



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

TRIAFUNG

Triazolfungiciders persistens, akkumulering og omdannelse til 1,2,4-triazol i jord

Bekæmpelsesmiddel-
forskning nr. 215

August 2023

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion: Anders R. Johnsen, GEUS

Tekst:

Anders R. Johnsen,

Christian N. Albers,

Nora Badawi,

Ulla E. Bollmann,

De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (GEUS)

Fotos: GEUS

ISBN: 978-87-7038-532-9

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

1.	Forord	6
2.	Sammenfatning	7
3.	Summary	9
4.	Introduktion	11
4.1	1,2,4-triazol i Pesticidvarslingsprogrammet	11
4.2	Modelstoffer	13
4.3	Aging og biotilgængelighed	18
4.4	Naturlig dannelse af 1,2,4-triazol?	20
4.5	Arbejdshypoteser og forsøg	21
5.	Materialer og metode	23
5.1	Kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer i vand og jord	23
5.1.1	Ekstraktion og analyse	23
5.1.2	Vandprøver	25
5.1.2.1	Analyse af vandprøver ved direkte injektion	25
5.1.2.2	Opkoncentrering ved fastfaseekstraktion (SPE) – kun til analyse af nedbrydningsprodukter	25
5.1.3	Jordprøver	25
5.1.3.1	Prøveforberedelse	25
5.1.3.2	Ekstraktion af jord - kombination af ultralyd- og rysteeekstraktion	26
5.1.4	Analyse på UPLC-MS/MS	26
5.1.4.1	Analysemetode 1: Moderstoffer	26
5.1.4.2	Analysemetode 2: Nedbrydningsprodukter	27
5.1.5	Validering, detektionsgrænser og kvalitetssikring	28
5.1.6	HRMS suspect screening af jordprøver for gamle moderstoffer og moderstoffernes nedbrydningsprodukter	28
5.2	Feltforsøg til bestemmelse af naturlig dannelse af 1,2,4-triazol	30
5.2.1	Installation af sugeceller ved Svanholm Gods, april 2020	30
5.2.2	Installation af sugeceller i Tisvilde Hegn, maj/juni 2020	31
5.2.3	Drift af sugeceller	34
5.2.4	Jordprøver - overfladejord	34
5.2.5	Ekstraktion og analyse af jordprøver	35
5.2.6	HRMS suspect screening af jordprøver for gamle moderstoffer og kendte nedbrydningsprodukter	35
5.2.7	Indsamling og analyse af nedbørsprøver	35
5.2.8	Moderstoffer i halm, kompost, kokasser og friske nåle	35
5.3	Laboratorieforsøg til belysning af potentiel 1,2,4-triazol udvaskning fra bejdset såsæd og test for omdannelse af prothioconazol, florasulam og pyroxsulam til 1,2,4-triazol.	37
5.3.1	Forsøgsopstilling	37
5.3.2	Fremstilling af gødningsvand til perkolering og vanding:	38
5.3.3	Prøvetagning af jord i søjlerne senest dagen efter sidste perkolering (delforsøg A og B)	39

5.3.4	Ekstraktion af jordprøver (delforsøg A og B)	39
5.4	Feltforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i pløjelaget	40
5.4.1	Primær prøvetagning af VAP-markernes pløjelag	40
5.4.2	Oparbejdning i laboratoriet	40
5.4.3	Bestemmelse af moderstoffernes total-koncentrationer.	40
5.4.4	Bestemmelse af moderstoffernes aged sorption	40
5.4.5	Bestemmelse af moderstoffernes biotilgængelige fraktioner	41
5.4.6	HRMS suspect screening af jordprøver for moderstoffer og kendte nedbrydningsprodukter	41
5.5	Moderstoffers nedbrydning og aging i laboratorieforsøg	42
5.5.1	Forsøgsopstilling	42
5.5.2	Sekventiel ekstraktion	42
5.5.3	Test for vandig hydrolyse ved forskellig pH	43
6.	Metodeudvikling: Udvikling, implementering og validering af metoder til ekstraktion og kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer	44
6.1	Matrix til udvikling og validering samt fremstilling af kalibreringsstandarder	44
6.2	Udvikling og validering: Analysemetoderne	44
6.2.1	Moderstoffer	44
6.2.2	Små, polære nedbrydningsprodukter	45
6.3	Udvikling og validering: Ekstraktion og opkoncentrering af vandprøver	47
6.3.1	Én metode til alle stoffer? – valg af kolonnemateriale	47
6.3.2	Én metode til alle stoffer? – kombination Strata-XCW (moderstoffer) + Hypercarb (nedbrydningsprodukter)	48
6.3.3	Solvent-skift til analysen	49
6.3.4	SPE-metodeoptimering: moderstoffer	50
6.3.5	SPE-metodeoptimering: nedbrydningsprodukter	50
6.3.6	SPE-metode validering: nedbrydningsprodukter	51
6.4	Krydsvalidering: sammenligning SPE vs. direkte injektion, samt interlaboratorie-sammenligning	52
6.5	Udvikling og validering: Ekstraktion af jordprøver	53
6.5.1	Opløsningsmiddel, ekstraktionstid	53
6.5.2	Hvor tabes stofferne?	54
6.5.3	Metodevalidering	54
6.5.4	Ekstraktion af prothioconazol	55
6.5.5	Ekstraktion af bound residues i naturligt ældede jorde	55
7.	Metodeudvikling: Bestemmelse af ældede 1,2,4-triazol moderstoffers biotilgængelige koncentrationer i jord	57
7.1.1	Centrifugering – optimering af nedspinning af kolloider	58
7.1.2	Genfinding af friskt tilsat moderstof.	58
7.1.3	Overførsel af HPCD-ekstraheret moderstof til organisk solvent.	59
7.1.4	Kinetikekstraktion af biotilgængelig fraktion i naturligt ældede jorde.	60
8.	Resultater og diskussion: Undersøgelse af naturlig dannelse og nedsivning af 1,2,4-triazol i naturområder og økologiske marker	65
8.1	Karakterisering af jorden på de forskellige lokaliteter	66
8.2	Laboratorietest af triazolmetabolitters stabilitet i vandig opløsning.	67
8.3	1,2,4-triazol i porevand fra sugecellerne	67
8.4	Analyse for 1,2,4-triazol-metabolitter i porevand fra sugecellerne	71
8.5	Analyse af jorden over sugecellerne	71
8.6	Atmosfærisk deposition, analyse af nedbør og grannåle fra Tisvilde Hegn for 1,2,4-triazol og 1,2,4-triazol-metabolitter	71

8.7	Atmosfærisk deposition, triazol-fungicider i NOVANA	72
8.8	Analyse af halm, gødning/kompost og friske kokasser fra Svanholm Gods	73
9.	Resultater og diskussion: 1,2,4-triazol udvaskning fra bejdset udsæd og test for omdannelse af prothioconazol, florasulam og pyroxsulam til 1,2,4-triazol	74
9.1	1,2,4-triazol-udvaskning i søjleforsøg	74
9.2	Florasulam og pyroxsulam	76
9.3	Moderstoffernes fordeling og mobilitet i søjleforsøget	76
9.4	Opgørelse af bejdsemidler med moderstoffer til 1,2,4-triazol	78
10.	Resultater og diskussion: Feltforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i pløjelaget	80
10.1	Triazolfungicidernes akkumulering i jorden	80
10.2	Moderstoffernes aging og biotilgængelighed	83
10.3	Nedbrydning, aging og biotilgængelighed efter sprøjtning	85
10.4	HR-MS suspect screening - test for akkumulering af gamle moderstoffer og intermediære nedbrydningsprodukter	89
11.	Resultater og diskussion: Laboratorieforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i jord	91
11.1	Triazolfungicidernes nedbrydning	91
11.2	Test for vandig hydrolyse	96
11.3	Sammenligning af K _{oc} med EFSA-parametre og mellem de forskellige jorde	97
11.4	Aged sorption	98
11.5	Biotilgængelighed	99
11.6	Ikke-tilgængelig fraktion og nedbrydning	103
12.	Samlet diskussion	105
12.1	Hypotese I: Naturlig dannelse af 1,2,4-triazol?	105
12.2	Hypotese II: 1,2,4-triazol-udvaskning fra bejdsemidler?	106
12.3	Hypotese III: 1,2,4-triazol-udvaskning fra atypiske moderstoffer?	107
12.4	Hypotese IV: Moderstoffers akkumulering i pløjelaget.	107
12.5	Konklusion	108
13.	Referencer	109
	Bilag 1. Udvasning af 1,2,4-triazol inden sprøjtning i VAP	115
	Bilag 2. Udvikling, implementering og validering af metoder til ekstraktion og kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer	117
	Bilag 3. HPCD-genfindning af friskt tilsat ¹⁴C-tebuconazol	124
	Bilag 4. Test for triazolmeta-bolitters stabilitet i vandig opløsning i milli-Q-vand og sugecellevand.	125
	Bilag 5. Kemisk karakterisering af sugecelle-vand	126
	Bilag 6. Analyseret mængde sugecellevand på forskellige prøvetagningsdage	127
	Bilag 7. Triazol-fungiciders ældning i pløjelaget	128
	Bilag 8. Tebuconazols, difenoconazols og metconazols nedbrydning og aging i laboratorieforsøg	132
	Bilag 9. Vandig hydrolyse	135
	Bilag 10. Laboratorieforsøg til bestemmelse af triazol-moderstoffernes aging: Sammenligning af forsøgsbetingelserne og anbefalinger i guidelines	138

1. Forord

Projektet "TRIAFUNG – Triazolfungiciders persistens og akkumulering i jord og omdannelse til 1,2,4-triazol" er finansieret af Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning (J.nr. 667-00200). Projektet er gennemført ved De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (GEUS), Geokemisk Afdeling.

Tak til Varslingssystem for udvaskning af pesticider til grundvand (VAP) for adgang til prøvetagning af pløjelaget på markerne i Estrup, Fårdrup, Jydevad og Lund. Specielt tak til Eline Bojsen Haarder for hjælp med VAP-data for drænvand og grundvand. Tak til Svanholm Gods for at vi måtte installere sugeceller ved deres marker og naturområder og for at være behjælpelige med viden om arealernes anvendelse over de sidste 40 år. Vi vil også gerne takke Spire Maja Kiersgaard for teknisk hjælp i laboratoriet.

Projektet har været fulgt og kommenteret af en følgegruppe under Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning. Følgende medlemmer af følgegruppen har reviewet rapporten: Signe Rasmussen (Miljøstyrelsen), Bolette Palle Neve (Dansk Planteværn) og Jacob Neergaard (Landbrug og Fødevarer).

2. Sammenfatning

Indledning. 1,2,4-triazol dannes i landbrugsjord ved nedbrydning af en række triazol-fungicider. I Pesticidvarslingsprogrammet (VAP) blev 1,2,4-triazol i 2015 overraskende påvist i drænvand og det øvre grundvand under marker, der ikke var sprøjtet med triazolfungicider i flere år. Fundene kunne muligvis skyldes overraskende høj udvaskning fra ældre triazol-fungicidsprøjtninger, men der var også en række andre mulige kilder såsom naturlig dannelse af 1,2,4-triazol i landbrugsjord, udvaskning fra brug af triazol-fungicider i bejdsemidler, dannelse fra pesticider, der ikke har en simpel 1,2,4-triazol-sidegruppe, samt diffuse antropogene kilder. Det var derfor vigtigt at undersøge, hvad kilden var til 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand, hvad der sker med triazol-fungicider, der sprøjtes på markerne, og hvor længe efter sprøjtning der er risiko for udvaskning af 1,2,4-triazol.

Pesticidstoffer ældes i jord, på engelsk "aging", hvorved stofferne i stigende grad bliver utilgængelige for mikrobiel omdannelse og efterfølgende udvaskning af nedbrydningsprodukter. Vi testede effekterne af triazol-fungicidernes aging ved at måle ændringer i stoffernes sorption (aged sorption, stigende K_d) og biotilgængelighed over tid. Først udviklede og validerede vi metoder til kvantificering af projektets modelstoffer. Metodeudviklingen var specielt vigtig for 1,2,4-triazol, da der ved projektets start ikke fandtes validerede og robuste metoder med tilstrækkelig lav detektionsgrænse i den videnskabelige litteratur. Derefter tilpassede og testede vi en metode til bestemmelse af hydrofobe stoffers biotilgængelighed i jord, metoden bygger på triazolfungiciders kompleksering med hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD).

Naturlig dannelse af 1,2,4-triazol? Vi installerede sugeceller i tre naturtyper og på fire økologiske landbruglokaliteter. Der kunne ikke påvises 1,2,4-triazol i jordvand fra naturområderne, vi har derfor ikke kunnet bekræfte en baggrund af naturligt forekommende 1,2,4-triazol i naturområder. Tre af de fire økologiske landbrugslokaliteter indeholdt 1,2,4-triazol i jordvandet i koncentrationsområdet 0,005-0,015 µg/l. Konventionel halm, der er bragt ud som husdyrgødning på to af de tre marker, indeholdt op til flere hundrede µg/kg af tebuconazol, epoxiconazol og prothioconazol-desthio. Enkelte fund af 1,2,4-triazol under landbrugsarealer kan derfor skyldes diffuse antropogene kilder såsom husdyrgødning indeholdende konventionel halm fra sprøjtede afgrøder, muligvis kombineret med atmosfærisk deposition. Generelt kunne vi ikke sandsynliggøre naturlig dannelse i de økologiske marker, men på én lokalitet (våd eng) var der et mindre, uforklaret bidrag, hvor naturlig dannelse ikke kunne udelukkes.

Bejdsemidler og atypiske triazol-moderstoffer. Laboratorieforsøg med bejdset udsæd er gennemført for at afklare, om bejdset udsæd vil kunne bidrage til udvaskningen af 1,2,4-triazol og den akkumulerede pulje af triazol-moderstoffer i landbrugsjord. Forsøget viste stor risiko for udvaskning af 1,2,4-triazol fra bejdset udsæd med et estimeret årlig middelbidrag på op til 0,004–0,02 µg/L i det øvre grundvand. Vi anbefaler, at triazolfungicider i bejdset udsæd bør medregnes, ved beregning af den årlige, samlede markbelastning med triazolfungicider. Bidrag fra bejdset udsæd er desuden en sandsynlig årsag til nogle af de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i drænvandet på VAP-marker.

I et lignende forsøg testede vi om prothioconazol, florasulam og pyroxsulam, tre pesticider der ikke har en simpel 1,2,4-triazolgruppe, kan omdannes til frit 1,2,4-triazol i jorden. Prothioconazol viste udvaskning af 1,2,4-triazol, sprøjtning og bejdsning med prothioconazol er derfor et sandsynligt bidrag til nogle af de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i drænvandet på VAP-markerne. Vi påviste ikke 1,2,4-triazol-udvaskning fra florasulam og pyroxsulam, men 1,2,4-triazolsulfonsyre blev påvist i koncentrationer op til 1,5 µg/l fra florasulam.

Sorption, biotilgængelighed og persistens. Fire VAP-marker blev prøvetaget over to år for at undersøge, hvor hurtigt triazolfungiciderne forsvinder i pløjelaget. På Estrup steg indholdet af metconazol fra ikke-målbart til 32 µg/kg efter sprøjtning og stoffet havde høj biotilgængelighed. Koncentrationen faldt derefter til et lavt men konstant niveau på ca. 5 µg/kg med kun 10% biotilgængelighed, der var altså opbygget en persistent metconazol-pulje i jorden. Sprøjtning med prothioconazol gav lignende resultater, bortset fra at koncentrationerne faldt tilbage til baggrundsniveauet.

Flere stoffer var sprøjtet på markerne længe inden de blev påvist. På Estrup var der fx 3,1 µg/kg propiconazol 19 år efter seneste sprøjtning og 6,6 µg/kg epoxiconazol 14 år efter seneste sprøjtning. De højeste koncentrationer var for epoxiconazol i Jyndevad og Lund, men også tebuconazol og propiconazol forekom i varierende koncentrationer. I syv ud af 16 tilfælde kunne vi ikke påvise signifikant nedbrydning, hvilket skyldtes de ældede stoffers meget lave biotilgængelighed. De ældede triazol-fungicider var så hårdt bundne i jordene, at vi ikke kunne måle aged sorption. HPCD-ekstraktion af den biotilgængelige fraktion viste, at der i VAP-jordene er en biotilgængelig løst-bundet fraktion, der er i diffusiv kontakt med vandfasen og kan ekstraheres ved kompleksering med HPCD, og en ikke-tilgængelig fraktion som ikke kan udveksles med vandfasen under HPCD-ekstraktionen og hvis nedbrydning er meget langsom. Nedbrydningskinetikken i jorden følger derfor ikke simpel 1. ordens kinetik, men flader med tiden ud på et lavt niveau med meget langsom nedbrydning. Dette ses fx efter sprøjtning med metconazol. Når triazolfungiciderne er "naturligt" ældede i pløjelaget over en årrække er den biotilgængelige fraktion ganske lille og nedbrydningen tilsvarende langsom. Konceptuelt er det sandsynligt, at forskellene i nogen grad skyldes binding til to forskellige fraktioner af organisk stof med meget forskellig desorptionskinetik, hvilket kan opfattes som dobbelt første-ordens nedbrydning.

I et supplerende laboratorieforsøg undersøgte vi fem triazol-fungiciders nedbrydning og ældning i tre økologiske jorde under kontrollerede betingelser, men samtidig under mindre realistiske betingelser end på VAP-markerne. Tebuconazol, epoxiconazol, metconazol og difenoconazol blev nedbrudt meget langsomt, hvorimod propiconazol viste betydelig nedbrydning, specielt i en sandjord. De fem triazol-fungicider udviste aged sorption i de tre jorde med stigende sorptionskoefficient (K_d) i løbet af de første ca. 100 dage. Samtidig steg den ikke-biotilgængelige koncentration.

Konklusion: Resultaterne fra feltforsøget og laboratorieforsøget kan forklare de ældede triazol-fungiciders akkumulering og persistens i VAP-markerne længe efter sprøjtning. Efter sprøjtning vil det meste triazol-fungicid sandsynligvis nedbrydes i overjorden, men en fraktion kan bindes meget hårdt i pløjelaget med meget lav biotilgængelighed og kan derfor ophobes efter gentagne sprøjtninger. Langsom, men kontinuert nedbrydning af det ældede triazol-fungicid kan bidrage til de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand på VAP-marker, hvor der ikke for nyligt var sprøjtet med triazol-moderstoffer. Denne effekt skal lægges til udvaskning af 1,2,4-triazol fra bejdset udsæd, bidraget fra moderstoffernes atmosfæriske deposition, diffuse bidrag fra halm (fra fungicid-sprøjtede afgrøder) i husdyrgødning og muligvis også et lille bidrag fra naturlig dannelse. Samlet set er det derfor ikke overraskende, at der var et forholdsvis højt indhold af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand under VAP-markerne inden sprøjtning med specifikke triazol-fungicider.

3. Summary

Introduction. 1,2,4-triazole is formed in agricultural soil by the degradation of triazole fungicides. In the Danish Pesticide Leaching Assessment Programme (PLAP), 1,2,4-triazole was surprisingly detected in 2015 in drainage water and the upper groundwater in fields that had not been sprayed with triazole fungicides for several years. This might be due to surprisingly high leaching from older triazole fungicide sprayings, but there were also other possible sources such as natural formation of 1,2,4-triazole in agricultural soil, leaching from the use of triazole fungicides as seed dressing, formation from pesticides that do not have a simple 1,2,4-triazole side-group, as well as diffuse anthropogenic sources. It therefore was important to answer where 1,2,4-triazole in drainage and groundwater comes from, what happens to triazole fungicides that are sprayed on the fields, and how long after spraying there is a risk of leaching of 1,2,4-triazole.

Pesticides age in soil whereby they become increasingly unavailable for microbial transformation and subsequent leaching of degradation products. We tested the effects of triazole fungicide aging by measuring changes over time in sorption (aged sorption, increasing K_d) and bioaccessibility. First, we developed and validated methods for quantifying the project's model compounds. Method development was particularly important for 1,2,4-triazole, as there were no validated and robust methods with a sufficiently low detection limit in the scientific literature at the start of the project. Then we adapted and tested a method for determining the bioaccessibility of hydrophobic substances in soil, the method is based on complexation of triazole fungicides with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD).

Natural formation of 1,2,4-triazole? We installed suction cups in three nature types and four organic agricultural fields. 1,2,4-triazole was not detected in soil-water from the nature stations, but three of the four organic agricultural stations contained 1,2,4-triazole in the concentration range 0.005-0.015 µg/l in the soil water. Conventional straw applied to two of the three fields as livestock manure contained up to several hundred µg/kg of tebuconazole, epoxiconazole and prothioconazole-desthio. Some findings of 1,2,4-triazole under agricultural areas might therefore be due to diffuse anthropogenic sources such as livestock manure containing conventional straw from sprayed crops, possibly combined with atmospheric deposition. In general, we could not confirm natural formation in the organic fields, but at one location (wet meadow) there was a small, unexplained contribution where natural formation could not be ruled out.

Seed dressing and atypical triazole parent compounds. Laboratory experiments with coated seed were carried out to test whether seed dressing may contribute to the leaching of 1,2,4-triazole and the accumulated pool of triazole parent compounds in agricultural soil. The experiment demonstrated a high risk of leaching of 1,2,4-triazole from coated seed with an estimated annual mean contribution of up to 0.004–0.02 µg/l in the upper groundwater. We recommend that triazole fungicides in seed dressing should be included when calculating the annual total field load with triazole fungicides. Contribution from coated seed is also a likely cause for some of the "unexplained" findings of 1,2,4-triazole in drainage water from the PLAP fields.

In a similar experiment, we tested whether prothioconazole, florasulam and pyroxsulam, three pesticides that do not have a simple 1,2,4-triazole sidegroup, could be converted to 1,2,4-triazole in the soil. Prothioconazole led to 1,2,4-triazole leaching, it is therefore likely, that spraying and seed dressing with prothioconazole contributed to some of the "unexplained" findings of 1,2,4-triazole in the PLAP drainage water. We did not detect 1,2,4-triazole from florasulam or pyroxsulam, but 1,2,4-triazolesulphonic acid was detected in concentrations up to 1,5 µg/l from florasulam.

Sorption, bioaccessibility and persistence. Four PLAP fields were sampled over two years to investigate how fast triazole fungicides disappear in the plow layer. At Estrup, the content of metconazole increased from non-detectable to 32 µg/kg after spraying and with high bioaccessibility. The concentration then dropped to a low but constant level of approx. 5 µg/kg with only 10% bioaccessibility, so a persistent metconazole pool had built up in

the soil. Spraying with prothioconazole produced similar results, except that concentrations dropped to background levels.

Several triazole-fungicides were sprayed on the fields long before they were detected. At Estrup, for example, there was 3.1 µg/kg propiconazole 19 years after the last spraying and 6.6 µg/kg epoxiconazole 14 years after the last spraying. The highest concentrations were for epoxiconazole at Jyndevad and Lund, but also tebuconazole and propiconazole occurred in varying concentrations. In seven out of 16 cases, we could not detect significant degradation, which was due to the very low bioaccessibility of the aged fungicides. The aged triazole fungicides were so tightly bound in the soils, that we could not estimate aged sorption. HPCD extraction of the bioaccessible fraction showed that in the PLAP soils there is a bioaccessible, loosely bound fraction that is in diffusive contact with the water phase and can be extracted by complexation with HPCD, and a non-bioaccessible fraction that cannot be exchanged with the water phase during the HPCD extraction and whose degradation is very slow. The degradation kinetics in the soil therefore do not follow simple first-order kinetics, but level out over time at a low concentration with very slow degradation. This was seen, for example, after spraying with metconazole. When the triazole fungicides are "naturally" aged in the plow layer over several years, the bioaccessible fraction is small and the degradation correspondingly slow. Conceptually, it is likely that the differences are to some degree due to binding to two different fractions of organic matter with very different desorption kinetics, which may be thought of as double first-order degradation.

In a supplementary laboratory experiment, we investigated the degradation and aging of five triazole fungicides in three organic soils under controlled conditions, but at the same time under less realistic conditions than in the PLAP fields. Tebuconazole, epoxiconazole, metconazole and difenoconazole degraded very slowly, whereas propiconazole showed significant degradation, especially in a sandy soil. The five triazole fungicides showed aged sorption in the three soils with an increasing sorption coefficient (K_d) during the first approx. 100 days. At the same time, the non-bioaccessible concentration increased.

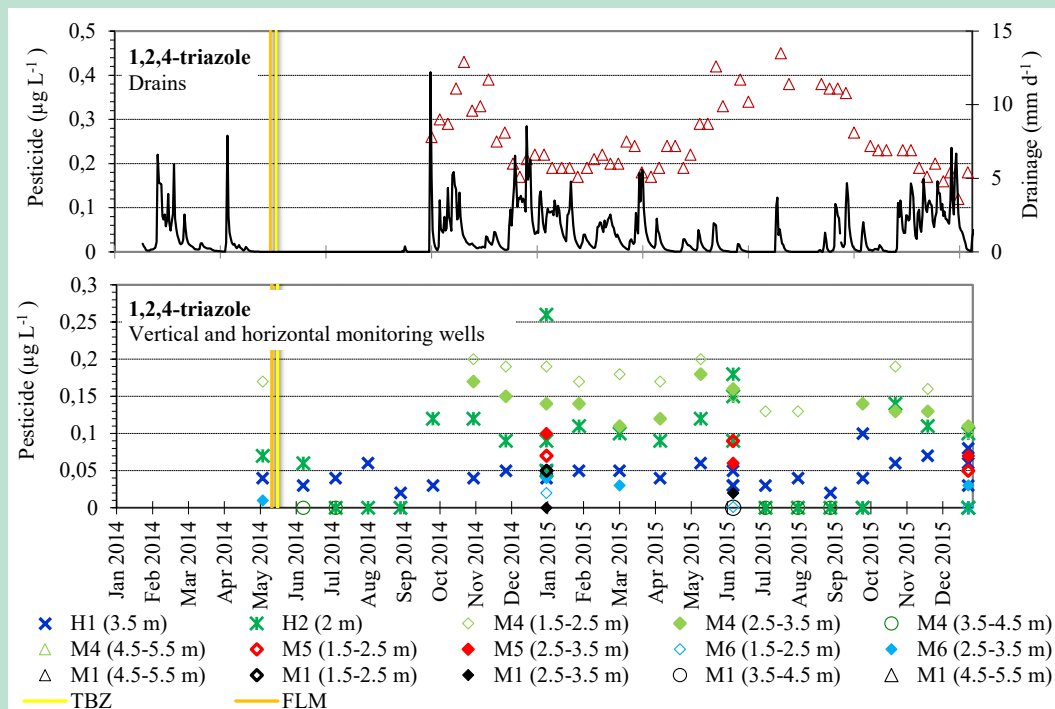
Conclusions: The results from the field experiment and the laboratory experiment can explain the accumulation and persistence of the aged triazole fungicides in the PLAP fields long after spraying. After spraying, most triazole fungicide will likely degrade in the topsoil, but a fraction can bind strongly in the plow layer with very low bioaccessibility and may therefore accumulate after repeated spraying. Slow but continuous degradation of the aged triazole fungicide may contribute to the "unexplained" findings of 1,2,4-triazole in drainage- and groundwater at PLAP fields where triazole parent compounds had not been sprayed recently. This effect must be added to leaching of 1,2,4-triazole from seed dressing, the contribution from atmospheric deposition of parent compounds, diffuse contribution from straw (from fungicide-treated crops) in manure and possibly also a small contribution from natural formation. Overall, it is therefore not surprising to find a relatively high concentration of 1,2,4-triazole in drainage- and groundwater under the PLAP fields before spraying with specific triazole fungicides.

4. Introduktion

1,2,4-triazol dannes i landbrugsjord ved nedbrydning af en række triazol-fungicider. Påvisning af 1,2,4-triazol i drænvand og det øvre grundvand inden specifikke sprøjtninger på pesticidvarslingsprogrammets marker kan skyldes overraskende høj udvaskning fra tidligere triazol-fungicidsprøjtninger, men der er også en række andre mulige kilder såsom naturlig dannelse af 1,2,4-triazol i landbrugsjord, dannelse fra pesticider, der har en kompleks 1,2,4-triazol-sidegruppe, udvaskning fra brug af triazol-fungicider i bejdsemidler og diffuse antropogene kilder. Det er derfor centralt, hvor 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand kommer fra, hvad der sker med triazol-fungicider, der sprøjtes på markerne, og hvor længe efter sprøjtning der er risiko for udvaskning af 1,2,4-triazol. Pesticidstoffer ældes i jord, på engelsk "aging", hvorved stofferne i stigende grad bliver utilgængelige for mikrobiel omdannelse og efterfølgende udvaskning af nedbrydningsprodukter. Triazol-fungicidernes aging kan estimeres ved at måle aged sorption (stigende K_d) og stoffernes biotilgængelighed.

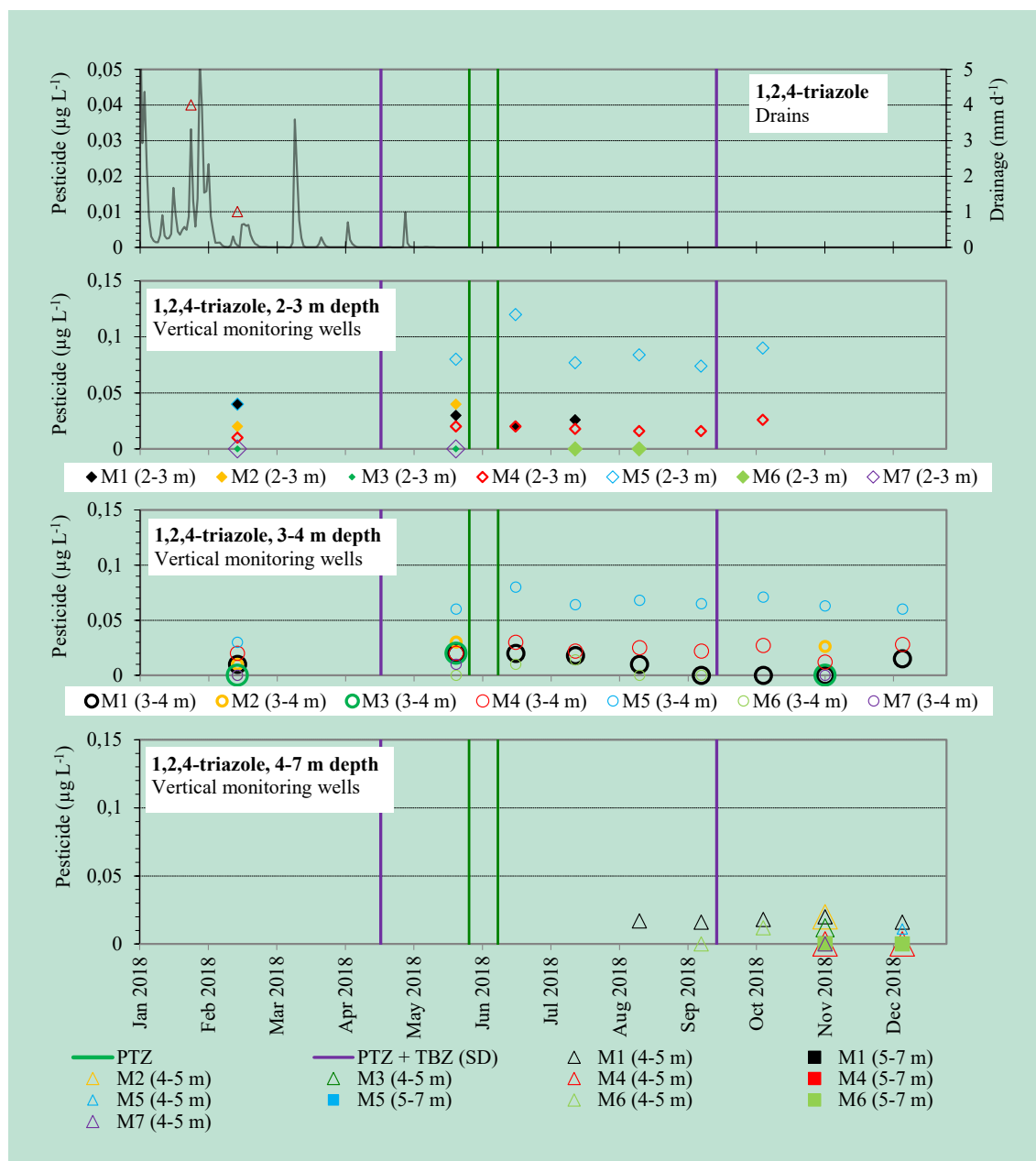
4.1 1,2,4-triazol i Pesticidvarslingsprogrammet

1,2,4-triazol er et organisk molekyle, der består af en 5-leddet ring med 3 kvælstofatomer indbygget i ringen. 1,2,4-triazol kan frigives ved hydrolyse af en række hydrofobe triazol-fungicider. 1,2,4-triazol er hydrofilt og dermed meget mere mobilt end moderstofferne, både med hensyn til diffusiv transport over korte afstande i jorden og med hensyn til opløst flow fra pløjelaget gennem jordsøjlen til det øvre grundvand. Med en typisk halveringstid i overjord på bare 10 dage (TABEL 1) er 1,2,4-triazol vurderet at være ikke-persistent. I Pesticidvarslingsprogrammet har man testet udvaskning af 1,2,4-triazol fra sprøjtning med triazolfungicider siden 2014 (Brüsch et al., 2016). 1,2,4-triazol har ofte udvasket til dræn og det øvre grundvand i høje koncentrationer over kravværdien på 0,1 µg/l for drikkevand. Figur 1 viser de første resultater fra VAP-marken ved Estrup. Efter udbringning af triazol-fungicidet tebuconazol overskred 1,2,4-triazol-koncentrationen i drænvand drikkevandskravet i samtlige prøver i mindst halvandet år efter sprøjtningen, i flere prøver var koncentrationen over 0,4 µg/l. Koncentrationen i det øvre grundvand under marken var også ofte over kravværdien og 1,2,4-triazol blev påvist i samtlige prøver i mindst halvandet år efter sprøjtningen (se også Silstrup, Bilag 1.1). Til de flestes overraskelse var der også 1,2,4-triazol i negative kontrolprøver udtaget fra det øvre grundvand under Estrup-marken inden udbringning af tebuconazol (FIGUR 1). På Estrup kunne der ikke tages kontrolprøver fra drænvandet inden tebuconazol-sprøjtningen, da der ikke løb vand i drænene, men på VAP-marken i Lund, var der 1,2,4-triazol i både drænvand og det øvre grundvand inden sprøjtning med tebuconazol og prothioconazol (FIGUR 2).



FIGUR 1. Udvaskning af 1,2,4-triazol inden første sprøjtning på Pesticidvarslingsprogrammets mark i Estrup. Figuren er en bearbejdet version af figurer i de årlige rapporter fra Pesticidvarslingsprogrammet (VAP). TBZ: tebuconazol, FLM: florasulam.

En pesticid screenings-undersøgelse viste i 2018, at 55 ud af 75 landbrugsjorde fra Centraleuropa indeholdt mål-bare triazol-fungicider med en middelkoncentration for summen af azolfungicider (conazoler) på $21 \mu\text{g/kg}$ (Hvězdová et al. 2018). Tilstedeværelse af azolfungicider i de centraleuropæiske jorde antydede, at triazolfungicider også kunne være akkumuleret i VAP-markerne, og at en pulje af "gammelt" triazolfungicid fra ældre sprøjtninger derfor kunne være årsag til fund af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand inden de specifikke sprøjtninger. Vi har derfor i dette projekt undersøgt, triazol-moderstofferne akkumulering, ældning og persistens i jorden i laboratorieforsøg og i feltforsøg, og om der kan have været andre kilder til 1,2,4-triazol end sprøjtning.



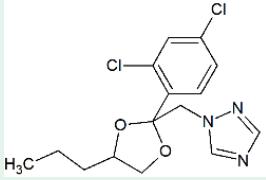
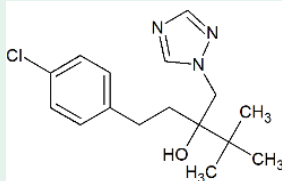
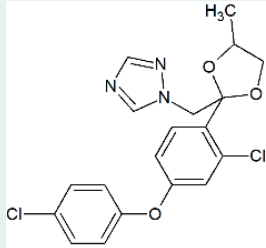
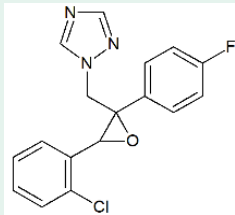
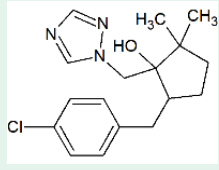
FIGUR 2. Udvaskning af 1,2,4-triazol inden første sprøjtning på Pesticidvarslingsprogrammets mark i Lund. Figuren er en bearbejdet version af figurer i de årlige rapporter fra Pesticidvarslingsprogrammet (VAP). PTZ: prothioconazol, TBZ: tebuconazol, SD: single dose

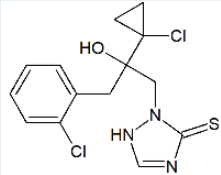
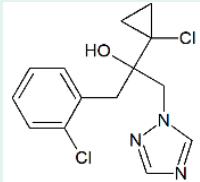
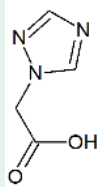
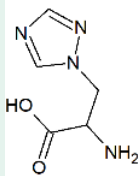
4.2 Modelstoffer

I TRIAFUNG har vi valgt seks 1,2,4-triazol moderstoffer med udbredt landbrugsanvendelse i årene op til projektets start. Det drejer sig om propiconazol, epoxiconazol, tebuconazol, metconazol, difenoconazol og prothioconazol. Alle seks stoffer kan nedbrydes til 1,2,4-triazol, men ifølge Pesticides Properties Database (PPDB) er 1,2,4-triazol kun en relevant metabolit fra propiconazol, epoxiconazol, tebuconazol og metconazol. Moderstofferne varierer med hensyn til salgperiode, samlet salg over årene, og persistens i overjord (TABEL 1). Stofferne omdannes også i varierende grad til 1,2,4-triazol i jordmiljøet (TABEL 2). Prothioconazol udgør en analytisk udfordring, idet prothioconazol hurtigt omdannes til prothioconazol-desthio og prothioconazol-S-methyl i jord, hvor prothioconazol-desthio mængdemæssigt er langt den vigtigste (EFSA, 2007). Omdannelsen til prothioconazol-desthio sker ved fjernelse af svovl fra triazol-gruppen, hvorefter molekylet indeholder en simpel 1,2,4-triazol-gruppe, der i struktur er identisk med de øvrige triazol-fungicider. Dannelse af 1,2,4-triazol fra prothioconazol i planter, overfladevand og sediment var velkendt ved projektets start (EFSA, 2007), men nedbrydningsforsøg havde vist, at i jord

blev mindre end 2% af det tilsatte prothioconazol omdannet til frit 1,2,4-triazol. Der krævedes derfor ikke yderligere data til at belyse eventuel udvaskning af 1,2,4-triazol fra prothioconazol ("no further assessment was required", EFSA, 2007) og prothioconazol blev ikke anset for at kunne udgøre en væsentlig kilde til 1,2,4-triazol i grundvandet i Danmark (Miljøstyrelsen, personlig kommunikation) og indgik ikke i beregningerne af den samlede årlige mængde triazol-moderstof, der måtte anvendes på en given mark. Da prothioconazol-desthio har en simpel triazol-gruppe, der i struktur svarer til de øvrige triazolfungicider, har vi i TRIAFUNG testet, om prothioconazol omdannes til frit 1,2,4-triazol i almindelig landbrugsjord og om det kan bidrage i betydelig grad til udvaskning af 1,2,4-triazol fra pløjelaget.

TABEL 1. Projektets modelstoffer, deres solgte mængder, nedbrydelighed og molekylære struktur. Stoffer uden sidste anvendelses år er stadigvæk tilladte i jordbruget (september, 2022).

Stof	Solgte mængder	Persistens ² DT50	Strukturformel
Propiconazol	2015-2020 ¹ Samlet salg ^{1,3} Anvendelsesperiode ^{1,3,8}		
	43.807 kg	Typisk: 71,8 dage Moderat persistent	
	2.004.208 kg	Lab 20°C: 26,6-115 dage Mark: 15,3-96,3 dage	
	1982-2020 ⁷		
Tebuconazol	371.580 kg	Typisk: 63 dage Moderat persistent	
	1.063.827 kg	Lab 20°C: >365 dage Mark: 25,8-91,6 dage	
	1996-		
Difenoconazol	56.684 kg	Typisk: 130 dage Persistent	
	97.321 kg	Lab 20°C 53-456 dage Mark: 20-265 dage	
	1998-		
Epoconazol	122.614 kg	Typisk: 354 dage Persistent	
	668.205 kg	Lab 20°C 127-1000 dage Mark: 0,75-248 dage	
	2003-2021 ⁸		
Metconazol	12.910 kg	Typisk: 142 dage Persistent	
	20.125 kg	Lab 20°C: 69-569 dage Mark: 26,6-369 dage	
	2003-		

Prothioconazol	516.458 kg 779.409 kg 2006-	Typisk: ? Ikke persistent Lab 20°C: 0,04-1,1 dage Mark: 0.49-1.4 dage	
Prothioconazol-desthio	Nedbrydningsprodukt	Typisk: 85 Moderat persistent Lab 20°C: 7,0-34 dage ⁵ Mark: 16,3-72,3 dage ⁵	
1,2,4-Triazol	Nedbrydningsprodukt	Typisk: 10 dage ⁶ Ikke persistent Lab 20°C: 5,0-9,9 dage Mark: ingen data	
1,2,4-triazoledikesyre	Nedbrydningsprodukt	Typisk: 15 dage Ikke-persistent Lab 20°C: 6,1-18,7 dage Mark: ingen data	
1,2,4-triazolalanin	Nedbrydningsprodukt	Typisk: ingen data Lab 20°C: ingen data Mark: ingen data	

¹Miljøstyrelsen. 2022

²Pesticides Properties Database (data downloadet januar, 2022)

³Miljøstyrelsen, 2017

⁵EFSA, 2007

⁶Ved bifasisk omdannelse er DT50 for den langsomme fraktion estimeret til 70,7 dage (MST personlig kommunikation).

⁷Stadigvæk tilladt som biocid.

⁸Stofbekendtgørelsen, BEK nr. 1187 af 17/08/2022

Blandt modelstofferne indgår også nedbrydningsprodukter nemlig 1,2,4-triazol i sig selv og tre andre nedbrydningsprodukter. 1,2,4-triazoleddikesyre er ifølge Pesticides Properties Database (PPDB) et velkendt nedbrydningsprodukt fra fx tebuconazol, epoxiconazol, metconazol, difenoconazol og bitertanol i jord, planter eller dyr. 1,2,4-triazolalanin er ifølge PPDB et kendt nedbrydningsprodukt fra nedbrydning af fx tebuconazol, epoxiconazol, metconazol og difenoconazol i planter og dyr. Prothioconazol-desthio dannes, som beskrevet ovenfor, fra prothioconazol i planter og jord (EFSA, 2007). I enkelte forsøg analyseres yderligere for de teoretiske 1,2,4-triazolmoderstoffer florasulam og pyroxsulam, samt triazolsulfonamid, der er et muligt nedbrydningsprodukt fra florasulam (Jackson et al., 2000).

Moderstoffernes registrerede salg i Bekæmpelsesmiddelstatistikken dækker anvendelse i jordbruget og for propiconazol og tebuconazol også anvendelse som biocid mod trædelæggende svamp. Biocidanvendelse til beskyttelse af udendørs maling (filmpreservering) og i træbeskyttelse mod fx råd og blåsplint er for langt de fleste år ikke inkluderet i salgsstatistikken og indgår dermed i meget begrænset omfang i de opgjorte salgsmængder i TABEL 1. Bekæmpelsesmiddelstatistikens salg af tebuconazol har næsten udelukkende været til anvendelse i jordbruget, dog er der et lille bidrag som biocid mod trædelæggende svamp frem til 2009. Bekæmpelsesmiddelstatistikens salg af propiconazol har frem til 1999 hovedsageligt været til anvendelse i jordbruget. Fra 1999 og fremefter ud-

gjorde salget af propiconazol anvendt mod trædelæggende svamp en betydelig del af det samlede salg. Propiconazol har været forbudt at anvende i jordbruget fra marts 2020 (EU, 2018; Miljøministeriet, 2022) og epoxiconazol fra april 2016 (Miljøministeriet, 2022). Epoxiconazol, metconazol, difenoconazol og prothioconazol har ikke registreret biocidanvendelse i Bekæmpelsesmiddelstatistikken. Udover som fungicid, bruges metconazol også som vækstregulerende middel, dog kun tilladt i vinterraps (Carys: 2015-2022; LFS Metconazol/Mepiquat-Chlorid 2015-2022). Derudover har tebuconazol, prothioconazol og difenoconazol været anvendt som bejdsemidler (TABEL 20).

TABEL 2. Triazolfungicider anvendt i Danmark i betydeligt omfang og som ifølge Pesticides Properties Database (juni, 2022) kan danne 1,2,4-triazol.

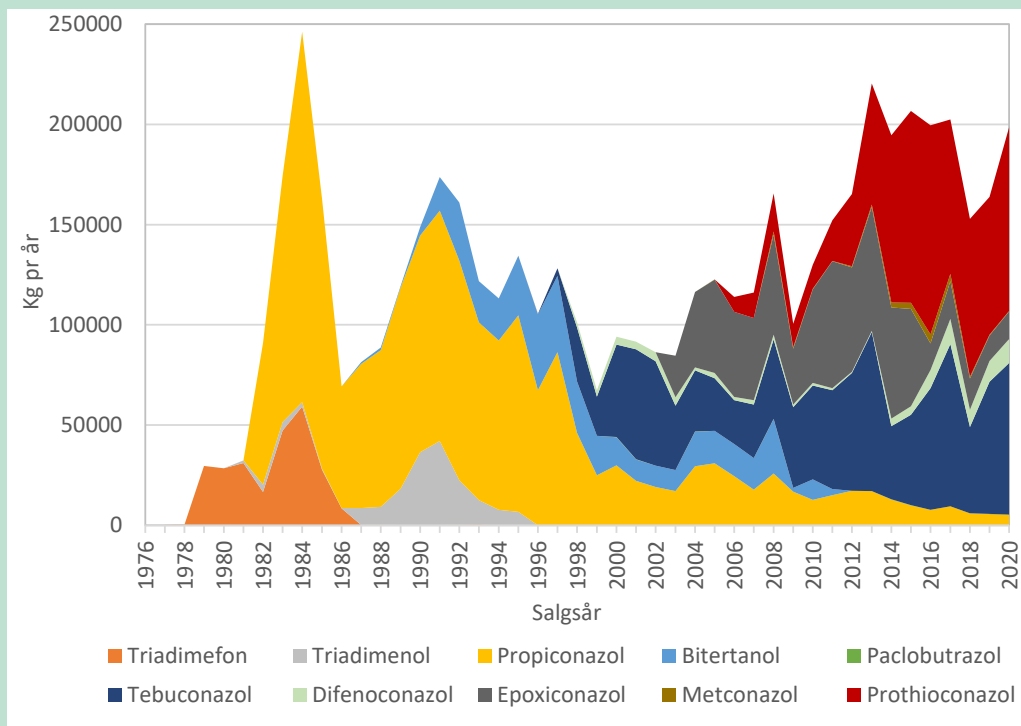
Stof	Dannelses medium	Maximum occurrence fraction
Propiconazol	Jord	0,430
Tebuconazol	Jord	0,09
Difenoconazol	Jord	0,23
Epoxiconazol	Jord	0,066
Metconazol	Jord	0,091
Mefentrifluconazol	Jord	0,051
Bitertanol	Jord	0,44
Triadimenol	Jord	0,21
Triadimefon	Jord	?*

* Ifølge oplysningerne i PPDB er 1,2,4-triazol ikke identificeret som nedbrydningsprodukt fra triadimefon, men triadimefon omdannes i jord til triadimenol (maximum occurrence fraction = 0,9; PPDB), der kan nedbrydes til 1,2,4-triazol.

1,2,4-triazol kan også dannes ved nedbrydning af flere andre triazol-pesticider (TABEL 2). Ifølge Bekæmpelsesmiddelstatistikken har tre af disse triazolfungicider været anvendt i Danmark i betydelige mængder, det drejer sig om triadimefon (salg 1977-1993; 249.833 kg, DT50_{typisk}: 26 dage), triadimenol (salg 1981-1995; 174.216 kg, DT50_{typisk}: 250 dage) og bitertanol (salg 1987-2011; 398.939 kg, DT50_{typisk}: 23 dage). Triadimenol er det mest persistente af de tre stoffer. Ud fra den typiske DT50 i jord, en gennemsnitlig jordtemperatur på ca. 10 grader og en Q₁₀ på 2,2 (FOCUS, 2006) er den anslåede restmængde efter 20 år nede på ca. 0,1 promille af den tilførte mængde. Da triadimenol havde sidste salgsår i 1995 er det usandsynligt at triadimenol skulle kunne bidrage væsentligt til den nuværende udvaskning af 1,2,4-triazol fra vores forsøgsområder. Triadimefon havde sidste salgsår i 1993 og nedbrydes betydeligt hurtigere end triadimenol, så det er også usandsynligt som bidrag til den nuværende udvaskning af 1,2,4-triazol. Bitertanol kan muligvis være anvendt i vores forsøgsområder frem til december 2012 (Miljøministeriet, 2022), men da bitertanol nedbrydes forholdsvis hurtigt er den forventede restmængde i jorden mindre end 0,05 promille allerede 2 år efter udbringning. De tre stoffer er derfor fravalgt som modelmoderstoffer, men jordene blev screenet for stofferne med HRMS suspect-screening for at bekræfte, at de ikke fandtes i jordene. Derudover har mefentrifluconazol været markedsført fra 2021, men har ikke været anvendt på VAP-markerne i forsøgsperioden og indgår derfor ikke blandt model-moderstofferne.

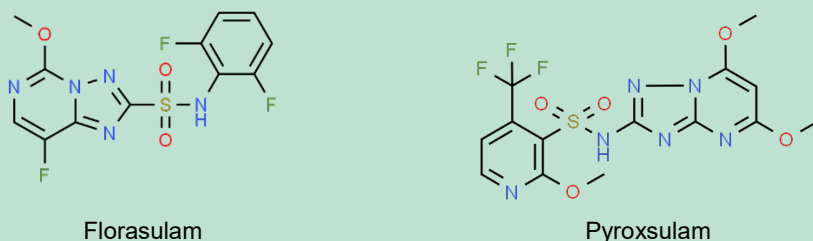
To andre triazol-fungicider, penconazol (1995; 124 kg, DT50_{typisk}: 117 dage) og paclobutrazol (1990-; 727 kg, DT50_{typisk}: 112 dage), har kun været solgt i ubetydelige mængder. Mefentrifluconazol (2021-, DT50_{typisk}: 268 dage) er godkendt som landbrugspesticid til svampebekæmpelse i korn fra 2021, men da seneste bekæmpelsesmiddelstatistik kun dækker salget frem til 2020 findes der ikke offentlige tilgængelige data for salget. Mefentrifluconazol har ikke været anvendt på vores forsøgsområder før eller i løbet af forsøgsperioden. Derudover har der tidligere været et stort forbrug af herbicidet amitrol (1958-1989; 442.937kg), men forbruget ophørte 30 år inden projektets start. Amitrol nedbrydes hurtigt med en typisk halveringstid på 7,4 dage (lab: 4,3-17,6 dage, mark: 6,8-28,1 dage, Pesticides Properties Database) og har lav sorption (K_f = 1,6, Pesticides Properties Database). Vi vurderer derfor, at amitrol i dag er uden betydning for den nuværende udvaskning af 1,2,4-triazol til dræn og det terrænnære grundvand i vores forsøgsområder. For øjeblikket (juni, 2022) indeholder Bekæmpelsesmiddeldatabasen god-

kendte produkter med følgende aktivstoffer: mefentrifluconazol (plantebeskyttelse), tebuconazol (plantebeskyttelse og biocid), propiconazol (biocid), metconazol (plantebeskyttelse), difenoconazol (plantebeskyttelse), paclobutrazol (plantebeskyttelse) og prothioconazol (plantebeskyttelse).



FIGUR 3. Summeret årligt salg af triazol-fungicider ifølge Miljøstyrelsens årlige bekæmpelsesmiddelstatistikker. Salget dækker anvendelse i jordbruget og for tebuconazol og propiconazol også biocidanvendelse mod træde-læggende svamp.

Yderligere har der ifølge Bekæmpelsesmiddeldatabasen været markedsført mindst tre triazolstoffer, som ikke har en simpel 1,2,4-triazol sidekæde, men hvor 1,2,4-triazol indgår som en kompleks del af molekylet, det drejer sig om triazophos, og som nævnt florasulam og pyroxsulam. Triazophos kan nedbrydes til 1-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-ol (Yang et al., 2011), som har en triazol-3-ol sidegruppe, der i struktur er en O-analog til prothioconazols S-triazolgruppe. Ifølge Bekæmpelsesmiddelstatistikken er det samlede salg dog helt nede på 349 kg og stoffet er dermed uden relevans. Florasulam kan nedbrydes til 1,2,4-triazolsulfonamid (TSA) og DFP-TSA, der begge har en S-bundet 1,2,4-triazol sidegruppe (Jackson et al., 2000). Pyroxsulam kan nedbrydes til ATSA, der har en N-bundet amitrol-sidegruppe (EFSA, 2013). Amitrol-sidegruppen kan muligvis frigives som frit amitrol, der videre kan nedbrydes til 1,2,4-triazol, men om det forekommer i miljøet, er et åbent spørgsmål. I TRIAFUNG har vi i et begrænset forsøg testet om florasulam og pyroxsulam kan omdannes til 1,2,4-triazol i mængder, der kan udvaske fra pløjelaget, men stoffer med en kompleks triazol-struktur har generelt ikke indgået i TRIAFUNG -forsøgene.



FIGUR 4. Triazol-herbicider hvor 1,2,4-triazol indgår som en kompleks del af molekylet (strukturer fra chemspider.com).

Der findes også en række lægemidler med 1,2,4-triazol i molekylet fx fluconazol, isavuconazol, voriconazol, itraconazol, ravuconazol, posaconazol, som muligvis kan være tilført vores forsøgsområder i mindre mængder i spildevandsslam. COWI (2019) har for lægemidlerne opgjort at: "Det mængdemæssigt dominerende af de 11 aktivstoffer er fluconazol, som estimeres at repræsentere omkring 90% af det samlede 1,2,4-triazolpotentiale fra danske lægemidler. Det er estimeret som worst case, at 17 kg 1,2,4-triazol/år hidrørende fra fluconazol kan blive tilført landbrugsjord gennem udbringning af spildevandsslam". Denne kilde er dermed ganske ubetydelig sammenlignet med de agrokemiske bidrag og indgår derfor ikke i TRIAFUNG. I landbruget anvendes veterinære lægemidler med 1,2,4-triazol. En søgning på triazol-strukturen i Veterinary Substances DataBase (VSDB) gav kun to stoffer, itraconazol og albaconazol, idet langt de fleste veterinære azoler er diazoler, som ikke indeholder 1,2,4-triazol-strukturen. Itraconazol og albaconazol har haft en begrænset landbrugsanvendelse mod hud – og klovinfektioner.

Endelig kan det ikke udelukkes at 1,2,4-triazol i mindre omfang har været anvendt som nitrifikationshæmmer under handelsnavnene Piadin og Alzon46. Det kan fx være tilsat gylle under udbringning for at mindske omdannelsen af ammonium til nitrat og dermed mindske nitratudvaskningen fra marken (Landbrugsavisen, 2014). Der er ingen registreret anvendelse af 1,2,4-triazol som nitrifikationshæmmer på forsøgsarealerne i TRIAFUNG.

4.3 Aging og biotilgængelighed

Pesticidstoffer ældes i jord, på engelsk "aging", hvorved stofferne i stigende grad bliver utilgængelige for mikrobiel omdannelse og efterfølgende udvaskning. Aging-begrebet blev oprindeligt defineret af Martin Alexander (1995) på følgende måde: "Changes in extractability with residence time and the kinetics of sorption and desorption suggest that the compounds are becoming sequestered in inaccessible microsites within the soil matrix....A change is occurring that renders persistent molecules less accessible, whether accessibility is assessed in microbiological or chemical terms.....Aging thus is presumably associated with a continuous diffusion into more remote sites, where the molecules are retained." Aging er grunden til, at hydrofobe, persistente pesticidstoffer bliver mindre biotilgængelige over tid. Biotilgængelighed har været defineret på flere måder, men Reichenberg og Mayer foreslog i 2006 en definition, som er både teoretisk funderet og praktisk anvendelig. De skelnede mellem kemisk aktivitet fx målt som frit opløst koncentration, der bestemmer potentialet for diffusion og fasefordeling, og biotilgængelig mængde. De definerede den biotilgængelige mængde som følger: "Accessibility describes the mass quantity of a chemical that is or can become available within a given time span and under given conditions". Den biotilgængelige mængde dækker dermed, hvad der er umiddelbart tilgængeligt for jordens mikroorganismer, plus hvad der potentielt kan blive tilgængeligt over tid. Biotilgængelighed er altid operationelt defineret, men er dybest set mængden af stof, som er tilgængelig for diffusiv udveksling og som mikroorganismerne derfor vil kunne "trække" ud af jorden ved konstant at nedbryde den opløste, vandige mængde.

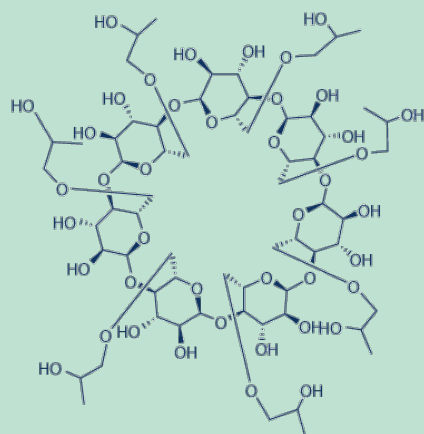
Når hydrofobe stoffer er bundet i jord, har man i de senere år skelnet mellem to meget forskellige fraktioner: løst bundet, biotilgængeligt stof, som kan frigives forholdsvis hurtig fra jordpartiklerne, og hårdt bundet, ikke-biotilgængeligt stof, som frigives meget langsomt, hvis det overhovedet frigives (Cornelissen et al. 2004a og 2005). Det løst-bundne stof vil typisk være bundet til amorft organisk stof, det klassiske "soil organic matter" såsom humus,

lignin og andre polymerer, hvorimod det hårdt-bundne stof typisk vil være bundet til organiske og delvist krystallinske geosorbenter såsom sodpartikler og kerogen (Cornelissen et al. 2004a og 2005). Processerne er bedst beskrevet for PAH'erne, hvor den ikke-biotilgængelige, hårdt-bundne fraktion under naturlige forhold i jorden kræver fra årtier til århundreder for frigivelse (Cornelissen et al. 2005), kortest for de mindst hydrofobe PAH'er. Triazol-fungicidernes binding forventes at være lidt svagere end PAH'ernes, dels fordi triazol-fungiciderne er mindre hydrofobe end mange PAH'er, dels fordi bindingen til sod er kraftigere for plane molekyler som PAH'er, chlorbenzener og plane PCB'er end for rumligt mere fyldige stoffer (Cornelissen et al., 2004b) som fx triazol-fungicider. Udover binding til organisk stof kan triazol-fungiciderne sandsynligvis også sorbere svagt til uorganiske mineraler. Dette er vist for tebuconazol, som udover kraftig sorption til humusstoffer også sorberer svagt til ferrihydrit pga. mineralens store overflade, samt i mindre grad til illit, og nærmest slet ikke til goetit, birnesit og calcit (Čadková et al., 2012).

Hydrofobe stoffers biotilgængelige fraktion bestemmes typisk ved ekstraktion med porøse polymer-materialer fx tenax eller ved ekstraktion med kompleksende stoffer. I TRIAFUNG har vi estimeret triazol-fungicidernes biotilgængelige fraktion ved tilpasning af en metode, der er baseret på kompleksdannelse med hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD). I ekstraktionen blandes jord med en vandig HPCD-opløsning og efter stigende tidsintervaller separeres jord og HPCD-opløsning, hvorefter koncentrationen af 1,2,4-triazol moderstoffer i HPCD-opløsningen bestemmes. HPCD er et ringformet polysaccharid med et hydrofilt ydre og et hydrofobt indre (FIGUR 5). Metoden princip er, at hydrofobe stoffer i vandig opløsning kompleksere med HPCD og derved fjernes triazol-fungicid fra fri opløsning (Cuyper et al., 2002). Således skabes et stort "træk" på adsorberede stoffer, så ligevægten mellem stof bundet i jorden og opløst stof hele tiden forskydes mest muligt mod opløst stof, hvilket mekanistisk svarer til mikroorganismer, der optager og metaboliserer hydrofobe stoffer og derved driver frigivelsen af den biotilgængelige fraktion (Reid et al., 2000a; Reid et al., 2000b; Johnsen et al., 2005). I biotilgængelighedsbestemmelsen med HPCD foregår denne proces dog langt hurtigere end ved mikrobiel nedbrydning i jorden, idet jorden er opslæmnet og under omrøring, hvorved koncentrationsgradienter og begrænsninger for diffusiv transport minimeres. Denne konceptuelle model forudsætter, at det meste nedbrydning sker intracellulært i mikroorganismene. Hvis der er extracellulær nedbrydning, kan den biotilgængelige koncentration muligvis være højere end estimeret med tenax og HPCD.

Frigivelsen af stof går med tiden mod nul efterhånden som frigivelsen i stigende grad begrænses af intrapartikulær diffusion på mikroskala i jordpartiklerne. Til sidst er der ikke længere en diffusionsgradient over vand-partikel grænsefladen (i teorien), der frigives ikke mere stof og man har bestemt den biotilgængelige koncentration (Reid et al., 2000a, Cuyper et al., 2002). Denne antagelse er bekræftet i talrige studier, hvor HPCD-ekstraktion korrelerede med den mængde stof, der kunne bionedbrydes under optimale betingelser i forureninger ældet i laboratoriet (fx Reid et al., 2000a; Cuyper et al., 2002 Allan et al., 2006; Doick et al., 2006) og "naturligt" ældede forureninger (fx Doick et al., 2005; Stokes et al., 2005; Papadopoulos et al., 2007). Korrelationen har dog ikke været testet for triazol-moderstoffer.

HPCD-metoden har mest været brugt til PAH'er med varierende antal aromatiske ringe, men oftest til de 3-ringede fx phenanthren. De 3-ringede PAH'ers hydrofobicitet ligger typisk lidt højere end triazol-fungiciderne. Metoden har også været brugt med succes til at bestemme biotilgængeligheden af *p*-cresol (Allen et al., 2006), der er mere polært end triazol-fungiciderne. Derudover har HPCD været brugt til at kompleksere og derved pseudo-opløse det farmaceutiske azolfungicid sertaconazol i hydrogel til behandling af *Candida albicans* infektioner (Lopez-Montero et al., 2009). På baggrund af erfaringerne med aromatiske forbindelser og den effektive komplekseringen af sertaconazol forventer vi, at HPCD-metoden vil kunne tilpasses til bestemmelse af triazol-fungicidernes biotilgængelighed i landbrugsjord.



FIGUR 5. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) er en ringstruktur med et hydrofobt indre og et hydrofilt ydre. HPCD kan danne komplekser med hydrofobe stoffer, hvis de har den rette molekyl størrelse.

Aging er en vigtig parameter, når pesticiders udvaskningsrisiko skal vurderes. Der er for nylig offentliggjort en guideline til, hvordan aged sorption studier skal udføres, tolkes og anvendes i EU's pesticidgodkendelser (EU, 2021). Guidelinens aged-sorption-koncept bygger på, at mange pesticidstoffer over tid binder hårdere og hårdere til jorden, hvilket beskrives af stigning i sorptionskoefficienten K_d over tid. I guidelinen anføres, at de grundlæggende forsøg skal være laboratorie-inkubationer, hvor jordprøver spises med modelstoffet og inkuberes i mørke ved konstant temperatur og fugtighed. Med stigende tidsintervaller ekstraheres prøver med en vandig CaCl_2 opløsning (10 mM) i 24 timer for at bestemme koncentrationen i vandfasen, efterfulgt af ekstraktion med et organisk solvent så man til hvert tidspunkt kan beregne K_d og totalt mængde tilbageværende stof. Per definition skal K_d over tid vise en stigende tendens, der kan skelnes fra baggrundsstøjen, for at der er tale om aged sorption (EU, 2021).

Konceptuelt ligger denne beskrivelse af aging tæt på den første biotilgængeligheds-parameter i Reichenberg og Mayers definition, nemlig kemisk aktivitet bestemt som frit opløst koncentration i den vandige fase, men i modsætning til frit opløst koncentration er den vandige koncentration i K_d skaleret i forhold til den bundne koncentration. Da aged sorption konceptuelt er sammenlignelig med kemisk aktivitet, er aged sorption ikke et mål for en mængde i en bestemt fraktion i jorden, men derimod et relativt mål for potentialet for diffusion og fasefordeling og dermed også nedbrydning og udvaskning. K_d -bestemmelse er dog kun en god proxy for det kemiske potentiale i jorde, hvor der ikke frigives større mængder vandopløselige, komplekserende stoffer under K_d -bestemmelsen, det vil sige mineraljorde med lavt organisk indhold. Fordelen ved K_d i forhold til kemisk potentiale og frit opløst koncentration er, at det er en simpel bestemmelse, som er umiddelbart forståelig og rutine i de fleste laboratorier, og hvis man kender totalkoncentrationen, kan K_d omregnes til vandig koncentration, der er en tilnærmelse til kemisk potentiale målt som frit opløst koncentration.

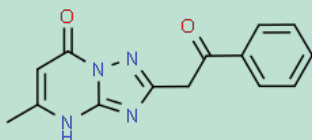
I TRIAFUNG beskriver vi triazol-moderstoffernes aging i et fuld-skala feltforsøg på Pesticidvarslingsprogrammets marker (VAP-marker) og i et kontrolleret laboratorieforsøg. I begge forsøg kvantificeres moderstoffernes aging både som aged sorption (K_d -bestemmelse) og som ændringer i biotilgængelig koncentration (HPCD-ekstraktion).

4.4 Naturlig dannelse af 1,2,4-triazol?

I den videnskabelige litteratur er der anekdotiske beretninger om naturlig dannelse af 1,2,4-triazol. Pesticidproducenten Bayer har fx præsenteret data fra jord og plantemateriale fra 10 tyske skovområder, der viste forekomst af 1,2,4-triazol omkring kvantifikationsgrænsen på 1 $\mu\text{g/kg}$ (<1,0-2,1 $\mu\text{g/kg}$ uden tydelig sæsonvariation, Heine-mann, 2013) og især af 1,2,4-triazol-alanin og 1,2,4-triazol-eddikesyre (0-12 $\mu\text{g/kg}$, Blank, 2017). Bayer konkluderer, at oprindelsen på disse lokaliteter kun kunne være naturlig, bl.a. fordi der var mindst 100 m til nærmeste

landbrugsjord. Heinemann (2013) undersøgte også en skovjord med 5 km til nærmeste landbrugsmark, hvor der dog ikke kunne påvises 1,2,4-triazol. Det blev ikke undersøgt, om der var naturlig dannelse i andre jorde end skovjorde eller om der kunne være antropogene kilder i form af atmosfærisk deposition af pesticid-moderstof (tørdeposition eller opløst i nedbøren). Det blev heller ikke undersøgt, hvorvidt de lave koncentrationer detekteret i de øverste jordlag var tilstrækkeligt til at forårsage en målbar udvaskning af 1,2,4-triazol.

I den videnskabelige litteratur kan vi kun finde ét entydigt eksempel på naturlig dannelse af 1,2,4-triazol-strukturen, nemlig stoffet essramycin (FIGUR 6) fra aktinobakterien *Streptomyces* sp. Merv8102 (El-Gendy et al., 2008). Teoretisk kan man ikke udelukke, at essramycin kan dannes i landbrugsjord, men det vides ikke, hvorvidt det vil kunne ske i tilstrækkelig mængde til at forklare 1,2,4-triazol udvaskning, eller hvorvidt essramycin overhovedet kan nedbrydes til frit 1,2,4-triazol.



FIGUR 6. Essramycin; en mikrobiel, sekundær metabolit, som indeholder 1,2,4-triazol-strukturen og som kan dannes af aktinobakterien *Streptomyces* sp. Merv8102 (El-Gendy et al., 2008).

Derudover er der rapporteret dannelse af 1,2,4-triazol-alanin i aktinobakterien *Streptomyces* sp. KM-10329 (Imamura et al., 1985). Studiet er dog af meget ringe videnskabelig kvalitet, idet der ikke indgik et negativt kontrolforsøg, til at dokumentere at 1,2,4-triazol-alanin ikke i forvejen var til stede i vækemediet, dvs. et negativt kontrolforsøg uden bakterien. Det er derfor sandsynligt, at 1,2,4-triazol-alanin kom fra det konventionelt dyrkede hvedeklid (800 g) eller soja (400 g), der blev brugt som vækstsubstrat. 1,2,4-triazol-alanin er nemlig som nævnt et kendt nedbrydningsprodukt fra triazol-fungicider i planter (Shah og Tasheva, 2008). For at afklare om der er et udbredt, naturligt 1,2,4-triazol-baggrundsniveau testede vi i TRIAFUNG, om der kan påvises naturligt 1,2,4-triazol i jordvandet under forskellige typer økologisk landbrugsjord og udvalgte danske naturtyper.

4.5 Arbejdshypoteser og forsøg

Vi har på baggrund af den uventede udvaskning af 1,2,4-triazol inden sprøjtning af VAP-markerne med triazol-fungicider opstillet en række hypoteser og tilhørende forsøg til forklaring af 1,2,4-triazol udvaskningen og til generelt at belyse triazol-fungicidernes oprindelse og skæbne i jordmiljøet. Inden forsøgene kunne sættes i gang, skulle vi dog først udvikle metoder til kvantificering af 1,2,4-triazol i jord og vand, samt tilpasse en metode til bestemmelse af moderstoffernes biotilgængelighed i jord.

Hypotese I: 1,2,4-triazol kan have naturlige kilder, som er årsag til baggrundskoncentrationer i nogle jorde, og som kan forklare 1,2,4-triazol-fund i grundvandsprøver, som ikke har en identificerbar antropogen kilde. Denne 1,2,4-triazol stammer dermed ikke fra landbrugsanvendelse af et eller flere moderstoffer.

For at teste hypotese I installerede vi sugeceller i 1 meters dybde under udvalgte naturområder og økologiske marker for at følge en eventuel udvaskning af 1,2,4-triazol fra disse områder over et år. Som kontrol testede vi overjorden over sugecellerne for eventuelt indhold af triazol-fungicid moderstoffer og intermediære nedbrydningsprodukter med HRMS suspect screening. Derudover testede vi enkelte nedbørsprøver for atmosfærisk deposition af 1,2,4-triazol og andre små 1,2,4-triazol-forbindelser, ligesom indholdet af disse stoffer og moderstoffer blev testet i den halm, der bringes ud som møg på de økologiske marker. Derudover prøvede vi at fremskaffe de to *Streptomyces* isolater, der i litteraturen er rapporteret at danne 1,2,4-triazol-stofferne essramycin og 1,2,4-triazolalanin for at teste dannelsen af disse stoffer, og om de kan nedbrydes til frit 1,2,4-triazol i landbrugsjord.

Hypotese II: 1,2,4-triazol i landbrugsjord kan stamme fra moderstoffers fungicid-anvendelse, som ikke er sprøjtning. I VAP medregnede og registrerede man ikke bejdsemidler frem til 2017. Da såsæd til diverse kornafgrøder ofte har været bejdset med triazol-fungicider, er den mest oplagte ikke-sprøjtning-anvendelse bejdsemiddel på udsæd. Vi opsatte derfor et laboratorieforsøg med jordkolonner til beskrivelse af 1,2,4-triazol-udvaskning efter såning med bejdset byg.

Hypotese III: 1,2,4-triazol kan dannes ved nedbrydning af pesticid-moderstoffer, der har en kompleks 1,2,4-triazol sidegruppe. Det mest relevante stof er prothioconazol, hvor triazol-gruppens dobbelt-bundne svovl kan fraspaltes og give en simpel, fri triazolgruppe svarende til de kendte 1,2,4-triazol moderstoffer. Derudover indeholder herbiciderne florasulam og pyroxulam en kompleks, central triazol-ring i molekylerne. Disse stoffer vil dog teoretisk også kunne omdannes til 1,2,4-triazol. Vi opsatte derfor et laboratorieforsøg med jordkolonner for at teste om 1,2,4-triazol udvasker fra pløjelaget efter sprøjtning med disse stoffer.

Hypotese IV: 1,2,4-triazols moderstoffer kan akkumulere i overjorden efter gentagne sprøjtninger, så 1,2,4-triazol kan frigives langsomt ved nedbrydning af moderstoffer lang tid efter moderstoffernes seneste landbrugsanvendelse med efterfølgende langsom udvaskning af 1,2,4-triazol til dræn og grundvand. Moderstofferne vil kunne påvises i overjorden og forventes at have lav biotilgængelighed, da de ellers for længst ville være nedbrudt. Denne hypotese blev testet med to forsøg: et feltforsøg og et mere kontrolleret laboratorieforsøg. I feltforsøget indsamlede vi prøver fra pløjelaget på fire VAP-marker over to år og bestemte total-indholdet af udvalgte triazol-moderstoffer samt moderstoffernes sorption til jorden (aged sorption, K_d) og biotilgængelige fraktioner. Som kontrol testede vi VAP-jordene for eventuelt indhold af andre triazol-fungicid moderstoffer og intermediære nedbrydningsprodukter med HRMS suspect screening. I laboratorieforsøget spikede vi tre økologiske landbrugsjorde med triazol-moderstoffer og inkuberede i op til ét år. Ligesom i feltforsøget bestemtes ændringerne over tid i totale koncentrationer, aged sorption (K_d) og biotilgængelig fraktion. Som abiotiske kontroller, brugte vi en identisk opstilling med autoklaveret jord og supplerede med test af moderstoffernes stabilitet ved forskellige pH-værdier for at udelukke effekter af simpel vandig hydrolyse.

5. Materialer og metode

Metodeafsnittet dækker følgende metoder og forsøgsbeskrivelser: 1) Metoder til kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer og deres biotilgængelighed i vand og jord. 2) Et feltforsøg til undersøgelse af naturlig dannelse og nedsivning af 1,2,4-triazol i naturområder og økologiske marker. 3) Et laboratorieforsøg til belysning af potentiel 1,2,4-triazol-udvaskning fra bejdset såsæd og test for omdannelse af prothioconazol, florasulam og pyroxsulam til 1,2,4-triazol. 4) Et feltforsøg til bestemmelse af moderstoffers akkumulering, nedbrydning og ældning i pløjelaget, herunder HRMS suspect screening for gamle moderstoffer og intermediære nedbrydningsprodukter i pløjelaget. 5) Et laboratorieforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i jord.

5.1 Kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer i vand og jord

5.1.1 Ekstraktion og analyse

Seks triazol-fungicider blev udvalgt til TRIAFUNG-projektets forsøg: propiconazol, epoxiconazol, tebuconazol, prothioconazol, metconazol og difenoconazol (TABEL 3), og derudover til enkelte forsøg også det potentielle moderstof florasulam (herbicid). Udover nedbrydningsproduktet 1,2,4-triazol, har vi indkøbt de fire nedbrydningsprodukter triazolalanin, triazolsulfonamid, triazoleddikesyre og prothioconazol-desthio samt som kontrol 1,2,3-triazol (TABEL 4). På grund af de meget forskellige fysisk-kemiske egenskaber blev stofferne opdelt i to grupper i metodeudvikling og analyser: dels moderstofferne og prothioconazol-desthio, dels de fem mindre stoffer omkring 1,2,4-triazol. Fire isotop-mærkede standarder, blev brugt som interne standarder i metoderne: propiconazol-D₅, tebuconazol-D₉, difenoconazol-D₆, og 1,2,4-triazol-¹³C₂. Alle stoffer blev analyseret på UPLC-MS/MS (Acquity Classic UPLC med Xevo TQ-S micro MS fra Waters). For at opnå en detektionsgrænse på 0,01 µg/l i vandprøver, blev en opkoncentreringsmetode baseret på fastfaseekstraktion udviklet og valideret. Derudover blev en ekstraktionsmetode til at analysere stofferne i jordprøver udviklet og valideret. I det følgende beskrives de optimerede og validerede metoder. En detaljeret beskrivelse af optimeringsprocessen og validering findes i kapitel 6.

TABEL 3. Moderstoffer analyseret i TRIAFUNG og deres fysisk-kemiske egenskaber.

Stofnavn, forkortelse IUPAC-navn CAS-nr.	Oktanolvand fordelingskoefficient ved pH 7, 20 °C (LogP) Sorption: lineær K _D , Freundlich K _f ^A
Propiconazol, PPZ 1-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1,2,4-triazole CAS: 60207-90-1	LogP: 3.7 ^A ; 4.33 ^B pK _a (acidic): 1.95 ^B K _D : 33.7 / K _{OC} : 1086 K _f : 15 / K _{foc} : 955
Epoxiconazol, EPZ (2RS,3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazole CAS: 135319-73-2	logP: 3.3 ^A ; 3.74 ^B pK _a (basic): 2.0 ^B K _D : / K _{OC} : K _f : 12.2 / K _{foc} : 894
Tebuconazol, TBZ (RS)- 1-(4-chlorophenyl)- 4,4-dimethyl-3-(1H, 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol CAS: 107534-96-3	logP: 3.7 ^A ; 3.67 ^B pK _a (acidic): 13.85 ^B pK _a (basic): 2.01 ^B K _D : / K _{OC} :

Florasulam, FLM N-(2,6-Difluorophenyl)-8-fluoro-5-methoxy-[1,2,4]triazolo[1,5-c] pyrimidine-2-sulfonamide CAS: 145701-23-1	K _f : 12.69 / K _{foc} : 769 LogP: -1.22 ^A ; 2.09 ^B pKa(acidic): 8.8 ^B K _D : 0.46 / K _{OC} : 22 K _f : 0.45 / K _{foc} : 20.37
Metconazol, MTZ 5-(4-Chlorophenylmethyl)-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl-methyl)cyclopentanol CAS: 125116-23-6	LogP: 3.85 ^A ; 3.59 ^B pKa(acidic): 13.67 ^B pKa(basic): 2.01 ^B K _D : / K _{OC} : K _f : 23.05 / K _{foc} : 1116
Difenoconazol, DFZ 1-((2-(2-Chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-1H-1,2,4-triazole CAS: 119446-68-3	LogP: 4.36 ^A ; 4.86 ^B pKa(basic): 1.95 ^B K _D : / K _{OC} : K _f : 41.0 / K _{foc} : 3760
Prothioconazol, PTZ 2-[2-(1-Chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-hydroxypropyl]-1,2-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione CAS: 178928-70-6	logP: 3.8 ^A ; 2.78 ^B pKa(acidic): 9.75 ^B pKa(basic): -0.7 ^B K _D : 15.2 / K _{OC} : 1765 K _f : 44.2 / K _{foc} : 2556

^APPDB: Pesticide Properties DataBase (www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb)

^BBeregnet med: www.chemicalize.com

TABEL 4. Nedbrydningsprodukter analyseret i TRIAFUNG og deres fysisk-kemiske egenskaber.

Stofnavn, Forkortelse IUPAC-navn CAS-nr.	Fysiskkemiske egenskaber LogP pKa
1,2,4-Triazol, 124-TRZ 1H-1,2,4-triazole CAS: 288-88-0 1,2,3-Triazol, 123-TRZ CAS: 288-36-8	LogP = -1,0 ^A ; -0.41 ^B pKa(acidic): 10.39 ^B pKa(basic): 2.46 ^B logP: -0.5 ^B pKa(acidic): 9.34 ^B pKa(basic)pKa: 0.31 ^B
Triazolalanin, TA (R,S)-2-amino-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoic acid CAS: 114419-45-3	logP: -3.66 ^B pKa(acidic): 0.82 ^B pKa(basic): 8.84 ^B
Triazoledikesyre, TAA 1H-1,2,4-triazol-1-ylacetic acid CAS: 28711-29-7	logP: -1.26 ^B pKa(acidic): 3.2 ^B pKa(basic): 1.96 ^B
Triazolsulfonamid, TSA 1H-1,2,4-triazole-3-sulfonamide CAS: 89517-96-4	logP: -1.12 ^B pKa(acidic): 4.68 ^B pKa(basic)pKa: 0.7 ^B
Prothioconazol-desthio, PTZ-S α-(1-Chlorocyclopropyl)-α-[(2-chlorophenyl)methyl]-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol CAS: 120983-64-4	logP: 3.04 ^A ; 2.68 ^B pKa(acidic): 12.99 ^B pKa(basic): 2.01 ^B

^A fra PPDB: Pesticide Properties DataBase (www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb)

^B Beregnet med: www.chemicalize.com

5.1.2 Vandprøver

Vandprøverne blev analyseret enten direkte eller opkoncentreret ved fastfaseekstraktion.

5.1.2.1 Analyse af vandprøver ved direkte injektion

Til 1 ml filtreret vandprøve (PTFE-filtrer, 0,22 µm) blev intern standard tilsat: $^{13}\text{C}_2$ -TRZ ved analyse af nedbrydningsprodukterne eller TBZ-D₉, PPZ-D₅, DFZ-D₆ ved analyse af moderstoffer, eller både og; 5 ng af hvert stof. Efterfølgende blev prøven analyseret på UPLC-MS/MS med analysemetode 1 eller 2.

5.1.2.2 Opkoncentrering ved fastfaseekstraktion (SPE) – kun til analyse af nedbrydningsprodukter

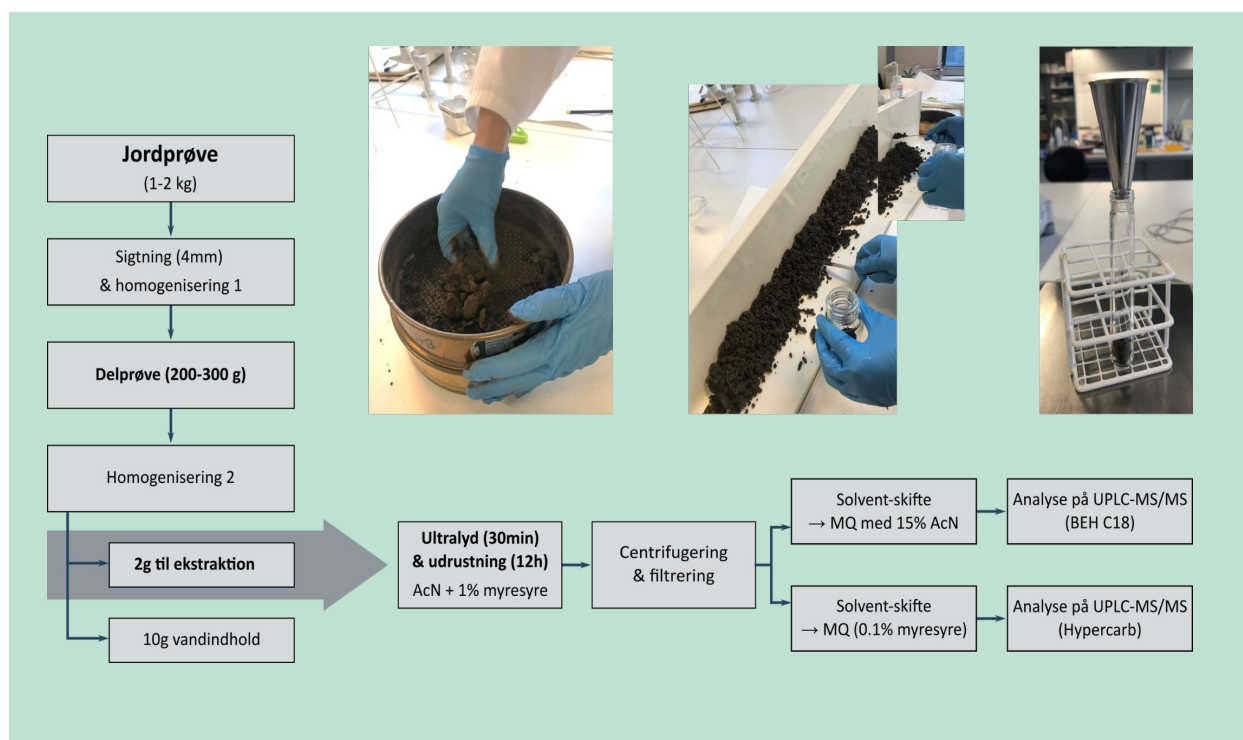
5 ng intern standard ($^{13}\text{C}_2$ -TRZ) blev tilsat prøven (op til 100 ml). Prøven blev ekstraheret ved fastfase-ekstraktion på en Supelclean EnviCarb-Plus kolonne (Supelco, 1ml, 400mg, reversible tube). Kolonnen blev konditioneret med 2 x 3ml metanol og efterfølgende 2 x 5ml Milli-Q vand. Prøven blev sat på med let vakuum. Efterfølgende blev kolonnen skyllet med 2 x 5ml Milli-Q vand og vendt om efter tørring med let vakuum. Stofferne blev elueret med 1 x 3ml metanol og 1 x 3ml acetonitril med 5% (v/v) myresyre. Til sidst blev prøven inddampet til tørhed (30°C, N₂) og genopløst med 1000µl Milli-Q vand med 0,2% (v/v) myresyre. Efterfølgende blev prøven analyseret på UPLC-MS/MS (Analysemetode 2). Den absolutte genfinding varierede mellem 26% og 104% - metoden blev optimeret til 1,2,4-triazol, dvs. metoden var ikke optimal til de andre metabolitter. Med en matrix-matched kalibrering, som blev ekstraheret sammen med prøverne, kunne metoden dog bruges til en korrekt kvantificering af stofferne, som ikke blev repræsenteret tilfredsstillende af de interne standarder.

5.1.3 Jordprøver

Jordprøver blev sigtet og en repræsentativ delprøve ekstraheret med en kombination af ultralyd og udrystning som beskrevet nedenfor

5.1.3.1 Prøveforberedelse

Udtagning af en repræsentativ jordprøve til ekstraktion er en meget vigtig del i analyser af jord. Det handler ikke kun om udtagning i felten, men i lige så høj grad også den videre neddeling og prøvetagning i laboratoriet. Derfor blev jorden omhyggeligt homogeniseret og prøvemængden reduceret til 2 g som vist i FIGUR 7. Alt udstyr blev rensset grundigt med ethanol og Milli-Q vand mellem hver prøve. Prøverne blev optøet i køleskab i to dage og efterfølgende sigtet til 4 mm. Derefter blev de sigtede prøver homogeniseret ved bed-blanding, dvs. minimum 15 lag blev lagt ud i en 1-meter lang metalrende. Sammensatte delprøver på 200-300g blev udtaget ved min. 30 tværgående prøvetagninger fordelt over hele renden med bagenden af en lille ske og samlet i 100-ml syrevaskede red-cap flasker. Efter delprøveudtag, blev resten af prøven i renden gemt i en rilsanpose og opbevaret på frys som backup. Delprøverne blev homogeniseret igen med endnu en bed-blanding (minimum 10 lag i renden) og repræsentative delprøver til ekstraktion (2 g) blev udtaget ved minimum 8 tværgående prøvetagninger. Parallelt med prøveudtag til ekstraktion blev 10 g-delprøver udtaget fra samme udlægning til bestemmelse af vandindhold (105 °C natten over).



FIGUR 7. Oparbejdning af jordprøver i laboratoriet: to-trins homogenisering, efterfulgt af ekstraktion ved udrustning og ultralyd.

5.1.3.2 Ekstraktion af jord - kombination af ultralyd- og rysteekstraktion

Til 2 g jord blev internt standard tilsat (hhv. $^{13}\text{C}_2$ -TRZ ved analyse af nedbrydningsprodukterne eller TBZ-D₉, PPZ-D₅, DFZ-D₆ ved analyse af moderstoffer eller både og, 5 ng af hver) og efterfølgende 4 mL acetonitril (v/v 1% myresyre). Prøverne blev sat i 15 min ultralyd og derefter på rystebord i ca. 15 timer. Prøverne blev centrifugeret (1500rpm, 1495g, 20min) og ekstraktet filtreret (PTFE-filtrer, 0,22 µm). Ekstraktet blev gemt i fryseren indtil analyse.

Til analyse af triazol-moderstofferne, inkl. PTZ-S, blev 1000 µl prøve inddampet til tørhed (30°C, N₂), genopløst først med 150 µl acetonitril og efterfølgende 850 µl MQ-vand. Alternativt, blev 150 µl ekstrakt blandet med 850 µl Milli-Q vand (injektionsvolumen blev i disse tilfælde opjusteret til 67 µl). Prøverne blev analyseret på UPLC-MS/MS (Analysemetode 1).

Til analyse af nedbrydningsprodukterne blev 2000 µl prøve inddampet til tørhed (30°C, N₂), genopløst med 1000 µl Milli-Q vand med 0,2% (v/v) myresyre og analyseret på UPLC-MS/MS (Analysemetode 2). Den absolutte genfindning varierede mellem 45-80% for metabolitter og 80-100% for moderstofferne. Metoden inkluderede ret forskellige stoffer, og var derfor ikke optimeret til dem alle sammen på lige fod. Med en matrix-matched kalibrering, som blev ekstraheret sammen med prøverne, kunne metoden dog bruges til en kvantificering af stofferne, som ikke blev repræsenteret tilfredsstillende af de interne standarder.

5.1.4 Analyse på UPLC-MS/MS

Alle stoffer bliver analyseret med UPLC-MS/MS (Acquity Classic UPLC med Xevo TQ-S micro MS fra Waters). To forskellige metoder blev udviklet. Den ene til moderstofferne og PTZ-S og den anden til de små nedbrydningsprodukter. Prøverne blev analyseret ved dobbelt-injektion, hvor alle resultater i rapporten er middelværdier af de to injektioner.

5.1.4.1 Analysemetode 1: Moderstoffer

Metoden er udviklet på en ACQUITY UPLC BEH C18 kolonne (50mm x 2.1mm, 1.7µm partikler, Waters). Kolonetemperaturen er 50°C. Mobilfasen er (A) acetonitril og (B) vand (Milli-Q) med 0,1% myresyre. En multi-step gradient ved 0,6 ml/min blev brugt til at separere stofferne: 0 min 15% A → 1,5 min 40% A → 1,6 min 55% A → 2,2

min 57% A → 2,3 min 98% A → 3,0 min 98% A → 3,1 min 15% A → 4 min 15% A. Massespektrometret kørte med følgende parameter: Ionization: ESI+, Desolvation temperature: 500°C, Desolvation gas flow: 1000 l/h, Cone gas flow: 30 l/h, Capillary: 2V, Source temperature: 150°C. Stofferne blev analyseret med en kvantificeringsion og en kvalificeringsion (TABEL 5). Injektionsvolumen var 10 µl.

TABEL 5. Massespektrometriske indstillinger til moderstofferne inkl. PTZ-S (cone voltage, kvantificeringsionspor med kollisionsenergi samt minimum ét kvalificeringsionspor).

Stof	Leverandør	Cone [V]	Kvant. ion (Kollisionsenergi CE)	Kval. ion (Kollisionsenergi CE)
Tebuconazol, TBZ	Sigma-Aldrich	45V	308 → 70 (CE 18V)	310 → 70 (CE 18V)
Propiconazol, PPZ	Sigma-Aldrich	40V	342 → 69 (CE 19V)	342 → 159 (CE 25V)
Epoxiconazol, EPZ	Sigma-Aldrich	40V	330 → 121 (CE 19V)	330 → 70 (CE 18V)
Metconazol, MTZ	Sigma-Aldrich	40V	320 → 70 (CE 20V)	320 → 125 (CE 30V)
Difenoconazol, DFZ	Sigma-Aldrich	40V	406 → 251 (CE 24V)	406 → 188 (CE 45V)
Prothioconazol, PTZ*	Sigma-Aldrich	40V		344 → 326 (CE 9V) 346 → 328 (CE 10V)
Prothioconazol-desthio, PTZ-S	Sigma-Aldrich	32V	312 → 70 (CE 22V)	312 → 125 (CE 34V)
Florasulam, FLM	Sigma-Aldrich	40V	360 → 129 (CE 20V)	360 → 109 (CE 58V)
Tebuconazol-D₉, TBZ-D₉ Tebuconazole-(tert-butyl-D ₉)	Sigma-Aldrich	45V	312 → 70 (CE 22V)	312 → 125 (CE 34)
Propiconazol-D₅, PPZ-D₅ Propiconazole-(2,2,3,3,3-propyl-D ₅)	LGC standards	38V	347 → 74 (CE 19V)	347 → 159 (CE 25V)
Difenoconazol-D₆, DFZ-D₆ Difenoconazole-(1,1,2,3,3,3-propyl D ₆)	LGC standards	40V	412 → 251 (CE 27V)	312 → 343 (CE 18V)

* Kun kvalitativ

5.1.4.2 Analysemetode 2: Nedbrydningsprodukter

Prøverne blev analyseret på UPLC-MS/MS ved brug af en Hypercarb^{HT} kolonne (100mm x 2.1mm, 3µm partikler, Thermo Fisher Scientific). Kolonneovnen blev sat på 40°C. Mobilfasen var (A) acetonitril og (B) vand (Milli-Q), begge med 0,2% myresyre. En multi-step gradient ved 0,25 ml/min blev brugt til at separerer stofferne: 0-4 min 1%→15% A; 4-5 min 15%→95% A; 5-6 min 95% A; 6-6,1 min 95%→1% A; 6.1-14 min 1% A. Massespektrometret kørte med følgende parameter: Ionization: ESI+, Desolvation Temperatur: 500°C, Desolvation Gas: 1000 l/h, Cone Gas: 30 l/h, Capillary: 0.5V, Source Temperatur: 150°C. Stofferne blev analyseret med en kvantificeringsion og en kvalificeringsion (TABEL 6). Ved direkte analyse af vandprøver blev 100 µl injiceret til UPLC'en, mens 10 µl blev injiceret af både fastfase- og jordekstrakter.

TABEL 6. Massespektrometriske indstillinger til nedbrydningsprodukterne (cone voltage, kvantificeringsionspor med kollisionsenergi samt minimum ét kvalificeringsionspor).

Stof	Leverandør	Cone [V]	Kvant. ion (Kollisionsenergi CE)	Kval. ion (Kollisionsenergi CE)
1,2,4-Triazol, 124-TRZ	Sigma-Aldrich	40V	70 → 43 (CE 13V)	70 → 70 (CE 2V)
1,2,3-Triazol, 123-TRZ	Sigma-Aldrich	40V	70 → 43 (CE 13V)	70 → 70 (CE 2V)
Triazol alanin, TA	Sigma-Aldrich	30V	157 → 88 (CE 15V)	157 → 70 (CE 10V)
Triazol eddikesyre, TAA	Sigma-Aldrich	20V	128 → 70 (CE 16V)	128 → 59 (CE 20V)
Triazol sulfonamid, TSA	LGC standards	36V	149 → 132 (CE 14V)	149 → 70 (CE 18V)
1,2,4-Triazole-¹³C₂, TRZ-¹³C₂	TRC Canada	28V	72 → 44 (CE 12V)	72 → 72 (CE 4V)

5.1.5 Validering, detektionsgrænser og kvalitetssikring

Den detaljerede validering af metoden findes i kapitel 6. Den optimerede og internt validerede metode til analyse af 1,2,4-triazol i vand blev yderligere valideret i en interlaboratorie-sammenligning med Eurofins. TABEL 7 viser detektions- (LOD) og kvantificeringsgrænserne (LOQ) for triazol-fungicider og deres nedbrydningsprodukter i vand og jord. Til vandanalyserne med direkte injektion blev de instrumentelle grænser for detektion og kvantificering bestemt som hhv. signal/støj = 3 og signal/støj = 10. De metodiske detektions- og kvantificeringsgrænser af vand- og jordekstraktion er opgivet som hhv. 3x og 10x standardafvigelsen bestemt ved en lav koncentration tæt ved LOQ (vand: 0,01 µg/L; jord: 2 µg/kg, n=5). Da sensitiviteten af UPLC-MS/MS-analysen varierede lidt i løbet af projektet, kan det forekomme at koncentrationer under den her viste LOD blev oplyst. I disse tilfælde var som minimum et signal/støj-niveau på min. 3 opfyldt samt forholdet mellem kvantificerings- og kvalificerings-ion var korrekt.

TABEL 7. Detektionsgrænser (LOD) og kvantificeringsgrænser (LOQ) for triazol-fungicider og dens nedbrydningsstoffer i vand og jord.

Stof	Vandprøve (direkte)		Vandprøve (ekstrakt)		Jord (ekstrakt)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Tebuconazol, TBZ	0,02 µg/L	0,06 µg/L	-	-	0,3 µg/kg	0,8 µg/kg
Propiconazol, PPZ	0,03 µg/L	0,11 µg/L	-	-	0,2 µg/kg	0,8 µg/kg
Epoxiconazol, EPZ	0,08 µg/L	0,26 µg/L	-	-	0,3 µg/kg	1,1 µg/kg
Metconazol, MTZ	0,01 µg/L	0,03 µg/L	-	-	0,3 µg/kg	1,1 µg/kg
Difenoconazol, DFZ	0,10 µg/L	0,34 µg/L	-	-	0,3 µg/kg	1,0 µg/kg
Prothioconazol-desthio, PTZ-S	0,02 µg/L	0,06 µg/L	-	-	0,3 µg/kg	0,9 µg/kg
Florasulam, FLM	0,04 µg/L	0,04 µg/L	-	-	0,2 µg/kg	0,7 µg/kg
1,2,4-Triazol, 124-TRZ	0,02 µg/L	0,07 µg/L	0,003 µg/L	0,011 µg/L	0,4 µg/kg	1,4 µg/kg
1,2,3-Triazol, 123-TRZ	0,13 µg/L	0,42 µg/L	0,004 µg/L	0,013 µg/L	1,5 µg/kg	5 µg/kg
Triazolalanin, TA*	0,04 µg/L	0,13 µg/L	0,004 µg/L	0,012 µg/L	>30 µg/kg	>30 µg/kg
Triazoleddikesyre, TAA*	1,0 µg/L	3,0 µg/L	> 0,3 µg/L	> 0,3 µg/L	1,5 µg/kg	5,0 µg/kg
Triazolsulfonamid, TSA	0,003 µg/L	0,01 µg/L	0,008 µg/L	0,026 µg/L	1,0 µg/kg	3,4 µg/kg

* Ved metodevalidering til vandprøverne havde vi meget god sensitivitet for triazol alanin, mens sensitiviteten for triazol eddikesyre var relativt dårlig. Med indkøb af en ny Hypercarb kolonne blev det omvendt. LOD/LOQ ved jord ekstraktion med ny Hypercarb-kolonne.

Til kvalitetssikring af de enkelte analyser, blev der altid kørt metodiske blind- og kontrolprøver (spike til matrix) sammen med prøverne; type og antal er noteret ved de enkelte forsøg. Relativt store matrixeffekter kunne observeres for især 1,2,4-triazol og de andre nedbrydningsprodukter. Da der desværre ikke kunne skaffes interne standarder til alle stoffer, blev alle kalibreringer i TRIAFUNG-projektet lavet i standardmatrix matchende til forsøget (dvs. jord eller vandig jordekstrakt med jord fra en økologisk landbrugsmark, Svanholm Gods, Skibby, Danmark) og behandlet ligesom prøverne.

5.1.6 HRMS suspect screening af jordprøver for gamle moderstoffer og moderstoffernes nedbrydningsprodukter

Ekstrakter fra udvalgte jordprøver blev analyseret på en high resolution UPLC-qTOF (Elute OLE UHPLC & UHR-TIMS-Q-TOF, Bruker). Selve analysen fulgte Brukers TargetScreener pakke til pesticider, for flere detaljer se <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/ms-solutions/targetscreener.html>, som beskriver kolonne, solventer, gradient, temperaturer og indstillinger på MS'en (bbCID). TargetScreener suspektlisten blev udvidet så den indeholdt alle triazol-aktivstofferne, som har været på markedet i Danmark (propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, prothioconazol, difenoconazol, metconazol, triadimenol, triadimefon, bitertanol, penconazol, paclobutrazol, cyproconazole, flusilazole, fluquinconazol; afsnit 4.2), bortset fra amitrol, som ikke kan detekteres med metoden. Derudover blev listen udvidet med alle triazol-nedbrydningsprodukterne opført i EFSA- og

FAO-rapporterne, og seneste litteratur (El Azhari et al., 2018; Kiefer et al., 2019; Man et al., 2021) for de 6 aktivstoffer, som er modelstoffer i TRIAFUNG, samt naturstoffet essramycin.

5.2 Feltforsøg til bestemmelse af naturlig dannelse af 1,2,4-triazol

5.2.1 Installation af sugeceller ved Svanholm Gods, april 2020

Vi installerede tre sugeceller af typen Prenart Supersteel (FIGUR 8) den 22-23/4-2020 på hver af fem forskellige lokaliteter ved Svanholm Gods (FIGUR 9). Sugecellerne blev installeret som følger (FIGUR 10): Der blev gravet et hul (2 m langt, 1 m bredt, 0,7 m dybt) med rendegraver. I 0,7 m dybde bankedes en metalstang (24 mm i diameter, 110 cm lang) på skrå, indtil spidsen var i ca. 1 m dybde og ca. 1 m inde under mark/eng/skovbund, hvorefter metalstangen blev fjernet, så der var et åbent hul til installation af sugeceller. Proceduren blev gentaget to gange, så der var tre huller med ca. 1 m afstand, hvori sugecellerne kunne placeres. Sugecellerne blev påsat 4 m slange (FEP, OD 1/8", ID 1.8mm, Prenart) og mættet med silikamel (Prenart) ved at påsætte undertryk, mens de var placeret i en tynd opslæmning af silikamel i MiliQ-vand og herefter installeret i bunden af hullet, hvor der umiddelbart forinden var placeret en opslæmning af 160 g silikamel i 70 ml Milli-Q vand. Herefter blev der placeret ca. 30 cm filtersand (0,4-0,9 mm, ROTEK) og installationshullet blev enten fyldt med bentonit (lokalitet 3 og 9) eller jord fra bunden af det udgravede hul (øvrige lokaliteter). Det gravede hul blev herefter med håndkraft fyldt med den jord, der var gravet op. Der blev løbende stampet i hullet. Til sidst blev alle sugeceller koblet til 1l-flasker og der blev påsat et undertryk på 650 mbar. Før installation blev det undersøgt i laboratoriet, at sugecellerne og slangen ikke adsorberede 1,2,4-triazol. Fra bunden af hullerne blev der udtaget jordprøver til karakterisering af jorden i den dybde hvor sugecellerne sidder eller lige over.



FIGUR 8. . Prenart, Supersteel sugeceller i rustfrit stål. Diameter er 20 mm. Gennemsnitlig porestørrelse er 0,05 μm



FIGUR 9. Oversigt over sugecellelokaliteter ved Svanholm Gods. Lokalitet 1 var sandet jord i omdrift. Lokalitet 2 var våd eng/græsmark. Lokalitet 3 var leret jord i omdrift. Lokalitet 4 var tør eng/græsmark. Lokalitet 5 var bøgeskov på sandet jord. Der blev installeret tre sugeceller pr. lokalitet



FIGUR 10. Installation af sugeceller. 1. Gravning af arbejdshul (lokalitet 2). 2. Bankning af installationshul (lokalitet Sv4). 3. Silikamel-opslæmning hældes i bunden af hullet før sugecellen installeres. 4. Sugeceller installeret med slanger stikkende ud i ca. 70 cm dybde (lokalitet 2). 5. Installation af flasker, overløbsflaske og pumpe i alu-case. 6. Færdig installation (lokalitet 3).

5.2.2 Installation af sugeceller i Tisvilde Hegn, maj/juni 2020

GEUS har i mange år haft en prøvelokalitet midt i Tisvilde Hegn i Nordsjælland i en tæt bevoksning af gran og fyr (FIGUR 11). Lokaliteten ligger i et område med forholdsvis ekstensivt drevet skov med ca. 50 år gamle skovfyr, som er plantet, men med mange selvsåede graner og også en del birk. Området har været skov i mindst 150 år, men sandsynligvis længere. Skoven blev plantet for at stoppe sandflugt i området og jorden er meget sandet. På prøvelokaliteten er der installeret sugeceller, som var i brug fra 2008-2010. Der blev gjort et forsøg på at "genoplive" de gamle sugeceller, men kun en enkelt i 1,6 m dybde var stadig funktionsdygtig. Der blev derfor installeret yderligere to sugeceller på samme måde som ved Svanholm. De blev nummeret TH1 og TH3, mens den gamle blev nummeret TH2 (TH1 installeret ca. 1 m til venstre og TH3 ca. 1 m til højre for den gamle (FIGUR 12).



FIGUR 11. Placering af skov-lokaliteten i Tisvilde Hegn (TH) og hede-lokaliteten i Asserbo Plantage (AP).



FIGUR 12. Sugecelleinstallation på GEUS' feltlokalitet i Tisvilde Hegn. Venstre: Jordprofil til ca. 30 cm under terræn, herunder er ensartet gult sand. Højre: Oversigtsbillede ved installationen med angivelse af sugecellernes omtrentlige placering.

Derudover blev der forsøgsvist installeret en "mobil" stål-sugecelle 30 m fra de permanente sugeceller i en mere åben lærke-bevoksning (TH4, FIGUR 13). Denne celle sidder placeret i ca. 80 cm dybde. I modsætning til alle øvrige lokaliteter, er der altså på TH-lokaliteten ikke placeret tre replikate stål-sugeceller i 1 m dybde, men blot to som så er suppleret med en teflon-sugecelle i 1.6 m dybde (TH2 – installeret 2008) og dertil en mobil stål-sugecelle i en nærliggende men anderledes bevoksning (TH4).



FIGUR 13. Mobil sugecelle installeret i Tisvilde Hegn. Opsamlingsflaske med påsat undertryk er under træpladen.

Tre sugeceller blev installeret på en hedelokalitet i Tisvilde Hegn/Asserbo Plantage (AP, FIGUR 11) efter samme metode som ved Svanholm Gods. Arealet ligger i et skovområde. Ifølge oplysninger fra Naturstyrelsen har der dog sandsynligvis aldrig vokset skov lige på dét areal (ikke tilplantet i hvert fald) og det har sandsynligvis været hede-lignende areal siden sandflugten for mere end 150 år siden, muligvis med periodevis afgræsning. I hvert fald har arealet været naturplejet som hede siden 1980 ved fjernelse af trævækst bortset fra enebærbuske. Arealet er domineret af hedelyng, men med områder med mosebølle og ene (FIGUR 14). Som ved Svanholm blev sugecellerne placeret med ca. 1 m afstand og nummereret 1-3. AP1 er placeret under mosebølle og hedelyng. AP2 er placeret under hedelyng. AP3 er placeret under hedelyng og ene. Ved installationen kunne vi konstatere, at grundvandsspejlet stod lige omkring 1 m dybde. Dermed er sugecellerne placeret lige omkring grundvandsspejlet, som det stod pr. 3. juni 2020. Sandsynligvis fluktuerer grundvandsspejlet ikke meget i området, men det kan tænkes at sugecellerne periodevist vil være lige over og periodevist lige under grundvandsspejlet.



FIGUR 14. Hedelokalitet ved Asserbo Plantage (AP). Venstre: Jordprofil til ca. 70 cm under terræn. Højre: Installationens placering på arealet med angivelse af sugecellernes omtrentlige placering under forskellige typer vegetation.

5.2.3 Drift af sugeceller

Undertryk blev enten påsat med håndpumpe eller med membranpumpe med 12V-batteri. Ved anvendelse af håndpumpe pumpedes et undertryk på 0,7 bar, som derefter langsomt gik mod nul, når porevand blev suget over i flasken, eller eventuelt poreluft i tørre perioder. Ved anvendelse af 12V-pumpe påsattes et undertryk på 0,65 bar. Når undertrykket faldt til 0,35 bar, blev der automatisk genpumpet til 0,65 bar. Vi havde tre 12V-pumper, som generelt stod placeret på lokalitet 1, 3 og TH. På den lerede og lavtydende lokalitet 3, indstilledes pumpen dog efter første prøvetagning til at holde et undertryk mellem 0,6-0,7 bar for at øge vandmængden. Efter installation blev der jævnligt påsat undertryk og tømt flasker alene med det formål at fjerne eventuel påvirkning fra installationen. Efter udsnid af mindst 1 liter pr. sugecelle (dog kun ca. 300 ml for lokalitet 3) påbegyndtes prøvetagning ca. hver tredje måned. Prøvetagning foregik ved, at der påsattes undertryk og efter 5-7 dage blev indsamlet vandprøver, som dernæst blev transporteret til laboratoriet, hvor de blev opbevaret i køleskab og analyseret for triazolnedbrydningsprodukter efter fastfase-ekstraktion som beskrevet i afsnit 5.1 inden for maksimalt 3 dage.

Eventuel nedbrydning af 1,2,4-triazol under henstand i flasker i felten eller under efterfølgende opbevaring i køleskab blev testet ved at spike jordvand blandet fra forskellige sugeceller med 1,2,4-triazol i laboratoriet (0,3 µg/l, fra vandig standard) og analysere indholdet løbende gennem 14 dages opbevaring ved enten 4 eller 20°C. Lige inden analysen blev den interne standard tilsat, prøven filtreret og efterfølgende analyseret ved direkte injektion som beskrevet i afsnit 5.1 På lokalitet 1 og 3 blev temperaturen i kassen målt under en én uge lange prøvetagning. Disse målinger viste aldrig over 20 grader, og ved de fleste prøvetagninger stod flaskerne ved langt lavere temperaturer.

5.2.4 Jordprøver - overfladejord

Ved vandprøvetagningerne blev der også udtaget jordprøver, men kun prøverne fra 28/8-2020 og 27/1-2021 blev analyseret. Jordprøverne bestod for hver lokalitet af en blanding af 10 delprøver fra 0-15 cm dybde udtaget med et jordspyd (FIGUR 15). Prøverne blev taget tilfældigt indenfor en afstand af 10 m fra sugecellerne, men ikke direkte over sugecellerne for at undgå påvirkning af vandstrømning gennem jorden. For lokaliteterne TH og AP blev hver delprøve delt i to, så O-horisonten (mor-laget) blev holdt for sig selv. Jordprøverne blev udtaget direkte i en rilsanpose (PB Miljø) og frosset samme dag (-18°C). Efter optøning blev jorden sigtet gennem 4 mm-sigte til homogenisering, ekstraktion og analyse af 1,2,4-triazol, 1,2,4-triazolalanin og 1,2,4-triazoleddikesyre som beskrevet i afsnit 5.1.



FIGUR 15. Eksempel på delprøve udtaget med jordspyd (lokalitet AP).

Homogenisering og udtag af repræsentative delprøver foregik som beskrevet i afsnit 5.1. ved to-trins homogenisering og prøveudtag, dog med en mindre modifikation: sigtning til 4 mm blev først foretaget inden anden homogenisering, da samme prøve skulle bruges til karakterisering af jorden (sigteanalyse, glødetab og hydrometeranalyse). Pga. en anderledes struktur blev O-horisont-prøverne fra TH- og AP-lokaliteterne behandlet lidt anderledes. Disse prøver blev homogeniseret i en kaffemølle. Derefter bliver prøven homogeniseret ved bed-blending og der blev udtaget delprøver, dels til ekstraktion efter yderligere homogenisering, dels til glødetabsanalyse. Prøverne blev ikke karakteriseret ved sigte- og hydrometeranalyse.

5.2.5 Ekstraktion og analyse af jordprøver

Jordprøverne blev ekstraheret og analyseret for triazol-moderstoffer og nedbrydningsprodukter som beskrevet i afsnit 5.1. Sammen med prøverne ekstraheredes en positiv kontrolprøve (Ottawa sand, 5 µg/kg), 2 blindprøver (ren Ottawa sand inkl. sigtning og bed-blending) og en teknisk blind (ren Pyrex rør), ligesom for alle andre prøver.

5.2.6 HRMS suspect screening af jordprøver for gamle moderstoffer og kendte nedbrydningsprodukter

Efter analysen på LC-MS/MS blev udvalgte ekstrakter fra Svanholm-jordprøver screenet med HRMS suspect screening for tilstedeværelse af triazol-moderstoffer og nedbrydningsprodukter som beskrevet i afsnit 5.1. Da enkelte prøver var brugt efter LC-MS/MS analysen, blev kun følgende prøver analyseret: Sv1 (28/8-2020), Sv2, Sv3, Sv4, Sv5 (27/1-2021).

5.2.7 Indsamling og analyse af nedbørsprøver

I et tidligere projekt blev tre nedbørsopsamlere installeret på lokalitet TH i Tisvilde Hegn for at opsamle nedbør i åbent terræn mellem spredte lærketræer (L3) og under nåletræsbeplantning med rødgran, fyr og birk (G2 og G3). Nedbørsopsamlerne er simpelt konstruerede med en stål-tragt, som er placeret i halvanden meters højde på toppen af et PVC-rør og påsat en polyamid-slange (FIGUR16). Slangen blev stukket gennem låget til en glasflaske, så fordampningen var minimal; men overtryk kunne undslippe, når nedbøren løb fra slangen til flasken. Glasflasken stod i PVC-røret ca. 40 cm under jordoverfladen for at minimere frysning om vinteren og opvarmning om sommeren. Vi indsamlede nedbør d. 14. september, 14. december 2021 og 15. maj 2022. I alle tilfælde blev flaskerne tømt en uge inden prøveindsamling, så nedbøren maksimalt har opholdt sig en uge i flaskerne. Nedbørsprøverne blev analyseret for triazol-nedbrydningsprodukter på samme måde som sugecellevandet.



FIGUR 16. Nedbørsopsamler i Tisvilde Hegn (1) og fotos taget fra toppen af de to nedbørsopsamlere G2 (2) og G3 (3), som var placeret under nåletræsbeplantning.

5.2.8 Moderstoffer i halm, kompost, kokasser og friske nåle

Den 14/12-2021 udtog vi prøver fra Svanholms halm-lager. Det var muligt at få økologisk halm produceret på Svanholm, samt halm fra forskellige konventionelle landmænd i nærområdet fra årene fra 2019, 2020 og 2021. Prøverne blev udtaget som blandprøver af mindst 5 halmballer fra hvert år. Derudover blev der udtaget en blandprøve fra 10 kokasser på lokalitet 2 og en blandprøve fra en stor kompostbunke, som indeholdt diverse staldrester. Nåle blev indsamlet fra rødgran og lærk på lokalitet TH ved at klippe de yderste skud eller sideskud af med en saks og holde en pose under, for at minimere risikoen for kontaminering af nålene i felten. Hver nåleprøve bestod af nåle fra mindst 5 træer og fra forskellige højder (1-2,5 m over terræn). Da prøverne var enkelt-replikater fra felten, blev alle prøver ekstraheret som duplikat i laboratorie.

Ekstraktionen fulgte protokollen for jordprøver (afsnit 5.1, prøverne til duplikat blev udtaget i anden homogeniseringsstrin), dog med mindre ændringer: 1) Da ingen matrix uden stofferne var tilgængelig, blev prøverne kvantificeret ved brug af standardadditionsmetoden. For at begrænse det totale antal prøver, blev dog kun en enkelt halm- (Svanholm) og nåleprøve (friske nåle) brugt som kalibrering til de øvrige prøver af samme type. 2) Kokasse- og kompostprøver blev frysetørret inden homogenisering og ekstraktion. 3) Volumen af prøverne fyldte betydeligt mere end fra 2 g jord, derfor blev prøverne ekstraheret med hhv. 20 ml (halm, nåle) eller 25 mL (kokasse, kompost) solvent. En blanding af Milli-Q vand og acetonitril (v:v 1:4, 1% myresyre) blev brugt som ekstraktionssolvent, da prøverne var meget tørre.

5.3 Laboratorieforsøg til belysning af potentiel 1,2,4-triazol udvaskning fra bejdsset såsæd og test for omdannelse af prothioconazol, florasulam og pyroxsulam til 1,2,4-triazol.

Forsøgsopstillingen bestod af pakkede jordsøjler i rustfri stålkolonner. Der var 7 forskellige behandlinger inklusiv negative kontroller (TABEL 8). 1) Bygfrø (3 korn per søjle) som var bejdsset med prothioconazol og tebuconazol. 2) Kontrol uden frø og uden fungicid. 3) Økologiske bygfrø (3 korn per søjle) og rent prothioconazol tilført i sådybde i en mængde svarende til mængden på de bejdsede frø som opgivet af producenten (13,5 µg per kolonne). 4) Økologiske bygfrø (3 korn per søjle) og rent tebuconazol tilført i sådybde i en mængde svarende til mængden på de bejdsede frø som opgivet af producenten (1,8 µg per kolonne). 5) Kontrol kun med økologiske frø. 6) Rent florasulam tilsat fra toppen opløst i vand. 7) Rent pyroxsulam tilsat fra toppen opløst i vand.

Rent prothioconazol, tebuconazol, florasulam og pyroxsulam blev opløst i acetonitril i passende mængder og fortyndet 1000x i Milli-Q vand inden tilsætning til kolonnerne. Den bejdsede byg var den vårbyg, som blev sået på VAP-marken ved Estrup den 8/4-2019 (180 kg udsæd/ha, sortsblanding 1215 C2 Ø, batch nr. 20MA1148) og var ifølge DLG bejdsset med 50 ml Redigo Pro 170 FS per 100 kg korn. Redigo Pro 170 FS indeholder ifølge Middel-databasen prothioconazol (150 g/l) og tebuconazol (20 g/l), hvilket svarer til 10 mg/kg tebuconazol og 75 mg/kg prothioconazol. Den økologiske udsæd var også vårbyg fra DLG. Florasulam og pyroxsulam blev begge tilsat i 10x typisk markdosis, for at øge sandsynligheden for at detektere en mindre dannelse af 1,2,4-triazol. Det vil sige, at hvor en typisk markdosis er henholdsvis 5 og 7 g aktivstof pr. hektar, så tilsatte vi stof til søjlerne svarende til henholdsvis 50 og 70 g/ha. I søjleforsøgene svarer dette til ca. 40 µg/kg for florasulam og ca. 60 µg/kg for pyroxsulam.

Forsøget blev udført i delforsøg: Først testede vi om 1,2,4-triazol udvaskede fra bejdsede frø (delforsøg, A, behandling 1 og 2), dernæst testede vi om den udvaskede 1,2,4-triazol stammede fra prothioconazol og/eller tebuconazol (delforsøg B, behandling 3,4 og 5), og til sidst testede vi, om nedbrydning af florasulam og pyroxsulam gav udvaskning af 1,2,4-triazol (delforsøg C, behandling 6 og 7). Replikater i hvert delforsøg (n=5 bortset fra delforsøg 3 hvor n=3) var tilfældigt fordelt under inkubationen.

Jorden til delforsøg 1 og 2 blev indsamlet fra pløjelaget på en økologisk mark ved Svanholm Gods (lokalitet Sv1), som har været dyrket økologisk i mere end 30 år. Jorden bestod mest af finsand (59%) og silt (25%), kun med en smule ler (2%) og 3% organisk stof. Jorden til delforsøg 3 (florasulam og pyroxsulam) kom fra lokalitet Sv4.

TABEL 8. Behandlinger til test for udvaskning af 1,2,4-triazol fra nedbrydning af bejdsede bygfrø, eller rent prothioconazol, tebuconazol, florasulam og pyroxsulam i pakkede jordkolonner (n=5 i behandling 1-5, n=3 i behandling 6-7).

Delforsøg	A	A	B	B	B	C	C
Behandling	1	2	3	4	5	6	7
Bejdsede korn	X	-	-	-	-	-	-
Økologiske korn	-	-	X	X	X	-	-
Rent prothioconazol	-	-	X	-	-	-	-
Rent tebuconazol	-	-	-	X	-	-	-
Rent florasulam	-	-	-	-	-	X	-
Rent pyroxsulam	-	-	-	-	-	-	X

5.3.1 Forsøgsopstilling

Forsøgsopstillingen er vist i FIGUR 17 og blev sat op som følger:

1. Søjler pakkes med 1 cm Ottawasand, mesh 20-30 (14 g – opvarmet til 100°C natten over).
2. Søjler pakkes derefter med 7 cm ikke-sigtet jord (ca. 60 g), i delforsøg C dog 10 cm.
3. I søjler med korn lægges tre korn per søjle. I søjler med rent prothioconazol, tebuconazol, florasulam eller pyroxsulam tilsættes stofferne opløst i 1 ml vand.

4. Søjlerne i delforsøg 1 og 2 pakkes derefter med 3 cm ikke-sigtet økologisk jord (ca. 25 g).
5. Søjlerne vandes med Milli-Q vand efter pakning, så næsten hele søjlen er opfugtet, 14 ml i delforsøg A og B, og 5 ml i delforsøg C hvor jorden havde et større vandindhold.
6. Søjlerne i delforsøg A og B inkuberes ved 20-22 °C i et vestvendt vindue med tilskudslys fra en rød/blå LED vækstlampe (ProPlant 6, 20W, 16-timers fotoperiode), søjlerne i delforsøg C (florasulam og pyroxsulam) blev inkuberet ved 20 °C i mørke.
7. I delforsøg A og B vandes søjlerne ugentligt med 4 × 5 ml Milli-Q-vand (= 30 mm) tilsat NPK (N: 25 mg/l, P: 2,5 mg/l, K: 15 mg/l). I delforsøg C vandes ugentligt til der er opsamlet ca. 10 ml perkolat (svarende til ca. 3 x 5 ml vanding). Vandingen fordeles over et par timer. Søjler med planter tilføjes ekstra vand, så mængden af perkolat svarer til søjler uden planter for at kompensere for planternes transpiration.
8. Perkolat opsamles indtil minimum 1 time efter hver vanding, perkolatet afvejes, omrystes let og 1 ml delprøve nedfryses til senere analyse for 1,2,4-triazol med direkte injektion som beskrevet i afsnit 5.1.
9. Søjler med planter vandes yderligere efter behov i sene vækstfaser for at undgå udtørring fx med 10 ml 1-2 gange pr. uge, dog kun så lidt, at der ikke er gennembrud af perkolat.
11. Efter 2 måneder "slægtes" søjlerne fra delforsøg A og B til jordanalyser (fraktion A-G, FIGUR 17) og planteanalyse for indhold af moderstoffer som beskrevet i afsnit 5.1.



FIGUR 17. Forsøgsopstilling (Albers et al., 2022). A) Planter dag 5. B) Dag 21, opsamling af perkolat i glasvials. C) Jordkolonnerne parteres ved forsøgets afslutning efter ca. 60 dages inkubation. D) Skematisk forsøgsopstilling med angivelse af de forskellige fraktioner, der analyseres for residuale moderstoffer ved forsøgets afslutning.

5.3.2 Fremstilling af gødningsvand til perkolering og vanding:

Til syrevasket 500 ml-flaske tilsættes ca. 497 ml Milli-Q-vand + 1 ml N-opløsning + 1 ml K-opløsning + 0,4 ml P1-opløsning + 0,6 ml P2-opløsning (giver pH 7 i blandingen).

N-opløsning: 35,7 g/l NH_4NO_3 , laves som 715 mg NH_4NO_3 i 20 ml Milli-Q-vand.

K-opløsning: 14,3 g/l KCl, laves som 286 mg KCl i 20 ml Milli-Q-vand.

P1: 5,6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, laves som 111 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 20 ml Milli-Q-vand.

P2: 7,2 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, laves som 144 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 20 ml Milli-Q-vand.

5.3.3 Prøvetagning af jord i søjlerne senest dagen efter sidste perkolering (delforsøg A og B)

1. "Overjordiske plantedele" klippes af og nedfryses hver for sig i alufolie.
2. Bunden drejes forsigtigt af søjlen. Metalnet og Ottawasand fjernes fra bunden. Herefter skubbes jorden forsigtigt ud af bunden med et PTFE-stempel fra toppen indtil de nederste 3½ cm kan prøvetages samlet på et stykke alufolie (prøve A). Herefter skubbes videre og resten opskæres med bred spartel i fraktioner i 1 cm-intervaller (prøver B-F) og til sidst de øverste 1½ cm (prøve G). Frøene bør ligge i prøve E (6,5-7,5 cm fra bunden af jordsøjlen). Notér, hvis det ikke stemmer.
3. Frø og rødder overføres til et stykke alufolie og nedfryses som "underjordiske plantedele".
4. Alle jordprøver nedfryses i alufolien og frysetørres.
5. Der udtages 2 g frysetørret jord til ekstraktion efter homogenisering på samme måde som større prøver (se afsnit 5.1), dog kun et enkelt bed-blandings-trin, pga den meget mindre prøvemængde.

5.3.4 Ekstraktion af jordprøver (delforsøg A og B)

Prøver fra forsøgets afslutning blev ekstraheret og analyseret som beskrevet i afsnit 5.1. Kontrolprøver (2 g jord spiket til henholdsvis 0,15 og 15 µg/kg med moderstofferne og nedbrydningsprodukter) blev frysetørret og ekstraheret på samme måde som prøverne (n=3). Disse prøver viste, at en analyse af 1,2,4-triazol og de andre nedbrydningsprodukter pga. frysetrørring ikke var muligt uden modifikation af metoden, hvorfor kun data for moderstofferne er rapporteret.

5.4 Feltforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i pløjelaget

Feltforsøget blev udført ved prøvetagning af Pesticidvarslingsprogrammets marker ved Fårdrup (lerjord), Estrup (lerjord), Lund (lerjord) og Jyndeved (sandjord). I feltforsøget følges markernes indhold af triazol-moderstoffer, stoffernes aged sorption og biotilgængelighed over tid. Markerne blev som udgangspunkt prøvetaget ca. hver tredje måned, men med ekstra prøvetagninger før- og efter sprøjtning med triazol-fungicider. Den primære prøvetagning på markerne og efterfølgende oparbejdning i laboratoriet bygger på en multi-incremental prøvetagningsstrategi, hvorved små delprøver på få gram til brug i laboratorieanalyserne bliver så repræsentative for markens middelværdi som muligt.

5.4.1 Primær prøvetagning af VAP-markernes pløjelag

Som udgangspunkt udtages på hver dato på hver mark tre uafhængige blandprøver, hver af ca. 20 stik fra pløjelaget (0-20 cm), hvor stikkene er fordelt diagonalt på marken fra skur/ISCO-samlere mod fjerneste hjørne (diagonalprøver). For at få uafhængige diagonalprøver foretages hele prøvetagningen tre gange, idet tre stik på hvert sted ville have givet korrelerede prøver. Materialer: jordspyd, metalske, store rilsanposer, stor kraftig plasticpose til at have udenom rilsanposerne under prøvetagning, poselukkere, feltnotesbog og skriveredskaber. Prøvetagning blev udført som følger:

1. Marken skridtes af diagonalt fra hjørnet med skur/ISCO-samlere mod fjerneste hjørne. Derefter beregnes hvor mange skridt, der skal være mellem hvert af de ca. 20 stik. Det er vigtigt, at der er næsten lige langt mellem stikkene, så hele diagonalen er ensartet repræsenteret, det er mindre vigtigt om der totalt er 19 eller 21 stik.
2. Jordspyd og metalske renses med ethanol.
3. Med jordspyddet tages først et prøvestik ved at presse spyddet 20 cm ned i jorden, hvorefter spyddet drejes en omgang og hives op, prøvestikket kasseres.
4. Derefter tages på samme måde 20 stik på marken. De 20 stik overføres til en rilsanpose med en metalske. Hvis der er grønne planterester i prøven, fjernes de. Lokalt, navn, dato og initialer noteres på rilsanposen.
5. Prøvetagningen gentages yderligere to gange.
6. Prøverne opbevares i skyggen under prøvetagning, og hvis muligt på køl indtil de ankommer på GEUS samme aften eller følgende dag. Undgå et varmt bagagerum. På GEUS opbevares prøverne ved minus 18 grader indtil prøveoparbejdning og analyse.

5.4.2 Oparbejdning i laboratoriet

For hver prøvedato og mark er der tre replikater, uafhængige diagonalprøver, der håndteres som individuelle prøver i laboratoriet. Prøverne blev oparbejdet, homogeniseret og reduceret til enten 2 g (total koncentration) eller 1 g (aged sorption, biotilgængelig fraktion) ved at følge protokollen i afsnit 5.1. Delprøven (~200-300g) til analyserne af aged sorption og biotilgængelig fraktion, blev udtaget fra samme udlægning som til analysen af total koncentration og gemt i fryseren indtil videre reducere til 1 g og efterfølgende ekstraktion.

Der skulle bruges repræsentative jordprøver til metodeoptimering. Vi udtog derfor ekstra delprøver (første-homogeniseringstrin) fra første diagonalprøve fra Jyndeved (1/4-2019) og Estrup (20/8-2019).

5.4.3 Bestemmelse af moderstoffernes total-koncentrationer.

Jordprøverne blev analyseret for totalt-ekstraherbart indhold af triazolmoderstoffer som beskrevet i afsnit 5.1 ved en kombination af ultralyd og udrystning med acetonitril (1%myresyre) og analyse på UPLC-MS/MS.

5.4.4 Bestemmelse af moderstoffernes aged sorption

1 g jord afvejedes i sorptionsrør (12-ml glasrør med låg med teflonindlæg) og der tilsættes 5 ml 10 mM CaCl₂. Rørene rystes grundigt manuelt for at opslæmme jorden og sættes derefter på blodvender i mørke i 10°C inkubator. Efter 24 h centrifugeres rørene i 30 min ved 1500 g. Supernatanten filtreres (hydrofil PTFE-filter, 0.22 µm). Præcis 1,2 ml supernatant overføres til UPLC-vial og der tilsættes 50 µl IS-F samt 300 µl MeOH. Prøverne analyseres med det samme på BEH C18 kolonne (injektionsvolumen 15µl) som beskrevet i afsnit 5.1.

5.4.5 Bestemmelse af moderstoffernes biotilgængelige fraktioner

1 g jord afvejedes i sorptionsrør (12-ml glasrør med låg med teflonindlæg). 10ml HPCD (77 g/l i 10 mM CaCl₂, Shaanxi Guanjie Technology Co., Shaanxi, China) tilsættes. Rørene rystes grundigt på Wortex for at opslæmme jorden og sættes derefter på blodvender i mørke i 10°C inkubator. Efter 140 h centrifugeres røret i 30 min ved 1500 g. Præcis 9 ml supernatant overføres til vials til ekstraktion med dichlormethan (DCM) og røret vejes igen. Til de 9 ml supernatant tilsættes 50 µl IS-F og 4 mL DCM og der rystes kraftigt i 30 min. Efter god faseseparering udtages DCM-fasen, filtreres (PTFE-filter, 0,22 µm) og præcis 3 ml fryses ned i 4-ml vials (hvis de ikke analyseres direkte). Til analyse inddampes DCM-prøverne og reopløses i 150 µl ACN og efterfølgende tilsættes 850 µl MilliQ-vand. Prøverne overføres til UPLC-vials og analyseres på BEH C18 kolonne som beskrevet i afsnit 5.1.

5.4.6 HRMS suspect screening af jordprøver for moderstoffer og kendte nedbrydningsprodukter

De tre replikater af diagonalprøverne fra alle fire VAP-markere ved første prøvetagning i 2019 (Estrup 01/04/2019, Fårdrup 24/05/2019, Jyndevad 01/04/2019, Lund 01/04/2019) blev screenet med HRMS for indhold af triazolmoderstoffer og nedbrydningsprodukter som beskrevet i afsnit 5.1.5.

5.5 Moderstoffers nedbrydning og aging i laboratorieforsøg

Vi udførte et laboratorieforsøg til beskrivelse af moderstoffernes nedbrydning, aged sorption og ændring i biotilgængelig fraktion under mere kontrollerede forhold end på VAP-markerne. Vi spikede tre forskellige økologiske jorde (TABEL 9) med forholdsvis høje moderstofkoncentrationer for at der var tilstrækkeligt stof i jorden til at kunne måle aged sorption. Forsøget blev udført ved, at vi satte et stort antal inkubationsrør op med 1 g jord i hvert rør, spikede med en blanding af triazol-fungiciderne og inkuberede i op til 300 dage ved 10 °C i en vandmættet atmosfære. Rør med autoklaveret jord blev brugt som kontrol for abiotiske processer. Over tid "slagtede" vi rør, så der i alle tilfælde var tale om ægte replikater (n=3). I modsætning til VAP-prøverne blev de enkelte rør ekstraheret sekventielt med CaCl₂, HPCD og acetonitril for at bestemme aged sorption (CaCl₂-ekstrakt), biotilgængelig fraktion (CaCl₂-ekstrakt + HPCD-ekstrakt) og total koncentration (CaCl₂-ekstrakt + HPCD-ekstrakt + acetonitril-ekstrakt).

TABEL 9. Jordparametre til laboratorieforsøg med ældning. Høj SOM: jord med højt indhold af organisk stof.

	Glødetab (%)	pH _{H2O}	pH _{CaCl2}	<2 µm	2-63 µm	0,063-0,2 mm	0,2-0,6 mm	0,6-2 mm	>2 mm
Sandet	3,0	8,17	7,05	1,4	28,5	59,2	8,41	1,39	1,12
Leret	4,4	6,12	5,5	8,5	55,0	22,9	9,56	2,94	1,00
Høj SOM	15,7	6,77	6,15	4,1*	37,0*	33,6	20,0	4,41	0,98

*Hydrometeranalyse usikker ved glødetab over 5% så fordelingen indenfor den fine fraktion (<63 µm) er usikker.

5.5.1 Forsøgsopstilling

Jordene blev indsamlet ved Svanholm Gods d. 21/8-2020 (sandet: lokalitet Sv1. leret: lokalitet Sv3. høj SOM: jord nær lokalitet Sv2 med højt indhold af organisk stof, TABEL 9), sigtet (2 mm) og opbevaret på køl indtil forsøgsstart d. 17/9-2020. Sigtet jord svarende til 1 g tørvægt blev afvejet i 12-ml pyrex-rør. Der blev så tilsat 100 µl vandig fungicid-opløsning svarende til ca. 0,7 µg/g for hvert af fungiciderne tebuconazol, propiconazol, metconazol, epoxiconazol, prothioconazol og difenoconazol, dog kun 0,4 µg/g difenoconazol pga. lav vandig opløselighed. Tilsvarende mængde vand uden fungicid blev tilsat til kontrolprøver. For at kunne tilsætte fungiciderne som vandig opløsning, måtte vi acceptere at lave opløsningen ud fra en standardopløsning i acetone og dermed 0,8 ml/l acetone i tilsætningsopløsningen, svarende til en startkoncentration af acetone på ca. 0,05 mg/g jord. Efter tilsætning af fungicid blev rørene påsat PE-film og elastik og afvejet til senere kontrol for tab af vand. I forsøget blev der inkluderet sterile kontroller ved autoklaveret jord direkte i de enkelte inkubationsrør inden tilsætning af fungicid. Rørene blev autoklaveret med tætsluttende skruelåg og gen-autoklaveret efter to døgnens henstand ved 10°C. Alle rør blev herefter placeret ved 10°C i en lukket kasse med vådt filterpapir i bunden for at minimere vandtabet.

Inkubationen stoppedes ved nedfrysning af tre rør med fungicider og ét kontrolrør efter 0, 1, 2, 4, 8, 15, 26 og 40 ugers inkubation. Inden nedfrysning testede vi de negative, autoklaverede kontroller for vækst ved udstrykning på R2A-agar og inkubation af pladerne i 4 uger ved stuetemperatur. Ved nedfrysningen blev PE-filmen erstattet af skruelåg med teflonliner. På start-dagen (T=0) blev der nedfrosset to sæt af hver tre replikater, det ene til sekventiel ekstraktion, det andet til ekstraktion kun med acetonitril, for at evaluere effektiviteten af den sekventielle ekstraktion i den konkrete opsætning. Forsøget blev kørt helt til ende før ekstraktionen blev påbegyndt.

5.5.2 Sekventiel ekstraktion

Calciumklorid-ekstraktion: Rør med jord afvejedes og der tilsattes 5 ml 10 mM CaCl₂ til prøven. Rørene rystedes grundigt manuelt for at opslæmme jorden og sattes derefter på blodvender i mørke i inkubator ved 10°C. Efter 24±2 timer centrifugeredes prøverne (30 min ved 1500 g). 1,2 ml CaCl₂-opløsning overførtes til UPLC-vial og der tilsattes 50 µl intern standard samt 300 µl MeOH. Prøverne analyseredes med det samme med direkte injektion på BEH C18-kolonne som beskrevet i afsnit 5.1.

HPCD-ekstraktion: Resten af CaCl₂-opløsningen dekanteredes forsigtigt af og røret blev vejet igen. 10 ml HPCD (50 mM = 77 g/l i 10 mM CaCl₂) tilsattes prøven. Rørene rystedes grundigt manuelt for at opslæmme jorden og

blev sat på blodvender i mørke i 10°C-inkubator. Efter 140±5 timer blev rørene centrifugeret (30 min ved 1500 g) og 9 ml supernatant overførtes til vials, øvrig supernatant blev smidt ud og røret vejlet igen. Til de 9 ml supernatant tilsattes 50 µl intern standard samt 4 ml DCM og det blev rystet kraftigt i 30 min. Efter god faseseparering udtoges DCM-fasen i et glasrør, som blev sat i fryser. Til analyse inddampedes DCM-prøverne og genopløstes i 150 µl acetonitril og efterfølgende tilsattes 850 µl Milli-Q vand. Prøverne overførtes til UPLC-vials og analyseredes på BEH C18-kolonne beskrevet i afsnit 5.1. Kalibreringsrækken blev tilsat til HPCD-ekstraktet fra en ikke-spi- ket jord (Svanholm sandet) og behandlet som prøverne, dvs. ekstraheret med DCM, inddampet og genopløst i acetonitril/vand.

Acetonitril-ekstraktion: Til jordprøven tilsattes 50 µl intern standard samt 2 ml acetonitril med 1% (v/v) myre- syre. Rørene rystedes grundigt manuelt for at opslæmme jorden, sættes i ultralydsbad i 15 min og derefter på ry- stebord i 20±2 timer. Herefter centrifugeredes prøven i 20 min ved 1500 g, supernatanten filtreredes (PTFE-filter, 0,22 µm) og blev gemt i fryser til senere analyse. Lige inden analysen, overførtes 150 µl af den filtrerede prøve til UPLC-vial, fortyndedes med 850 µl MilliQ-vand og analyseredes på BEH C18-kolonne beskrevet i afsnit 5.1.

5.5.3 Test for vandig hydrolyse ved forskellig pH

Triazolmoderstoffernes stabilitet blev undersøgt ved tre forskellige pH-værdier (5,5; 7,0; 8,5). Stofferne blev tilsat til en buffer-opløsning (50 µl stamopløsning i acetonitril, 1000 µl/l, ad 950 µl buffer) til forskellige tids- punkter, blandet på Vortex og inkuberet ved 10°C i mørke indtil ekstraktion og analyse. De tre buffer-opløsnin- ger blev fremstillet fra to fosfat-opløsninger: 1) 3,40 g KH₂PO₄ i 250 ml vand og 2) 4,35 g K₂HPO₄ i 250 ml vand. Bufferopløsningerne blev sterilfiltreret inden tilsætning af stoffer og tilsætning af stoffer foregik i LAF-bænk for så vidt muligt at undgå kontaminering. Rørene blev inkuberet i mørke ved 10°C. Inkubationen blev afsluttet ved at tilsætte 50 µl intern standard (TBZ-D9, PPZ-D5, DFZ-D6; 100 µg/l, ACN) og oprense prøverne via fastfaseeks- traktion (OASIS HLB, 3 ml, 60 mg). Kolonnen blev konditioneret med 1x 3 ml metanol og efterfølgende med 2x 3 ml Milli-Q-vand. Prøven blev påført, kolonnen vasket med 2x 1 ml Milli-Q-vand og tørret med vakuum i 1 min. Stofferne blev elueret med 1 x 1 ml myresyre:MeOH (5:95) og derefter med 1x 1 ml myresyre:ACN (5:95). 150 µl ekstrakt blandes ad 850 µl Milli-Q vand og analyseres på UPLC-MS/MS (analysemetode 1).

6. Metodeudvikling: Udvikling, implementering og valide-ring af metoder til ekstrak-tion og kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer

I TRIAFUNG udviklede og validerede vi metoder til kvantificering af projektets modelstoffer. Metodeudviklingen var specielt vigtig for 1,2,4-triazol, da der ved projektets start ikke fandtes umiddelbart validerede og robuste metoder med tilstrækkelig lav detektionsgrænse i den videnskabelige litteratur og stoffet kunne i Danmark kun analyseres kommercielt af et enkelt analysefirma. Metodeudviklingen omfattede blandt andet kromatografiske metoder til effektiv separering af små, polære triazoler, optimering af fastfase ekstraktion af moderstoffer og nedbrydningsprodukter, og ekstraktion af jordprøver. 1,2,4-triazol-metoden blev valideret ved interlaboratorie-sammenligning af autentiske drænvandsprøver fra VAP-marker med 1,2,4-triazol. Metoderne er publiceret som open access (Bollmann and Badawi, 2020).

6.1 Matrix til udvikling og validering samt fremstilling af kalibreringsstandarder

Til metodeudviklingen skulle der bruges standard-matricer til de forskellige forsøg. En sandet jord fra en landbrugsmark, dyrket efter økologiske principper i de sidste 40 år (lokalitet Sv1, Svanholm Gods, Skibby, Danmark, sugecelle lokalitet 1) blev brugt som matrix. Lige som prøverne i de øvrige forsøg, blev jorden sigtet til 4 mm. En drænvand-lignende standardmatrix blev frisk fremstillet ved at ryste 250 g jord (Svanholm Gods) med 250 ml Milli-Q-vand i 10 min. Efterfølgende blev prøven centrifugeret (4500 rpm, 10 min) og 200 ml supernatant fortyndet til 2 l med Milli-Q-vand. Både jord og vand blev undersøgt for indhold af alle target-stoffer, ingen af target-stoffer blev fundet i de to matricer.

6.2 Udvikling og validering: Analysemetoderne

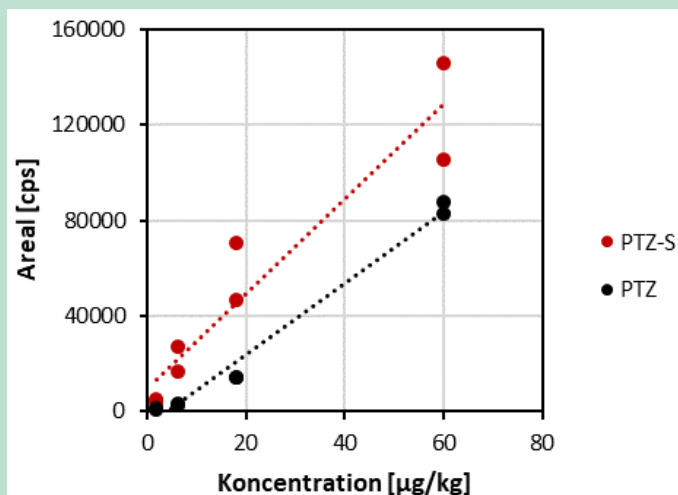
6.2.1 Moderstoffer

Analysemetoden til moderstofferne blev udført på en ACQUITY UPLC BEH C18 kolonne (50mm x 2.1mm, 1.7µm, Waters). Udvælgelsen af kolonnen var baseret på Badawi et al. (2016). Efter optimering af de massespektrometriske parametre til alle moderstoffer samt interne standarder, blev en multi-step-gradient optimeret til en kort og reproducerbar metode. Den optimerede metode er beskrevet i afsnit 5.1 – analysemetode 1.

Metoden er optimeret med en organisk andel på 15% i prøven, som svarer til forholdet af opløsningsmidlerne på UPLC ved metodestart. Et forsøg viste, at en øget organisk andel i prøven (0-100% organisk) fører til en betydelig udvidelse af toppene. Derudover havde det indflydelse på sensitiviteten af enkelte stoffer, især difenoconazol. Det er derfor meget vigtigt at sørge for samme sammensætning af prøve og kalibreringsstandarder. Der var ikke for-

skel på rent Milli-Q-vand og vand med 10 M CaCl₂. Lineariteten kunne verificeres op til 30 µg/l. Ved højere koncentrationer (100 µg/l) observeredes en overbelastning af detektoren. Den relative standardafvigelse var <12% (n=6, 0,1 µg/l; DFZ: 1 µg/l).

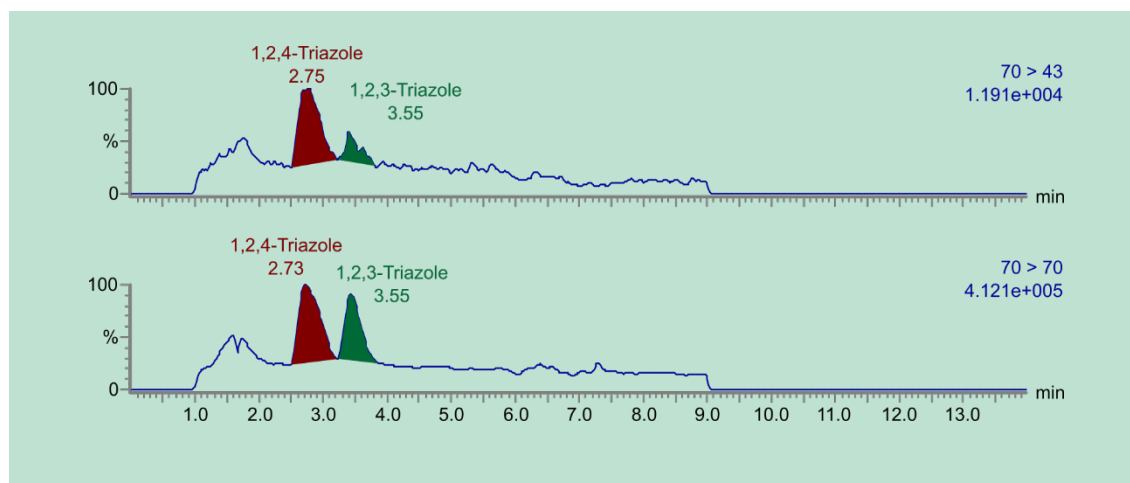
Metoden kunne ikke optimeres tilfredsstillende for prothioconazol. Selvom prothioconazol-standerne blev fremstillet i acetonitril, så var det meget tydeligt, at hydrolyseprocessen allerede var i gang kort efter fremstilling. Beregning af koncentrationerne af prothioconazol-desthio i kalibreringsstandarden (FIGUR 18) ved den anden kalibrering viste, at i gennemsnit 34% prothioconazol, måles allerede som prothioconazol-desthio. Prothioconazol blev desuden nedbrudt i filtreret drænvand. Nedbrydning var meget hurtigere ved 20°C end ved 4°C (Bilag 2, figur B2.1). Prothioconazol-desthio blev dannet, men der var også ét eller flere andre nedbrydningsprodukter, da 20-50% ikke er opklaret.



FIGUR 18. Kalibreringskurver for prothioconazol (sort), samt arealerne fra nedbrydningsprodukter i (rød). Injektion var af "rene" prothioconazol-standarder fremstillet i acetonitril kort før analysen.

6.2.2 Små, polære nedbrydningsprodukter

Hypercarb^{HT} (100 x 2,1 mm, 3µm, Thermo Fisher Scientific) er et meget lovende søjlemateriale til kromatografisk adskillelse af meget polære forbindelser såsom 1,2,4-triazol og beslægtede triazol-forbindelser. Baseret på metoderne for 1,2,4-triazol publiceret af Freitag et al. (2013), Scheurer et al. (2016), og Blondel et al. (2018) blev den kvantitative analysemetode derfor udviklet på et UPLC-MS/MS-system udstyret med en Hypercarb^{HT}-kolonne. Metoden blev optimeret med hensyn til syrestyrke af solventerne, gradient og ækvilibreringstid. De massespektrometriske parametre blev optimeret for alle nedbrydningsprodukter og den interne standard (TABEL 4). Den endelige, optimerede analysemetode er beskrevet i kapitel 5.1 – analysemetode 2. Som vist i FIGUR 19, så er adskillelse af ellers identiske strukturisomerer som 1,2,4-triazol og 1,2,3-triazol mulig med metoden.



FIGUR 19. Kromatogram (kvantificeringsion og kvalificeringsion) ved 0,1 µg/l tilsat til vandig jord ekstrakt (økologisk jord, Svanholm Gods).

Mens LC-MS/MS-metoden for 1,2,4-triazol tidligere er beskrevet (Freitag et al., 2013; Scheurer et al., 2016; Blondel et al., 2018), viser ingen af de citerede publikationer omfattende validerings- og robusthedstests. Der er således udført en omfattende test i TRIAFUNG-projektet.

Detektions- (LOD) og kvantificeringsgrænse (LOQ) blev bestemt som hhv. tre- og ti-gange signal/støj ved gentagen injektion (n=9) af en 0,1 µg/l standard i standardmatrix og er vist i TABEL 7. For de fleste stoffer opnås detektionsgrænser under den europæiske grundvandstærskelværdi på 0,1 µg/l (EU, 2006). 1,2,3-triazol og især triazoleddikesyre har betydeligt højere detektionsgrænser, henholdsvis 0,13 µg/l og 1 µg/l.

Metodens reproducerbarhed blev vurderet baseret på arealet af gentagne injektioner af en spiket drænprøve (n=9). Relative standardafvigelser på ≤ 8% blev observeret for alle stoffer ved 0,05 µg/l (Bilag 2, Figur B2.2). Retentionstiden varierede mindre end ±0,05 minutter inden for en batch på 30 injektioner. Retention af de meget polære forbindelser på Hypercarb^{HT}-kolonne var stærkt påvirket af små mængder organisk opløsningsmiddel (Test: 0 - 10% metanol). Det organiske indhold i prøven bør derfor være så lavt som muligt (< 2%), helst svarende til gradientforhold ved starten (1% organisk). Derudover påvirkede prøvens pH den kromatografiske adskillelse (Test: 0 - 0,2% myresyre). For at stabilisere den kromatografiske kørsel skal alle injicerede prøver såvel som blindprøver justeres til kolonnegradientbetingelserne (0,2 % myresyre og maksimalt 2 % organisk). Baseret på en Mandel-test valideres lineariteten for hele koncentrationsområdet fra 0,07-30 µg/l (7-3000 pg on-column). Der blev ikke observeret nogen overførsel, heller ikke efter injektion af højere koncentrationer (100 µg/l).

For at sænke grænsen for detektion og kvantificering blev en øget injektionsvolumen undersøgt. Det viste sig, at forøgelse af injektionsvolumenet fra 10 µL til 100 µL var muligt (Bilag 2, Figur B2.3). Selvom top-bredden var stigende og opløsningen ca. 3 gange lavere, var 1,2,3- og 1,2,4-triazol stadig nogenlunde adskilt.

Stærke matrixeffekter fra drænvandet blev observeret (TABEL 10). Signalerne fra 1,2,4-triazol blev undertrykt med op til 75% i drænvand sammenlignet med spikede prøver fremstillet i Milli-Q-vand (FIGUR 20). For 1,2,4-triazol er matrixeffekter godt korrigerede med den interne standard. Da der desværre ikke kunne skaffes interne standarder til alle stoffer, blev alle kalibreringer i TRIAFUNG lavet i standardmatrix, matchende til forsøget.

TABEL 10. Matrix-effekten på de fem nedbrydningsprodukter i metoden (middelværdi fra 1-30 µg/l).

Stof	Matrix-effekt
1,2,4-Triazol	-75%
1,2,3-Triazol	-22%
Triazol alanin	-73%
Triazol sulfonamid	-33%
Triazol eddikesyre	52%

Tidligere undersøgelser nævnte, at Hypercarb-kolonnen ikke er nem at håndtere og anbefaler injektioner af spinatekstrakt for at dække visse aktive steder på kolonnematerialets overflade før analysen af f.eks. glyphosat og aminomethylphosphonsyre (AMPA) (Anastassiades et al., 2019). Ved en tilfældighed opdagede vi, at Thermo Fisher Scientific tilbyder to versioner af Hypercarb HPLC-kolonner: høj temperatur (HT) og analytisk; forkolonner er kun tilgængelige for analytiske kolonner. Tidligere publikationer angiver ofte ikke den præcise Hypercarb-kolonne-type. Da optimering under denne undersøgelse blev udført på en Hypercarb^{HT}-kolonne uden problemer, blev en sammenligning med Hypercarb^{analytic} gennemført (Bilag 2, Figur B2.4). Mens betydelige forskelle i den kromatografiske ydeevne kunne genkendes for en brugt Hypercarb HT-søjle sammenlignet med en ny Hypercarb^{HT}-kolonne, var forskellene mellem den nye Hypercarb^{HT}-kolonne og den nye Hypercarb^{analytic}-kolonne ubetydelige. Derfor ser det ikke ud til, at kolonnestabilisering er nødvendig for analysen af target-stoffer i TRIAFUNG-projektet og en metodeoverførsel til Hypercarb^{analytic}-kolonne kan være mulig. Ikke desto mindre, selvom stabile kromatogrammer kan opnås inden for batches af 50-100 injektioner, er ændringer over en længere periode synlig. Aktive steder ser ud til at blive mættede, hvilket fører til nedsat retention, men samtidig til højere signalintensitet.

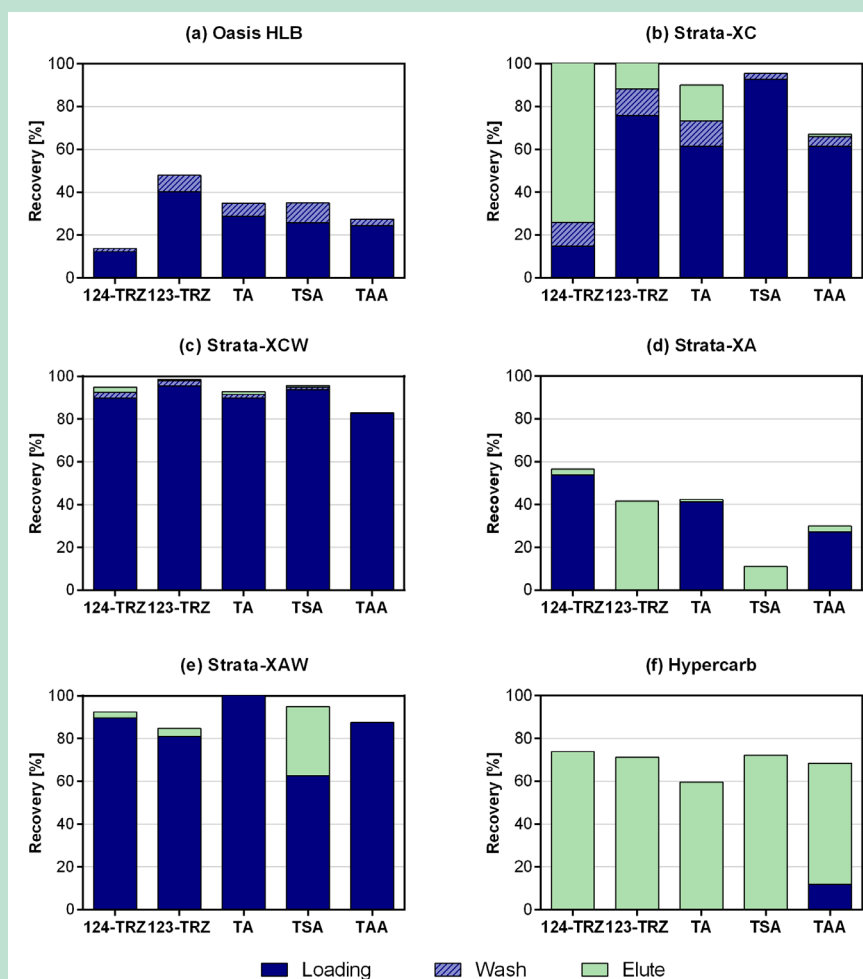
I løbet af projektet var det tydeligt, at forskellige Hypercarb^{HT}-kolonner alligevel ikke er ens. Efter metoden var optimeret på én kolonne, blev prøverne analyseret med en ny kolonne. Det viste sig at sensitiviteten for især triazolalanin og triazoleddikesyre var ret forskellig på forskellige kolonner og tidspunkter i løbet af projektet. Forskellige muligheder blev undersøgt (syreindhold i opløsningsmidler, metanol eller acetonitril som organisk opløsningsmiddel), men det er stadig usikkert, hvad forskellene skyldes. Vi besluttede at gå videre med den optimerede metode fra starten. Vi udelod dog triazolalanin og triazoleddikesyre i nogle undersøgelser pga. for høje detektionsgrænser.

6.3 Udvikling og validering: Ekstraktion og opkoncentrering af vandprøver

6.3.1 Én metode til alle stoffer? – valg af kolonnemateriale

Ekstraktionen af vandprøver blev baseret på fastfaseekstraktion. I udviklingsproceduren forsøgte vi som udgangspunkt at udvikle en samlet metode for alle stoffer i TRIAFUNG-moderstoffer og -nedbrydningsprodukter. For at identificere det bedst egnede ekstraktionsmateriale blev forskellige materialer testet: forskellige mixed-mode stærke og svage anion- og kationbytttermaterialer (Strata-X C, Strata-X CW, Strata-X A, Strata-X AW; 3 mL / 60 mg, Phenomenex), et generisk polymert materiale (OASIS HLB, 3 mL / 60 mg, vand) og et grafitiseret kulstofmateriale (HyperSep Hypercarb; 6 mL / 500 mg, Thermo Fisher). Forsøget blev gennemført med spiket Milli-Q-vand (30 µg/l, 10 mL). Resultaterne (FIGUR 21) viste, at >80 % af de tilsatte triazol-nedbrydningsprodukter genfindes i det gennemløbende prøvevand under prøveladning fra både svage ionbytttermaterialer (Strata-XCW og Strata-XAW) og den stærke anionbytttermateriale (Strata-XA). I overensstemmelse med den tidligere publicerede metode af Schermerhorn et al. (2005) var det muligt at ekstrahere 1,2,4-triazol (genfindings >70% i ekstrakt) ved brug af et stærkt kationbytttermateriale (Strata-XC). Der blev dog genfundet en fraktion i både gennemløbet prøvevand og vaskevand, hvilket indikerer en risiko for gennembrud ved forøgelse af prøvevolumenet. Derudover blev de andre nedbrydningsprodukter overvejende fundet i det gennemløbende prøvevand. Det betyder, at denne kolonne ikke er brugbar til en generisk metode til meget polære forbindelser. Det grafitiserede kulstofmateriale (Hypercarb) var det mest lovende materiale for de fem nedbrydningsprodukter med genfindinger over 60%. Som forventet er det generiske polymere SPE-materiale (OASIS HLB) ikke egnet til ekstraktion af nedbrydningsprodukterne.

Moderstofferne blev tilbageholdt på alle testede kolonner (Bilag 2, Figur B2.5) og ekstraheredes bedst (genfinding >60% for alle stoffer) ved brug af Strata-XCW (svag kationbytter). Ekstraktionsmetoden med Oasis HLB-kolonnen kunne måske optimeres til ekstraktion, men ved første forsøg var genfinding meget varierende. Moderstofferne bliver holdt tilbage på Hypercarb-kolonnen, det er dog umuligt at eluerer stofferne igen.

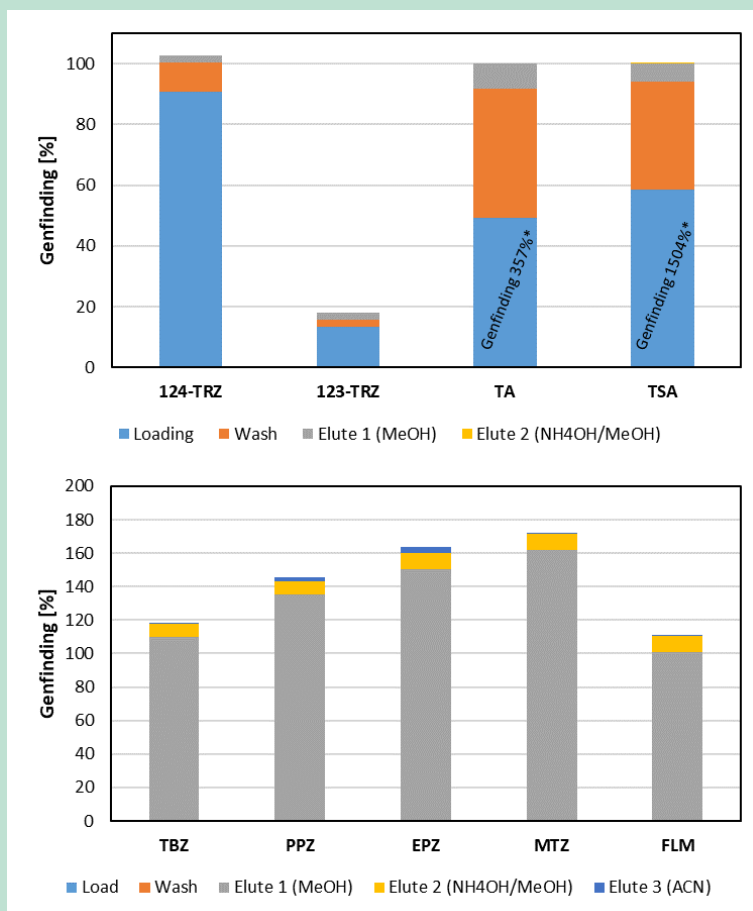


FIGUR 20. Genfinding af triazol-nedbrydningsprodukter (tilsat til 10 ml, 30 µg/l) ved brug af forskellige SPE-materialer. De tre fraktioner, vandet, som løber igennem kolonnen ved påføring af prøven (Loading), vaskevandet (Wash) og det organisk opløsningsmiddel til eluering (Elute), blev opsamlet og analyseret hver for sig.

6.3.2 Én metode til alle stoffer? – kombination Strata-XCW (moderstoffer) + Hypercarb (nedbrydningsprodukter)

Det er tydeligt fra det foregående test, at nedbrydningsprodukterne og moderstoffer skulle ekstraheres på forskellige materialer. Moderstofferne viser gode genfindinger ved brug af HLB og Strata-XCW, mens nedbrydningsprodukterne ekstraheres bedst på Hypercarb. Som opsætning kunne tænkes en sammensat ekstraktion af først en kolonne til moderstofferne og nederst en kolonne til nedbrydningsprodukterne. Da en stor andel af nedbrydningsprodukterne ikke kunne genfindes i hverken eluat eller gennembruds-vandet ved brug af HLB-kolonnen, forsøges opsætning med Strata-XCW, hvor alle nedbrydningsprodukter løb igennem. Prøverne blev således loadet på en Strata-X CW (3ml, 60mg) ovenpå en Hypercarb-kolonne (6ml, 500mg). Efterfølgende blev de to kolonner separeret og elueret enkeltvis. Som vist i FIGUR 22, bliver nedbrydningsprodukterne vasket ud af kolonnen allerede med vaskevandet og genfinding i de samlede ekstrakter er <20%. Dvs. selvom Hypercarb-kolonnen alene kunne ekstrahere >60% af nedbrydningsprodukterne, så forstyrrer opsætningen med Strata-XCW ekstraktionsprocessen betydeligt. Ekstraktionen af moderstofferne er til gengæld god (for høj genfinding skyldes flere eluerings-trin, som

gør beregning unøjagtig). Ud fra de foreliggende data, blev det besluttet at opgive forsøget på at optimere en fælles ekstraktionsmetode til alle stoffer og i stedet optimere to separate metoder til hhv. nedbrydningsprodukter og moderstoffer.



FIGUR 21. Genfindning af nedbrydningsprodukterne på Hypercarb og moderstofferne på Strata-XCW (loadet sammen med Strata-XCW på toppen af Hypercarb kolonnen). Prøve: drænvand med spike 10 µg/l; * genfindning >100% skyldes opsamling af kun det sidste vand fra loading-trin.

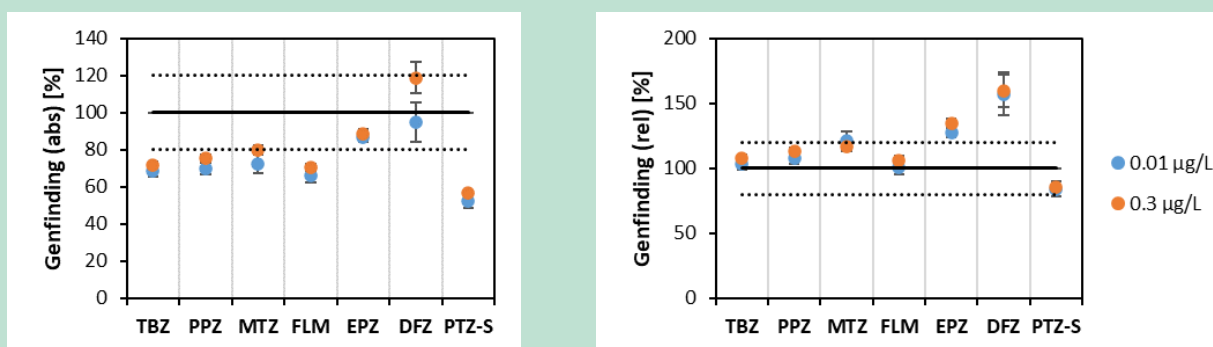
6.3.3 Solvent-skift til analysen

Det er nødvendigt med en fuldstændig udskiftning af det organiske opløsningsmiddel med vand for at analysere prøverne med UPLC-MS/MS (se ovenfor). For at sikre fuldstændig udskiftning blev fordampning til tørhed og opløsning i Milli-Q-vand testet i sammenligning med tilsætning af 1 ml vand og efterfølgende fordampning til 1 ml. Mens inddampning til tørhed kan føre til tab af de små semi-flygtige forbindelser, er risikoen ved at tilsætte vandet inden inddampning, at man faktisk ikke med 100%-sikkerhed ved, om alt organisk opløsningsmiddel er fordampet. Det sammenlignende forsøg viste, at ingen af stofferne går tabt på grund af fordampning til tørhed (Bilag 2, Figur B2.6). Moderstofferne kræver dog, at der reopløses med acetonitril først, for at opnå den samme sammensætning som ved starten af UPLC-MS-kørslen, blev der opløst med 150 µl ACN efterfulgt af 850 µl MilliQ-vand. Derfor blev et inddampningstrin indbygget i metoden med genopløsning i hhv. MilliQ-vand (0,2% myresyre) og acetonitril/Milli-Q-vand.

6.3.4 SPE-metodeoptimering: moderstoffer

Da den sammensatte metode til både moderstoffer og nedbrydningsprodukter blev opgivet, fokuserede vi på optimering af metoderne enkeltvis. Den første forsøg med forskellige SPE-kolonner viste lidt lave genfindinger af moderstofferene. Derfor blev der gennemført et nyt forsøg med forskellige polymerfaser. Denne gang var kolonnerne lidt større: Strata-X CW (3ml, 200mg), OASIS HLB (6ml, 200mg), Chromabond Speedisk H2O-philic DVB (6mL, 600mg), Chromabond Speedisk H2O-phobic DVB (6mL, 600mg), OASIS MCX (6ml, 150mg). Derudover blev der tilsat buffer (fosfatbuffer, pH7) til alle prøver (100 ml MilliQ-vand, 10 µg/l); undtagen MCX hvor prøven blev tilsat myresyre. Genfinding af alle stoffer var >80% (Bilag 2, Figur B2.7). Da nogle kolonner-materialer gav en teoretisk genfinding på mere end 100%, blev Oasis HLB-materialet udvalgt.

Efter nogle småforsøg til at optimere kolonnestørrelsen, konditionerings- og elueringsmidlerne, blev metodens reproducerbarhed afprøvet ved forskellige koncentrationsniveauer (FIGUR 23). For de fleste stoffer lå genfindingen konstant mellem 80 og 100%. Difenonazol genfinding er lidt for høje – efterfølgende blev en intern standard for difenonazol tilføjet. Da det i det senere forløb blev ikke var nødvendigt at bruge SPE-ekstraktion til moderstofanalyse i løbet af projektet (LOD ved direkte analyse blev vurderet tilstrækkelig), blev valideringen ikke gentaget. Den optimerede metode blev brugt til oprensning af hydrolyseforsøget (kapitel 5), ellers blev moderstofferne analyseret kun ved direkte injektion.



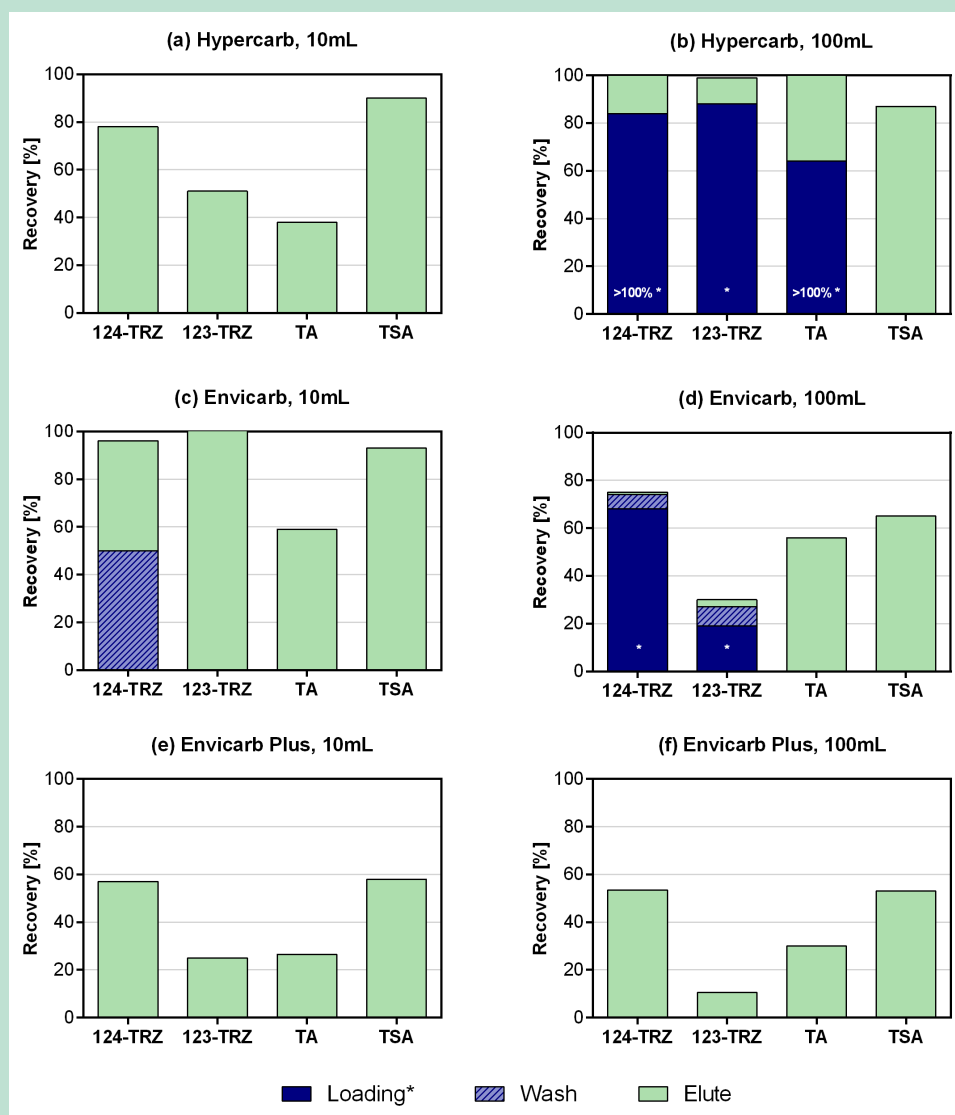
FIGUR 22. Genfinding af moderstoffer ved SPE-ekstraktion. Venstre figur: absolut genfinding, højre figur: IS-korrigeret genfinding, Propiconazol og prothioconazol-desthio brugte PPZ-D₅, mens de øvrige stoffer blev korrigeret med TBZ-D₉; DFZ-D₆ blev først inkorporeret i metoden efterfølgende.

6.3.5 SPE-metodeoptimering: nedbrydningsprodukter

Hypercarb-SPE-kolonnen (HyperSep™ Hypercarb™, 6 ml / 500 mg, fladt porøst grafitkul, Thermo Fisher) var mest lovende til ekstraktion af triazol-nedbrydningsprodukter, men desværre førte en stigning i prøvevolumenet fra 10 ml til 100 ml til højt gennembrud. Kun triazolsulfonamid blev genfundet i lignende mængder, mens mindre end 20% af 1,2,4- og 1,2,3-triazol blev genfundet i eluatet (FIGUR 24b). Yderligere test med andre kulstofbase-rede materialer viste, at der kunne opnås lidt højere (Supelclean™ ENVI-Carb™, 6 mL / 500 mg, grafitiseret ikke-porøst kulstof, Supelco, Merck) og lidt lavere (Supelclean™ ENVI-Carb™ Plus, vendbar kolonne, 1 ml / 400 mg, sfæriske kulparkler, Supelco, Merck) samlet genfinding for 10-ml prøver. Ikke desto mindre afslørede ekstraktion af 100 ml prøver, at de sfæriske partikler i ENVI-Carb Plus kolonnerne, med et 10 gange større overfladeareal (1149 m²/g) end både Hypercarb og ENVI-Carb, er bedst egnede til ekstraktion af disse små polære forbindelser (FIGUR 24c-f). ENVI-Carb Plus viste intet gennembrud under loading-trinnet af prøven og efterfølgende vask af kolonnen, såvel som lignende genfindinger for både 10 ml og 100 ml prøvevolumen. Genfinding for 1,2,4-triazol i lav og høj prøvevolumentest lå således på ca. 60%.

Effekten af en reduceret prøve-pH blev yderligere testet på alle tre kolonner ved at justere sure betingelser ved anvendelse af myresyre (pH 3) eller saltsyre (pH 1). Reduktion af prøvens pH resulterede i betydeligt lavere genfinding af stofferne, og denne fremgangsmåde blev derfor ikke fulgt yderligere.

Det optimale elueringsvolumen og dens sammensætning blev undersøgt ved sekventiel eluering med metanol, metanol med 5% NH_4OH , metanol med 5% myresyre, acetonitril, ethylacetat og dichlormethan. Den største fraktion af stofferne blev elueret med den første metanol -fraktion; dog var både forsuring og acetonitril tilstrækkelige til at eluere resterende forbindelser. Eluering med mindre polære, stærkere organiske opløsningsmidler (ethylacetat og dichlormethan) øgede ikke den samlede genfinding. Den endelige ekstraktionsprotokol inkluderer således metanol og forsuret acetonitril.



FIGUR 23. Gennembrud af triazol-nedbrydningsprodukter ved brug af forskellige kulbaserede SPE-patroner fyldt med to prøvevolumener: 10 og 100 ml (prøver blev fremstillet i Milli-Q-vand, og prøvekoncentrationen var 1 µg/l, n=1). *Kun de sidste 10 mL er blevet indsamlet fra 100 ml prøvevolumen, så genfinding af "Loading"-fraktion er ikke repræsentativ

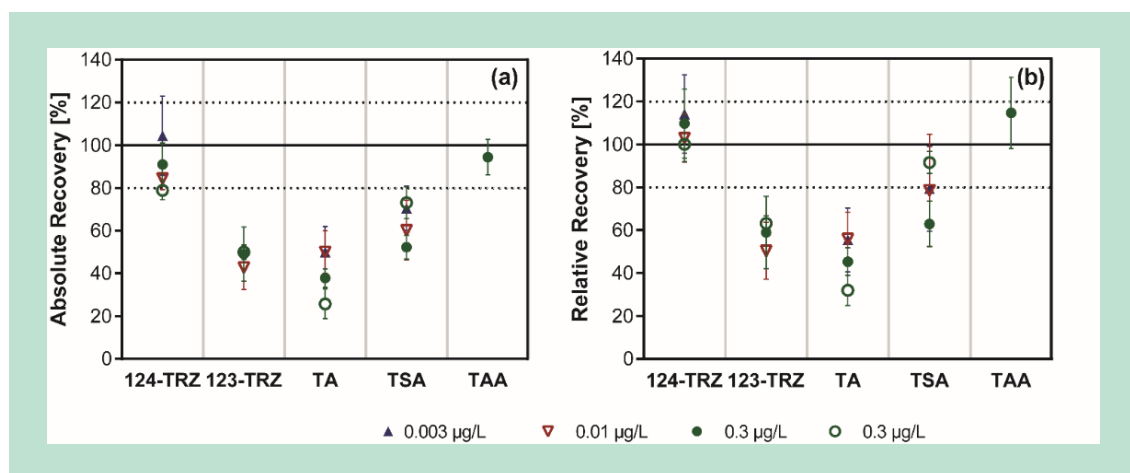
6.3.6 SPE-metode validering: nedbrydningsprodukter

Den endelige SPE-protokol er beskrevet i afsnit 5.1. Genfinding, reproducerbarhed og dag-til-dag variation blev testet ved ekstraktion af 100 ml standardmatrix tilsat 0,003 µg/l (n=5), 0,01 µg/l (n=5) og 0,3 µg/l (2x n=5). Metodens genfindingsrater blev således valideret ved tre koncentrationsniveauer, to tæt på grænsen for detektion/kvantificering og en ved et højt miljøkoncentrationsniveau. De absolutte genfindingsrater varierede mellem 26% og 104% (FIGUR 25a). Metodereproducerbarheden blev bestemt for parallel-ekstraktion (standardafvigelse

< 20 %, n=5). Dag-til-dag variation af 1,2,4-triazol-genfindingen var ikke signifikant efter korrektion med den interne standard.

Den relative genfindingsrate for 1,2,4-triazol, dvs. den korrigerede genfindingsrate med hensyn til den isotopmærkede interne standard, ligger tæt på 100% (FIGUR 25b). Da der ikke var nogen tilsvarende isotopmærkede standarder til rådighed for resten af stofferne, blev genfindingskorrektion udført under anvendelse af 1,2,4-triazol- $^{13}\text{C}_2$. Ikke desto mindre var resultaterne ikke tilfredsstillende. Dette kan forklares med de lave genfindingsrater for disse stoffer sammenlignet med 1,2,4-triazol, men også forskellene i de observerede matrixeffekter. Til at overkomme disse udfordringer, blev alle kalibreringsstandarder i TRIAFUNG-projektet ekstraheret på samme måde som prøverne.

Ekstraktionsmetodens detektionsgrænsen blev evalueret baseret på signal/støj-niveau af den laveste ekstraherede koncentration (0,01 µg/l, n=5; TABEL 7). Laveste validerede koncentration med en relativ standardafvigelse <20% er rapporteret som kvantificeringsgrænse. Opkoncentrering af prøven ved SPE muliggør dermed en valideret kvantificering ved niveauer ned til 0,003 µg/l og detektion selv under 0,001 µg/l. Ved brug af SPE-metoden kan detektionsgrænsen sænkes betydeligt i forhold til den direkte injektion uden forudgående prøveforberedelse. Det skal dog nævnes, at injektionsvolumenet skal være omkring 10 µl, da separering på HPLC-kolonnen reduceres ved højere injektionsvolumener pga. den opkoncentrerede matrix. Med en SPE-koncentrationsfaktor på 100 (prøvevolumen 100 ml → 1 ml) og en injektionsvolumen på 10 µl (ekstrakt) versus 100 µl (direkte injektion) dvs. en samlet koncentrationsfaktor SPE/direkte injektion på 10, er den resulterende masse på kolonne (3 pg) lige under det testede og validerede lineære område for direkte injektion (7-3000 pg på kolonnen).



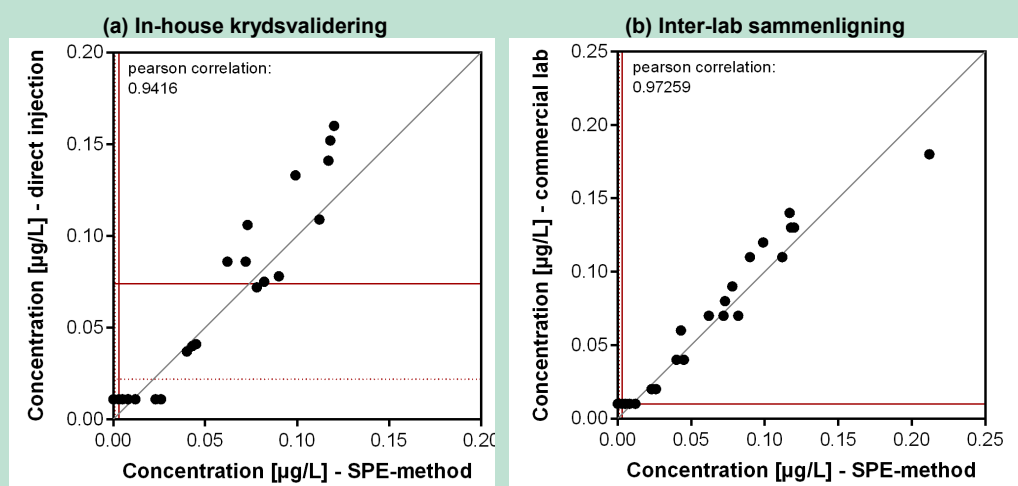
FIGUR 24. Ekstraktionsgenfindingstest blev udført ved koncentrationsniveauer tæt på detektionsgrænsen (0,003 µg/l og 0,01 µg/l) og ved en høj koncentration (0,3 µg/l) i standardmatrix (vanding jordekstrakt, 100 ml). Testen blev gennemført på to forskellige dage, som visualiseres med åbne og lukkede symboler (n=5): (a) Absolut genfindingsrate (b) Relativ genfindingsrate ved brud af 1,2,4-triazol- $^{13}\text{C}_2$ som internt standard til alle stoffer. Sort vandret linje repræsenterer 100% genfinding og intervallet på 80-120 % er visualiseret med prikkede linjer.

6.4 Krydsvalidering: sammenligning SPE vs. direkte injektion, samt interlaboratorie-sammenligning

Til sammenligning af den udviklede SPE-metode mod kvantificering ved brug af direkte injektion blev der gennemført en prøvetagningskampagne i okt./nov. 2019 på de fire VAP-markere, og analyseret i henhold til de endelige protokoller som beskrevet i afsnit 5.1. Prøveudtagning fra drænsystemet og de lodrette og vandrette borer blev udført i overensstemmelse med den almindelige prøvetagning inden for VAP. Udover dræn- og grundvandsprøver blev feltblind- og spikedede feltkontrolprøver inkluderet som beskrevet i Badawi et al. (2022). Prøver blev opbevaret i fryseren og analyseret inden for 4 uger efter prøveudtagning. 100 ml prøver blev ekstraheret ved at følge SPE-metoden som beskrevet i afsnit 5.1. Kalibreringssopløsninger (0,003-1 µg/l) blev fremstillet i 100 ml standardmatrix og ekstraheret samtidigt med feltprøverne. Sideløbende blev prøver forberedt til direkte analyse:

til 1 ml prøve blev der tilsat 50 µl intern standard (spikeopløsning: 0,1 µg/ml i Milli-Q-vand (10% metanol)) samt 10 µl myresyre (10% v/v)). Derudover blev kalibreringsopløsninger (0,3-100 µg/l) fremstillet i forsuret standardmatrix (0,1 % myresyre). Begge prøvesæt blev analyseret med LC-MS/MS (afsnit 5.1) med injektionsvolumener på henholdsvis 10 µl (SPE-ekstrakter) og 100 µl (direkte injektion). Som en del af VAP's analyseprogram blev et parallelt prøvesæt sendt til analyse for 1,2,4-triazol på et kommercielt laboratorium (Eurofins), som bruger en lignende akkrediteret metode baseret på direkte injektion på LC-MS/MS. Således blev nøjagtigheden af resultaterne opnået ved de foreliggende metoder verificeret ved sammenligning mellem laboratorier.

Kun 1,2,4-triazol og triazolsulfonamid blev påvist i feltprøverne. Mens triazolsulfonamid kun blev påvist i de spikeede feltkontrolprøver, blev 1,2,4-triazol påvist i koncentrationer op til 0,22 µg/l i drænprøver. Pearson-korrelationskoefficienterne mellem ekstraktions- og direkte injektionsresultater er 0,94 for 1,2,4-triazol og 0,98 for triazolsulfonamid. Som vist i FIGUR 26, var der en acceptabel afvigelse fra 1:1-linjen for 1,2,4-triazol. Selvom resultaterne for triazolsulfonamid blev bestemt ved hjælp af simultant ekstraherede kalibranter og således genfindingskorrigeret, ser resultaterne fra SPE-metoden ud til at undervurdere koncentrationen sammenlignet med kvantificering ved brug af direkte injektion. Udskiftning af den direkte injektionsmetode med den nyudviklede SPE-ekstraktionsmetode er således let mulig til analyse af 1,2,4-triazol, mens man skal være forsigtig med hensyn til de øvrige stoffer, som ikke blive analyseret med en tilsvarende interne standarder. Da koncentrationer i naturlige prøver er meget lave, besluttede vi at ekstraherer alle naturlige prøver for analyse af nedbrydningsprodukterne. For at sikre metodernes nøjagtighed blev resultaterne sammenlignet med analyser i et kommercielt laboratorie (Eurofins). Disse viste høj overensstemmelse for 1,2,4-triazol (Pearson-korrelationskoefficient: 0,97); triazolsulfonamid blev ikke analyseret eksternt.



FIGUR 25. (a): Metodesammenligning af SPE-metoden med den direkte injektion. (b): Inter-laboratorie sammenligning af den direkte injektions- og SPE-metode med et kommercielt akkrediteret laboratorium (Eurofins). Forsøgene blev gennemført med dræn- og grundvandsprøver indsamlet i VAP. Røde vandrette- og lodrette stiplede linjer viser grænserne for detektion og linjerne grænserne for kvantificering af henholdsvis den direkte injektion og SPE-metoden; Prøvekoncentrationer <LOD er plottet som 0,5*LOD.

6.5 Udvikling og validering: Ekstraktion af jordprøver

6.5.1 Opløsningsmiddel, ekstraktionstid

Metodeudviklingen tog udgangspunkt i ekstraktionen af tebuconazol fra jord med ryste-ekstraktion (Badawi et al., 2016). 2g jord blev spiket med både moderstoffer og nedbrydningsprodukter (15 µg/kg) og efterfølgende ekstraheret med 4 ml opløsningsmiddel. Forskellige ekstraktionsmidler blev afprøvet i ryste-ekstraktion: acetonitril,

vand, vand + 5% myresyre, vand + 5% NH_4OH og derudover en sammenligning mellem rysteeksaktion og ultralyd-ekstraktion.

Ryste og ultralyd-ekstraktion viser samme genfindinger (30% - 75%). At tilføje flere ekstraktionstrin ville øge genfindingen med 5-12%, et tredje trin yderlige med maksimalt 3%. Mens genfindingen af nedbrydningsprodukterne er næsten lige høje ved brug af acetonitril og Milli-Q-vand, er det ikke muligt at ekstrahere moderstofferne ved brug af Milli-Q-vand. Til at reducere arbejdsstrinnene i laboratoriet, blev jordprøverne ekstraheret med acetonitril. Stærkt baskisk eller surt øger ekstraktion af især 1,2,4-triazol. Da analysemetoden efterfølgende er forsuret, besluttede vi at ekstrahere med acetonitril/myresyre.

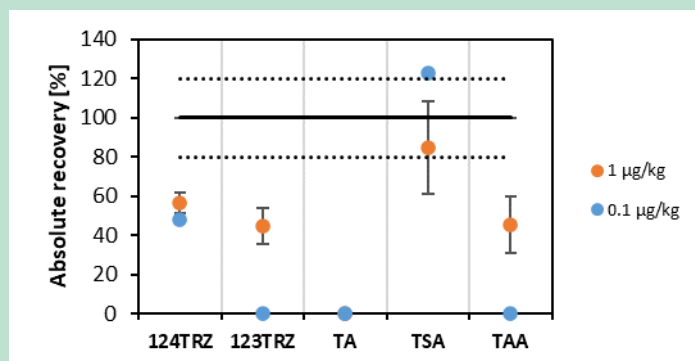
6.5.2 Hvor tabes stofferne?

De lave genfindinger i den tidligere forsøg kan skyldes lavt ekstraktionsudbytte i første trin, eller tab af stofferne i de efterfølgende trin og matrixeffekterne ved analysen. Til at vurdere i hvilket trin stofferne mistes, blev et lignende forsøg gennemført, hvor stofferne blev tilsat på forskellige tidspunkter i processen. Matrix-effekterne for nedbrydningsstofferne spiket til organisk jordekstrakt (Figur B8, "efter inddampning") var minimal og genfindingen lå på 100%. Mens tilsætning af stofferne før inddampning gav næsten samme resultat for 1,2,4-triazole, triazolalanin og triazolsulfonamid, var genfindingen af hele ekstraktionsproceduren meget mindre; dvs. enten ekstraheres ikke det hele eller mistes ved filtrering. Det ser ud til at filtreringstrinnet fører til tab af ~25% af 1,2,4-triazol. Efterfølgende blev følgende filtrer afprøvet og sammenlignet med en ikke-filtreret prøve: PTFE hydrophobic (Q-Max, 0,22 μm), Cellulose acetat (Q-Max, 0,22 μm), Nylon (titan2, 0,45 μm), PTFE hydrophilic (Whatman, 0,2 μm), PES (Q-Max, 0,22 μm), Hydrophilic PVDF (Millipore, 0,45 μm). Forsøget kunne dog ikke genskabe tab af stofferne (næsten 100% genfinding uafhængig af materiale). Med hensyn til moderstofferne er det næsten lige meget hvor i processen stofferne blev tilsat: genfindingsrate ligger omkring 100% – undtagen difenoconazol. Senere i projektet indførte vi en intern standard for difenoconazol, for at korrigere resultaterne.

6.5.3 Metodevalidering

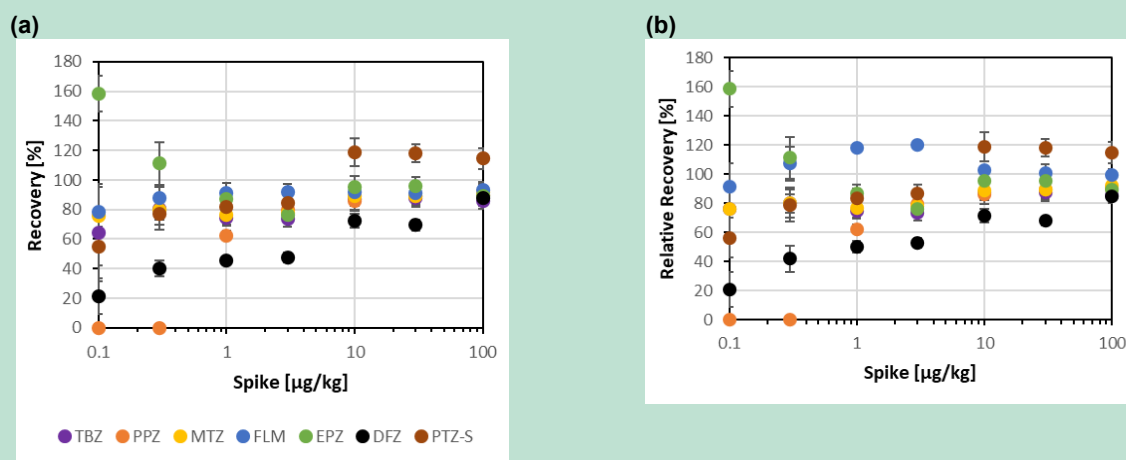
Den optimerede metode (se den endelige metodebeskrivelse i afsnit 5.1) med forsuret acetonitril kan bruges til både moderstofferne og nedbrydningsprodukterne. Efter ekstraktionen bliver det filtrerede ekstrakt delt i to fraktioner, som bliver parallelt inddampet, genopløst og derefter analyseret på UPLC-MS/MS med henholdsvis analysemetode 1 eller 2. Metoden blev afprøvet på jord spiket til forskellige koncentrationsniveauer fra 0,1 $\mu\text{g/kg}$ til 100 $\mu\text{g/kg}$. Metodens reproducerbarhed blev undersøgt ved hhv. 3 (moderstoffer) og 5 (nedbrydningsprodukter) parallel-ekstraktioner. LOD og LOQ blev bestemt fra standardafvigelse af en replikate ekstraktioner ved 1 $\mu\text{g/kg}$ ($n=5$).

Som vist i FIGUR 27, lå genfindingen for nedbrydningsprodukterne på 45% og 85% ved tilsætning af 1 $\mu\text{g/kg}$, undtagen triazolalanin, som ikke genfindes i dette forsøg. Det var ligeledes tydeligt, at kun enkelte stoffer detekteres ved lavere koncentration og med en meget stor standardafvigelse (>50%). Ved hjælp af den interne standard kunne 1,2,4-triazol koncentrationen korrigeres, mens de andre stoffer bør ekstraheres med en matrix-matched kalibrering.



FIGUR 26. Genfinding af nedbrydningsprodukter i jord ($n=5$).

Moderstoffernes genfindingsfunktionen viser 80-100% genfinding ved $\geq 0.3 \mu\text{g/kg}$ (FIGUR 28), undtagen propiconazol (ingen genfinding $< 1 \mu\text{g/kg}$). Genfinding af difenconazol afhænger af spike-koncentrationen (trend) – først senere i projektet blev en intern standard til difenoconazol tilført til metoden. Prothioconazol kunne ikke genfindes.



FIGUR 27. Genfindingsfunktion - moderstoffer i jord (n=3). (a): absolut genfinding, (b): relativ genfinding.

6.5.4 Ekstraktion af prothioconazol

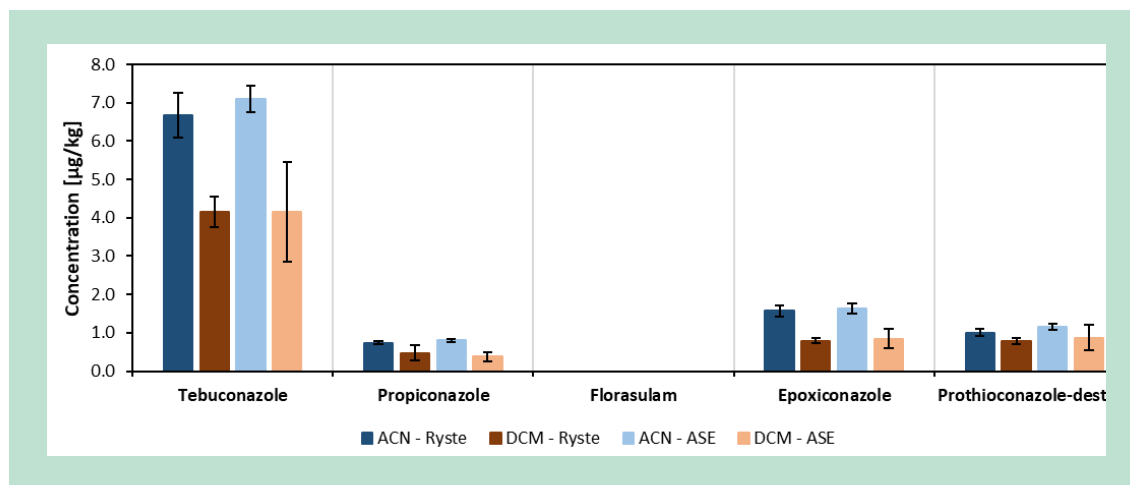
Som tidligere nævnt er prothioconazol ikke stabil under analysen ved de valgte betingelser. Til at vurdere, i hvilket omfang prothioconazol omdannes til prothioconazol-desthio ved ekstraktion af en jordprøve, blev jordprøver (n=5) spiket med prothioconazol fra en helt ny standard i acetonitril (0,05 $\mu\text{g/l}$) til hhv. 1 $\mu\text{g/kg}$ og 10 $\mu\text{g/kg}$ og ekstraheret med det samme ved at følge den optimerede jordekstraktionsmetode. Forsøget viste at prothioconazol blev omdannet 100% i løbet af ekstraktionen ved den anvendte metode (Bilag 2, Figur B2.9). Omdannelsen til prothioconazol-desthio ligger på omkring 70% ved både 1 $\mu\text{g/kg}$ og 10 $\mu\text{g/kg}$. Resultaterne fra prothioconazol-desthio i nogle "rigtige" feltprøver kunne derfor være en kombination af prothioconazol og prothioconazol-desthio. Ved analysen af "rigtige" feltprøver, analyserede vi yderligere på ionsporene for prothioconazol til kvalitativ analyse. Prothioconazol blev dog ikke detekteret i nogle feltprøver.

6.5.5 Ekstraktion af bound residues i naturligt ældede jorde

Metodeudviklingen til jordekstraktion blev gennemført med jord, hvortil stofferne blev tilsat kort inden ekstraktion. Når pesticider forbliver i jorden over længere tid, binder stofferne stærkere til jordmatricen. Derfor undersøgte vi, om en hårdere ekstraktionsmetode (accelerated solvent extraction, ASE sammenlignet med ultralyd/udrystningsmetode) såvel som et stærkere ekstraktionsmiddel (dichlormethan sammenlignet med acetonitril) ville øge ekstraktionsudbyttet ved bestemmelse af totalt ekstraherbart stof.

I første delforsøg blev ASE (Bollmann et al. (2017) sammenlignet med den optimerede ryste-ekstraktion (den endelige metode i afsnit 5.1). I ekstraktionsforsøget brugte vi en VAP diagonal-prøve fra Fårdrup, prøvetaget i foråret 2017. Marken i Fårdrup er blevet sprøjtet med tebuconazol (senest i såsæson 2014/15), propiconazol (2016/17), epoxiconazol (2005/06), prothioconazol (2014/15) og florasulam (2016/17). Dermed omfattede datasættet næsten alle TRIAFUNG moderstoffer og seneste sprøjtning lå ét eller flere år tilbage. Resultaterne (FIGUR 29) viste, at ASE-metoden ikke ekstraherer mere pesticid end den simple ultralyd/udrystning. Dermed blev ASE droppet, da det giver et stort prøvevolumen på 40ml. Acetonitril-ekstraktionen viste 30-100% højere pesticidkoncentrationer end ved dichlormethan-ekstraktionen. Dichlormethan blandes ikke med vand. Derfor kunne det skyldes, at den fugtige jordoverflade forhindrede at dichlormethan kunne komme helt i kontakt med pesticiderne. Derfor blev jorden frysetørret i et opfølgende forsøg (udrystningsmetoder som før, men med henholdsvis frysetørret og ikke frysetørret jord). Jorden blev afvejet før frysetørring, dermed sammenlignes wet-weight koncentrationer. Yderlige to jordtyper (Jyndevad: sandet jord, 1/4-2019 og Estrup: leret jord, 20/8-2019) blev medtaget i forsøget. Resultaterne viste, at ekstraktionsudbytte ikke øges ved frysetørring, hverken ved acetonitril- eller dichlormethan-

ekstraktion (Bilag 2, Figur B2.10). Tværtimod var den målte koncentration højest ved ikke-frysetørret jord og ekstraktion med acetonitril. Det gjaldt stort set for alle tre jorde og alle de forskellige moderstoffer. Derfor bruges acetonitril og ultralyd+udrystning i den optimerede standardmetode.



FIGUR 28. Sammenligning af ASE og udrystning med acetonitril (ACN) eller dichlormethan (DCM) som solvent (n=3).

7. Metodeudvikling: Bestemmelse af ældede 1,2,4-triazol moderstoffers biotilgængelige koncentrationer i jord

Vi tilpassede og testede en eksisterende metode til bestemmelse af hydrofobe stoffers biotilgængelighed. Med metoden kunne vi ekstrahere næsten 100% af friskt tilsat propiconazol og tebuconazol svarende til fuld biotilgængelighed i jorden. For naturligt ældede triazolfungicider i VAP-jorde fulgte HPCD-ekstraktionen oftest en 3-parameter exponentiel rise-to-max kinetik. Vi testede metoden på jord indsamlet umiddelbart efter sprøjtning med metconazol og efter to års aging på marken. Friskt-sprøjtet metconazol viste et meget kraftig fald i biotilgængelig koncentration i løbet af de to år. Triazoler, der allerede var ældet i jorden inden indsamling af den første jordprøve, viste også fald i biotilgængelig koncentration, dog i noget mindre omfang end metconazol. Kinetikken fladede ud efter 140 timers HPCD-kontakt, hvorfor vi valgte ekstraktion med HPCD i 140 timer som standardmål for biotilgængeligheden i resten af projektet.

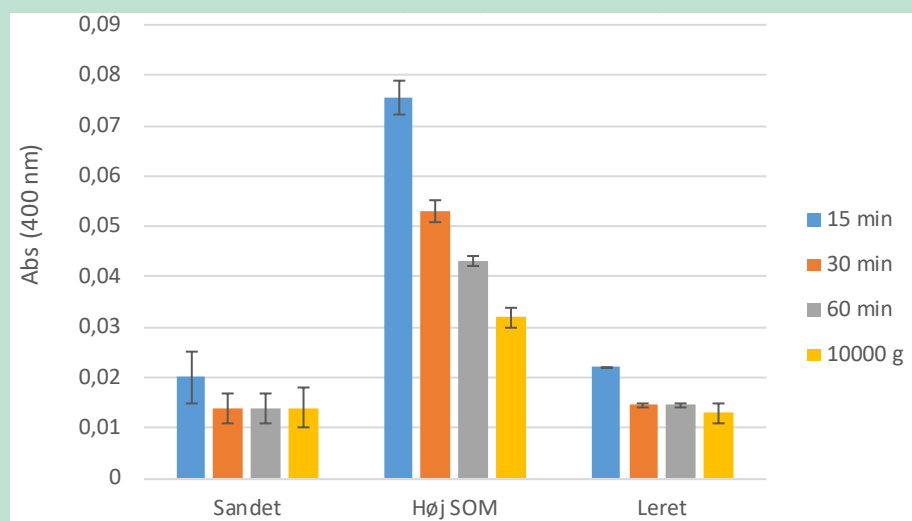
Metoden er en tilpasning til bestemmelse af PAH'er og andre hydrofobe stoffers biotilgængelige fraktion i forurenet jord og sediment (Reid et al., 2000a, Cuypers et al., 2002). Metoden består grundlæggende af opslæmning af jord i en HPCD-opløsningen, udrystning i et passende tidsrum hvor det biotilgængelige triazol-moderstof binder til HPCD, adskillelse af HPCD-opløsning og jordpartikler ved centrifugering, væske-væske-ekstraktion af det HPCD-bundne triazol-moderstof med en organisk solvent, og til sidst bestemmelse af koncentrationerne i solventet med LCMS. Metoden findes grundlæggende i to versioner, enten ekstraheres prøven med HPCD i stort overskud i én enkelt udrystning (Reid et al., 2000a, Doick et al., 2006) eller prøven ekstraheres gentagne gange med stigende tidsinterval, de summerede koncentrationer til hver ekstraktionstid plottes mod ekstraktionstiden, hvorefter der fittes en funktion til de ekstraherede koncentrationer, så man kan beregne koncentrationen, når ekstraktionstiden går mod uendeligt (Cuypers et al., 2002). I den første metode ekstraheres typisk med 50 mM HPCD (77 g/l) i 20 timer (Reid et al., 2000a, Doick et al., 2006), men metoden er kun valideret mod jord som er spiket med "friskt" PAH i laboratoriet og ældet i op til 139 dage. Kinetikmetoden derimod er udviklet og valideret på "naturligt" ældede sedimentprøver fra en kanal og fra Amsterdams oliehavn (Cuypers et al., 2002) og inkluderer gentagen ekstraktion af 2,5-g prøver i 50 ml HPCD-opløsning (106-145 g/l, NaN_3 0,5 g/l) i op til 120 timer. Kinetik-metoden er også anvendt til PAH'er i dansk motorvejsjord (Johnsen et al., 2006).

Vores metodetilpasning bestod af indledende forsøg til optimering og dokumentation af de indledende trin i metoden efterfulgt af et større kinetik-forsøg til bestemmelse af optimale ekstraktionstider for triazol-fungicider i "naturligt" ældede VAP-jorde. Til det formål indkøbte vi HPCD (Shaanxi Guanjie Technology co., Shaanxi, China, degree of substitution: 5,39) og ^{14}C -tebuconazol og ^{14}C -propiconazol (Izotop, begge mærket i benzen-ringen). I de indledende forsøg brugte vi tre økologiske landbrugsjorde, som også blev brugt i aging laboratorie-forsøget. De økologiske jorde blev indsamlet 21/8-2020 på Svanholm Gods: en sandet jord (2,7% organisk stof), en leret jord (4,3% organisk stof), og en jord med højt indhold af organisk stof (Høj SOM, 15% organisk stof). Ca. 1 kg af hver

jord blev homogeniseret ved sigtning gennem 2-mm-sigte. Der bruges samme set-up som ved almindelige sorptionsforsøg til bestemmelse af K_d , hvor 1 g jord suspenderes i 10 mM CaCl_2 i 12-ml glastrør, men i modsætning til K_d -bestemmelse er der også tilsat HPCD i en koncentration på 50 mM.

7.1.1 Centrifugering – optimering af nedspinning af kolloider

For at metoden virker, skal man kunne fjerne jordpartiklerne fra HPCD-opløsningen efter inkubation da man ellers kommer til at medtage kolloid-bundet stof i den biotilgængelige fraktion og dermed overestimerer den biotilgængelige fraktion. Vi testede derfor effekten af centrifugering ved at spinne glastrørene ned i 15, 30 eller 45 min, og ved at overføre 2 ml til eppendorfrør og spinne ned i 15 min ved 10.000 g. Supernatantens absorbans/turbiditet blev målt ved 600 nm og ved 400 nm. Efter centrifugering var der ingen absorbans ved 600 nm hvilket viser, at alle mineralske kolloider blev spunnet effektivt ned i alle behandlingerne. Ved 400 nm var der lidt absorbans, (FIGUR 30) sandsynligvis fra organisk stof. I den sandede og den lerede jord var absorbansen en anelse højere ved centrifugering i 15 min end ved de længere centrifugeringer og den hårde 10.000 g centrifugering. Da der vinde lidt ved at øge tiden til 30 min, anvendes 30 minutters centrifugering i de efterfølgende forsøg. Den tilbageværende absorbans efter 30 min skyldes opløst organisk stof. Den organiske jord var anderledes, idet absorbansen ved 400 nm var høj efter 15 min og faldt hver gang centrifugeringen blev forøget. Det skyldes sandsynligvis nedspinning af pseudo-opløste, organiske semikolloider, hvilket viser at HPCD-metoden er mindre egnet til meget organiske jorde.

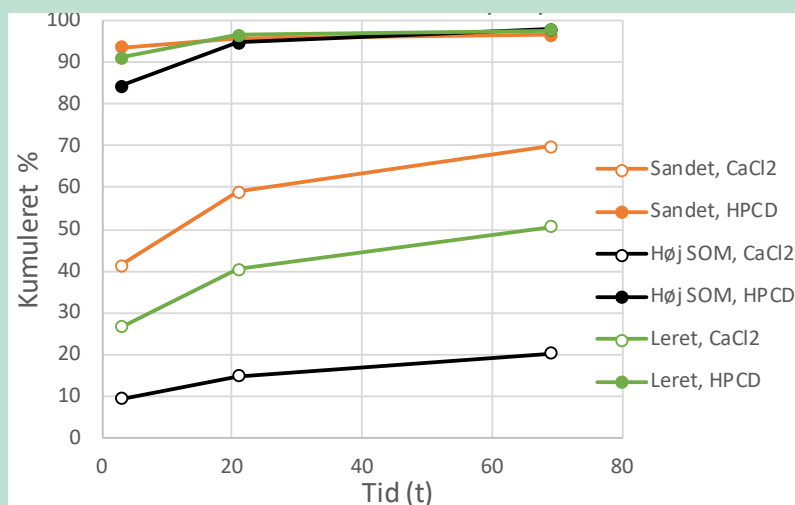


FIGUR 29. Effekt af centrifugering på absorbans ved 400 nm for jord suspenderet i 50 mM HPCD+10 mM CaCl_2 og centrifugeret ved 1500 g i 15, 30 eller 60 min eller ved 10.000 g i 15 min.

7.1.2 Genfindning af friskt tilsat moderstof.

Hvis metoden virker, skal den kunne ekstrahere alt friskt tilsat moderstof, svarende til fuld biotilgængelighed, da der jo ikke har været tid til aging, når stoffet lige er tilsat. For at teste dette afvejes 1 g jord, som tilsættes 200 μl opløsning med ^{14}C -propiconazol eller ^{14}C -tebuconazol (20 μl stamopløsning i 1 ml H_2O , hvilket giver ca. 50.000 dpm pr. glas svarende til ca. 100 $\mu\text{g/kg}$ i jorden. 10 ml CaCl_2 med HPCD tilsættes 10 min efter og der omrystes 3 timer, før der centrifugeres og ^{14}C -aktiviteten måles i 2 ml af væsken. Herefter fjernes resterende supernatant (afvejes) og der tilsættes en ny mængde svarende til den mængde som blev fjernet (typisk 9.8 ml). Herefter omrystes yderligere 18 timer og proceduren gentages, hvorefter der omrystes yderligere 48 timer før der måles for tredje og sidste gang. Genfindingerne er vist i FIGUR 31, Det meste propiconazol (84-94%) blev ekstraheret allerede ved den første HPCD-ekstraktion. For den sandede jord blev kun ca. 2% ekstraheret ved anden ekstraktion. For den lerede kom der ca. 5% procent yderligere ved anden ekstraktion, men næsten intet ved tredje. For jorden med højt indhold af organisk stof kom der en del ekstra ved anden ekstraktion, ca. 10%, og yderligere et par procent ved tredje ekstraktion. Samlet set kunne der ekstraheres 97-98%, det vil sige praktisk taget fuld genfindning af alt friskt spiket propiconazol. Variationen mellem duplikater var minimal med en afvigelse på maksimalt $\pm 2\%$ af

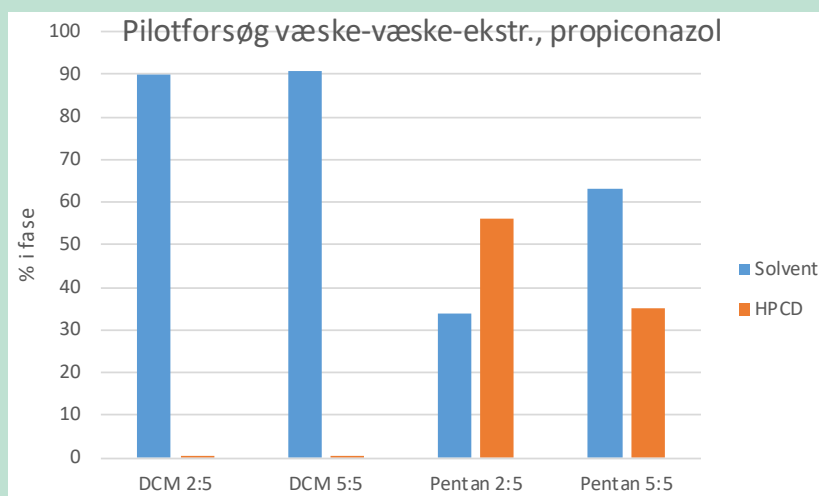
middelværdien. Til sammenligning vises tilsvarende ekstraktioner uden HPCD, dvs. kun med CaCl_2 , hvor ekstraktionseffektiviteten er meget ringere. Tebuconazols genfindning blev testet på samme måde i den lerede jord, og med 99% genfindning (Bilag 3).



FIGUR 30. Genfindning af friskt tilsat ^{14}C -propiconazol (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Ekstraktion af friskt tilsat propiconazol med hhv. CaCl_2 og CaCl_2 +HPCD i tre jordtyper med forskelligt indhold af organisk stof og forskellig tekstur. Middel af duplikate prøver.

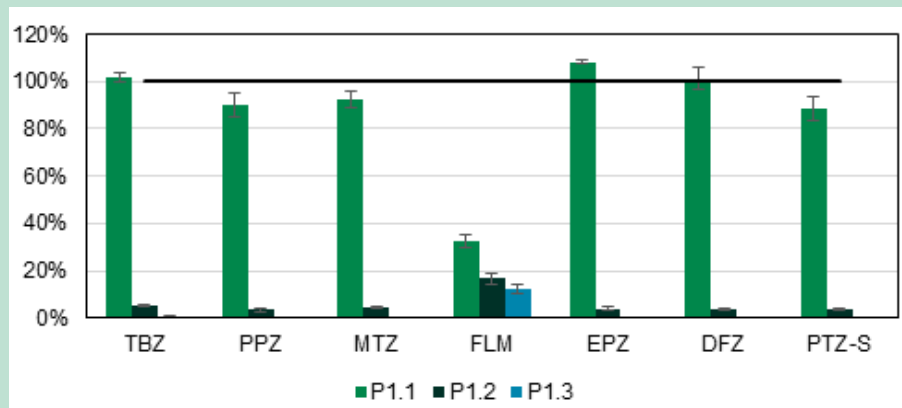
7.1.3 Overførsel af HPCD-ekstraheret moderstof til organisk solvent.

HPCD-ekstraktet kan næppe analyseres direkte på LC-MS. Vi testede derfor om dichlormethan eller *n*-pentan kunne ekstrahere ^{14}C -propiconazol (ca. 10 $\mu\text{g}/\text{l}$) fra en HPCD-opløsning ved væske-væske-ekstraktion med udrystning i 1 time. Vi testede væskeforholdene 2 ml solvent til 5 ml HPCD (2:5) og 5 ml solvent til 5 ml HPCD (5:5). Dichlormethan var meget effektivt til at ekstrahere propiconazol fra HPCD-opløsningen, hvorimod *n*-pentan var langt mindre effektiv. Vi valgte derfor dichlormethan-ekstraktion, selvom dichlormethan er tungere end HPCD-opløsningen, hvilket vanskeliggør metoden. Det antages, at HPCD ikke overføres til solventet, idet cyclo- β -dextrin er uopløselig i organiske solventer medmindre solventerne er meget polære (Hedges, 2009). Det forventes at hydroxypropyl-grupperne ikke ændrer ved dette.



FIGUR 31. Fordeling af ^{14}C -propiconazol i solventfasen og HPCD-fasen efter væske-væske ekstraktion

Eventuelle matrixeffekter fra HPCD, CaCl₂ og ekstraherede humusstoffer mm. blev undersøgt ved at spike et HPCD-jordekstrakt med en blanding af moderstoffer efterfulgt af analyse på LCMS. HPCD-jordekstraktet blev ekstraheret tre gange med DCM. Recovery er vist i FIGUR 33. Bortset fra florasulam, er én DCM-ekstraktion nok til at ekstraherer >90% af triazolmoderstofferne fra HPCD i jordekstrakt. Florasulam udgik fra de efterfølgende forsøg.



FIGUR 32. Gentagen DCM-ekstraktion og test for matrixeffekter for alle moderstoffer bestemt med LC-MS

7.1.4 Kinetikekstraktion af biotilgængelig fraktion i naturligt ældede jorde.

Naturligt ældede forureninger er oftest bundet meget hårdere i jorden end frisk forurening, hvorfor ekstraktion af den biotilgængelige fraktion også forventes at kræve længere tid for ældet moderstof end for friskt moderstof. I dette forsøg testede og sammenlignede vi to de forskellige variationer af HPCD-metoden til at estimere biotilgængelige fraktioner. Som beskrevet ovenfor, ekstraherede Cuypers et al., (2002) den samme jordprøve gentagne gange med HPCD og stigende tidsintervaller, hvorefter de fittede en funktion til de akkumulerede koncentrationer, så den maksimale koncentration, når tiden går mod uendelig, kunne beregnes. Reid et al, 2000a, og Doick et al., 2006) havde en mere simpel procedure, hvor jordprøverne blev ekstraheret én gang under optimerede betingelser. I første forsøgsserie satte vi parallelle forsøg op for at sammenligne metoderne. I begge tilfælde testede vi kinetikken i HPCD-ekstraktion af den biotilgængelige fraktion i naturligt ældede triazol-fungicider. Vi testede tre replikate diagonal-prøver fra Estrup, prøvetaget lige efter anden metconazol sprøjtning (disse prøver indeholdt også ældet tebuconazol, propiconazol og epoxiconazol), og tre replikate diagonalprøver fra Jyndevad prøvetaget med ældet tebuconazol, propiconazol og epoxiconazol. Prøverne indeholdt dermed både friskt og ældet triazol-moderstof i både høj og lav koncentration (TABEL 11). Opsætning af forsøgene er beskrevet i TABEL 12.

TABEL 11. Total-koncentration af triazol moderstoffer [µg/kg] og årstal for seneste sprøjtning.

	Prøvedato	TBZ	PPZ	MTZ	EPZ	PTZ-S
Estrup	20/06/2019	4.0	3.1	32.3	8.9	0.2
		(2014)	(2002)	(2019)	(2007)	
Jyndevad	01/04/2019	5.9	1.3	0.0	33.4	0.6
		(2014)	(2016)		(2015)	(2015)

TABEL 12. To forskellige metoder til bestemmelse af moderstoffernes biotilgængelighed.

Metode 1: Én ekstraktion af mange prøver med stigende tidsintervaller (Reid et al., 2000a og Doick et al., 2006)	Metode 2: Gentagen ekstraktion af få prøver med stigende tidsintervaller (Cuypers et al., 2002)
Fra hver jordprøve afvejes 5x1 g jord i 5 sorptionsrør og 10 ml HPCD (77 g/L i 10 mM CaCl) tilsættes til hvert rør. Rørene rystes grundigt manuelt for at opslæmme jorden.	Fra hver jordprøve afvejes 1 g jord i 1 sorptionsrør og 10 ml HPCD (77 g/L i 10 mM CaCl) tilsættes. Rørene rystes grundigt manuelt for at opslæmme jorden.
Rørene inkuberes på blodvender i mørke i 10°C inkubator.	Rørene inkuberes på blodvender i mørke i 10°C inkubator.
Efter ca. 5, 16, 42, 72 og 140 timer (den præcise tid noteres) spindes 1 rør fra hver jordprøve ned i 30 min ved 1500 g.	Efter ca. 5, 16, 42, 72 og 140 timer (den præcise tid noteres) spindes rørene ned i 30 min ved 1500 g.
Supernatanten overføres til nye vials og ekstraheres med DCM. Efter solvent-skifte fra DCM til ACN/vand (15/85) bestemmes moderstof-koncentration som beskrevet i afsnit 5.1.	Supernatanten overføres til nye vials og ekstraheres med DCM. 10 mL friskt HPCD-opløsning tilsættes til rørene som rystes grundigt manuelt for at opslæmme jorden igen og rørene sættes derefter på blodvender igen. Moderstof i DCM-fasen bestemmes efter solvent-skifte til ACN/vand (15/85), som beskrevet i afsnit 5.1.

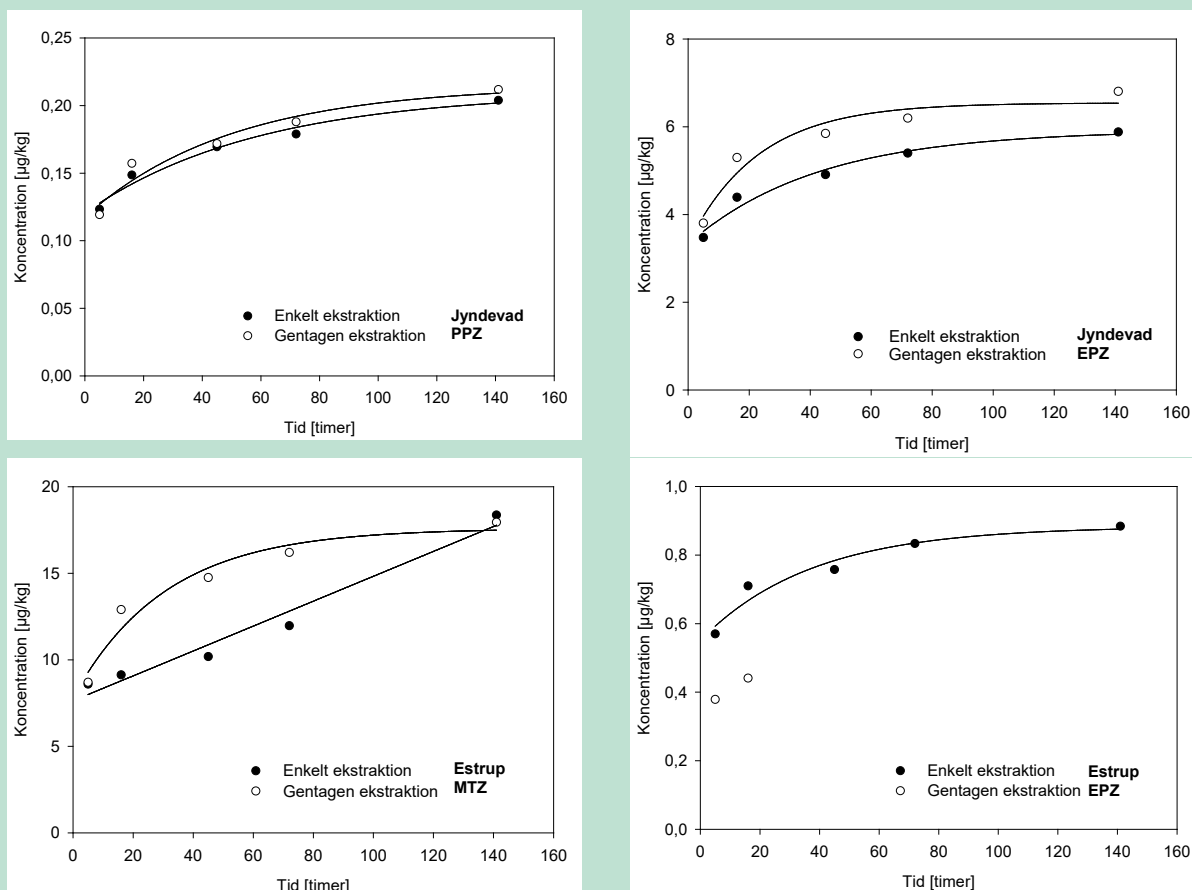
Forsøget skulle afklare følgende spørgsmål: 1) Kan man fitte data med en simpel exponentie rise-to-max funktion så man kan estimere det endelige niveau (biotilgængeligheden), når tiden går mod uendelig? 2) Er der forskel på den estimerede biotilgængelighed (fittede niveauer) når man bruger metode 1 (enkeltekstraktioner) og metode 2 (gentagne ekstraktioner)? 3) Hvor stor er forskellen på de målte biotilgængelige koncentrationer til tiden 140 timer og biotilgængelige koncentrationer estimeret ud fra kinetikken?

Der var forholdsvis stor variation mellem replikate diagonalprøver, hvilket afspejler, at der er tale om ægte replikater, som er samplet uafhængigt af hinanden på samme dato i marken. Variationen repræsenterer derfor både variationen i HPCD-metodens reproducerbarhed og variationen mellem de uafhængige replikater. Ofte bruges tekniske replikater i metodeudvikling, men vi valgte at bruge de ægte replikater, da det er denne type replikate prøver (diagonalprøver), der indsamles i projektets feltforsøg (Kapitel 9).

Ekstraktionens kinetik (FIGUR 34) fulgte i de fleste tilfælde en 3-parameter exponentiel rise-to-max funktion (LIGNING 1),

LIGNING 1 $y = y_0 + a(1 - e^{-bt})$

hvor y er koncentrationen i HPCD-fasen til tiden t , y_0 er skæring med y -aksen til $t=0$, og den biotilgængelige koncentration, når t går mod uendelig, er $y_0 + a$. Ved gentagen ekstraktion af prøver i metode 2, er y den akkumulerede koncentration i HPCD-fasen. I mange tilfælde var kinetikken ens for metode 1 og 2 (FIGUR 34 Jynde vad PPZ) eller metode 1 (enkelt ekstraktion) var lidt langsommere end metode 2 (gentagen ekstraktion) (FIGUR 34 Jynde vad EPZ). I enkelte tilfælde fulgte ekstraktionen ikke første-ordens kinetik, idet forløbet ikke var kurvet, men nærmere lineært (FIGUR 34 Estrup MTZ). For stoffer med meget lave biotilgængelige koncentrationer kunne biotilgængeligheden ikke estimeres med metode 2 (gentagen ekstraktion), da koncentrationer efter første eller anden ekstraktion var under detektionsgrænsen (FIGUR 34 Estrup EPZ).



FIGUR 33. Eksempler på kinetikken i ekstraktion af den biotilgængelige fraktion med HPCD (n=3) i to forskellige metodiske tilgange, hvor flere prøver hver ekstraheres én gang efter varierende inkubationstid (metode 1, enkelt ekstraktion) eller enkeltprøver ekstraheres gentagne gange og de ekstraherede mængder akkumuleres over tid (metode 2, gentagen ekstraktion).

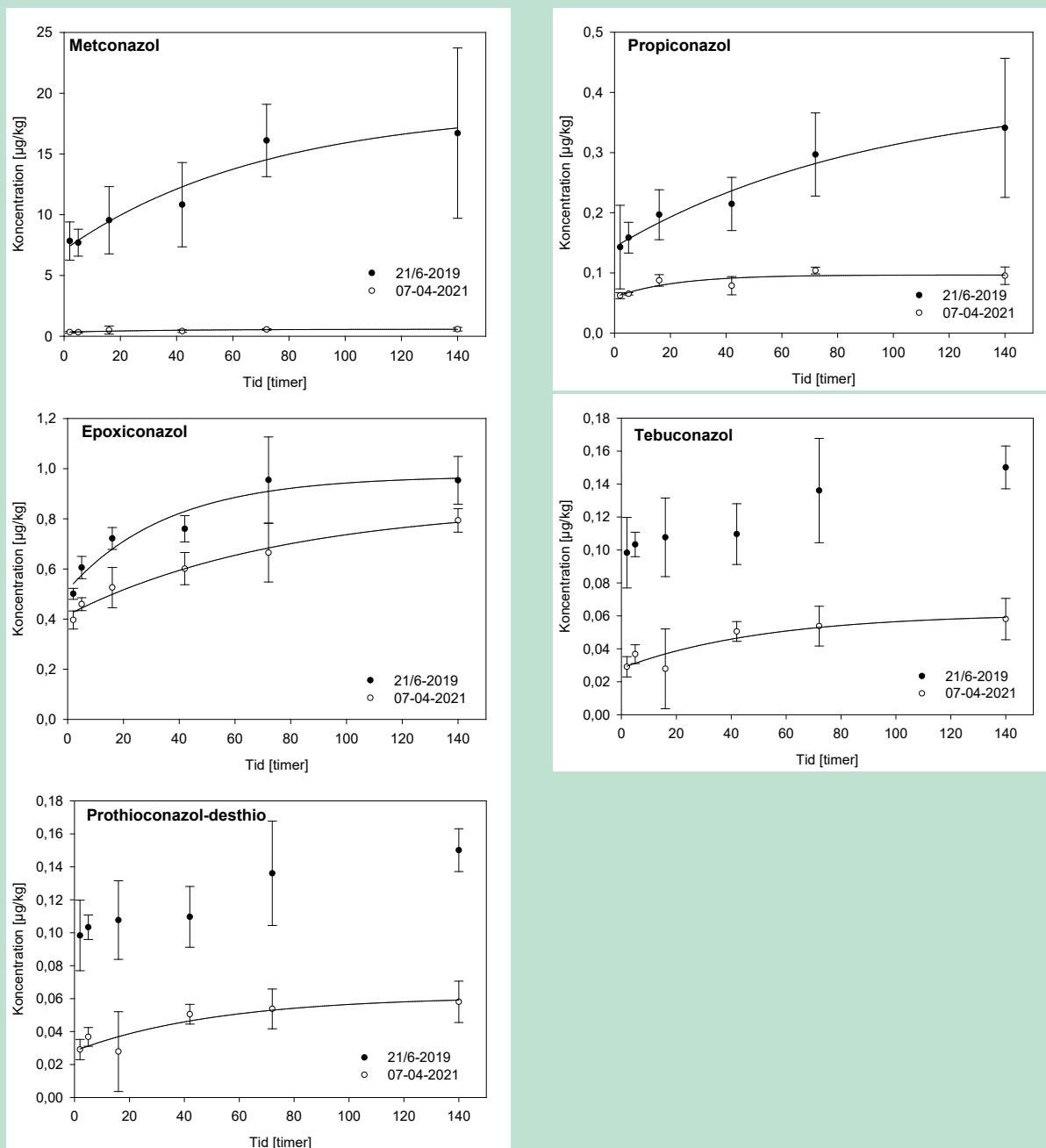
Forsøgets resultater er opsummeret i TABEL 13. De viser, at det er muligt at bestemme den biotilgængelige koncentration, og dermed også den biotilgængelige fraktion, med HPCD. Kinetikken for ekstraktioner af enkeltprøver (metode 1) giver næsten samme resultat efter 140 timer som gentagne ekstraktioner (metode 2), der mangler dog data for frigivelsen i de første timer, som ville give bedre model-fit. Det er generelt god overensstemmelse mellem fittede biotilgængeligheder og biotilgængeligheder bestemt efter 140 timers ekstraktion. For stoffer, hvor både enkeltextraktioner og gentagne ekstraktioner kan fittes, er der også god overensstemmelse mellem metoderne, dog nogle gange med lidt lavere værdier i enkeltextraktioner (metode 1). Som standard-metode valgte vi enkeltextraktioner, som har en stor fordel, når man er tæt på detektionsgrænsen, idet gentagne ekstraktioner ofte er under detektionsgrænsen og derfor underestimerer den biotilgængelige koncentration i disse prøver.

TABEL 13. Sammenligning af ekstraktion af den biotilgængelige fraktion med HPCD (n=3) i to forskellige metodiske tilgange, hvor flere prøver hver ekstraheres én gang efter varierende inkubationstid (metode 1, enkelt ekstraktion) eller enkeltprøver ekstraheres gentagne gange og de ekstraherede mængder akkumuleres over tid (metode 2, gentagen ekstraktion). Biotilgængelige koncentrationer estimeres både som koncentrationer efter 140 timers HPCD-kontaktstid og ved kinetik-fit.

Estrup (lerjord)	TBZ	PPZ	MTZ	EPZ	PTZ-S
Total koncentration [$\mu\text{g/kg}$]	4,000	3,083	32,323	8,887	0,200
Biotilgængelig konc., enkelt, 140h	0,131	0,293	18,367	0,884	0,061
Biotilgængelig konc., enkelt fit	0,133	Ikke kurvet	Ikke kurvet	0,884	0,069
Biotilgængelig konc., gentagen, 140h	<LOD	0,359	17,95	<LOD	0,070
Biotilgængelig konc., gentagen, fit	<LOD	0,360	17,59	<LOD	0,065
% biotilgængeligt, enkelt, 140h	3,3	9,5	56,8	9,9	30,5
% biotilgængeligt, enkelt, fit	3,3			9,9	34,5
% biotilgængeligt, gentagen, 140h		11,6	55,5		35,0
% biotilgængeligt, gentagen, fit		11,7	54,4		32,5

Jyndevad (sandjord)	TBZ	PPZ	EPZ	PTZ-S
Total koncentration [$\mu\text{g/kg}$]	5,880	1,287	33,413	0,553
Biotilgængelig konc., enkelt, 140h	0,500	0,204	5,881	0,054
Biotilgængelig konc., enkelt fit	0,502	0,215	6,546	0,058
Biotilgængelig konc., gentagen, 140h	0,512	0,212	6,806	0,058
Biotilgængelig konc., gentagen, fit	0,528	0,210	5,924	Ikke kurvet
% biotilgængeligt, enkelt, 140h	8,5	15,9	17,6	9,8
% biotilgængeligt, enkelt, fit	8,5	16,7	19,6	10,5
% biotilgængeligt, gentagen, 140h	8,7	16,5	20,4	10,5
% biotilgængeligt, gentagen, fit	9,0	16,3	17,7	

I en efterfølgende forsøgsserie testede vi, om vi med metode 1 kunne påvise ændringer i biotilgængelighed over tid. Vi ekstraherede derfor jordprøver indsamlet umiddelbart efter sprøjtning med metconazol og efter to års aging på marken. For at få større tidlig opløsning i den første del af kinetikken inkluderede vi en ekstraktion efter bare 2 timers kontakt med HPCD. Kinetikken blev dog ikke anderledes af større tidlig opløsning (Figur 35) og viste igen, at en forholdsvis stor del af det biotilgængelige stof frigives meget hurtigt (skæring med y-aksen, y_0 i LIGNING 1) efterfulgt af en i stigende grad langsomt frigivet mængde (a i LIGNING 1). Koncentrationerne bestemt efter 42 timers HPCD-ekstraktion af prøverne fra 21/6-2019 (Figur 35) var for de fleste stoffer mindre effektiv end forventet ud fra de øvrige punkter. Dette betyder, at funktionen ikke kunne fittes til tebuconazol og prothioconazol-desthio på denne dato. Friskt-sprøjtet metconazol viste et meget kraftig fald i biotilgængelig koncentration i løbet af de to år (Figur 35). Den målte biotilgængelighed lige efter sprøjtning underestimerede i nogen grad den faktiske biotilgængelighed, idet den målte biotilgængelige koncentration lige efter sprøjtning var $19 \mu\text{g/kg}$ bestemt ved kinetik-fit og $17 \mu\text{g/kg}$ bestemt som enkeltextraktion efter 140 timer, men den faktiske fjernelse i marken i løbet af de to år var på $25 \mu\text{g/kg}$ (TABEL 14).



FIGUR 34. Sammenligning af kinetikken i ekstraktion af den biotilgængelige fraktion med HPCD (metode 1; n=3) i to forskellige i jordprøver udtaget på to forskellige tidspunkter fra VAP-marken ved Estrup. 21/6-2019 er kort efter sprøjtning med metconazol, 7/4-2021 er efter næsten to års ældning i marken.

Andre triazoler, der allerede var ældet i jorden inden indsamling af den første jordprøve, viste også fald i biotilgængelig koncentration, dog i noget mindre omfang end metconazol. Det var god overensstemmelse mellem fittede biotilgængeligheder og biotilgængeligheder bestemt efter 140 timers ekstraktion af enkeltprøve, dog var de fittede estimater oftest lidt højere end estimater bestemt ved 140 times inkubation (TABEL 14). Vi havde i de følgende forsøg et stort antal prøver, hvor biotilgængeligheden skulle bestemmes. Da kinetik-ekstraktion er meget resurse-krævede, valgte vi som standard at bruge ekstraktion med HPCD i 140 timer som mål for biotilgængeligheden, vel vidende at det giver en lille underestimering af biotilgængeligheden. Metoden er dog langt bedre dokumenteret og valideret end mange andre studier, der bruger en enkelt HPCD-ekstraktion.

TABEL 14. Sammenligning af kinetikken i ekstraktion af den biotilgængelige fraktion med HPCD (metode 1; n=3) i to forskellige jordprøver udtaget på to forskellige tidspunkter fra VAP-marken ved Estrup. 21/6-2019 er kort efter sprøjtning med metconazol, 7/4-2021 er efter næsten to års ældning i marken. Biotilgængelige koncentrationer estimeres både som koncentrationer efter 140 timers HPCD-kontaktstid og ved kinetik-fit.

21-06-2019	TBZ	PPZ	MTZ	EPZ	PTZ-S
Total koncentration [µg/kg]	4,000	3,084	32,323	8,888	0,198
Biotilgængelig konc. 140 h	0,150	0,341	16,714	0,954	0,050
Biotilgængelig konc. fit	Ikke kurvet	0,402	18,793	0,971	Ikke kurvet
% biotilgængeligt, 140 h (%)	3,8	11,1	51,7	10,7	25,3
% biotilgængeligt, fit		13,0	58,1	10,9	

07-04-2021	TBZ	PPZ	MTZ	EPZ	PTZ-S
Total koncentration [µg/kg]	3,129	3,105	7,288	6,609	0,451
Biotilgængelig konc. 140 h	0,058	0,095	0,576	0,794	0,041
Biotilgængelig konc. fit	0,061	0,097	0,573	0,860	0,061
% biotilgængeligt, 140 h (%)	1,9	3,1	7,9	12,0	9,1*
% biotilgængeligt, fit (%)	2,0	3,1	7,9	13,0	13,6

* Det ene replikat var en outlier (non-detect), som er udeladt af beregningen

Nogle gange tilsættes natriumazid for at hæmme mikrobiel aktivitet ved langvarig HPCD-ekstraktion for at undgå en eventuel nedbrydning af stofferne (Cuypers et al., 2002, Johnsen et al., 2007). I vores forsøg tilsatte vi ikke natriumazid, idet natriumazid ville interferere med koncentrationsbestemmelserne på LC-MSMS. Der var dog ikke tegn på nedbrydning i løbet af ekstraktionen, idet ingen koncentrationer viste faldende tendens i de sidste punkter.

Biotilgængelig fraktion kunne bestemmes over et stort koncentrationsområde og for meget forskellige biotilgængeligheder, idet den biotilgængelige fraktion varierede fra 2% for tebuconazol til 50-60% for metconazol (TABEL 13). Der var også en tydelig aging i løbet af de to år, specielt for metconazol hvor 50-60% var biotilgængeligt kort tid efter sprøjtning, men kun ca. 8% efter to år.

Konklusion: Metoden vurderes at være anvendelig til at beskrive triazol-fungiciders aging i landbrugsjord, men underestimerer sandsynligvis biotilgængeligheden lidt for friskt triazol-fungicid. Som standardmetode vil vi ekstrahere med HPCD i 140 timer, efterfulgt af centrifugering i 30 min ved 1500g for at separere HPCD og jord, og derefter overføre det ekstraherede triazol-fungicid til en DCM-fase inden kvantificering på LCMS.

8. Resultater og diskussion:

Undersøgelse af naturlig dannelse og nedsivning af 1,2,4-triazol i naturområder og økologiske marker

Vi installerede sugeceller i tre naturtyper og fire økologiske landbrugsarealer. Der kunne ikke påvises 1,2,4-triazol i jordvand fra naturområderne, men tre af

de fire økologiske landbrugslokaliteter indeholdt 1,2,4-triazol (0,005-0,015 µg/l) i jordvandet. Konventionel halm, der bringes ud på to af de tre marker som husdyrgødning, indeholdt op til flere hundrede µg/kg af tebuconazol, epoxiconazol og prothioconazol-desthio. Regnvandsprøver indeholdt lave koncentrationer af 1,2,4-triazol og 1,2,4-triazoleddikesyre. Man kan desuden forvente et lille 1,2,4-triazol-bidrag i jordvandet fra atmosfærisk våddeposition af moderstoffer. Vi har ikke kunnet bekræfte en baggrund af naturligt forekommende 1,2,4-triazol i naturområder, til gengæld har vi entydigt påvist 1,2,4-triazol omkring 0,01 µg/l under de økologiske marker, som kan skyldes diffuse antropogene kilder, muligvis med et lille naturligt bidrag.

I dette kapitel undersøger vi, om der kan påvises naturlig dannelse og nedsivning af 1,2,4-triazol i naturområder og økologiske marker, dvs. om man kan påvise en generel, udbredt, naturlig kilde til 1,2,4-triazol i grundvandet. En eventuel naturlig dannelse af 1,2,4-triazol i landbrugsjord, vil kunne forklare, hvorfor 1,2,4-triazol fandtes på VAP-marker før sprøjtning med triazol-fungicider.

Formålet med vores undersøgelser af naturlig dannelse af 1,2,4-triazol var derfor 1) at se om vi kunne eftervise Bayers fund af 1,2,4-triazol, 1,2,4-triazolalanin og 1,2,4-triazoleddikesyre i jord fra skove, samt at foretage tilsvarende undersøgelse af landbrugsarealer, som har været dyrket økologisk i mange år og 2) om der var forekomst af 1,2,4-triazol i jordvand fra 1 m dybde i natur- og landbrugsområder, hvor der ikke forventes input af triazol-fungicider eller af 1,2,4-triazol fra antropogen aktivitet. Vi installerede derfor sugeceller i tre naturtyper og fire økologiske landbrugsarealer (TABEL 15) for at følge koncentrationen af 1,2,4-triazol og triazolmetabolitter over tid i jordvandet.

TABEL 15. Oversigt over sugeceller til bestemmelse af naturlig 1,2,4-triazol.

Lokalitet	Nr.	Dybde (m.u.t.)	Jordtype	Bevoksning/anvendelse
Sv1	1-1, 1-2, 1-3	1	Sandet	Økologisk omdrift siden før 1990
Sv2	2-1, 2-2, 2-3	1	Leret, organisk-rig	Våd eng med græsning, økologiske køer
Sv3	3-1, 3-2, 3-3	1	Leret	Økologisk omdrift siden før 1990
Sv4	4-1, 4-2, 4-3	1	Sandet	Tør eng med græsning, økologiske får
Sv5	5-1, 5-2, 5-3	1	Sandet	Gammel bøgeskov med bar bund
TH	TH1, TH3	1	Sandet, podzol (morbund)	Blandet nåleskov med bar bund
TH	TH2	1.6	Sandet, podzol (morbund)	Blandet nåleskov med bar bund
TH*	TH4	0.8	Sandet, podzol (morbund)	Åben lærkeskov m. mos/græs
AP	AP1, AP2, AP3	1	Sandet, podzol (morbund)	Hedelyng, ene, mosebølle

*Placeret ca. 30 m fra de øvrige TH-sugeceller i halvåbent terræn i en lærketræsbeplantning.

8.1 Karakterisering af jorden på de forskellige lokaliteter

Udover at have en meget forskellig anvendelse, har de forskellige jorde også en ret forskellig tekstur og meget forskellig organisk indhold (TABEL 16). Generelt er der tale om sandede jorde, men lokalitet Sv2 og Sv3 havde også et betydeligt indhold af ler og finsilt.

TABEL 16. Glødetab, sigteanalyse og hydrometeranalyse for topjord og jord fra 80 cm dybde ved sugecelle-lokaliteterne.

Lokalitet	Dybde cm.u.t	Gløde- tab %	Sigteanalyse (%)					Hydrometer (%)	
			>2 mm	0.6-2 mm	0.2-0.6 mm	0.063-0.2 mm	< 0.063 mm	2-20 µm	<2 µm
Sv1	0-15	2,9	0,80	1,4	8,8	59,7	29,4	0,3	3,0
Sv2	0-15	11,5	3,3	4,8	17,0	38,2	36,7	*	*
Sv3	0-15	4,8	1,1	3,1	10,7	24,2	60,9	11,5	9,6
Sv4	0-15	4,2	3,2	3,5	11,3	48,4	33,7	3,2	2,7
Sv5	0-15	7,2	2,3	3,1	10,3	56,7	27,7	1,7	1,4
TH	0-10	1,6	0,61	1,9	73,5	20,9	3,04	**	**
AP	0-10	2,1	0,22	4,0	76,4	15,9	3,47	**	**
TH-O hor.	5-0	38,5	-	-	-	-	-	-	-
AP-O-hor.	5-0	33,2	-	-	-	-	-	-	-
Sv1	80	-	0,0	0,1	0,1	28,2	71,6	16,5	4,7
Sv2	70	-	0,0	0,0	0,7	18,2	81,1	21,9	14,0
Sv3	90	-	0,0	0,1	0,3	10,0	89,6	27,0	33,8
Sv4	80	-	4,5	4,1	12,6	42,7	36,1	3,1	2,6
Sv5	90	-	3,4	3,2	10,4	55,1	27,8	1,8	1,5
TH	60	-	5,3	6,2	30,1	48,7	9,7	**	**
AP	70	-	0,0	1,0	87,7	10,8	0,5	**	**

* For meget organisk stof til hydrometeranalyse

** For lidt fint materiale til hydrometeranalyse

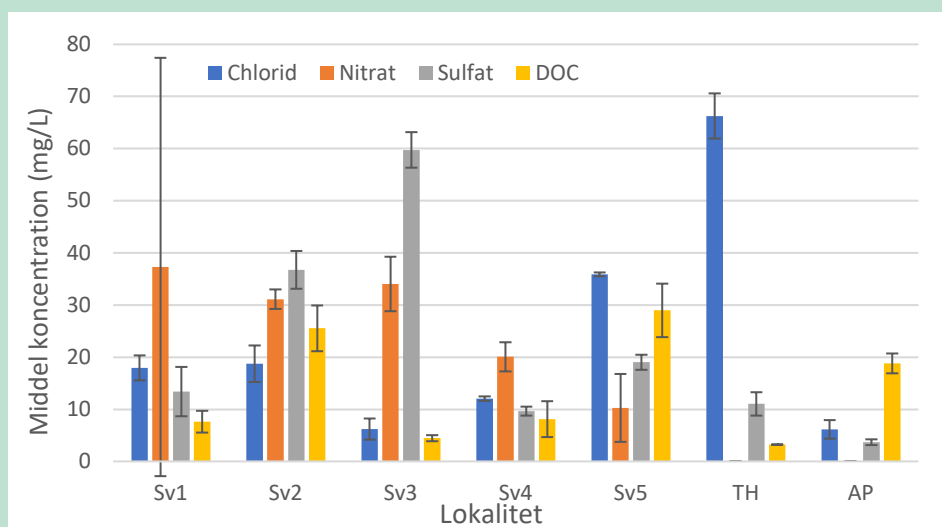
8.2 Laboratorietest af triazolmetabolitters stabilitet i vandig opløsning.

For at kunne opnå pålidelige resultater for porevandskoncentrationer af 1,2,4-triazol og de øvrige små triazoler må stofferne være stabile i den uge, det tager at suge vand ud af jorden samt den efterfølgende prøvetransport og prøveopbevaring. Stoffernes stabilitet i Milli-Q vand og en blanding af sugcellevand fra flere af lokaliteterne blev testet i et laboratorieforsøg. Stabilitetstesten i Milli-Q vand viste om stofferne er stabile med hensyn til spontan kemisk omdannelse i vand. Stabilitetstesten i sugcellevand viste derudover effekten af de naturligt forekommende enzymer, mikroorganismer og diverse opløste stoffer. Stabiliteten blev testet ved både 4 °C og 20 °C, idet 4 °C er den typiske temperatur i køleskabe under opbevaring og prøveflaskerne i felten kan nå op på maksimalt ca. 20 °C under prøvetagning og transport. 1,2,4-triazol viste konstante koncentrationer over 14 dage i både Milli-Q-vand og sugcellevand ved både 4 °C og 20 °C (Bilag 4). Det er derfor usandsynligt at målte 1,2,4-triazol-koncentrationer skulle være væsentligt undervurderet pga. nedbrydning i løbet af de 5-7 dage som prøvetagningen krævede og den efterfølgende opbevaring i køleskab i op til 3 dage. 1,2,3-triazol og 1,2,4-triazolalanin, derimod, viste faldende koncentrationer med størst effekt for 1,2,3-triazol og størst effekt ved 20 °C (Bilag 4). For disse stoffer kan der derfor forventes nogen nedbrydning i felten om sommeren, hvorfor koncentrationerne generelt må anses for underestimerede.

8.3 1,2,4-triazol i porevand fra sugecellerne

Der blev indsamlet og analyseret porevand fra sugecellerne på 6 datoer i perioden 3. november 2020 til 14. december 2021. Der var for enkelte prøver tale om volumener på under 100 ml med deraf-følgende forhøjede detektionsgrænser, ligesom der var dage, hvor det var umuligt at trække vand ud af nogle af sugecellerne, særligt på den meget lerede lokalitet 3 (Bilag 6).

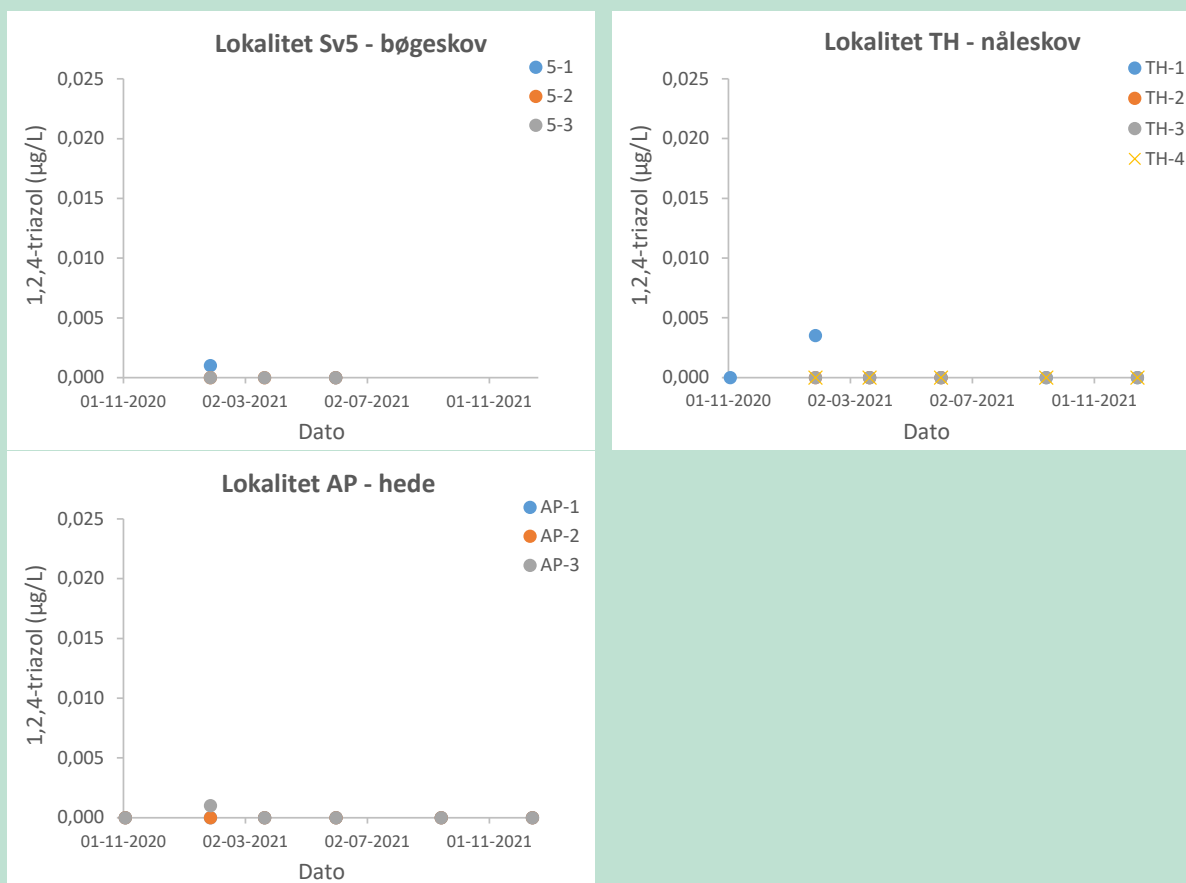
Vi analyserede anioner og opløst organisk stof (DOC) i sugecellevandet på en enkelt prøvedato (22. marts 2021). Der var betydelige forskelle mellem lokaliteterne, især for koncentrationen af nitrat og DOC (FIGUR 36). For nogle lokaliteter var der også betydelige forskelle mellem de enkelte sugeceller, mest udpræget for nitrat på lokalitet Sv1 som varierede fra 4 til 94 mg/l.



FIGUR 35. Chlorid, nitrat, sulfat og opløst organisk stof (DOC) i sugeceller fra de syv lokaliteter udtaget d. 22/3-2022 (n=3, for lokalitet Sv5 og TH dog n=2). Fejllinjer angiver ± 1 standardafvigelse. Rådata findes i Bilag 5.

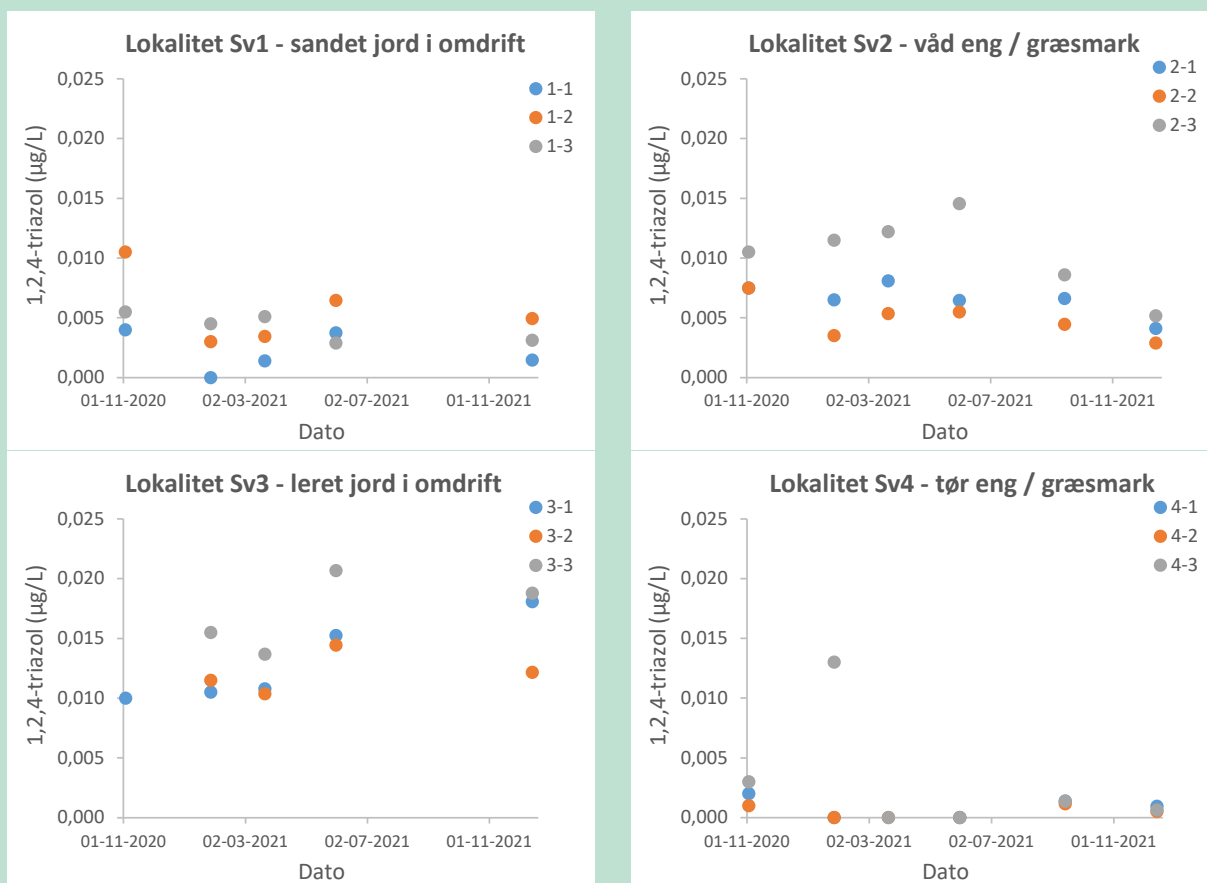
Nitrat var under detektionsgrænsen (0,05 mg/l) på lokaliteterne TH og AP, hvilket passer med, at de er naturlokaliteter. Bøgeskoven (lokalitet Sv5) havde mindre nitrat i porevandet end de nærliggende græsningssenge og marker, men dog tyder koncentrationen på et betydeligt næringsinput for en naturlokalitet, sandsynligvis atmosfærisk deposition fra den nærliggende landbrugsdrift.

FIGUR 37 viser koncentrationen af 1,2,4-triazol for hver enkelt sugecelle i de naturlige vegetationstyper. Der kunne ikke påvises 1,2,4-triazol i sugeceller i naturområderne (Sv5, TH og AP). En enkelt prøve fra én af sugecellerne på lokaliteten TH (nåleskov, 27/1-2021) viste ganske vist 1,2,4-triazol på kvantifikationsgrænsen og de to øvrige lokaliteter havde hver én prøve på detektionsgrænsen på samme dato, men dette kunne ikke bekræftes på andre prøvetagningsdage.



FIGUR 36. Koncentration af 1,2,4-triazol i 1 m dybde i tre naturtyper angivet for hver enkelt sugecelle på hver enkelt prøvedato. Kvantifikationsgrænse var generelt 0,003 µg/l, men forøget op til 3x i enkelte prøver pga. lavt prøvevolumen. Prøver med prøvevolumen mindre end 20 ml er ikke vist på grund af $\geq 5x$ forøget kvantifikationsgrænse

FIGUR 38 viser koncentrationen af 1,2,4-triazol for hver enkelt sugecelle på de økologiske landbrugs-lokaliteter. Der var tydelige spor af 1,2,4-triazol i alle sugecellerne fra tre af de økologiske landbrugslokaliteter (Sv1: sandet jord i omdrift; Sv2: våd eng/græsmark; Sv3: leret jord i omdrift, FIGUR 38) på de fleste prøvetagningsdage. Den højeste koncentration var 0,021 µg/l på lokalitet Sv3 den 1. juni 2021, men de typiske koncentrationer lå mellem 0,005-0,015 µg/l. Dette er så konsistent og så langt over kvantifikationsgrænsen, at vi anser det for helt usandsynligt, at der kan være tale om fejlmålinger. Sv4 (tør eng/græsmark) viste en betydelig koncentration af 1,2,4-triazol i en enkelt sugecelle på en enkelt dag og derudover spor af 1,2,4-triazol på visse af de andre prøvetagningsdage (FIGUR 38). For lokalitet Sv4 er det derfor ikke entydigt, om der var 1,2,4-triazol i porevandet eller ej.



FIGUR 37. Koncentration af 1,2,4-triazol i 1 meters dybde i fire økologiske landbrugsjorde angivet for hver enkelt sugecelle på hver enkelt prøvedato. Analyser uden detektion, men med prøvevolumen mindre end 20 mL er ikke inkluderet på grund af $\geq 5x$ forøget kvantifikationsgrænse. Kvantifikationsgrænse var generelt 0,003 µg/l, men forøget op til 3x i enkelte prøver pga. mindre prøvevolumen

For at udelukke fejlmålinger fik vi fundene bekræftet af et uafhængigt laboratorium. I forbindelse med den afsluttende prøvetagning den 14/12-2021 blev prøver fra to sugeceller (Sv2-3 og Sv3-3) derfor delt i to og den ene del sendt til kommerciel analyse hos Eurofins Danmark for at bekræfte forekomsten af 1,2,4-triazol, den anden del blev analyseret på GEUS. Analyserne fra Eurofins bekræftede forekomsten af 1,2,4-triazol i begge prøver og i samme koncentrationsniveau, som målt i GEUS' laboratorium (TABEL 17).

TABEL 17. 1,2,4-triazol. Sammenligning af analyseresultater for to sugecelleprøver analyseret hos både GEUS og Eurofins.

Prøve	GEUS (µg/l)	Eurofins (µg/l)
Sv2-3, 14/12-2021	0,0052	0,0079
Sv3-3, 14/12-2021	0,019	0,016

En eventuel naturlig dannelse af 1,2,4-triazolstoffer, fx essramycin, kunne muligvis være styret af mængden af tilgængeligt kvælstof, idet triazol-ringen jo indeholder tre kvælstofatomer og derfor er en metabolisk omkostning for mikroorganismerne i kvælstof-begrænsede miljøer. Dette stemmer ganske godt overens med de observerede koncentrationer, hvor 1,2,4-triazol-indholdet er størst i landbrugsjordene i omdrift (FIGUR 37) og lavest i de naturlige økosystemer (FIGUR 38). Det passer dog dårligt med de forholdsvis høje 1,2,4-triazol-koncentrationer i den våde eng, som ikke har været tilført husdyrgødning i mere end 20 år. Et andet argument mod kvælstof-afhængig

dannelse er, at mikrobielle sekundære metabolitter oftest udgør en ganske lille del af mikroorganismernes samlede stofskifte og derfor sandsynligvis kun er ganske lidt afhængig af jordens generelle kvælstofniveau, samt at vi ikke kunne påvise essramycin i jordene (afsnit 8.5). Vi undersøgte derfor om der kunne være andre kilder til 1,2,4-triazol, fx andre 1,2,4-triazolmetabolitter i jordvandet, rester af gamle moderstoffer i jorden, moderstoffer eller triazol-metabolitter i nedbøren, eller rester af moderstoffer i konventionel halm brugt i husdyrproduktionen på Svanholm.

8.4 Analyse for 1,2,4-triazol-metabolitter i porevand fra sugecellerne

1,2,4-triazolalanin og 1,2,4-triazoledikesyre blev ikke detekteret i nogen af prøverne, men det skal bemærkes, at detektionsgrænsen for 1,2,4-triazolalanin var 0.03 µg/L, altså noget højere end for 1,2,4-triazol, hvor detektionsgrænsen var 0.001 µg/l (TABEL 18).

TABEL 18. Detektions- og kvantifikationsgrænser for triazol-nedbrydningsprodukter i vandprøver fra sugeceller efter oprensning med SPE. Analysen af 1,2,4-triazolalanin var ikke stabil over tid og i perioder kunne lavere koncentrationer end det her opgivne detekteres.

	Detektionsgrænse (µg/l)	Kvantifikationsgrænse (µg/l)
1,2,4-triazol	0,001	0,003
1,2,4-triazolalanin	0,03	0,1
1,2,4-triazoledikesyre	0,003	0,01

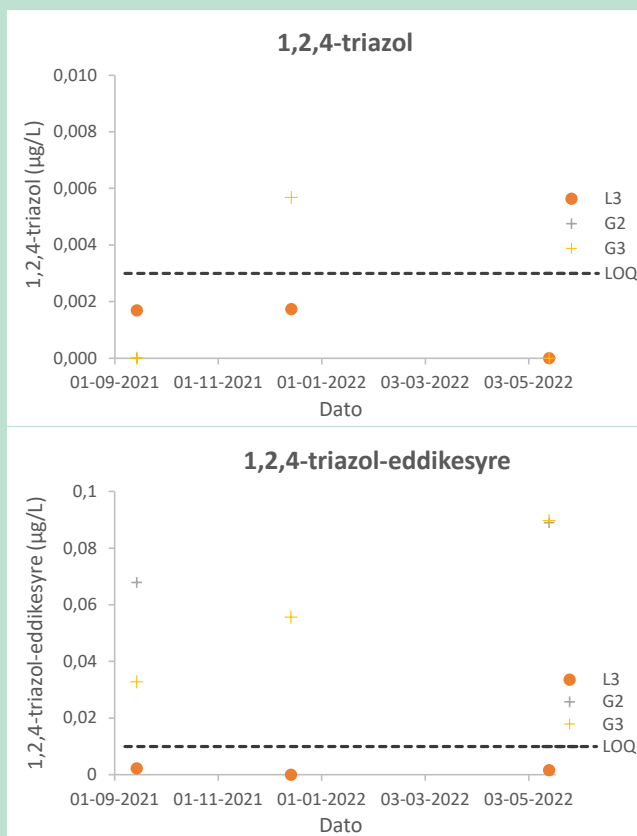
8.5 Analyse af jorden over sugecellerne

I første omgang blev kun prøver fra 28/8-2020 og 27/1-2021 analyseret. Der kunne ikke detekteres hverken 1,2,4-triazol (LOD: 0,9 µg/kg), 1,2,4-triazolalanin (LOD: 30 µg/kg) eller 1,2,4-triazoledikesyre (LOD: 0,5 µg/kg) i nogen af prøverne, vi brugte derfor ikke resurser på at ekstrahere de øvrige jordprøver. Analyse af O-horisonter var ikke succesfuld på grund af den meget anderledes jordtype, og der kan derfor ikke afrapporteres en detektionsgrænse, men ingen af stofferne blev detekteret i disse prøver.

Jordprøverne blev også analyseret kvantitativt for projektets model-moderstoffer med LC-MS/MS, og kvalitativt med LC-HRMS for bitertanol, triadimenol, triadimefon, paclobutrazol og alle kendte nedbrydningsprodukter fra alle moderstofferne (afsnit 5.1.6) samt naturstoffet essramycin. Ingen af stofferne blev detekteret i jordprøverne. Da hverken ekstraktionsmetoden eller analysemetoden er optimeret til LC-HRMS-stofferne, kan falsk negative resultater ikke helt udelukkes. Detektionsgrænsen for de seks model-moderstoffer lå på 2-3 µg/kg med samme metode. Dette giver en indikation af detektionsgrænsen for de øvrige moderstoffer, det kan dog være svært direkte at oversætte detektionsgrænser til andre stoffer, da ioniseringsintensitet og ion-suppression pga. matrix er stofspecifik.

8.6 Atmosfærisk deposition, analyse af nedbør og grannåle fra Tisvilde Hegn for 1,2,4-triazol og 1,2,4-triazol-metabolitter

Nedbørsanalyserne viste lave koncentrationer af 1,2,4-triazol og 1,2,4-triazol-edikesyre i regnvand (FIGUR 39). Koncentrationen var dog omkring eller under kvantifikationsgrænsen for begge stoffer. Nåledryppet, derimod, viste ret høje koncentrationer af 1,2,4-triazoledikesyre (0,02-0,09 µg/l), men kun 1,2,4-triazol i detekterbar koncentration i en enkelt prøve. Alene ud fra målingerne, er det svært at vide, om der er tale om deposition på nålene og efterfølgende afvaskning, eller om der er tale om udskillelse fra nålene af 1,2,4-triazoledikesyre dannet naturligt i træerne, eller dannet fra atmosfærisk deposition af moderstofferne på nålene. De meget lavere koncentrationer i regnvandet kunne dog tyde på, at der er tale om en udskillelse fra nålene. Vi kunne ikke genfinde 1,2,4-triazol eller 1,2,4-triazoledikesyre i jorden eller jordvandet fra sugecellerne på denne lokalitet.



FIGUR 38. 1,2,4-triazol og 1,2,4-triazoleddikesyre i regnvand (L3) og gennemdryp fra nåletræer (G2 og G3). Analysen mislykkedes for G2 i december 2021, derfor ingen data. Kvantifikationsgrænse i vandprøver var generelt 0,003 µg/l for 1,2,4-triazol og 0,01 µg/l for 1,2,4-triazoleddikesyre (stiplet linje), dog formodentlig forhøjet for gennemdryp (G2 og G3) pga. øget matrixeffekt. Bemærk forskel i skala på y-akserne.

8.7 Atmosfærisk deposition, triazol-fungicider i NOVANA

Atmosfærisk våddeposition af udvalgte pesticider måles i NOVANAs program for atmosfærisk deposition, hvor de nationale pesticiddata baseres på to målestationer: Risø og Sepstrup Sande. Epoxiconazol er det eneste 1,2,4-triazolstof i programmet og indgik i årene 2017-2020 med årsbidrag på henholdsvis: 2017: 0,3 og 0,8 µg/m² (Ellermann m.fl., 2018); 2018: 1,0 og 1,0 µg/m² (Ellermann m.fl., 2019); 2019: 0,8 og 0,9 µg/m² (Ellermann m.fl., 2020); 2020: 0,3 og 0,4 µg/m² (Ellermann m.fl., 2021). Middel af disse årsmidler giver 0,68 µg/m²/år. Herfra kan man beregne et overslag over worst-case koncentrationer i jordvand, hvis man forudsætter fuldstændig omdannelse af epoxiconazol til 1,2,4-triazol og en nettonedbør på 300 mm, hvilket giver en gennemsnitlig 1,2,4-triazol koncentration på 0,0005 µg/l. Bidraget er sandsynligvis betydeligt mindre, idet ikke alt epoxiconazol kan forventes omdannet til 1,2,4-triazol og fordi det dannede 1,2,4-triazol i varierende grad vil nedbrydes i overjorden, inden det når ned til sugecellerne. På den anden side må man ud fra bekæmpelsesmiddelstatistikken formode, at den samlede deposition af 1,2,4-triazol moderstoffer er betydeligt højere end epoxiconazol, idet det samlede salg af triazol-moderstoffer ifølge bekæmpelsesmiddelstatistikken har været 24,5 gange højere end salget af epoxiconazol i disse år (FIGUR 3). Alt i alt kan man derfor forvente et lille 1,2,4-triazol-bidrag i jordvandet fra atmosfærisk våddeposition af moderstoffer. Koncentrationerne kan dog variere mellem nærtliggende lokaliteter fx pga. forskelligt potentiale for dannelse og nedbrydning af 1,2,4-triazol.

Man kunne også forestille sig, at et eventuelt atmosfærisk indhold af triazol-fungicider blev opkoncentreret på blade og nåle, da både bladoverflader, nåle og triazol-fungicider er hydrofobe. Vi kunne dog ikke detektere moderstoffer til 1,2,4-triazol på friske eller nedfaldne nåle i fire prøver indsamlet fra gran og lærk på lokalitet TH i december 2021, dvs. koncentrationer for hvert enkelt triazolfungicid var mindre end ca. 2 µg/kg tørvægt og for 1,2,4-triazoledikesyre mindre end ca. 50 µg/kg tørvægt.

8.8 Analyse af halm, gødning/kompost og friske kokasser fra Svanholm Gods

På Svanholm gods anvendes konventionel halm til strøelse i kostalden. Husdyrgødning baseret på strøelse er derfor en mulig kilde til 1,2,4-triazol detekteret i porevandet under de dyrkede lokaliteter Sv1 og Sv3. På lokalitet Sv2 tilføres dog intet udover komøg direkte fra køer på græs. For at indsnævre antallet af mulige kilder til den observerede 1,2,4-triazol under de tre af Svanholm-lokaliteterne analyserede vi prøver fra Svanholms halmlager. Det var muligt at få halm fra 2019, 2020 og 2021, som stammer fra forskellige, konventionelle landmænd i nærområdet. Prøverne blev udtaget som blandprøver af mindst 5 halmballer fra hvert år. Derudover blev der udtaget en blandprøve fra en stor kompostbunke, som indeholdt diverse staldrester med henblik på anvendelse som gødning på de dyrkede marker, og en blandprøve fra 10 kokasser på lokalitet Sv2.

Det var ikke muligt at angive moderstoffernes nøjagtige koncentrationer i disse prøver, da metoden ikke er optimeret og valideret til disse meget anderledes matricer. Høje koncentrationer af triazol-moderstoffer kunne dog utvetydigt detekteres i konventionelt produceret halm, op til flere hundrede µg/kg af både tebuconazol, epoxiconazol og prothioconazol-desthio i halm fra både 2019 (tebuconazol og prothioconazol-desthio), 2020 (alle tre stoffer) og 2021 (alle tre stoffer), mens de ikke kunne detekteres i Svanholms eget økologisk producerede halm fra 2021 (LOD omkring 5 µg/kg). I komposten, der blandt andet var baseret på staldgødning, kunne de samme tre moderstoffer detekteres i koncentrationer omkring 20-50 µg/kg. Propiconazol, metconazol og difenoconazol blev ikke detekteret i hverken halm eller kompost (LOD formodentlig omkring 5 µg/kg). I kokasserne kunne vi ikke detektere moderstoffer (LOD formodentlig omkring 15 µg/kg), men 1,2,4-triazoledikesyre blev til gengæld detekteret med en koncentration omkring 30 µg/kg. De store matrixeffekter fra kokasserne gjorde det umuligt at analysere for 1,2,4-triazol.

Det kan undre, at kokasser fra økologisk kvæg indeholder 1,2,4-triazoledikesyre, da økologisk kvæg som udgangspunkt skal have økologisk foder. Man må dog også fodre med eget omlægningsfoder fra første års eller andet års omlægningsmarker, eller indkøbt omlægningsfoder fra andre bedrifter (Landbrugsstyrelsen, 2022). Det betyder, at 1,2,4-triazoledikesyre teoretisk kan være dannet som metabolit i kørerne, hvis de er fodret med omlægningsfoder, der har optaget triazol-fungicidrester akkumuleret i den omlagte jord, eller hvis de eventuelt har ædt af den konventionelle halm, der er anvendt som strøelse i staldene. Det vides ikke om omlægningsfoder faktisk kan indeholde tilstrækkeligt 1,2,4-triazol eller triazol-fungicid til, at 1,2,4-triazol metabolitter kan detekteres i kokasserne, dette vil kun kunne afklares med konkrete målinger af omlægningsfoderets indhold af 1,2,4-triazol, triazolmetabolitter og triazol-fungicid.

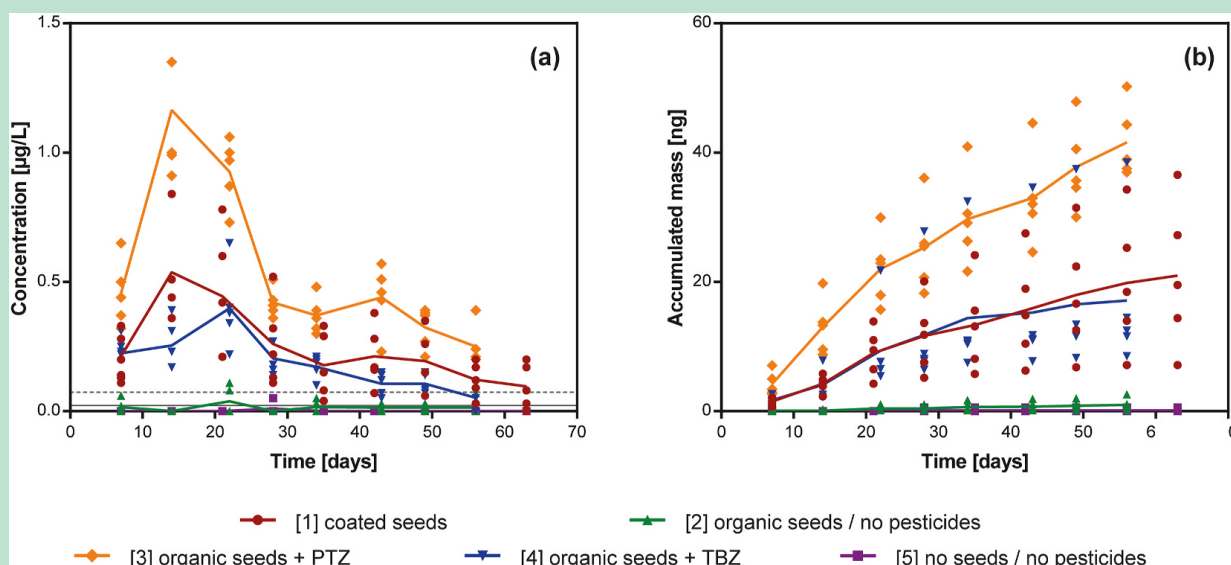
9. Resultater og diskussion: 1,2,4-triazol udvaskning fra bejdset udsæd og test for omdannelse af prothio-conazol, florasulam og pyroxsulam til 1,2,4-triazol

Laboratorieforsøg (pilotforsøg) med bejdset udsæd er gennemført for at afklare, om bejdset udsæd vil kunne bidrage til den akkumulerede pulje af triazol-moderstoffer i landbrugsjord og udvaskningen af 1,2,4-triazol. Forsøget viste stor risiko for udvaskning af 1,2,4-triazol fra bejdset udsæd, dels i pulse med høj koncentration umiddelbart efter såning, dels som estimeret årlig middelsoncentration på op til 0,004–0,02 µg/l i grundvandet. I et lignende forsøg testede vi om prothioconazol, florasulam og pyroxsulam, der ikke har en simpel 1,2,4-triazolgruppe, kan omdannes til 1,2,4-triazol i jorden. Prothioconazol viste udvaskning af 1,2,4-triazol, hvorimod vi ikke kunne påvise 1,2,4-triazol-udvaskning fra florasulam og pyroxsulam. Resultaterne er publiceret som open access (Albers et al., 2022).

9.1 1,2,4-triazol-udvaskning i søjleforsøg

Gennemgang af sprøjtninger og udsæd på VAP-markerne har vist, at udsæd bejdset med triazol-fungicid bidrager til den samlede mængde triazol-fungicider, som tilføres markerne. Den videnskabelige litteratur på området er meget begrænset, men der er dokumenteret en generel risiko for udvaskning fra bejdsede frø (Wettstein et al., 2016). Da der samtidig i VAP er påvist 1,2,4-triazol udvaskning i kontrolprøver inden sprøjtninger, valgte vi at undersøge effekten af bejdset udsæd i et kontrolleret laboratorieforsøg. Forsøget havde to hypoteser: 1) triazolfungicider frigives fra de bejdsede frø og kan akkumulere i jorden; 2) det frigivne triazol-fungicid kan hydrolyseres til 1,2,4-triazol, som efterfølgende kan udvaske fra pløjelaget.

Der var målbart 1,2,4-triazol i perkolatet fra søjler med bejdsede frø allerede efter første vanding på dag 7 (FIGUR 40a). Koncentrationerne steg hurtigt og toppede på dag 14 med en middelsoncentration på 0,5 µg/l og et spænd på 0,4–0,8 µg/l. Perkolat-volumen var højere på dag 21, hvorfor udvasket 1,2,4-triazol mængden fra bejdsede frø toppede på dag 21 (FIGUR 40b). Koncentrationen faldt efter dag 21 men var stadigvæk målbar efter 64 dage med et gennemsnit på 0,1 µg/l (FIGUR 40a). Som forventet udvaskede 1,2,4-triazol ikke fra kontrolsøjler med ikke-bejdsede økologiske frø og kontrolsøjler uden frø, bortset fra spormængder under kvantifikationsgrænsen i enkelte prøver fra søjler med økologiske frø. Krydskontaminering af perkolatprøver kan ikke fuldstændigt udelukkes, men ekstraktion af økologiske frø viste, at de faktisk havde et meget lavt indhold af både tebuconazol (0,034 ng/frø) og prothioconazol-desthio (0,025 ng/frø). Vi kunne ikke detektere nogen af model-moderstofferne i jorden med kvantitative målinger og kunne heller ikke påvise andre triazol-moderstoffer med HRMS suspect screening, det er derfor usandsynligt, at jorden indeholdt gamle, ældede triazolfungicider fra før den blev økologisk 30 år tidligere.



FIGUR 39. Udvasket 1,2,4-triazol vist som vandig koncentration (a) og akkumuleret mængde (b) i perkolat fra jordsøjler, med bejdsede bygfrø (coated) eller hvor tebuconazol (TBZ) eller prothioconazol (PTZ) er tilsat hver for sig som rent stof sammen med ubejdsede økologiske frø (n=5). Som negative kontroller er brugt jordkolonner kun med økologiske frø samt jordkolonner, der hverken indeholdt frø eller moderstof. Kvantifikationsgrænsen er vist med en stiplet linje, detektionsgrænsen er vist med fuldt optrukket linje. (Albers et al., 2022).

Frøene var fra producenten bejdsat med RedigoPro, der indeholder både tebuconazol og prothioconazol. Efter at have bekræftet, at 1,2,4-triazol udvaskede fra de bejdsede frø, undersøgte vi i det andet delforsøg, om 1,2,4-triazolen stammede fra tebuconazol, prothioconazol eller begge stoffer. I dette delforsøg blev rent tebuconazol eller prothioconazol tilsat sammen med økologiske frø for at tage højde for transpiration og optag i planten, så koncentrationerne i perkolaterne ville blive sammenlignelige med første delforsøg. For prothioconazol var udvaskningsprofilen magen til de bejdsede frø med en top efter 14-21 dage, men koncentrationerne var ca. dobbelt så høje (FIGUR 40). Søjler med rent tebuconazol viste en let forsinket udvaskning og 2-3 gange lavere koncentrationer end for prothioconazol. Men eftersom der var tilsat 7,5 gange mere prothioconazol end tebuconazol (udregnet som molmængde) var det en 2-3 gange højere andel af tebuconazol, der udvaskede som 1,2,4-triazol.

Den samlede mængde udvasket 1,2,4-triazol var tre gange større for rent stof end for de bejdsede frø i del-forsøg 1, selvom de tilsatte, rene mængder svarede til bejdse-mængderne, som oplyst af producenten (TABEL 19). Moderstoffernes startkoncentration i udsæden er dels beregnet ud fra producentens oplysninger om udsæden, dels beregnet ud fra GEUS' bestemmelse af ekstraherbart moderstof (TABEL 19). Ud fra den målte tebuconazol-mængde kan det estimeres, at frøenes bejdseindhold faktisk kun var ca. 58% af producentens oplyste mængde. Den tilsyneladende lavere udvaskning fra bejdsede frø kan derfor skyldes lavere moderstof-koncentrationer i delforsøg 1 end i delforsøg 2. Derudover kan forskelle i biotilgængelighed mellem bejdsede frø og friskt tilsat moderstof også have bidraget til forskellen som foreslået af Charnay et al. (2000) og Smalling et al. (2018).

Selvom jorden var en typisk dansk landbrugsjord, var forsøgsbetingelserne langt fra forholdene på en rigtig mark. Perkolat-volumen var højere end infiltrationen på de fleste marker, jordlaget var kun 10 cm sammenlignet med typisk 25-30 cm pløjelag på markerne, temperaturen var højere, der var ikke hydrauliske short-cuts i form af orme huller og tørkesprækker og vi brugte et urealistisk højt antal frø per areal. På trods af de urealistiske betingelser kan resultaterne dog give en ide om koncentrations-niveauet for 1,2,4-triazol, der forlader pløjelaget efter såning med bejdsede frø. I Danmark bruges typisk 15-20 gram vårbyg per m², hvilket svarer til 250-333 frø/m². I søjleforsøgene med bejdsede frø udvaskede 0,007 µg/frø, hvilket giver 1,8-2,3 µg/m². Dette er et minimumsestimat eftersom der stadigvæk udvaskede 1,2,4-triazol, da forsøget blev afsluttet. Den danske nettonedbør (bruttoned-

bør minus evapotranspiration) ligger typisk i spændet 100-500 mm per år (Thorling et al., 2021). Hvis 1,2,4-triazolen ikke nedbrydes under transport i den umættede zones mineraljord, giver det en årlig middelkoncentration 0,004–0,02 µg/l i det øverste grundvand. Dette er et meget upræcist estimat, men det viser, at bejdning bør medregnes ved beregning af landbrugets samlede 1,2,4-triazol belastning. I et worst-case scenarie, hvor alt moderstof omdannes til 1,2,4-triazol og uden 1,2,4-triazol-nedbrydning, er resultatet en årlig middelkoncentration på 0,5-2,4 µg/l i det øverste grundvand.

TABEL 19. Moderstoffernes startkoncentration i absolutte koncentrationer og 1,2,4-triazol udvaskning i absolutte mængder og omregnet til andel af tilsat moderstof opgjort som i mol. (Albers et al., 2022).

	Bejdsede frø (ifølge producent)	Bejdsede frø (målt koncentration)	Rent tebuconazol	Rent prothioconazol
Tilsat tebuconazol (µg/søjle)	1,8	1,1	1,8	-
Tilsat prothioconazol (µg/søjle)	13,5	7,9*	-	13,5
Udvasket 1,2,4-triazol (µg/søjle)	0,020	0,020	0,017	0,042
Pct. udvasket som 1,2,4-triazol	0,7	1,1	4,2	1,5

*Beregnet fra den målte tebuconazol-koncentration og prothioconazol:tebuconazol ratioen som opgivet af producenten idet prothioconazol er ustabil under ekstraktion og kun delvist omdannes til prothioconazol-desthio.

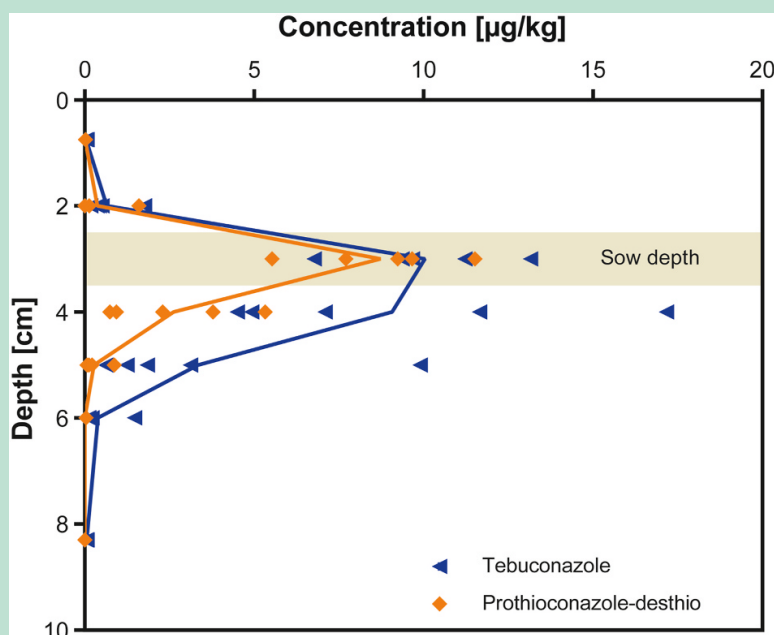
9.2 Florasulam og pyroxsulam

I det tredje delforsøg testede vi, om florasulam og pyroxsulam gav udvaskning af 1,2,4-triazol fra jordsøjlerne. Der blev ikke påvist 1,2,4-triazol i perkolat fra hverken florasulam eller pyroxsulam. 1,2,4-triazolsulfonsyre blev påvist i koncentrationer op til 1,5 µg/l fra florasulam-søjler. 1,2,4-triazolsulfonsyre har en simpel triazol-gruppe svarende til triazol-fungiciderne, 1,2,4-triazolsulfonsyre vil derfor muligvis kunne spaltes til frit 1,2,4-triazol i dybere jordlag.

Derudover var det et begrænset forsøg med kun to jordtyper, vi kan derfor ikke fuldstændig "frikende" stofferne på det foreliggende grundlag.

9.3 Moderstoffernes fordeling og mobilitet i søjleforsøget

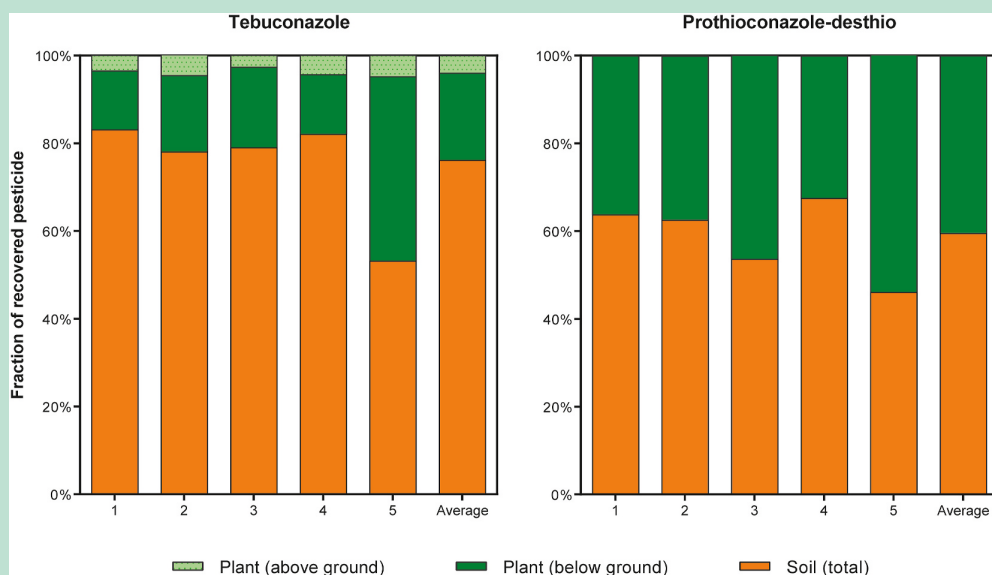
Efter inkubationen blev jord og planter fra delforsøg 1 analyseret for tebuconazol, prothioconazol og prothioconazol-desthio. Prothioconazol blev ikke påvist, men det blev hovedmetabolitten prothioconazol-desthio. I jorden var koncentrationen af prothioconazol-desthio højest i så-dybden (2,5-3,5 cm), meget lavere 1 cm under så-dybden og kun spormængder 2 cm under så-dybden. Tebuconazol fra de bejdsede frø var en anelse mere mobilt end prothioconazol-desthio, og gav en fordeling, der var ca. 1 cm dybere (Figur 41), hvilket var lidt overraskende, da tebuconazol generelt sorberer kraftigere end prothioconazol-desthio (TABEL 3). Transport over kun 1-3 cm på 63 dage viser, at udvaskningspotentialet var meget lavt for begge moderstoffer. Det skal dog bemærkes, at vi i analyserne har svært ved at skelne mellem prothioconazol og prothioconazol-desthio, da meget prothioconazol omdannes til prothioconazol-desthio under ekstraktion og analyse. Da prothioconazol har en høj pKa på ca. 7, kan prothioconazol-udvaskningen være større fra jorde, der er mere basiske end den testede jord.



FIGUR 40. Dybdefordeling af tebuconazol og prothioconazol-desthio ved afslutningen af delforsøg 1 (63 dage). Datapunkterne ligger i midten af hvert dybdeinterval og repræsenterer de enkelte replikater (n=5), linjer er middelværdier (Albers et al., 2022).

FIGUR 42 viser stoffernes fordeling mellem jorden, biomassen under jordoverfladen og biomassen over jordoverfladen. 27% af det tilsatte tebuconazol, bestemt ud fra frøenes målte start-koncentration, kunne ekstraheres ved forsøgets afslutning. 1% var i stængler og blade, 5% var i underjordisk biomasse inklusiv rester af det bejdsede frø, og 21% var i den omgivende jord. 73% af det tilsatte tebuconazol var altså enten ikke-ekstraherbart eller nedbrudt af planterne og jordens mikroorganismer. Dette svarer godt til et tidligere studie, hvor Börjesson et al. (2003) konkluderede, at det meste triticonazol på bejdsede frø var tilgængeligt for bionedbrydning i jorden, heraf en del på frøene, som først blev tilgængeligt, når frøene nedbrydes.

Kun 2,3% af det tilsatte prothioconazol, målt som prothioconazol-desthio, blev genfundet ved forsøgets afslutning. Stængler og blade indeholdt ikke målbart prothioconazol-desthio, 0,9% var i underjordisk biomasse inklusiv rester af bejdsede frø, og 1,4% var i den omgivende jord.



FIGUR 41. Fordeling af tebuconazol og prothioconazol-desthio mellem planter og jord i de fem jordsøjler med bejdsede frø ved forsøgets afslutning (Albers et al., 2022).

9.4 Opgørelse af bejdsemidler med moderstoffer til 1,2,4-triazol

På baggrund af bejdseforsøgets udvaskningsresultater har vi undersøgt godkendelsesperioder og triazol-aktivstoffer for triazol-bejdsemidler, der har været tilladte i Danmark (TABEL 20). Tebuconazol, prothioconazol og difenoconazol er tilladte i 2022 og har været tilladte i længere perioder, tebuconazol fra 2008, prothioconazol fra 2010, difenoconazol fra 2008. Bitertanol var godkendt som bejdsemiddel frem til 2010. Triadimenol var godkendt frem til 1991, dog er der i Middeldatabasen yderligere ét bejdsemiddel med triadimenol (Baytan Universal), hvor godkendelsesperioden er ukendt, sandsynligvis fordi det er et gammelt produkt. De fire bejdsestoffer har kun været godkendt til anvendelse i forskellige korn-typer. Det er derfor meget sandsynligt, at et eller flere af stofferne har været anvendt jævnlige på VAP-markerne inden bejdsemidlernes registrering startede i 2017. 1,2,4-triazol kan derfor have udvasket fra VAP-markerne som følge af disse fire stoffers bejdseanvendelse. Bejdsning er også en mulig kilde til stoffernes akkumulering i overjorden.

I Middeldatabasen er der ingen bejdsemidler med propiconazol, epoxiconazol eller triadimefon. Metconazol er kun afprøvet i forsøg, og aldrig tilladt til almindelig bejdseanvendelse. Det er derfor meget usandsynligt, at 1,2,4-triazol skulle kunne udvaske fra VAP-markerne som følge af disse fire stoffers bejdseanvendelse, eller at stofferne skulle kunne være akkumuleret i overjorden som følge af bejdseanvendelse.

TABEL 20. Oversigt over bejdsemidler med triazol-fungicider, der har været tilladte i Danmark. Middeldatabasen pr 1/3-2022.

Produkt	Aktivstof	Godkendelses- periode	Anvendelser
Arena C FS 030	Tebuconazol	2008-2009	Hvede beregnet til eksport.
Raxil IM 035 ES	Tebuconazol	2013-2014	Vår- og vinterbyg.
Seedron	Tebuconazol	2016-2022	Korn.
LFS Tebuconazol-Pro-thioconazol Pro	Tebuconazol-Pro-thioconazol	2015-2020	Vinter- og vårbyg, vinter- og vårhvede, rug og tritcale.
Bariton Super	Tebuconazol-Pro-thioconazol	2018-2022	Hvede, byg, rug og tritcale.
Redigo Pro 170 FS	Tebuconazol-Pro-thioconazol	2010-2022	Vinter- og vårbyg, vinter- og vårhvede, rug og tritcale.
Agros Prothioconazol 100	Prothioconazol	2011-2015	Korn.
LFS Prothioconazole Bejdse	Prothioconazol	2014-2020	Korn.
Redigo FS 100	Prothioconazol	2010-2022	Korn.
Metcon	Metconazol	Ikke tilladt	Kun afprøvet i forsøg.
SAT 2002 komponent 1	Metconazol	Ikke tilladt	Kun afprøvet i forsøg.
Beret Combi 100 FS	Difenoconazol	1997-1999	Vårbyg, vinterhvede og vinterrug.
Dividend 037,5 LS	Difenoconazol	2008-2013	Vinterhvede og vinterrug.
LFS Difenoconazol	Difenoconazol	2010-2015	Vintersæd (hvede, rug og tritcale).
GBH 25 g/l difenoconazol + 25 g/l fludioxonil	Difenoconazol	2014-2015	Vinterhvede, vinterbyg, rug og tritcale.
Agros C Extra	Difenoconazol	2015	Hvede, byg, rug og tritcale.
Agros Pro C Extra	Difenoconazol	2016-2018	Hvede, byg, rug og tritcale.
Celest Extra Formula M	Difenoconazol	2015-2022	Hvede, byg, rug og tritcale.
Difend	Difenoconazol	2012-2022	Hvede, rug og tritcale.
Dividend Formula M	Difenoconazol	2015-2022	Vinter- og vårhvede, vinter- og vårrug, vinter- og vårritcale, vinter- og vårbyg.
Difend Extra	Difenoconazol	2016-2022	Korn.
Vibrance Gold	Difenoconazol	Ikke tilladt	Kun afprøvet i forsøg.
LFS Bitertanol Plus	Bitertanol	1998-2001	Vinterudsæd af rug, hvede og tritcale.
Sibutol FS 199	Bitertanol	2006-2009	Vinterudsæd af hvede, rug og tritcale.
Sibutol LS 280	Bitertanol	2006-2010	Vinterudsæd af hvede, rug og tritcale.
Baytan bejdse	Triadimenol	1980-1991	Korn.
Baytan Universal	Triadimenol	Forbudsliste fra 2011	Korn.

I landbruget må man benytte udsæd bejdset i et andet EU-land. Det er derfor lovligt at anvende importeret udsæd, som er bejdset med stoffer, der ikke er godkendt til bejdse i Danmark, når bare bejdsemidlet er godkendt i det pågældende EU-land. Opslag i Middeldatabasen og Bekæmpelsesmiddeldatabasen giver derfor ikke nødvendigvis en fuldstændig oversigt over alle triazol-bejdsemidler anvendt i dansk landbrug, fx kan importeret udsæd have været bejdset med triticonazol. Det gør problemstillingen lidt mere kompliceret, men det er dog usandsynligt, at der i VAP er brugt importeret udsæd bejdset med triazol-fungicider, der ikke har været tilladt i Danmark.

10. Resultater og diskussion:

Feltforsøg til bestemmelse af moderstoffers nedbrydning og ældning i pløjelaget

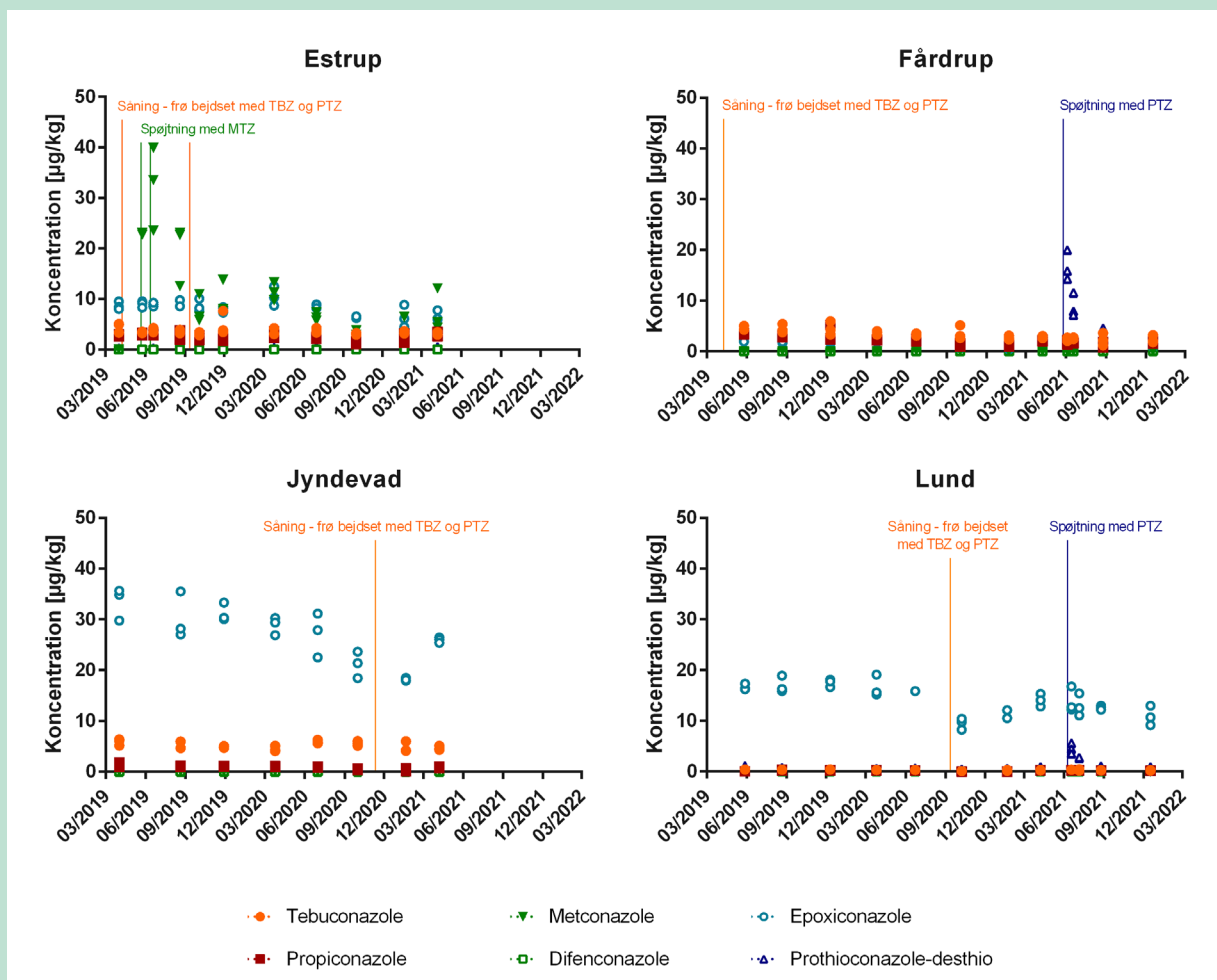
Fire VAP-marker blev prøvetaget over to år for at undersøge, hvor hurtigt triazolfungiciderne forsvinder i pløjelaget. Flere stoffer var sprøjtet på markerne længe inden de blev påvist. På Estrup var der fx 3,1 µg/kg propiconazol 19 år efter seneste sprøjtning og 6,6 µg/kg epoxiconazol 14 år efter seneste sprøjtning. De højeste koncentrationer var for epoxiconazol i Jyndeved og Lund, men også tebuconazol og propiconazol forekom i varierende koncentrationer. I syv ud af 16 tilfælde kunne vi ikke påvise signifikant nedbrydning, hvilket skyldtes de ældede stoffers meget lave biotilgængelighed. På Estrup steg indholdet af metconazol kraftigt efter sprøjtning til 32 µg/kg og stoffet havde høj biotilgængelighed. Koncentrationen faldt derefter til et lavt men konstant niveau på ca. 5 µg/kg med kun 10% biotilgængelighed, der var altså opbygget en persistent metconazol-pulje i jorden. Sprøjtning med prothioconazol gav lignende resultater, bortset fra at koncentrationerne faldt tilbage til baggrundsniveauet.

10.1 Triazolfungicidernes akkumulering i jorden

De fire VAP-marker blev prøvetaget over to år for at undersøge, hvor hurtigt 1,2,4-triazols moderstoffer forsvinder i pløjelaget efter sprøjtning og om moderstoffernes nedbrydning kan korreleres med målte koncentrationer i dræn under markerne. Alle marker er prøvetaget mindst otte gange, med ekstra prøveindsamlinger på relevante marker, efter sprøjtning. Der var desværre kun én triazol-sprøjtning i starten af indsamlingsperioden, nemlig sprøjtning med metconazol på Estrup. Sidst i indsamlingsperioden var der desuden sprøjtninger med prothioconazol på Fårdrup og Lund, men disse sprøjtninger gav mindre information fordi vi kun kunne følge markerne over en kort periode efter sprøjtningen.

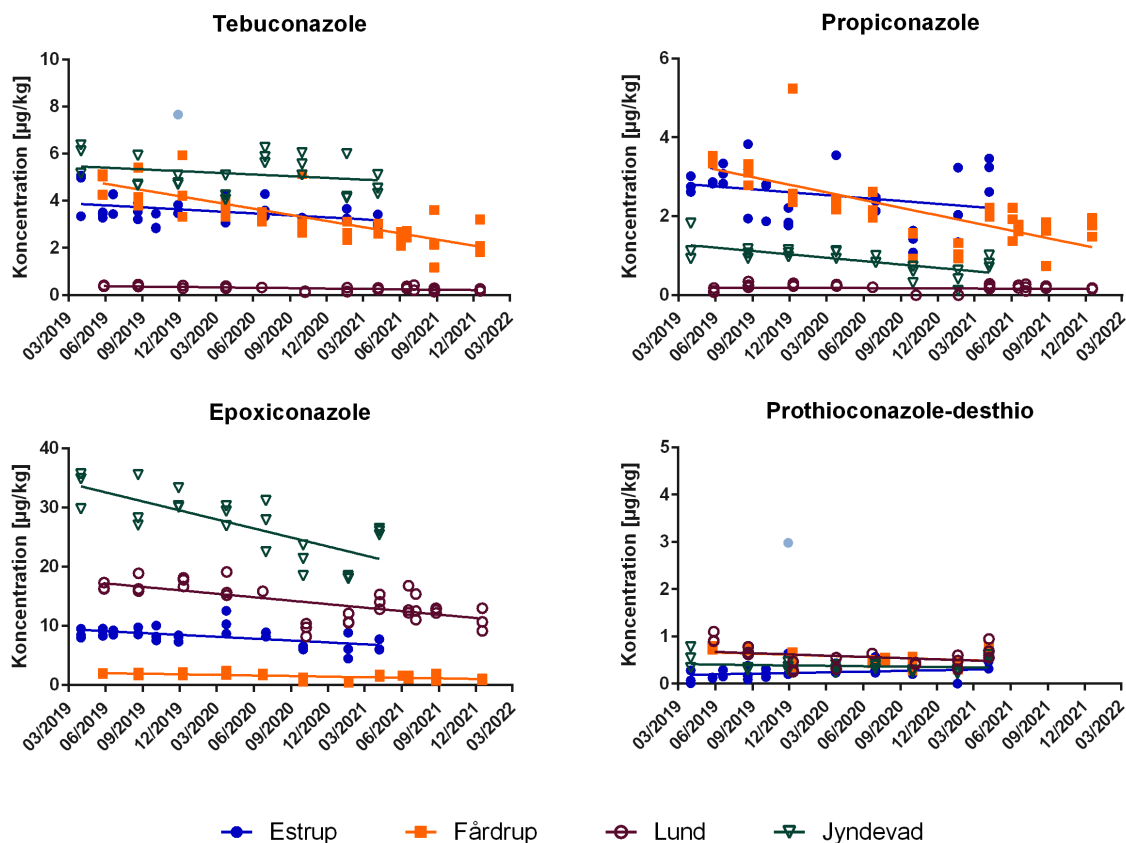
Markernes totale indhold af projektets model-moderstoffer er vist i FIGUR 43, hvor nogle mønstre træder tydeligt frem. På Estrup steg indholdet af metconazol kraftigt i pløjelaget efter sprøjtning, men koncentrationen faldt også betydeligt i det efterfølgende sommerhalvår, hvorefter koncentrationen var mere konstant. Metconazol har ikke tidligere været sprøjtet på marken, så der var ingen baggrund inden sprøjtningen. Efter sprøjtning med prothioconazol på Fårdrup og Lund steg prothioconazol-desthio koncentrationen også efterfulgt af et hurtigt fald over de næste par måneder. Alle fire marker blev i perioden tilsået med udsæd bejdset med tebuconazol og prothioconazol. Den bejdsede udsæd gav dog ikke synlige stigninger i markernes indhold af tebuconazol og prothioconazol.

Den største overraskelse var fund af andre triazol-moderstoffer. Generelt indeholdt alle fire marker flere moderstoffer, som ikke blev sprøjtet på marken i monitoringsperioden eller umiddelbart inden, og hvor seneste sprøjtning i nogle tilfælde lå mange år tilbage (FIGUR 43). De højeste koncentrationer var for epoxiconazol, specielt i Jyndeved og Lund, men også tebuconazol og propiconazol kunne påvises på Estrup, Fårdrup og Jyndeved i varierende koncentrationer. Lund derimod havde meget lave koncentrationer af tebuconazol og prothioconazol-desthio.



FIGUR 42. 1,2,4-triazol-moderstoffers koncentration i pløjelaget i VAP-marker målt over to år med angivelse af sprøjtning og såning af bejdset udsæd.

Et overfladisk blik på FIGUR 43 antyder, at nogle af stofferne ikke blev nedbrudt i løbet af de to år. Vi testede derfor med lineær regression, om de ældede stoffers koncentration, var konstant (Figur 44). I syv ud af 16 tilfælde var linjens hældning ikke signifikant forskellig fra nul (Tabel 21). Det skal dog bemærkes, at næsten alle hældninger var negative, hvilket antyder, at alle stofferne sandsynligvis nedbrydes selvom det i nogle tilfælde går meget langsomt. Prothioconazol i Lund var eneste undtagelse, idet hældningen var positiv. Det skyldtes til dels en outlier med forhøjet indhold af prothioconazol-desthio og tebuconazol, altså sandsynligvis resterne af et bejdset frø. Uden outlieren var prothioconazols hældning 0.00016 ± 0.00012 , men ikke signifikant forskellig fra nul. Uden outlieren skiftede tebuconazol fra ikke-signifikant til signifikant (-0.000929 ± 0.000376).



FIGUR 43. Lineær regression for 1,2,4-triazol-moderstoffers koncentration i pløjelaget i VAP-marker målt over to år. Det er kun brugt data for ældede stoffer, det vil sige, at der indgår ikke data fra efter sprøjtninger. Én prøve fra Estrup viste meget høje prothioconazol-desthio og tebuconazol-koncentrationer (lyseblå).

Tabel 21. Lineær regression. Hældning [µg/kg/d] ±1 standardafvigelse med angivelse af om linjen er signifikant forskellig fra en vandret linje (5% signifikansniveau).

	Tebuconazol	Propiconazol	Epoxiconazol	Prothioconazol-desthio
Estrup	-0,0011 ± 0,0006 Ikke signifikant	-0,0008 ± 0,0005 Ikke signifikant	-0,0034 ± 0,0009 Signifikant	(0,00005 ± 0,00037) (Ikke signifikant)
Lund	-0,00018 ± 0,00005 Signifikant	-0,00004 ± 0,00006 Ikke signifikant	-0,0064 ± 0,0013 Signifikant	-0,0003 ± 0,0002 Ikke signifikant
Fårdrup	-0,0029 ± 0,0004 Signifikant	-0,0021 ± 0,0004 Signifikant	-0,0011 ± 0,0002 Signifikant	-0,0003 ± 0,0001 Ikke signifikant
Jyndeved	-0,0008 ± 0,0006 Ikke signifikant	-0,0009 ± 0,0002 Signifikant	-0,0166 ± 0,0032 Signifikant	-0,00009 ± 0,00012 Ikke signifikant

I TABEL 22 sammenlignes målte koncentrationer i VAP-markerne i seneste prøve med tiden fra seneste sprøjtning for ældede moderstoffer. For Estrup, Fårdrup og Jyndeved findes sprøjtejournaler fra 1999 og fremefter. Lund er ikke vist i tabellen, da der kun findes sprøjtejournaler fra 2017 og fremefter. Flere stoffer var sprøjtet på markerne længe inden de blev påvist, på Estrup var der 3,1 µg/kg propiconazol 19 år efter seneste sprøjtning, på Fårdrup var der 0,9 µg/kg epoxiconazol 15 år efter seneste sprøjtning og på Estrup var der 6,6 µg/kg epoxiconazol 19 år efter seneste sprøjtning. De højeste koncentrationer var 26 µg/kg epoxiconazol på Jyndeved 6 år efter seneste sprøjtning og 7,3 µg/kg metconazol på Estrup 2 år efter sprøjtning. Metconazol-koncentrationen på

Estrup er ikke overraskende, da der jo blev sprøjtet med metconazol i starten af monitoringsperioden. Tebuconazol og prothioconazol er tilladt som bejdsemiddel i korn og har sandsynligvis været anvendt jævnligt som bejdse på markerne, bejdsemidler er dog først registreret systematisk på VAP-markerne fra 2017. Fund af tebuconazol og prothioconazol-desthio kan derfor til dels skyldes anvendelse af bejdsemidler siden sidste sprøjtning. Fund af prothioconazol-desthio i Estrup skyldes sandsynligvis akkumulering efter gentagen brug som bejdsemiddel, da prothioconazol ikke har været registreret anvendt som sprøjtemiddel på marken. Vi kunne på den anden side ikke se stigning i deres koncentration efter såning med bejdset udsæd i løbet af monitoringsperioden (FIGUR 43). Der er ingen registrerede bejdsemidler med propiconazol og epoxiconazol (TABEL 20), fund af disse stoffer skyldes derfor med meget stor sandsynlighed sprøjtning af VAP-markerne 5-19 år tidligere.

TABEL 22. Målte koncentrationer i VAP-markerne i seneste prøve sammenlignet med tiden fra seneste sprøjtning.

Mark	Stof	Seneste prøve, dato	Seneste prøve, koncentration ± 1 standardafvigelse, [$\mu\text{g/kg}$]	Seneste sprøjtning	Antal år siden sprøjtning
Estrup	Tebuconazol*	07-04-2021	3,1 $\pm$ 0,2	20-05-2014	7
	Propiconazol	07-04-2021	3,1 $\pm$ 0,4	17-06-2002	19
	Metconazol	07-04-2021	7,3 $\pm$ 3,4	13-06-2019	2
	Epoxiconazol	07-04-2021	6,6 $\pm$ 0,8	31-05-2007	14
	Prothioconazol-desthio*	07-04-2021	0,5 $\pm$ 0,1	Ikke sprøjtet	
Fårdrup	Tebuconazol*	17-12-2021	2,4 $\pm$ 0,6	20-11-2014	7
	Propiconazol	17-12-2021	1,7 $\pm$ 0,2	07-07-2017	4
	Epoxiconazol	17-12-2021	0,9 $\pm$ 0,1	29-06-2006	15
	Prothioconazol-desthio*	08-04-2021**	0,8 $\pm$ 0,0	12-05-2015	6
Jyndevad	Tebuconazol*	07-04-2021	4,6 $\pm$ 0,3	11-11-2014	6
	Propiconazol	07-04-2021	0,8 $\pm$ 0,1	02-06-2016	5
	Epoxiconazol	07-04-2021	26,0 $\pm$ 0,4	08-05-2015	6
	Prothioconazol-desthio*	07-04-2021	0,6 $\pm$ 0,0	17-06-2015	6

*Tebuconazol, prothioconazol: tilladt som bejdse.

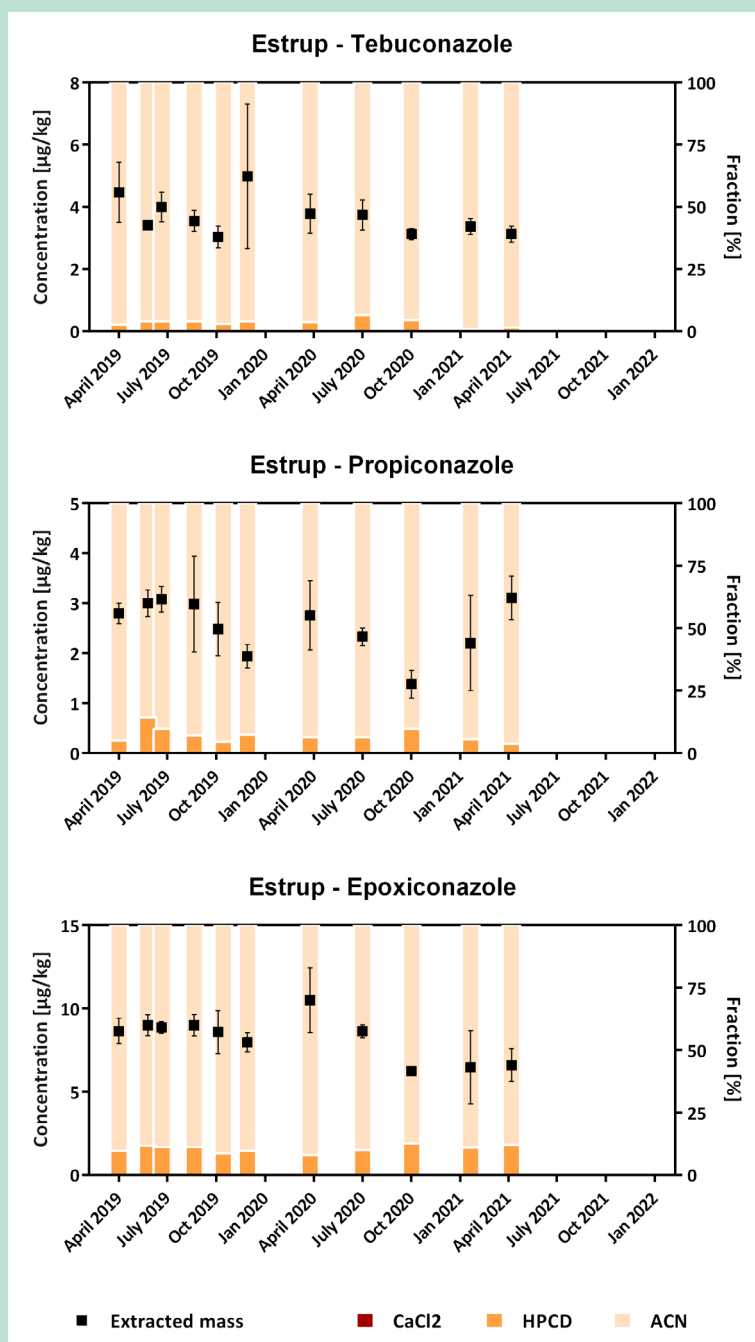
** Seneste prøve før prothioconazol-sprøjtning i 2021.

10.2 Moderstoffernes aging og biotilgængelighed

Aged sorption og biotilgængelighed er bestemt for alle prøver fra Estrup da denne mark tidligt i prøvetagningen blev sprøjtet med metconazol og derfor gav mulighed for at følge ændringer over næsten to år efter sprøjtningen. Jyndevad og Lund blev sent i forløbet sprøjtet med prothioconazol, prøver fra disse marker er derfor kun analyseret sporadisk inden sprøjtningen og for alle prøver efter sprøjtningen. Vi analyserede kun aging i den første og sidste prøve fra Fårdrup. Alle aging-prøver blev analyseret for alle model-moderstofferne.

Typiske resultater for ældede moderstoffer er vist i FIGUR 45 og FIGUR 46, øvrige resultater er vist i Bilag 7. I CaCl_2 -ekstrakterne var koncentrationerne under detektionsgrænsen for alle ældede moderstoffer. Det betyder, at deres ældning var så fremskreden, at den ikke kunne beskrives med den normale aged sorption tilgang med CaCl_2 -ekstraktion og bestemmelse af ændringer i K_d . I Estrup var tebuconazols biotilgængelige fraktion meget lav (1,9-7,6%, FIGUR 46) dog over kvantifikationsgrænsen. Propiconazols biotilgængelige fraktion var kun lidt højere (4,8-16%, FIGUR 46). For tebuconazol og propiconazol var næsten alt stof i Estrup dermed ikke-biotilgængeligt, selv når man tager højde for at HPCD-metoden kan give en mindre underestimering af den biotilgængelige fraktion. Tebuconazols og propiconazols lave biotilgængeligheder passer godt med, at deres nedbrydning var så langsom, at hældningen ikke var signifikant forskellig fra nul (Tabel 21). Epoxiconazols biotilgængelige fraktion i Estrup var højere (10,2-15,2%, FIGUR 46) og stort set konstant over tid, hvilket passer godt med en signifikant

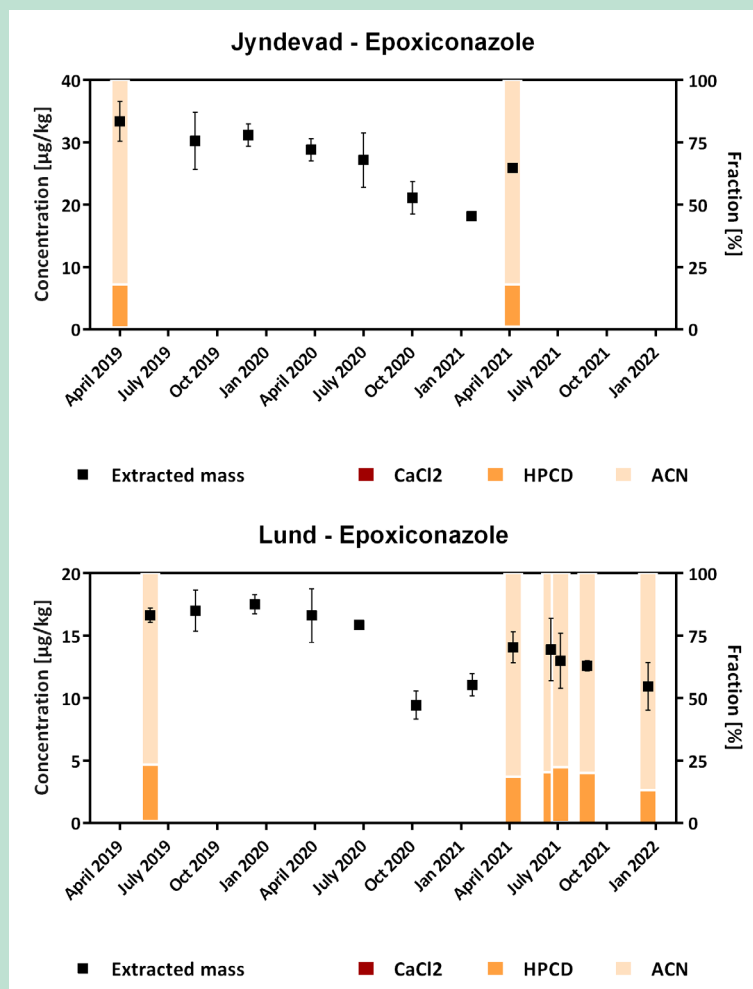
nedbrydning af epoxiconazol i Estrup (Tabel 21). Det skal bemærkes, at de absolutte, biotilgængelige koncentrationer falder med faldende total-koncentrationer, selvom andelen er konstant. For prothioconazol-desthio i Estrup var totalkoncentrationer tæt på kvantifikationsgrænsen, det var derfor ikke muligt at foretage en troværdig kvantificering af de forskellige delmængder.



FIGUR 44. Tidlige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for ældede triazol-moderstoffer i VAP-marken i Estrup samt procentvis fordeling på CaCl₂-ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN)

Epoxiconazol var det ældede moderstof, der blev fundet i højest koncentration, henholdsvis i Jyndevad og Lund. På disse marker var epoxiconazols biotilgængelighed generelt højere end i Estrup (Jyndevad: 20%, Lund 14-

23%, FIGUR 48), hvilket også passer med, at nedbrydningen var signifikant i begge marker (Tabel 21). Det ændrer dog ikke ved, at nedbrydningen stadigvæk var langsom og at 73-80% af epoxiconazol i markerne var ikke-biotilgængeligt.



FIGUR 45. Tidlige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for ældet epoxiconazol i VAP-marken i Jydevad og Lund samt procentvis fordeling på CaCl_2 -ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN).

10.3 Nedbrydning, aging og biotilgængelighed efter sprøjtning

Nedbrydning, aged sorption og biotilgængelighed var helt anderledes efter sprøjtning med prothioconazol og metconazol end for de ældede moderstoffer. Lund havde et lavt prothioconazol-desthio baggrunds niveau på $<1 \mu\text{g/kg}$ i de første to års monitoring, sandsynligvis fordi marken blev sprøjtet to gange med prothioconazol i 2018, og der blev brugt udsæd bejdset med prothioconazol forår og efterår 2018. Lund blev prøvetaget 9 dage efter sprøjtning med prothioconazol i 2021. Koncentrationen af prothioconazol-desthio var $4-6 \mu\text{g/kg}$ i første prøve efter sprøjtningen, hvorefter koncentrationen klingede af til samme niveau som før sprøjtningen (FIGUR 47). Vi fittede både en første-ordens funktion (Ligning 2) og en dobbelt førsteordens funktion (Ligning 3) til prothioconazol-koncentrationerne (FIGUR 47).

Ligning 2.

Enkelt 1.-ordens
(SFO)

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

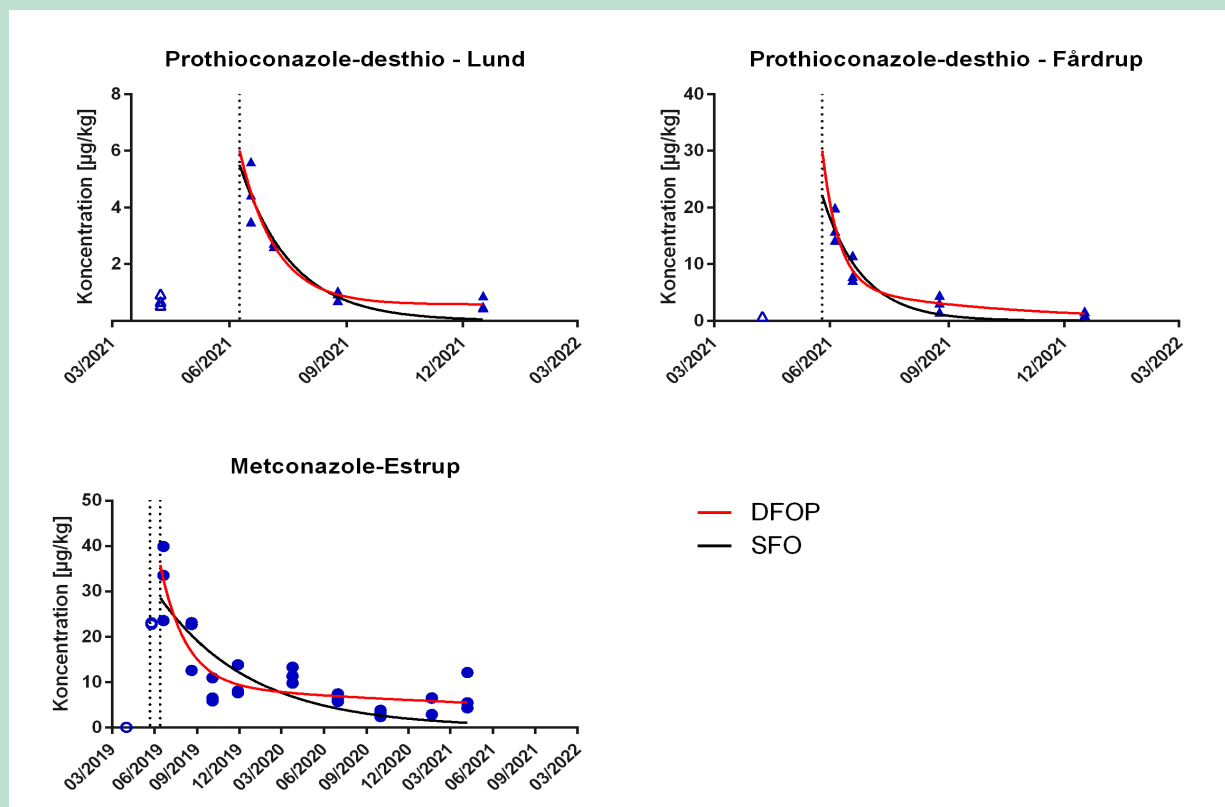
Ligning 3.

Dobbelt 1.-ordens – parallel
(DFOP)

$$C_t = C_0(fraction_{fast} * e^{-k_{fast}t}) + C_0(fraction_{slow} * e^{-k_{slow}t})$$

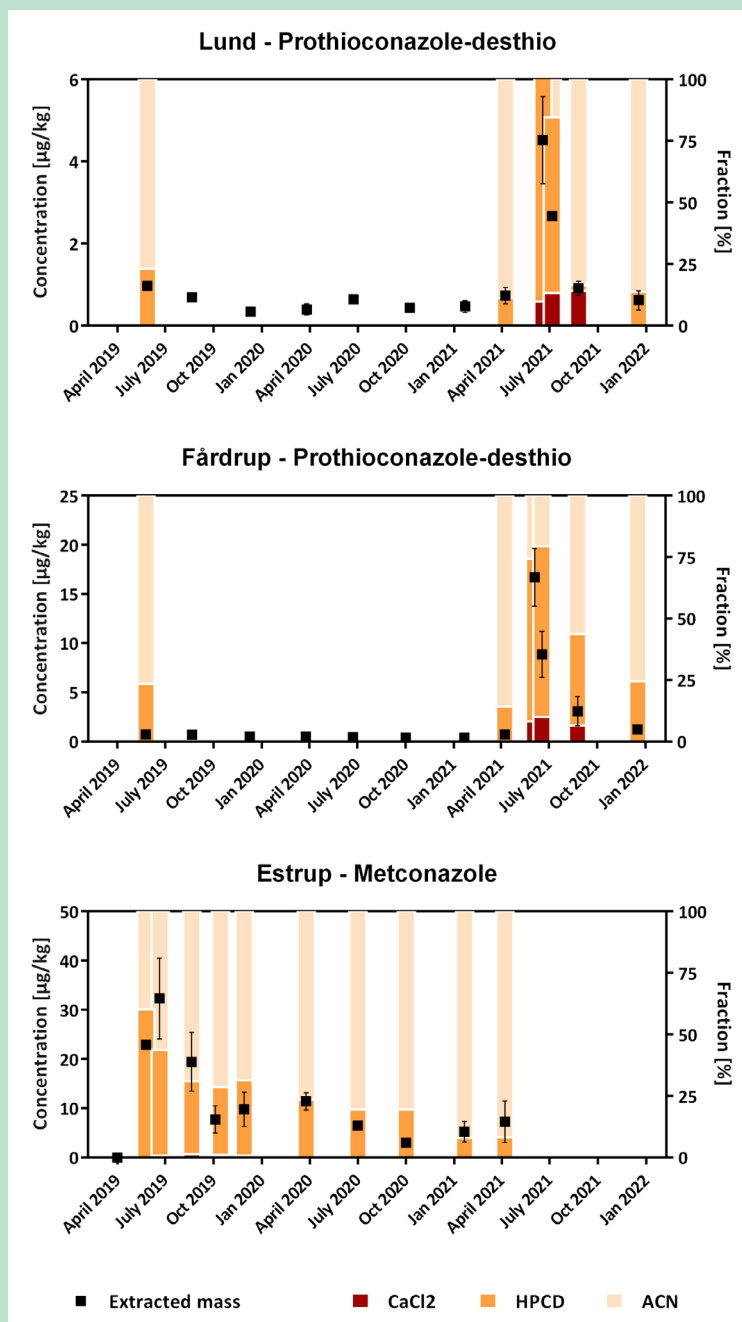
med $fraction_{fast} + fraction_{slow} = 1$

Udviklingen kunne ikke beskrives med en simpel førsteordens funktion, da koncentrationen jo fladede ud uden at gå mod nul. En funktion med dobbelt førsteordens nedbrydning i parallel gav et glimrende fit (FIGUR 47), måske mest fordi den har flere parametre, men konceptuelt kan den også tolkes som kombinationen af en hurtig fraktion (den friske prothioconazol-desthio) og en meget langsommere fraktion (den ældede prothioconazol-desthio). I modsætning til de ældede moderstoffer kunne vi faktisk måle prothioconazol-desthio i CaCl₂-ekstraktet i de første tre prøver efter sprøjtningen (FIGUR 48). Biotilgængeligheden målt med HPCD var lav og svagt faldende inden sprøjtningen (23% i maj 2019 og 12% i april 2021), men efter sprøjtningen i juni 2021 var prothioconazol-desthio fuldt biotilgængelig, hvorefter biotilgængeligheden klingede af til bare 10% et halvt år senere, hvor total-koncentrationerne også var tilbage på samme niveau som før sprøjtningen (FIGUR 48). Fårdrup viste samme mønster, bortset fra at baggrundsniveauet var lavere inden sprøjtning med prothioconazol og koncentrationen i jorden var betydeligt højere i første prøve efter sprøjtningen (FIGUR 47 og FIGUR 48). I tolkningen af resultaterne skal man være opmærksom på, at prothioconazol både omdannes til prothioconazol-desthio og til et andet nedbrydningsprodukt, som vi ikke har målt på, og at eventuelt tilbageværende prothioconazol omdannes til prothioconazol-desthio i varierende grad under ekstraktion og analyse. Man skal derfor ikke overfortolke små koncentrationsforskelle.



FIGUR 46. Udvikling i pløjelagets koncentrationer efter sprøjtning med prothioconazol og metconazol. Kun fyldte symboler gik ind i regressionen, anden sprøjtning er sat som startpunkt til metconazol-nedbrydning. SFO: single first-order, DFOP: double first-order in parallel.

Sprøjtning med metconazol på Estrup gav lidt anderledes resultater end prothioconazol. Metconazol blev udbragt som dobbelt-sprøjtning med 22 dages mellemrum. Estrup blev prøvetaget to dage efter første sprøjtning og syv dage efter anden sprøjtning. Der var intet metconazol baggrunds niveau inden sprøjtning, da marken ikke tidligere har været sprøjtet med metconazol og stoffet ikke har været brugt som bejdsemiddel. Koncentrationen steg efter første sprøjtning og steg yderligere efter anden sprøjtning til op mod 40 µg/kg (FIGUR 47). Som for prothioconazol i Lund og Fårdrup klingede koncentrationen af i løbet af et halvt års tid, men i modsætning til prothioconazol-desthio faldt koncentrationen ikke tilbage til niveauet fra før sprøjtningen, men forblev på et betydeligt niveau i resten af monitoringsperioden. Der var altså opbygget en persistent metconazol-pulje i jorden. Dette kunne beskrives med en dobbelt førsteordens nedbrydning i parallel (FIGUR 47), hvor tolkningen er, at noget metconazol ældes og bindes hårdt i jorden, hvorved der opstår to forskellige fraktioner med meget forskellige nedbrydningshastigheder. Den friske metconazol bandt hårdere til jorden end friskt prothioconazol-desthio, hvilket kunne ses ved at der ikke var målbart metconazol i CaCl_2 -ekstraktet (FIGUR 48).



FIGUR 47. Tidlige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for "friskt" sprøjtet metconazol i VAP-mar-ken i Estrup og prothioconazol-desthio på markerne i Lund og fårdrup samt procentvis fordeling på CaCl₂-ekstra-heret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN).

Biotilgængeligheden var også lavere og faldt til bare 10% i de to sidste prøvetagninger (FIGUR 48). Biotilgænge-ligheden målt med HPCD lige efter sprøjtning underestimerede i nogen grad den faktiske biotilgængelighed. Den målte biotilgængelige koncentration lige efter sprøjtning var 19 µg/kg bestemt ved kinetik-fit og 17 µg/kg bestemt som enkeltextraktion efter 140 timer (TABEL 14), men den faktiske fjernelse i marken i løbet af de to år var på 25 µg/kg (TABEL 14). Det kan skyldes en metodisk undervurdering af den biotilgængelige koncentration, men det kan også skyldes, at biotilgængelighedsmålingerne bygger på et princip om, at sorberede hydrofobe stoffer skal diffundere gennem et vandigt grænselag, for at mikroorganismer kan optage det og nedbryde det intracellulært

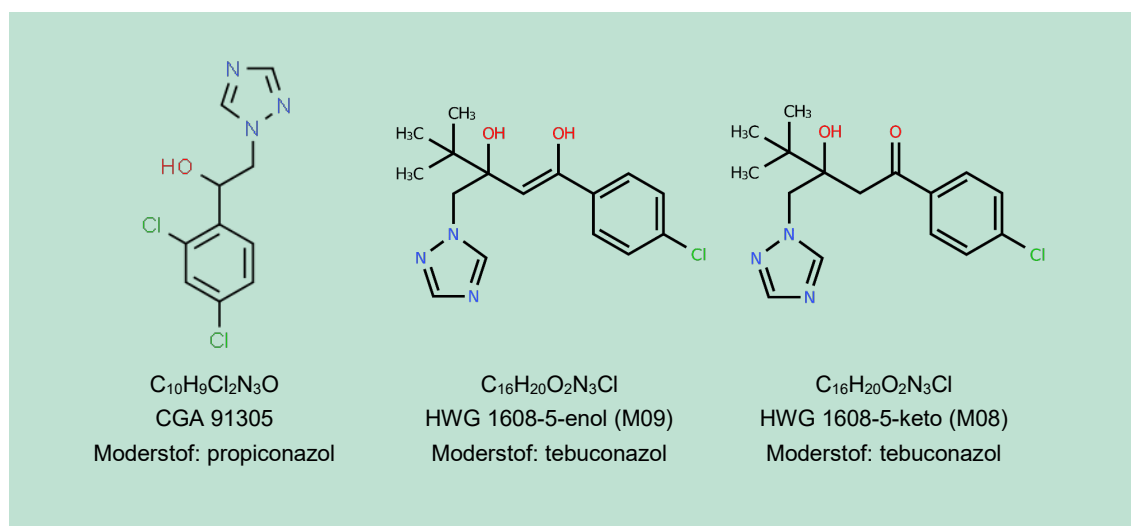
(Volkering et al., 1992; Volkering et al., 1993; Harms and Bosma, 1997; Bosma et al., 1997). Hvis mikroorganismerne derimod udskiller extracellulære enzymer, fx peroxidaser og laccaser, der kan nedbryde pesticider udenfor cellerne, vil de muligvis kunne nedbryde noget af den "ikke-biotilgængelige" pulje.

10.4 HR-MS suspect screening - test for akkumulering af gamle moderstoffer og intermediære nedbrydningsprodukter

Analyserne af VAP-markerne viste, at moderstofferne undersøgt i TRIAFUNG-projektet ophobes i jorden over meget lang tid. Potentielt kan VAP-markerne også have været sprøjtet med gamle triazol-fungicider inden markerne blev omdannet til VAP-marker, eller der kan have været brugt udsæd med nogle af de gamle bejdsemidler før man begyndte at registrere bejdsemidler i VAP. Jordprøverne fra første prøvetagning foråret 2019 på VAP-markerne blev derfor analyseret med LC-HRMS suspect screening for at afklare om der stadigvæk kunne være rester af de gamle fungicider, eller om der eventuelt kunne være intermediære nedbrydningsprodukter, som bliver overset, hvis man kun analyserer for moderstoffer og 1,2,4-triazol. Suspektlisten indeholdt triazol-aktivstofferne, som har været på markedet i Danmark, det vil sige projektets model-moderstoffer propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, prothioconazol, difenoconazol og metconazol. Suspektlisten indeholdt også de ældre moderstoffer triadimenol, triadimefon og bitertanol, som ellers ikke har været analyseret i projektet, men som tidligere har været solgt i Danmark i betydelig mængde (afsnit 4.2) samt de nyere moderstoffer penconazol og paclobutrazol, som kun er solgt i ubetydelige mængder i Danmark (afsnit 4.2). Derudover blev suspectlisten udvidet med model-moderstoffernes kendte nedbrydningsprodukter, som er beskrevet i moderstoffernes EFSA konklusionsrapporter og FAO-rapporter eller i den seneste videnskabelige litteratur (Azhari et al., 2018; Kiefer et al., 2019; Man et al., 2021) samt naturstoffet essramycin (El Gendy et al., 2008).

VAP-markerne indeholdt ikke detekterbare koncentrationer af de ekstra moderstoffer (triadimenol, triadimefon, bitertanol, penconazol og paclobutrazol) eller naturstoffet essramycin. Det ser således ikke ud til, at de gamle og vidt anvendte moderstoffer triadimenol, triadimefon og bitertanol har relevante restkoncentrationer, eller at de nyere moderstoffer penconazol og paclobutrazol har været anvendt på VAP-markerne. Da hverken ekstraktionsmetoden eller analysemetoden er optimeret til disse stoffer, kan falsk negative resultater ikke helt udelukkes. Detektionsgrænsen for projektets model-moderstoffer lå på 2-3 µg/kg. Det giver en ide om detektionsgrænsen for de ekstra triazol-moderstoffer og eventuelle ukendte triazol-stoffer, men detektionsgrænsen kan ikke overføres direkte, da ioniseringsintensitet og ion-suppression pga. matrix er stofs-specifik.

Til gengæld kunne massesporet fra en del nedbrydningsprodukter genfindes i jordprøverne fra VAP-markerne, fx CGA 91305 (Fårdrup og Lund), der er nedbrydningsprodukt fra propiconazol, og HWG 1608-5-enol (M08) / HWG 1608-5-keto (M09), der er nedbrydningsprodukter fra tebuconazol (FIGUR 49). HWG 1608-5-enol og HWG 1608-5-keto er grundlæggende det samme stof, der optræder som to tautomerer. Nedbrydningsprodukterne er kun verificeret på Level 4 (Schymanski et al., 2014), som er en usikker identifikation, hvor kun den molekylære formel ($C_xH_xO_xN_xS_xCl_x$) er bestemt med høj sikkerhed, men hvor den præcise molekylære struktur ikke er bekræftet. Om det er præcis disse stoffer, kan kun bekræftes med en dybdegående undersøgelse af fragmenteringsmønstret og efterfølgende verificering med analysestandarder, hvilket ligger udenfor projektets økonomiske ramme og formål. Søger man efter 1,2,4-triazol-fragmentet i MSMS-sporet, er det tydeligt, at der er flere stoffer i jorden, udover de kvantificerede model-moderstoffer. Det er altså ikke kun moderstofferne, der akkumulerer i pløjelaget, det kan også være mellemprodukter, som man skal være opmærksom på, når risikoen for 1,2,4-triazol-udvaskning vurderes.



FIGUR 48. 1,2,4-triazol-nedbrydningsprirodukter påvist på level 4 med HRMS suspect screening af jordprøver fra VAP-markerne. Strukturerne er hentet fra Chemspider (<http://www.chemspider.com/>, CGA 91305) og EnviPath (<https://envipath.org/>, HWG 1608-5-enol/ HWG 1608-5-keto).

11. Resultater og diskussion:

Laboratorieforsøg til bestemmelse af moder-stoffers nedbrydning og ældning i jord

I et laboratorieforsøg undersøgte vi fem triazol-fungicidernes ned-brydning og ældning i tre økologiske jorde: en leret jord, en san-det jord og en jord med højt indhold af organisk stof. Tebucona-zol, epoxiconazol, metconazol og dife-noconazol blev nedbrudt meget langsomt, hvorimod propiconazol viste betyde-lig nedbryd-ning, specielt i sandjorden. For alle stoffer sorberedes mest tri-azol-fungicid i den høj-organiske jord efterfulgt af den lerede jord og mindst i den sandede jord. Dette mønster skyldes sandsynlig-vis jordenes forskellige indhold af organisk stof. De fem triazol-fungiciders sorptionskoefficient steg i de tre jorde i løbet af de første ca. 100 dage, triazol-fungiciderne udviste altså aged sorption.

I dette laboratorieforsøg undersøgte vi triazol-fungicidernes nedbrydning og ældning under mere kontrollerede betingelser end monitoringen på VAP-markerne, men samtidig under mindre realistiske betingelser. I VAP-mar-kerne kunne vi ikke beskrive stoffernes ældning som aged sorption med K_d -bestemmelser, da vi ikke kunne på-vise stofferne i K_d -bestemmelsens CaCl_2 -ekstraktion. I laboratorieforsøget tilsatte vi derfor så høje moderstofkon-centrationer, at der ville være tilstrækkeligt høje koncentrationer i vandfasen til bestemmelse af aged sorption.

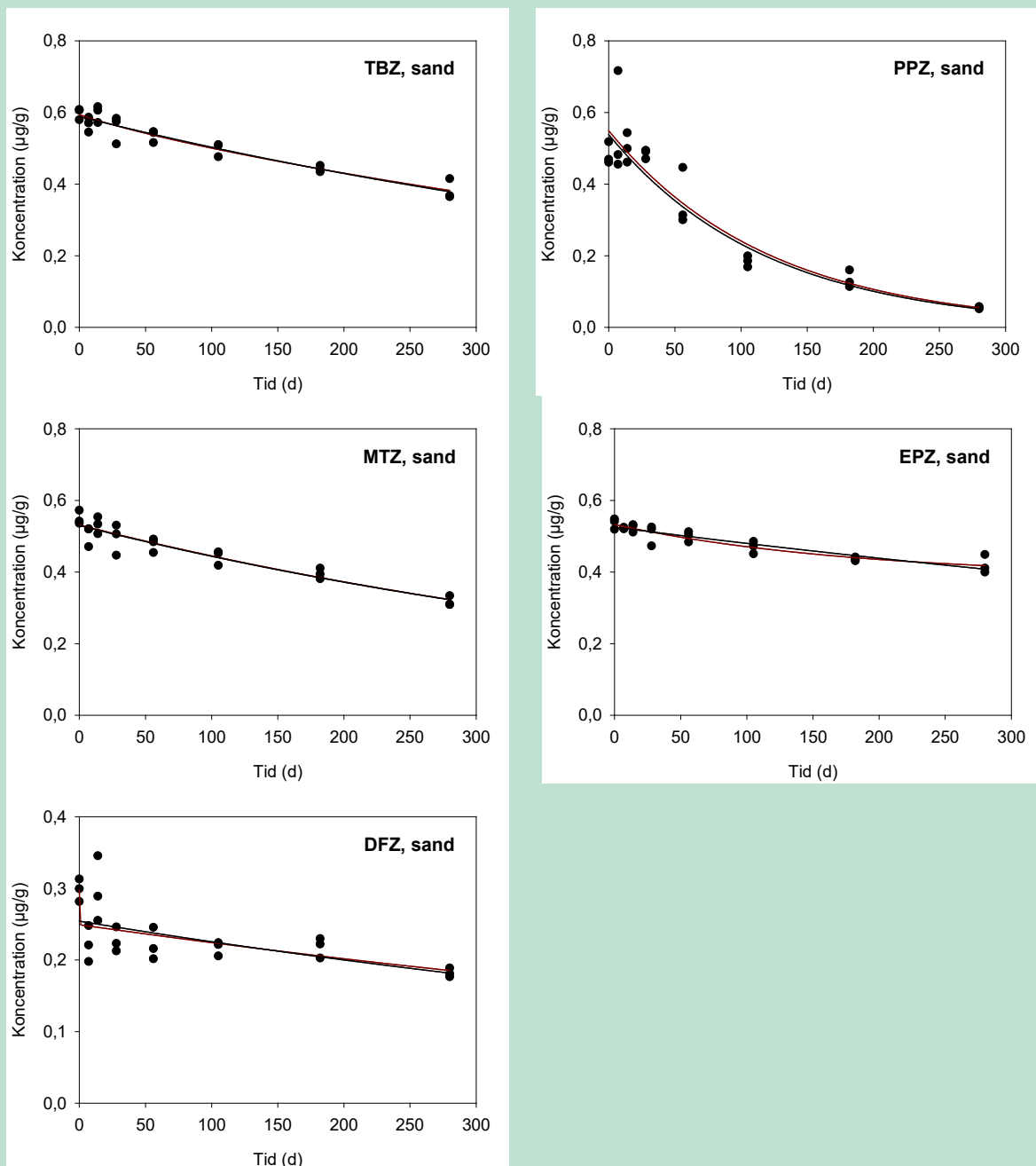
Forsøgsopsætningerne fulgte i store træk anvisningerne i guidance-dokumentet for aged sorption (EU, 2021) og guideline OECD 106 til bestemmelse af sorption og desorption (OECD, 2000). Forsøget er sat op med tre økolo-giske landbrugsjorde, for at undgå baggrunds niveau af ældede triazol-fungicider. Der er brugt tre forskellige jorde: en leret, en sandet, og en jord med højt organisk indhold. Forsøgsbetingelserne afveg på nogle punkter fra de anbefalede guidelines, idet vi fx brugte et stort antal prøver med lille prøvevolumen i stedet for en større mængde jord, hvorfra der kunne udtages delprøver. Dette var for at undgå støj fra ikke-repræsentativ udtagning af delprø-ver, som kan være et problem for sorberende, hydrofobe stoffer. Inkubationsrørene havde desuden en ilt-permea-bel membran i stedet for at bruge inkubationsflasker med gennemstrømmende luft. Vi testede heller ikke om jord-enes mikrobielle aktivitet aftog i løbet af forsøget. Endelig afveg specielt den ene jord fra det anbefalede ved at have et højt indhold af organisk stof. Vi valgte at teste netop denne jord for at undersøge, om triazol-fungicidernes nedbrydning og ældning var anderledes i organisk lavbunds jord, hvor de hydrofobe triazol-fungicider må forven-tes at sorbere kraftigere end i mineraljorde. Forsøgsopsætningen er i detaljer sammenlignet med de gængse guidelines i Bilag 10. Data for prothioconazol er udeladt pga. analytiske udfordringer med at skelne mellem pro-thioconazol og prothioconazol-desthio i inkubationerne.

11.1 Triazolfungicidernes nedbrydning

Triazolfungicidernes nedbrydning er vist i Figur 50 (sandjord), Figur 51 (lerjord) og Figur 52 (højt indhold af orga-nisk stof). Nedbrydningskinetikken blev testet ved fit af første-ordens nedbrydningskinetik (Ligning 2) og dobbelt første-ordens kinetik (Ligning 3).

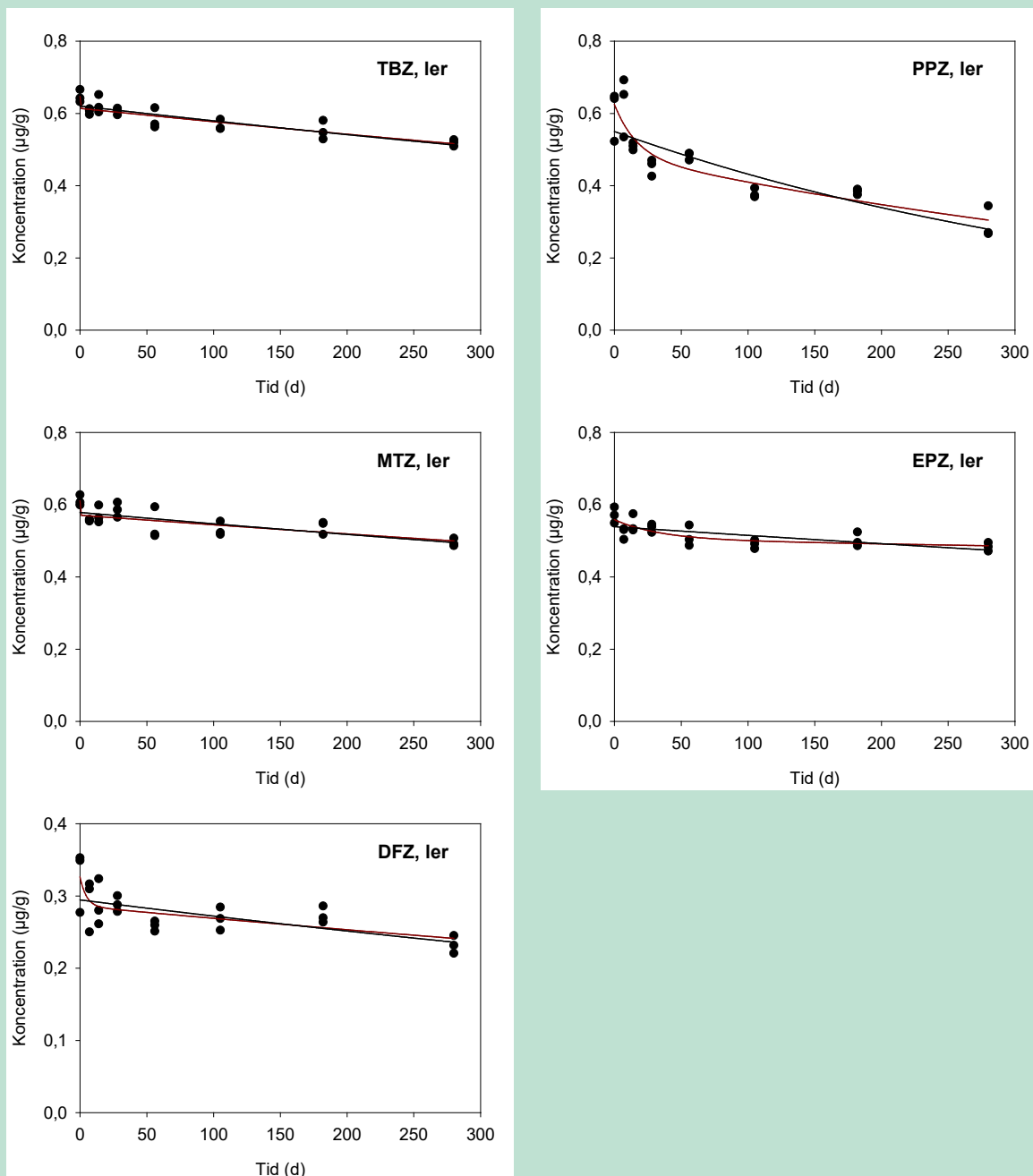
I sandjorden var triazol-fungicidernes nedbrydning langsom for de fleste stoffer og kun en tredjedel til en fjerdedel af det tilsatte fungicid blev nedbrudt i løbet af de 280 dages inkubation (Figur 50). Propiconazol var anderledes, da det meste propiconazol blev nedbrudt i løbet af de 280 dages inkubation. Propiconazols nedbrydning fulgte en simpel 1. ordens nedbrydning. Dobbelt første-ordens kinetik giver også gode fits for tebuconazol, metconazol og epoxiconazol, men da vi ikke kan afgøre om koncentrationerne går mod nul eller flader ud på et lavt, konstant niveau, som set for metconazol på Estrup-marken har vi valgt at bruge den simple første-ordens kinetik til estimering af DT50-værdier (TABEL 23). Første-ordens-kinetikken gav lidt dårligere fit for difenoconazol end de andre stoffer, fordi der var stor spredning på koncentrationerne i de første målinger.

Ved mikrobiel nedbrydning, antager man ofte, at nedbrydningen i nogen grad afhænger af stoffernes K_{foc} , der bestemmer den vandige koncentration i systemer med organisk stof, i hvert fald i starten hvor triazol-fungiciderne lige er tilsat og derfor ikke ældet endnu. Det var dog ikke tilfældet. Difenconazol har en K_{foc} på 3760 (TABEL 3), men blev nedbrudt næsten lige så hurtigt som metconazol ($K_{foc} = 1116$) og epoxiconazol ($K_{foc} = 894$). Propiconazols sorption ($K_{foc} = 955$) ligger tæt på metconazol og epoxiconazol, men nedbrydningen var langt hurtigere (Figur 50). Det tyder på, at nedbrydningen enten var styret af abiotiske processer, fx vandig hydrolyse, eller at stofferne varierer i deres iboende bionedbrydelighed styret af molekylestruktur.



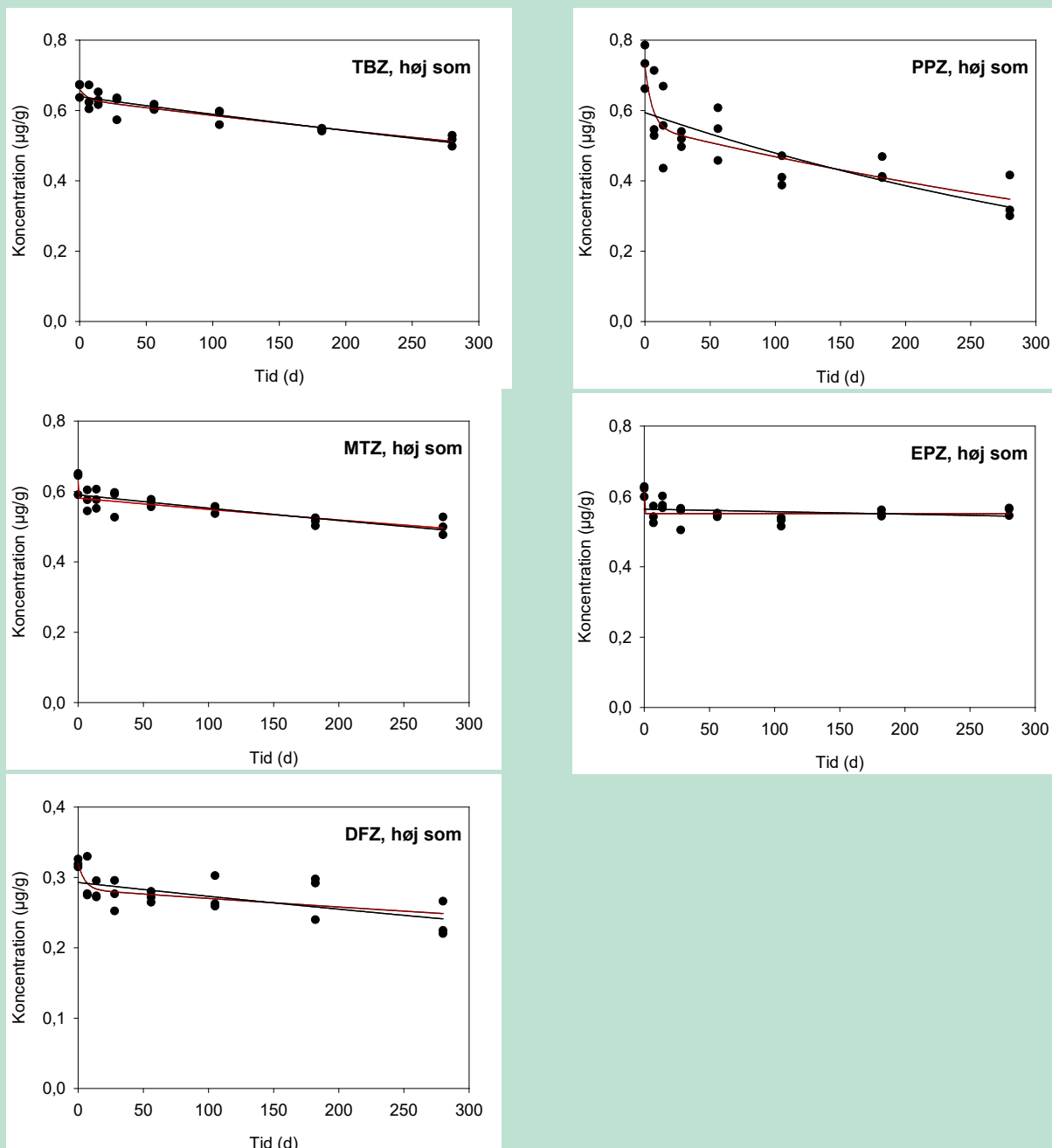
FIGUR 49. Triazol-fungiciders nedbrydning i et batch-forsøg med sandet, økologisk landbrugsjord. Datapunkter er den totale mængde, som kunne ekstraheres ved sekventiel ekstraktion. Sort linje er enkelt 1.-ordens fit, rød linje er dobbelt 1.-ordens fit.

Triazol-fungicidernes nedbrydning i lerjorden var endnu langsommere end i sandjorden og kun op til en tiendedel af det tilsatte triazol-fungicid blev nedbrudt i løbet af de 280 dages inkubation (Figur 51) bortset fra propiconazol, hvor ca. 40% blev nedbrudt. De relative forskelle mellem stofferne var dog de samme som for sand, bortset fra at propiconazol muligvis flader ud på et højere niveau end i sand. Tebuconazol, metconazol og til dels propiconazol kunne fittes med simpel 1. ordens kinetik. Difenconazol og epoxiconazol var nærmest lineære og gav derfor ringere 1. ordens fits. Man får kun marginalt bedre fit med dobbelt 1. orden, tydeligst for propiconazol og epoxiconazol (Figur 51).



FIGUR 50. Triazol-fungiciders nedbrydning i et batch-forsøg med leret, økologisk landbrugsjord. Datapunkter er den totale mængde, som kunne ekstraheres ved sekventiel ekstraktion. Sort linje er enkelt 1.-ordens fit, rød linje er dobbelt 1.-ordens fit.

I den meget organiske jord ("høj SOM"), var det igen propiconazol, der blev nedbrudt hurtigst (Figur 52) med en halveringstid der var ca. en tredjedel af metconazol, difenoconazol og tebuconazol (TABEL 23). Difenoconazol gav dog dårligt fit til første-ordens kinetik ($R^2=0,397$), da udviklingen nærmest er lineær. For epoxiconazol kan første-ordens kinetik ikke bruges ($R^2=0,051$), da koncentrationen dybest set er konstant efter de første dage. Som for de to andre jorde, gav dobbelt første-ordens kinetik ikke bedre fit bortset fra de første målepunkter.



FIGUR 51. Triazol-fungiciders nedbrydning i et batch-forsøg med høj-organisk, økologisk landbrugsjord. Data-punkter er den totale mængde, som kunne ekstraheres ved sekventiel ekstraktion. Sort linje er enkelt 1.-ordens fit, rød linje er dobbelt 1.-ordens fit

Forsøgets DT50-værdier er opsummeret i TABEL 23 og sammenlignet med værdierne i stoffernes EU-dossierer. Formålet var ikke at teste om DT50 i stoffernes godkendelser er repræsentative for danske marker, men derimod at teste hvilken type kinetik nedbrydningen fulgte i de tre jorde. I mange tilfælde var nedbrydningen langsom, hvorfor det var nødvendigt med 280 dages inkubation i stedet for de anbefalede 120 dage. Ved forlænget inkubation risikerer man, at de mikrobielle processer i stigende grad forløber langsomt. Optimalt bør man derfor jævnligt måle den mikrobielle aktivitet, men en så detaljeret tilgang lå udenfor projektets formål og rammer. For dog at få en indikation af, om processerne forløb som forventet, sammenlignede vi de bestemte DT50 med godkendelsernes værdier, med en forventning om at jorden med højt organisk indhold ville vise længere DT50 pga. øget sorp-

tion. I sammenligningen er det vigtigt at huske, at de opgivne laboratorie DT50 fra EU-dossiererne er under standardbetingelser, dvs. bestemt ved inkubation ved 20 °C. Vores data er fra inkubation ved 10 °C som typisk bruges i danske nedbrydningsforsøg. Den lavere temperatur giver lavere nedbrydningsrater, hvor Q_{10} for pesticidnedbrydning i jord typisk ligger på 2,2 (FOCUS, 2006), altså 2,2 gange højere DT50 ved 20 °C end ved 10 °C. Når man tager denne effekt i betragtning, ligger de bestemte DT50-værdier i den høje ende, men nogenlunde indenfor spændet i EU-dossiererne.

For metconazol kunne vi sammenligne stof-fjernelse i laboratorieinkubationerne og i marken. Stof-fjernelsen var betydeligt langsommere i de tre laboratoriejorde, hvilket også gælder for DT50 i EU-dossierne (TABEL 23). I vores forsøg skyldes det sandsynligvis, at metconazols begyndelseskoncentration var ca. 20 gange højere i laboratorieinkubationerne end i Estrup-jorden, men også at der i laboratorieforsøget ikke er naturlig gennemstrømning af vand, frigivelse af organisk kulstof fra planter og tilførsel af næringsstoffer. Alt i alt betyder det sandsynligvis, at den generelle mikrobielle aktivitet i laboratoriet blev tiltagende langsommere som tiden gik. Vi vurderede derfor, at det ikke gav mening at inkubere længere end 280 dage. Forskellen på VAP-markerne og laboratorieinkubationerne kan også være, at de mikrobielle samfund i VAP-jordene er tilpasset vækst på triazol-fungicider efter gentagne sprøjtninger, hvilket ikke er tilfældet for de økologiske jorde i laboratorieforsøget. Denne effekt kan give nærmest lineære nedbrydninger i laboratorieforsøget på grund af de højere start-koncentrationer.

TABEL 23. Beregning af forsøgets nedbrydningsrater (DT50, dage) ved 10° C og sammenligning med EU-dossierer som citeret i Pesticides Properties Database. I parentes angives forsøgets nedbrydningsrater omregnet til 20° C med en Q_{10} på 2,2 (FOCUS, 2006).

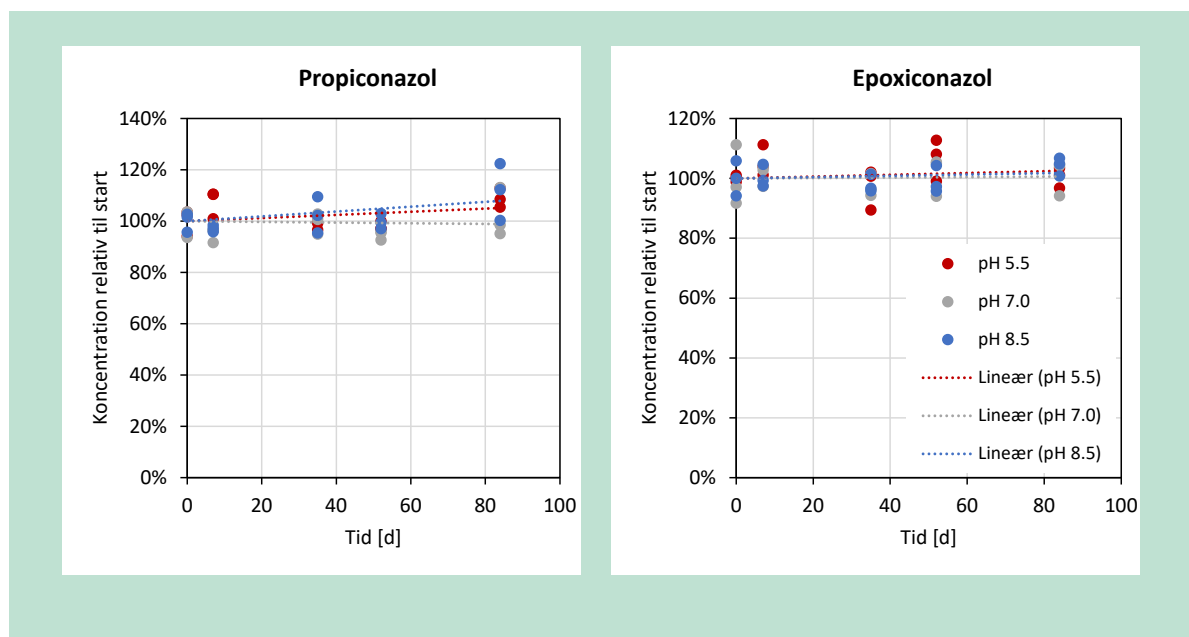
	DT50, Sandet	DT50 Leret	DT50 SOM	Høj DT50-range, lab 20° C EU dossier	DT50-range, field EU dossier
Tebuconazol	433 (197)	990 (450)	866 (394)	>365	25,8-91,6
Propiconazol	83 (38)	289 (131)	315 (143)	26,6-115	15,3-96,3
Metconazol	385* (175)	1155 (525)	990 (450)	69-569	26,6-368,5
Epoxiconazol	770 (350)	1386* (630)	-	127,1-1000	0,75-247,8
Difenoconazol	578 (263)	866* (394)	990* (450)	53-456	20-265

*Sandsynligvis overestimeret, da udviklingen nærmest er mere lineær end første-ordens.

11.2 Test for vandig hydrolyse

Propiconazol viser hurtigst omsætning, det vil sige mindst DT50, i alle tre jorde, hvorimod epoxiconazol viste langsomst nedbrydning, dvs. størst DT50, i alle tre jorde (TABEL 23). Vi undersøgte, om det kunne skyldes forskelle i, hvor følsomme stofferne er for spontan vandig hydrolyse. I Pesticides Properties Database (PPDB) er epoxiconazol, tebuconazol, metconazol og difenoconazol opgivet som hydrolysestabile ved 20-25 °C fra pH 4 til pH 9. Propiconazol, derimod, er opgivet som moderat persistent med en hydrolyse-DT50 på 53,3 dage ved 20°C og pH 7. Dette ville kunne forklare, at propiconazol nedbrydes hurtigst i laboratorieinkubationerne. Propiconazol forsvandt desuden langt hurtigst i sandjorden, som er en jord med meget høj pH på 8,2 (TABEL 9). Vi testede derfor triazol-moderstofferne stabilitet ved tre forskellige pH-værdier (5,5; 7,0; 8,5) i 0,1 M fosfatbuffer ved 10 °C, og inkluderede også prothioconazol-desthio, paclobutrazol og mefentrifluconazol. Forsøget viste, at propiconazol og epoxiconazol (Figur 53) og de øvrige testede triazol-moderstoffer (Bilag 9) alle er hydrolysestabile ved de tre pH-værdier. pH og vandig hydrolyse kan derfor ikke forklare forskellen på propiconazol og de øvrige moderstoffer. De autoklavede kontrolinkubationer fra laboratorieforsøget med jord viste desuden, at propiconazol-koncentrationen var konstant over tid (FIGUR 55, FIGUR 56 og FIGUR 57), hvilket underbygger, at abiotisk nedbrydning ikke er årsagen til faldet i propiconazol-koncentrationen. Der er altså ingen af de eksperimentelle data, som tyder på at

propiconazol er nedbrudt abiotisk i eksperimentet og der må sættes spørgsmålstegn ved data i PPDB vedrørende propiconazols vandig stabilitet.



FIGUR 52. Test for vandig hydrolyse af propiconazol og epoxiconazol ved forskellige pH i fosfatbuffer ved 10 °C. Tilsvarende data for de øvrige model-moderstoffer er vist i Bilag 9.

11.3 Sammenligning af K_{oc} med EFSA-parametre og mellem de forskellige jorde

Triazol-fungiciderne er relativt hydrofobe pesticider. Det organiske stof i jorden må dermed forventes at være den vigtigste adsorbent i jorden, hvilket fx er demonstreret for tebuconazol i pesticidforskningsprojektet TRANSPORTER (Johnsen et al., 2020). Ud fra laboratorieforsøgets ekstraktion med 10 mM CaCl_2 og summen af ekstraktion med HPCD og acetonitril kan sorptionskoefficienter (K_d) beregnes, som angivet i følgende ligning,

Ligning 4:

$$K_d = \frac{(C_{HPCD} + C_{AcN})}{C_{CaCl_2}}$$

hvor C_{CaCl_2} er koncentrationen i vandig ekstraktion i $\mu\text{g/l}$ og C_{HPCD} og C_{AcN} er koncentrationen i henholdsvis HPCD-ekstraktionen og acetonitril-ekstraktionen omregnet til $\mu\text{g/kg}$ jord (tørvægt).

Når organisk stof er den vigtigste adsorbent, kan det give mening at omregne K_d til en K_{oc} -værdi i en given jord på baggrund af jordens indhold af organisk kulstof. K_{oc} fås ved at dividere K_d med fraktionen af organisk kulstof i jorden. I den sandede jord lå K_{oc} ved forsøgsstart indenfor K_{foc} -range opgivet i EU-dossiererne for tebuconazol og propiconazol, hvorimod metconazol, epoxiconazol og difenoconazol lå højere. I den lerede jord var alle K_{oc} -værdier højere end opgivet i dossiererne, hvor forskellen var størst for det mest hydrofobe stof metconazol. I den organiske jord var forskellen endnu tydeligere, hvor alle stoffernes K_{oc} var mindst dobbelt så stor som højeste værdi i EU-dossiererne. Forskellen mellem laboratorieforsøgets K_{oc} og EU-dossierernes K_{foc} skyldes sandsynligvis, at der er brugt højere koncentrationer og flere koncentrationer i forsøgene i EFSA's konklusionsrapporter. Vores startkoncentration var ca. 0,6 mg/kg, dvs. koncentrationen i vandfasen ved ligevægt var typisk omkring 10 $\mu\text{g/l}$. K_{foc} er K_{oc} ved en koncentration i vandfasen på 1 mg/l. Med en Freundlich eksponent (n) på ca. 0,85 (EU-dossiererne som citeret i PPDB) er K_d ved 10 $\mu\text{g/l}$ ca. det dobbelte af K_f , når denne er beregnet på mg/l-basis, hvilket er standard ifølge EFSA/OECD. Derudover er sorptionen bestemt ved 10°C, hvor OECD-guidelinen anbefaler 20-25°C, og endelig er den organiske jord (høj SOM) valgt netop fordi vi ville undersøge sorptionen i en lavbundsjord med højt organisk indhold, selvom den ikke opfylder guidelinens krav til indhold af organisk stof.

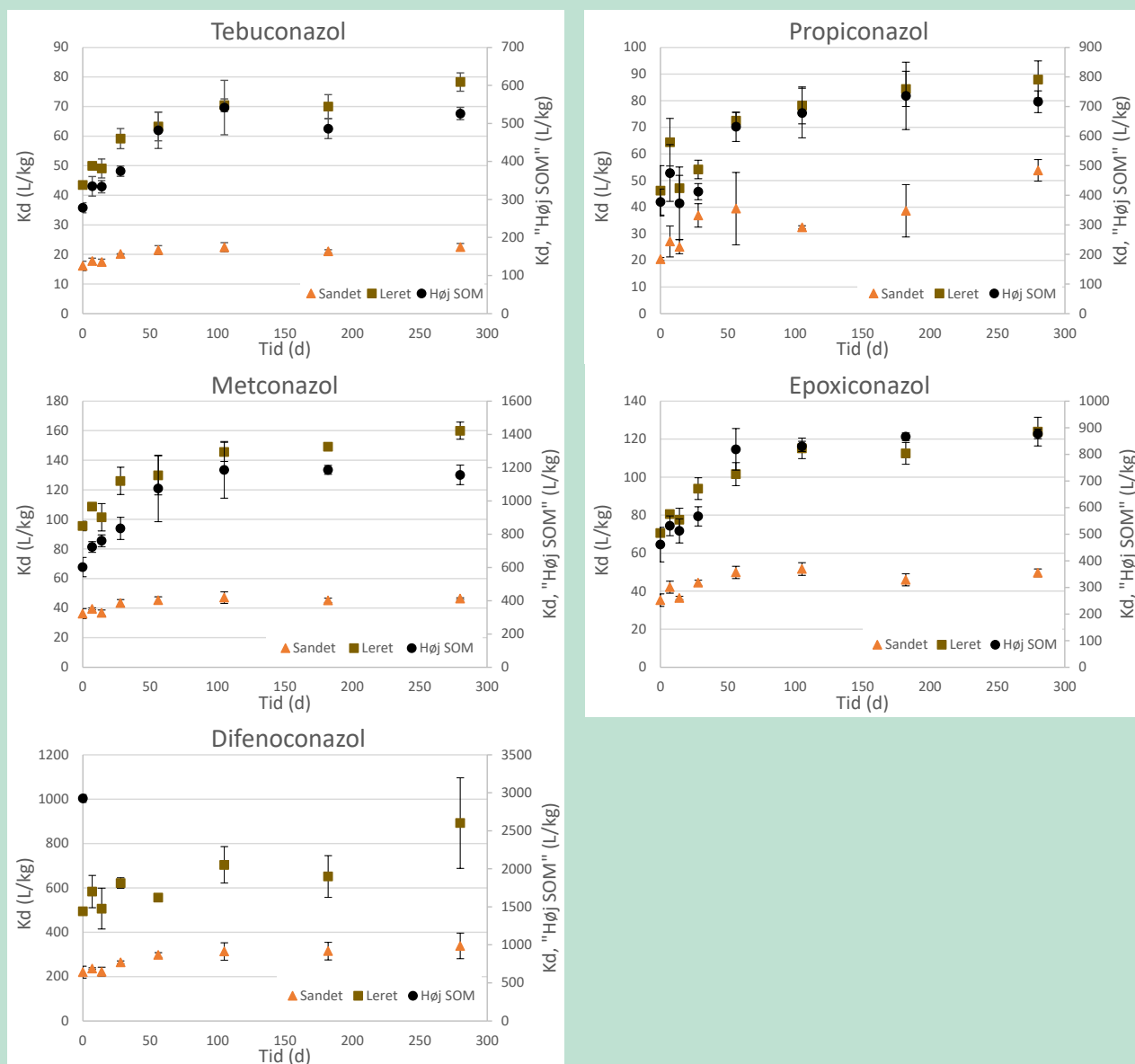
TABEL 24. K_{oc} bestemt ved laboratorieforsøgets start. K_{oc} beregnet ud fra K_d og jordenes indhold af organisk stof (bestemt ved glødetab) omregnet til organisk kulstof under antagelse af, at 55% af det organiske stof er kulstof, og sammenligning med EU-dossierer som citeret i Pesticides Properties Database.

	K_{foc} -range, EU-dossier	K_{oc} , sandet	K_{oc} , leret	K_{oc} , høj SOM
Tebuconazol	102-1249	968	1799	3231
Propiconazol	387-1817	1230	1911	4383
Metconazol	726-1718	2182	3954	6989
Epoxiconazol	702-1962	2122	2922	5352
Difenoconazol	400-7730	13218	20448	33982

11.4 Aged sorption

Hvis K_d stiger i løbet af inkubationen, er der tale om aged sorption (Beulke et al., 2015; EU, 2021), også kendt som “time-dependent sorption” eller “slow sorption”. Hvis et stof udviser aged sorption vil den modellerede pesticidudvaskning i mange tilfælde være 1-2 størrelsesordner mindre, hvis aged sorption inkluderes i modellen (Boesten, 2017), regulativt er aged sorption derfor en vigtig parameter. FIGUR 54 viser ændringer i triazol-fungicidernes K_d i løbet af laboratorieforsøget. Det er tydeligt, at sorptionskoefficienten generelt stiger for alle stoffer og alle jorde over tid. Difenconazol, som er det mest hydrofobe af stofferne, sorberede så kraftigt, at koncentrationen i $CaCl_2$ -ekstraktionen var under detektionsgrænsen bortset fra de første prøver til tiden nul. Generelt, skete den største stigning i løbet af de første to-tre måneder, hvorefter stigningen enten var lille eller fraværende. Motoki et al. (2016) anvendte aged sorption, beregnet på baggrund af K_d -værdier lige efter sprøjtning, til bedre at forudsige den vandige koncentration af en række pesticider over tid. Deres antagelse var, at K_d ville blive ved med at stige. Dette ser altså ikke ud til at være tilfældet for triazol-fungicider, hvor K_d flader ud efter et par måneder. Lignende udfaldning af K_d efter nogle måneders forløb er set for penflufen og fluxapyroxad (Gulkowska et al. 2016), mens andre forsøg ikke varede længe nok til at afgøre om K_d ville fortsætte med at stige efter et par måneder (f.eks. Beigel et al., 1997; Cox et al., 1998; Oi, 1999). Der er dog fremsat hypoteser om, at fuld ligevægtsindstilling for organiske, miljøfremmede stoffer i jord typisk vil tage et par måneder (Pignatello og Xing, 1996; Suddaby et al., 2016), hvilket vores studie ser ud til at bekræfte for triazol-fungiciderne.

Hvor udfaldning af K_d efter et par måneder var fælles for alle fungicider og jorde, var der også forskelle, både mellem fungicider og mellem jorde. For alle stoffer sorberedes der mest fungicid til den høj-organiske jord efterfulgt af den lerede jord og med mindst sorption til den sandede jord. Forskellene mellem jordene skyldes sandsynligvis indholdet af organisk stof, som falder i samme rækkefølge i de tre jorde (TABEL 9). Stigningen i K_d over tid er generelt størst i den organisk rige jord (ca. en fordobling af K_d) og mindst i den sandede jord (ca. 50% øgning i K_d). Årsagen til disse forskelle er svær at udlede ud fra vores eksperiment, men skyldes muligvis jordenes fysiske strukturer og/eller det organiske stofs kemiske og fysiske sammensætning, fx hvorvidt det organiske stof hovedsageligt er partikulært eller bundet til ler. Årsagerne til fænomenet aged sorption er ikke velbeskrevne og tolkningen af både årsagen og betydningen af den observerede stigning i K_d over tid er derfor ikke simpel. I litteraturen er der observeret aged sorption for en række forskellige organiske stoffer i jord (Pignatello og Xing, 1996), inklusive pesticider såsom fluroxypyr (Lehmann et al., 1990), triticonazol (Beigel et al., 1997), imidacloprid (Cox et al., 1998; Oi, 1999) og penflufen og fluxapyroxad (Gulkowska et al. 2016). I disse studier blev den fortsatte stigning i K_d over tid tilskrevet forskellige årsager, såsom diffusion ind i mikro- og nanoporer (Beigel et al., 1997; Cox et al., 1998), forstærkning af binding mellem pesticid og jord over tid (Oi, 1999), fysisk indeslutning af pesticid i jord/SOM-komplekser (Lehmann et al., 1990; Oi, 1999) og præferentiel nedbrydning af svagt sorberet pesticid (Cox et al., 1998), dog uden at noget af dette blev eftervist eksperimentelt i de konkrete studier. I ca. 25 år gamle, hyppigt citerede reviews var konklusionen, at aged sorption hovedsageligt er relateret til diffusion i organisk matrix og mineralske nanoporer (Pignatello og Xing, 1996; Luthy et al., 1997). Denne opfattelse er fortsat dominerende i nogle sammenhænge (Beulke et al., 2015), omend den ikke efterfølgende er blevet eftervist eksperimentelt. Der har i de senere år været et paradigmeskifte i forståelsen af hydrofobe stoffers sorption med større fokus på blødt organisk kulstof (polymerer og humus) versus krystallinsk organisk kulstof (sod og kerogen) som beskrevet i afsnit 4.3.



FIGUR 53. Ændring i triazolfungicidernes sorptionskoefficienter (K_d) over tid i tre jorde. Bemærk, at for den høj-organiske jord "høj SOM" er K_d vist på sin egen y-akse, som ses til højre. For difenoconazol var koncentrationen i CaCl_2 -opløsningen for lav til at bestemme K_d i den højorganiske jord, bortset fra lige ved forsøgsstart

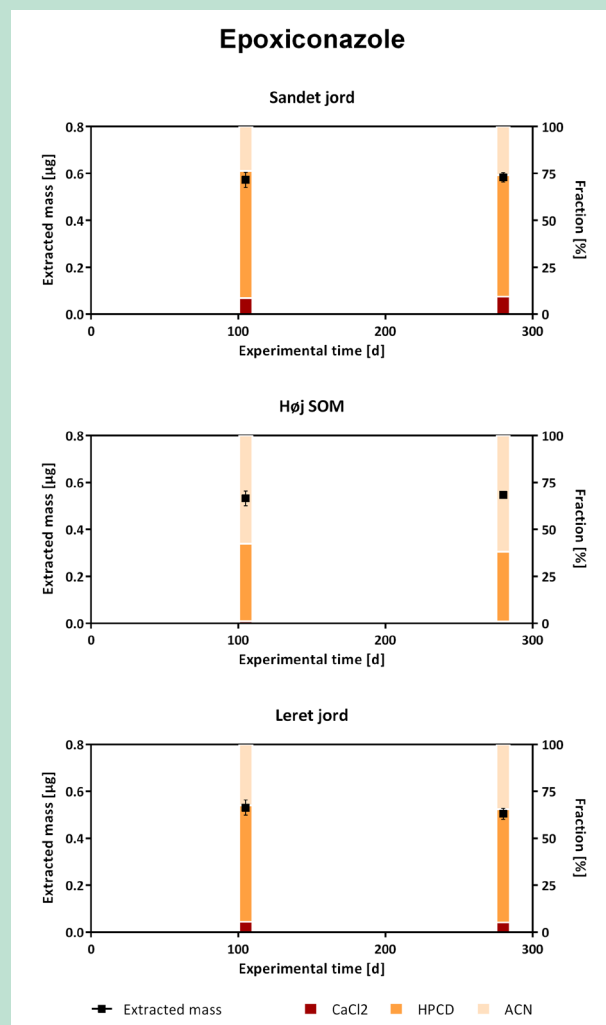
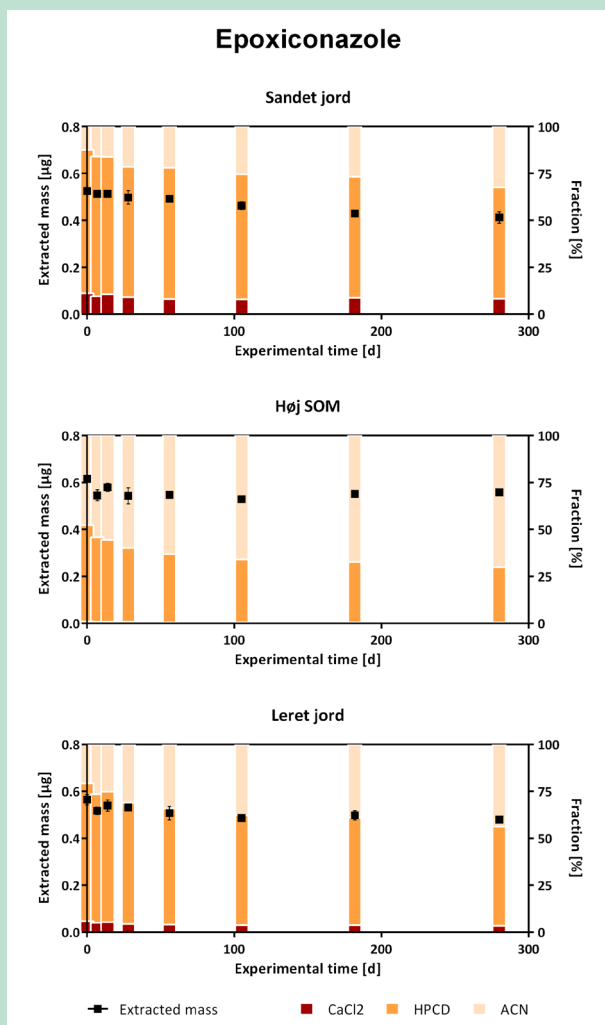
11.5 Biotilgængelighed

Triazol-fungiciderne viste alle faldende biotilgængelig andel over tid i alle tre jorde (TABEL 25) med det største fald i den organiske jord (høj SOM). I alle jordene skete faldet i biotilgængelig andel indenfor de første ca. 100 dage (FIGUR 55 - FIGUR 57, og Bilag 8). Faldet i biotilgængelig andel er mindre i de autoklaverede rør, hvilket jo skyldes, at den totale koncentration forbliver høj i disse rør. Det skal bemærkes at ikke alle kontrolrør var fuldstændig sterile, idet sporer i enkelte rør overlevede den dobbelte autoklaving. De konstante total-koncentrationer i kontrollerne viser, at disse mikroorganismer ikke kunne nedbryde triazol-fungiciderne og vi antager, at væksten ikke har påvirket stoffernes biotilgængelighed. Udover faldende biotilgængelighed viser kontrollerne også, at triazol-fungiciderne ikke omdannes abiotisk i løbet af forsøget.

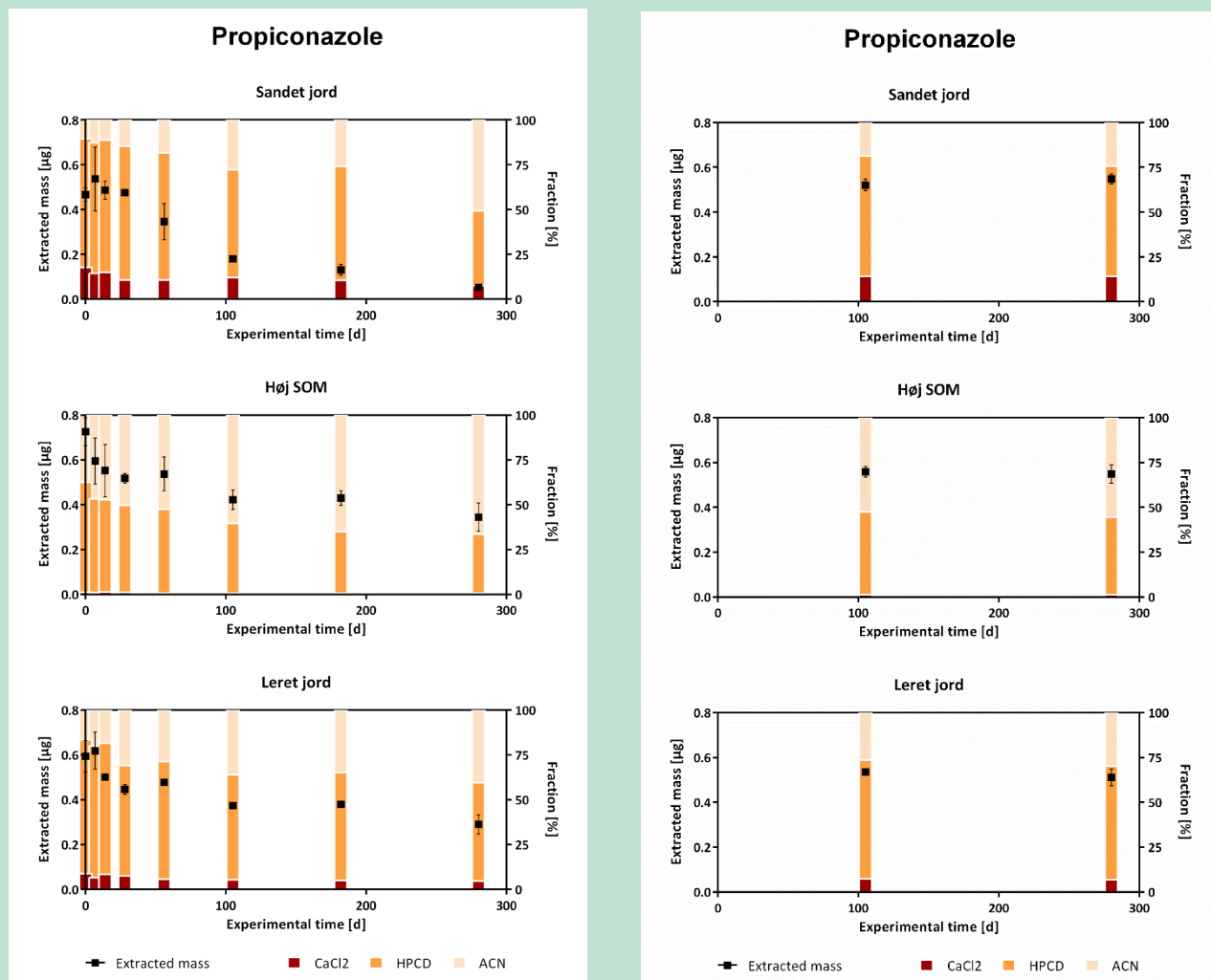
TABEL 25. Biotilgængelig andel (ekstraherbar med CaCl_2 plus HPCD) i procent ved forsøgets start og efter 280 dages inkubation. Gennemsnit af tre replikater inkubationsrør ± 1 standardafvigelse.

	Sandet		Leret		Høj SOM	
	Dag 0	Dag 280	Dag 0	Dag 280	Dag 0	Dag 280
Tebuconazol	92 $\pm$ 0,2	76 $\pm$ 0,5	83 $\pm$ 1,0	61 $\pm$ 0,7	60 $\pm$ 2,2	36 $\pm$ 1,1
Propiconazol	90 $\pm$ 2,6	50 $\pm$ 9,8	84 $\pm$ 3,5	60 $\pm$ 10	63 $\pm$ 2,5	34 $\pm$ 2,0
Metconazol	94 $\pm$ 0,5	79 $\pm$ 0,7	86 $\pm$ 0,6	65 $\pm$ 0,2	70 $\pm$ 2,6	44 $\pm$ 1,3
Epoxiconazol	88 $\pm$ 0,7	68 $\pm$ 0,6	80 $\pm$ 0,7	57 $\pm$ 0,2	52 $\pm$ 2,3	30 $\pm$ 0,6
Difenoconazol	88 $\pm$ 1,7	67 $\pm$ 4,5	81 $\pm$ 4,7	53 $\pm$ 4,0	61 $\pm$ 1,2	37 $\pm$ 4,1

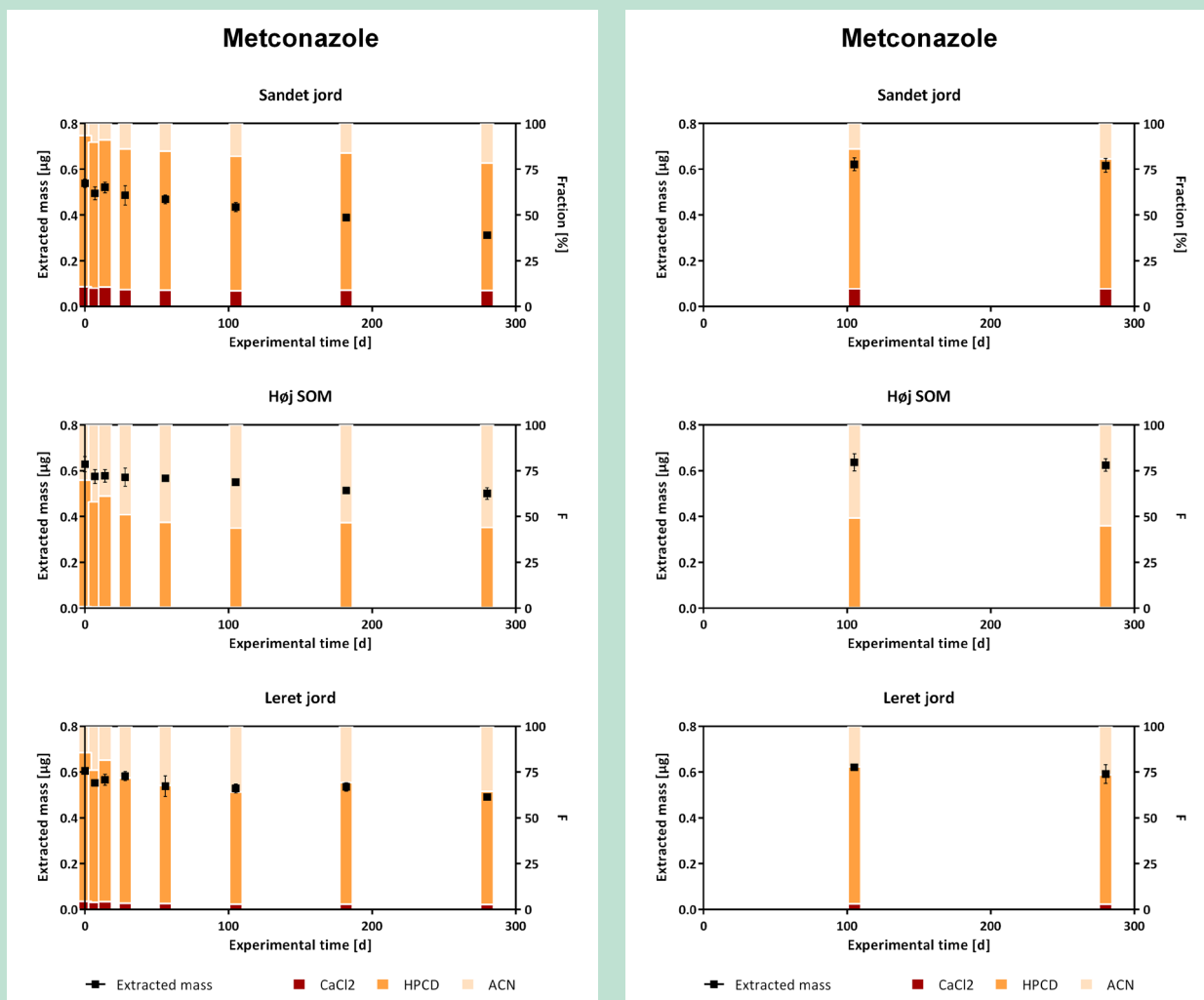
Ved starten af eksperimentet burde al det tilsatte fungicid i princippet være biotilgængeligt. Dette er tæt på at være tilfældet i den sandede jord, hvor den målte biotilgængelige fraktion i første prøve til tiden nul varierende fra 88-94% (TABEL 25), og til dels i den lerede jord, hvor den biotilgængelige fraktion varierende fra 80-86%. Det var ikke tilfældet i "høj SOM", hvor den biotilgængelige fraktion varierende til tiden nul varierende fra 52-70 % (TABEL 25). I metodeudviklingen var propiconazols biotilgængelighed til tiden nul ca. 95% i alle tre jorde, når biotilgængeligheden blev målt med kun 21 timers kontakt mellem frisk moderstof og HPCD (FIGUR 31). Forskellen mellem optimeringen og laboratorieforsøget kan skyldes, at der sker en vis ældning, fx ved binding til sodpartikler, under de 140 timers ekstraktion sammenlignet med den næsten fuldstændige biotilgængelighed i metodeoptimeringens korte ekstraktion. Undersøgelser af desorptions-kinetikken viste derudover, at enkelt-ekstraktioner efter 140 timer i nogle tilfælde giver en lille underestimering sammenlignet med en mere omfattende metode, hvor kinetikken følges og fittes til en funktion (TABEL 14). I princippet kan forskellen også skyldes delvis nedbrydning af den biotilgængelige fraktion under de 140 timers ekstraktion, men dels var der ikke tegn på nedbrydning i metodeudviklingen (FIGUR 34), dels er totalkoncentrationerne til tiden nul stort set de samme som i de efterfølgende døde kontroller. Hvis der havde været betydelig bionedbrydning under ekstraktionen, ville totalkoncentrationerne til tid nul have været lavere end de døde kontroller.



FIGUR 54. Tidlige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for epoxiconazol i laboratorieinkubationer samt procentvis fordeling på CaCl_2 -ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN) i tre forskellige jordtyper. Høj SOM: jord med højt indhold af organisk stof. Figurene til højre viser resultater for auto-klaverede kontroller



FIGUR 55. Tidslige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for propiconazol i laboratorieinkubationer samt procentvis fordeling på CaCl₂-ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN) i tre forskellige jordtyper. Høj SOM: jord med højt indhold af organisk stof. Figurene til højre viser resultater for auto-klaverede kontroller.

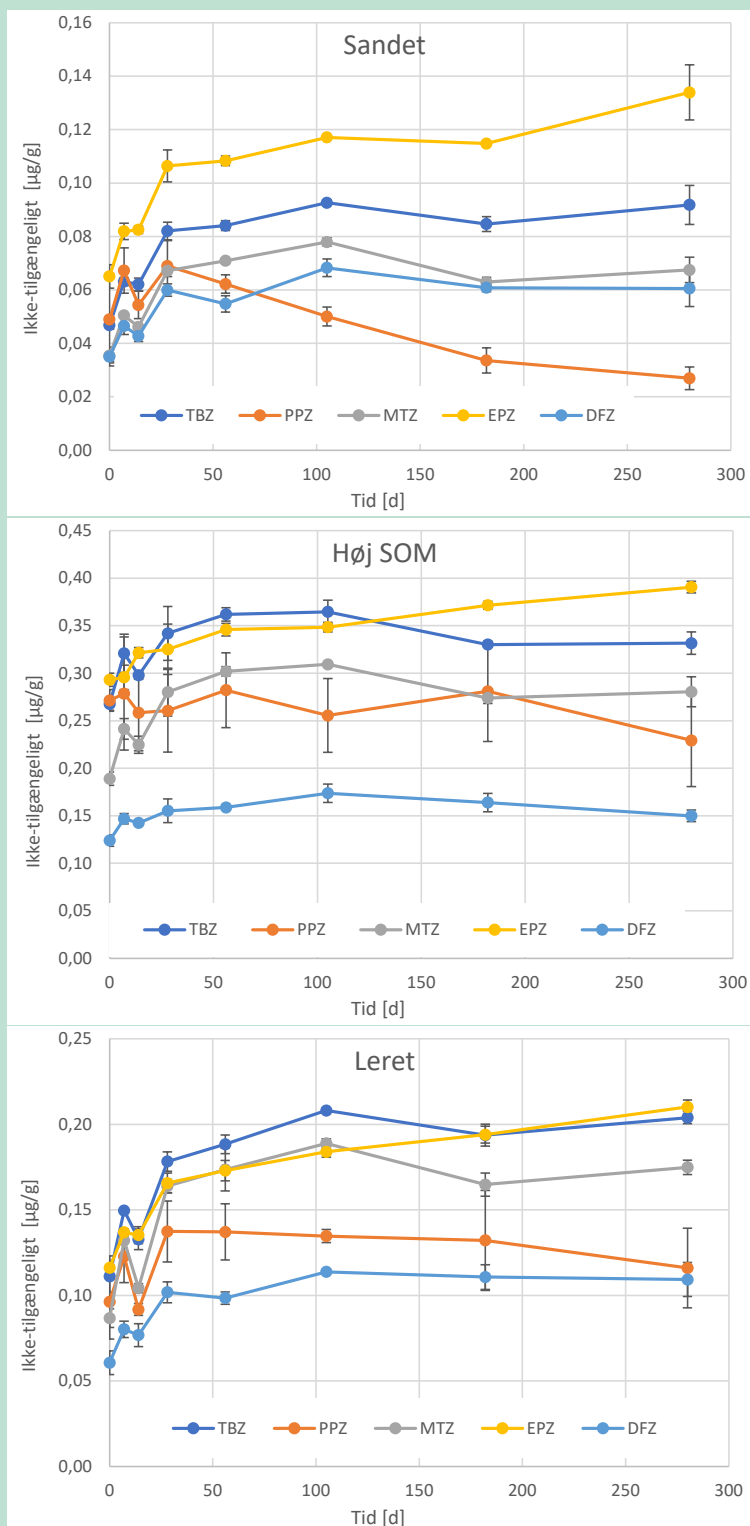


FIGUR 56. Tidlige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for metconazole i laboratorieinkubationer samt procentvis fordeling på CaCl_2 -ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN) i tre forskellige jordtyper. Høj SOM: jord med højt indhold af organisk stof. Figurene til højre viser resultater for auto-klaverede kontroller

11.6 Ikke-tilgængelig fraktion og nedbrydning

En stadig større relativ andel af ikke-biotilgængeligt stof kan både skyldes, at den biotilgængelige fraktion langsomt nedbrydes og at der er stof, som går fra at være biotilgængeligt til at være ikke-biotilgængeligt. FIGUR 58 viser de absolutte ændringer i ikke-biotilgængelige koncentrationer. For de fleste af stofferne stiger den ikke-biotilgængelige koncentration i de første 5-10 uger, hvorefter den er stort set konstant. Dette kan tolkes som at stoffet med tiden diffunderede ind i de hårdest-bindende sorptions-steder fx sod i løbet af laboratorieforsøget og at disse steder i stigende grad blev mættede. Propiconazol er en undtagelse, da den ikke-biotilgængelige koncentration først stiger og derefter falder sidst i forsøget, det er specielt markant i den sandede jord. I princippet burde ikke-biotilgængeligt stof ikke blive biotilgængeligt igen i løbet af 280 dage. Det kan tolkes, som at metoden er meget upræcis og højest kan give et fingerpeg om størrelsesorden, men det kan også tolkes som en helt fundamental egenskab ved det ikke-tilgængelige stof. Det skyldes, at biotilgængelighedsmålingerne bygger på et princip om, at sorberede hydrofobe stoffer skal gennem et vandigt grænselag, for at mikroorganismer kan optage det og nedbryde det intracellulært (Volkerling et al., 1992; Volkerling et al., 1993; Harms and Bosma, 1997; Bosma et al., 1997). Men mange mikroorganismer udskiller også extracellulære enzymer, fx peroxidaser og laccaser, der kan

nedbryde pesticider udenfor cellerne og dermed muligvis noget af den ikke-biotilgængelige pulje. Vi kan ikke afgøre hvilken af de to forklaringer, der er vigtigst.



FIGUR 57. Ændring over tid i de ikke-biotilgængelige koncentrationer ± 1 standardafvigelse (n=3).

12. Samlet diskussion

Det er sandsynligt, at antropogene diffuse kilder indimellem kan give målbart 1,2,4-triazol under nogle marker. Vi har ikke kunnet bekræfte en baggrund af naturligt forekommende 1,2,4-triazol, men på én lokalitet (våd eng) var der et mindre, uforklaret bidrag i jordvandet, hvor naturlig dannelse ikke kunne udelukkes. Bejdset udsæd vil også kunne bidrage til udvaskningen af 1,2,4-triazol med en årlige middelkoncentration omkring 0,004–0,02 µg/l i vand der forlader rodzonen. Svovl-atomet på triazol-ringen i prothioconazol forhindrede ikke omdannelse af prothioconazol til frit 1,2,4-triazol, hvorfor sprøjtning med prothioconazol også vil kunne give et bidrag til 1,2,4-triazol-udvaskning. I VAP-markerne påviste vi høje koncentrationer af triazol-fungicider 5-19 år efter seneste sprøjtning og omsætningen var i mange tilfælde ganske langsom. HPCD-ekstraktion viste, at der er en biotilgængelig, løst-bundet fraktion, der er i diffusiv kontakt med vandfasen og kan ekstraheres ved kompleksering med HPCD, og en ikke-biotilgængelig fraktion som ikke kunne udveksles med vandfasen under HPCD-ekstraktionen. Efter sprøjtning vil det meste triazol-fungicid sandsynligvis nedbrydes i pløjelaget, men en lille fraktion kan bindes meget hårdt og derfor ophobes efter gentagne sprøjtninger. Langsom, men kontinuert nedbrydning af det ældede triazol-fungicid i VAP-markerne bidrager derfor også til "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand på VAP-marker, hvor der ikke for nyligt var sprøjtet med moderstofferne.

12.1 Hypotese I: Naturlig dannelse af 1,2,4-triazol?

Vi har med baggrund i sugecelleinstallationer og ekstraktion af jordprøver ikke kunnet bekræfte en baggrund af naturligt forekommende 1,2,4-triazol i naturområder (bøgeskov ved Svanholm Gods, nåleskov i Tisvilde Hegn og hedeareal i Tisvilde Hegn). Vi har heller ikke kunnet detektere de to derivater 1,2,4-triazolalanin og 1,2,4-triazoleddikesyre i jord eller jordvand. Til gengæld har vi entydigt fundet baggrundskoncentrationer af 1,2,4-triazol omkring 0,01 µg/L i porevand under marker, som har været drevet økologisk i mindst 30 år. Forekomsten på landbrugslokaliteterne, men ikke på naturlokaliteterne, antyder ikke-naturlige kilder, selv på økologiske marker.

Det har ikke været muligt entydigt at lokalisere kilderne til 1,2,4-triazol på de tre landbrugs-lokaliteter. På areaerne med omdrift kunne noget 1,2,4-triazol stamme fra staldgødning, som indeholder ikke-økologisk halm. Dette ville dog næppe kunne forklare forekomsten på den våde eng (Sv2), som ikke har været i omdrift siden registreringerne startede i 1982 og hvor der ikke tilføres gødning udover den direkte tilførsel fra græssende kvæg. Kokasser indsamlet på marken viste faktisk et indhold af 1,2,4-triazoleddikesyre, men dets oprindelse og om det er tilstrækkeligt til at forklare koncentrationen af 1,2,4-triazol i jordvandet i 1 m dybde er uklart. På den våde eng (Sv2) er der sandsynligvis tale om en uidentificeret diffus kilde til triazol-moderstoffer, idet 1,2,4-triazoleddikesyre er et almindeligt nedbrydningsprodukt fra triazolfungicider i planter fx tebuconazol og epoxiconazol (PPDB). Atmosfærisk deposition af moderstoffer og muligvis 1,2,4-triazol forekommer sandsynligvis på alle lokaliteter, men pga. omdannelse i overjorden er det usikkert, om den atmosfæriske deposition bidrager med målbart 1,2,4-triazol i jordvandet. Desuden forekommer det usandsynligt med afdrift fra sprøjtning af konventionelle marker, da der er ca. 500 m fra den våde eng (Sv2) til nærmeste konventionelle mark. Triazol-bidrag fra grundvand eller overfladeafstrømning fra andre marker til Sv2 virker også usandsynligt, da den våde eng, trods beliggenheden i en lavning i landskabet, ikke oversvømmes fra bække, søer, åer eller grundvandsspejlet i området, idet grundvandsspejlet

ligger 10-14 meter under terræn. Man kan ikke generalisere ud fra uforklarede 1,2,4-triazolfund på én enkelt eng-lokalitet (Sv2). Skulle fugtige landbrugslokaliteter generelt have et naturligt 1,2,4-triazol-bidrag, vil det dog have ringe effekt på grundvandet, idet de fleste våde landbrugslokaliteter har ringe eller ingen grundvandsdannelse, da sådanne lokaliteter oftest ligger tæt på åer, søer eller fjorde, hvor grundvandsgradienten enten er opadrettet eller det dannede grundvand strømmer terrænnært mod recipienten.

Den observerede baggrundskoncentration omkring 0,01 µg/l på økologiske jorde i omdrift ligger ca. en faktor 2 til 5 lavere end den "baggrund", som er observeret på VAP-markerne og som gennem årene har været flittigt debatteret. Det er sandsynligt, at de diffuse, antropogene kilder i markjorde tilsammen indimellem kan give detekterbare 1,2,4-triazolkoncentrationer i jordvandet under nogle marker og dermed bidrage til observerede baggrundsniveauer af 1,2,4-triazol. Dette udelukker ikke et bidrag fra naturlig dannelse af 1,2,4-triazol på nogle marker, men der er dog intet, der tyder på, at en eventuel naturlig dannelse af 1,2,4-triazol skulle kunne forårsage koncentrationer i porevand (og dermed senere i grundvand), der overskrider kravværdien på 0,1 µg/l.

I den videnskabelige litteratur er der rapporteret dannelse af 1,2,4-triazolalanin i actinobakterien *Streptomyces* sp. KM-10329 (Imamura et al., 1985). Da 1,2,4-triazolalanin har en simpel triazol-gruppe vil stoffet sandsynligvis kunne hydrolyseres til 1,2,4-triazol i jordmiljøet. Vi ville gerne gentage forsøget, men stammen er ikke deponeret i nogen af de store internationale stammesamlinger (DSMZ, ATCC og JCM). Vi forsøgte derfor at kontakte artiklens forfattere, men Imamura-artiklen er fra 1985, dvs. fra før email blev udbredt, så i artiklen findes kun forfatterens postadresser. Søgning på alle forfatternavne på institutioners hjemmesider var uden hits. Efter 37 år vurderes det derfor formålsløst at prøve at kontakte forfatterne. Studiet er desværre af meget ringe videnskabelig kvalitet, idet der ikke indgik et negativt kontrolforsøg, til at dokumentere at 1,2,4-triazolalanin ikke i forvejen var til stede i vækemediet, dvs. et negativt kontrolforsøg uden bakterien. Det er derfor sandsynligt, at 1,2,4-triazolalanin kom fra det konventionelt dyrkede hvedeklid (800 g) eller soja (400 g), der blev brugt som vækstsustrat. 1,2,4-triazolalanin er nemlig et almindeligt nedbrydningsprodukt fra triazol-fungicider i planter. Artiklens resultaterne kan derfor ikke bruges til at demonstrere naturlig dannelse af 1,2,4-triazol.

I den videnskabelige litteratur kan vi kun finde ét entydigt eksempel på naturlig dannelse af 1,2,4-triazol-strukturen, nemlig stoffet essramycin fra aktinobakterien *Streptomyces* sp. Merv8102, hvor 1,2,4-triazol-strukturen er centralt indlejret i molekylet (El-Gendy et al., 2008). Vi ville gerne lave nedbrydnings- og udvaskningsforsøg med essramycin i landbrugsjord, men vi har ikke kunnet finde kommercielle kilder til essramycin. Denne stamme er heller ikke deponeret i nogen af de store stammesamlinger, corresponding authors email-adresse er ikke længere gyldig og vi har ikke kunnet lokalisere forfatterne. Vi har derfor ikke kunne teste om essramycin kan udvaske som 1,2,4-triazol.

I den videnskabelige litteratur har vi ikke kunnet finde generelle screeninger af mikroorganismer for dannelse af 1,2,4-triazol-holdige stoffer, hvilket også ville være svært i praksis, idet eventuelle triazol-stoffer sandsynligvis ikke har en simpel 1,2,4-triazol-sidegruppe, hvor fragmentet kan detekteres med HRMS, men nærmere må forventes at have triazolstrukturen indlejret i molekylet som set for essramycin. Teoretisk kan man derfor ikke udelukke, at essramycin eller nærtbeslægtede stoffer kan dannes af actinobakterier i landbrugsjord, men det vides ikke, hvorvidt det vil kunne ske i tilstrækkelig mængde til at forklare 1,2,4-triazol udvaskning, eller hvorvidt essramycin og lignende stoffer overhovedet nedbrydes til frit 1,2,4-triazol.

12.2 Hypotese II: 1,2,4-triazol-udvaskning fra bejdsemidler?

Vi lavede et laboratorieforsøg med jordkolonner for at afklare, om bejdset udsæd vil kunne bidrage til udvaskningen af 1,2,4-triazol. Forsøget viste at 1,2,4-triazol udvaskede i meget høje koncentrationer fra vårbyg bejdset med tebuconazol og prothioconazol. Forsøgsresultaterne kan ikke overføres direkte til markforhold, men de viser, at der er stor risiko for 1,2,4-triazol udvaskning fra bejdset udsæd, dvs. proof-of-concept for hypotesen om, at udsæd bejdset med triazolfungicider frigiver moderstoffer, der kan hydrolyseres til 1,2,4-triazol, der efterfølgende kan udvaskes. Vores forsøg og overslagsberegninger viser at vårbyg bejdset med disse stoffer sandsynligvis kortvarigt kan give 1,2,4-triazol-udvaskning fra pløjelaget i høje koncentrationer, men også at den årlige middeldkoncentration i vandet, der forlader rodzonen (nettonedbøren) fra byg bejdset med disse stoffer, sandsynligvis ligger

omkring 0,004–0,02 µg/l. Bejdsemidler med andre triazol-fungicider fx difenoconazol må forventes at have lignende effekt. Mængderne af triazol-fungicid er betydeligt mindre for bejdsede frø end for sprøjtningerne opgjort per hektar. Det kan derfor måske synes overraskende, at bejdsemidlet kunne give de høje koncentrationer, men det skyldes nok, at bejdsemidlerne jo placeres direkte i jordmiljøet sammenlignet med sprøjtemidler, hvor en stor del forsvinder fx ved optag i planternes grønne dele, fotonedbrydning og fordampning. Vi anbefaler derfor, at triazol-fungicider i bejdset udsæd bør medregnes, når den årlige, samlede markbelastning med triazol-fungicider beregnes. Bidrag fra bejdset udsæd er desuden en sandsynlig årsag til nogle af de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i drænvandet på VAP-marker. Mere overordnet viser vores resultater, at pesticidgodkendelsens modeller nok bør modificeres, så de bedre kan simulere udvaskning fra frøbejdsning, fx ved at stoffet i modellerne tilføres i så-dybde og uden tab til fotonedbrydning og fordampning.

12.3 Hypotese III: 1,2,4-triazol-udvaskning fra atypiske moderstoffer?

Søjleforsøg med bejdsede frø og rene moderstoffer viste, at 1,2,4-triazol kan udvaske uanset om tebuconazol eller prothioconazol bruges som frøbejdse. Svovl-atomet på prothioconazol-triazolringen forhindrede ikke omdannelse til frit 1,2,4-triazol, hvorfor sprøjtning med prothioconazol også vil kunne give 1,2,4-triazol-udvaskning. Sprøjtning og bejdsning med prothioconazol er derfor en sandsynlig årsag til nogle af de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i drænvandet på VAP-marker. Den molære fraktion af prothioconazol, udvasket som 1,2,4-triazol, synes dog at være noget lavere end for tebuconazol. Florasulam og pyroxsulam, der ikke har en simpel, triazol-gruppe, gav ikke udvaskning af 1,2,4-triazol i vores udvaskningsforsøg med jordsøjler. 1,2,4-triazolsulfonsyre blev påvist fra florasulam-søjler i koncentrationer op til 1,5 µg/l. 1,2,4-triazolsulfonsyre har en simpel triazol-gruppe svarende til triazol-fungiciderne, 1,2,4-triazolsulfonsyre vil derfor muligvis kunne spaltes til frit 1,2,4-triazol i dybere jordlag. Derudover var det et begrænset forsøg med kun to jordtyper, vi kan derfor ikke fuldstændig "frikende" stofferne på det foreliggende grundlag.

12.4 Hypotese IV: Moderstoffers akkumulering i pløjelaget.

Relativt høje koncentrationer blev påvist i VAP-markerne 5-19 år efter seneste sprøjtning, og omsætningen var i mange tilfælde ganske langsom, hvilket viser, at VAP-jordene indeholder en persistent fraktion af triazol-fungicider. En screeningsundersøgelse i 2018 viste, at 55 ud af 75 landbrugsjorde fra Centraleuropa indeholdt målbare triazol-fungicider (Hvězdová et al. 2018). En senere screening af 317 landbrugsjorde fra EU (Silva et al., 2019) viste, at triazol-fungicider kunne påvises i en stor del af jordene, hvor epoxiconazol blev påvist i 24% af jordene i koncentrationer >10 µg/kg, tebuconazol i 12%, prothioconazol i 7%, difenoconazol og propiconazol i 3%, cyproconazol i 2% og penconazol i 1%. Resultaterne fra VAP-markerne stemmer derfor godt overens med de få undersøgelser i den videnskabelige litteratur. På SETAC-konferencen i 2018 præsenterede Bayer data fra et 1,2,4-triazol-feltforsøg, hvor ¹³C-mærket tebuconazol blev tilført marker, som ikke var sprøjtet med triazol-fungicider i mindst tre år (Blank et al., 2018). Efterfølgende kunne der påvises ¹³C-tebuconazol, men ikke ¹²C-tebuconazol, og både ¹³C-1,2,4-triazol og ¹²C-1,2,4-triazol. Det blev konkluderet, at det påviste ¹²C-1,2,4-triazol ikke stammede fra landbrugsfungicider, men fra andre kilder. Vores resultater fra VAP-markerne og de øvrige undersøgelser i den videnskabelige litteratur viser, at der sandsynligvis var tale om ¹²C-1,2,4-triazol fra akkumuleret triazol-fungicid anvendt mere end tre år tidligere på markerne.

De ældede triazolstoffer var så hårdt bundet i VAP-jordene, at vi ikke kunne måle aged sorption, idet koncentrationen i CaCl₂ ekstrakterne var under detektionsgrænsen. HPCD-ekstraktion af den biotilgængelige fraktion viste, at der er to forskellige hovedfraktioner, en biotilgængelig løst-bundet fraktion, der er i diffusiv kontakt med vandfasen og kan ekstraheres ved kompleksering med HPCD, og en ikke-tilgængelig fraktion som ikke kunne udveksles med vandfasen under HPCD-ekstraktionen og hvis nedbrydning er meget langsom. Nedbrydningskinetik i jorden følger derfor ikke simpel 1. ordens kinetik, men flader med tiden ud på et lavt niveau med meget langsom nedbrydning. Dette ses fx efter sprøjtning med metconazol. Når triazol-fungiciderne er naturligt ældede i pløjelaget over en årrække er den biotilgængelige fraktion ganske lille og nedbrydningen tilsvarende langsom. Konceptuelt er det sandsynligt, at forskellene i nogen grad skyldes forskellig binding i jorden fx binding til to forskellige fraktioner af organisk stof med meget forskellig desorptionskinetik. For hydrofobe stoffer i jord opfattes det ofte som binding til henholdsvis blødt organisk stof, det traditionelle "soil organic matter" som indeholder humus, lignin og andre polymerer, og binding til mere krystallinsk organisk kulstof med stort indhold af sod og kerogen. Konceptuelt

vil det kunne opfattes som dobbelt første-ordens nedbrydning. Det er uafklaret, om det er netop disse to fraktioner, der er styrende for triazolfungiciders nedbrydning, sorption, akkumulering og ældning i VAP-jordene.

Prothioconazol-desthio blev desuden påvist i Estrup-marken, der så vidt vides ikke har været sprøjtet med prothioconazol. Tilstedeværelse af prothioconazol-desthio i pløjelaget på denne mark skyldes derfor sandsynligvis akkumulering efter gentagen såning af prothioconazol-bejdsset udsæd. Det persistente bidrag fra prothioconazol er dog sandsynligvis lavt, idet koncentrationerne i Estrup-marken var lav, og idet vi ikke kunne måle øget indhold efter sprøjtning af markerne i Lund og Fårdrup.

I et supplerende laboratorieforsøg undersøgte vi fem triazol-fungiciders nedbrydning og ældning i tre økologiske jorde under kontrollerede betingelser. De fem triazol-fungicider udviste aged sorption i de tre jorde med stigende sorptionskoefficient i løbet af de første ca. 100 dage. Samtidig steg den ikke-biotilgængelige koncentration.

12.5 Konklusion

Resultaterne fra feltforsøget og laboratorieforsøget kan forklare de ældede triazolfungiciders akkumulering og persistens i VAP-markerne længe efter sprøjtning. Efter sprøjtning vil det meste triazol-fungicid sandsynligvis nedbrydes i overjorden, men en fraktion kan bindes meget hårdt i pløjelaget med meget lav biotilgængelighed og kan derfor ophobes efter gentagne sprøjtninger. Langsom, men kontinuert nedbrydning af det ældede triazol-fungicid kan forklare "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand på VAP-marker, hvor der ikke for nyligt er sprøjtet med moderstofferne. Denne effekt skal lægges til udvaskning af 1,2,4-triazol fra bejdsset udsæd, bidraget fra moderstoffernes atmosfæriske deposition, diffuse bidrag fra halm i husdyrgødning og muligvis også et lille bidrag fra naturlig dannelse. Samlet set er det derfor ikke overraskende, at der var et forholdsvist højt indhold af 1,2,4-triazol i dræn- og grundvand under VAP-markerne inden sprøjtning med specifikke triazol-fungicider.

13. Referencer

- Albers CN, Bollmann UE, Badawi N, Johnsen AR. 2022. Leaching of 1,2,4-triazole from commercial barley seeds coated with tebuconazole and prothioconazole, *Chemosphere* 286: 131819. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131819>
- Allen IJ, Semple KT, Hare R, Reid BJ. 2006. Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction. *Environmental Pollution* 144:562-71. DOI:10.1016/j.envpol.2006.01.026
- Anastassiades M, Kolberg DI, Eichhorn E, Benkenstein A, Wachtler A-K, Zechmann S, Mack D, Wildgrube C, Barth A, Sigalov I, Görlich S, Dörk D, Cerchia G. 2019. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS Involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method) I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method). Version 10. EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM), Fellbach, Germany
- Badawi N, Rosenbom AE, Jensen AMD, Sørensen SR. 2016. Degradation and sorption of the fungicide tebuconazole in soils from golf greens. *Environmental Pollution* 219: 368-378.
- Badawi N, Karan S, Haarder EB, Rosenbom AE, Gudmundsson L, Hansen CH, Nielsen CB, Plauborg F, Kørup K, Olsen P (2022) The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme - Monitoring results May 1999–June 2020. Geological Survey of Denmark and Greenland, Copenhagen, Denmark
- Beigel C, Barriuso E, Di Pietro L. 1997; Time dependency of Triticonazole Fungicide Sorption and Consequences for Diffusion in Soil. *Journal of Environmental Quality* 26: 1503-1510. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600060008x>
- Beulke S, van Beinum W, Suddaby L. 2015. Interpretation of aged sorption studies for pesticides and their use in European Union regulatory leaching assessments. *Integrated Environmental Assessment and Management* 11: 276-286. <https://doi.org/10.1002/ieam.1607>
- Blank, M., 2017; 1,2,4-triazol - pathway and footprint in the environment, Presentation from Bayer AG, Monheim, Germany
- Blank, M, Borchers H, Chapple SC, Naeb O, Heinemann O, Roulier S. 2018. The triazole story: Differentiation between different 1,2,4-Triazole sources using a ¹³C stable isotope labelled azole-fungicide. Proceedings of SETAC Europe 28th Annual Meeting, 13 – 17 May 2018. Brussels, Belgium: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Blondel A, Krings B, Ducat N, Pigeon O. 2018. Validation of an analytical method for 1,2,4-triazole in soil using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry and monitoring of propiconazole degradation in a batch study. *Journal of Chromatography A* 1562:123-127.
- Boesten JJTI. 2017. Effects of aged sorption on pesticide leaching to groundwater simulated with PEARL. *Science of the Total Environment* 576: 498-507. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.099>
- Bollmann UE, Badawi N. 2020. A fast and simple SPE-LC-MS/MS procedure for extraction and quantitative analysis of 1,2,4-triazole, N,N-dimethylsulfamide, and other small polar organic compounds in groundwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412: 5683–5693. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02788-1>
- Bollmann UE, Fernández-Calviño D, Brandt KK, Storgaard MS, Sanderson H, Bester K. 2017. Biocide Runoff from Building Material: Degradation Kinetics in Soil. *Environ. Sci. Technol.*, 51:3694–3702
- Börjesson E., Stenström J, Johnsson L, Torstensson L. 2003. Comparison of triticonazole dissipation after seed or soil treatment. *J. Environ. Qual.* 32: 1258–1261. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1258>

Bosma TNP, Middeldorp PJM, Schraa G, Zender AJB. 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environ Sci Technol* 31, 248-252.

Brüsch W, Rosenbom AE, Badawi N, Gudmundsson L, Hansen CH, von Platten-Hallermund F, Nielsen CB, Plauborg F, Olsen P. 2016. Varslingssystemet for udvaskning af pesticider til grundvand. Monitoringsresultater juli 2012-juni 2014. De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland.

Čadková E, Komárek M, Kaliszová R, Koudelková V, Dvořák J, Vaněk A. 2012. Sorption of tebuconazole onto selected soil minerals and humic acids. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 47: 336–342. DOI: 10.1080/03601234.2012.640918

Charnay M-P, Verge C, Barriuso E. 2000. Influence of soil type and water content on release of triticonazole from coated maize seed. *Pest Manag Sci* 56: 249–256. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200003\)56:3<249::AID-PS135>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200003)56:3<249::AID-PS135>3.0.CO;2-0).

Cornelissen G, Kkulska Z, Kalaitzidis S, Christanis K, Gusafsson Ö. 2004a. Relations between Environmental Black Carbon Sorption and Geochemical Sorbent Characteristics. *Environ Sci Technol* 38, 3632-3640

Cornelissen G, Elmquist M, Growth I, Gusafsson Ö. 2004b). Effect of Sorbate Planarity on Environmental Black Carbon Sorption. *Environ Sci Technol* 38: 3574-3580

Cornelissen G, Gustafsson Ö, Bucheli TD, Jonker MTO, Koelmans AA, van Noort PCM. 2005. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ Sci Technol* 39, 18, 6881–6895. doi: 10.1021/es050191b

COWI. 2011. Potential sources of 1,2,4-triazole in Danish groundwater, Technical note - Final, 06.03.2019.

Cox et al., 1998; Changes in Sorption of Imidacloprid with Incubation Time, *Soil Science Society of America Journal* 62: 342-347. <https://doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200020008x>

Cuyper C, Pancras T, Grotenhuis T, Rulkens W. 2002. The estimation of PAH-bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46: 1235-1245

Doick KJ, Dew NM, Semple KT. 2005. Linking catabolism to cyclodextrin extractability: determination of the microbial availability of PAHs in soil. *Environ Sci Technol* 39: 8858-8864

Doick KJ, Clasper PJ, Urmann K, Semple KT. 2006. Further validation of the HPCD-technique for the evaluation of PAH microbial availability in soil. *Environmental Pollution* 144: 345-354. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.054

EFSA (European Food Safety Authority). 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prothioconazole. *EFSA Scientific Report* 106: 1-98. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.106r>

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyroxsulam. *EFSA Journal* 2013;11:3182. doi:10.2903/j.efsa.2013.3182

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance epoxiconazole. *EFSA Scientific Report* (2008) 138, 1 -80

EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. *EFSA Journal* 2014;12(1):3485, 98 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3485.

El Azhari N, Dermou E, Barnard RL, Storck V, Tournai M, Beguet J, Karas PA, Lucini L, Rouard N, Botteri L, Ferrari F, Trevisan M, Karpouzas DG, Martin-Laurent F. 2018. The dissipation and microbial ecotoxicity of tebuconazole and its transformation products in soil under standard laboratory and simulated winter conditions. *Science of the Total Environment* 637–638 (2018) 892–906.

El-Gendy, M.M.A., Shaaban, M., Shaaban, K.A., 2008; Essramycin: A First Triazolopyrimidine Antibiotic Isolated from Nature. *J. Antibiot.* 61: 149–157.

Ellermann T, Bossi R, Nygaard J, Christensen J, Løfstrøm P, Monies C, Grundahl L, Geels C, Nielsen IE, Poulsen MB. 2018. Atmosfærisk deposition 2017. Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 304

Ellermann T, Bossi R, Nygaard J, Christensen J, Løfstrøm P, Monies C, Geels C, Nielsen IE, Poulsen MB. 2019. Atmosfærisk deposition 2018. Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 351

Ellermann T, Bossi R, Nygaard J, Christensen J, Løfstrøm P, Monies C, Geels C, Poulsen MB. 2020. Atmosfærisk deposition 2019. Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 415.

Ellermann T, Bossi R, Sørensen MOB, Christensen J, Løfstrøm P, Lansø AS, Monies C, Geels C, Poulsen MB. 2021. Atmosfærisk deposition 2020. Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 471.

EU. 2006. DIRECTIVE 2006/118/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration (Groundwater directive). Official Journal of the European Union L 372:19-31.

EU. 2018. Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2018/1865 af 28. november 2018 om ikke at forny godkendelsen af aktivstoffet propiconazol, jf. Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1107/2009 om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler, og om ændring af Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) nr. 540/2011 (EØS-relevant tekst.)

EU. 2021. Guidance on how aged sorption studies for pesticides should be conducted, analysed and used in regulatory assessments. EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY. REV 1, 22 October 2021

FOCUS. 2014. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, version 2.0.

Freitag T. 2013. Analytical method 01364 for the determination of 1,2,4-triazole in soil by HPLC-MS/MS. BayerCropScience, Monheim am Rhein, Germany.

Gulkowska A, Buerge IJ, Poiger T, Kasteel R. 2016. Time-dependent sorption of two novel fungicides in soils within a regulatory framework. *Pest Management Science* 72: 2218-2230. <https://doi.org/10.1002/ps.4256>

Harms H, Bosma TNP. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Indust. Microbiol* 18:97-105.

Hedges A., 2009: Cyclodextrins: Properties and Applications, in: Starch (3rd edition), chapter 22, pages 833-851. Wiley.

Heinemann, O., 2013; Background Abundance of 1H-1,2,4-Triazole in Selected German Forest Soils- Final Report -, Report: EnSa-12-0516, Bayer Cropscience AG, Monheim, Germany.

Hvězďová M, Kosubová P, Košíková M, et al., (2018). Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Science of the Total Environment* 613-614: 361-370.

Imamura, N., Murata, M., Yaot, T., Oiwa, R., Tanaka H., Vmura, S. et al., 1985; Occurrence of 1,2,4-triazole ring in actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, vXXXVIII no81 p1110-1111.

- Johnsen AR, Wick LY, Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 133: 71-84.
- Johnsen, AR, de Liphay JR, Reichenberg F, Sørensen SJ, Andersen O, Christensen P, Binderup M-L, Jacobsen CS. 2006. Biodegradation, bioaccessibility and genotoxicity of diffuse polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollution at a motorway site. *Environmental Science and Technology* 40:3293-3298.
- Johnsen AR, Albers CN, Rosenbom AE, Ernstsens V, Haarder EB. 2020. Sorberende pesticiders mobilisering, tilbageholdelse og transport i makroporer (TRANSPORER). Bekæmpelsesmiddelforskning nr. 187, Miljøstyrelsen.
- Jackson R, Ghosh D, Paterson G. 2000. The soil degradation of the herbicide florasulam. *Pest Management Science* 56:1065-1072.
- Kiefer K, Müller A, Singer H, Hollender J. 2019. New relevant pesticide transformation products in groundwater detected using target and suspect screening for agricultural and urban micropollutants with LC-HRMS. *Water Research* 165: 114972.
- Landbrugsavisen. 26/11, 2014. Gyllemiddel hæmmer kvælstof. <https://landbrugsavisen.dk/maskiner/gyllemiddel-h%C3%A6mmer-kv%C3%A6lstof>
- Landbrugsstyrelsen. 2022. Vejledning om økologisk jordbrugsproduktion 2022. Økologisk kvæghold.
- Lehmann RG, Miller JR, Laskowski DA. 1990. Fate of fluroxypyr in soil. *Weed Research* 30: 383-388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1990.tb01725.x>
- Lopez-Montero E, Rosa dos Santos J-F, Torres-Labandeira JJ, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. 2009. Sertaconazole-loaded cyclodextrin-polysaccharide hydrogels as antifungal devices. *The Open Drug Delivery Journal* 3:1-9.
- Luthy RG, Aiken GR, Brusseau ML, Cunningham SG, Gschwend PM, Pignatello JJ, Reinhard M, Traina SJ, Weber WJ, Westall JC. 1997. Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environmental Science and Technology* 31: 3341-3347.
- Man Y, Stenrød M, Wu C, Almvik M, Holten R, Clarke JL, Yuan S, Wu X, Xu J, Dong F, Zheng Y, Liu X. 2021 Degradation of difenoconazole in water and soil: Kinetics, degradation path-ways, transformation products identification and ecotoxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials* 418: 126303.
- Miljøministeriet. 2022. BEK nr 1187 af 17/08/2022. Bekendtgørelse om brug af kemiske stoffer og blandinger i bekæmpelsesmidler.
- Miljøstyrelsen, 2017. Pesticider og biocider, salgstal 1956-2014. Miljøstyrelsen 14. december 2017.
- Miljøstyrelsen, 2022. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2020. Behandlingshyppighed og pesticidbelastning baseret på salg og forbrug. Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 54.
- Motoki Y, Iwafune T, Seike N, Inao K, Otani T. 2016. Effect of Time-Dependent Sorption on the Dissipation of Water-Extractable Pesticides in Soils. *J Agric Food Chem* 64 :4478–4486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01028>
- OECD (2000), Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069602-en>.
- Oi, 1999; Time-Dependent Sorption of Imidacloprid in Two Different Soils. *J Agric Food Chem* 47: 327–332.
- Papadopoulos A, Paton GI, Reid BJ, Semple KT. 2007. Prediction of PAH biodegradation in field contaminated soils using a cyclodextrin extraction technique. *J Environ Monit* 9:516-522. DOI: 10.1039/b700720e.

Pignatello og Xing, 1996; Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science and Technology* 30: 1-11.

PPDB, Pesticides Properties Database. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>

Reichenberg F, Mayer P (2006) Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ Toxicol Chem* 25: 1239-1245.

Reid BJ, Stokes JD, Jones KC, Semple KT. 2000a. Nonexhaustive dextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH-bioavailability. *Environ Sci Technol* 34: 3174-3179

Reid BJ, Jones KC, Semple KT. 2000b. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ Pollut* 108: 103-112.

Shah, P.V., Tasheva, M., 2008; Triazole fungicide metabolites (1,2,4-triazole; triazole alanine; triazole acetic acid), Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 2008, 437–490.

Schermerhorn PG, Golden PE, Krynitsky AJ, Leimkuehler WM. 2005. Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 88 (5):1491-1502.

Scheurer M, Brauch H-J, Schmidt CK, Sacher F. 2016. Occurrence and fate of nitrification and urease inhibitors in the aquatic environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18 (8):999-1010.

Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J. 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48: 2097–2098.

Silva V, Mol HGJ, Zomer P, Tienstra M, Ritsema CJ, Geissen V. 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>

Smalling KL, Hladik ML, Sanders CJ, Kuivila KM. 2018. Leaching and sorption of neonicotinoid insecticides and fungicides from seed coatings. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 53, 176–183. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1405619>

Stokes JD, Wilkinson A, Reid BJ, Jones KC, Semple KT. 2005. Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an aqueous hydroxypropyl- β -cyclodextrin extraction technique. *Environ Toxicol Chem* 24: 1325-1330.

Suddaby LA, Beulke S, van Beinum W, Oliver RG, Kuet S, Brown CD. 2016. Long-term experiments to investigate irreversibility in sorption of pesticides to soil. *Chemosphere* 162: 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.062>

Thorlin, L, Ditlefsen C, Ernstsén V, Hansen B, Johnsen AR, Trolborg L, Albers CN. 2021. Grundvand. Status og udvikling 1989-2019. Teknisk rapport, GEUS 2020.

VSDB: Veterinary Substances DataBase. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.htm>

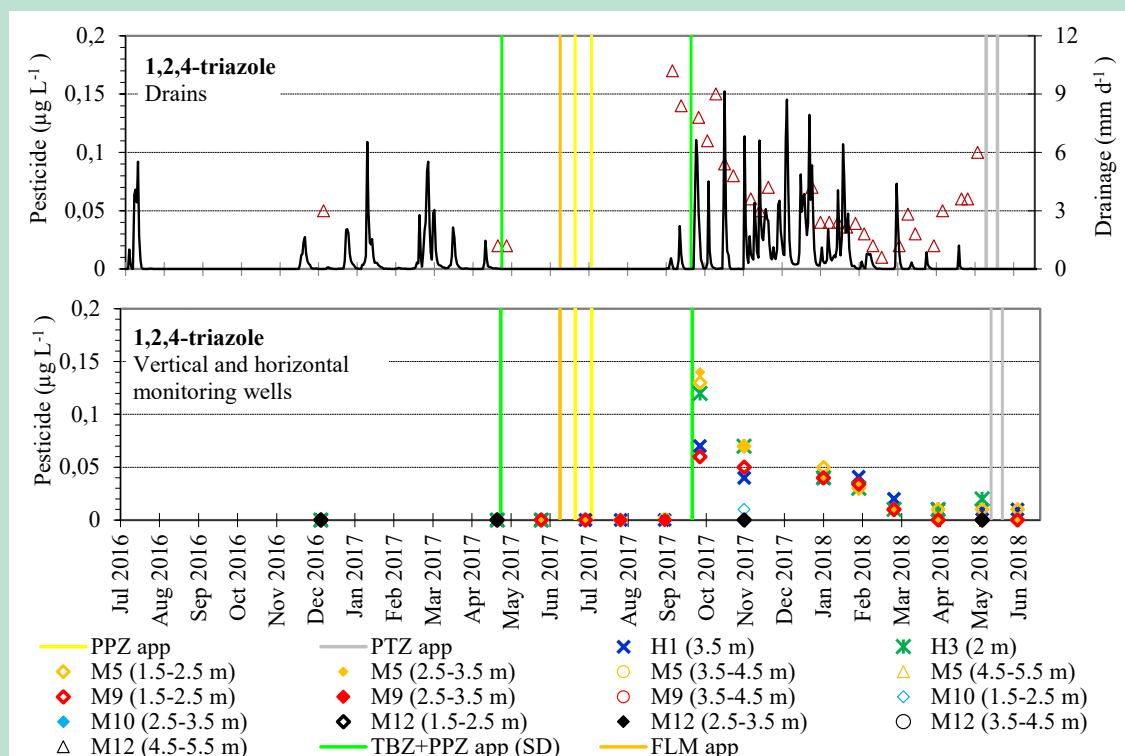
Volkerling F, Breure AM, Sterkenburg A., van Andel JG. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 548e552.

Volkerling F, Breure A., van Andel JG. 1993. Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl Microbiol Biotechnol* 40:535-540.

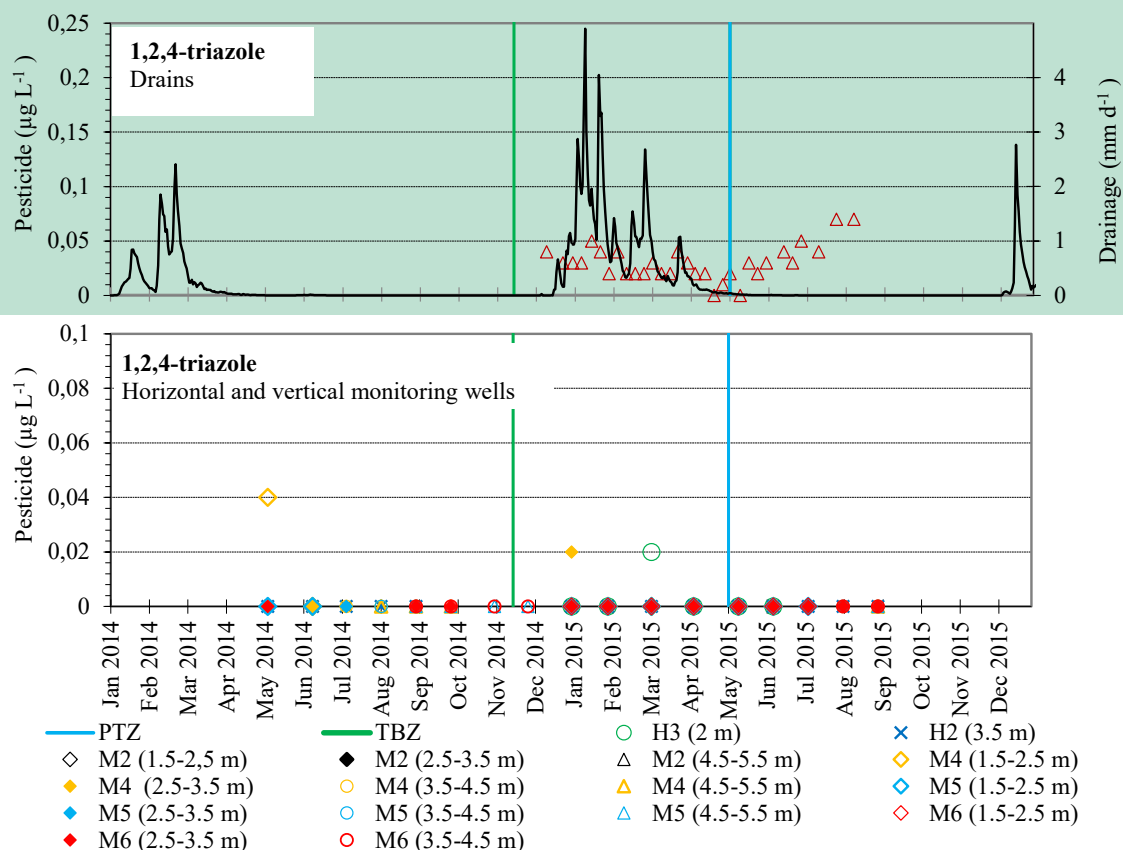
Wettstein et al., 2016. Leaching of the Neonicotinoids Thiamethoxam and Imidacloprid from Sugar Beet Seed Dressings to Sub-surface Tile Drains. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02619>

Yang C, Li R, Song Y, Chen K, Li S, Jiang J. 2011. Identification of the Biochemical Degradation Pathway of Triazophos and its Intermediate in *Diaphorobacter* sp. TPD-1. *Curr Microbiol* 62:1294–1301. DOI 10.1007/s00284-010-9859-z

Bilag 1. Udvaskning af 1,2,4-triazol inden sprøjtning i VAP

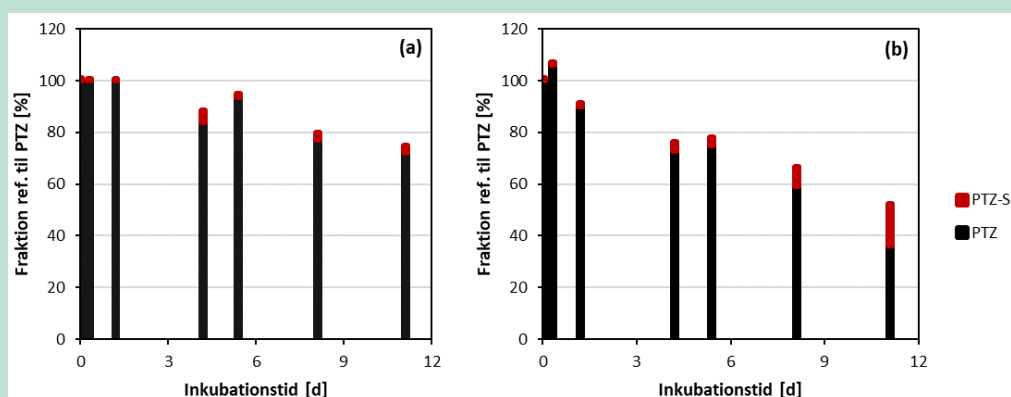


FIGUR B1.1. Silstrup. Udvaskning af 1,2,4-triazol inden første sprøjtning på Pesticidvarslingsprogrammets mark i Silstrup. Figuren er en bearbejdet version af figurer i de årlige rapporter fra Pesticidvarslingsprogrammet (VAP).

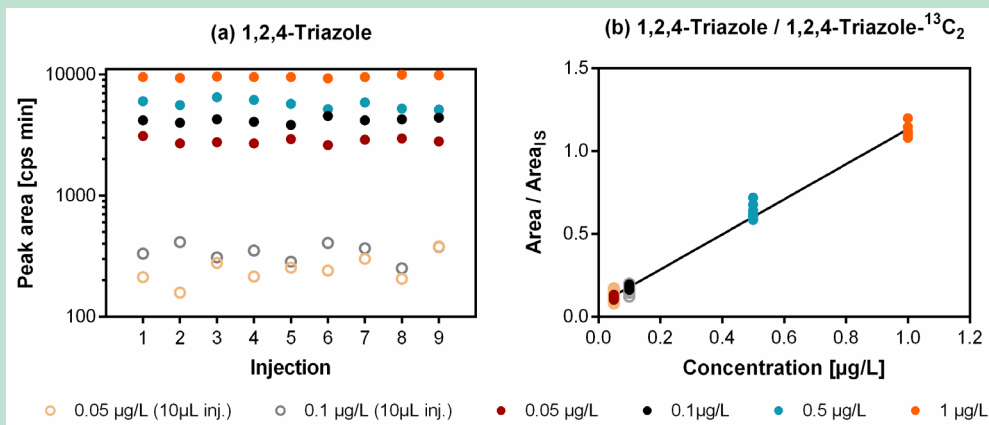


FIGUR B1.2.. Fårdrup. Udvaskning af 1,2,4-triazol inden første sprøjtning på Pesticidvarslingsprogrammets mark i Fårdrup. Figuren er en bearbejdet version af figurer i de årlige rapporter fra Pesticidvarslingsprogrammet (VAP).

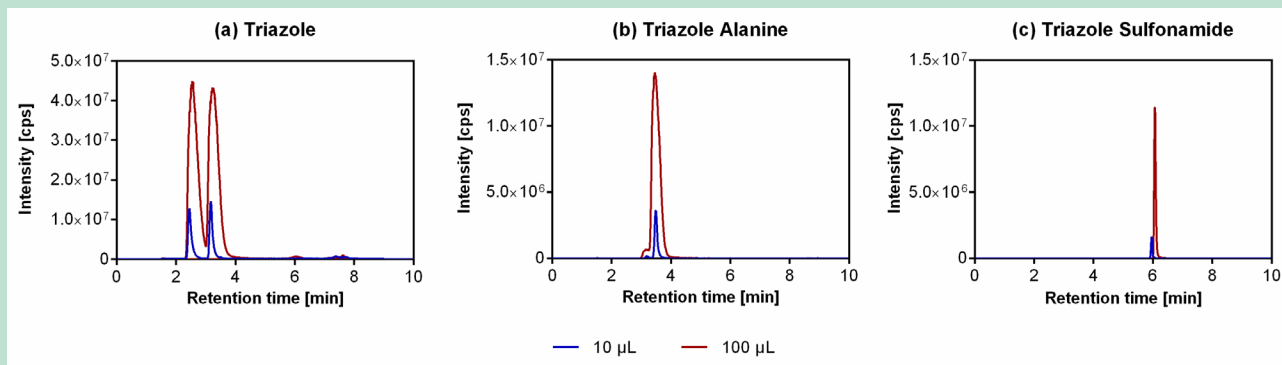
Bilag 2. Udvikling, implementering og validering af metoder til ekstraktion og kvantificering af 1,2,4-triazol og moderstoffer



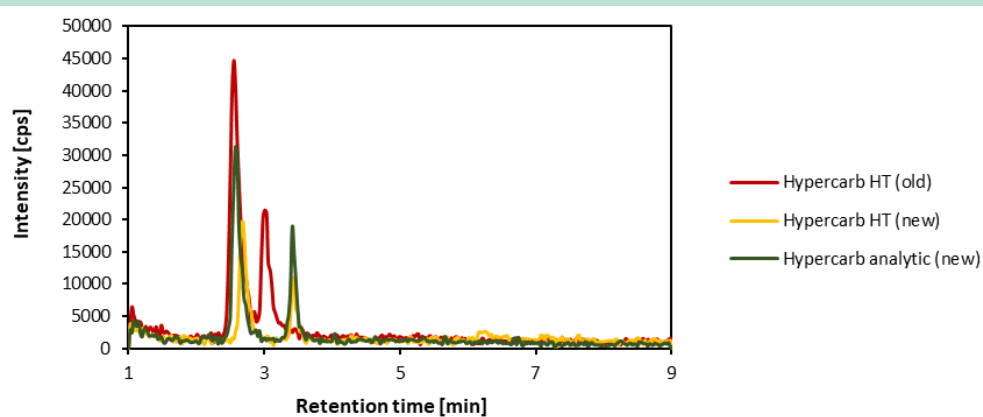
FIGUR B 2.1.58. Stabilitet af prothioconazol i filtreret drønvand (10% MeOH) ved (a) 4°C og (b) 20°C.



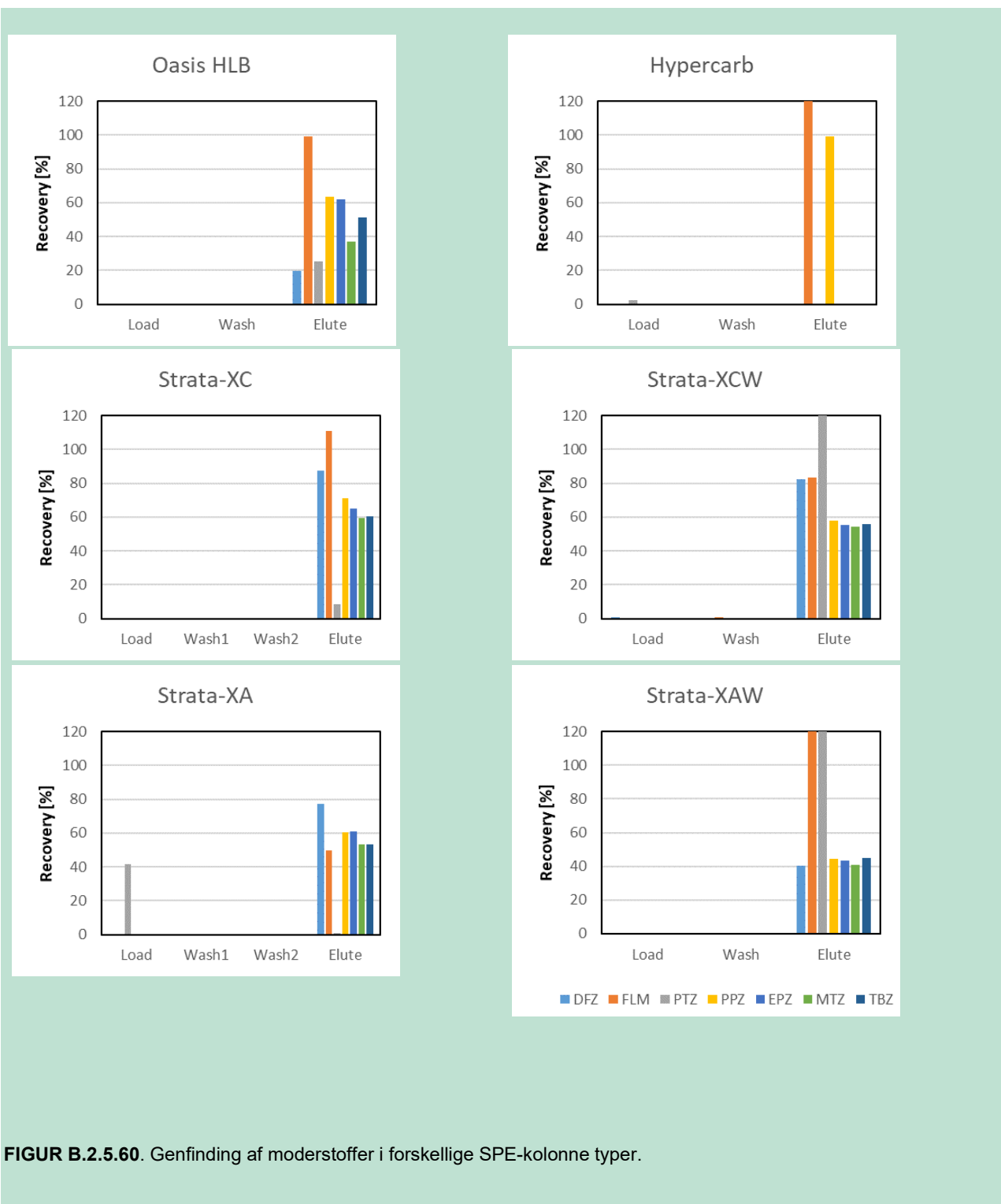
FIGUR B 2.259. (a) Reproducerbarhed af den analytiske metode til analyse af 1,2,4-triazol og lignende nedbrydningsprodukter og (b) intern standard korrigerede kalibreringskurve i drønvand (n=9, spiked drønvand; 100 µl injektionsvolumen, dog 10 µl ved åbne cirkler; baggrunds niveau af 1,2,4-triazole i drønvand: 0,07 µg/l).



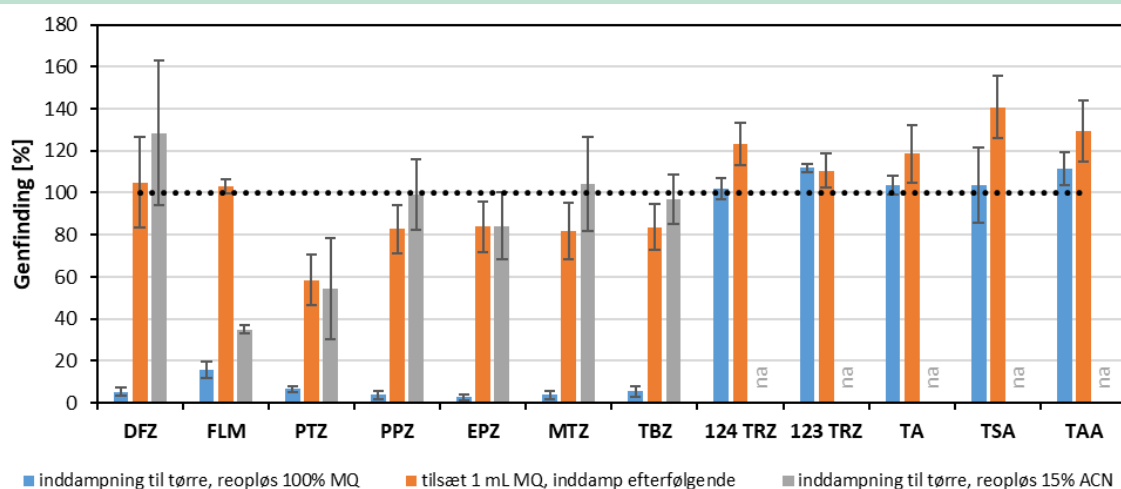
FIGUR B2.3..Sammenligning af kromatografien ved en injektionsvolumen hhv. 10 µl (blå) og 100 µl (rød).



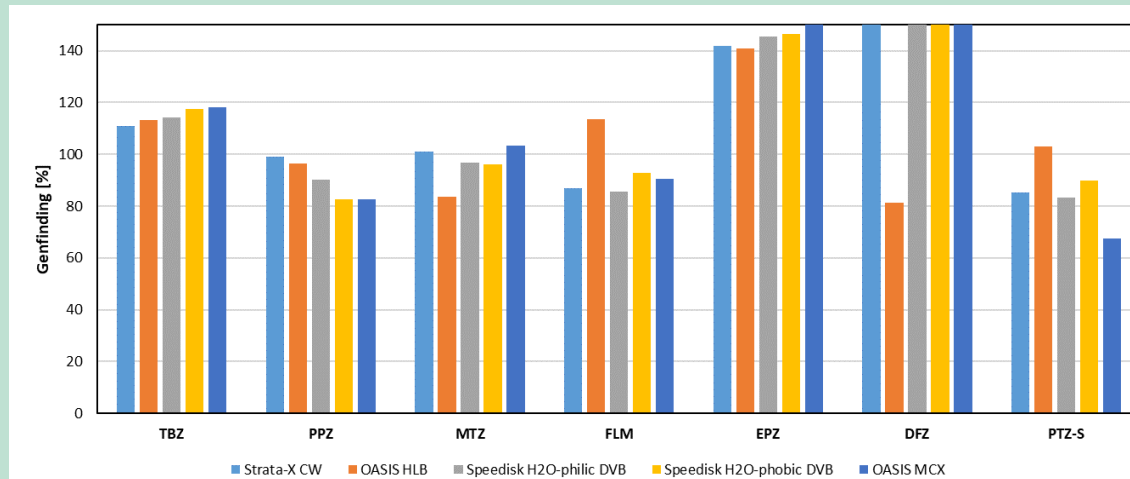
FIGUR B.2.4.. Sammenligning af separeringseffektivitet og topform af 1,2,4-triazol og 1,2,3-triazol (kvant.-ion: 70 => 42) på forskellige Hypercarb kolonner: Hypercarb HT, brugt for omkring et år (old) og ny, samt en ny Hypercarb analytic.



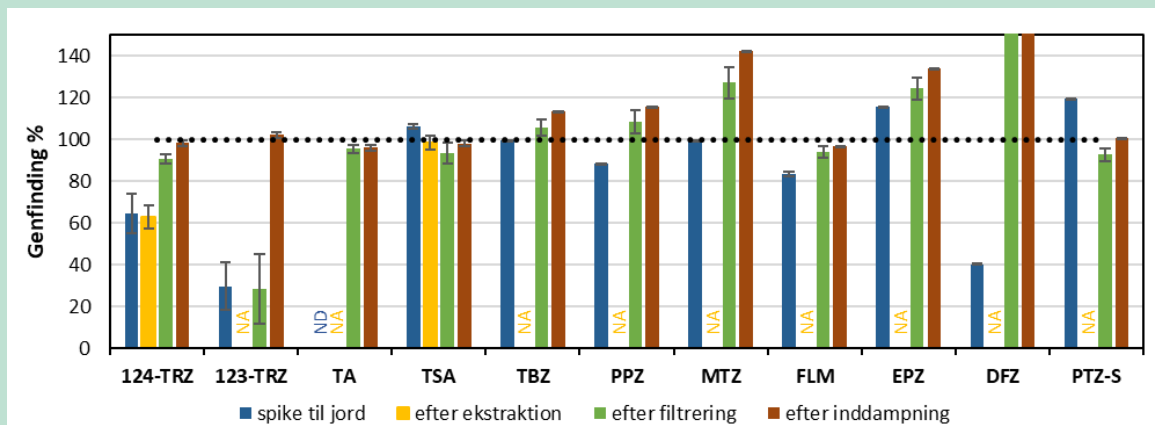
FIGUR B.2.5.60. Genfindning af moderstoffer i forskellige SPE-kolonne typer.



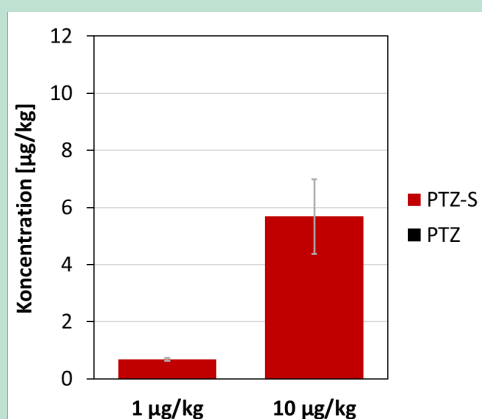
FIGUR B.2.6. Genfinding ved opløsningsmiddelskift fra MeOH til vand (inddampning med N₂ ved 30°C, n=3, 30 µg/l); na: ikke analyseret



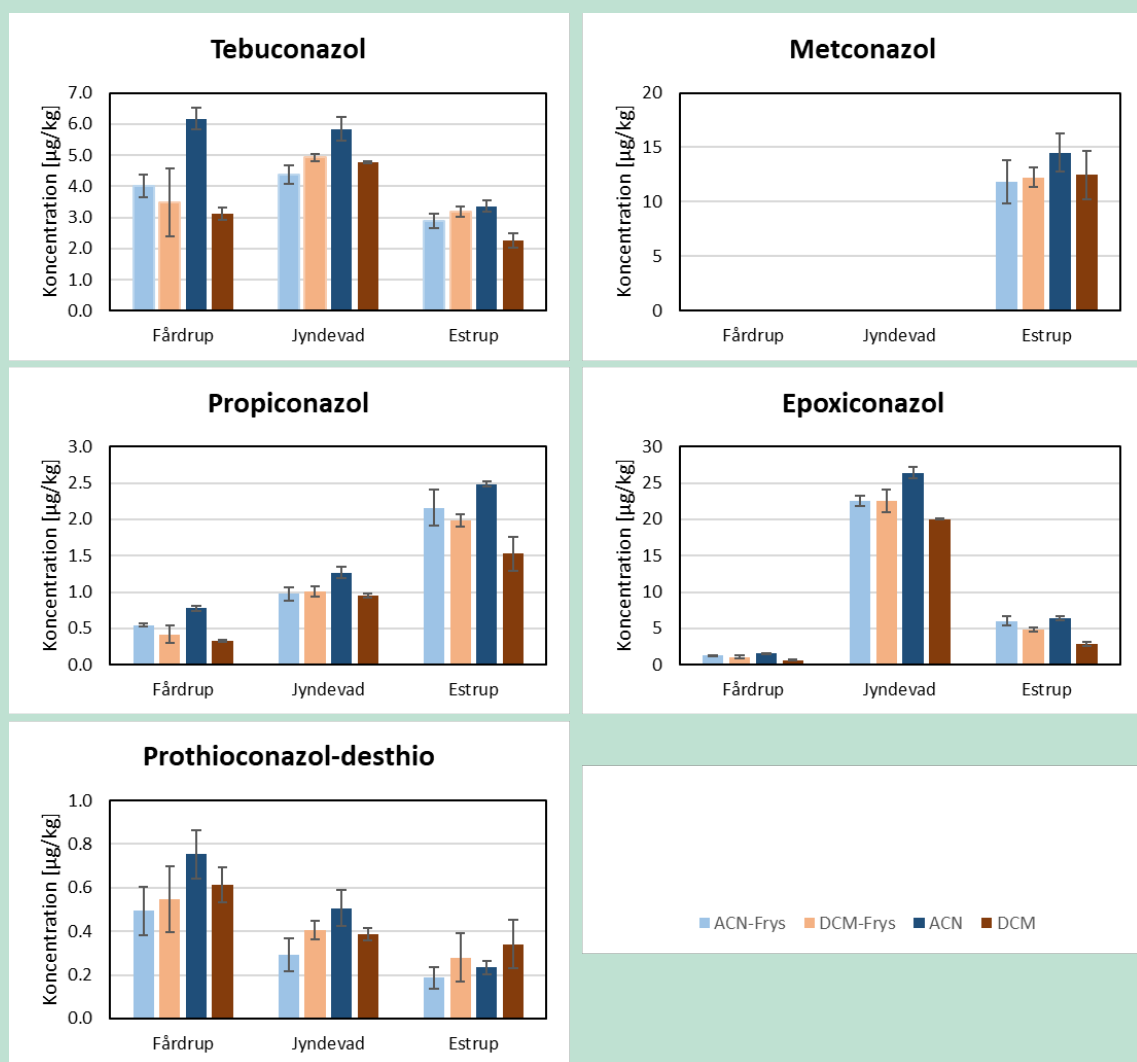
FIGUR B.2.7. Genfinding af moderstoffer – forskellige polymerbaserede SPE-kolonner (n=2).



FIGUR B.2.8. Tab af stofferne i ekstraktionsforløb. Tilsætning skete ved starten, til ekstraktet, efter filtrering og efter inddampning (n=3); NA: ikke analyseret, ND: Ikke påvist.

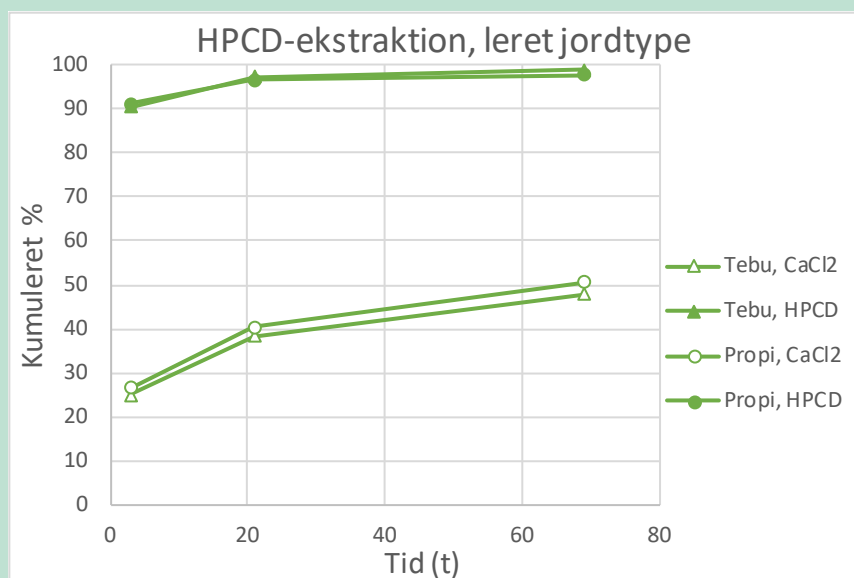


FIGUR B.2.9. Ekstraktion af prothioconazol fra jord, tilsætning af hhv. 1 µg/kg og 10 µg/kg, og analyse af ekstraktet for både moderstof og prothioconazol-desthio (n=5).



FIGUR B.2.10. Effekt af frysetørring på ekstraktion af jord. Jordprøverne blev udrystet med acetonitril eller dichlormethan (n=3).

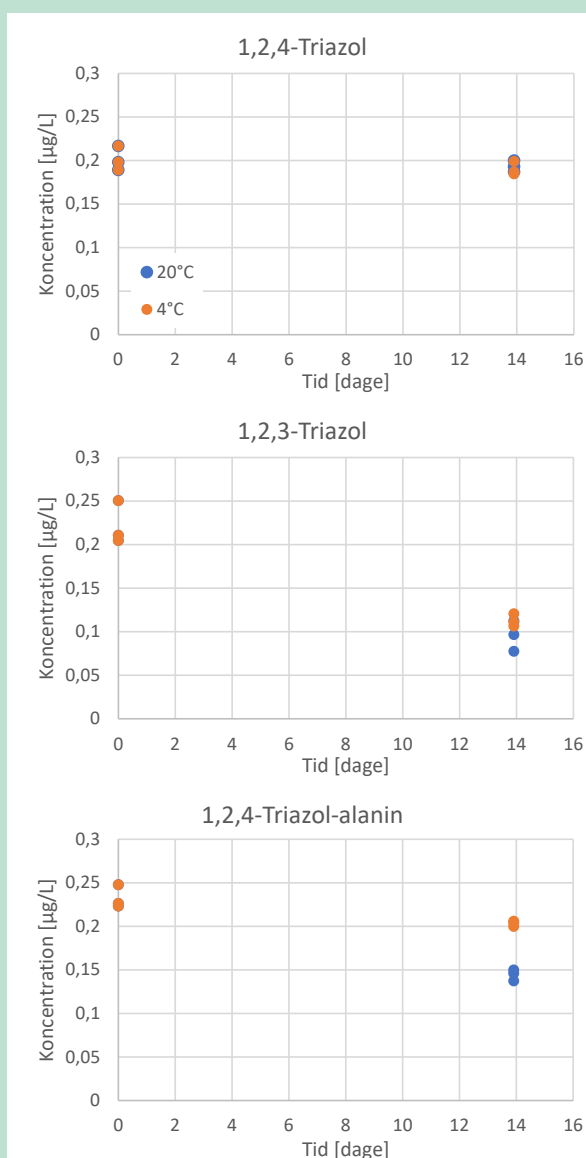
Bilag 3. HPCD-genfinding af friskt tilsat ^{14}C -tebuconazol



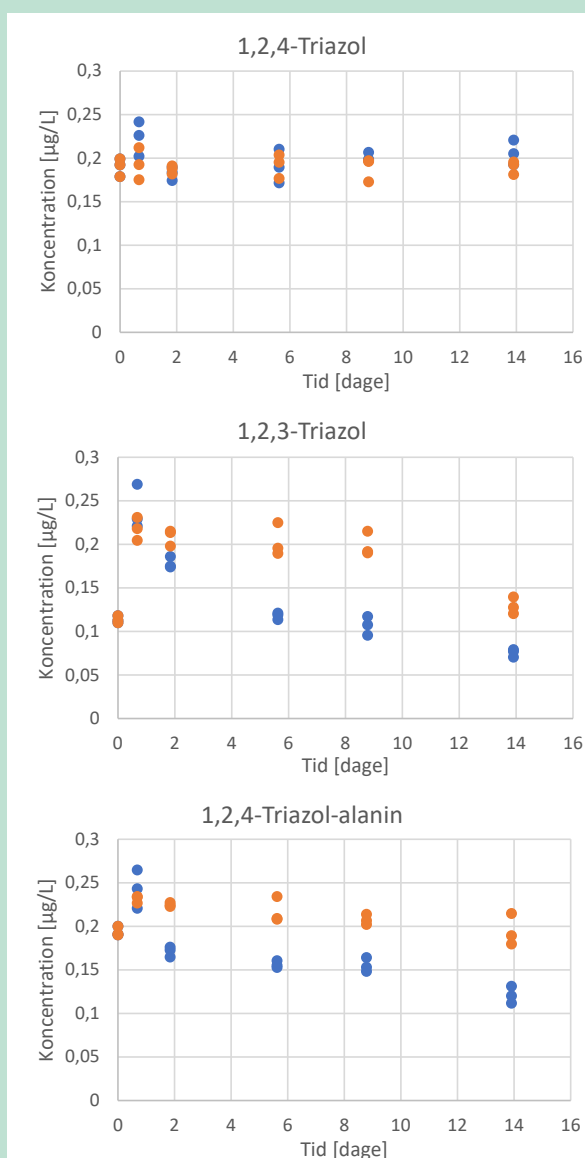
FIGUR B.3. Ekstraktion af friskt tilsat tebuconazol og propiconazol (100 µg/kg) med henholdsvis CaCl₂ og CaCl₂+HPCD i økologisk lerjord. Middel af duplikate prøver

Bilag 4. Test for triazolmeta-bolitters stabilitet i vandig opløsning i milli-Q-vand og sugecellevand.

Milli-Q-vand



Sugecellevand



Bilag 5. Kemisk karakteri-sering af sugecelle-vand

Chlorid, nitrat, sulfat og opløst organisk stof (DOC) i sugecellevand fra de syv lokaliteter udtaget den 22/3-2022.

Sugecelle	Dato	Cl ⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	DOC (mg/l)
Sv1-1	22-03-2021	20,6	93,7	19,7	10,6
Sv1-2	22-03-2021	18,6	13,7	8,25	6,22
Sv1-3	22-03-2021	14,8	4,4	12,3	6,08
Sv2-1	22-03-2021	13,8	32,9	33,5	31,6
Sv2-2	22-03-2021	21,3	31,9	41,8	23,8
Sv2-3	22-03-2021	21,1	28,5	34,9	21,3
Sv3-1	22-03-2021	3,99	27,1	64,6	4,19
Sv3-2	22-03-2021	5,77	39,7	57,4	3,98
Sv3-3	22-03-2021	8,90	35,4	57,3	5,28
Sv4-1	22-03-2021	11,5	21,6	10,9	3,35
Sv4-2	22-03-2021	12,5	22,5	9,34	11,3
Sv4-3	22-03-2021	12,2	16,2	8,79	9,69
Sv5-1	-	-	-	-	-
Sv5-2	22-03-2021	36,3	16,8	17,6	34,1
Sv5-3	22-03-2021	35,5	3,75	20,5	23,8
TH-1	22-03-2021	61,9	<0,05	8,83	3,28
TH-2	22-03-2021	147	<0,05	97,4	37,9
TH-3	22-03-2021	71	<0,05	13,3	3,25
TH-4	22-03-2021	2,97	<0,05	1,79	20,3
AP-1	22-03-2021	3,79	<0,05	2,89	18,9
AP-2	22-03-2021	6,70	<0,05	4,17	16,5
AP-3	22-03-2021	8,05	<0,05	4,07	21,2

Bilag 6. Aanalyseret mængde sugecelle vand på forskellige prøve-tagningsdage

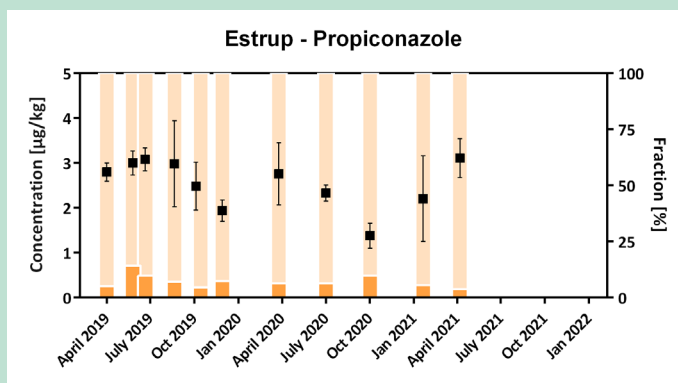
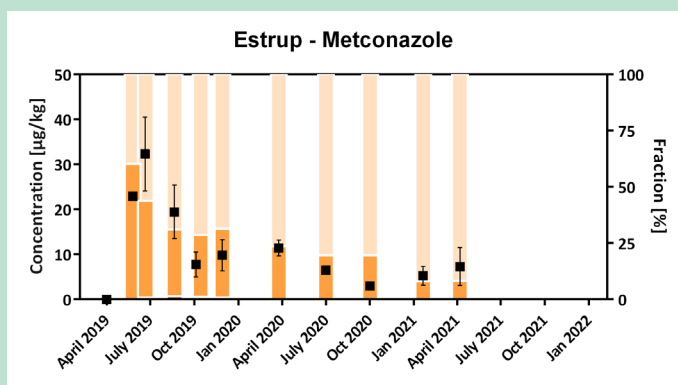
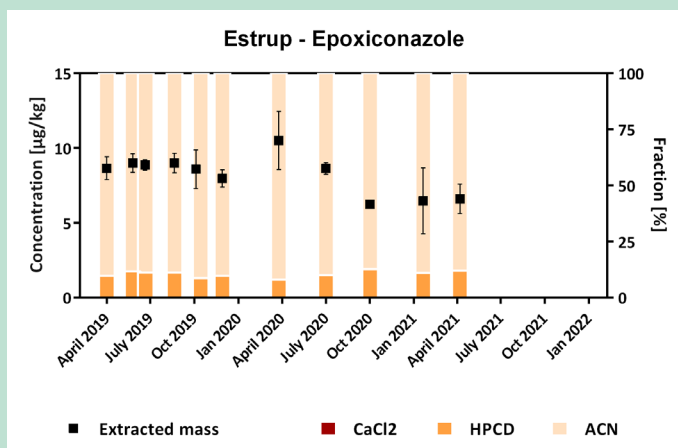
Prøvetagningsdage med analyseret prøvemængde (ml) for de enkelte sugeceller. Tomme felter angiver, at det var umuligt at suge vand ud af jorden på det pågældende tidspunkt.

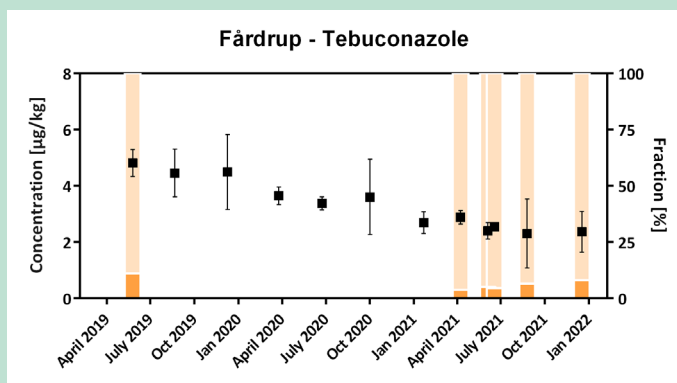
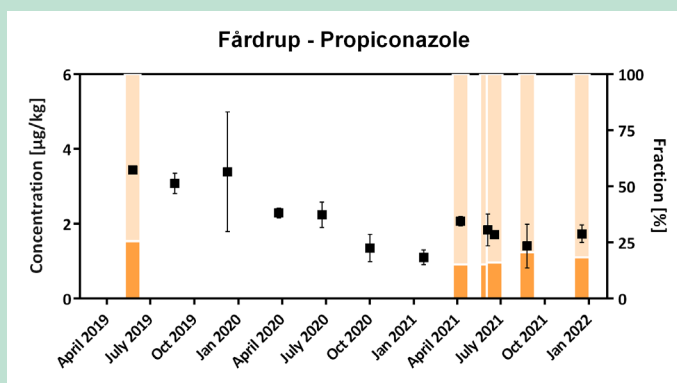
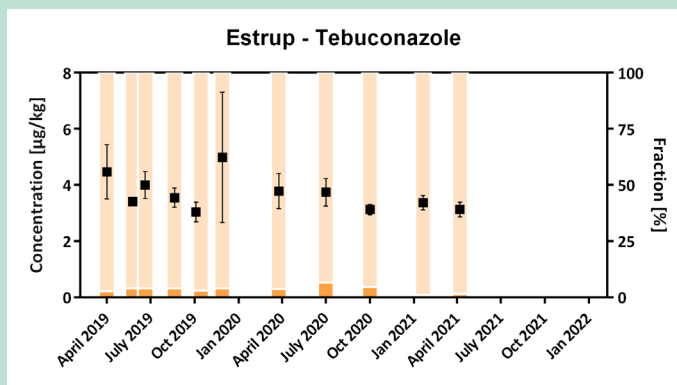
Sugecelle	03/11/2020	27/01/2021	22/03/2021	01/06/2021	14/09-2021	14/12-2021
Sv1-1	100	100	100	100	10*	100
Sv1-2	100	100	100	100	12*	100
Sv1-3	100	100	100	100		100
Sv2-1	100	100	100	100	100	100
Sv2-2	100	100	100	100	100	100
Sv2-3	100	100	100	100	100	100
Sv3-1	10	100	76	100		45
Sv3-2		100	81	80		100
Sv3-3		100	98	80		85
Sv4-1	100	100		100	100	100
Sv4-2	100	100	100	100	100	100
Sv4-3	100	100	100	100	100	100
Sv5-1		100		50		
Sv5-2	10*	100	100	100		
Sv5-3		100	100	100		
TH-1	20	100	100	100	35	100
TH-2		100	100	100		
TH-3	15*	100	100	100	100	100
TH-4		100	100	100	76	100
AP-1	100	100	100	100	100	100
AP-2	100	100	100	100	100	100
AP-3	100	100	100	100	100	100

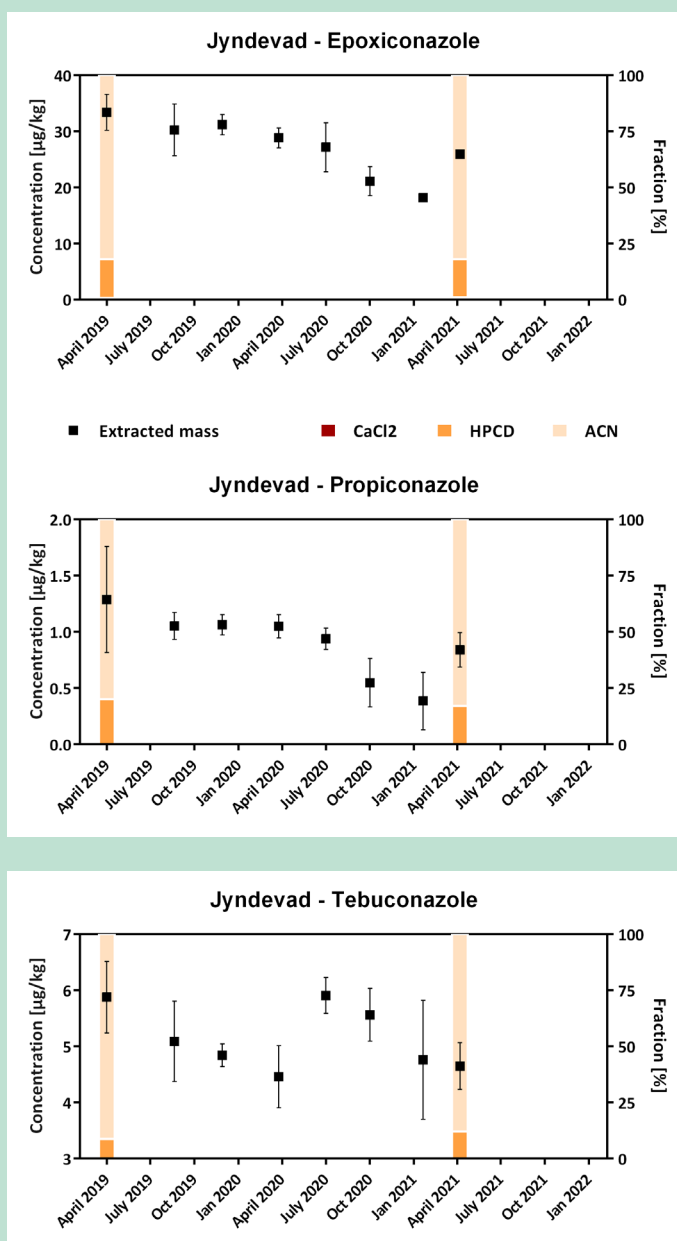
*1,2,4-triazol ikke detekteret, men data anvendes ikke i rapporten, da detektionsgrænsen er kraftigt forhøjet ved volumen <20 ml.

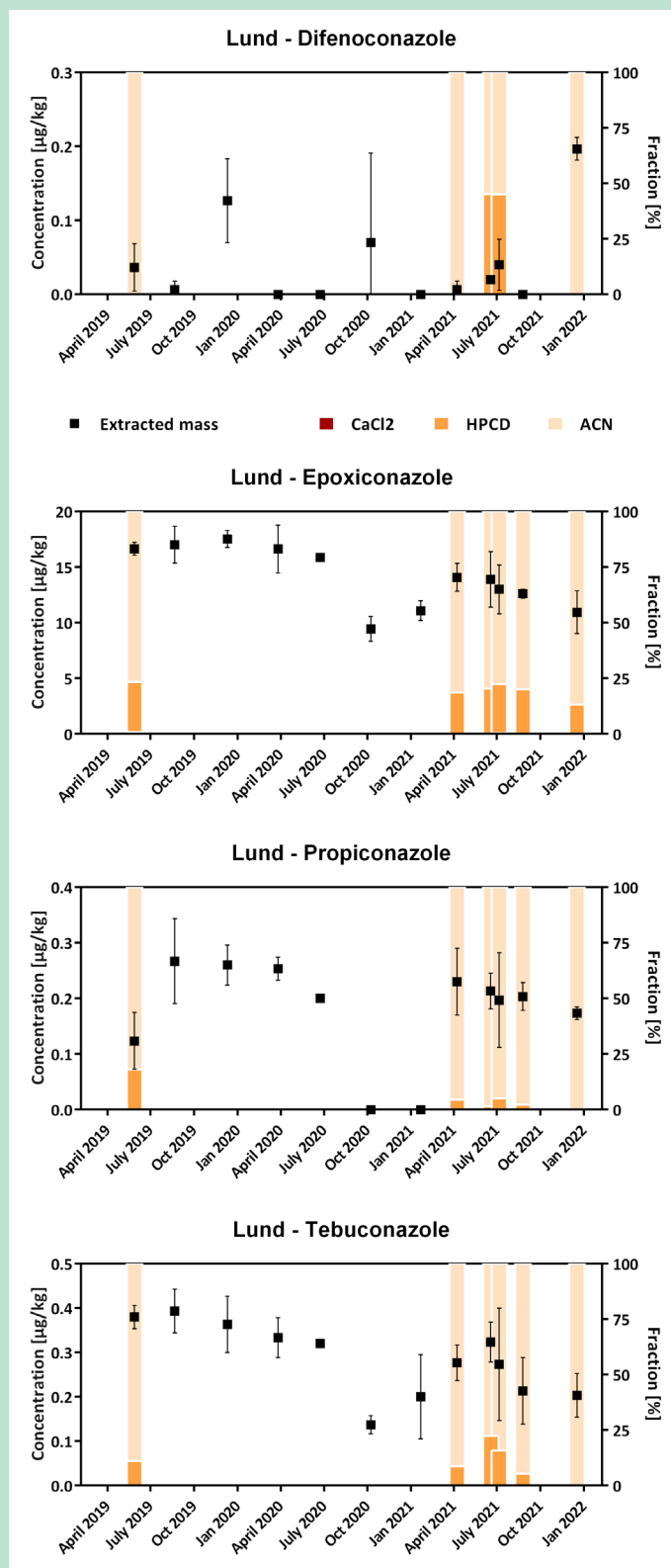
Bilag 7. Triazol-fungiciders ældning i pløjelaget

Tidslige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for triazol-moderstoffer i VAP-markerne samt procentvis fordeling på CaCl_2 -ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN).



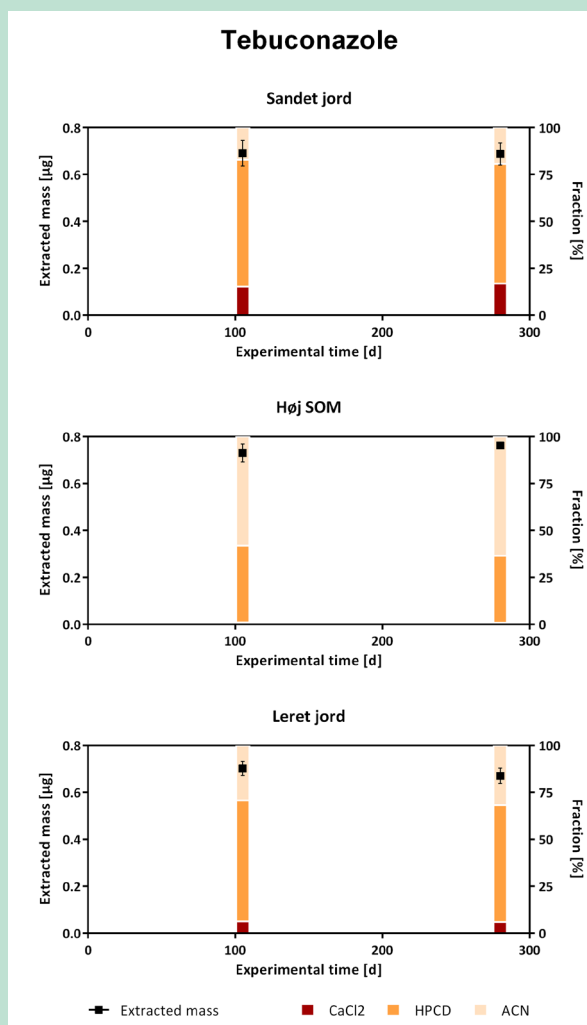
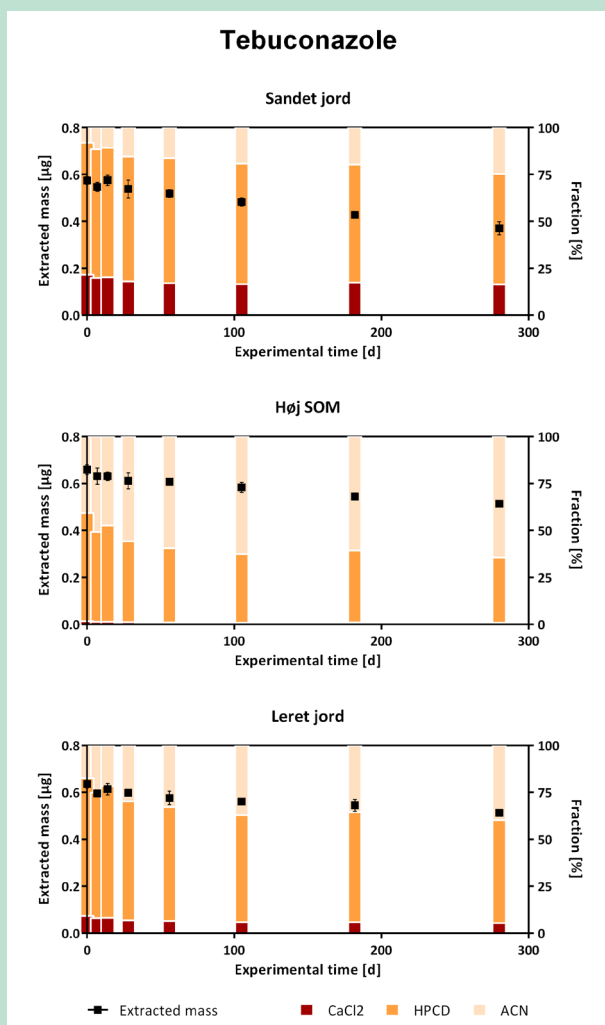




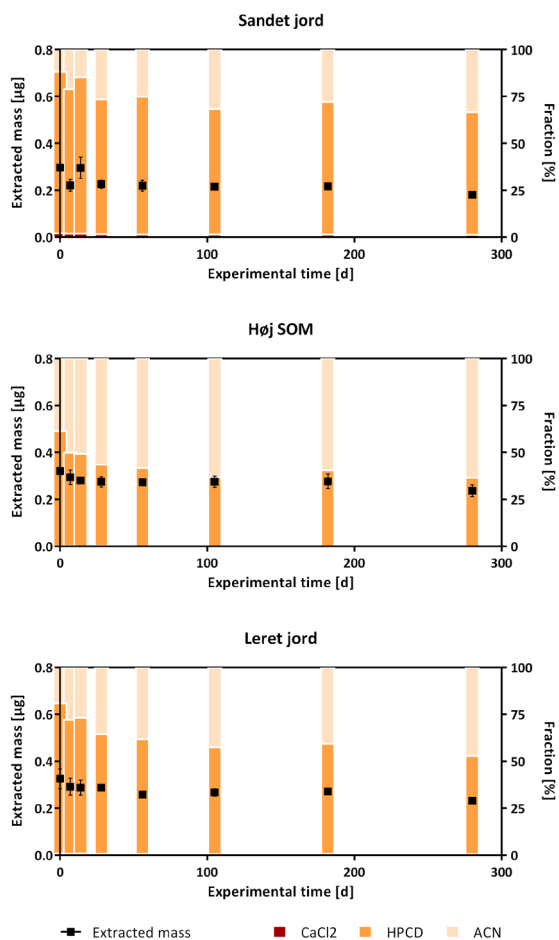


Bilag 8. Tebuconazols, difenoconazols og metconazols ned-brydning og aging i laboratorieforsøg

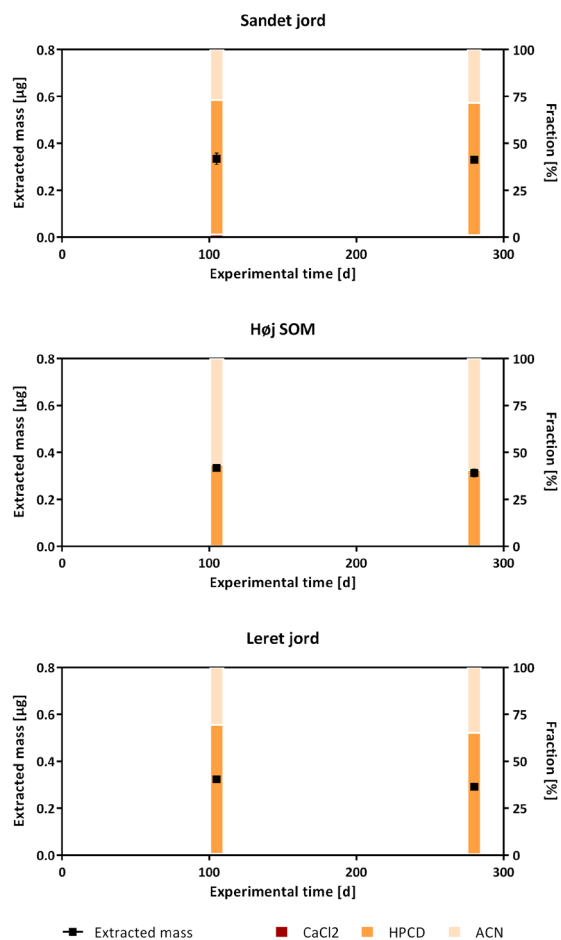
Tidslige ændringer i samlet koncentration (extracted mass) for tebuconazol, difenoconazol og metconazol i laboratorieinkubationer samt procentvis fordeling på CaCl_2 -ekstraheret, biotilgængeligt over tid (HPCD) og ikke-biotilgængeligt (ACN) i tre forskellige jordtyper. Høj SOM: jord med højt indhold af organisk stof. Figurene til højre viser resultater for autoklavede kontroller.



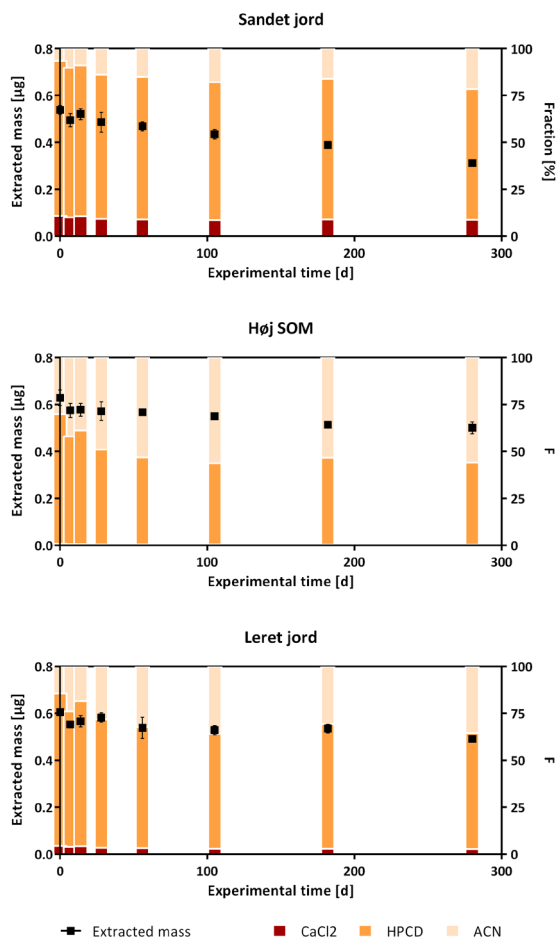
Difenoconazole



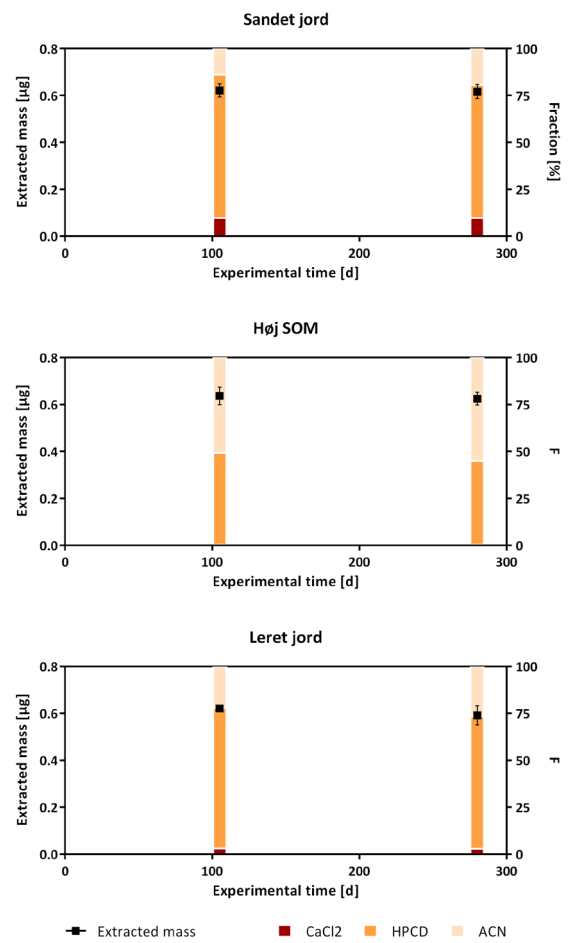
Difenoconazole



Metconazole

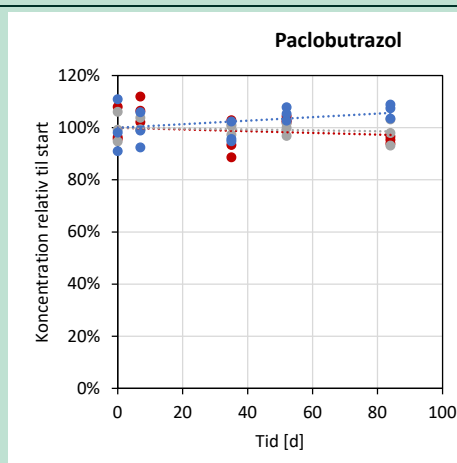
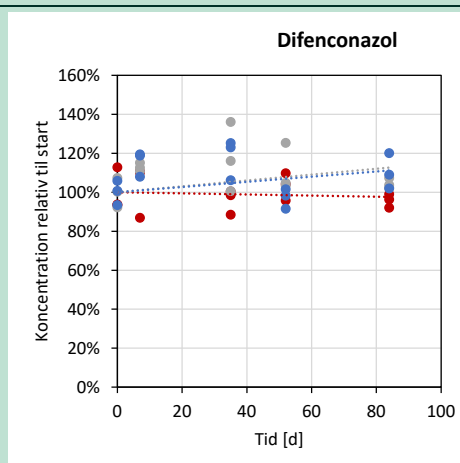
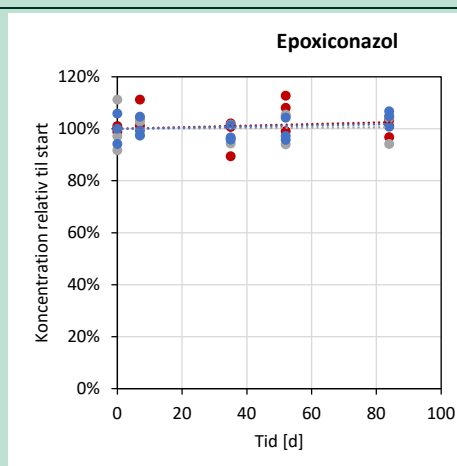
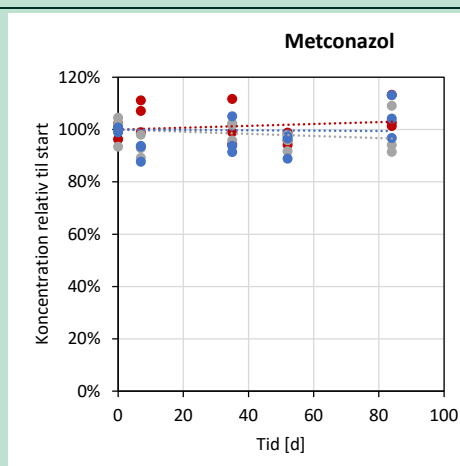
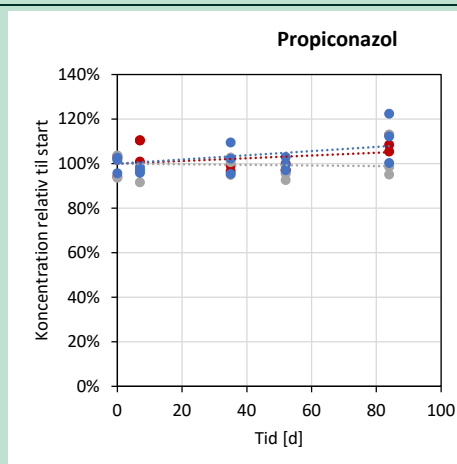
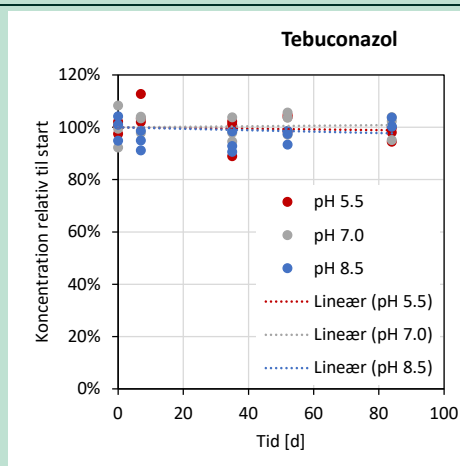


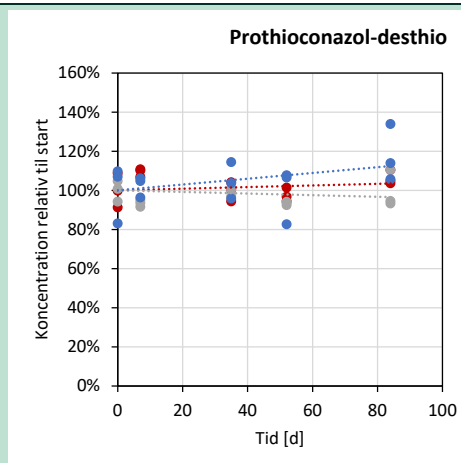
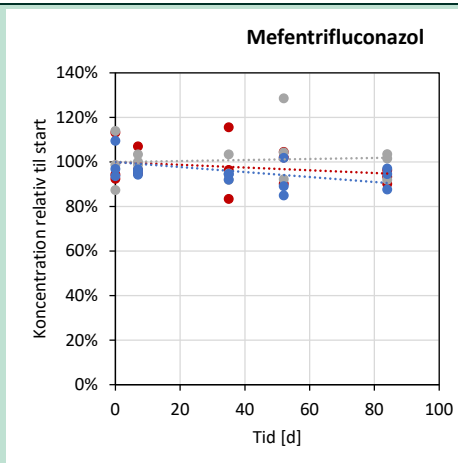
Metconazole



Bilag 9. Vandig hydrolyse

Test for vandig hydrolyse af triazol-moderstoffer ved forskellige pH i fosfatbuffer.





Bilag 10. Laboratorieforsøg til bestemmelse af triazolmoder-stoffernes aging: Sammenligning af forsøgsbetingelserne og anbefalinger i guidelines

Sammenligning af forsøgsbetingelserne i laboratorieforsøget og anbefalinger i guidelines som beskrevet af FOCUS (2014) i Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, version 2.0, APPENDIX 1: EXISTING GUIDANCE ON EXPERIMENTAL LABORATORY DEGRADATION STUDIES.

	SETAC	OECD	US-EPA	TRIAFUNG
Soil				
Number	1 plus 3 for degradation rate(s)	1 plus 3 for degradation rate(s)	At least 1	3
Property requirements	Agricultural soil, approximately 2-5 % OM, pH 5.5-7.5, 10-25% clay	Representative sandy loam, silt loam, loam or loamy sand (FAO, USDA classification), pH 5.5-8.0, OC 0.5-2.5% and microbial mass of at least 1% of total organic carbon (OECD, 1995)	Representative sandy loam or silt loam	Økologisk landbrugsjord OM: 3,0%; 4,4%; 15,7% pH 5,50-6,15. sandjord, lerjord og lavbundsjord med højt indhold af organisk stof
Characterisation requirements	Texture, pH, % organic matter, cation exchange capacity, water holding capacity, microbial activity e.g. biomass	Texture, pH, % organic matter, cation exchange capacity, water retention characteristic, bulk density, microbial activity/ biomass (e.g. substrate-induced respiration)	General soil characteristics	Textur, pH, organisk stof,
Origin	Agricultural soil	Representative soil	Field representative for compound use	Økologisk landbrugsjord.
Sampling	Freshly sampled	Freshly sampled	Not specified	Friskt indsamlet.
Storage	ISO 10381-6 (1993)	ISO 10381-6 (1993)	Not specified	Opbevaret ved 5 °C
Previous exposure	No adverse effects on soil micro-organisms	No treatment with a.s. or structural analogs within previous 4 years	Not specified	Ingen eksponering i de foregående +30 år.
Application				

Test system	Sufficient air exchange, must allow measurement of volatile components	Flow-through or biometer	Flow-through or biometer	Centrifugerør med ilt-permeabel membran i boks med vandmættet atmosfære.
Application rate	Maximum label rate, sufficient for metabolite identification	Maximum label rate, sufficient for metabolite identification, no unrealistic suppression of soil micro-organisms	Sufficient for following parent decline and metabolite identification	Tilstrækkelig høj koncentration til at kunne kvantificere aged sorption (faldende Kd).
Test substance	Preferably ¹⁴ C radio-labelled	Preferably ¹⁴ C radio-labelled	Preferably ¹⁴ C radio-labelled	Ikke-mærkede moderstofer.
Allowed vehicle	Water, acetone	As solid, water, acetone, organic solvents, may not suppress soil micro-organisms	Not specified	Vand
Incubation conditions				
Duration	Until pattern of decline of a.s. and formation and decline of degradation products established, should not exceed 120 days, may last 6-12 months, however decrease of soil micro-organism activity after 4 month should be accounted for in interpretation of results	Should not exceed 120 days, may last 6-12 months with additional biomass measurement at end of study	1 year or when pattern of decline of a.s. and formation and decline of degradation products are established, whatever comes first	Inkubation I op til 280 dage. Ingen måling af ændringer i biomasse.
Temperature	20 ± 2°C, experiment at 10° or 30°C or calculation	20 ± 2°C, 10 ± 2°C for use in cold climates	18-30°C	10 ± 2°
Soil moisture	40-50% of maximum water holding capacity	pF 2.0-2-5	75% of 1/3 bar	
Light regime	dark	dark	dark	Mørke
Sampling				
Minimum sampling dates	Minimum of 8, for non-linear analysis more	Minimum of 6	Minimum of 12	8
Number of replicates	Single	Two	Sufficient samples to allow interpretable results	3
Measurements				
Soil microbial activity	At start of study	At start of study using e.g. SIR	Not specified	Ikke målt.
Mass balance	Yes, between 90-110% of applied mass for ¹⁴ C-labelled test substance, 70-110% for non-labelled test substance.	Yes, between 90-110% of applied mass	Yes	Ja

Extraction methods	Exhaustive extraction			Must allow rate, type and degree of metabolism of the a.s. and its major degradates	Sekventiel ekstraktion med CaCl ₂ , HPCD og acetonitril.
Analysis and metabolite identification	Analysis of a.s. and identification of metabolites >10% AR, attempt to characterise metabolites approaching 10% AR, characterisation of bound residues, identification of volatile components > 10% AR	Analysis of a.s. and transformation products, quantification of non-extractable radioactivity, analysis of volatile components Limit of detection (LOD) for a.s. and transformation products at least 0.01 mg kg ⁻¹ or 1% of applied dose, whichever is lower. Specification of limit of quantification (LOQ) required	Analysis of a.s. and major degradates, identification of metabolites occurring at > 0.01 mg kg ⁻¹ soil		Kun analyse af moderstoffer, nedbrydningsprodukter ikke relevant i dette studie.
Results					
Metabolic pathway	Yes	Yes	Yes		Ikke relevant.
DT50 / DT90	Yes	Yes, for simple-first-order $r^2 > 0.7$	Yes		DT50

Triazolfungiciders persistens, akkumulering og omdannelse til 1,2,4-triazol i jord

1,2,4-triazol dannes i landbrugsjord ved nedbrydning af en række triazolfungicider. I Pesticidvarslingsprogrammet (VAP) blev 1,2,4-triazol i 2015 overraskende påvist i drænvand og det øvre grundvand under marker, der ikke var sprøjtet med triazol-fungicider i flere år. TRIAFUNG-projektet har i feltforsøg og laboratorieforsøg undersøgt, hvor dette 1,2,4-triazol kan stamme fra. Fire VAP-marker blev prøvetaget over to år for at undersøge, hvor hurtigt triazolfungicider forsvinder i pløjelaget. Flere triazolfungicider var sprøjtet på markerne længe inden de blev påvist fx 3,1 µg/kg propiconazol 19 år efter seneste sprøjtning og 6,6 µg/kg epoxiconazol 14 år efter seneste sprøjtning. Når triazolfungiciderne er "naturligt" ældede i pløjelaget over en årrække er den biotilgængelige fraktion ganske lille og nedbrydningen tilsvarende langsom. Efter sprøjtning vil det meste triazolfungicid sandsynligvis nedbrydes i overjorden, men en fraktion kan bindes meget hårdt i pløjelaget med meget lav biotilgængelighed og kan derfor ophobes efter gentagne sprøjtninger. Langsom, men kontinuert nedbrydning af det ældede triazolfungicid kan bidrage til de "uforklarlige" fund af 1,2,4-triazol i drænvand og grundvand på VAP-marker. Denne effekt skal lægges til udvaskning af 1,2,4-triazol fra bejdset udsæd, bidrag fra triazolfungicidernes atmosfæriske deposition og bidrag fra husdyrgødning indeholdende konventionelt dyrket halm. Samlet set er det derfor ikke overraskende, at der var et forholdsvis højt indhold af 1,2,4-triazol i drænvand og grundvand under VAP-markerne inden sprøjtning med specifikke triazolfungicider. Generelt kunne vi ikke sandsynliggøre naturlig dannelse af 1,2,4-triazol, men på én lokalitet var der et mindre, uforklaret bidrag, hvor naturlig dannelse ikke kunne udelukkes.



Miljøstyrelsen
Tolderundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk