fødevarerindustrien. BIOO Scientific er et af de få firmaer, der har en distributør i Danmark (Nordic BioSite APS i København). Der fremgår en række eksempler på de traditionelle ELISA testkit i Knudsen et al. (2004). Priserne spænder fra 83 dkk til 1.265 dkk.

For NIDS-testkits gælder, at den dyreste udgave (ACE1) koster 50.000 dkk, inkl. 10 testkits. Derefter koster testkits 133 dkk per stk. "Medium-metoden" (den som er anbefalet til fødevarerindustrien) koster 25.680 dkk inkl. 10 testkits. Teststrips koster efterfølgende DKK 80 per stk. (ved en omregningskurs på 6,67).

5.5 **Mulige alternativer til ELISA**

ELISA metoderne må generelt siges at være de mest udviklede metoder i forhold til anvendelse på jordprøver og i forhold til praktiske erfaringer på markedet. Der er dog truffet oplysninger om andre metoder, der kunne være alternativer til ELISA teknikkerne. Disse oplysninger er beskrevet i de følgende afsnit.

5.5.1 **Nanopartikel baseret metode med rhodamin B**

Stoffet rhodamin B (RB) er ofte anvendt inden for mikrobiologi og biokemi, idet stoffet er fluorescerende. En række kinesiske forskere (Dingbin et al. 2012) har arbejdet med anvendelse af dette stof i kombination med nanopartikler og udviklet et rhodamin B dækket guld nanopartikel (RB-AuNP) baseret testsystem med dobbelt signal (kolorimetrisk og fluorimetrisk) til bestemmelse af Acetylcholinesterase inhiberende pesticider. Ved fraværet af Acetylcholinesterase inhiberende pesticider forbliver RB-AuNP opløsningen rød og fluorescerende, mens tilstedeværelsen af disse pesticider fører til blå farvning og fjernelse af fluorescensen fra RB.

Metodens følsomhed er angivet til koncentrationsniveauer omkring 0,1 – 1 µg/l for en række stoffer som fx carbaryl, diazinon, malathion og phorate. Metoden er alene beskrevet for vandige prøver, men oplyses dog også at kunne dække faste prøver som fx fødevarer. Der er ikke fundet oplysninger om eventuel anvendelse på jordprøver.

5.5.2 **AgriScreen Ticket, Neogen**

Det amerikanske firma Neogen har udviklet en simpel test – AgriScreen Ticket – for tilstedeværelse af op til 50 forskellige Acetylcholinesterase inhiberende pesticider som fx carbamater, thiophosphater og organophosphater. Testen oplyses til at være mindre specifik end traditionelle ELISA og immunoassay test, og er ikke kvantitativ men indikativ (farveudvikling). Testen er baseret på en reaktion mellem pesticidet og et enzym, der er imprægneret på en filterplade.

Baseret på de tilvejebragte oplysninger kan testen udføres på faste stoffer herunder også jordprøver.

6. Konklusion

Der er udført en litteratur-og forhandlerscreening via søgemaskinen Google for metoder og produkter til bestemmelse af pesticider i jord ved feltteknikker eller simple screeninger. Søgningen viser at den mest lovende metode til screening af jordprøver i felten for indhold af pesticider er ELISA-teknikkerne. Det er tillige konstateret, at der ikke er andre metoder end ELISA metoderne, der på nuværende tidspunkt vurderes som egnede til formålet.

ELISA teknikkerne er meget specifikke og har som følge heraf lave detektionsgrænser. At de er så specifikke gør dog også at de typisk kun er målrettet analyse af et stof af gangen. Som følge af krydsreaktioner med stoffer der kemisk ligner det specifikke stof, som den enkelte ELISA metode er udviklet til, vil der kunne detekteres indhold af stoffer tilhørende samme stofgruppe.

Ved anvendelse af ELISA teknikker på jordprøver vil der kunne forekomme matrixeffekt som følge af jordens indhold af fx humussyrer, samt krydsreaktioner som følge af indhold af kemisk beslægtede komponenter. Disse forhold har forhandlerne af produkter som udgangspunkt beskrevet nærmere i metodevejledninger og –beskrivelser.

Generelt kan det konkluderes, at der er fundet en række produkter og metoder baseret på ELISA teknik, der vil kunne detektere indhold af pesticider i relevante koncentrationsniveauer ved screening af jordprøver for forekomst af pesticider i punktkilder. Metoderne er enten stofspecifikke eller begrænset til bestemmelse af kemiske beslægtede stoffer. Der er i særlig grad udviklet metoder til bestemmelse af atrazin og simazin, samt generelt indhold af triaziner, eller til bestemmelse af Acetylcholinesterase inhiberende stoffer (insekticider). Der er i projektet dog også fundet metoder, der dækker stoffer som fx 2,4-D og glyphosat. Der er ikke fundet oplysninger om metoder til bestemmelse af det for danske forhold relevante stof bentazon.

Metodernes detektionsgrænser er på et koncentrationsniveau, der vurderes relevant i forhold til krav om detektion på niveauer omkring eller lavere end ved laboratorieanalyser. Og metodemæssigt kan der foretages en forholdsvis simpel ekstraktion til vandfase, og filtrering af vandfasen for fjernelse af sedimentpartikler.

Perspektiverne i de identificerede ELISA metoder er anvendelse til at belyse en punktkildes styrke ned gennem et jordprofil eller en punktkildes horisontale udbredelse, men dog med den begrænsning, at den enkelte metode alene dækker enkeltstoffer eller en stofgruppe. Der vurderes at være behov for en afprøvning af konkrete ELISA metoder til dette formål, således at den praktiske anvendelighed og resultaternes brugbarhed ved konkrete undersøgelser af punktkilder med pesticider kan vurderes. En sådan afprøvning kunne eksempelvis foretages i forbindelse med undersøgelser af kildeområder på lokaliteter, hvor sammensætningen af pesticider i kildeområdet er belyst, og hvor der derfor kan foretages et valg af den bedst egnede ELISA metode. Baseret på antallet af tilgængelige testmetoder i form af strips og egentlige ELISA metoder anbefales det, at der fokuseres på punktkilder med stofferne atrazin og simazin.

Der er ved projektet tillige fremkommet oplysninger om mulig anvendelse af tungmetallet kobber som indikator for den horisontale placering af en punktkilde. Dette skyldes, at kobber har været anvendt som indholdsstof i en række svampemidler og derfor typisk kan konstateres hvor bekæmpelse af svampeangreb har været nødvendig som fx på planteskoler, gartnerier og landbrug. Erfaringer med denne fremgangsmetode er ikke vurderet nærmere i dette projekt.

Referencer

Bay, Henrik og Rügge, Kirsten (2007): Risikovurdering af pesticidpunktkilder. 1158. Miljøstyrelsen 2007.

Bjerg, Poul L.; Tuxen, Nina; Elkjær, Lars; Jeppesen, Astrid Zeuthen og Jensen, Bjørn K. (2007): Strategier over for pesticidtruslen mod grundvandet fra punktkilder – forprojekt. Miljøprojekt Nr. 1159. Miljøstyrelsen, 2007

Brandt Knudsen, Torben; Andersen, Ole og Rasmussen, Hanne (2004): Reduceret omkostninger i forbindelse med analyse af pesticider i små vandforsyningsanlæg. Miljøprojekt Nr. 921. Miljøstyrelsen 2004.

Cornell University. Soil and Water Lab Pesticides (2010): Pesticides in Upstate New York's Ground Water: Analytical Methods and Sampling Protocols. Screening Method for Pesticides. <http://soilandwater.bee.cornell.edu/Research/pesticides/methods.html>

Dankwardt, Andrea (2001): Immunochemical assays in pesticide Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry (Robert A Meyers, Eds.) <http://eu.wiley.com/legacy/wileychi/eac/pdf/A1714-W.PDF>

Dingbin Liu, Wenwen Chen, Jinhua Wei, Xuebing Li Zhuo Wang and Xingyu Jiang. Anal. Chem., 2012, 84 (9), pp 4185–4191 – A Highly Sensitive, Dual-Readout Assay Based on Gold Nanoparticles for Organophosphorus and Carbamate Pesticides

Falkenberg, Jacqueline Anne; Larsen, Morten Birch; Lenschow, Søren Rygaard; Bay, Henrik; Rügge, Kirsten; Ludvigsen, Anders Korsgaard og Christensen, Anders G. (2011): Strategier over for pesticidtruslen mod grundvandet fra punktkilder. Lokalitetsundersøgelser for pesticider i grundvand. Miljøprojekt Nr. 1332. Miljøstyrelsen 2011.

Goel, P. (2013): Immunodiagnosis of pesticides: A review. African Journal of Biotechnology. Vol 12 (52), pp. 7158-7167

Jackson, T.M.; Ekins, R.P. (1986): Theoretical limitations of immunoassay sensitivity. Journal of Immunological Methods. Nr. 87. pp 13-20

Meulenberg E. P. and Stoks P. G. Water quality control in the production of drinking water from river water. The application of immunological techniques for the detection of chlorophenoxy acid herbicides (2,4-D). *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 407-413.

Mingtao Fan; Jiang He (2011): Pesticide Immunoassays. In: Pesticides – Strategies for Pesticides Analysis, Prof. Margarita Stoytheva (Ed.). In Tech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-strategies-for-pesticides-analysis/pesticides-immunoassay>

Rubio F, Veldhuis LJ, Clegg BS, Fleeker JR, Hall JC (2003). Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. J. Agric. Food Chem. 51:691-696.

Stubsgaard, Eike; Hansen, Nis; Outzen, Stefan (2005): Analyser for pesticider i punktkilder. Miljøprojekt Nr. 1029. Miljøstyrelsen 2005

Thorling, L., Ernstsén, V., Hansen, B., Larsen, F., B., Mielby, S., Johnsen, A.R., og Trolborg, L. 2015: Grundvand. Status og udvikling 1989 – 2014. Teknisk rapport, GEUS 2015. www.grundvandsovervaagning.dk

Tuxen, Nina; Roost, Sandra; Jepsen, Trine Skov; Tsitonaki, Katerina og Brandt, Gyrite (2016): Teknisk erfaringsopsamling for pesticidpunktkilder. Miljøprojekt 1781. Miljøstyrelsen 2016.

Xiao Liang, Rong Xie, Chunmei Wang, Wenjun Gui, Guonian Zhu (2013): Development of a broad-selective immunoassay for multi-residue determination of type II pyrethroids in West Lake water. Food and Agricultural Immunology. Volume 24, Issue 1, pages 59-78

Xu Yana, Haiyan Shia, Minghua Wang (2012): Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous determination of parathion and imidachloprid. Analytical Methods. Issue 12, 2012.

Besøgte hjemmesider på nettet:

<https://www.nemi.gov/home/> [Citeret d 23/3-2016]

<http://www.dexsil.com> [Citeret d 29/3-2016]

<http://www.abraxiskits.com>. [Citeret d 23/2-2016]

<http://www.modernwater.com/monitoring/environment/test-kits>

<http://www.sensafe.com> [citeret d 23/3-2016]

<http://www.neogen.com> [Citeret d 25/5 – 2016]

<http://www.bioscientific.com/> [citeret 23/3-2016]

<http://www.anptinc.com> [citeret d 28/3-2016]

<http://www.hach.com> [citeret 10/3-2016]

<http://www.middeldatabasen.dk> [citeret 25/5-2016]

Bilag 1 Metode: Bestemmelse af atrazin og metolachlor i jordprøver

Metodeforskrift modtaget fra firmaet Abraxis for bestemmelse af atrazin og metolachlor i jordprøver.

DETECTION OF ATRAZINE AND METOLACHLOR IN SOIL

MATRIX	Soil
RANGE OF DETECTION	Atrazine: 15-750 ppb Metolachlor: 15-750 ppb
MATERIALS	<i>Reagents:</i> methanol (pesticide grade), distilled or deionized water <i>Equipment:</i> reciprocating shaker; plastic bottles (HDPE or PP, 60 mL capacity); centrifuge (optional); filters (optional); sample containers; 100mL graduated cylinder; 50mL polypropylene conical tubes or bottles; serological pipettes; shaker; scale or balance; apparatus for grinding and mixing soil.
SAMPLE PREPARATION	Break up large soil clumps and mix thoroughly to uniformity with a mixer, mortar and pestle or by hand with a spatula. Moist samples should be air dried at room temperature by spreading soil in a thin layer for up 24 hours prior to mixing.
EXTRACTION SOLUTION	Methanol/water 3:1 (3 parts methanol plus 1 part water).

EXTRACTION PROCEDURE

NOTE: *Extraction times as short as 10 minutes give useful results. Extraction times should be chosen depending on the objective of the study, especially when high concentrations are expected and when time constraints are critical. The following protocol is recommended when assessing ppb levels while extracting most of the pesticide from the soil for analysis.*

1. Label soil collection bottles and extract collection vials.
2. *Sampling:* Remove the screw cap from the soil collector bottle and collect soil by weight as follows:

- *By weight using digital balance:*

Place the bottle in an upright position on the balance and tare weight. Weigh 10 ± 0.1 gram of soil into the bottle. Record the soil weight.

3. *Extraction*

- 3.1 Position the soil collection bottle containing the soil sample upright.
- 3.2 Pour approximately 30 mL of the Extraction Solution into a graduated cylinder.
- 3.3 Pour the contents of the tube into the bottle. Screw the cap on tightly.
- 3.4 Position the sample bottle on its side and shake vigorously and continuously for 30 minutes at approximately 200 cycles/min.
- 5.2 Allow sample to sit overnight
- 5.3 Shake sample vigorously for 30 minutes.
- 3.7 Position the collection/extraction bottle upright and allow the mixture to settle at least five minutes.

4. *Filtration*

- 4.1 Remove the screw cap and pour about two (2) mL of the soil/extraction solution mixture into the bottom container of filter device (available from Abraxis).
- 4.2 Attach the plunger rod containing the filter to the bottom holder of the filter device.
- 4.3 Apply slight pressure to the plunger handle. The filtrate will begin to flow more quickly as gentle pressure is continuously applied.
- 4.5 Fill the filter container with vial with approximately 10 to 20 drops (0.5 to 1 mL). Cap the filter container. This amount of filtrate is sufficient to perform multiple replicate analyses with Abraxis Assays kits. The filter container will hold up to several mL of filtrate if additional extract volume is desired. The filtrate containing the extracted glyphosate should be transferred to glass vials with Teflon stoppers.

5. *Alternative to Filtration*

- 5.1 Allow sample to stand for about 10-15 minutes, then remove 0.5-1.0 mL of the solution being careful as to not disturb the soil. Samples can also be centrifuged.
- 5.2 Store sample in glass vials with Teflon stoppers.

• Dilution Procedure

Dilute the extract (at least 1:50) as follows with the appropriate Assay Sample Diluent or distilled water using serological pipets:

<u>dilution</u>	<u>dilution volumes</u>
1:50	50 μ L extract + 2.45 mL diluent
1:500	50 μ L extract plus 25 mL diluent

ANALYSIS Analyze the diluted extract as the "sample" according to the package insert of the ABRAXIS Atrazine, Metolachlor Assay.

INTERPRETATION

Calculate the pesticide concentration in the soil by multiplying the assay result by the appropriate factors introduced by the procedure:

EXAMPLE 1: For a soil sample containing pesticide and weighing 10.0 grams, using a 1:50 dilution and giving an assay result of 2.5 ppb:

Assay result (ppb) x $\frac{\text{vol. Extractant (mL)}}{\text{wt. of soil (g)}}$ x dilution factor*

Assay result (ppb) x $\frac{30}{\text{wt. of soil (g)}}$ x dilution factor* =

concentration of pesticide in soil (ppb)

2.5 ppb x $\frac{30}{10}$ x 50* = 375 ppb = concentration of pesticide in soil

NOTE: If the assay result is labeled "nd" (non-detectable) or if the result is less than the concentration of STANDARD 1, do not multiply the result. Report the result for this sample as not detectable.

EXPECTED RESULTS When soil samples are extracted according to the procedure described above, average recoveries for Atrazine 92%, Metolachlor 90%. However, recoveries will depend on soil type, mechanism of retention of the pesticide, length of extraction period, etc.

TECHNICAL ASSISTANCE

ABRAXIS LLC
54 Steamwhistle Drive
Warminster, PA 18974
Phone: (215) 357-3911
Fax: (215) 957-6402
Email: info@abraxiskits.com
WEB: www.abraxiskits.com

Bilag 2 Oversigt over immunoassays i litteraturen med tilknyttede detektionsgrænser

I nedenstående tabeller ses en samlet oversigt over, hvilke immunoassays der findes til pesticider jf. hhv. Dankwardt (2001) for data frem til 2001, samt Goel (2013) for data frem til 2013. Af oversigten fremgår tillige detektionsgrænser for de enkelte metoder. De fleste af de nævnte analyser er dog analyser af pesticider i vand, og de fleste af detektionsgrænserne er altså rettet mod analyser af vandprøver (eller andre prøver på flydende form såsom fx juice). De oprindelige tabeller kan ses i hhv. Dankwardt 2001 og Goel 2013, hvoraf det også fremgår, hvilke oprindelige kilder, de enkelte immunoassays er citeret i.

Pesticides	Test format	Ab	Range, DL, or middle of test (IC ₅₀)
Herbicides			
Alachlor	EIA	p	0.2–8 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.1–10 µg L ⁻¹
Amitrole	EIA	p, m	0.2–8 µg L ⁻¹
	EIA	p	1.7–4200 µg L ⁻¹
Atrazine	CLIA	p	25–500 ng L ⁻¹
	EIA	p	0.5–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.01 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	m	0.03–1 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.2–100 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.011–33 µg L ⁻¹
	EIA	m	0.05–3 µg L ⁻¹
	EIA	p, m	0.1–100 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.5–10 µg L ⁻¹
	EIA	m	0.05 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	m	0.01–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.03–3 µg L ⁻¹
	EIA	p	1–1000 ng L ⁻¹
Bentazon	EIA	p	2–24 µg L ⁻¹
Bromacil	EIA	p	0.1–160 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.01–1 µg L ⁻¹
Chlorodiamino-s-triazine	EIA	p	160–480 µg L ⁻¹
Chlorsulfuron	EIA	p	0.1 µg L ⁻¹ (DL)
Clomazone	EIA	p	2–250 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.5–500 µg L ⁻¹
Cyanazine	EIA	p	0.035–3 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.5 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.5 µg L ⁻¹ (DL)
Diethylatrazine	EIA	p	0.01–100 µg L ⁻¹
Diclofop-methyl 2,4-D	EIA	p	10–75 µg L ⁻¹
	EIA	p	50–5000 µg L ⁻¹
	EIA	m	2–20 µg L ⁻¹
	RIA	p	0.1–10 mg L ⁻¹
	EIA	p	0.05–10 mg L ⁻¹
	RIA	p	5–250 µg L ⁻¹
	PFIA	m	0.6 µg L ⁻¹ (DL)
	RIA	p	1–1000 µg L ⁻¹
	EIA	m	0.096 µg L ⁻¹ (DL)
	PFIA	p	0.01–100 µg mL ⁻¹
Dichlorprop	PFIA	p	0.01–100 µg mL ⁻¹
Diuron	EIA	m	2 µg L ⁻¹ (IC ₅₀)
	EIA	p	0.05–1 µg L ⁻¹
Hexazinone	EIA	p	0.22–17.6 µg L ⁻¹
Hydroxyatrazine	EIA	m	0.03–1 µg L ⁻¹
	EIA	m	0.05 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.01–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	3–300 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.5–32 µg L ⁻¹
Imazamethabenz	EIA	p	0.45–25 µg L ⁻¹
Imazaquin	EIA	p	0.01–10 µg L ⁻¹
	EIA	m	20–250 µg L ⁻¹
	EIA	NA	0.02–1 µg L ⁻¹
Isoproturon	EIA	m	0.01–11 µg mL ⁻¹
Maleic hydrazide	EIA	m	0.03–0.9 µg L ⁻¹
MCPB	EIA	p	10–1000 ng L ⁻¹
Metazachlor	EIA	p	

Pesticides	Test format	Ab	Range, DL, or middle of test (IC ₅₀)	
Methabenzthiazuron	EIA	p	0.05–10 µg L ⁻¹	
Metolachlor	EIA	m	0.05–10 µg L ⁻¹	
Molinate	EIA	p	0.05–5 µg L ⁻¹	
	EIA	p	6 µg L ⁻¹ (IC ₅₀)	
	EIA	p	3–2000 µg L ⁻¹	
Monuron (Diuron)	EIA	p	10–500 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.08–5 µg L ⁻¹	
Monuron (Diuron, Linuron)	EIA	p	0.05–5 µg L ⁻¹	
Norflurazon	EIA	p	1–1000 µg L ⁻¹	
Paraquat	RIA	m	0.46–165 µg L ⁻¹	
	FIA	p	20–2000 µg L ⁻¹	
	RIA	p	1–100 µg L ⁻¹	
	EIA	p	20–200 ng L ⁻¹	
	RIA	p	50–1600 µg L ⁻¹	
	EIA	m	10–100 µg L ⁻¹	
	EIA	m	0.8–12 µg L ⁻¹	
	EIA	p	20 ng L ⁻¹ (DL)	
	EIA	p	1–100 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.1–27 µg L ⁻¹	
	Picloram	EIA	m	1–200 µg L ⁻¹
		EIA	p	5–5000 µg L ⁻¹
RIA		p	0.05–5 mg L ⁻¹	
Propazine	EIA	m	0.02–3 µg L ⁻¹	
Simazine	EIA	p	0.1–10 µg L ⁻¹	
	PFA	p	3–1000 µg L ⁻¹	
Terbuthylazine	EIA	p	0.05–10 µg L ⁻¹	
	EIA	m	0.14–10 µg L ⁻¹	
Terbutryn	EIA	m	0.05–1 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.1–600 µg L ⁻¹	
Thiobencarb	EIA	m	0.1–10 µg L ⁻¹	
	EIA	p	20–1000 µg L ⁻¹	
Triasulfuron	EIA	p	0.004–40 µg L ⁻¹	
	EIA	m	0.01–1 µg L ⁻¹	
2,4,5-T	RIA	p	1–1000 µg L ⁻¹	
Trifluralin	EIA	p	0.1–1 mg L ⁻¹	
Insecticides				
Aldicarb	EIA	p	0.3–40 µg L ⁻¹	
	EIA	p	1–100 µg L ⁻¹	
Aldrin	RIA	p	0.7–35 ng	
Azinphos-methyl	EIA	m	0.4–20 µg L ⁻¹	
S-Bioallethrin	EIA	m	1–250 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.8–28 µg L ⁻¹	
	RIA	p	0.03–3 µg	
	EIA	p	0.01–100 mg L ⁻¹	
Bioresmethrin	EIA	p	50–10 000 µg L ⁻¹	
Carbaryl	EIA	m	0.02–20 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.05–10 µg L ⁻¹	
Carbofuran	EIA	p	0.056–5 µg L ⁻¹	
Chlorpyrifos	EIA	m	2–45 µg L ⁻¹	
DDA	EIA	p	10–100 µg L ⁻¹	
DDT	EIA	m	2–11 nM L ⁻¹ (IC ₅₀)	
Dieldrin	RIA	p	0.08–38 ng	
Diflubenzuron	EIA	p	0.5–15 µg L ⁻¹	
Endosulfan	EIA	p	3–400 µg L ⁻¹	
	EIA	p	0.2–10 µg L ⁻¹	
	EIA	p	3–500 µg L ⁻¹	

Pesticides	Test format	Ab	Range, DL, or middle of test (IC ₅₀)
Fenitrothion	EIA	p, m	1–1000 µg L ⁻¹
Chlorpyrifos	EIA	p	0.05–2.5 µg L ⁻¹
Heptachlor	EIA	m	10–200 µg L ⁻¹
Methoprene	EIA	p	0.1–100 µg L ⁻¹
	EIA	p	1–10 µg L ⁻¹
1-Naphthol	EIA	p	10–1000 µg L ⁻¹
Parathion	RIA	p	100 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.1 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.1–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.2 µg L ⁻¹ (DL)
Paraoxon	EIA	m	10–100 µg mL ⁻¹
	RIA	p	0.2–19 ng L ⁻¹
	EIA	p	28–275 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.03 µg L ⁻¹ –275 mg L ⁻¹
PCP	EIA	p	0.3–150 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.1–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	25 µg L ⁻¹ (DL)
Permethrin	EIA	p	10–6000 µg L ⁻¹
	EIA	m	15–100 µg L ⁻¹
	EIA	m	1.5–90 µg L ⁻¹
Pyrimiphos-methyl	EIA	p	30 µg L ⁻¹ (DL)
Quassin	EIA	p	0.05–3 µg L ⁻¹
3,5,6-Trichloro-2-pyridinol	EIA	m	0.25 µg L ⁻¹
Fungicides			
Benomyl	EIA	m	0.1–1 µg L ⁻¹
	PFIA	p	0.1–10 µg L ⁻¹
	RIA	p	1.25 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.38 µg L ⁻¹ (DL)
	EIA	p	0.35 µg L ⁻¹ (DL)
Benzimidazole	EIA	m	1–20 µg L ⁻¹
Captan	EIA	p	1–200 µg L ⁻¹
Chlorothalonil	EIA	p	0.07 µg L ⁻¹ (DL)
Fenpropimorph	EIA	p	0.1–0.8 µg L ⁻¹
Iprodione	EIA	p	0.1–10 mg kg ⁻¹
Metalaxyl	EIA	p	0.06–1 µg L ⁻¹
Myclobutanil	EIA	p	0.5–50 mg L ⁻¹
Procymidone	EIA	p	1 µg L ⁻¹ (DL)
Thiabendazole	EIA	m	0.5–10 µg L ⁻¹
	EIA	p	0.03–0.5 µg L ⁻¹
Triadimefon	EIA	p	2 µg L ⁻¹ (DL)
Triazole	EIA	p	10–1200 µg L ⁻¹

MCPB, 4-(4-chloro-2-methylphenoxy)butyric acid; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; bis(*p*-chlorophenyl)acetic acid; DDT, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; PCP, pentachlorophenol. NA, not available.

Pesticide	Antibody used	LOD
Chlorpyrifos	pAb	0.1 ng/mL
Bromophos-ethyl	pAb	1.0 ng/mL
Deltamethrin	pAb	1.1 ± 0.5 µg/L
2-(2,4,5 trichloro phenoxy) propionic acid	pAb	0.05 µg/L
Isofenphos	pAb	70 ng/mL
Bromophos	pAb	7 ng/mL
Fenitrothion	pAb	0.3 ng/mL
Fenthion	pAb	0.1 µg/L
Acephate	pAb	2 ng/mL
Fenthion	pAb	0.03 ng/ml
Isoproturon	pAb	0.1 µg/L
	mAb	0.003 µg/L
Cypermethrin	pAb	1.3 ± 0.5 µg/L
Chlorpyrifos	pAb	0.3 ng/mL
Cyhalothrin	pAb	4.7 µg/L
Pirimiphos-methyl	mAb	0.07 ng/mL
Imidacloprid	pAb	30 ng/mL
Triazophos	mAb	0.02 µg/L
Pentachloronitrobenzene	pAb	7 ng/mL
Triazophos	mAb	0.36 to 7.89 ng/mL
Carbofuran	mAb	1.89 to 45.95 ng/mL
2,4-dinitroaniline	mAb	0.05±0.03 µg/L
2,6-dinitroaniline	mAb	0.11±0.08 µg/L
O-ethyl o-4-nitrophenyl phenyl phosphonothioate	pAb	0.9 ng/mL
fenazaquin	pAb	1.8 ng/mL
Parathion	pAb	0.15 ng/mL
Deltamethrin	mAb	1.2±1.3 ng/mL
EPN	mAb	0.09 ng/mL
Atrazine	pAb	0.1 ng/mL
Chlorpyrifos	mAb	0.1 ng/mL
Pretilachlor	pAb	6.9 ng/L
Imidaclothiz	mAb	0.0178 ± 0.0018 mg/L
Triazophos	mAb	0.063 ng/mL
Imidacloprid	pAb	0.03-0.16 ng/mL

Feltmetoder til bestemmelse af pesticider i jord

Det er undersøgt, hvilke metoder og teknikker der findes til bestemmelse af pesticider i jordprøver i felten. De mest lovende metoder er fundet at være baseret på ELISA-teknikken (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Der vurderes at være behov for en afprøvning af konkrete ELISA-metoder, således at den praktiske anvendelighed og resultaternes brugbarhed ved konkrete undersøgelser af punktkilder med pesticider kan vurderes.



Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K

www.mst.dk