



# **PICT-RISK**

## **Evaluering af PICT som en økologisk relevant effekt- og eksponeringsindikator for risikovurdering af biocider**

Bekæmpelsesmiddel-  
forskning nr. 224

Juni 2024

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Kristian K. Brandt,  
Kai Bester,  
David Fernández-Calviño,  
Ulla E. Bollmann,  
Samuel Jacquiod,  
Ida M.B. Rasmussen,  
Søren J. Sørensen,  
David B. Collinge.

ISBN: 978-87-7038-625-8

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter indenfor 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

<b>1.</b>	<b>Forord</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Forkortelser</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Sammenfatning</b>	<b>7</b>
3.1	Indledende resumé	7
3.2	Formål og overordnede hypoteser	7
3.3	Forsøgsstrategi	8
3.4	Vigtigste resultater og konklusioner	8
<b>4.</b>	<b>Summary</b>	<b>11</b>
4.1	Introduction	11
4.2	Purpose and overarching hypotheses	11
4.3	Experimental approach	12
4.4	Highlighted results and conclusions	12
<b>5.</b>	<b>Indledning</b>	<b>15</b>
5.1	Videnskabelig baggrund	15
5.2	Formål og hypoteser	16
<b>6.</b>	<b>Materialer og metoder</b>	<b>18</b>
6.1	Teststoffer	18
6.2	Valg af model jord for laboratoriestudier	20
6.3	Opsætning af laboratorie mikrokosmos forsøg	20
6.3.1	Biocid nedbrydningskinetik	20
6.3.2	Økotoxikologiske effekter i laboratorie mikrokosmos	21
6.3.3	Økotoxikologiske effekter i kontrollerede feltforsøg	21
6.4	Økotoxikologiske effektparametre	21
6.4.1	Substrat-induceret respiration	21
6.4.2	Basal respiration	21
6.4.3	Svampevækst ([ <sup>14</sup> C]acetat indbygning i ergosterol)	22
6.4.4	Bakterievækst ([ <sup>3</sup> H]leucin indbygning)	22
6.4.5	Bakteriel samfundstolerance	22
6.4.6	Mikrobiel samfundsstruktur - PLFA	22
6.4.7	Mikrobiel samfundsstruktur – DNA og RNA	23
6.5	Bakteriel samfundstolerance som en <i>in situ</i> eksponeringsindikator	24
6.6	Feltmonitoring af biocider i jord	24
6.7	Kemiske analyser af teststoffer og deres nedbrydningsprodukter i jord	26
6.7.1	Kemisk ekstraktion af teststoffer fra jord	26
6.7.2	Kvantificering af teststoffer ved HPLC-MS/MS	28
<b>7.</b>	<b>Resultater og diskussion</b>	<b>29</b>
7.1	Biocid nedbrydningskinetik i laboratoriemikrokosmos forsøg	29
7.1.1	Nedbrydningskinetik – primær nedbrydning	29
7.1.2	Nedbrydningskinetik – nedbrydningsprodukter og massebalancer	31
7.1.3	Validering af teststofkoncentrationer i økotoxikologiske tests	34

7.2	Effekter af modelstoffer på jordens mikroorganismer – mikrobiel aktivitet	35
7.2.1	Mikrobiel aktivitet i jordmikrokosmos over tid	35
7.2.2	Effekter af 3,5-diklorphenol på jordens mikrobielle aktivitet	36
7.2.3	Effekter af isothiazolinoner på jordens mikrobielle aktivitet	39
7.2.4	Effekter af azoler på jordens mikrobielle aktivitet	44
7.2.5	Effekter af øvrige biocider på jordens mikrobielle aktivitet	48
7.3	Effekter af isothiazolinoner på jordens mikrobiom i mikrokosmos forsøg	54
7.3.1	Udvikling af bakteriel samfundstolerance (PICT)	54
7.3.2	Mikrobiel samfundsanalyse – svampe og bakterier (PLFA)	57
7.3.3	Mikrobiel samfundsanalyse – bakterier (16S rRNA)	63
7.4	PICT feltforsøg	70
7.5	Screening af biocider i byjorder	72
<b>8.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
8.1	Biocider i jord – forekomst og skæbne	74
8.2	Effekter af biocider på jordens mikroorganismer	74
<b>9.</b>	<b>Konklusion</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>Perspektiver</b>	<b>80</b>
10.1	Videnskabelige perspektiver	80
10.2	Administrative perspektiver	80
<b>11.</b>	<b>Referencer</b>	<b>82</b>
<b>Bilag 1.</b>	<b>87</b>	
Bilag 1.1	Massespektrometriske data for biocider	87
Bilag 1.2	Massespektrometriske data for TP'er	89

# 1. Forord

Projektet "PICT-RISK: Evaluering af PICT som en økologisk relevant effekt- og eksponeringsindikator for risikovurdering af biocider" har været finansieret af Miljøstyrelsens program for bekæmpelsesmiddelforskning. Projektet er udført i perioden 2013-2017 ved Københavns Universitet (Institut for Plante- og Miljøvidenskab og Institut for Biologi) og ved Aarhus Universitet (Institut for Miljøvidenskab). Dele af projektet er desuden blevet udført i samarbejde med Lunds Universitet (Biologiska Institutionen) i Sverige.

Vi vil gerne takke Miljøstyrelsens følgegruppe, og specielt de tre faglige korrekturlæsere, Carsten Suhr Jacobsen (Aarhus Universitet), Hanne Ingmar (Københavns Universitet) og Jesper Johannesen (Miljøstyrelsen).

Desuden vil vi gerne takke professor Erland Bååth og professor Johannes Rousk for at vejlede postdoc David Fernández-Calviño for den del af arbejdet, der blev udført på Lunds Universitet (membranlipidanalyser og måling af svampevækst).

## 2. Forkortelser

3,5-DCB: 3,5-diklorbenzen  
BIT: Benzisothiazolinon  
BR: Basal respiration  
DCOIT: Diklorisothiazolinon  
IP: Isoproturon  
MCPP: Mecoprop  
MIT: Methylisothiazolinon  
OIT: N-Octylisothiazolinon  
PICT: Pollution-induced community tolerance  
PLFA: Phospholipid fedtsyrer  
PPZ: Propiconazol  
SIR: Substrat-induceret respiration  
TB: Terbutryn  
TBU: Tebuconazol

# 3. Sammenfatning

## 3.1 Indledende resumé

Biocider er potente bioaktive stoffer beregnet til at dræbe eller hæmme skadelige organismer (ofte mikroorganismer) i en bred vifte af produktkategorier (Regulativ (EU) No 528/2012). I denne rapport baseret på resultater fra projektet PICT-RISK belyser vi udvalgte biociders forekomst, skæbne og toksiske effekter i jordmiljøet med særlig fokus på mulig eksponering fra biocidanvendelsen i byggematerialer, biocid nedbrydningskinetik, dannelsen af mulige toksiske nedbrydningsprodukter og risikoen for skadelige effekter på jordens mikroorganismer og dertil knyttede økosystemtjenester. Et særligt fokusområde var desuden at udvikle og teste et nyt testkoncept i forhold til at vurdere økotoksikologiske effekter af biocider på jordens mikroorganismer og her i særlig grad at teste jordbakteriesamfundets resistensniveau (eng. "pollution-induced community tolerance = PICT) som en økologisk relevant effekt- og eksponerings-indikator for risikovurdering af biocider.

Vores resultater bekræftede vores hypotese, at den klassiske OECD 217 testmetode underestimerer effekter af biocider på jordens mikroorganismer, idet mikrobiel vækst og diversitet i jord generelt blev påvirket ved lavere biocidkoncentrationer end potentiel mikrobiel aktivitet (substrat-induceret respiration). Vores nye testkoncept viste desuden, at mikrobielle samfund kan respondere vidt forskelligt efter eksponering til tæt beslægtede stoffer. Samlet set indikerer vores resultater dog, at der kun er en lav risiko for akutte toksiske effekter af de undersøgte biocider på jordens mikroorganismer. Målte koncentrationer for biocider og deres nedbrydningsprodukter i udvalgte "højrisikojorder" (op til 0,2 mg/kg) var således mindst 1-2 størrelsesordener lavere end de koncentrationer, der forårsagede toksiske effekter på jordens mikrobielle samfund.

Nogle af biociderne var yderst persistente eller gav anledning til akkumulering af hidtil ukendte nedbrydningsprodukter, og i et enkelt tilfælde (terbutryn) faldt akkumulering af nedbrydningsprodukter sammen med en øget toksisk effekt på jordens mikroorganismer over tid. Andre biocider (f.eks. isothiazolinoner) var let-nedbrydelige, men alligevel sås en overaskende høj forekomst af disse stoffer i byjorder, hvilket kunne forklares med semikontinuert udvaskning fra byggematerialer i forbindelse med regnhændelser. Vi kategoriserer derfor disse biocider som værende "pseudo-persistente".

Baseret på vores resultater, foreslår vi, at eksisterende økotoksikologiske test metoder rettet mod jordens mikroorganismer revurderes, og at OECD 217 testen udbygges ved inddragelse af nyere og mere følsomme testmetoder, der belyser toksiske effekter på svampe- og bakterievækst (tier 1) med mulig inddragelse af yderligere tests (tier 2), der er målrettet kemiske stoffers effekter på resistensudvikling og diversitet i jordens mikrobielle samfund. Derudover foreslår vi, at der sættes fokus på grundvandsudvaskning af biocider fra byjorder og mulig akkumulering biocidnedbrydningsprodukter i miljøet.

## 3.2 Formål og overordnede hypoteser

PICT-RISK projektet havde to overordnede formål: 1) at tilvejebringe viden om biociders mulige skadevirkninger i jordmiljøet ved dels at undersøge udvalgte biociders koncentrationsniveauer og skæbne i højrisiko jorder, der modtager regnvand fra bygningsfacader, og dels at undersøge biociders økotoksikologiske effekter på jordens mikroorganismer; 2) at udvikle og teste et nyt testkoncept i forhold til at vurdere økotoksikologiske effekter af biocider på jordens mikroorganismer.

### 3.3 Forsøgsstrategi

I startfasen af projektet blev der i tæt samarbejde med Miljøstyrelsen udvalgt en række teststoffer (biocider). Udover relevans for Miljøstyrelsen var det et udvælgelseskræterium, at kemiske analysemetoder allerede var tilgængelige i projektgruppen, og at nogle af de valgte biocider kunne forventes at have effekter både på svampe og bakterier, mens andre kun var rettet mod enten svampe eller bakterier. De udvalgte biocider bliver anvendt i forskellige produkttyper (PT): konserveringsmidler i murværksprodukter (puds) (PT10), træbeskyttelsesmidler (PT8), film præservativer (maling) (PT 7) og præservativer for opbevaring af produkter ("in can preservatives") (PT 6). Alle disse materialer udsættes for vejrpåvirkninger og udvaskes efter regnhændelser.

Baseret på kendte emissions- og udvasknings-data blev det beregnet, at biocidkoncentrationer på mellem 0,1 og 1 mg/kg måtte kunne forventes i "højrisikojorder" tæt på bygningsfacader, såfremt stofferne ikke blev nedbrudt i jorden. Faktiske teststofkoncentrationer og udvalgte nedbrydningsprodukter blev efterfølgende målt i udvalgte, urbane højrisikojorder. Derudover blev der udført detaljerede nedbrydningsforsøg i en landbrugsjord med kendt pesticid anvendelseshistorik med det formål at bestemme nedbrydnings-rater og -kinetik. For enkelte teststoffer blev der desuden fokuseret på identifikation af mulige toksiske nedbrydningsprodukter. Biocider blev ekstraheret ved accelereret solvent ekstraktion (ASE) og analyseret med HPLC-MS/MS.

Biocidernes økotoxikologiske effekter på jordens mikroorganismer blev undersøgt i jordmikrokosmos udført som beskrevet i den eksisterende OECD 217 standard test, men med et udvidet sortiment af komplementære testmetoder designet til at minimere risikoen for at overse toksiske effekter på jordens mikroorganismer (Brandt et al., 2015). Alle mikrokosmos forsøg blev udført med den samme landbrugsjord som anvendt til studier af nedbrydnings-rater og –kinetik (se ovenfor). Testkonceptet var baseret på anvendelsen af komplekse mikrobielle samfund bestående af tusindvis af forskellige arter som indikatorer for jordmiljøets tilstand og var inddelt i to faser.

Fase 1 blev udført for alle udvalgte biocider og bestod udover måling af substrat-induceret respiration (SIR; CO<sub>2</sub> produktionsraten målt efter glukose tilsætning til jord) jf. OECD 217 testprotokollen også af to potentielt mere følsomme tests: svampevækst målt som [<sup>14</sup>C]acetat-iergosterol inkorporering og bakterievækst målt som [<sup>3</sup>H]leucin inkorporering. Basal respiration (BR; CO<sub>2</sub> produktionsraten målt uden substrat tilsætning) blev også målt.

Endelig blev PICT testmetoden også testet i felten med et enkelt biocid (diklorisothiazolinon; DCOIT) for testmetodens evne til at fungere som en økologisk relevant biocid effekt- og eksponerings-indikator på jordens bakteriesamfund samt på metodens evne til at vurdere hvor hurtigt DCOIT tolerante bakteriesamfund genetablerer deres "naturlige" biocid følsomhed efter biocidstress.

### 3.4 Vigtigste resultater og konklusioner

De opnåede resultater viste generelt en lav risiko for toksiske effekter af biocider på jordens mikroorganismer selv i forventede højrisikojorder tæt ved bygningsfacader. Målte koncentrationer for biocider og deres nedbrydningsprodukter var således mindst 1-2 størrelsesordener lavere end de koncentrationer, der forvoldte toksiske effekter på jordens mikrobielle samfund. En screening af højrisiko byjorder fandt meget forskellige biocid koncentrationer. De højeste koncentrationer (op til 0,2 mg/kg) blev fundet for tebuconazol, propiconazol, og terbutryn, mens andre biocider (diuron og carbendazim) blev detekteret i lave koncentrationer op til 0,01 mg/kg. Der blev også fundet let nedbrydelige biocider (octylisothiazolinon) i nogle af jorderne. Disse let nedbrydelige biocider kan karakteriseres som 'pseudo-persistente' som følge af hyppig udvaskning fra bygningsfacader. Der blev dog kun analyseret et ret begrænset antal byjorder, og der må forventes en meget heterogen fordeling af specifikke biocider på forskellige byarealer.



En række biociders nedbrydelighed blev undersøgt i samme type jordmikrokosmos forsøg, som anvendt til økotoksikologiske tests (se nedenfor). Isothiazolinonerne og iodocarb blev nedbrudt med halveringstider på <10 dage (MIT 0.28 d, BIT 0.52 d, IPBC 1.05 d, DCOIT 4.8 d, OIT 9.3 d). Mecoprop og isoproturon blev nedbrudt med længere halveringstider (MCPP 44 d, IP 100 d). MCPP og IP må dog betragtes som "pseudo-persistente" stoffer i jorder, der er udsat for hyppig tilførsel af biocider i forbindelse med regnhændelser, der fører til udvaskning af biocider fra byggematerialer. Diuron, tebuconazol, propiconazol og terbutryn var persistente med halveringstider på over 200 dage. Desuden blev der for nogle biocider fundet akkumulerende nedbrydningsprodukter i jorden.

De opnåede resultater i PICT-RISK projektet viste desuden, at OECD 217 standardtesten, der rutinemæssigt anvendes af miljømyndigheder til at vurdere risikoen for økotoksikologiske effekter af biocider og pesticider på jordens heterotrofe mikroorganismer, kan overse toksiske effekter på disse mikroorganismer. Toksiske effekter kunne således detekteres ved anvendelse af mere følsomme og indbyrdes komplementære testmetoder, der måler vækstinhibering i enten svampe eller bakterier, udvikling af biocid tolerance og ændringer i mikrobiel samfundsstruktur. Baseret på vores resultater og eksisterende litteratur på antimikrobielle stoffers effekter på jordens mikroorganismer foreslår vi mulige forbedringer af den fremgangsmåde, som p.t. anvendes i forbindelse med økotoksikologisk vurdering og godkendelse af nye biocider og pesticider i EU. Specifikt foreslår vi, at OECD 217 testen på sigt erstattes eller udbygges med inddragelse af mere følsomme "Fase 1" testmetoder, der måler vækstinhibering i henholdsvis svampe (<sup>14</sup>C-acetat-i-ergosterol indbygning) og bakterier (<sup>3</sup>H-leucin indbygning i proteiner). Såfremt Fase 1 sammenholdt med eksponeringsdata indikerer en risiko for skadelige effekter af biocider, foreslår vi, at OECD 217 testen ekspanderes yderligere ved at inddrage mere detaljerede "Fase 2" tests, der måler PICT udvikling overfor teststoffet og ændringer i mikrobiel diversitet baseret på analyser af enten phospholipidfedtsyre (PLFA) profiler eller DNA sekvensprofiler (rRNA gen amplikonsekventering).

Fase 2 tests blev kun udført for isothiazolinonerne DCOIT og MIT, der begge var i stand til at hæmme bakterievæksten i jorden (Fase 1). Selv om de to stoffer er strukturelt beslægtede og må antages af have den samme primære virkningsmekanisme, udviste de to biocider markant forskellige effekter i Fase 2 tests. DCOIT-eksponering førte til en markant toleranceudvikling af jordens bakteriesamfund (PICT) og en tilhørende drastisk ændring i mikrobiel diversitet, mens MIT ikke selekterede for resistens og førte til langt mere begrænsede effekter på mikrobiel diversitet. Udviklingen af jordbakteriesamfundenes resistens overfor DCOIT var næsten identisk i laboratoriemikrokosmos inkubationer og under mindre kontrollerede feltbetingelser i havejord. Jordbakteriesamfundenes resistens var dog mindre persistent under feltbetingelser sandsynligvis pga. højere tilførsel af mikrobielle væksts substrater til jorden under feltforhold end i lukkede jordmikrokosmos. Disse resultater viser derfor, at laboratorietests jf. OECD 217 kan underestimere jordmikrobiomets evne til at "komme sig" efter at have været udsat for biocid eksponering.

Samlet set konkluderer vi, at de testede biocider udgør en ret lille risiko for at kunne udøve akutte økotoksikologiske effekter på jordens mikrobielle samfund i en dansk kontekst, men også, at der er behov for mere viden om biocid eksponeringsniveauer i jordmiljøet og dertil knyttet resistensudvikling og selektion af mikroorganismer. Ny forskning har således vist, at PICT-metoden anvendt i dette projekt i visse tilfælde er mindre følsom end andre mere detaljerede metoder (f.eks. metagenomics og "high-throughput" qPCR) til at kvantificere jordbakteriesamfundets resistens i naturlige miljøer, hvorfor det er muligt, at vi har overset effekter af de testede biocider. Dertil kommer, at det er muligt, at jordens mikroorganismer udvikler resistens overfor biocider efter længere tids eksponering overfor sub-inhibitoriske biocid koncentrationer i jorder på samme måde som tidligere vist for antibiotika i dyr. Resistensudvikling overfor azoler i plantepatogene svampe er allerede et alvorligt og velkendt problem i EU og kan med høj sandsynlighed til dels tilskrives landbrugets anvendelse af azoler som fungicider, men i de senere år er der også kommet stigende fokus på miljøets rolle for selektion og resistensudvikling i humanpatogene mikroorganismer i en sådan grad, at miljødimensionen er indskrevet i EUs handlingsplan for bekæmpelse af antimikrobiel resistens i patogene mikroorganismer. I den forbindelse skal det bemærkes, at humanpatogene svampes resistensudvikling overfor medicinske azoler udgør et stigende problem i Nordeuropa, og at en del af denne resistensudvikling muligvis kan tilskrives anvendelsen af azoler som pesticider eller biocider. Biociders evne

til at co-selektere for antibiotika resistens i bakterier er også velkendt og kan potentielt udgøre en betydelig risiko (vist i PICT-RISK som co-selektion af tetracyklin tolerance i jordbakteriesamfund), men denne risiko er imidlertid kun dårligt, eller slet ikke, belyst for de biocider, der indgik i PICT-RISK projektet. Endeligt må der skønnes at være en betydelig risiko for, at persistente/pseudo-persistente biocider og persistente nedbrydningsprodukter udvaskes til grundvandet i byområder og andre områder med biocidanvendelse. I den forbindelse er der behov for yderligere studier af biocidnedbrydningsprodukters skæbne og effekter i jordmiljøet.

# 4. Summary

## 4.1 Introduction

Biocides are potent bioactive compounds that are designed to either kill or impede harmful organisms (often microorganisms) in a broad array of product categories (Regulation (EU) No 528/2012). This report is based on results from the project PICT-RISK. We illuminate the occurrence and fate of selected biocides, as well as their toxic effect in soil environments with particular focus on possible exposure from biocide use in building materials, biocide degradation kinetics, the creation of possible toxic degradation products, and risks for harmful effects affecting soil microorganisms which support important ecosystem services.

A particular focus area has been the development and testing of a new test-concept designed to assess ecotoxicological effects of biocides in soil microorganisms, and in this case especially the testing of the pollution-induced community tolerance (PICT) concept as an ecological relevant effect and exposure-indicator for the risk assessment of biocides.

Our results confirmed our hypothesis that the classical OECD 217 method underestimates the effects of biocides on soil microorganisms, since microbial growth and diversity in soil was generally disturbed at lower biocide concentrations than potential microbial activity (substrate-induced respiration). Furthermore, our new testing concept showed that microbial communities can respond in contrasting ways even after exposure to closely related compounds. Overall, our results indicate that there is only a minor risk of acute toxic effects of the investigated biocides on soil microorganisms. Measured concentrations for biocides and their degradation products in selected "high risk soils" (up to 0,2 mg/kg) were at least 1-2 orders of magnitude lower than the concentrations causing toxic effects in soil microbial communities.

Some of the biocides were highly persistent or led to the accumulation of previously unknown degradation products, and, in a single case (terbutryn), the accumulation of degradation products coincided with an increased toxic effect in soil microorganisms over time.

Other biocides (e.g., isothiazolinones) were easily degradable, yet a surprisingly high occurrence of these substances was observed in urban soils. This could be explained by semi-continuous leaching from building materials by persistent rain. Therefore, we categorize these biocides as "pseudo-persistent."

Based on our results, we suggest that existing ecotoxicological testing methods targeting soil microorganisms should be reassessed. We propose an expansion of the OECD 217 test by incorporating newer and more sensitive test methods that elucidate toxic effects on fungal and bacterial growth (tier 1), possibly with the inclusion of additional tests (tier 2) targeting the effects of chemicals on resistance development and diversity in soil microbial communities. Additionally, we suggest a focus on groundwater leaching of biocides from urban soils and the potential accumulation of biocide degradation products in the environment.

## 4.2 Purpose and overarching hypotheses

The PICT-RISK project had two overarching objectives, namely 1) to provide knowledge about potential adverse effects of biocides in the soil environment by investigating the concentration levels and fate of selected biocides in high-risk soils receiving rainwater runoff from building facades, and by examining the ecotoxicological effects of biocides on soil microorganisms; 2) to develop and test a new testing concept for assessing the ecotoxicological effects of biocides on soil microorganisms.

### 4.3 Experimental approach

In the initial phase of the project, a set of test substances (biocides) was selected in close collaboration with the Danish Environmental Protection Agency. In addition to relevance for the Danish Environmental Protection Agency, several selection criteria that were applied. 1) chemical analysis methods should already be available within the project group. 2) that some of the chosen biocides could be expected to have effects on both fungi and bacteria, while others would target either fungi or bacteria. 3) The biocides selected are used in different product types (PT): preservatives in masonry products (plaster) (PT10), wood preservatives (PT8), film preservatives (paint) (PT7), and preservatives for the storage of products ('in-can preservatives') (PT6). All these materials are exposed to weather and leach following substantial rainfall.

Based on known emission and leaching data, it was estimated that biocide concentrations between 0.1 and 1 mg/kg could be expected in 'high-risk soils' close to building facades if the substances were not degraded in the soil. Actual test substance concentrations and selected degradation products were measured subsequently in selected urban high-risk soils. In addition, detailed degradation experiments were conducted in agricultural soil with a known pesticide use history, aiming to determine degradation rates and kinetics. For some test substances, we focused also on identifying potential toxic degradation products. Biocides were extracted using accelerated solvent extraction (ASE) and analysed with HPLC-MS/MS.

The ecotoxicological effects of biocides on soil microorganisms were investigated in soil microcosms conducted as described in the existing OECD 217 standard test, but with an extended range of complementary test methods designed to minimize the risk of overlooking toxic effects in soil microorganisms (Brandt et al., 2015). All microcosm experiments were performed using the same agricultural soil as used for studies of degradation rates and kinetics (see above). The test concept was based on the use of complex microbial communities consisting of thousands of different species as indicators of soil quality and was divided into two phases.

Phase 1 was conducted for all selected biocides and, in addition to measuring substrate-induced respiration (SIR; CO<sub>2</sub> production rate measured after glucose addition to soil) according to the OECD 217 test protocol, consisted of two potentially more sensitive tests: fungal growth measured as [<sup>14</sup>C]acetat-i-ergosterol incorporation and bacterial growth measured as [<sup>3</sup>H]leucine incorporation. The basal respiration (BR; CO<sub>2</sub> production rate measured without substrate addition) was also measured.

In Phase 2, the PICT test method was also tested in a field experiment with a single biocide (dichloroisothiazolinone; DCOIT) to assess the ability of PICT to serve as an ecologically relevant biocide effect and exposure indicator in soil bacterial communities. Additionally, the "reverse" PICT methodology was used to assess how quickly DCOIT-tolerant bacterial communities re-establish their 'natural', high biocide sensitivity after termination of biocide stress.

### 4.4 Highlighted results and conclusions

The results obtained generally indicated a low risk of toxic effects of biocides on soil microorganisms, even in expected high-risk soils close to building facades. Measured concentrations of biocides and their degradation products were at least 1-2 orders of magnitude lower than the concentrations causing toxic effects on soil microbial communities. A screening of high-risk urban soils revealed highly variable biocide concentrations. The highest concentrations (up to 0.2 mg/kg) were found for tebuconazole, propiconazole, and terbutryn, while other biocides (diuron and carbendazim) were detected at low concentrations up to 0.01 mg/kg. Easily degradable biocides (octylisothiazolinone) were also found in some of the soils. These easily degradable biocides were characterized as 'pseudo-persistent' due to frequent leaching from building facades following rain events. However, only a limited number of urban soils were analysed, and there is expected to be a highly heterogeneous distribution of specific biocides in different urban areas.

The degradability of a range of biocides was investigated in microcosm experiments using the same soil as used for ecotoxicological tests (see below). Isothiazolinones and iodocarb were degraded with half-lives of <10 days (MIT 0.28 d, BIT 0.52 d, IPBC 1.05 d, DCOIT 4.8 d, OIT 9.3 d). Mecoprop and isoproturon were degraded with longer half-lives (MCPP 44 d, IP 100 d). However, MCPP and IP must be considered as 'pseudo-persistent' substances in soils subjected to frequent biocide input during rainfall events, leading to leaching of biocides from building materials. Diuron, tebuconazole, propiconazole, and terbutryn were persistent with half-lives exceeding 200 days. Furthermore, degradation products accumulated in the soil for some biocides.

The results achieved in the PICT-RISK project also demonstrated that the OECD 217 standard test, routinely used by environmental authorities to assess the risk of ecotoxicological effects of biocides and pesticides on soil heterotrophic microorganisms, may overlook toxic effects on these microorganisms. Hence, we detected toxic effects of biocides using more sensitive and mutually complementary test methods that measure growth inhibition in either fungi or bacteria, the development of biocide tolerance in bacterial communities, and changes in microbial community structure. Based on our results and existing literature on the effects of antimicrobial substances on soil microorganisms, we propose potential improvements to the current approach used for ecotoxicological assessment and approval of new biocides and pesticides in the EU. Specifically, we suggest that the OECD 217 test be eventually replaced or expanded by incorporating more sensitive 'Phase 1' test methods that measure growth inhibition in fungi ( $[^{14}\text{C}]$ acetate-in-ergosterole incorporation and bacteria ( $[^3\text{H}]$ leucine incorporation into proteins). If Phase 1, in conjunction with exposure data, indicates a risk of harmful effects from biocides, we propose further expansion of the OECD 217 test by incorporating more detailed 'Phase 2' tests. These tests would measure PICT development when exposed to the test substance and changes in microbial diversity based on analyses of either phospholipid fatty acid (PLFA) profiles or DNA sequence profiles (rRNA gene amplicon sequencing).

Phase 2 tests were only conducted for the isothiazolinones DCOIT and MIT, both of which were able to inhibit bacterial growth in the soil (Phase 1). Although the two substances are structurally related and are assumed to have the same primary mode of action, the two biocides exhibited significantly different effects in Phase 2 tests. DCOIT exposure resulted in significant resistance development in the soil bacterial communities (PICT) and a corresponding drastic change in microbial diversity, while MIT did not select for resistance and led to much more limited effects on microbial diversity. The development of soil bacterial community resistance to DCOIT was nearly identical in laboratory microcosm incubations and under less controlled field conditions in garden soil. However, the resistance of soil bacterial communities was less persistent under field conditions, likely due to higher inputs of microbial growth substrates into the soil in field conditions compared to closed soil microcosms. These results indicate that laboratory tests according to OECD 217 may underestimate the resilience of the soil microbiome following exposure to biocides.

In conclusion, we find that the biocides tested pose a relatively low risk of exerting acute ecotoxicological effects on soil microbial communities in a Danish context. However, there is a need for more knowledge on biocide exposure levels in the soil environment and related development of resistance and selection of microorganisms. New research has shown that the PICT method used in this project is, in certain cases, less sensitive than other more detailed methods (e.g., metagenomics and high-throughput qPCR) for quantifying resistance in soil bacterial communities in natural environments. Therefore, it is possible that we have overlooked the effects of the tested biocides. Furthermore, it is possible that soil microorganisms develop resistance to biocides after prolonged exposure to sub-inhibitory biocide concentrations in soils, similar to what has been previously demonstrated for antibiotics in the animal gut. Resistance development to azoles in plant-pathogenic fungi is already a serious and well-known problem in the EU, in part attributed to the agricultural use of azoles as fungicides. However, in recent years, there has been increasing focus on the environment's role in selection and resistance development in human-pathogenic microorganisms to such an extent that the environmental dimension is now incorporated into the EU action plan for combating antimicrobial resistance in pathogenic microorganisms. In this context, it should be noted that the development of resistance in human-pathogenic fungi to medical azoles poses an increasing

problem in Northern Europe, and a portion of this resistance development may potentially be attributed to the use of azoles as pesticides or biocides. The ability of biocides to co-select for antibiotic resistance in bacteria is also well-known and can potentially pose a significant risk (demonstrated in PICT-RISK as co-selection of tetracycline tolerance on soil bacterial communities), but this risk is only poorly, or not at all, assessed for the biocides included in the PICT-RISK project. Finally, there is a risk that persistent/pseudo-persistent biocides and persistent degradation products leach into groundwater in urban areas and other areas with biocide use. In this regard, further studies are needed on the fate and effects of biocide degradation products in the soil environment.

# 5. Indledning

## 5.1 Videnskabelig baggrund

Biocider er potente bioaktive stoffer beregnet til at dræbe eller hæmme skadelige organismer i en bred vifte af produktkategorier (Regulation (EU) No 528/2012). Mange af biociderne er rettet mod mikroorganismer som f.eks. svampe og bakterier og anvendes bl.a. i malinger og andre byggematerialer. Disse biocider er generelt relativt vandopløselige og er derfor potentielt mobile i miljøet. Biocider kan derfor udvaskes fra bygningsfacader (Burkhardt et al., 2012, Wangler et al., 2012), hvilket medfører en risiko for skadelige effekter i både akvatiske og terrestriske miljøer.

Tidligere er biociders skæbne, forekomst og økotoksikologiske effekter især blevet undersøgt i akvatiske miljøer, mens der er langt mindre viden fra terrestriske miljøer. I denne rapport fokuserer vi på forekomst, skæbne og toksiske effekter af biocider i jordmiljøet med særlig fokus på mulig eksponering fra biocidanvendelsen i byggematerialer, biocid nedbrydningskinetik, dannelsen af mulige toksiske nedbrydningsprodukter og risikoen for skadelige effekter på jordens mikroorganismer og dertil knyttede økosystemtjenester (Brandt et al., 2015).

I forbindelse med den terrestriske risikovurdering, der foretages, når nye pesticider og biocider godkendes i EU, anvendes almindeligvis kun data fra to typer af økotoksikologiske tests, der er rettet mod jordens mikroorganismer (European Commission 2002; ECHA 2014). Den ene type af disse tests eksemplificeres af OECD 216 test metoden (OECD, 2000a), der er rettet mod nitrificerende mikroorganismer, og som betragtes som en relevant test, der tester den potentielle aktivitet af en defineret, følsom og økologisk vigtig indikator gruppe (Brandt et al., 2015). Den anden test type eksemplificeres af OECD 217 testmetoden (OECD, 2000b), der er rettet mod stort set alle heterotrofe mikroorganismer (i praksis især svampe og bakterier) i jordbunden, og som direkte måler kemiske stoffers evne til at hæmme den potentielle heterotrofe aktivitet. Denne test kaldes også en SIR inhiberingstest (SIR = substrat-induceret respiration), da den potentielle heterotrofe aktivitet måles som CO<sub>2</sub> produktionsraten i jord tilsat glukose. I forbindelse med risikovurdering af biocider kan der også benyttes visse ISO certificerede metoder, som er tæt beslægtede med ovenfor refererede OECD metoder (ECHA, 2014).

OECD 217 test metoden og hertil beslægtede metoder anses almindeligvis som meget ufølsomme tests af flere årsager (Brandt et al., 2015). For det første er disse tests baseret på hæmning af respiration, som generelt er et mindre følsomt mål for toksiske effekter end hæmning af vækst. For det andet er der en betydelig funktionel redundans i den meget diverse gruppe af mikroorganismer (C mineraliserende svampe og bakterier), som OECD 217 testen og beslægtede metoder måler på. De fleste stoffer vil således kun påvirke en del af jordens mikroorganismer. F.eks. vil et fungicid oftest primært inhibere svampe, hvilket ofte fører til, at de upåvirkede mikroorganismer (i dette tilfælde bakterier og archaea) får en konkurrencefordel og bliver dominerende. Den toksiske effekt af fungicidet vil derfor potentielt kunne blive overset, når man anvender OECD 217 metoden. For det tredje kan OECD testmetoderne (både OECD 216 og 217) desuden overse toksiske effekter, der skyldes, at giftstoffer selekterer for resistente mikroorganismer. Denne effekt kaldes også for 'pollution-induced community tolerance' (PICT) (Blanck, 2002) og vil normalt også resultere i et mikrobielt samfund med en ændret artssammensætning, men ikke altid, da selektion for resistens kan forekomme blandt forskellige typer af mikroorganismer (stammer) tilhørende samme art (Brandt et al., 2010).

En centralt element i rapporten er derfor også at sammenligne resultater med OECD 217 test metoden med data fra en ny kombination af mere detaljerede økotoksikologiske tests, der specifikt måler væksthæmning i jordens svampe (<sup>14</sup>C acetat-inkorporering i ergosterol) eller bakterier (<sup>3</sup>H leucin indbygning i proteiner), ændringer i mikrobiel samfundsstruktur (phospholipid fedtsyre analyse af svampe + bakterier; rRNA gen amplikonsekventering rettet mod enten bakterier eller svampe) og selektion for biocidtolerante bakteriesamfund (PICT; baseret på <sup>3</sup>H leucin indbygning som PICT detektionsmetode).

Udover at fungere som en økotoxikologisk indikator i definerede mikrokosmosforsøg som dem, der anvendes for OECD 217 metoden, har PICT konceptet derudover den indbyggede fordel, at PICT effekten kan påvise toksiske effekter af stoffer selv under komplekse feltbetingelser, hvilket ofte ikke lader sig gøre for de øvrige testede parametre (vækst, respiration, samfundsstruktur etc.) (Blanck, 2002). Mikrobielle samfundsstruktur og funktion vil således kunne påvirkes af en række forskellige økologiske og fysisk/kemiske faktorer under feltbetingelser, mens PICT overfor et givent giftstof normalt kun vil forekomme, hvis giftstoffet har været i stand til at udøve en toksisk effekt og derved har selekteret for resistente mikroorganismer.

Et yderligere element i rapporten er derfor at undersøge, om PICT kan anvendes som en økologisk relevant indikator for eksponering og toksisk effekt af biocider under feltbetingelser. I denne sammenhæng ønskes også belyst, hvorvidt udvikling af mikrobiel samfundstolerance overfor biocider er persistent eller reversibel. I denne sammenhæng er det også vigtigt at bemærke, at resistensudvikling overfor biocider i naturlige miljøer også kan udgøre en risiko for human sundhed. F.eks. tilhører nogle svampemidler, der anvendes som både fungicider og biocider, samme klasse af stoffer som visse medicinske svampemidler, der anvendes til bekæmpelse af svampeinfektioner i mennesker (Berger et al., 2017). Tilsvarende er der også en betydelig risiko for, at nogle biocider kan co-selektere for antibiotika resistente bakterier, hvilket udgør en risiko for vores fremtidige evne til at behandle bakterieinfektioner i mennesker (Ashbolt et al., 2013; Pal et al., 2015).

## 5.2 Formål og hypoteser

Følgende hypoteser undersøges i kontrollerede jordmikrokosmos forsøg udført jf. OECD 217 testmetoden, men hvor målingen af substrat-induceret respiration suppleres af detaljerede studier af udvalgte biociders skæbne og deres effekter på jordens mikrobielle samfund. Hypoteserne er skrevet som arbejdshypoteser, der afspejler vores forventninger, inden forsøgene blev udført.

1. OECD 217 testmetoden underestimerer toksiske effekter af biocider i forhold til gruppespecifikke vækstinhiberingsassays målrettet henholdsvis svampe eller bakterier.
2. Svampemidler inhiberer svampevækst i jord, hvilket fører til, at bakteriers vækst stimuleres pga. mindre intens konkurrence fra svampe, mens der ikke kan måles hæmning af basal jordrespiration pga. funktionel redundans i jordens kulstof mineraliseringsprocesser. Det forventes således, at tolerante mikroorganismer (her især bakterier) vil blive mere aktive i takt med at svampenes aktivitet inhiberes.
3. Biocider rettet mod både svampe og bakterier vil initialt inhibere både svampes og bakteriers vækst i jorden, men efter få dage/uger vil vækstinhiberingen ophøre enten fordi biociderne nedbrydes eller fordi de mikrobielle samfund udvikler biocid tolerance (PICT). *NOTE: PICT undersøges i dette projekt kun for jordens bakteriesamfund.*
4. PICT overfor biocider vil kun forekomme i tilfælde, hvor biociderne initialt hæmmer jordbakteriernes vækst, da initial vækstinhibering er en indikator for selektionstryk fra de testede stoffer.
5. Initial vækstinhibering og PICT-effekter forårsaget af biocider i jordmikrokosmos kan valideres og korreleres til ændringer i den mikrobielle samfundsstruktur (PLFA-profiler) eller i 'artssammensætningen' af bakterier (amplikon sekvensanalyser).
6. Biocid eksponering i jord kan føre til co-selektion af tetracyklinresistente jordbakteriesamfund.
7. Biocider nedbrydes i jord og nedbrydningskinetikken kan modelleres.
8. Toksiske biocid nedbrydningsprodukter akkumulerer ikke i jorden.

Flg. hypoteser undersøges i kontrollerede feltforsøg:

9. PICT-konceptet kan anvendes til at teste toksiske effekter af biocider i felteksponerede jorder.
10. PICT-signalet er positivt korreleret til biocid eksponeringen.



11. PICT-dynamikken i feltjorder er anderledes end i laboratorie mikrokosmos udført jf. OECD 217 testmetoden; især forventes PICT at være mindre persistent i felten end i laboratorie mikrokosmos.
12. PICT har potentiale som en kombineret eksponerings- og effekt-feltindikator for skadelige effekter af biocider på jordens mikroorganismer.

Fig. hypoteser testes ved monitoring af biocider i jorder, der modtager afløbsvand fra bygningsfacader:

13. Jordens organismer eksponeres kontinuert eller semi-kontinuert overfor biocider i jorder, der modtager afløbsvand fra bygningsfacader.

Fig. overordnede hypoteser testes i projektet:

14. Effektkoncentrationer for toksiske effekter af biocider på jordens mikroorganismer er højere end målte koncentrationer af biocider i danske jorder, der modtager udvaskede biocider fra bygningsfacader, og biocider i byggematerialer forventes derfor at udgøre en ret lav risiko for økotoksikologiske effekter på jordens mikroorganismer.
15. EU medlemslandenes fremgangsmåde i forhold til at teste skadelige effekter af nye biocider på jordens mikroorganismer og deraf afledte økosystem tjenester kan forbedres ved at indføre mere relevante og følsomme økotoksikologiske tests. En initial måling af biociders effekter på henholdsvis svampes og bakteriers vækstrate i jorden vil udgøre en nyttig Fase 1 test, der kan forudsige potentielle effekter på mikrobielle samfunds biocid tolerance (PICT) og samfundsstruktur. PICT og molekylær mikrobiel samfundsanalyse kan udgøre nyttige Fase 2 tests i forhold til at opnå en mere informativ og sikker økotoksikologisk vurdering af biociders effekter på jordens mikroorganismer i tilfælde, hvor Fase 1 data indikerer en betydelig risiko for skadelige effekter på jordens mikroorganismer.

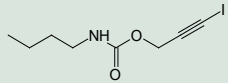
# 6. Materialer og metoder

## 6.1 Teststoffer

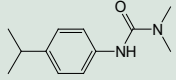
Teststoffer (biocider) blev udvalgt i samarbejde med Miljøstyrelsen med henblik på at sikre teststoffernes relevans. Derudover var det et udvælgelseskræterium, at kemiske analysemetoder allerede var tilgængelige i projektgruppen, og at nogle af de valgte biocider kunne forventes at have effekter både på svampe og bakterier, mens andre kun var rettet mod svampe. Tabel 1 viser en bruttoliste over de udvalgte modelbiocider samt tre ekstra biocider (cybutryn, iodocarb og isoproturon), der kun blev inkluderet i den del af projektet, der foregik på AU. Udover disse stoffer blev der også udvalgt et biocidnedbrydningsprodukt (1,2,4-triazol) samt referencegiftstoffet 3,5-dichlorophenol (3,5-DCP). Biocider indgår i en række kommercielle produkter indeholdende mange forskellige indholdsstoffer. Det er derfor vigtigt at understrege at biociders interaktioner med andre indholdsstoffer kan påvirke både toksicitet og skæbne af biocider i jord. Derudover skal det bemærkes, at adskillige af de valgte teststoffer også anvendes som aktivstoffer i pesticidformuleringer sammen med hjælpestoffer, der maksimerer deres biologiske effekt (Tabel 1).

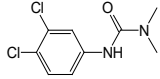
**TABEL 1.** Oversigt over udvalgte stoffer til PICT-RISK projektet (bruttoliste). Biocider, som bliver anvendt i façadeprodukter (maling og puds) angivet med produkttype fra biocid direktivet III og suppleret med kosmetik direktivet IV samt anvendt i Danmark som pesticid V.

Group Compound (Abbreviation) CAS-No.	Formula	Physical-chemical properties	Toxicity, Ecotoxicity, Degradation	Activity Product types (BPR) Pesticide in DK
<b>Triazines</b>				
Terbutryn (TB) 886-50-0		Log K <sub>ow</sub> : 3.74 WS: 25 mg L <sup>-1</sup> p <sub>vap</sub> : 2.3*10 <sup>-6</sup> hPa pK <sub>a</sub> : 4.1 (base)	PNEC: 34 ng L <sup>-1</sup> LD50 (dermal): > 10200 mg kg <sup>-1</sup> rabbit LC50 3 mg L <sup>-1</sup> fish (96h) LD50 (oral): 2045 mg kg <sup>-1</sup> rat EC50 2.4-2.9 mg L <sup>-1</sup> green algae (96h)	Algaecide Biocide: PT 7, 9, 10 Pesticide: -
Cybutryn, Irgarol 105 (IRG) 28159-98-0		Log K <sub>ow</sub> : 3.95 WS: 7 mg L <sup>-1</sup> p <sub>vap</sub> : 8.8*10 <sup>-6</sup> hPa pK <sub>a</sub> : 4.1 (base)	PNEC: 1 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): >2000 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat Skin-sensitizer LC50 0.94 mg L <sup>-1</sup> rainbow trout (96h) EC50 0.4 mg L <sup>-1</sup> mysid shrimps (96h) Extremely hazardous to water	Algaecide Biocide: PT 21 Pesticide: -
<b>Carbamates</b>				
Carbendazim (CD) 10605-21-7		Log K <sub>ow</sub> : 1.6 WS: 8 mg L <sup>-1</sup> p <sub>vap</sub> : < 2.6*10 <sup>-6</sup> hPa pK <sub>a</sub> : 4.5 (base) & 10 (acid)	PNEC: 34 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): 640 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat Mutagenic (proposed cat 2) LC50 0,61 mg L <sup>-1</sup> carp (96h) Not readily biodegradable T0.5 (soil) 5-6 weeks	Fungicide Biocide: PT 7, 9, 10 Pesticide: c

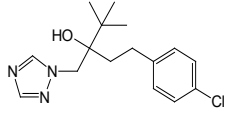
Iodocarb (IPBC) 55406-53-6		Log $K_{OW}$ : 2.4 WS: 168 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $1.04 \cdot 10^{-5}$ hPa $pK_a$ : 11.8 (acid)	PNEC: 26 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): 1400 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat LC50 0,026 mg L <sup>-1</sup> green algae (72h) Not easily biodegradable	Fungicide Biocide: PT 6, 7, 8, 9, 10, 13 Cosmetics Pesticide: a
----------------------------------	---	--	--	--

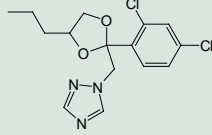
#### Phenylureas

Isoproturon (IP) 34123-59-6		Log $K_{OW}$ : 2.87 WS: 65 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $3.3 \cdot 10^{-8}$ hPa $pK_a$ : 0.1 (base) & 14.3 (acid)	PNEC: 20 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): >2000 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat Possibly carcinogenic EC50 0,01 mg L <sup>-1</sup> green algae (72h) Not readily biodegradable Very toxic to aquatic	Algaecide Biocide: PT 7, 10 Pesticide: -
-----------------------------------	---	--	---	--


Diuron (DR) 330-54-1		Log $K_{OW}$ : 2.71 WS: 35 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $2.3 \cdot 10^{-9}$ hPa $pK_a$ : -1.6 (base) & 13.8 (acid)	LD50 (oral): ~4150 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 5000 mg kg <sup>-1</sup> rat LC50 3.2 mg L <sup>-1</sup> carp (48h) EC50 0,022 mg L <sup>-1</sup> green algae T0.5 (abiotic) ~5-6years Light stable	Algaecide Biocide: PT 7, 10 Pesticide: -
----------------------------	---	---	--	--

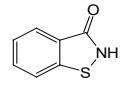
#### Triazoles

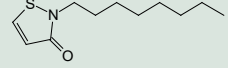
Tebuconazole (TBU) 107534-96-3		Log $K_{OW}$ : 3.7 WS: 36 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $.17 \cdot 10^{-8}$ hPa $pK_a$ : 1.8 (base) & 13.7 (acid)	LD50 (oral): ~1700 mg kg <sup>-1</sup> female rat LD50 (dermal): > 5000 mg kg <sup>-1</sup> rat LC50 4.4 mg L <sup>-1</sup> rainbow trout (96h) Not readily biodegradable	Fungicide Biocide: PT 7, 8, 9, 10 Pesticide: a/b/c
--------------------------------------	--	---	--	--

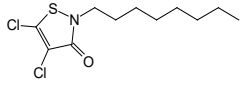
Propiconazole (PPZ) 60207-90-1		Log $K_{OW}$ : 3.72 WS: 100 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $2.7 \cdot 10^{-7}$ hPa $pK_a$ : 1.7 (base)	LD50 (oral): 1490 mg kg <sup>-1</sup> mouse LD50 (dermal): > 4000 mg kg <sup>-1</sup> rat May cause sensitization by skin contact LC50 5.3 mg L <sup>-1</sup> rainbow trout (96h) EC50 (growth) 0,76 mg L <sup>-1</sup> green algae	Fungicide Biocide: PT 7, 8, 9 Pesticide: a
--------------------------------------	---	---	---	--

#### Isothiazolinones

Methylisothiazolinone (MIT) 2682-20-4		Log $K_{OW}$ : 0.5 WS: 30000 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $5.85 \cdot 10^{-5}$ hPa $pK_a$ : -0.4 (base)	LD50 (oral): 285 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat T0.5 (hydrolysis) > 720 h T0.5 (photolysis): 266 h T0.5 (aerobic aquatic microorg): 9h	Bactericide/ Fungicide Biocide: PT 6, 11, 12, 13 Cosmetics Pesticide: -
---	---	--	---	---

Benzisothiazolinone (BIT) 2634-33-5		Log $K_{OW}$ : WS: ~1000 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $pK_a$ : 14.8 (acid)	LD50 (oral): 670 mg kg <sup>-1</sup> male rat LD50 (dermal): > 2000 mg kg <sup>-1</sup> rat LC50 1.6 mg L <sup>-1</sup> rainbow trout (96h) EC50(growth) 0,07mg L <sup>-1</sup> green algae	Bactericide/ Fungicide Biocide: PT 2, 6, 9, 11, 12, 13 Pesticide: -
---	---	---	--	---

N-Octylisothiazolinone (OIT) 26530-20-1		Log $K_{OW}$ : 2.45 WS: 480 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : $4.9 \cdot 10^{-5}$ hPa $pK_a$ : -0.4 (base)	PNEC: 13 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): 760 mg kg <sup>-1</sup> rat LD50 (dermal): 690 mg kg <sup>-1</sup> rabbit LC50 0,065 mg L <sup>-1</sup> rainbow trout (96h) Readily dissipated in river water	Bactericide/ Fungicide Biocide: PT 6, 7, 9, 10, 13 Pesticide: -
---	---	--	--	---

Dichloro-N-octylisothiazolinone (DCOIT)		Log $K_{OW}$ : 4.9 WS: 14 mg L <sup>-1</sup> $p_{vap}$ : 6.67 hPa (xylene)	PNEC: 8 ng L <sup>-1</sup> LD50 (oral): 2600 mg kg <sup>-1</sup> female rat	Bactericide/ Fungicide Biocide: PT 7, 8, 9, 10, 11, 21 Pesticide: -
--	---	--	--	---

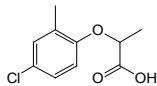
64359-81-5

pK<sub>a</sub>: -

LD50 (dermal): > 2000 mg kg<sup>-1</sup> rabbit  
 LC50 2.7 ppb rainbow trout (96h)  
 T0.5 (aerobic & anaerobic) < 1h  
 Products with greatly reduced toxicity

## Phenoxy acids

Mecoprop  
(MCP)  
93-65-2



Log K<sub>OW</sub>: 3.1  
 WS: 620 mg L<sup>-1</sup>  
 p<sub>vap</sub>: 10<sup>-7</sup> hPa  
 pK<sub>a</sub>: 3.1 (acid)

LD50 (oral): 650 mg kg<sup>-1</sup> rat  
 LD50 (dermal): 900 mg kg<sup>-1</sup> rabbit  
 Carcinogenic (class 1)  
 LC50 124.8 mg L<sup>-1</sup> rainbow trout (96h)  
 EC50 100 mg L<sup>-1</sup> daphnia magna  
 Very toxic to aquatic life

Algaecide  
 not registered under BPR, since Roof protection (higher plants)  
 Pesticide: -

- I. Log K<sub>OW</sub>, WS, p<sub>vap</sub> (eksperimentel data): IRG, CD, IPBC, DR, TBU, PPZ, MI, BIT, OIT, DCOIT (Paulus, 2005); TB, IP, MCP (SRC, 2014). pK<sub>a</sub>: undersøgt med ACD/I-LAB
- II. Tox. Data for IRG, CD, IPBC, DR, MI, BIT, OIT, DCOIT, TBU, PPZ: (Paulus, 2005); TB, IP: [Material Safety Data Sheet]. PNEC: (Burkhardt et al., 2009)
- III. Biocid product typer: PT6 In-can preservatives, PT7 filmkonserveringsmidler, PT8 trækonserveringsmidler, PT9 fiber, læder, gummi og polymeriseret materiale, PT10 Murværkskonservering, PT11 Konserveringsmidler til væskekøle- og forarbejdningssystemer, PT12 Slimicider, PT13 Metalbearbejdningssvæske konserveringsmidler, PT21 Antifouling-produkter (Europa-Parlamentet og Rådet; Europa-Kommissionen, 2013b, a).
- IV. Kosmetiske produktdirektiv (Europa-Parlamentet og Rådet, 2009).
- V. Stoffer mærket Compounds marked (a) bruges som pesticider i Danmark. (in 2010) (Danish Environmental Protection Agency, 2011a), (b) anvendes som plantebeskyttelsesmidler i dansk privat havebrug (in 2010) (Danish Environmental Protection Agency, 2011b), (c) kan findes som pesticider på frugt og grønt, der sælges, men ikke produceres i Danmark (Fødevarestyrelsen, 2011).

## 6.2 Valg af model jord for laboratoriestudier

En lerblandet sandjord (76% sand, 21% silt og 3% ler) fra Københavns Universitets forsøgs-gårde (Mark 26) blev anvendt til alle laboratorieforsøg. En repræsentativ Mark 26 jordprøve blev taget fra pløjelaget (0-20 cm dybde) i november 2013. Jordprøvetagning og opbevaring (mørke ved 5 °C) blev udført i overensstemmelse med OECD 217 guideline (OECD, 2000b). Jorden havde et organisk C indhold på 1.6% og en pH målt i vand på 6.4. Jordens mikrobielle biomasse estimeret på baggrund af substrat-induceret jordrespirationsdata (Anderson and Domsch, 1978) udgjorde 1.06% af jordens totale organiske stof. Jorden havde været anvendt til dyrkning af kornafgrøder (senest byg) og blev gødsket udelukkende ved brug af uorganisk handelsgødning (NPKS). Jorden var dermed sammenlignelig med jorder, der rutinemæssigt anvendes til økotoksikologiske teststudier af jordens mikroorganismer jf. OECD 217 testmetoden (OECD, 2000b).

Tidligere anvendelse af pesticider på marken blev undersøgt ved at gennemgå dyrkningsplaner for Mark 26 i perioden 2006-2013. To af biocidteststofferne undersøgt i denne rapport blev anvendt som fungicider i perioden; nemlig tebuconazol (alle år i perioden 2008-2013) og propiconazol (2006), hvorfor det ikke kan udelukkes, at jordens mikroorganismer havde tilpasset sig til disse to beslægtede stoffer, der begge hæmmer ergosterol biosyntesen i svampe. Sidste sprøjtning med tebuconazol fandt sted i juni 2013 fem måneder inden jordprøvetagningen blev foretaget. Ingen af de øvrige anvendte agrokemikalier på Mark 26 var tæt beslægtede med nogle af de udvalgte biocidteststoffer.

## 6.3 Opsætning af laboratorie mikrokosmos forsøg

### 6.3.1 Biocid nedbrydningskinetik

Jord mikrokosmosforsøg blev udført i 60 mL brune glas med 1 g fugtig jord. Biocider blev på forhånd tilsat til 100 mg sand som carrier og efterfølgende tilsat til 10 g jord i henhold til OECD guideline 217 (OECD, 2000b). For at kunne tilsætte biociderne til sandet, blev biociderne op-

løst i acetone. Efter tilsætning til sandet blev acetonen afdampet natten over. De endelige biocidkoncentrationer i jorden var  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  for isothiazolinoner (methyloisothiazolinone, benzisothiazolinone, octylisothiazolinone, dichlorooctylisothiazolinone) og  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  for alle andre biocider (terbutryn, diuron, isoproturon, iodocarb, tebuconazole, propiconazole, mecoprop). I alt 51 jordmikrokosmosforsøg blev gennemført i dette projekt til fastlæggelse af nedbrydningskinetiken. Glassene blev lukket med aluminiumsfolie for at tillade tilførsel af ilt. Mikrokosmer blev inkuberet ved  $22^\circ\text{C}$  i op til 120 dage (d). En gang om ugen blev vægten af mikrokosmerne målt, og vand blev tilsat til udligning af fordampning for at fastholde et vandindhold på 8-10 % (vægt/vægt). Tre replikater af hver inkubation blev kørt og analyseret. På definerede tidspunkter (0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 22, 29, 36, 42, 55, 72, 87, 100, 118 d) efter inkubationsstart blev jord udtaget og opbevaret ved  $-18^\circ\text{C}$ . Alle prøver blev analyseret på en gang.

### **6.3.2 Økotoksikologiske effekter i laboratorie mikrokosmos**

Alle mikrokosmos procedurer blev udført i overensstemmelse med OECD 217 (OECD; 2000b). Jord blev sigtet (2 mm netstørrelse) og præ-inkuberet i mikrokosmos bestående af 50-mL glasflasker med 25 g jord ved  $22^\circ\text{C}$  i 7-10 dage. Teststoffer blev tilsat jorden ved brug af kvartssand som en 'carrier' ( $10 \text{ mg g}^{-1}$ ). Teststof opløsninger blev lavet i acetone, som efter tilsætning til sand ( $200 \mu\text{L g}^{-1}$  jord) fik lov til at fordampe natten over, inden sandet blev blandet ind i jorden. Testkoncentrationer blev valgt med henblik på at tilvejebringe komplette dosis-respons kurver for at kunne sammenligne forskellige økotoksikologiske test parametres indbyrdes følsomhed.

Alle mikrokosmosjorder blev inkuberet ved  $22^\circ\text{C}$  i mørke. På forskellige tidspunkter blev der udtaget repræsentative mikrokosmos jordprøver til mikrobiologiske og kemiske analyser (se nedenfor). Mikrobielle aktivitetsparametre blev målt efter enten 4 timer, 2 dage, 7 dage eller 40 dage, mens bakteriel samfundstolerance og mikrobiel samfundsstruktur for udvalgte stoffer blev undersøgt efter 40 dage. Koncentrationen af teststofferne blev målt ved forsøgets start (få timer efter tilsætning til jord) og efter 40 dage. Alle jordmikrokosmos blev udluftet adskillige gange i løbet af de 40 dages inkubering og jordfugtigheden blev monitoreret ved vejning for at sikre en konstant jordfugtighed på 8-9 %.

### **6.3.3 Økotoksikologiske effekter i kontrollerede feltforsøg**

Jord blev sigtet (2 mm netstørrelse), præ-inkuberet og tilsat teststoffet DCOIT under kontrollerede laboratorieforhold som beskrevet ovenfor (Afsnit 6.3.2). Udover testjorden (Mark 26) blev der også anvendt en havejord fra Greve Strand syd for København. Jorderne (havejord eller Mark 26 jord) blev herefter inkuberet i nedgravede pletter i havejord (Greve Strand) og i laboratorie mikrokosmos bestående af 50-mL glasflasker med 25 g jord inkuberet som beskrevet ovenfor (Afsnit 6.3.2). Opsætningen af dette forsøg er beskrevet i større detalje i Afsnit 6.5.

## **6.4 Økotoksikologiske effektparametre**

### **6.4.1 Substrat-induceret respiration**

Substrat-induceret respiration (SIR) blev målt som  $\text{CO}_2$  akkumuleringsrater i gasfasen i forseglede serumflasker indeholdende jord udtaget fra jordmikrokosmos (Anderson and Domsch, 1978)(OECD, 2000b). Jord (2 g) blev tilsat 50 mg af en glukose/talkumblanding (4/1) og rystet i hånden i 10 sekunder. Efter 30 min blev serumflasken afgasset med teknisk luft uden  $\text{CO}_2$  og forseglet. Akkumuleret  $\text{CO}_2$  blev målt efter 5-7 timers inkubation ved  $22^\circ\text{C}$  i mørke ved gas-kromatografi (Fernandez-Calvino et al., 2017).

### **6.4.2 Basal respiration**

Basal respiration (BR) blev målt som beskrevet ovenfor for SIR med to ændringer: ingen tilsætning af glukose/talkum blanding til jorden og akkumuleret  $\text{CO}_2$  blev målt efter 19-21 timer.

### 6.4.3 Svampevækst ( $[^{14}\text{C}]$ acetat indbygning i ergosterol)

Mikrosvampes vækst i jord blev målt ved brug af  $[^{14}\text{C}]$ acetat i ergosterol inkuberingsmetoden (Ac-in-Erg) (Newell and Fallon, 1991) tilpasset anvendelse i jord (Bååth, 2001) med visse modifikationer (Rousk et al., 2009). Jord (1 g) blev overført til et reagensrør og tilsat 2 mL Na-acetat opløsning (220  $\mu\text{M}$ ) og 20  $\mu\text{L}$   $[^{14}\text{C}]$ acetat Na salt (7.4 MBq  $\text{mL}^{-1}$  og 2.04 GBq  $\text{mmol}^{-1}$ ; Perkin Elmer, USA). Jordsuspensionen blev inkuberet ved i mørke ved 22 °C i 8 timer, hvorefter 1 mL 5% formalin blev tilsat for at stoppe mikrosvampenes vækst. Ergosterol blev ekstraheret og kvantificeret ved HPLC analyse (UV detektion; 282 nm), hvorefter radioaktiviteten i opsamlede ergosterol fraktioner blev bestemt ved væskescintillationstælling.

### 6.4.4 Bakterievækst ( $[^3\text{H}]$ leucin indbygning)

Jordbakteriers vækst blev målt ved brug af  $[^3\text{H}]$ leucine (Leu) inkorporeringsmetoden (Kirchman et al., 1985) tilpasset anvendelse i jord (Bååth et al., 2001). Jord (1 g) blev tilsat 10 mL destilleret vand og dispergeret ved brug af en multivortex shaker ved maksimum intensitet i 3 minutter efterfulgt af centrifugering (1000  $\times$  g; 10 min). Supernatanten (1,5 mL portioner) indeholdende ekstraherede jordbakterier (jordbakteriesuspension) blev herefter overført til 2-mL mikrocentrifugeringsrør, hvorefter inkubationer startedes ved tilsætning af 2  $\mu\text{L}$   $[^3\text{H}]$ Leu (37 MBq  $\text{mL}^{-1}$  og 5.74 TBq  $\text{mmol}^{-1}$ ; Perkin Elmer, USA) og ikke-radioaktivt Leu til en slutkoncentration på 275 nM Leu i jordbakteriesuspensionen. Bakteriernes vækst blev stoppet efter 2 timers inkubation i mørke ved 22°C ved tilsætning af 75  $\mu\text{L}$  100% trikloreddikesyre. Ikke-inkorporeret  $[^3\text{H}]$ Leu blev fjernet via en serie af centrifugerings/vasketrin som beskrevet tidligere (Bååth et al., 2001).

### 6.4.5 Bakteriel samfundstolerance

Bakteriel samfundstolerance overfor udvalgte teststoffer (isothiazolinoner) blev målt efter 40 dages inkubering (PICT selektionsfase) i jordmikrokosmos. Hvis den bakterielle samfundstolerance til et stof stiger efter længere tids eksponering til stoffet i jord (i vores tilfælde 40 d) betyder det, at jordens bakteriesamfund har responderet ved at udvikle tolerance overfor stoffet, hvilket også kaldes "pollution-induced community tolerance" (PICT). PICT detektion blev foretaget som korttidsinkubationer ved brug af  $[^3\text{H}]$ Leu inkorporeringsmetoden beskrevet ovenfor (Bååth et al., 2001), men med den vigtige modifikation, at ekstraherede bakterier blev udsat for en række forskellige teststofkoncentrationer for på denne måde at kunne måle de ekstraherede bakteriers tolerance overfor teststoffet (Lekfeldt et al., 2014). Jord (2 g) blev tilsat 20 mL destilleret vand og dispergeret ved brug af en multivortex shaker ved maksimum intensitet i 3 minutter efterfulgt af centrifugering (1000  $\times$  g; 10 min). Supernatanten (1350  $\mu\text{L}$  portioner) indeholdende ekstraherede jordbakterier (jordbakteriesuspension) blev herefter overført til 2-mL mikrocentrifugeringsrør, hvorefter der blev tilsat 150  $\mu\text{L}$  teststofopløsning (varierende koncentrationer; se resultater) eller 150  $\mu\text{L}$  destilleret vand (kontroller). Teststoffer blev opløst i vand (MIT) eller i 10% vol/vol DMSO (øvrige teststoffer), hvilket i sidstnævnte tilfælde resulterede i en endelig DMSO-koncentration på 1% vol/vol (Modrzynski et al., 2019). Efter 30 minutters præ-inkubering med teststofferne startedes inkubationerne ved tilsætning af 2  $\mu\text{L}$   $[^3\text{H}]$ Leu (37 MBq  $\text{mL}^{-1}$  og 5.74 TBq  $\text{mmol}^{-1}$ ; Perkin Elmer, USA) og ikke-radioaktivt Leu til en slutkoncentration på 275 nM Leu i jordbakteriesuspensionerne. Bakteriernes vækst blev stoppet efter 2 timers inkubation i mørke ved 22°C ved tilsætning af 75  $\mu\text{L}$  100% trikloreddikesyre. Inkorporeret  $[^3\text{H}]$ Leu blev oprenset via en serie af centrifugerings/vasketrin som beskrevet tidligere (Bååth et al., 2001).

### 6.4.6 Mikrobiel samfundsstruktur - PLFA

Mikrobielle phospholipid fedtsyrer (PLFA) blev ekstraheret fra jord som beskrevet tidligere (Frostegård et al., 1993). Fedtstoffer blev ekstraheret i en kloroform/methanol/citrate buffer og separeret som neutrale lipider, glycolipider og phospholipider i en silica kolonne. Phospholipiderne blev udsat for mild alkalisk methanolyse, hvorefter fedtsyremethylestre blev identificeret ved gaskromatografi (flammeioniseringsdetektor) ved anvendelse af methyl nondecanoat

(19:0) som en intern standard. PLFA blev navngivet ud fra det totale antal C atomer, C-C dobbeltbindinger og dobbeltbindingernes position: præfix "a", "i", "cy" og "Me" blev anvendt for at henviser til henholdsvis "anteiso", "iso", "cyclopropyl" og "methyl" forgreninger. Ikke-specifikke forgreninger blev indikeret af "br", mens "cis" og "trans" konfigurationer blev indikeret med henholdsvis "c" og "t".

Den totale mikrobielle biomasse blev estimeret som summen af alle PLFA: i14:0, 14:0, i15:0, a15:0, 15:0, br16, i16:0, 16:1 $\omega$ 9, 16:1 $\omega$ 7c, 16:1 $\omega$ 7t, 16:1 $\omega$ 5, 16:0, br17, 10Me16a, 10Me16b, i17:0, a17:0, 17:1 $\omega$ 8, cy17:0, 17:0, br18, 10Me17, x3, 18:2 $\omega$ 6, 18:1 $\omega$ 9, 18:1 $\omega$ 7, 18:1, 18:0, 19:1a, 10Me18, cy19 og 20:0. Bakteriernes biomasse blev estimeret som summen af PLFA, der antages i overvejende grad at stamme fra bakterier: i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 $\omega$ 9; 16:1 $\omega$ 7t, i17:0, a17:0, 17:0, cy17:0, 18:1 $\omega$ 7 og cy19:0). Svampenes biomasse blev estimeret ved brug af 18:2 $\omega$ 6 som svampemarkør PLFA (Frostegård & Bååth, 1996). Gram-positive (G<sup>+</sup>) bakteriers biomasse blev estimeret som summen af i14:0, a15:0, i16:0 og 10Me18:0, mens Gram-negative (G<sup>-</sup>) bakteriers biomasse blev estimeret som summen af cy17:0, cy19:0, 16:1 $\omega$ 7c og 18:1 $\omega$ 7 (Zelles, 1999). Normaliserede PLFA-data (relativ forekomst af hver enkelt PLFA fra hver jordprøve) blev desuden anvendt som input til principal komponentanalyse (PCA) for at kunne påvise effekter af teststoffer på mikrobiel samfundsstruktur.

#### 6.4.7 Mikrobiel samfundsstruktur – DNA og RNA

##### Nukleinsyre ekstraktion fra jord

DNA og RNA blev ekstraheret direkte fra jordprøver som beskrevet i manualen for "Fast DNA<sup>®</sup> SPIN kit for Soil" (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Ekstraherede nukleinsyrer blev opbevaret ved -20°C (DNA) eller -80°C (RNA). Nukleinsyre kvaliteten blev konfirmeret ved agarose gel elektroforese. RNA-fractionen blev behandlet med DNase for at fjerne rester af metagenom DNA ved brug af Ambion<sup>®</sup> DNA-free<sup>™</sup> DNase Treatment and Removal Reagents kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Endelig blev Roche Expand<sup>™</sup> Reverse Transcriptase Kit (Roche, Basel, Switzerland) anvendt for at konvertere RNA til komplementært DNA (cDNA).

##### 16S rRNA gen amplikon sekvensering

Det ribosomale 16S RNA gen blev mangfoldiggjort ved en to-trins PCR proces med brug af enten DNA eller cDNA som 'skabeloner' (templates). Det første PCR trin blev foretaget med primerne 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3) og 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3) som beskrevet tidligere (Hansen et al., 2012). PCR-produktet (amplikon) udgør ca. 460 basepar (bp) i den variable V3-V4 region fra målgruppen prokaryoter, der inkluderer domænerne Bacteria og Archaea. Det andet PCR-trin blev foretaget med PCR produktet fra første PCR trin som template ved brug af de samme primere, men denne gang påhæftet tilhørende adaptorer og 'barcode tags' som beskrevet tidligere (Masoud et al., 2011). Oprensning af de ca. 620 bp store amplikons blev udført ved brug af Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) som anført i leverandørens brugsvejledning. DNA-koncentrationer blev målt i et Qubit Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), hvorefter alle oprensede amplikon suspensioner blev poollet i ekvimolære koncentrationer, opkoncentreret ved brug af DNA Clean and Concentrator<sup>™</sup>-5 kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), og sekvenseret (2x250 bp paired-end high-throughput sequencing) på en Illumina<sup>®</sup> MiSeq<sup>®</sup> platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

##### 16S rRNA gene sequence analysis

Amplikon sekvenser blev analyseret med qiime\_pipe ([https://github.com/maasha/qiime\\_pipe](https://github.com/maasha/qiime_pipe)) ved brug af af denne bioinformatiske 'pipeline's standard indstillinger (Caporaso et al., 2010). 'Paired-end mating' blev udført med et minimum længdeoverlap på 50 bp, maksimale 'mismatches' på 15 og en minimum kvalitetsscore på 30. Kriterier for sekvenstrimning (dvs. kaserig af lavkvalitetssekvenser) var baseret på: 1) 'reads' < 200 bp; 2) gennemsnitlig kvalitetsscore < 25; 3) maksimalt antal af tvetydige baser; 4) homopolymer længde  $\leq$  6. Test for kimære amplikon sekvenser blev udført med UCHIME (Edgar et al., 2011) og operationelle taksonomiske enheder ('operational taxonomic units' = OTUs) blev defineret på 97% sekvenslighedsniveau. Den hyppigst forekommende sekvens indenfor hver OTU blev udvalgt som den repræsentative OTU sekvens og blev efterfølgende taxonomisk identificeret ved brug af RDP classifier (Cole et al., 2003) med et konfidensstærskel på 80%. Sekvenser fra to prøver havde for lav

kvalitet og kunne ikke anvendes til efterfølgende analyser (et replikat mindre pr. jordbehandling).

## 6.5 Bakteriel samfundstolerance som en *in situ* eksponeringsindikator

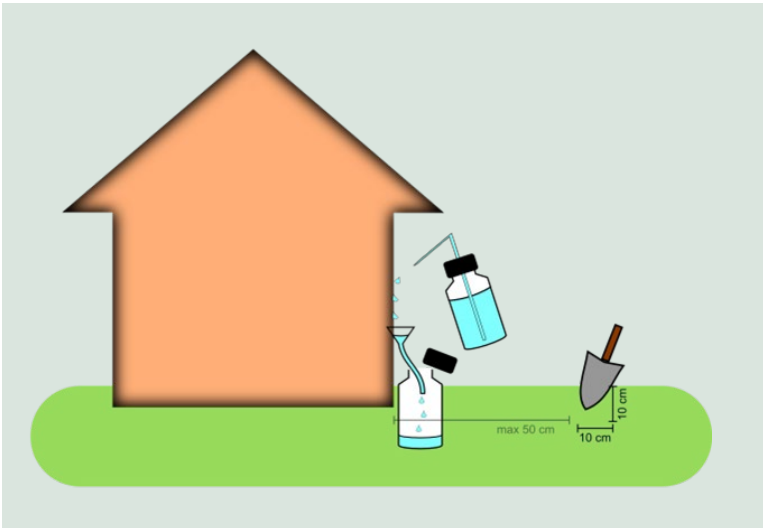
Baseret på resultater fra laboratorieforsøg blev teststoffet DCOIT udvalgt til at undersøge PICT dynamikken over tid i et feltforsøg. Forsøget blev udført i den projektansvarliges private have (opgravet græsplæne) som et randomiseret blokforsøg dels i havejord fra feltlokaliteten og dels i den lerblandede sandjord fra KU-PLENs forsøgsgårde (Mark 26), som blev anvendt til de tidligere laboratorieforsøg. Havejorden havde et betydeligt højere indhold af organisk C (7.7 % vs. 1.6) og en lidt højere pH (7.2 vs. 6.4) end Mark 26 jorden. Ingen af jorderne havde været påvirket af DCOIT eller andre isothiazolinoner jf. dyrkningsplaner for Mark 26 i perioden 2006-2015 og haveejernes viden om anvendte biocidprodukter i perioden 2004-2015. Repræsentative jordprøver blev taget fra de øverste 20 cm d.10. og 11.marts 2015. Jordprøvetagning, opbevaring (mørke ved 5 °C), og tilførsel af teststoffet DCOIT blev udført i overensstemmelse med OECD 217 guideline (OECD, 2000). Jord blev homogeniseret efter sigtning (2 mm netstørrelse) og tilsat forskellige koncentrationer af DCOIT (0, 10, 30 og 90 mg kg<sup>-1</sup>, *n*=12) ved brug af kvartssand som en 'carrier' som beskrevet tidligere (Afsnit 6.3.3). Straks efter tilførsel af teststoffet til de to jordtyper blev jorderne overført til en potteplade, der blev placeret i den opgravede græsplæne. Feltforsøget blev startet d. 16.marts. Parallelt med feltforsøget blev forsøget replikeret under kontrollerede laboratorieforhold som beskrevet i Afsnit 6.3.3 (dog kun for Mark 26 jorden).

Der blev udtaget jordprøver efter 45, 90 og 180 dages inkubation ved at høste tre replikater fra hver jordbehandling i pottepladen. Jordbakteriernes tolerance overfor DCOIT blev målt ved brug af [<sup>3</sup>H]Leu inkorporeringsmetoden som beskrevet i Afsnit 6.4.5.

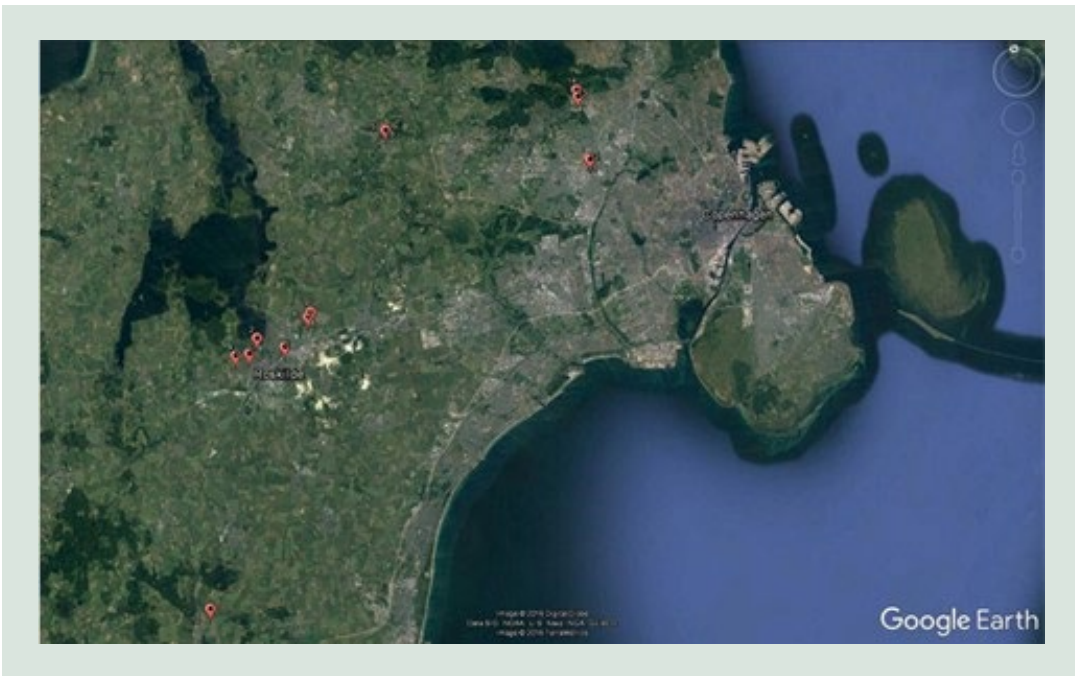
## 6.6 Feltmonitoring af biocider i jord

Figur 1 viser en oversigt over prøvetagningsprincipper og -lokaliteter. I alt 16 huse, hvor der var forventet at de var behandlet med biocider (fx. malet træ, udvendigt varmeisoleringsystem) og som var bygget eller renoveret inden for de seneste fem år, blev udvalgt indenfor Hovedstadsområdet (Danmark) i samarbejde med Boligselskabet Sjælland ([www.bosj.dk](http://www.bosj.dk), nr. 1-10) og DAB ([www.dabbolig.dk](http://www.dabbolig.dk) (nr. 11-14)). Endvidere indgik et privat hus (nr. 15) og et skur (nr. 16) i undersøgelsen. I de fleste tilfælde kunne brugen af biocider på forhånd ikke bekræftes. Facadeoverflader blev skyllet med vand og analyseret for biocider ved hjælp af HPLC-MS/MS, som beskrevet i afsnit 6.7.4. Jordprøver (ca. 10x10 cm<sup>2</sup> og 10 til 20 cm dybde) blev udtaget med en metalskovl direkte ved facaden (Figur 1a) En delprøve på 1 g af hver prøve blev ekstraheret med accelereret solvent ekstraktion og analyseret ved HPLC-MS/MS som beskrevet i afsnit 6.7.





**FIGUR 1.A.** Prøvetagningsprincipper for vand og jordprøver.



**FIGUR 1.B.** Kort over prøvetagningslokaliteter i Roskilde (9 prøver), København (4 prøver), Borup (1 prøve) og Væksø (2 prøver).



FIGUR 1.C. Fotos af prøvetagningssteder med tilhørende bygningsfacader.

## 6.7 Kemiske analyser af teststoffer og deres nedbrydningsprodukter i jord

### 6.7.1 Kemisk ekstraktion af teststoffer fra jord

Prøver (0.5 g ww jord) af to inkubationer for hvert biocid (med høj og middel koncentration) fra de økotoksikologiske eksperimenter (Afsnit 6.3.2) blev ekstraheret for fastlæggelse af eksponeringskoncentrationer. 1 g fugtig jord fra hvert mikrokosmos (nedbrydningskinetik, Afsnit 6.3.1) blev udtaget, og jordprøverne blev ekstraheret (feltmonitoring af biocider i jord, Afsnit 6.6). Ekstraktionen forgik vha. accelereret solvent ekstraktion (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Jordprøver blev blandet med 1,5 g Hydromatrix (Varian, Palo Alto, CA, USA) i 11 mL ekstraktionsceller. Overskydende plads i cellerne blev fyldt op med Ottawa sand. Ekstraktionerne forgik ved 80°C og 1000 psi tryk med methanol (LiChrosolv gradient grade, Merck, Darmstadt, Tyskland) som solvent i 2 ekstraktionscyklusser: statisk tid 5 min, preheating time 1 min, flush 60%, purge 60%. Derefter blev 50 µL af isotop-mærkede standarder (1 µg mL 1 carbendazim-D4, diuron-D6, iodocarb-D9, isoproturon-D6, methylisothiazolinone-D3, octylisothiazolinone-D17, tebuconazole-D6, terbutryn-D5 i methanol) tilsat til 1 mL delprøver af den

primære ekstrakt inden analyse vha. high performance liquid chromatography koblet til tandem masse spektrometri (HPLC-MS/MS). Relative genfindinger af biociderne (Tabel 2), terbutryn metabolitter (Tabel 3) og OIT-metabolitter (Tabel 4) var mellem 67 and 112%.

**TABEL 2.** Ekstraktionsgenvinding (%) for biocider i jord (n=20, koncentrationsområde: 0,03-300 mg g<sup>-1</sup>).

	MI	BIT	IP	IPBC	DR	TB	IRG	OIT	TBU	DCOIT	PPZ	CD	MCP
Recovery	88	70	104	103	101	108	109	91	98	84	112	104	67
StDev	14	20	6	16	7	9	8	21	22	45	13	14	32

MI: Methylisothiazolinone, BIT: Benzisothiazolinone, IP: Isoproturon, IPBC: Iodocarb, DR: Diuron, TB: Terbutryn, IRG: Cybutryn, OIT: Octyl- isothiazolinone, TBU: Tebuconazole, DCOIT: Dichloroethylisothiazolinone, PPZ: Propiconazole, CD: Carbendazim, MCP: Mecoprop

**TABEL 3.** Ekstraktionsgenvinding (%) for terbutryn nedbrydningsprodukter i jord (n=4, koncentration: 0,3 µg g<sup>-1</sup>).

	TBM	TB-SO	M1	TB-DesS	TB-DesS-DesE	TB-DesS-DesB	TB-OH-DesB	TB-OH-DesE	TB-OH
Recovery	141	79	145	95	108	91	53	92	106
StDev	7	4	6	4	6	7	8	2	3

TBM: Terbumeton, TB-SO: Terbutryn-sulfoxide, M1: Desethyl-terbutryn, TB-DesS: Desthiomethyl-terbutryn, TB-DesS-DesE: Desethyl-desthiomethyl-terbutryn, TB-DesS-DesB: Desbutyl-desthiomethyl-terbutryn, TB-OH-DesB: Desbutyl-2-hydroxy-terbutryn, TB-OH-DesE: Desethyl-2-hydroxy-terbutryn, TB-OH: 2-hydroxy-terbutryn

**TABEL 4.** Ekstraktionsgenvinding (%) for octylisothiazolinon nedbrydningsprodukter i jord (n=4, koncentration: 0,3 µg g<sup>-1</sup>).

	OAM	OFA	OAA	OPA	OT	OMA	OOA
Recovery	65	94	101	104	100	245	85
StDev	0.5	1	1	1	1	14	12

OAM: Octylamine, OFA: *N*-Octylformamide, OAA: *N*-Octylacetamide, OPA: *N*-Octylprop-2-enamide, OT: 3-Octylthiazol-2(3*H*)-one, OMA: *N*-Octyl malonamic acid, OOA: *N*-Octyl oxamic acid

## 6.7.2 Kvantificering af teststoffer ved HPLC-MS/MS

Biocider blev analyseret med højopløsende væskekromatografi med massespektrometrisk detektion (HPLC-MS/MS) ved brug af positivt electrospray ionization (ESI(+)) på en Ultimate 3000 dual gradient low pressure mixing HPLC-system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) koblet til en API 4000 triple-quadrupole-MS (AB Sciex, Framingham, MA, USA) (Bollmann et al., 2014). Udover biocider blev der også målt transformationsprodukter (TP) af terbutryn og octylisothiazolinon (Bollmann et al., 2016, 2017). TP af terbutryn blev dels analyseret med en neutralt eluent (vand/metanol) og dels med en sur eluent (vand/acetonitril med 0.2% myresyre), mens TP af OIT alle blev målt med en sur eluent (Tabel 5). Alle parametre for massespektrometri analyserne findes i Bollmann et al., 2016 og 2017.

**TABEL 5.** HPLC-gradienter og søjleparametre anvendt til analyse af biocider og nedbrydningsprodukter.

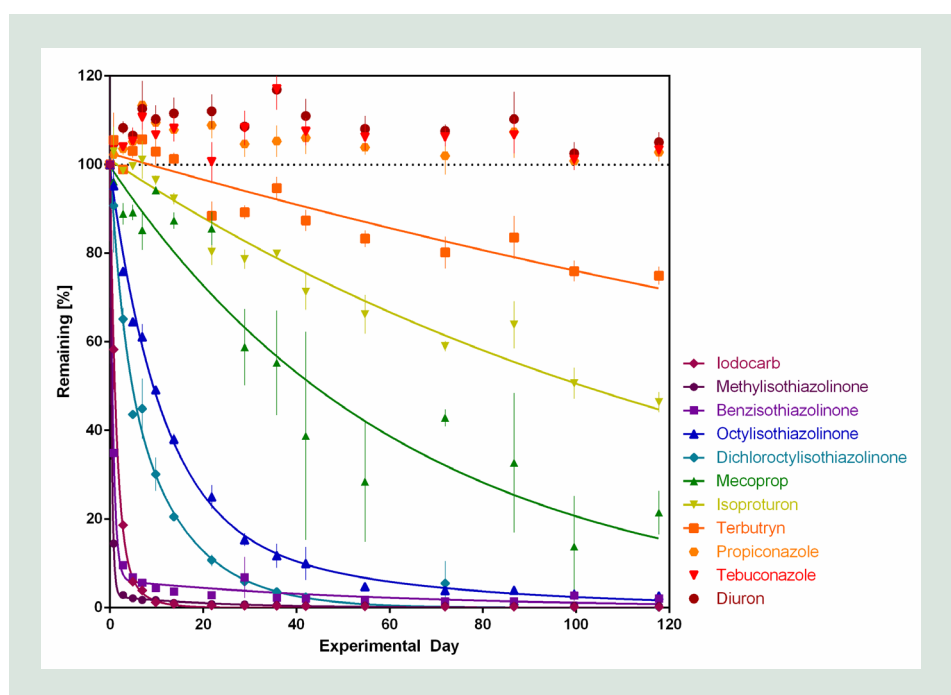
Compounds	Column	Gradient
Biocides	Synergy 4u Polar-RP 80Å, 150 x 2 mm Phenomenex, Torrance, CA, USA 5°C	Water (A) and methanol (B): 250 µL min <sup>-1</sup> 0-3 min 0% B, 3-5 min 0→50% B, 5-15 min 50→80% B, 15-15.5 min 80→100% B, 15.5-19 min 100% B, 19-20 min 100→0% B, 20-25 min 0% B Post column acidification: 0.2% formic acid in water (30 µL min <sup>-1</sup> )
TPs neutral Terbumeton Terbutryn-sulfoxide Desethyl-terbutryn Desthiomethyl-terbutryn Desethyl-desthiomethyl- terbutryn Desbutyl-desthiomethyl- terbutryn	Synergy 4u Polar-RP 80Å, 150 x 2 mm Phenomenex, Torrance, CA, USA 5°C	Water (A) and methanol (B): 300 µL min <sup>-1</sup> 0-2.5 min 0% B, 2.5-3.5 min 0→50% B, 3.5-9.5 min 50→100% B, 9.5-11min 100% B, 11-11.5min 100→0% B, 11.5-15min 0% B Post column acidification: 0.2% formic acid in water (30 µL min <sup>-1</sup> )
TPs acidic Octylamine N-Octylformamide N-Octylacetamide N-Octylprop-2-enaminde 3-Octylthiazol-2(3H)-one Desbutyl-2-hydroxy-terbutryn Desethyl-2-hydroxy-terbutryn 2-Hydroxy-terbutryn	Synergy 4u Polar-RP 80Å, 150 x 2 mm Phenomenex, Torrance, CA, USA 5°C	Water/ 0.2% formic acid (A) and acetonitrile/ 0.2% formic acid (B): 300 µL min <sup>-1</sup> 0-1 min 2% B, 1-2 min 2→40% B, 2-10 min 40→75% B, 10-10.5 min 75→100% B, 10.5-12 min 100% B, 12-12.5 min 100→2% B, 12.5-15 min 2% B
TPs acidic N-Octyl malonic acid N-Octyl oxamic acid	Kinetiex 2.6u PFP 100Å, 50 x 2.1 mm Phenomenex, Torrance, CA, USA 25°C	Water/ 0.2% formic acid (A) and methanol/ 0.2% formic acid (B): 250 µL min <sup>-1</sup> 0-1 min 0% B, 1-4.5 min 0→100% B, 4.5-6.5 min 100% B, 6.5-6.8 min 100→0% B, 6.8-12.5 min 0% B

# 7. Resultater og diskussion

## 7.1 Biocid nedbrydningskinetik i laboratiemikrokosmos forsøg

### 7.1.1 Nedbrydningskinetik – primær nedbrydning

Mere end 97% af isothiazolinonerne og iodocarb blev nedbrudt (fjernet) i løbet af 120 dage under de fastlagte inkubationsbetingelser, imens kun 78% af mecoprop, 54% af isoproturon, og 25% af terbutryn blev nedbrudt (Figur 2). Isothiazolinoner og iodocarb blev hurtig nedbrudt med halveringstider mindre end 10 dage (d) (MI 0,28 d, BIT 0,52 d, IPBC 1,05 d, DCOIT 4,8 d, OIT 9,3 d) (Tabel 6), og nedbrydning forløb med første ordens kinetik i to faser. Mecoprop, isoproturon og terbutryn blev nedbrudt meget langsomt (halveringstid MCPP 44 d, IP 100 d, TB 231 d) med enkeltfase første ordens kinetik. Diuron, tebuconazole og propiconazole var persistent under de fastlagte betingelser (halveringstid  $\gg$  120 d).



**FIGUR 2.** Nedbrydningskinetik for biocider i jord. Error bars: standardfejl af middelværdi (n=3); enkelt førsteordenskinetik: terbutryn, isoproturon, mecoprop; tofaset førsteordens kinetik: methylisothiazolinon, benzisothiazolinon, octylisothi-azolinon, dichloroethylisothiazolinon, iodocarb.

Vores resultater i dette projekt kan kun sammenlignes med ganske få referencer: f.eks. omkN-ring isothiazolinoner (i.e. methyl- and dichloroethylisothiazolinone) (Krzeminski et al., 1975a; Jacobson and Williams, 2000). Selv om isothiazolinoner er de mest anvendte biocider i filmbeskyttelse for maling og puds, er der ikke mange data til sammenligning for OIT. Dette projekt viser, at OIT blev nedbrudt langsommere end dichloroethylisothiazolinone og er de faktisk den isothiazolinon, som nedbrydes langsomst. Både terbutryn og mecoprop blev nedbrudt fire gange langsommere i dette projekt sammenlignet med andre studier (Brandhorst Daho, 1994; Paszko et al., 2016), selv om betingelser var sammenlignelige (Brandhorst Daho, 1994). Iodocarb blev også nedbrudt signifikant langsommere i dette projekt end i tidligere studier (Jørgensen et al., 2000; European Parliament and Council, 2008). Der er ikke information om tidligere forsøg med eksponering af jord til stofferne, så der kan ikke foretages en sammenligning

på akklimatisering af jord, som er tilsat stofferne. Halveringstid af isoproturon og diuron var svarende til andre studier (Sørensen et al., 2003; Giacomazzi & Cochet, 2004; Alletto et al., 2006). I Herrero-Hernández et al., 2011 blev nedbrydning af tebuconazol vist at være bifasisk med en halveringstid på 800 d (US-EPA, 2000), og for propiconazol er der rapporteret om halveringstider på mellem 200 d til mere end et år (Bromilow et al., 1999; Kim et al., 2003), imens der for denne triazol ikke kunne påvises nogen nedbrydning i løbet af 120 d (den eksperimentielle periode i dette projekt).

Biociderne i dette projekt tilhører forskellige stofgrupper (isothiazolinoner, triaziner, phenylureaer, carbamater, triazoler og phenoxy syrer), som hver især også er relevante i forbindelse med landbrugets anvendelse af pesticider. Dette studie er det første, som samler disse biocider i et enkelt eksperiment. I den nuværende praksis bliver kombinationer af biocider ofte brugt i maling og puds, og derfor er også kombinationseksperimenter vigtige.

For at få en ide om betydning af nedbrydning kontra udvaskning blev regnhypigheden (igen-nemsnitlig regn hver uge i Nordeuropa) sat i forhold til nedbrydningshastighed (European Environment Agency, 2009). Det viste, at der for methyl- og benzisothiazolinone samt iodocarb ikke er en særlig stor risiko for, at der akkumuleres biocidrester i jord.

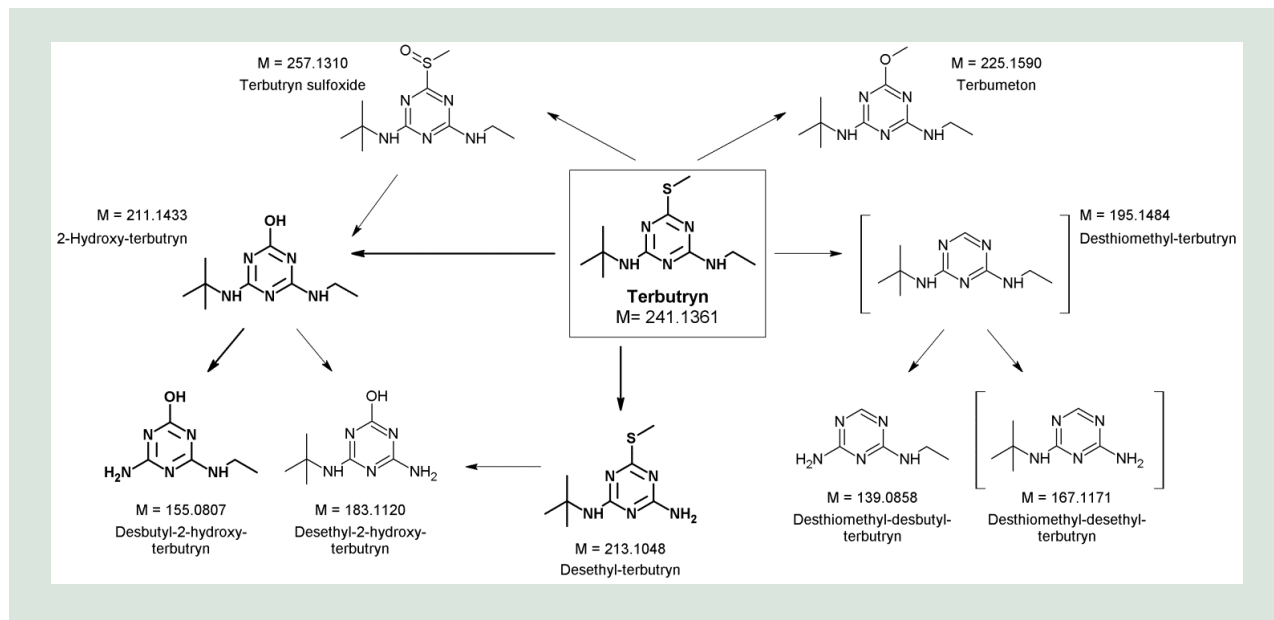
Sandsynligheden for akkumulering af octyl- and dichlorooctylisothiazolinone er ligeledes lille. Til gengæld er der stor sandsynlighed for, at der en ligevægt mellem emission og nedbrydning for disse to stoffer, da emissionsintervaller (regn) svarer til halveringstid (Tabel 6). Nedbrydning af mecoprop, isoproturon og terbutryn er så langsom, at akkumulering omkring bygninger, som er behandlet med disse biocider, er sandsynlig. Worst case scenario, dvs. alt udvasket biocid bliver akkumuleret i den jord afløbsvandet infiltreres i, er realistisk for diuron, tebuconazole og propiconazole.

**TABEL 6.** Nedbrydningshastighedskonstanter og halveringstider bestemt i denne undersøgelse.

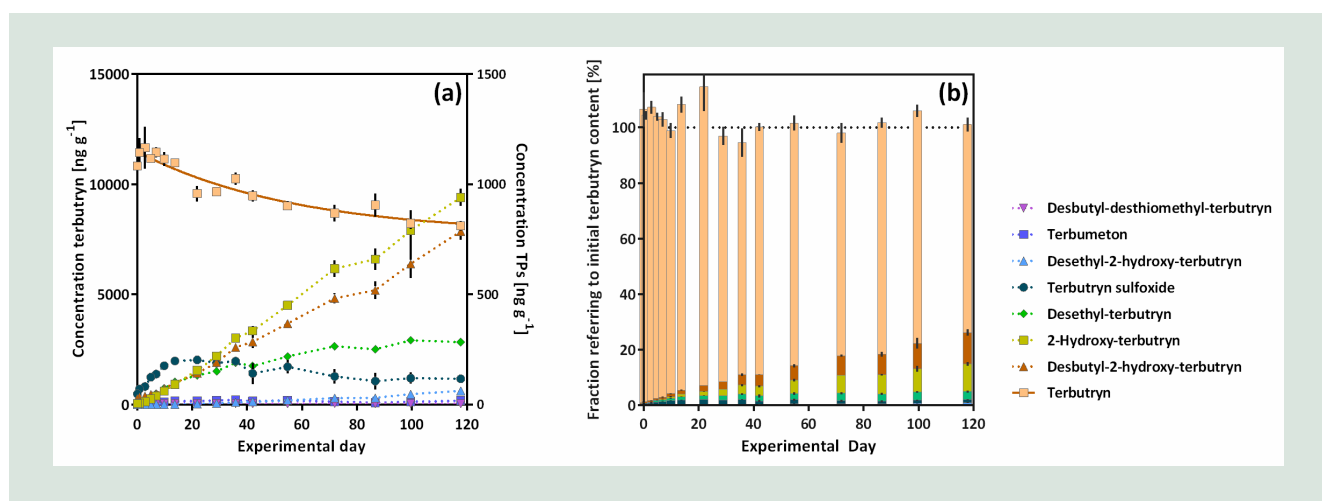
Group Compound	Degradation rate constants [d <sup>-1</sup> ] (percent fast 1)	Half-life [d]
<b>Triazines</b>		
Terbutryn	0.003	231
<b>Carbamates</b>		
Iodocarb	0.75 / 0.22 (86.8)	1.05
<b>Isothiazolinones</b>		
Methylisothiazolinone	2.62 / 0.045 (97.4)	0.28
Benzisothiazolinone	1.47 / 0.017 (93.7)	0.52
N-Octylisothiazolinone	0.092 / 0.021 (80.2)	9.3
Dichloro-N-octylisothiazolinone	0.35 / 0.079 (38.3)	4.8
<b>Phenylureas</b>		
Isoproturon	0.007	100
Diuron	-	> 2500 2
<b>Triazoles</b>		
Tebuconazole	-	> 2500 2
Propiconazole	-	> 2500 2
<b>Phenoxy acids</b>		
Mecoprop	0.016	44
1) Percent Fast: brøkdelen af spændvidden, som den hurtigste af de to konstanter udgør. 2) Estimeret baseret på 6% standard afvisning første orden kinetik.		

### 7.1.2 Nedbrydningskinetik – nedbrydningsprodukter og massebalancer

Octylisothiazolinons nedbrydningsprodukter (metabolitter) er ikke tidligere blevet rapporteret i litteraturen og rapporter om terbutryn metabolitter er sjældne. Derfor blev disse to stoffer undersøgt mere detaljeret. Nedbrydning kan enten ske fuldstændig (mineralisering) eller ufuldstændig (primært metabolisme med dannelsen af metabolitter).



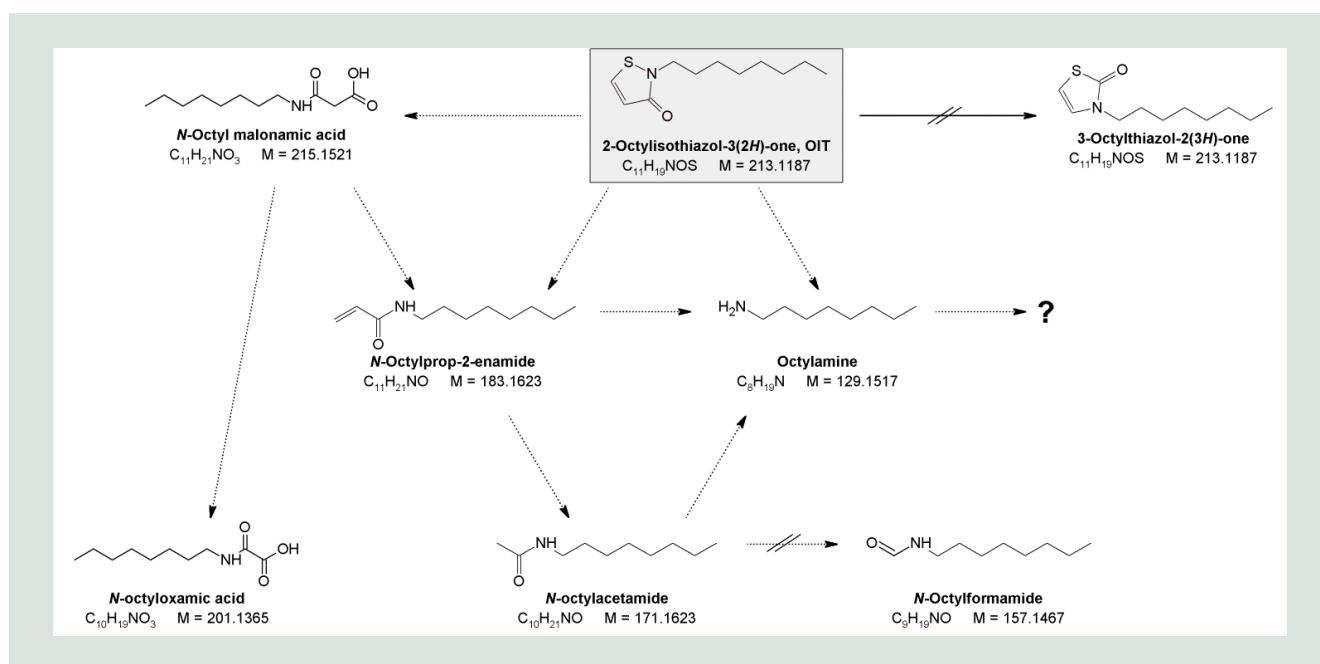
FIGUR 3. Nedbrydningskema for terbutryn i jord (stoffer i klammer var under detektionsgrænserne).



FIGUR 4. (a) Koncentrationer af terbutryn og terbutryn metabolitter (TPs) over tid og (b) den totale masse balance af terbutryn; error bars: standardafvigelse af middelværdi (n=3).

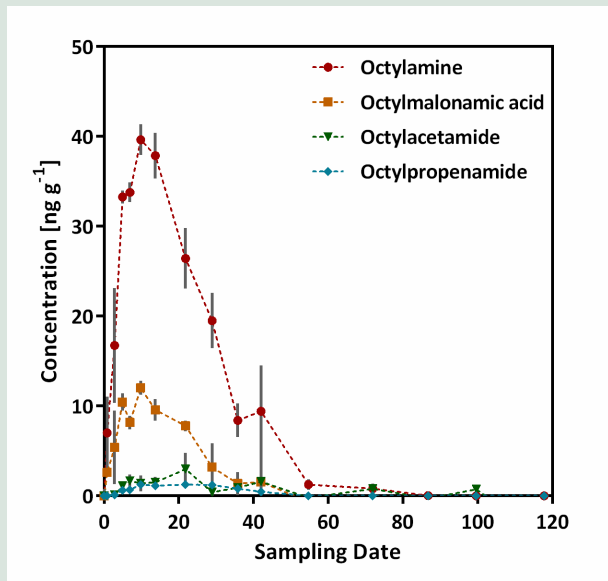
Figur 3 viser nedbrydningsveje for terbutryn, mens Figur 4 viser koncentrationer af terbutryn og terbutryn metabolitter (TPs) over tid inklusiv evidens for komplet massebalance over hele forsøgsperioden på 120 d. Efter 120 d kunne 26% af terbutryn detekteres som metabolitter. De primære metabolitter er desbutyl-2-hydroxy terbutryn (11%), 2-hydroxy-terbutryn (10%) og desethyl-terbutryn (ofte refereret til som M1; 3%) (Figur 4b). Imens koncentrationer af desethyl-terbutryn ikke ændres så meget efter at der er opnået en koncentration på 250 ng g<sup>-1</sup> efter 50 d, så stiger koncentrationen af desbutyl-2-hydroxy terbutryn, og 2-hydroxy-terbutryn løbende, hvilket viser, at disse metabolitter er persistente. Terbutryn-sulfoxide, som tidligere er

beskrevet som mellemprodukt i forbindelse med spildevandsbehandling (Luft et al., 2013), blev dannet med stigende koncentrationer over tid i de første 20 dage og blev derefter nedbrudt til koncentrationer omkring  $150 \text{ ng g}^{-1}$ . Terbutryn-sulfoxide er derfor ikke persistent men et midlertidigt nedbrydningsprodukt i jord (Figur 4a). Harada et al. (Harada et al., 2006) har publiceret, at *Bacillus cereus* stamme JUN7 kan nedbryde methylthio-s-triazines via sulfoxider til de tilsvarende 2-hydroxy-derivativer, hvilket er en tidligere foreslået reaktionsvej (Kaufman and Kearney, 1976). Transformation af terbutryn sulfoxide til 2-hydroxy-terbutryn kan forklare den hurtige dannelse af 2-hydroxy-terbutryn på bekostning af terbutryn sulfoxide efter 20 d inkubation. 2-hydroxy-terbutryn blev således yderligere nedbrudt. Imens fotonedbrydningsprocesser primært danner produkter, som har mistet en sidekæde såsom ethyl-gruppen (Bollmann et al., 2016), så er tab af butyl-gruppen mere dominerende for nedbrydning i jord. Denne observation gælder som minimum for de reaktioner der sker på thiomethyl-gruppen (2-hydroxy-terbutryn, desthiomethyl-terbutryn). Desbutyl-2-hydroxy-terbutryn og desbutyl-desthiomethyl-terbutryn blev fundet i højere koncentrationer end desethyl-derivaterne (Figur 4).



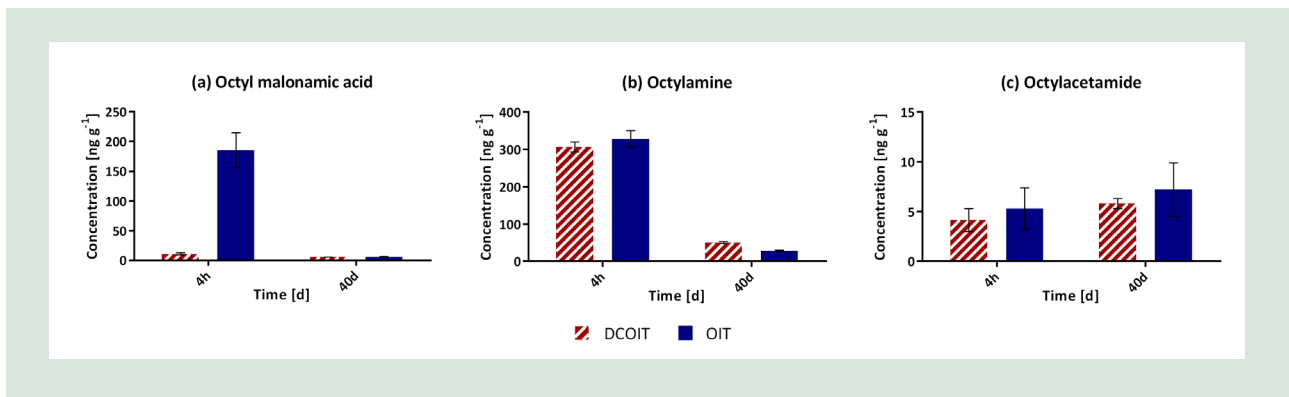
**FIGUR 5.** Nedbrydningskema for octylisothiazolinone i jord.





**FIGUR 6.** Koncentrationer af octylisothiazoli-  
none/dichlorooctylisothiazolinone metabolitter over tid; er-  
ror bars: standardafvigelse af gennemsnit (n=3).

Octylisothiazolinone er almindelig anvendt til filmbeskyttelse i facadeprodukter (Paulus, 2005). Baseret på tidligere nedbrydningsstudier på chloromethyl- og dichlorooctylisothiazolinone (Krzesinski et al., 1975b; Williams and Jacobson, 1999) samt fotonedbrydning af octylisothiazolinone (Bollmann et al., 2017) blev en række mulige transformationsprodukter udvalgt og analyseret (Figur 5). Ud af de 7 blev 4 detekteret i jordprøverne fra inkubationsforsøget: Octylamine (op til 40 ng g<sup>-1</sup>), octylmalonic syre (op til 12 ng g<sup>-1</sup>), octylacetamide (op til 3 ng g<sup>-1</sup>), og octylpropenamide (op til 1,3 ng g<sup>-1</sup>). Octylamine, octylmalonic syre, og octylpropenamide blev dannet i starten af forsøget (Figur 6). Ingen af disse metabolitter blev påvist at være persistente, da alle koncentrationer faldt til mindre end 1 ng g<sup>-1</sup> efter 10-20 d, dvs. mindre end 0.01% af den tilsatte mængde OIT. Nedbrydningsforsøg med enkeltstoffer har vist, at de fleste nedbrydningsprodukter kan stamme fra både octyl- og dichlorooctylisothiazolinone nedbrydning; kun octylmalonic syre bliver hovedsagelig dannet fra octylisothiazolinone (Figur 7). På grund af dette overlap i nedbrydningsprodukter var det ikke muligt at beregne den totale massebalance for octylisothiazolinone ud fra dette forsøg. Til gengæld kan det konkluderes, at ingen af OIT metabolitterne akkumuleres i jord. Dannede metabolitter omdannes videre og er ikke stabile i jord.



**FIGUR 7.** Nedbrydningsprodukter for DCOIT og OIT (jordkoncentration 50 µg g<sup>-1</sup>; inkubation for 4 timer og 40 dage; error bars: range, n=2).

### 7.1.3 Validering af teststofkoncentrationer i økotoxikologiske tests

Ud over de detaljerede biocidnedbrydningsstudier rapporteret i afsnit 7.1.1 og 7.1.2 blev der også udført kemiske analyser af teststofferne efter første og sidste prøvetagning henholdsvis 4 timer og 40 dage efter tilsætning af teststofferne til de mikrokosmos, der blev anvendt til at undersøge økotoxikologiske effekter på jordens mikroorganismer (se Afsnit 7.2).

De kemiske analyser blev udført for to koncentrations niveauer for hvert teststof, og resultaterne er vist i nedenstående tabel (Tabel 7).

I overensstemmelse med de detaljerede nedbrydningskinetik data rapporteret i Afsnit 7.1.1 var isothiazolinonerne de hurtigst nedbrydelige blandt de undersøgte teststoffer (Tabel 7). For den højeste koncentration (50 mg kg<sup>-1</sup>) af de 4 isothiazolinoner kunne 39-97 % af de tilsatte mængder genfindes i jordprøverne udtaget efter 4 timer, mens kun 2-28 % kunne genfindes for den lave koncentration (3,1 mg kg<sup>-1</sup>). Vi valgte derfor også at analysere de isothiazolinone-spikede sandfraktioner, som blev anvendt til at spike jorderne. De gennemsnitlige genfindingsprocenter var 47±8 (BIT), 69±14 (DCOIT) og 82±17% (OIT). Sandprøverne med MIT var desværre gået tabt og kunne ikke analyseres. Tilsammen viser vores resultater, at vi muligvis har tilført en lidt mindre mængde af BIT til jorderne end forventet, mens der ikke ser ud til at være et tilsvarende problem for de tre øvrige isothiazolinoner. Til gengæld viser resultaterne også, at alle fire isothiazolinoner blev nedbrudt ekstremt hurtigt efter tilførsel i lave doser, hvorfor mikroorganismene for lav-dosisbehandlinger kun blev udsat for den forventede dosis i et meget kort tidsrum (<8 timer).

For de øvrige mere persistente teststoffer var genfindingsprocenterne i jordprøver udtaget efter 4 timer generelt acceptable (Tabel 7), idet det dog skal understreges, at der vil være en forventelig heterogenitet i fordelingen af teststofferne i jordmikrokosmos, selv om man forsøger at indblande sandet i jorden så homogent som muligt. Den ekstremt lave genfinding på blot 4% for den lave koncentration af tebuconazol (TBU) er dog klart uacceptabel, idet dette stof forventeligt er relativt persistent i jorden. Vi kan derfor desværre ikke udelukke, at der er sket fejl i forbindelse med doseringen af TBU til nogle af testjorderne.

**TABEL 7.** Biocidkoncentrationer for økotoxikologiske forsøg

	Spike [mg/kg]	Incubation time: 4 h			Incubation time: 40 d				
		Average [mg/kg]	StDev <sup>1</sup>	N	Spike vs. detected [%]	Average [mg/kg]	StDev <sup>1</sup>	N	Degr. [%]
OIT medium	3.1	0.34	0.06	2	11	0.03	0.001	2	90.2
OIT high	50	36	0.03	2	69	3.0	0.15	2	91.5
MIT medium	3.1	0.11	0.03	2	4	0.01	0.002	2	90.2

MIT high	50	42	2.0	2	84	0.14	0.02	2	99.7
BIT medium	3.1	0.08	0.005	2	2	0.02	0.003	2	77.2
BIT high	50	19	5.2	2	39	1.7	1.45	2	91.2
DCOIT medium	3.1	0.9	0.3	2	28	0.12	0.10	2	86.2
DCOIT high	50	49	7.5	2	97	27	0.37	2	45.8
MCPP medium	25	21	1.2	2	84	3.5	0.15	2	83.0
MCPP high	400	113	1.5	2	28	66	7.38	2	41.4
PPZ medium	50	61	3.0	2	122	47	6.11	2	22.3
PPZ high	800	614	25	2	77	484	8.94	2	21.3
TBU medium	100	3.7	3.1	2	4	0.01	0.002	2	99.7
TBU high	800	620	51	2	78	517	85	2	16.6
DR medium	100	75	5.4	2	75				
DR high	800	572	47	2	71				
CD medium	50	97	9.7	2	194				
CD high	400	859	95	2	215				

<sup>1</sup> Standardafvigelse for 2 værdier.  
N: antallet af gentagelser.

## 7.2 Effekter af modelstoffer på jordens mikroorganismer – mikrobiel aktivitet

De i alt 12 modelstoffers effekter på mikrobiel aktivitet blev undersøgt ved brug af 4 økotoxikologiske testparametre ('endpoints'): bakterievækst ( $[^3\text{H}]$ leucin indbygning i proteiner), svampevækst ( $[^{14}\text{C}]$ acetat-indbygning-i-ergosterol), substrat-induceret respiration (SIR;  $\text{CO}_2$  produktionsrate fra jord tilsat glukose) jf. OECD 217 test metoden og basal respiration ( $\text{CO}_2$  produktionsrate fra jord uden substrattilsætning). Resultaterne vil her blive præsenteret separat for alle grupper af teststoffer, således at de forskellige testparametre kan sammenlignes for hvert enkelt biocid. I forbindelse med hvert enkelt biocid refereres endvidere til eventuelle tidligere undersøgelser af teststoffernes effekter på mikroorganismers aktivitet i jord. Til slut i Afsnit 7.2 diskuteres resultaterne opnået for alle stofferne kort samlet med henblik på at sammenligne resultater fra de testede økotoxikologiske parametre i forhold til at måle toksiske effekter af biocider på jordens mikrobielle aktivitet.

### 7.2.1 Mikrobiel aktivitet i jordmikrokosmos over tid

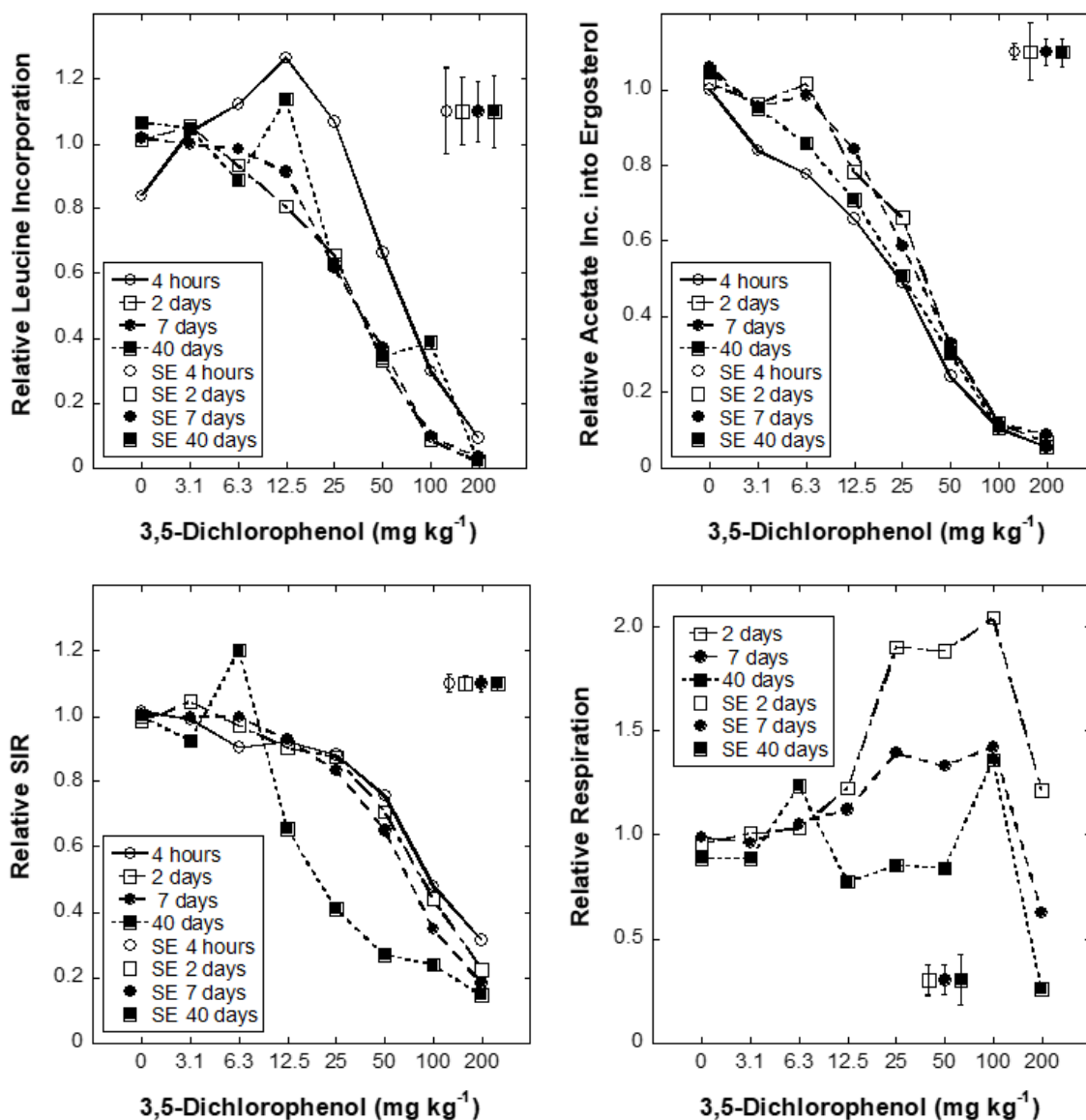
Kemiske stoffers toksiske effekter i jordens mikroorganismer undersøges for OECD 217 testmetodens vedkommende i kontrollerede jordmikrokosmosforsøg. Mikrokosmosforsøg er i mange tilfælde fundet at give sammenlignelige resultater i forhold til feltforsøg. I forhold til at undersøge genopretning af mikrobiel aktivitet efter en initial påvirkning fra et giftstof, kan mikrokosmos dog have en begrænsning, da den mikrobielle aktivitet generelt falder over tid i laboratoriemikrokosmos, hvilket derfor kan føre til en underestimering af mikroorganismernes evne til at genoprette deres aktivitet og artssammensætning. Tabel 8 viser dynamikken for mikrobiel aktivitet i vores mikrokosmosforsøg over 40 dage og viser generelt, at den mikrobielle aktivitet forblev på et acceptabelt højt niveau over de 40 dage, selv om den som forventet udviste en faldende tendens. Som eneste undtagelse udviste SIR raten ikke nogen faldende tendens, hvilket også var forventeligt, da SIR er en potential mikrobiel aktivitet, der måles efter tilsætning af glukose til jorden. Hvis der ikke er toksiske stoffer i jorden, antages SIR ofte for at være et godt mål for den mikrobielle biomasse i jorden (Anderson & Domsch, 1978). Til forskel herfor repræsenterer  $[^3\text{H}]$ leucin indbygning (bakterievækst),  $[^{14}\text{C}]$ acetat-i-ergosterol indbygning (svampevækst) og basal respiration (generel heterotrof mikrobiel aktivitet) aktuelle mikrobielle aktiviteter i jorden, der typisk vil variere mere over tid end den mikrobielle biomasse (Rousk & Bååth, 2011).

**TABEL 8.** Mikrobielle aktiviteter i kontroljorder uden tilsætning af biocider udtaget fra mikrokosmos på forskellige tidspunkter (middelværdier  $\pm$  spredning; n=3). De viste resultater stammer fra mikrokosmosforsøget med propiconazol som teststof, men er repræsentative for alle vores forsøg.

Tid	Leucin inkorporering (pmol h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	Acetate-i-ergosterol inkorporering (pmol h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	Substrat-inducet respiration (SIR) (µg CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	Basal jord respiration (BR) (µg CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )
4 timer	11.1 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 0.2	-
2 dage	13.0 $\pm$ 2.3	6.1 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	0.28 $\pm$ 0.01
7 dage	13.9 $\pm$ 1.4	5.4 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.1	0.23 $\pm$ 0.02
40 dage	6.0 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	0.19 $\pm$ 0.00

### 7.2.2 Effekter af 3,5-diklorphenol på jordens mikrobielle aktivitet

Stoffet 3,5-diklorphenol (3,5-DCP) anvendes ofte som et referenceteststof i økotoxikologiske undersøgelser og vi inddrog derfor dette stof i vores undersøgelse. Resultaterne for de 4 økotoxikologiske testparametre er vist i Figur 8. Basal respiration (BR) blev generelt stimuleret af 3,5-DCP koncentrationer op til 100 mg kg<sup>-1</sup>, men effekten aftog over tid og kunne ikke længere observeres efter 40 dage. For de øvrige 3 testparametre sås klare 3,5-DCP dosis-respons sammenhænge, der indikerede en toksisk effekt af teststoffet allerede efter 4 timer og helt op til efter 40 dages inkubation. Følsomheden af de 3 tests faldt i flg. rækkefølge (Tabel 9): bakterievækst > svampevækst > SIR, men til gengæld fulgte reproducérbarheden på målingerne den omvendte rækkefølge for de 3 tests.



**FIGUR 8.** 3,5-Diklorofenol (3,5-DCP) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af 3,5-DCP.

**TABEL 9.** IC<sub>50</sub> (mg kg<sup>-1</sup>) værdier med tilhørende standardfejl intervaller (i parentes) estimeret for 4 isothiazolinoner og 3,5-diklorphenol (3,5-DCP) ud fra dosis-respons kurver for substrat-induceret respiration (SIR), bakterievækst ([<sup>3</sup>H]leucinindbygning) og svampevækst ([<sup>14</sup>C]acetat-i-ergosterol).

	MIT		DCOIT		BIT		OIT		3,5-DCP		
	Incubation time	IC <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>	R <sup>2</sup>
SIR	4 h	22.4	0.94	61.7	0.96	93.3	0.91	66.1	0.98	104.7	0.98
		(18.2-27.5)		(43.7-87.1)		(64.6-134.9)		(58.9-74.1)		(97.7-112.2)	

	2 d	30.2 (28.8-31.6)	0.99	14.8 (13.2-16.6)	0.98	263.0 (144.5-478.6)	0.86	69.2 (63.1-75.9)	0.98	87.1 (83.2-91.2)	0.99
	7 d	42.7 (40.7-44.7)	0.96	14.1 (13.2-15.1)	0.99	575.4 (208.9-1584.9)	0.84	104.7 (74.1-147.9)	0.85	70.8 (69.2-72.4)	0.99
	40 d	81.3 (69.2-95.5)	0.92	14.1 (13.5-14.8)	0.99	--	--	--	--	25.7 (20.0-33.1)	0.89
<b>Bacterial Growth</b>	4 h	5.6 (4.6-6.9)	0.96	2.8 (2.5-3.2)	0.99	8.5 (7.8-9.3)	0.98	27.5 (24.5-30.9)	0.94	63.1 (53.7-74.1)	0.91
	2 d	12.6 (11.0-14.5)	0.97	3.1 (2.5-3.9)	0.98	15.5 (14.8-16.2)	0.99	10.7 (9.8-11.7)	0.99	33.1 (30.9-35.5)	0.99
	7 d	33.1 (24.0-45.7)	0.92	--	--	26.9 (22.4-32.4)	0.87	87.1 (38.9-195.0)	0.83	35.5 (33.9-37.2)	0.99
	40 d	--	--	--	--	--	--	--	--	44.7 (35.5-56.2)	0.90
<b>Fungal Growth</b>	4 h	13.8 (12.6-15.1)	0.99	15.5 (13.8-17.4)	0.96	14.5 (13.8-15.1)	0.99	13.8 (12.3-15.5)	0.98	20.4 (19.1-21.9)	0.99
	2 d	21.4 (20.0-22.9)	0.99	11.7 (11.0-12.6)	0.99	26.9 (24.0-31.6)	0.96	30.2 (28.8-31.6)	0.99	32.9 (31.6-36.3)	0.99
	7 d	95.5 (57.5-158.5)	0.91	14.1 (13.5-14.8)	0.94	39.8 (34.7-45.7)	0.93	53.7 (52.5-55.0)	0.99	32.4 (30.2-34.7)	0.99
	40 d	158.5 (51.3-489.8)	0.92	17.0 (15.8-18.2)	0.89	63.1 (50.1-79.4)	0.89	93.3 (74.1-117.5)	0.93	25.1 (24.0-26.3)	0.99

MIT: Methylisothiazolinon; DCOIT: Dichlorisothiazolinon; BIT: Benzisothiazolinon; OIT: Octylisothiazolinon; 3,5-DCP: 3,5-dichlorphenol; SIR: substratinduceret respiration; h: timer; d: dage.

### 7.2.3 Effekter af isothiazolinoner på jordens mikrobielle aktivitet

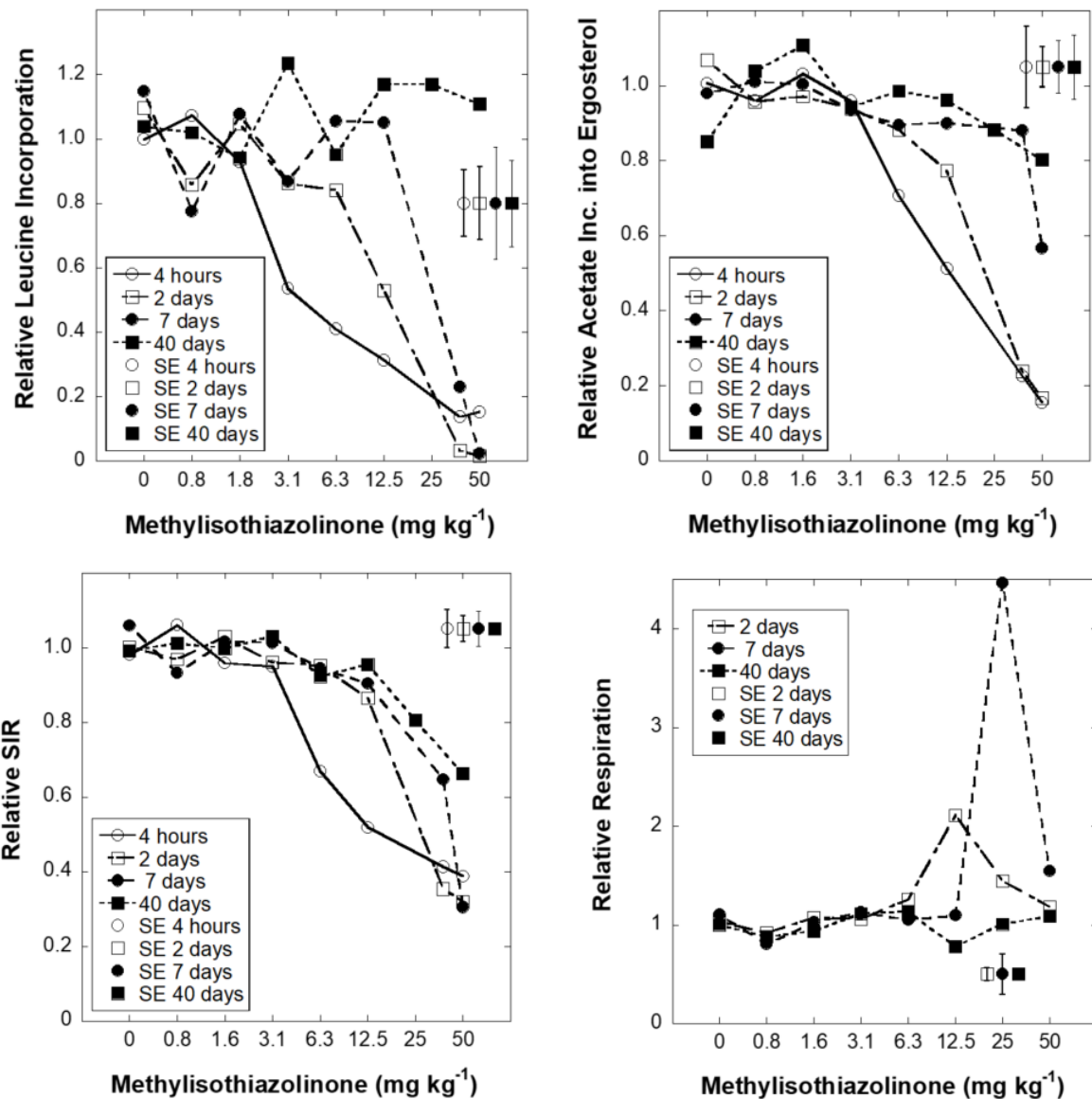
I alt 4 isothiazolinoner blev testet (Figur 9-12). Bakterievækstraten målt med [<sup>3</sup>H]leucin indbygningsmetoden udviste klare dosis-respons effekter 4 timer og 2 dage efter biocidtilsætning til jorderne. Til gengæld sås en klar tendens til genopretning af bakterievækst over tid selv for de højeste biocidkoncentrationer, og jordbakteriernes vækst var fuldstændig genoprettet efter 40 dage for alle isothiazolinoner.

Svampevæksten målt med [<sup>14</sup>C]acetat-i-ergosterol-inkorporeringsmetoden udviste klare dosis-respons effekter for hele inkubationsperioden (40 dage), men dog også med en klar tendens til genopretning af væksten over tid. For biociderne MIT, BIT and OIT aftog inhiberingen af svampevæksten i hele inkubationsperioden med det mest følsomme dosis-respons efter blot 4 timer, mens DCOIT inhiberede svampenes vækst mere efter 2 dage end efter 4 timer.

Substrat-induceret respiration (SIR) blev også inhiberet progressivt med stigende koncentration med en tendens til en mindre inhiberende effekt over tid for MIT, BIT and OIT. I kontrast hertil var inhiberingen af SIR næsten upåvirket af inkuberingstid for DCOIT med stort set identiske dosis-respons kurver efter 2, 7 og 40 dage, men der var dog en klar tendens til mindre hæmning af SIR for de højeste DCOIT koncentrationer efter blot 4 timers inkubation i forhold til 2-40 dage.

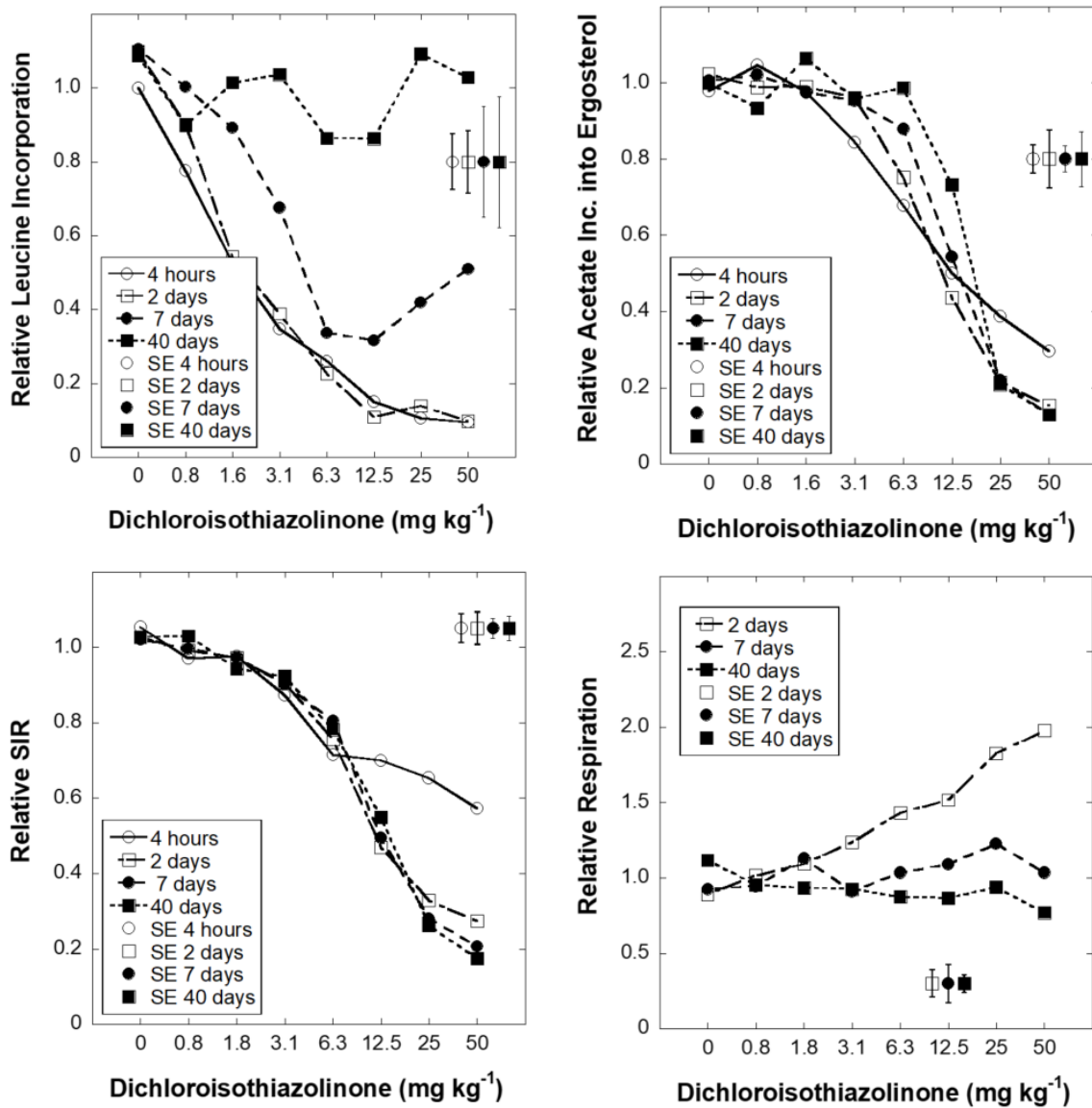
BR blev ikke inhiberet af nogle af de 4 isothiazolinoner. Tværtimod, var der en tendens til, at BR blev stimuleret for de højeste koncentrationer af de testede biocider. Stimuleringen af BR var generelt størst i den første uge, mens den aftog efter 40 dage. Disse resultater kan bedst forklares ved, at jordens mikroorganismer var i stand til at mineralisere biociderne, hvilket er konsistent med vores studier af disse stoffers nedbrydningskinetik (Afsnit 7.1; Figur 2; Tabel 7). Der kan imidlertid også være andre forklaringer på, at toksiske stoffer kan føre til stimulering af CO<sub>2</sub> produktion i jord (Giller et al., 1998; McGrath et al., 2002; Anderson, 2003).

IC<sub>50</sub> koncentrationer for de tre økotoksikologiske testparametre, der gav klare dosis-respons inhiberingskurver, er vist i Tabel 9. Hvis man sammenligner IC<sub>50</sub> værdierne efter 4 timer og 2 dage, ses det, at bakterievækst generelt var den mest følsomme test, efterfulgt af svampevækst og med SIR som den mindst følsomme test. De laveste IC<sub>50</sub> værdier for SIR efter 4 timer eller 2 dage var således 22, 15, 93 og 66 mg kg<sup>-1</sup> for henholdsvis MIT, DCOIT, BIT og OIT, mens de tilsvarende værdier var 4-11 og 1,3-6,4 gange lavere for henholdsvis bakterie og svampevækst. SIR var med andre ord en mindre følsom test end de to vækstbaserede tests både i forhold til at detektere toksiske effekter af de testede isothiazolinoner og efterfølgende genopretning af mikrobiel aktivitet efter nedbrydning af teststofferne (især for DCOIT). Til gengæld var standardfejlene generelt relativt mindre for SIR testen end for de to vækstinhiberingstests (især bakterievækst; Figur 9-12). For at teste reproducérbarheden af bakterievækst testen gentog vi den derfor 3 måneder senere med teststoffet DCOIT. Resultaterne demonstrerede høj reproducérbarhed af testens resultater (data ikke vist). Vi har ikke været i stand til at finde tidligere undersøgelser med 'peer-review' af isothiazolinoners effekter på mikrobiel aktivitet i jord, men der findes resultater fra OECD 216 og 217 testmetoderne (EC, 2014a; EC, 2014b).

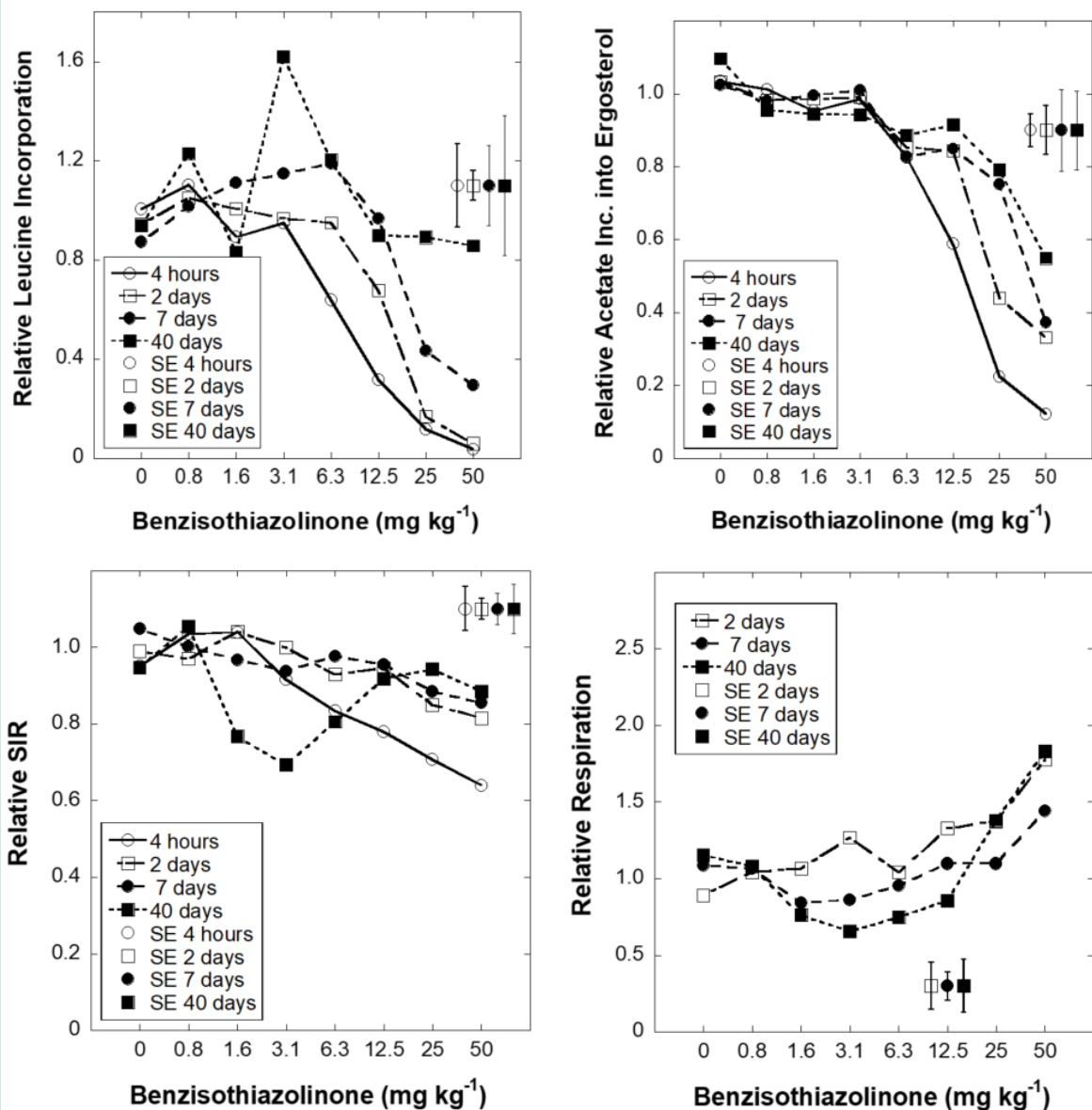


**FIGUR 9.** Methylisothiazolinone (MIT) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampesvækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af MIT.

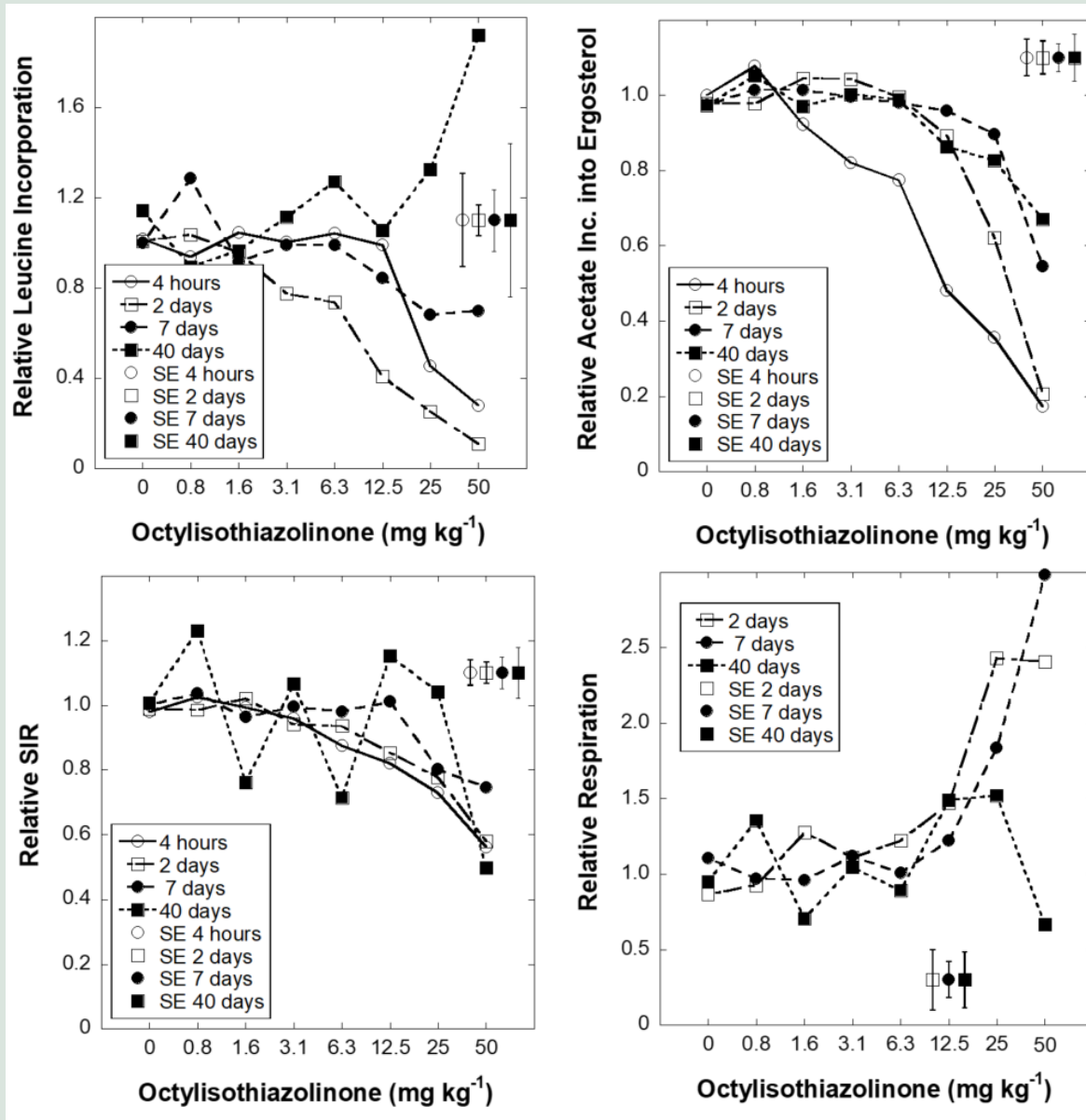




**FIGUR 10.** Dichloroisothiazolinone (DCOIT) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af DCOIT.



**FIGUR 11.** Benzisothiazolinone (BIT) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af BIT.



**FIGUR 12.** Octylisothiazolinone (OIT) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampewækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af OIT.

#### 7.2.4 Effekter af azoler på jordens mikrobielle aktivitet

Tre azoler blev testet; dels biociderne propiconazol (PPZ) og tebuconazol (TBU) og dels nedbrydningsproduktet 1,2,4-triazol (Figur 13-15). De to biocider anvendes også i landbruget som fungicider, og tebuconazol var blevet anvendt gentagne gange på den anvendte testjord med den sidste sommersprøjtning cirka et halvt år inden udførelsen af de økotoksikologiske tests. Som forventet sås en klar inhibering af svampevæksten med stigende koncentration af både PPZ og TBU (Figur 13 og 14). Den toksiske effekt var persistent og aftog ikke i løbet af de 40 dage, som forsøget varede. Effekten af TBU så endda ud til at tiltage over tid, men denne effekt kunne imidlertid ikke reproducere i et opfølgende forsøg, som viste uændret inhiberingsgrad efter 4 timer og 40 dages inkubation (data ikke vist). Det skal endvidere bemærkes, at resultaterne fra det første forsøg med TBU skal tages med et vist forbehold, da vi ikke kan udelukke problemer med doseringen af stoffet i nogle tilfælde (se Afsnit 7.1.3).

I forhold til svampevækst, udviste bakterievækst komplekse dosis-respons forløb med en svag inhibering ved koncentrationer op til 400 mg kg<sup>-1</sup> for begge svampemidler, men med en kraftig stigning af bakterievæksten for den højeste koncentration af PPZ (Figur 13 og 14). Begge stoffer vides at inhibere ergosterol syntesen i svampe, men har ikke kendte 'targets' i bakterier, så inhiberingen af bakterievæksten er ganske interessant, da den tyder på, at disse svampemidler i høje doser har potentialet til også at kunne hæmme bakteriers vækst. Stigningen i bakterievæksten for den højeste koncentration af PPZ skyldes sandsynligvis reduceret konkurrence med svampe, hvilket er konsistent med, at effekten ikke var til stede efter 4 timer, men derimod først efter 2-7 dage. Alternativt kunne den øgede bakterievækst også skyldes fremvæksten af PPZ-nedbrydende bakterier, hvilket dog ikke er sandsynligt pga. stoffets persistens i vores mikrokosmos forsøg (Figur 2; Tabel 7).

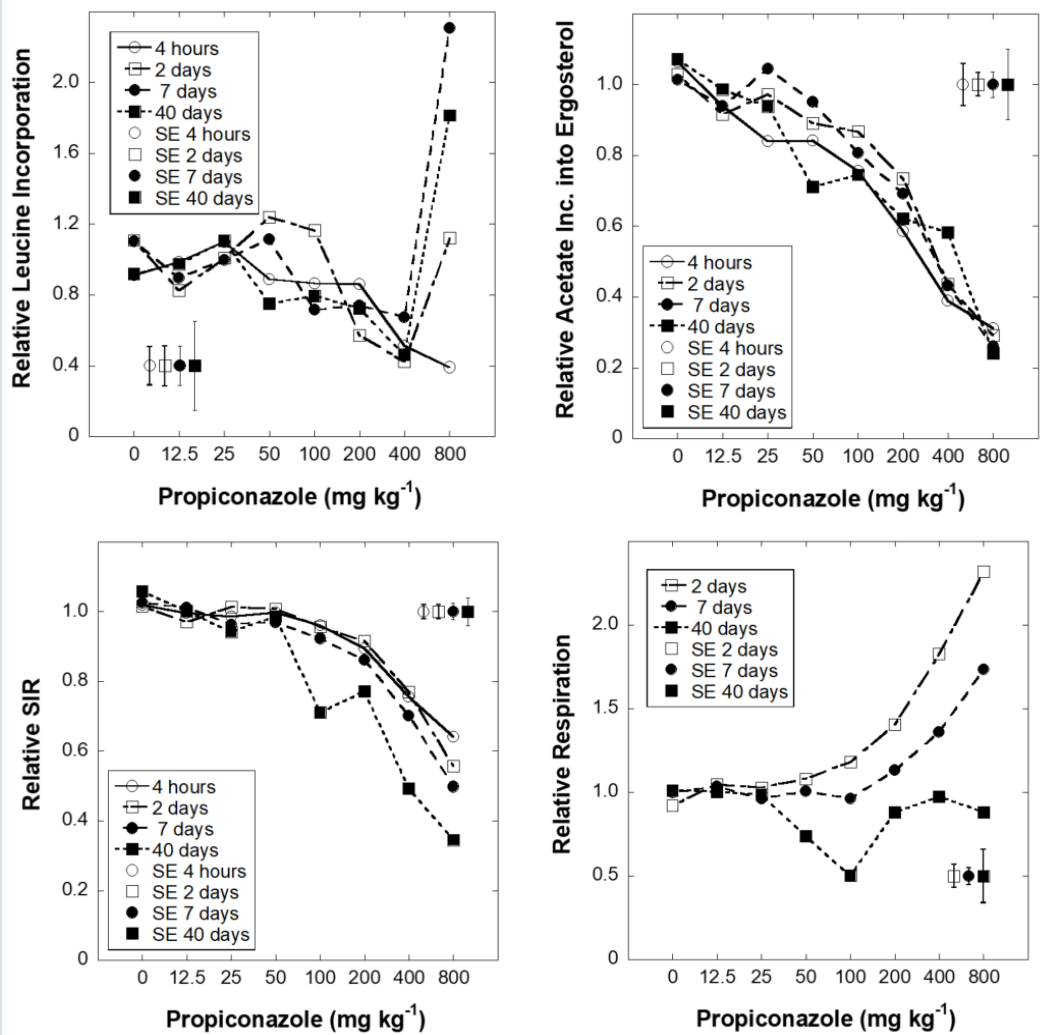
I lighed med svampevækst blev SIR progressivt inhiberet med stigende doser af PPZ på alle prøvetagningstidspunkter (Figur 13). Til gengæld var TBU dosis-respons kurverne for SIR mere uklare med en svag inhibering (< 15%) for den højeste dosis (800 mg kg<sup>-1</sup>) efter 4 timer og 7 dage, men med en betydelige kraftigere inhibering efter 40 dage (Figur 14). Denne uventede tidseffekt kunne imidlertid ikke reproducere i et opfølgende forsøg, som viste uændret svag inhibering (< 10%) af SIR både 4 timer og 40 dage efter tilsætning af TBU til jorden (data ikke vist). Vi konkluderer derfor, at TBU i koncentrationer på op til 800 mg kg<sup>-1</sup> kun havde en begrænset inhiberende effekt på SIR. Det skal her igen bemærkes, at vi havde problemer med at verificere vores teststofkoncentrationer netop for TBU, hvilket kan være med til at forklare de lidt "ujævne" data.

Hverken PPZ eller TBU forårsagede nogen betydelig inhibering af BR (Figur 13 og 14). Tværtimod sås en dosis afhængig stimulering af CO<sub>2</sub> produktionsraten jorderne i løbet af de første 7 dage for begge svampemidler. Pga. stoffernes persistens vurderes det som værende usandsynligt, at denne effekt skyldes mineralisering af teststofferne. Tilsvarende effekter af persistente giftstoffer på BR er tidligere observeret for både organiske og uorganiske stoffer i jord og kan tilskrives flere mulige mekanismer (Giller et al., 1998; McGrath et al., 2002; Anderson, 2003).

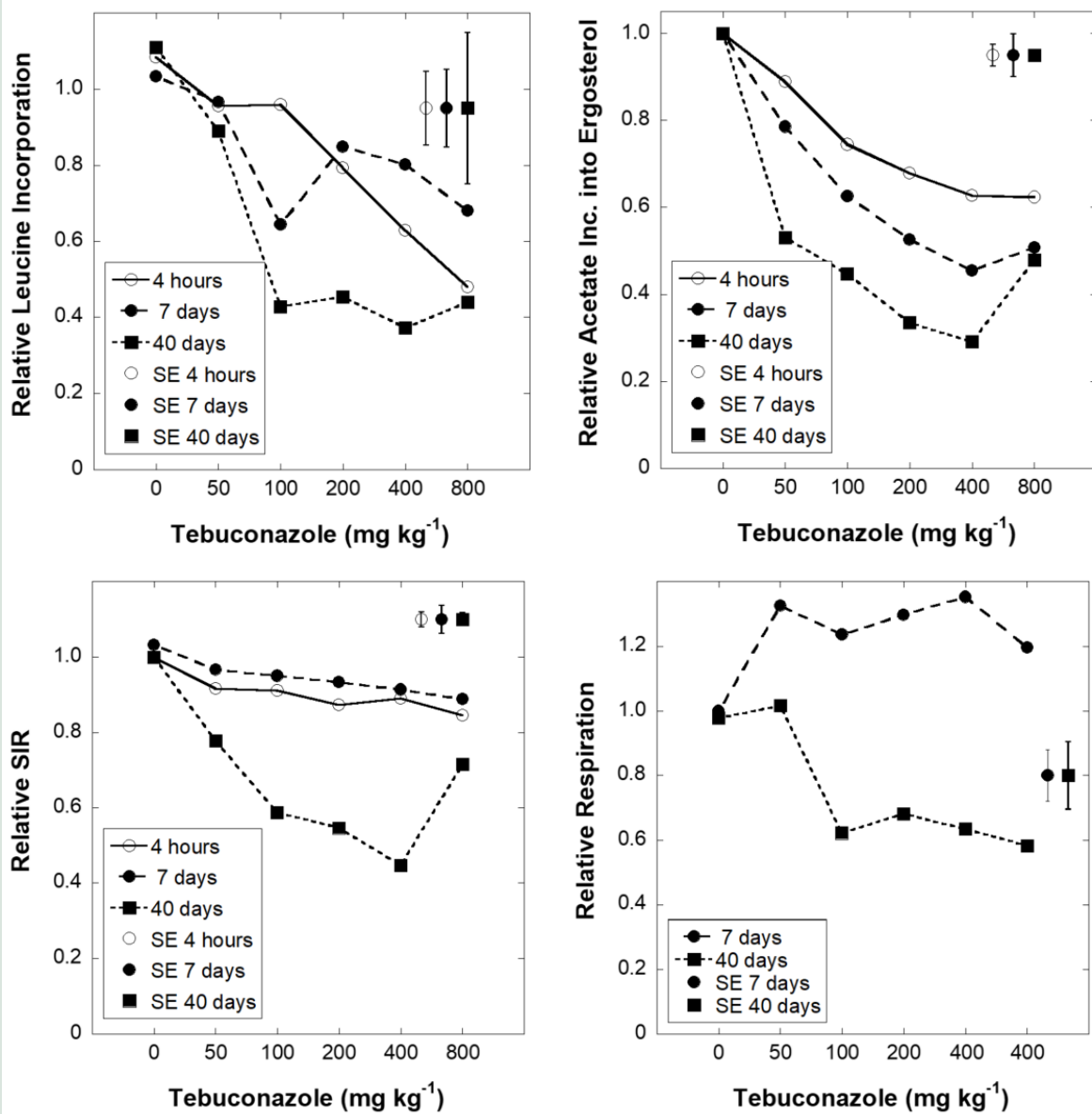
Som forventet udgjorde svampevækst den mest følsomme test for både PPZ og TBU (Figur 13 og 14; Tabel 10). IC<sub>50</sub> værdier var dog ret høje (240–389 mg kg<sup>-1</sup>). Mere overraskende var det, at IC<sub>50</sub> værdier for bakterievækst var lavere end IC<sub>50</sub> for SIR, hvis man vel at mærke undlod at medregne data for den højeste dosis (800 mg kg<sup>-1</sup>) ved beregning af IC<sub>50</sub> for bakterievækst. Den SIR-baserede OECD 217 testmetode var med andre ord en mindre følsom test end de to vækstbaserede tests i forhold til at detektere toksiske effekter af PPZ, og SIR var også mindre følsom end svampevækst for TBU.

Til forskel fra PPZ og TBU var 1,2,4-triazol i doser på op til 800 mg kg<sup>-1</sup> ikke i stand til at hæmme mikrobiel aktivitet i jorden (Figur 15).

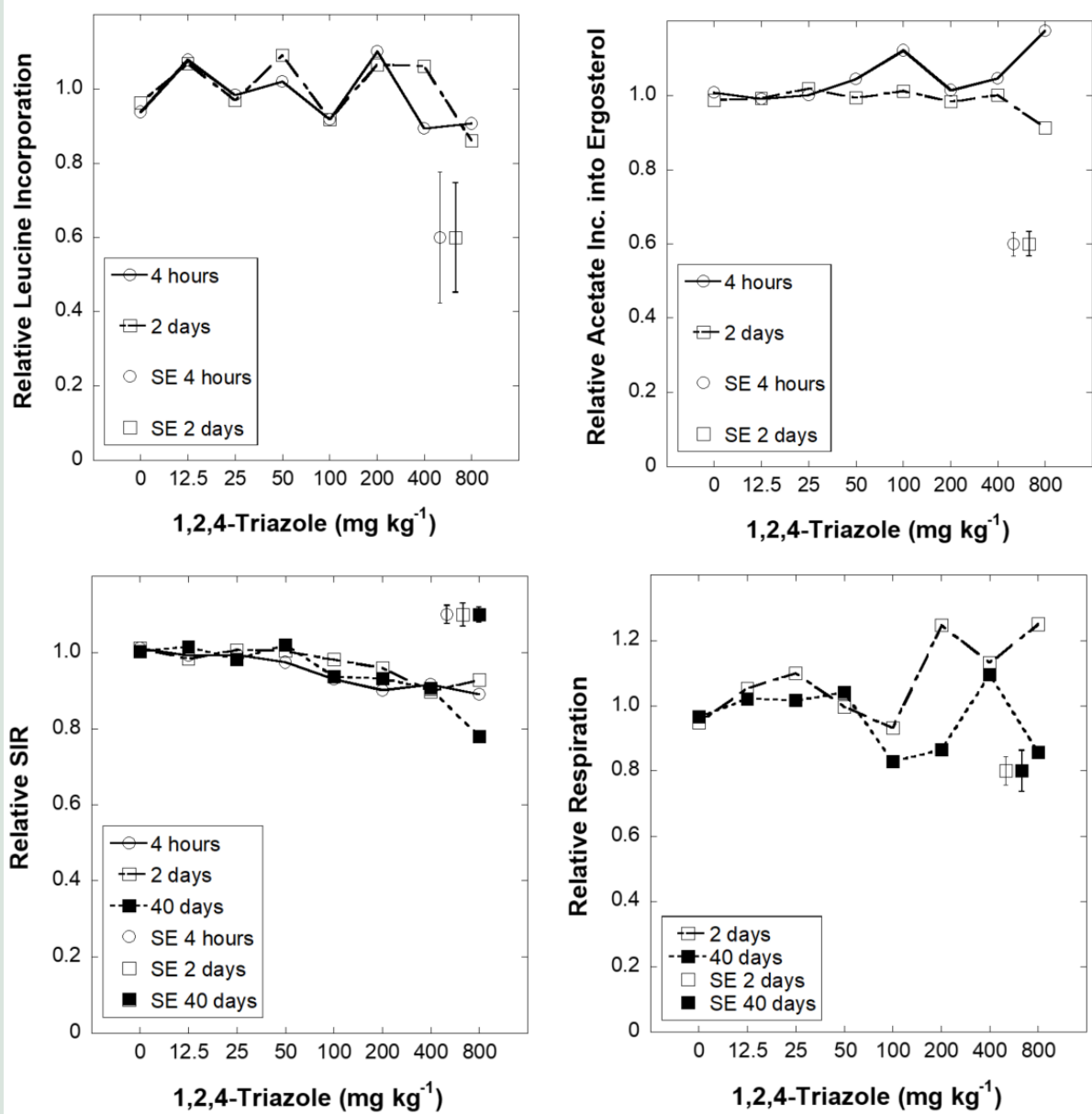
Vores resultater for azoler er konsistente med tidligere undersøgelser i forbindelse med risikovurdering af PPZ og TBU. Disse undersøgelser viste ikke nogen effekter på hverken OECD 216 (N mineralisering) eller OECD 217 (C mineralisering) for hverken disse biocider eller for 1,2,4-triazol ved de testede koncentrationer, der dog i alle tilfælde var betydeligt lavere end de koncentrationer, som blev testet i PICT-RISK projektet.



**FIGUR 13.** Propiconazole (PPZ) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af PPZ.



**FIGUR 14.** Tebuconazole (TBU) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af TBU.



**FIGUR 15.** 1,2,4-triazol dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (BR, nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer (kun SIR), 2 dage og 40 dage (kun SIR og BR) efter tilsætning af 1,2,4-triazol.

**TABEL 10.** IC<sub>50</sub> (mg kg<sup>-1</sup>) middelværdier med tilhørende spredning i parentes (n=3) estimeret fra propiconazol dosis-respons kurver for bakterievækst (<sup>3</sup>H]leucin inkorporering), svampevækst (<sup>14</sup>C]acetat-i-ergosterol inkorporering) og substrat-induceret respiration (SIR). R<sup>2</sup> værdier repræsenterer model fit koefficienter for IC<sub>50</sub> bestemmelserne.

Assay	Tid	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Leucine incorporation	4 hours	427 (355-513)	0.83
	2 days	282 (209-380) <sup>b</sup>	0.71
	7 days	676 (288-1585) <sup>b</sup>	0.64
	40 days	389 (269-562) <sup>b</sup>	0.79
Acetate-in- ergosterol incorporation	4 hours	240 (186-309)	0.99
	2 days	389 (347-437)	0.98
	7 days	339 (309-372)	0.98
	40 days	209 (100-437)	0.92
Substrate induced respiration (SIR)	4 hours	1288 (1175-1413)	0.98
	2 days	933 (891-977)	0.97
	7 days	794 (759-832)	0.98
	40 days	380 (295-490)	0.94

a IC<sub>50</sub>; propiconazol koncentration i jord, der forårsager 50 % inhibering af mikrobiel aktivitet.

b Data for den højeste dosis (800 mg kg<sup>-1</sup>) blev ikke anvendt til estimering af IC<sub>50</sub>.

### 7.2.5 Effekter af øvrige biocider på jordens mikrobielle aktivitet

Figur 16-19 viser effekterne af biociderne carbendazim, mecoprop, terbutryn og diuron på jordens mikrobielle aktivitet (bakterievækst, svampevækst, SIR og BR). Carbendazim havde ikke nogen nævneværdig effekt på nogle af de målte mikrobielle processer ved koncentrationer på op til 400 mg/kg (Figur 16).

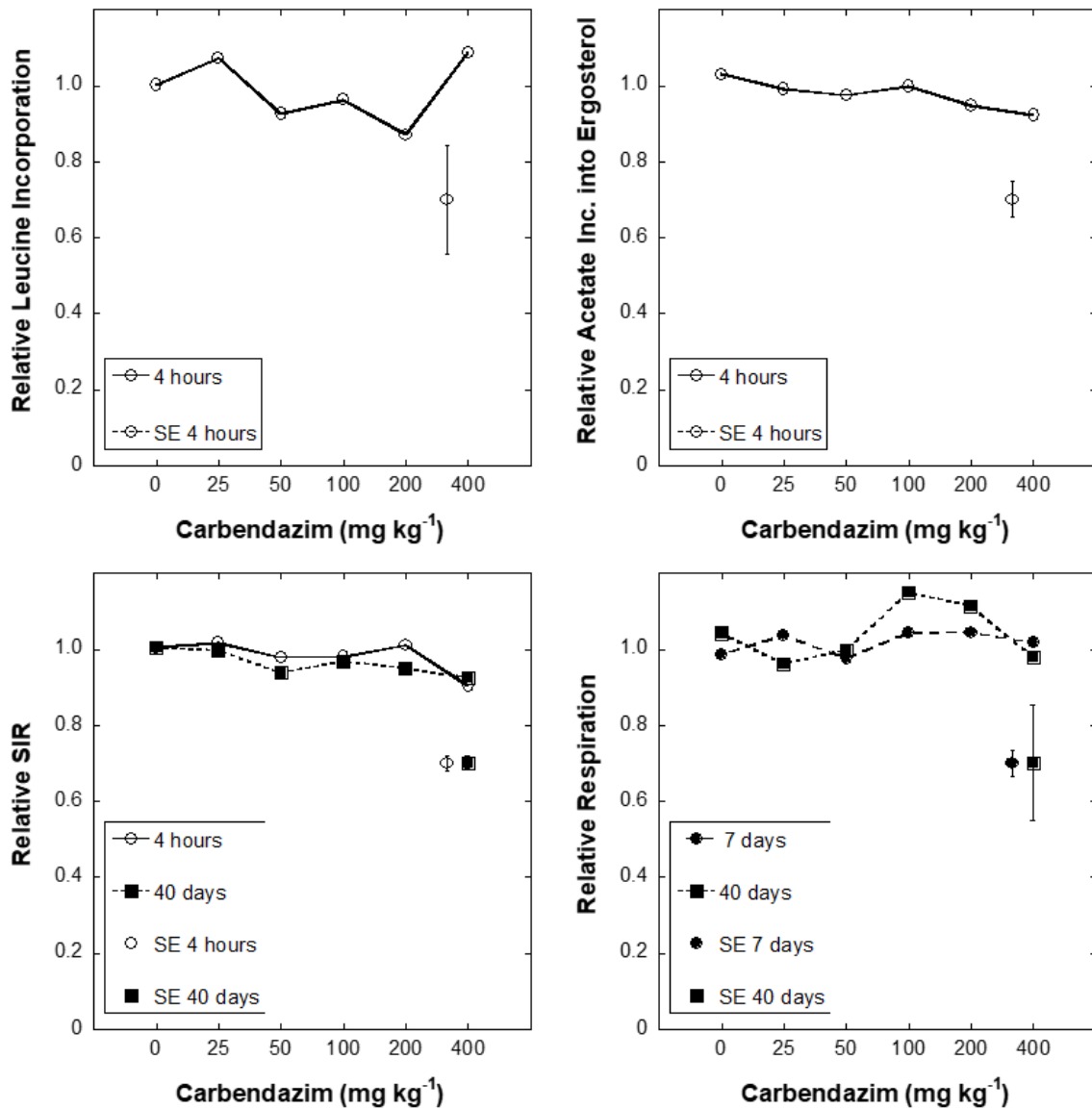
Mecoprop (MCP) havde derimod klare, men også noget uventede effekter på de målte mikrobielle processer (Figur 17). En klar dosis-responsammenhæng blev observeret for både SIR og BR (Figur 17). MCP førte til en dosis-afhængig inhibering af SIR med stort set identiske dosis-respons kurver efter 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage. BR blev stimuleret kraftigt af mecoprop efter 2 dage og i mindre grad efter 7 dage, mens en delvis inhibering blev observeret efter 40 dage. Dosis-responsammenhænge var derimod langt mere komplekse for bakterie- og svampevækst. Bakteriers vækst blev progressivt inhiberet med stigende teststofkoncentration efter 4 timers eksponering med over 95% inhibering ved den højeste testkoncentration (400 mg/kg). Bakteriers vækst var også påvirket efter længere eksponeringstider (2-40 dage), selv om det er umuligt at forklare de meget forskellige dosis-responskurver efter 2, 7 og 40 dage. Svampes vækst blev inhiberet med ca. 50% ved de højeste nominelle testkoncentrationer (100 – 400 mg/kg) efter 4 timer, men ligesom for bakteriers vækst er det vanskeligt at forklare de mere komplekse og divergerende dosis-respons kurver efter længere eksponeringstider (2-40 dage). MCP udgør en interessant 'case', fordi stoffets effekt på de faktiske mikrobielle processer (aktuel aktivitet) i jorden ser ud til at være meget komplekse med en betydelig grad af "uforudsigelighed" samtidig med, at effekten på SIR (potentiell aktivitet) er konstant over tid. Overordnet set afspejler vores resultater sandsynligvis komplekse økologiske interaktioner mellem forskellige subpopulationer af bakterier og svampe, der fysiologisk reagerer forskelligt på teststoffet over tid. Det er eksempelvis sandsynligt, at nogle mikroorganismer inhiberes af MCP, mens andre stimuleres. Derudover er det værd at bemærke, at nedbrydningskinetikken for MCP også var behæftet med en betydelig usikkerhed, hvorfor stoffets skæbne måske varierer mere fra jordprøve til jordprøve end for øvrige teststoffer (Afsnit 7.1.1; Figur 2), hvilket også kan føre til en vis grad af uforudsigelighed i vores mikrokosmos forsøg.



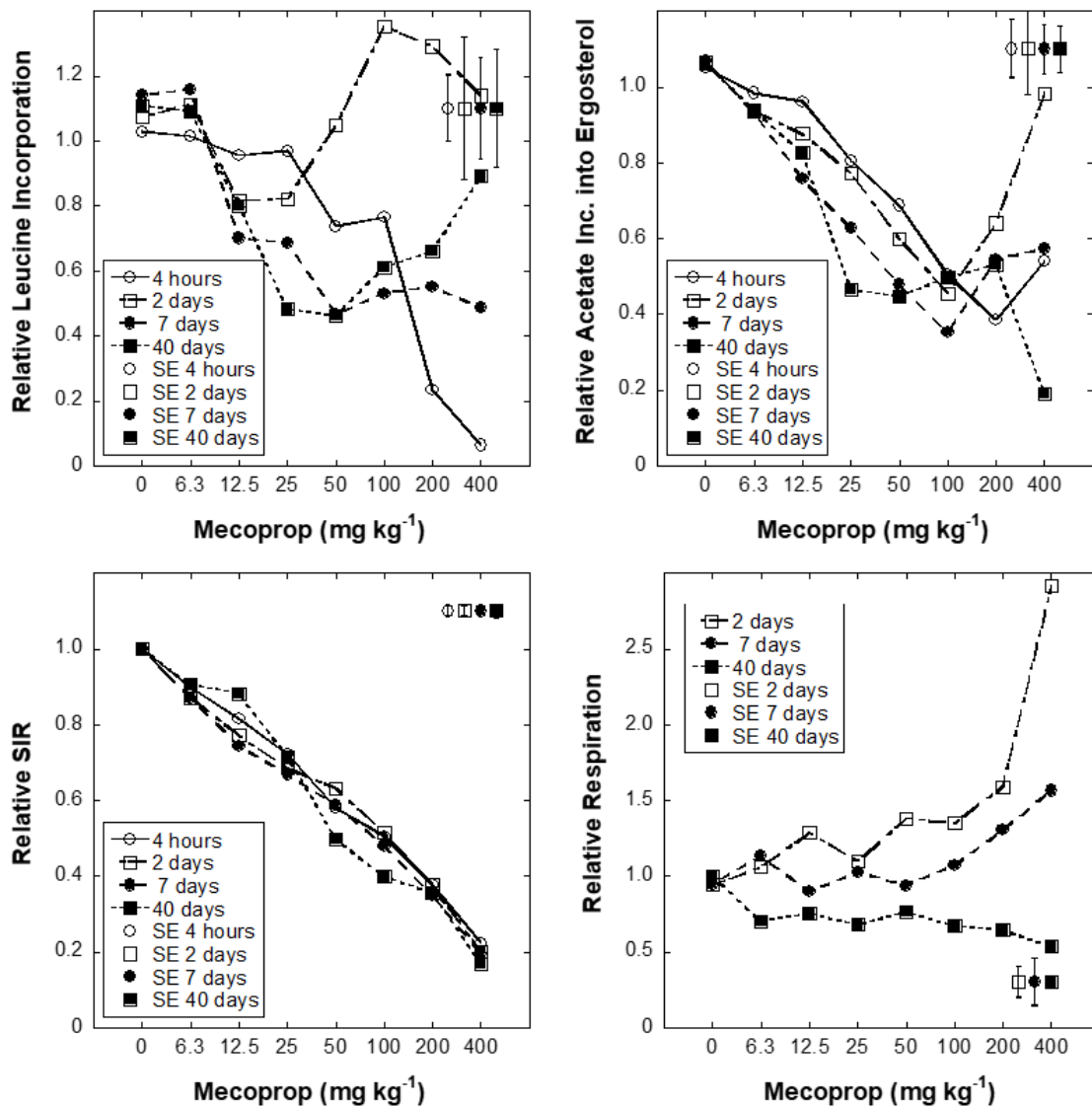
Denne uforudsigelighed står i skærende kontrast til vores SIR inhiberingsdata, der giver meget klare, tolkbare resultater, der ville kunne bruges til risikovurdering. Til gengæld viser vores resultater med al tydelighed, at effekten af MCPs på SIR kun i meget ringe grad afspejler de reelle effekter af stoffet på mikroorganismernes faktiske vækst og respiration i jorden. Der er derfor behov for yderligere forskning for at kunne forstå MCPs effekter på jordens mikroorganismer og vores resultater viser desuden, at SIR testen er en meget "grovkornet" test, der ikke afspejler de faktiske mikrobielle processer i jorden.

Terbutryn (TB) inhiberede såvel bakterie- som svampevækst, hvorimod effekterne på SIR og især BR var begrænsede (Figur 18). Således kunne der ikke ses nogle klare dosis-respons sammenhænge for SIR efter 4 timer og 7 dage, mens der slet ikke sås effekter på BR (kun undersøgt efter 7 og 40 dage). Det mest bemærkelsesværdige var dog TBs stigende evne til at inhibere de undersøgte mikrobielle processer over tid (4 timer versus 7 dage versus 40 dage). Denne uventede effekt blev observeret for begge mikrobiel vækstinhiberingsassays og også for SIR, der kun var inhiberet efter 40 dage. Effekten blev undersøgt i et uafhængigt forsøg (data ikke vist), der bekræftede, at TBs effekt på de mikrobielle processer tiltog over tid (0-40 dage). Vi har ikke nogen entydig forklaring på dette uventede resultat. Almindeligvis er teststoffers biotilgængelighed og toksicitet størst umiddelbart efter tilførsel til jord, hvorefter stoffets giftighed vil aftage som følge af binding til jorden (sorption og aldring) og som følge af stoffets nedbrydning. Derudover vil mikrobielle samfund ofte kunne udvikle tolerance overfor giftstoffer efter længere tids eksponering i jord. Det er mere vanskeligt at forklare vores observation af forøget inhibering af mikrobielle processer over tid. TB var persistent i jorden med mere end 60% af stoffet værende tilbage efter 40 dage, hvilket også var konsistent med resultaterne fra vores nedbrydningskinetik forsøg (Afsnit 7.1.1; Figur 2; Bollmann et al., 2017). En mulighed kunne derfor være, at der akkumuleredes toksiske nedbrydningsprodukter i løbet af forsøget, hvilket dog ikke blev sandsynliggjort ved brug af Microtox tests for tre af de identificerede TB nedbrydningsprodukter (desbutyl-desthiomethylterbutryn, desethyl-desthiomethylterbutryn og desthiomethyl-terbutryn) (Bollmann et al., 2017). En anden mulighed kunne være, at mikroorganismers vækst først inhiberes efter længere tids eksponering overfor TB. Der er behov for yderligere forskning for at kunne fastslå de underliggende mekanismer for TB effektens tidsafhængighed.

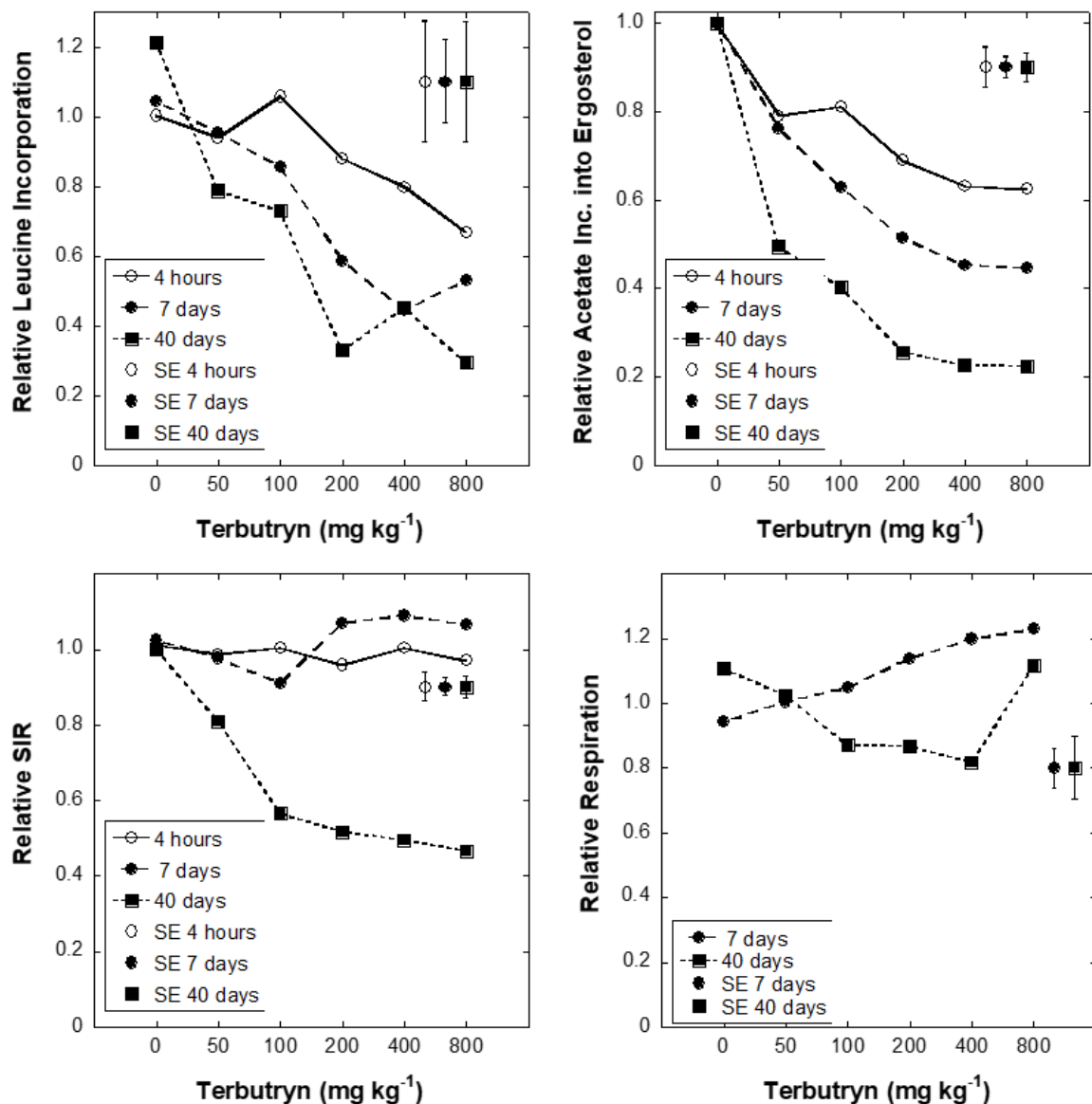
Diurons effekter på de undersøgte mikrobielle processer kan ses i Figur 19. Generelt sås kun en meget begrænset effekt af teststoffet selv ved koncentrationer på op til 800 mg/kg.



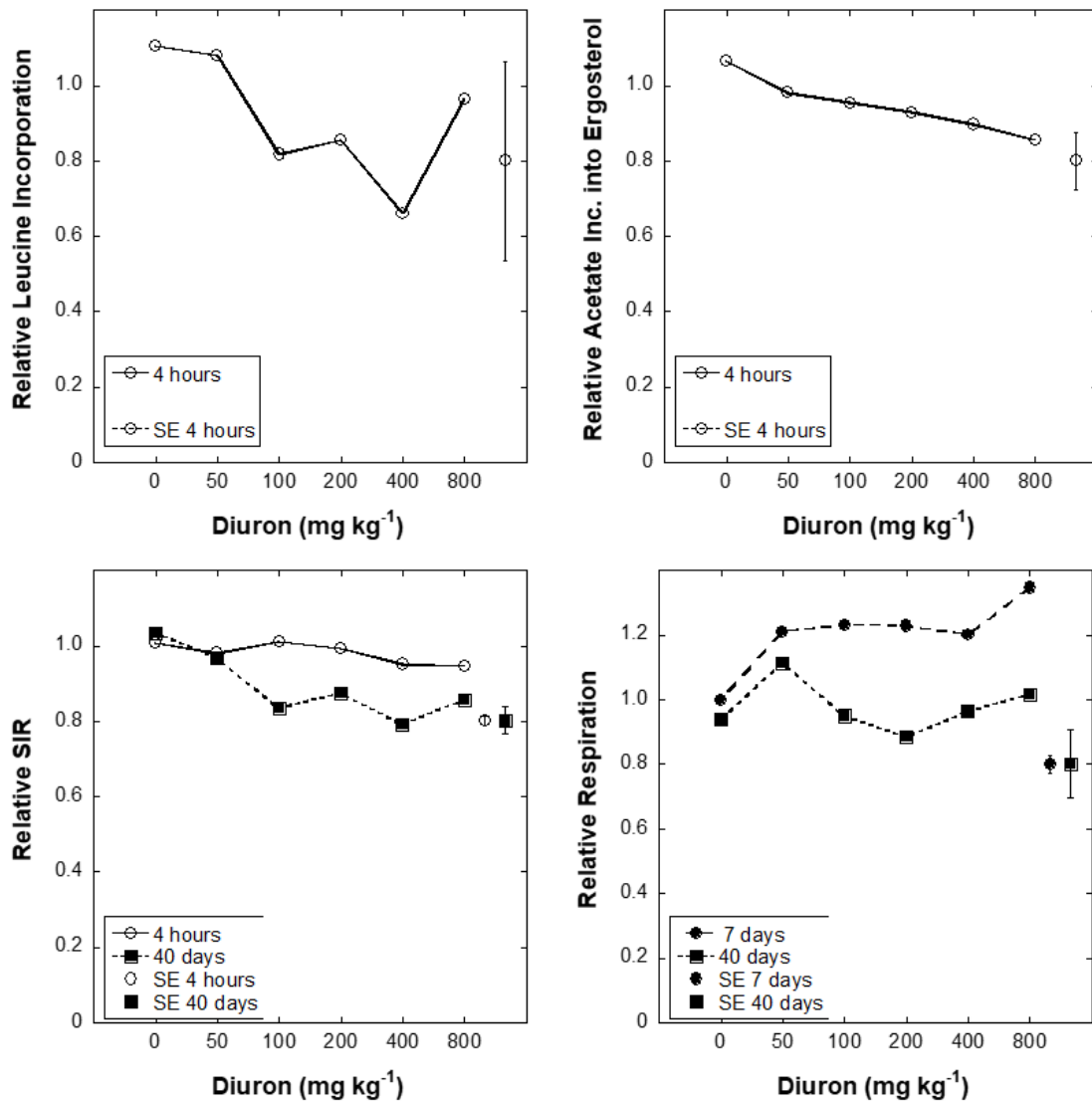
**FIGUR 16.** Carbendazim (CD) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampe-vækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 7 dage eller 40 dage efter tilsætning af DC.



**FIGUR 17.** Mecoprop (MCP) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampe-vækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af MCP.



**FIGUR 18.** Terbutryn (TB) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 2 dage, 7 dage og 40 dage efter tilsætning af TB.



**FIGUR 19.** Diuron (DR) dosis-respons kurver for bakterievækst i jord (øverst til venstre), svampevækst (øverst til højre), substrat-induceret respiration (SIR) jf. OECD217 testmetoden (nederst til venstre) og basal respiration (nederst til højre). Mikrobielle aktiviteter (vækst og respiration) blev bestemt i jord udtaget fra mikrokosmos 4 timer, 7 dage eller 40 dage efter tilsætning af DR.

## 7.3 Effekter af isothiazolinoner på jordens mikrobiom i mikrokosmos forsøg

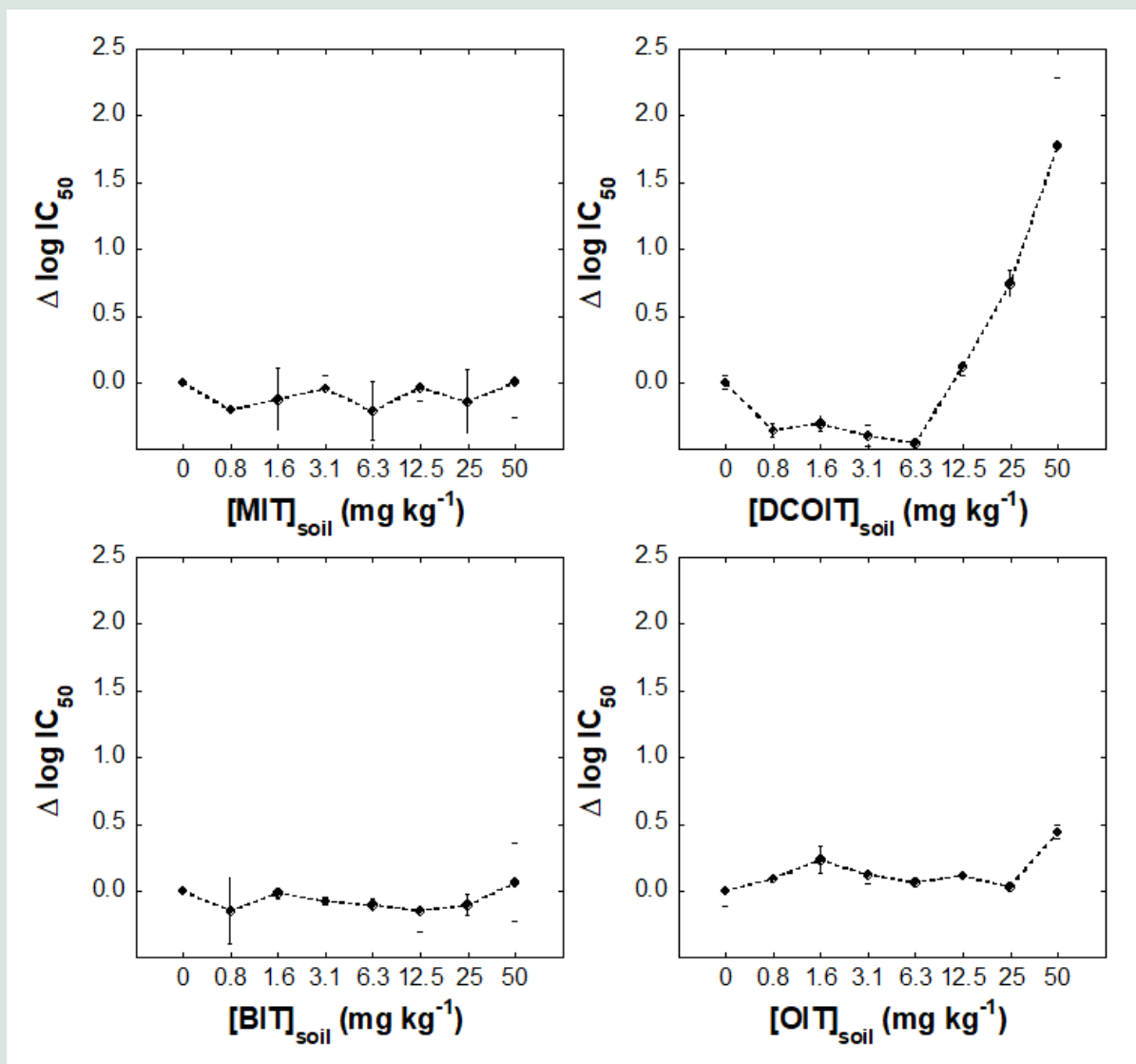
### 7.3.1 Udvikling af bakteriel samfundstolerance (PICT)

Mikrobielle samfund er i stand til at ændre sig hurtigt over tid og kan derfor hurtigt udvikle tolerance (PICT) overfor toksiske stoffer. PICT kan betragtes som en overordnet integreret effekt af tidligere eksponering for et toksisk stof, hvorfor PICT er blevet foreslået som en indikator for toksiske effekter af kemiske stoffer på mikrobielle samfund (Blanck 2002). PICT kan i nogle tilfælde detekteres selv efter fuldstændig nedbrydning eller fjernelse af det toksiske stof, hvilket viser, at mikrobielle samfund kan være langtidspåvirkede af toksiske stoffer, selv om eksponeringen overfor de toksiske stoffer kun er kortvarig eller periodisk. PICT udgør derfor en økologisk relevant integreret eksponerings- og effekt-indikator indenfor mikrobiel økotoksikologi (Brandt et al., 2015; Rotter et al., 2015; Tiili et al. 2016). Udvikling af PICT afspejler typisk ændringer i den mikrobielle samfundsstruktur p.g.a. succession over tid, hvorfor PICT-studier ideelt set bør "valideres" via mikrobielle samfundsanalyser (se Afsnit 7.3.2 – 7.3.4). Mikrobiel succession og dermed udvikling af PICT kan afhænge af mikroorganismernes "turnover" rate (mikrobiel vækstrate i forhold til mikrobiel populationsstørrelse), der oftest er begrænset af C og N i danske jorder. Dertil kommer, at nogle stoffer er markant mere toksiske overfor voksende/aktive mikroorganismer end overfor ikke-voksende/inaktive mikroorganismer (Demoling et al., 2009; Brandt et al., 2009). Vi udførte derfor forsøg både uden og med formalet lucerne som C og N kilde. PICT-detektion vanskeliggøres for jordprøver af, at selve jordmatricen kan generere adskillige typer af PICT detektionsartifakter, hvorfor det er vigtigt at udføre PICT detektionsassayet på mikroorganismer, der forinden er ekstraheret fra jorden på en måde, der bevarer deres fysiologiske integritet. Dette er p.t. vanskeligt for svampe, hvorfor vi i PICT-RISK projektet valgte at fokusere på PICT i jordens bakteriesamfund.

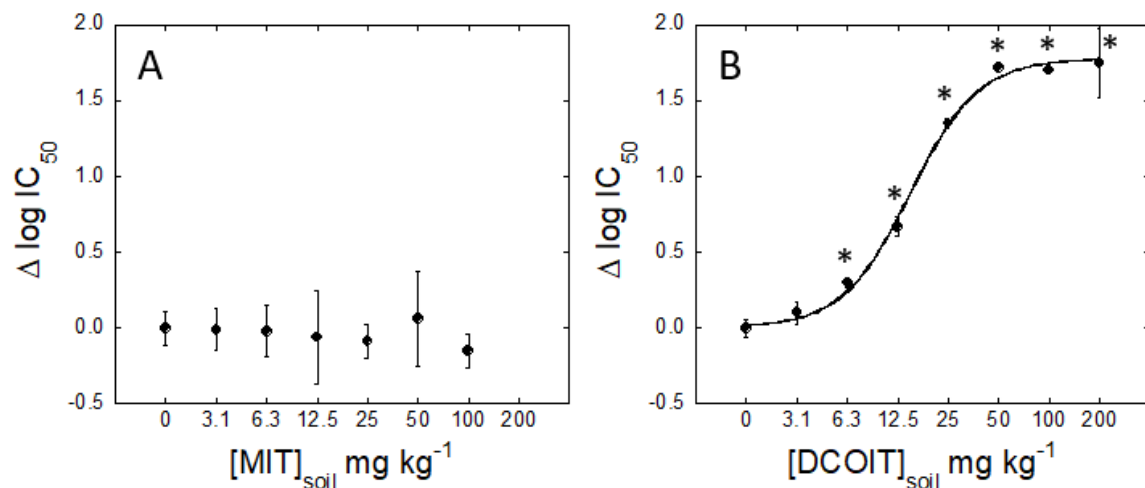
Blandt alle de testede biocider var det især isothiazolinonerne, der var i stand til at inhibere bakterievæksten i jord (Afsnit 7.2). Effekten var dog kun kortvarig, da bakterievæksten selv for de højeste stofeksposeringer var upåvirket eller svagt stimuleret efter 40 dage. En mulig forklaring kunne derfor være, at bakteriesamfundet i jorderne havde udviklet tolerance overfor teststofferne, hvorfor isothiazolinonerne blev udvalgt som modelstoffer for vores opfølgende PICT studier. De fire isothiazolinoner blev alle testet efter 40 dage i et pilotforsøg (Figur 20) med samme testdesign som for data præsenteret i Figur 9-12. Bakteriesamfundet i jorden udviklede tolerance overfor DCOIT ved koncentrationer  $>6,25$  mg/kg, mens der ikke sås nogen PICT udvikling for referencestoffet 3,5-dichlorophenol eller nogle af de øvrige isothiazolinoner med undtagelse af OIT ved den højeste testtestkoncentration (50 mg/kg). Tærskelkoncentrationer for PICT-udvikling var således markant højere for alle teststoffer end for inhibering af bakterievækst efter 4 timer eller 2 dages eksponering (Figur 9-12), hvilket er konsistent med tidligere PICT studier for andre toksiske stoffer (Brandt et al., 2009; Demoling & Bååth, 2008; Song et al., 2017).

Baseret på de ovenfor beskrevne resultater udvalgte vi MIT (ingen PICT udvikling) og DCOIT (kraftigt dosisafhængigt PICT udvikling) som vores teststoffer for mere detaljerede studier af biociders toksiske effekter på jordens mikrobielle samfund. Begge stoffer havde sammenlignelige korttidseffekter på bakteriers vækst (Figur 9 og 10), men stærkt divergerende effekter i forhold til PICT udvikling. For at teste reproducébarheden af PICT udviklingen blev der startet nye mikrokosmos forsøg over 40 dage med DCOIT og MIT. Forsøget validerede forskellen mellem de to isothiazolinoner, idet DCOIT ( $\geq 6,25$  mg/kg) selekterede for et mere DCOIT tolerant bakteriesamfund, mens MIT ikke selekterede for tolerance til MIT (Figur 21). Figur 22 viser repræsentative, underliggende dosis-respons data, der klart illustrerer forskellen mellem de to stoffers evne til at selektere for biocid tolerance i jordens bakteriesamfund. Bakterier ekstraheret fra kontroljord (ikke tilsat biocider) og MIT spiket jord (100 mg/kg) genererede således stort set identiske dosis-respons kurver med MIT, mens bakterier fra DCOIT spiket jord (100 mg/kg) var markant mere tolerante end bakterier fra kontroljord. Bortset fra en enkelt undtagelse (jord spiket med 200 mg/kg MIT) gav alle dosis-responskurver gode fits til den anvendte logistiske model;  $R^2 \geq 0,93$  (gennemsnit 0,97) for MIT og  $R^2 \geq 0,95$  (gennemsnit 0,98) for DCOIT.

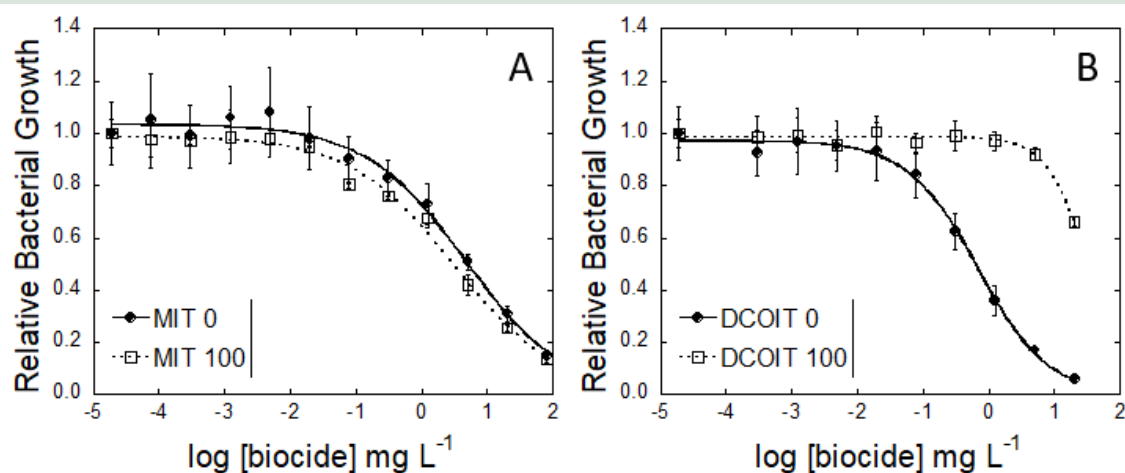
Figur 23 viser resultater for PICT udvikling for DCOIT og MIT udført enten uden eller med parallel tilførsel af formalet lucerne som en ekstra C og N kilde for jordens mikroorganismer. Tilførsel af lucerne havde ikke nogen markant effekt på PICT udvikling. I jordprøverne eksponeret overfor DCOIT undersøgte vi desuden, om DCOIT var i stand til at co-selektere for tolerance til MIT og tetracyklin (et bredspektret antibiotikum). Overraskende kunne vi ikke observere øget co-tolerance til MIT, men derimod sås co-tolerance overfor tetracyklin ved DCOIT-koncentrationer på  $\geq 100$  mg/kg (data ikke vist). Resultaterne viser, at isothiazolinoner i lighed med andre biocider har potentialet til at co-selektere for antibiotika resistens i bakterier (Ashbolt et al., 2013; Singer et al., 2016).



**FIGUR 20.** 'Pollution Induced Community Tolerance' (PICT;  $\Delta \log IC_{50}$ ) som funktion af isothiazolinon koncentrationen i jorden. 'Error bars' viser standardafvigelsen.

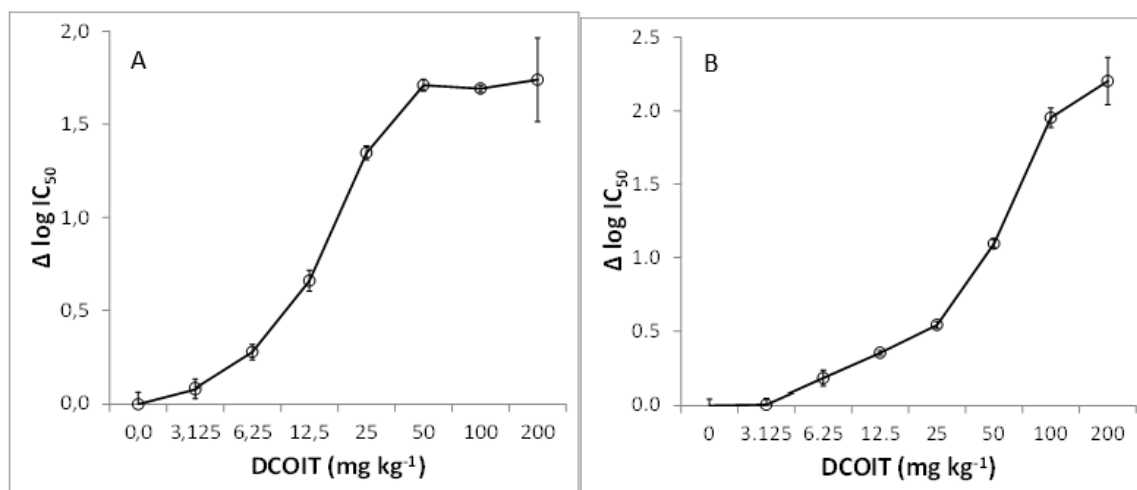


**FIGUR 21.** Pollution Induced Community Tolerance (PICT;  $\Delta \log IC_{50}$ ) som funktion af biocidkoncentrationen i jordmikrokosmos. (MIT (A); DCOIT (B)). 'Error bars' viser standardafvigelsen, og \* indikerer signifikante forskelle ( $P < 0,05$ ) til kontroljordens mikrokosmos, dvs. ingen 'spik-biocider' (Dunnets signifikante forskelstest fra ANOVA).



**FIGUR 22.** Bakterievækst dosis-respons kurver anvendt til at estimere bakteriesamfundets tolerance over for MIT (A) og DCOIT (B) i kontroljordens mikrokosmos (MIT 0 og DCOIT 0) og jordmikrokosmos tilsat med 100 mg kg<sup>-1</sup> biocid (MIT 100 og DCOIT 100). 'Error bars' viser standardafvigelsen.





**FIGUR 23.** 'Pollution Induced Community Tolerance' (PICT,  $\Delta \log IC_{50} = \log IC_{50} DCOIT - \log IC_{50} control$ ) som en funktion af tilsat koncentration af DCOIT til jorden. Eksperimenter udført i fravær af lucerne (A) og i tilstedeværelse af lucerne (B). Søjlerne viser standardafvigelsen.

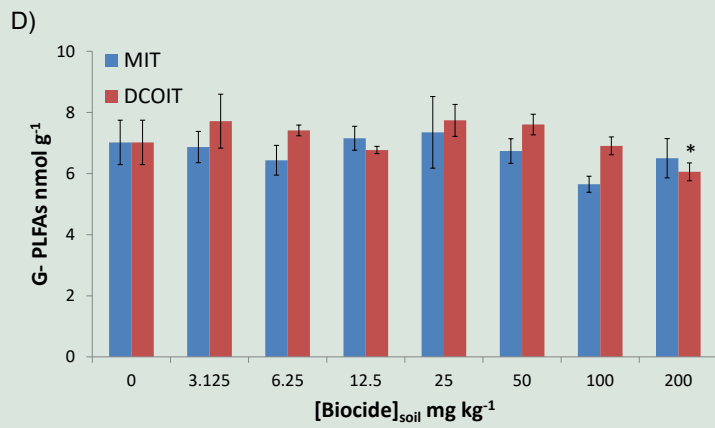
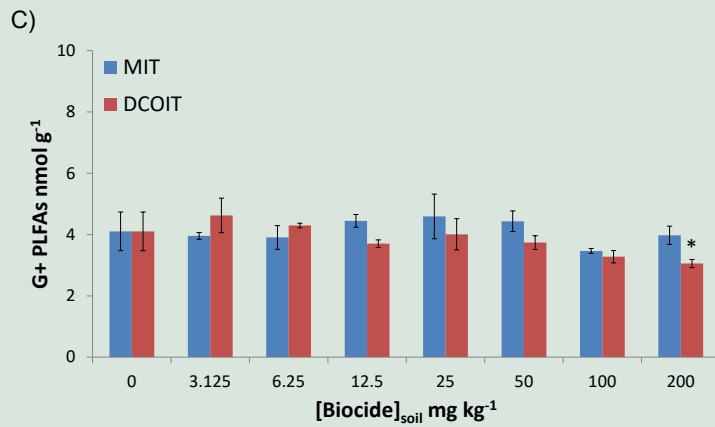
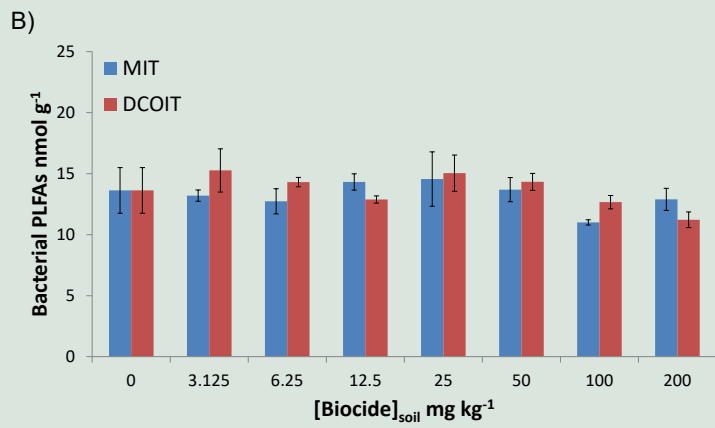
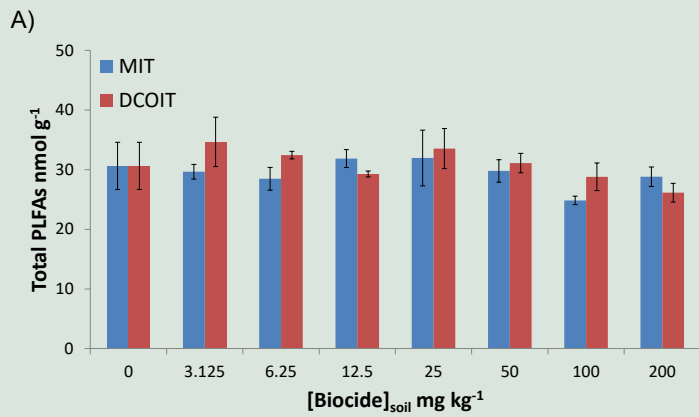
### 7.3.2 Mikrobiel samfundsanalyse – svampe og bakterier (PLFA)

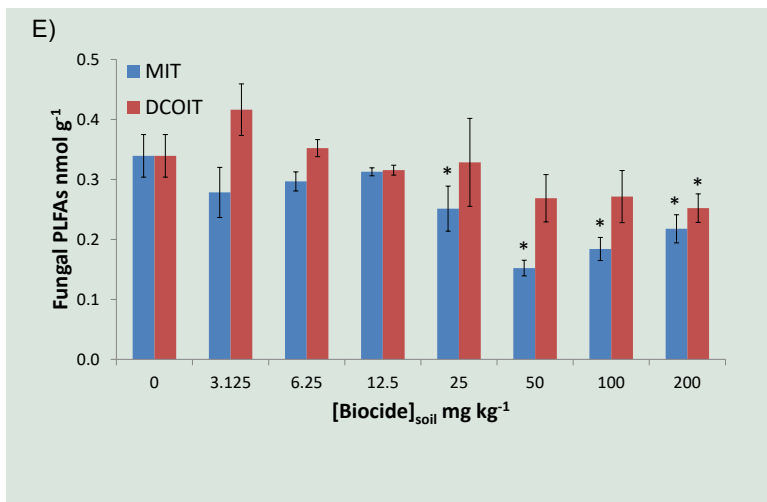
Som nævnt i forrige afsnit afspejler udvikling af PICT typisk ændringer i den mikrobielle samfundsstruktur, hvorfor PICT studier ideelt set bør "valideres" via mikrobielle samfundsanalyser. Dette blev i PICT-RISK projektet udført ved brug af PLFA analyser rettet mod både bakterier og svampe (dette afsnit) og ved brug af 16S rRNA gen amplikon sekventering (Afsnit 7.2.3) rettet specifikt mod bakterier. Disse analyser blev kun lavet for MIT og DCOIT i jordprøver fra de samme mikrokosmos (efter 40 dage), som blev anvendt til PICT bestemmelse (Afsnit 7.3.1). PLFA koncentrationen i en jordprøve betragtes som en robust proxy for den mikrobielle biomasse, idet PLFA fra døde celler nedbrydes hurtigt i jord. Nogle phospholipider kan endvidere anvendes som taksonomiske markører for specifikke grupper af mikroorganismer som f.eks. svampe og bakterier eller undergrupper af bakterier (Gram-positive versus Gram-negative bakterier). PLFA analyser kan derfor anvendes til at kvantificere overordnede ændringer i den mikrobielle samfundsstruktur (f.eks. mellem bakterier og svampe). Endelig kan hele PLFA profilen fra en jordprøve betragtes som et kemisk "fingeraftryk", der afspejler hele den mikrobielle samfunds sammensætning. Biociders effekter på den mikrobielle samfundsstruktur kan undersøges ved at sammenligne PLFA profilerne i forskellige jordprøver ved brug af multivariable statistiske metoder som f.eks. principal komponentanalyse (PCA).

**TABEL 11.** PLFA koncentrationer (gennemsnit  $\pm$  standardafvigelse; nmol g<sup>-1</sup>) i de anvendte jorder (kon-trolbehandling uden biocid) efter 0 inkubationsdage og efter 40 inkubationsdage. Signifikante forskelle ( $P < 0,05$ ) mellem de to inkubationsperioder blev undersøgt via t-Student-test.

	0 dage	40 dage	t	P	
Total PLFAs		34 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4	1.59	0.15
Bacterial PLFAs		15.3 $\pm$ 1.6	13.6 $\pm$ 1.9	1.46	0.18
Gram + PLFAs		4.6 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.6	1.33	0.22
Gram – PLFAs		8.0 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.7	2.13	0.07
Fungal PLFAs		0.41 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.04	2.05	0.08

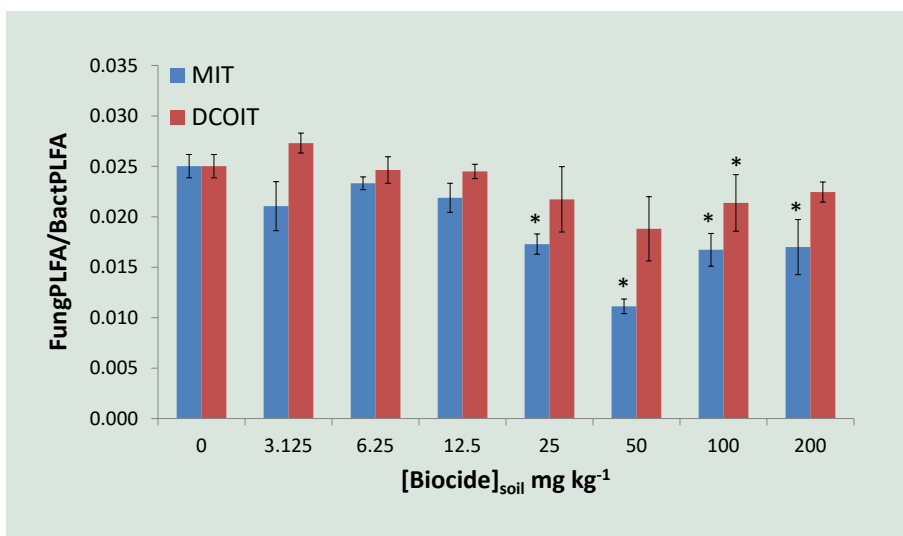
Tabel 11 viser PLFA data fra kontrol mikrokosmos uden tilsatte biocider. Den totale PLFA koncentration var  $34\pm 3$  nmol/g i begyndelsen af mikrokosmosforsøget (dag 0) mod  $31\pm 4$  nmol/g efter 40 dage, men forskellen var ikke statistisk signifikant. Baseret på taksonomiske PLFA markører responderede svampe, bakterier, Gram-positive bakterier og Gram-negative bakterier ens over tid. Resultaterne kan tyde på, at den mikrobielle biomasse faldt en smule i kontrol mikrokosmos over de 40 dage (dog ikke signifikante forskelle over tid), men også at den overordnede mikrobielle samfundsstruktur var relativt stabil i kontroljorden. Disse resultater var forventelige og er konsistente med den faldende mikrobielle aktivitet over tid i mikrokosmos med kontroljord (Afsnit 7.2.1; Tabel 8).



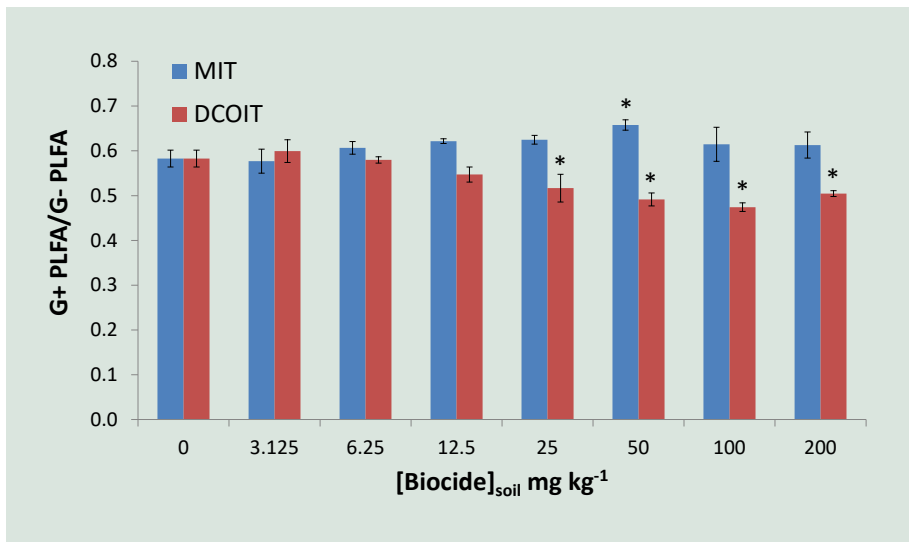


**FIGUR 24.** PLFA koncentrationer i kontroljordens mikrokosmos og i jordens mikrokosmos tilsat biocider (MIT og DCOIT) efter 40 inkubationsdage. A) summen af alle PLFA'er B) bakterielle PLFA'er C) Gram-positive PLFA'er D) Gram-negative PLFA'er og E) svampe PLFA'er. Fejlbjælker står for standardafvigelse af gennemsnitsværdier (n = 3 for biocidbehandlinger og n = 6 for kontrol behandlinger uden biocid). \* angiver signifikante forskelle (P<0,05) i forhold til kontrol behandlinger uden biocid.

Figur 24 viser effekterne af DCOIT og MIT på de samme fem PLFA fraktioner som omtalt ovenfor: Der sås ingen signifikante effekter af biociderne på den totale PLFA-koncentration eller på PLFA-markører for bakterier, men den højeste DCOIT koncentration (200 mg/kg) førte til en signifikant reduktion i PLFA-markører for både Gram-positive (26% reduktion) og Gram-negative bakterier (14% reduktion). PLFA-markører for svampe var også signifikant reducerede (26% reduktion) for DCOIT (200 mg/kg) og lidt overraskende for MIT ved koncentrationer helt ned til 25 mg/kg. Der var dog ikke noget klart dosis-respons forløb for MIT. Forholdet mellem svampe og bakterie PLFA-markører viste en faldende tendens med stigende biocidkoncentration for begge biocider (især for MIT) (Figur 25). Tilsvarende viste forholdet mellem Gram-positive og Gram-negative bakterie PLFA-markører en begrænset faldende tendens med stigende DCOIT koncentration, mens MIT ikke havde nogen effekt (Figur 26).



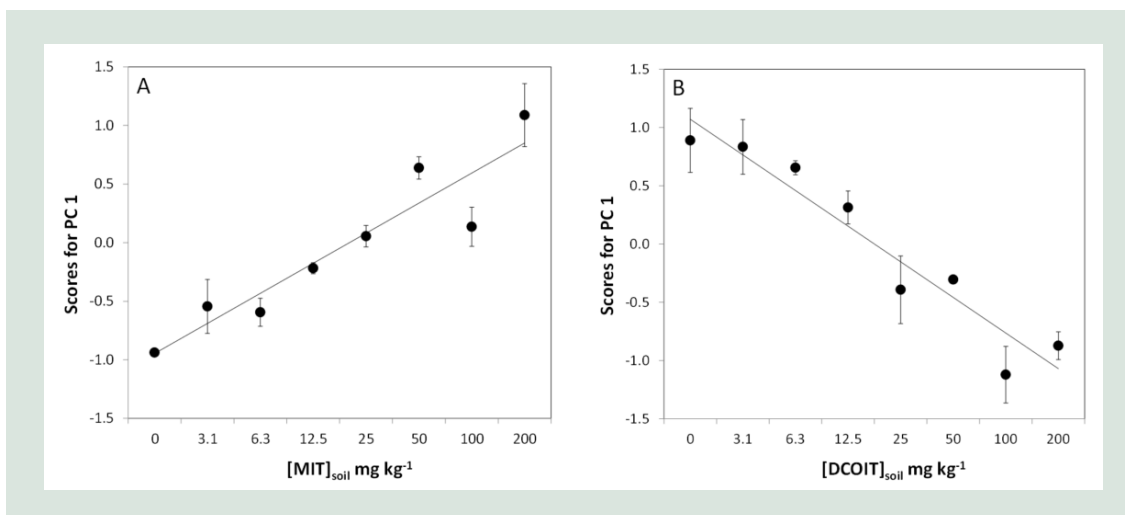
**FIGUR 25.** Svampe/bakterie ratio som funktion af biocidkoncentrationen.



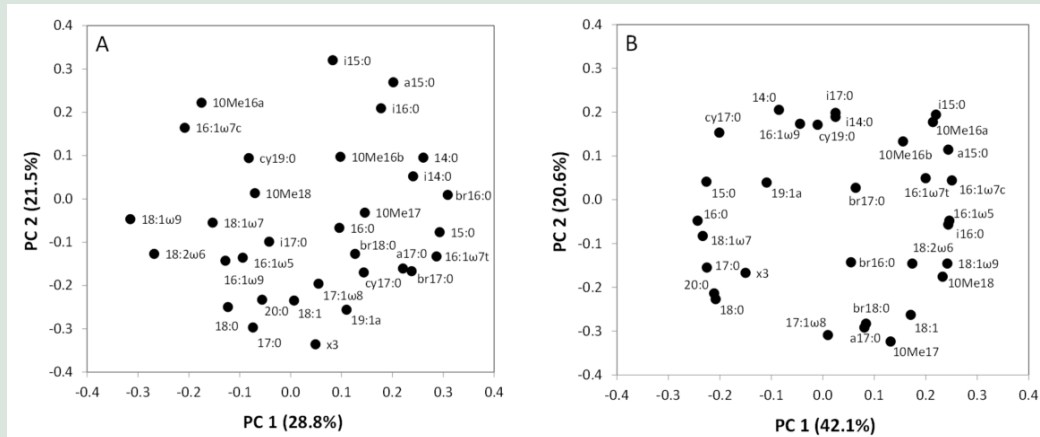
**FIGUR 26.** Gram +/Gram - ratio som funktion af biocidkoncentrationen

Principal komponentanalyse (PCA) blev anvendt for at analysere biocid-inducerede forskelle i mikrobiel samfundsstruktur. PCA analyser blev udført separat for MIT og DCOIT mikrokosmosforsøgene. PC1, 2 og 3 forklarede henholdsvis 28,8%, 21,5% og 13,6% af den totale varians i datasættet for MIT, mens de tilsvarende værdier var 42,1%, 20,6% og 14,6% for DCOIT. I begge datasæt var PC1 lineært korreleret med testkoncentrationen af biocid (Figur 27), mens dette ikke var tilfældet for PC2 og PC3 (data ikke vist). Resultaterne indikerer derfor, at biocidkoncentrationen var den primære faktor, der påvirkede artssammensætningen af mikroorganismer i mikrokosmosforsøgene.

PCA loading værdier for de forskellige PLFA stoffer viste, at jordmikrokosmos med høje koncentrationer af MIT resulterede i relativt høje koncentrationer af i14:0, 14:0, a15:0; 15:0, br16:0, 16:1ω7t, br17:0 og a17:0 og relativt lave koncentrationer af 16:1ω7c, 18:2ω6 og 18:1ω9 (Figur 28A). Jordmikrokosmos med høje koncentrationer af DCOIT resulterede i relativt høje koncentrationer af 15:0, 16:0, cy17:0, 17:0, 18:1ω7, 18:0 og 20:0; og relativt lave koncentrationer af i15:0, a15:0, i16:0, 16:1ω7c, 16:1ω7t, 16:1ω5, 10Me16a, 18:1ω9 og 10Me18 (Figur 28B).



**FIGUR 27.** Forholdet mellem biocidkoncentrationer og score af jordmikrokosmos tilsat MIT (A) eller DCO-IT (B) langs den første hovedkomponent (PC 1).



**FIGUR 28.** Indlæsning af de forskellige PLFA'er langs PC1 og PC2 fra Principal Component Analysis (PCA) i jordmikrokosmos tilsat MIT (A) og DCOIT (B).

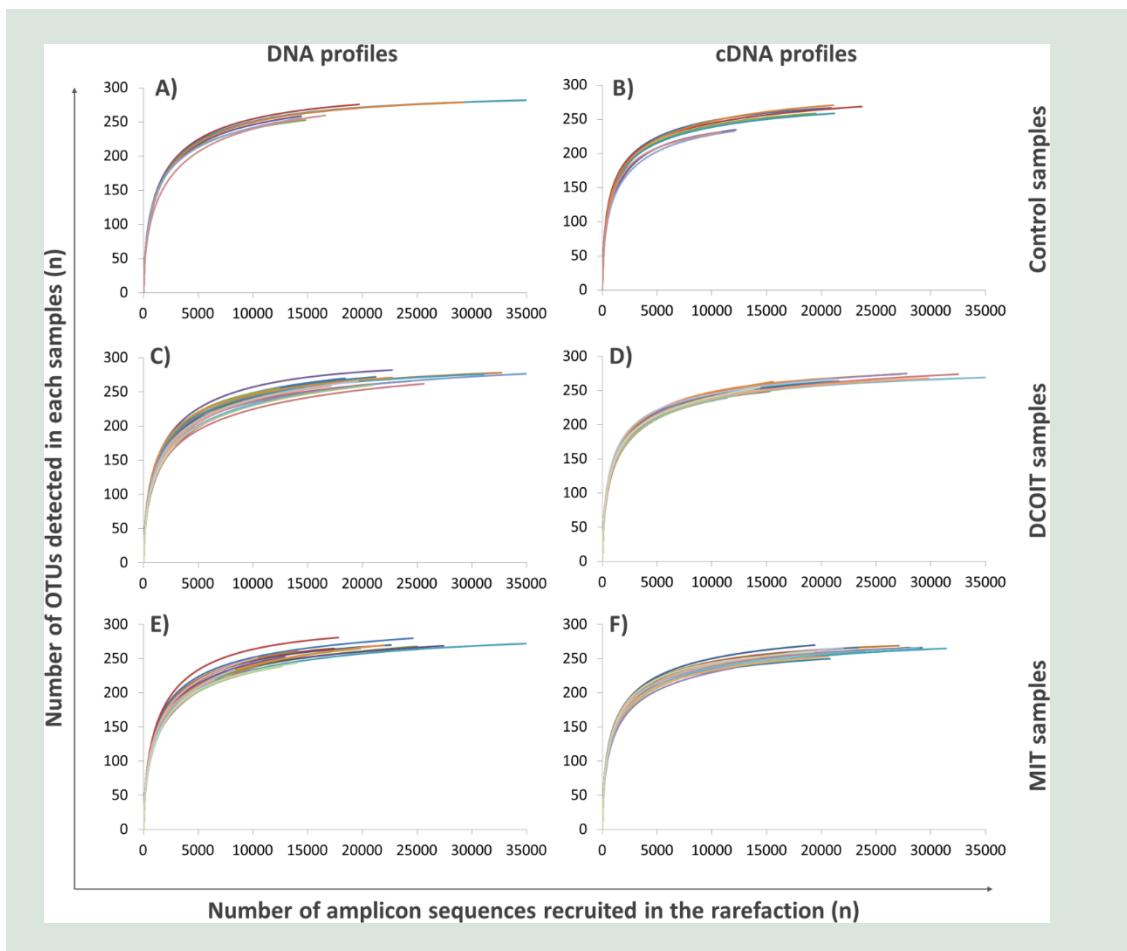
### 7.3.3 Mikrobiel samfundsanalyse – bakterier (16S rRNA)

Effekter af biocider specifikt på jordens bakteriesamfund blev udført med 16S rRNA gen amplikon sekvensanalyser foretaget på jord udtaget fra de samme mikrokosmos som for PICT og PLFA-analyser (se ovenfor). To varianter af denne analyse blev udført baseret på henholdsvis DNA eller RNA ekstraheret direkte fra jorderne. Ekstraheret RNA blev ved hjælp af enzymet revers transkriptase konverteret til komplementært DNA (cDNA), hvorefter DNA og cDNA blev anvendt til PCR amplificering af 16S rRNA genet. Den DNA baserede analyse afspejler direkte bakteriesamfundets sammensætning dog med det forbehold, at nogle bakterier har flere kopier af 16S rRNA genet, hvorfor deres andel af bakteriesamfundet vil blive overestimeret, mens bakterier med kun en enkelt kopi af genet vil blive underrepræsenteret. Den cDNA baserede analyse afspejler ud over bakteriesamfundets sammensætning også den relative forekomst af rRNA i de bakterieceller, som RNAet ekstraheres fra. Forekomsten af rRNA pr. celle regnes som et groft mål for cellens aktivitetsniveau, da ribosomantallet pr. celle er et udtryk for cellens kapacitet til at udføre proteinsyntese. Den RNA baserede metode vægter derfor biociders effekter på bakteriesamfundets aktive bakteriearter, mens den DNA baserede metode i højere grad, afspejler tilstedeværelsen af forskellige bakteriearter i jorden.

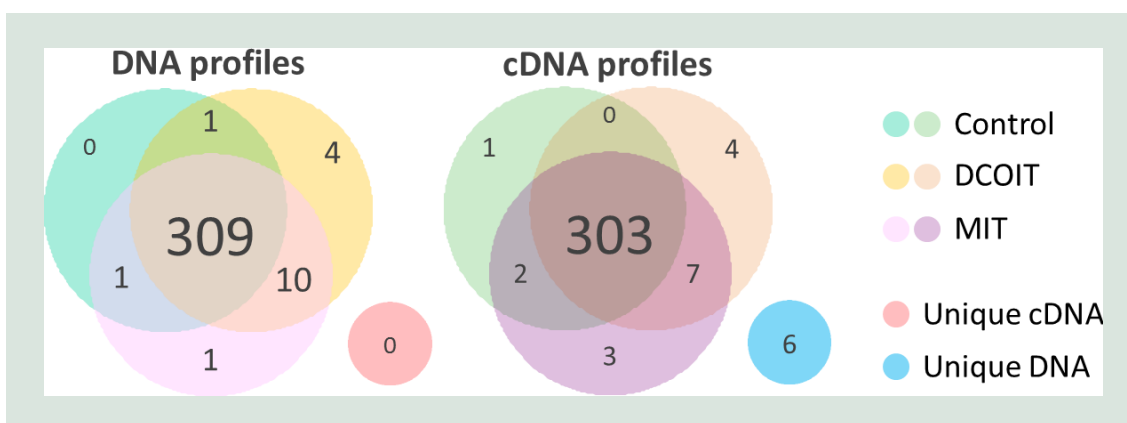
I alt 323 operationelle taksonomiske enheder (OTU) tilhørende 11 bakterie phyla blev detekteret på tværs af alle analyserede jordprøver fra anvendte lerblandede sandjord. Rarefaction analyser af 16S rRNA sekvenser viste, at sekventeringsdybden var tilstrækkelig til at kunne sammenligne den bakterielle samfundsstruktur på tværs af biocidbehandlinger (Figur 29). Denne konklusion blev yderligere bestyrket af Venn diagram af fordelingen af OTUs, der viste, at langt de fleste OTUs (309 for DNA og 303 for cDNA) kunne detekteres i alle jordbehandlinger (Figur 30). Derudover er det bemærkelsesværdigt, at alle 303 OTUs detekteret fra cDNA også kunne detekteres fra DNA. Samlet set viser ovenstående resultater, at resultaterne er robuste og tillader detaljerede analyser af biocidernes effekter på bakteriesamfundets taksonomiske sammensætning.

Selve mikrokosmosinkubationen på 40 dage havde ikke nogen markante effekter på alpha-diversiteten (Figur 29; Tabel 12). Der var ikke signifikante effekter af inkubationstid på observeret OTU-rigdom ("richness") eller ekstrapoleret OTU-rigdom (Chao-1). Til gengæld var der signifikante ( $p < 0.01$ ), men svage effekter af inkubationstid på andre diversitetsparametre (Simpson, Shannon and Equitability), der også i varierende grad vægter "evenness" (=reciprok dominans). Disse resultater indikerer lidt højere grad af dominans af de hyppigste OTUs efter 40 dage end ved forsøgets start. Mikrokosmosinkubationen på 40 dage havde heller ikke nogen signifikante effekter på den relative forekomst af forskellige OTUs (beta-diversiteten) (PERMANOVA,  $p = 0.37$ ).

Der var signifikante forskelle på alpha-diversiteten afhængigt af, hvilken type genetisk materiale (DNA versus cDNA), der blev anvendt (Tabel 12). OTU-rigdommen var lidt højere for DNA end for cDNA, hvilket sandsynligvis afspejler, at både aktive og inaktive OTUs detekteres ud fra DNA. Til gengæld var "evenness" signifikant højere i cDNA profiler, hvilket indikerer en lidt mindre grad af dominans af de hyppigste OTUs. Der var også signifikante forskelle på beta-diversiteten afhængigt af, hvilken type genetisk materiale (DNA versus cDNA), der blev anvendt (PERMANOVA, Bray-Curtis, 10000 permutations,  $p < 1.0E-06$ ).



**FIGUR 29.** Forekomstanalyse ("rarefaction") på rådata fra jordmikrokosmoseksperimentet. Pane i ven-stre kolonne (A, C og E) viser rRNA gen profilerne, mens højre kolonne (B, D og F) viser vi tilsvarende data baseret på komplementært DNA (cDNA dannet ud fra rRNA). Panel A og B vise kontrolprøverne, mens panel C og D viser prøver med DCOIT, og panel E og F viser prøver med MIT. "Rarefaction" plateauet blev kun vist for de første 35.000 sekvenser for at lette visualisering sammenligning.



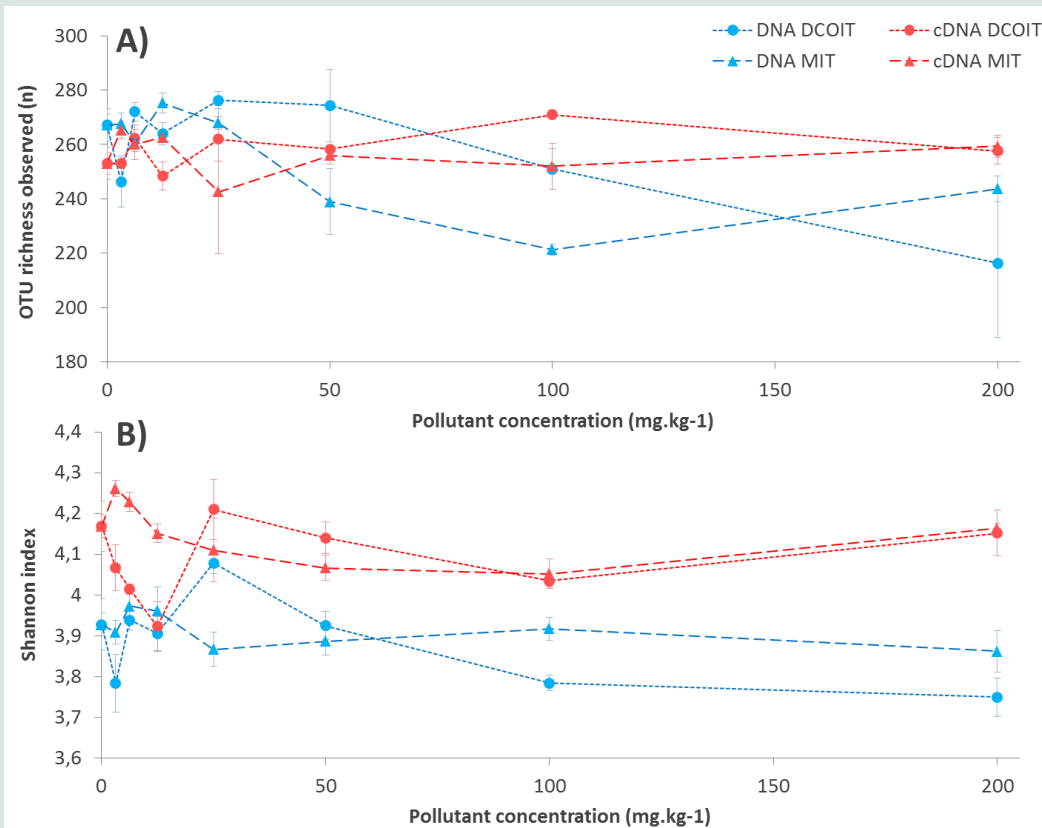
**FIGUR 30.** Fordeling af "artsrigdommen" baseret på påviste operationelle taksonomiske enheder (OTU'er) i DNA- og cDNA profiler. Venn-diagrammet til venstre viser DNA profiler, mens det til venstre viser cDNA-profilerne. Derudover er antallet af unikke OTU'er kun set enten i DNA (blå) eller cDNA (rød) vist i de små adskilte cirkler.



**TABEL 12.** Variansanalyse af alfa-diversiteten i kontroljordprøverne efter mikrokosmos inkubation. Tabel-len viser gennemsnitsværdierne for hvert indeks ( $\pm$ SD), ANOVA-linearitetskoefficienten  $r^2$  og tilhørende p-værdier. Det anvendte genetiske materiale (DNA, cDNA), de forurenende blok-kontroller og inkubationstiderne blev brugt som faktorer. P værdiens signifikans er givet som følger: \*\*\* < 0,001; \*\* < 0,01; \* < 0,05; < 0,1; - < 1.)

Alpha-diversity indices of control samples		Genetic material		Time (days)	
		DNA (n=4)	cDNA (n=4)	t0 (n=4)	t40 (n=4)
Observed Richness	Mean $\pm$ SD	267 $\pm$ 12	253 $\pm$ 17	261 $\pm$ 13	259 $\pm$ 19
	$r^2$		0,23		<0,01
	p-value		4,44E-03		0,59
	Significance		**		-
Chao-1	Mean $\pm$ SD	286 $\pm$ 9	270 $\pm$ 14	278 $\pm$ 13	278 $\pm$ 16
	$r^2$		0,41		<0,01
	p-value		4,75E-03		0,85
	Significance		**		-
Simpson	Mean $\pm$ SD	0,95 $\pm$ 0,004	0,96 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01
	$r^2$		0,27		0,13
	p-value		5,62E-04		4,76E-03
	Significance		***		**
Shannon	Mean $\pm$ SD	3,93 $\pm$ 0,08	4,17 $\pm$ 0,18	4,1 $\pm$ 0,2	3,99 $\pm$ 0,16
	$r^2$		0,49		0,10
	p-value		1,50E-05		3,29E-03
	Significance		***		**
Equitability	Mean $\pm$ SD	0,7 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,03
	$r^2$		0,66		0,08
	p-value		3,18E-16		3,53E-03
	Significance	***			**

Effekterne af de to biocider på alfa-diversiteten i jordens bakteriesamfund er vist i Figur 31 med tilhørende statistiske analyser vist i Tabel 13. Generelt var effekterne ret begrænsede, selv om de i mange tilfælde var statistisk signifikante med statistisk signifikante interaktioner mellem faktorerne. Mest bemærkelsesværdigt er det, at høje koncentrationer af MIT og DCOIT reducerede den observerede OTU rigdom for DNA profiler, mens denne effekt ikke observeres for cDNA profiler generet på baggrund af ekstraheret RNA (Figur 31).



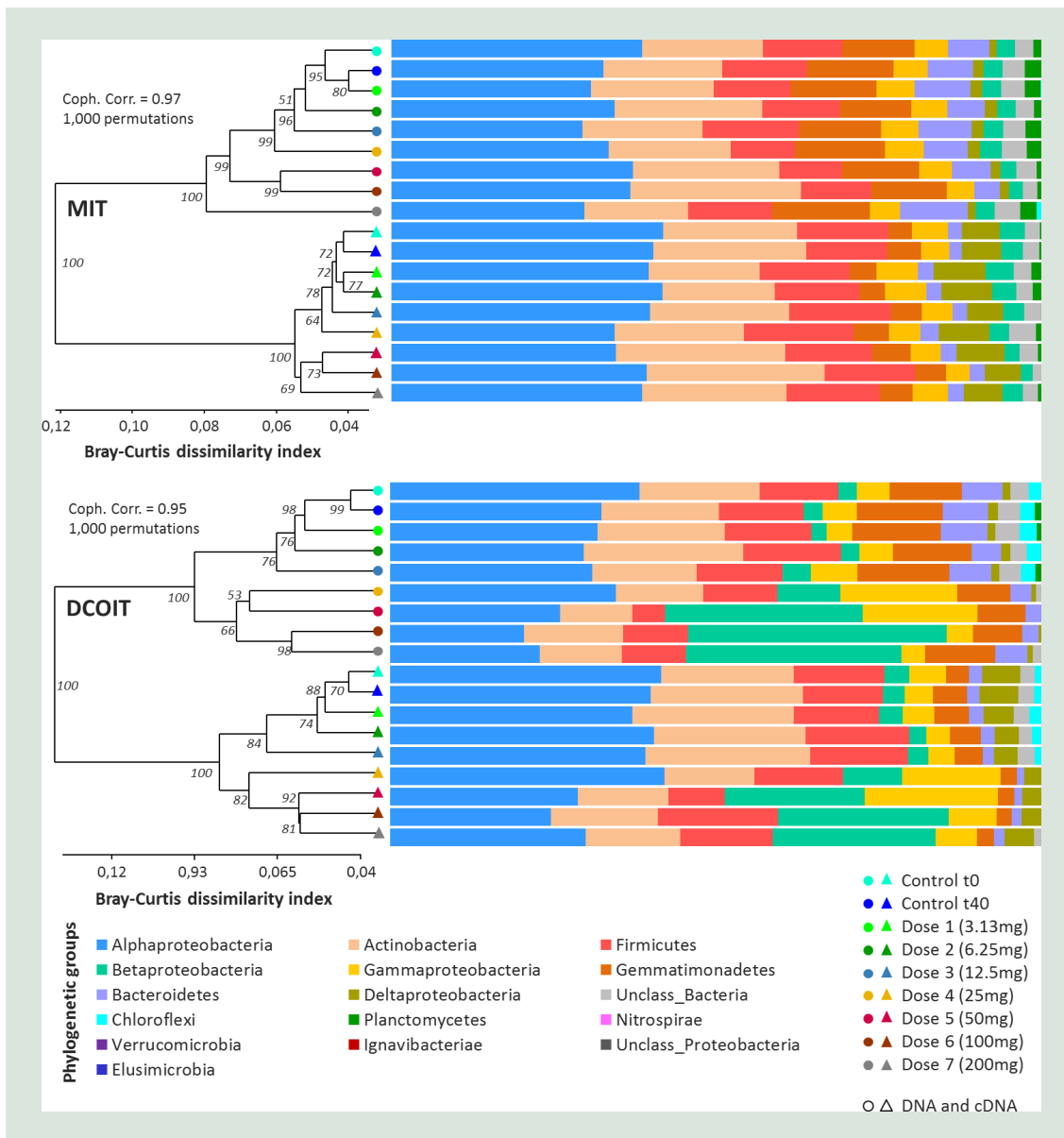
**FIGUR 31.** Alfa-diversitetsplot af rigdommen og jævnheden langs forurenende koncentrationer. Panel A) viser udviklingen af OTU rigdom, mens panel B) viser Shannon-indekset som et estimat af fællesskabets jævnhed. DNA- og cDNA-prøverne er farvet i blå og rødt, mens DCOIT og MIT vises med henholdsvis cirkler med små stiplede linjer og trekantede linjer. Fejlbjælker viser standardfejlen for replikater (SE).

**TABEL 13.** Variansanalyse af alfa-diversiteten i jordprøverne efter mikrokosmos berigelse med forurenende stoffer. Tabellen viser ANOVA linearitetskoefficienten  $r^2$  og tilhørende  $p$ -værdier. Det anvendte genetiske materiale (DNA, cDNA), det forurenende stof (DCOIT, MIT) og den anvendte dosis (3-200 mg/kg) blev brugt som faktorer.  $P$ -værdiens signifikans er givet som følger: \*\*\* < 0,001; \*\* < 0,01; \* < 0,05; . < 0,1; - < 1.)

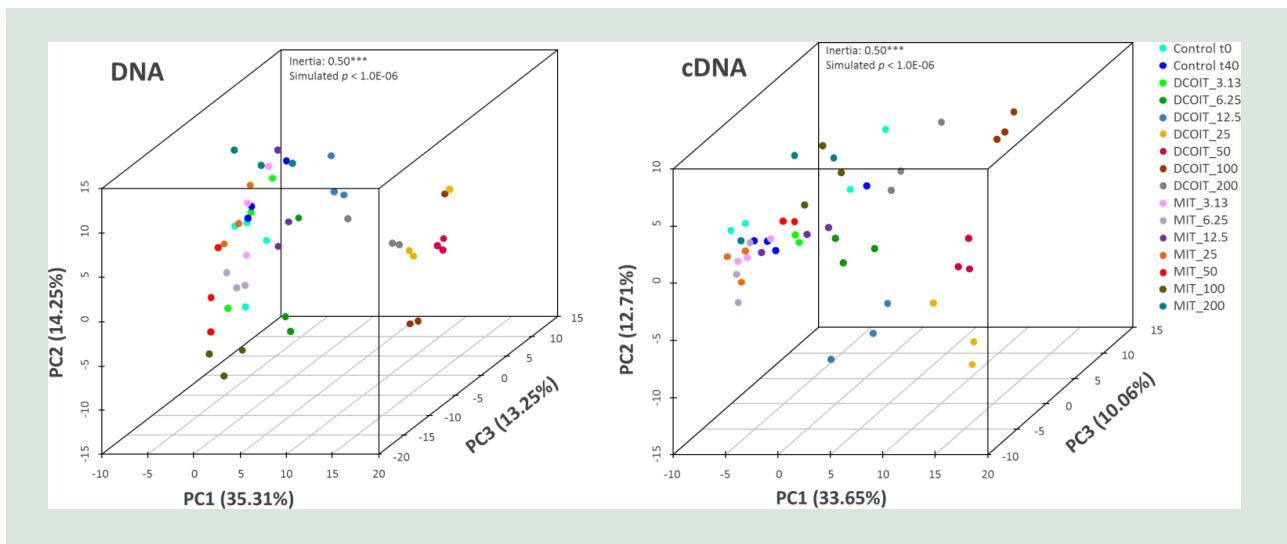
Factors	Observed richness			Shannon		
	$r^2$	$p$	Signif.	$r^2$	$p$	Signif.
1: DNA/cDNA	2,7E-05	0,99	-	0,88	2E-16	***
2: Dose	0,16	0,01	*	0,01	1,8E-03	**
3: Pollutant	0,17	0,03	*	0,04	3,0E-07	***
1:2	0,28	2,2E-04	***	0,01	1,1E-03	**
1:3	0,02	0,89	-	0,01	0,03	*
2:3	0,25	1,1E-03	**	0,03	4,4E-06	***
1:2:3	0,07	0,32	-	0,01	0,05	*

Figur 32 viser effekterne af MIT og DCOIT på beta-diversiteten af jordens bakteriesamfund på phylum niveau baseret på både DNA og cDNA sekvensprofiler. Der ses generelt udtalt overensstemmelse (kongruens) mellem biocideffekterne baseret på de to typer af bakteriesamfundsanalyser, men forskellene mellem behandlingerne (Bray-Curtis forskellighed) var generelt større på DNA end på cDNA niveau. De markante forskelle på DNA og cDNA profiler skyldes, at nogle bakteriegrupper (f.eks. delta-proteobakterier) konsekvent var overrepræsenteret i cDNA relativt til DNA-sekvensprofiler, mens det modsatte gjorde sig gældende for andre bakteriegrupper (f.eks. Bacteroidetes). Konsistent med de divergerende PICT resultater for DCOIT (signifikant PICT  $\geq 6,25$  mg/kg) og MIT (fravær af PICT med op til 100 mg/kg) er det tydeligt, at DCOIT havde en større effekt på bakteriesamfundsstrukturen end MIT havde (Figur 32). Derudover skal det bemærkes, at den anvendte parvise grupperingsmetode (se dendrogrammer til venstre i figuren) afspejlede dosis-respons effekten perfekt.

Effekterne af de to biocider på beta-diversiteten i jordens bakteriesamfund er også vist i Figur 33 (principal komponent analyse) med tilhørende statistiske analyser vist i Tabel 14. Monte-Carlos simuleringer viste en meget stærk og ikke-tilfældig gruppering af bakteriesamfund fra mikrokosmos replikater for både DNA og cDNA sekvensprofiler ( $p < 1.0E-06$ ). De to metoder viste endvidere den samme gruppering af biocidbehandlingerne, men med en lidt højere grad af replikathomogenitet for cDNA sekvensprofiler end for DNA sekvensprofiler. Effekten af DCOIT kan især aflæses på PC1 og PC2, der tilsammen forklarede 45-50 % af variansen. Effekten af DCOIT var især tydelig ved koncentrationer  $\geq 12,5$  mg/kg, mens effekter af MIT kun kunne ses for meget høje koncentrationer ( $\geq 50$  mg/kg).



**FIGUR 32.** Klyngedendrogramanalyse med søjlediagrammer for relativ forekomst af jordbakteriesamfund behandlet med forurenende stoffer. De øverste og nederste figurer viser henholdsvis MIT- og DCOIT-behandlingerne. Dendrogrammer blev genereret fra replikatgennemsnittet af OTU tabellen ved brug af Bray-Curtis-ulighedsindeks for afstandsmatricerne med en bootstrapped parvis koblingsmetode (1.000 bootstraps). Cophenic korrelationskoefficient (MIT = 0,97; DCO-IT = 0,95) er meget høje, hvilket indikerer bevarelse af de parvise afstande mellem de originale prøver. Søjlediagrammer repræsenterer den relative forekomst af de gentagelsesgennemsnitlige tællinger opnået for hver fylogenetisk gruppe. Cirkler og trekanter i spidsen af grenene indikerer henholdsvis DNA- og cDNA-profiler.



**FIGUR 33.** Effekter af DCOIT og MIT på jordbakteriesamfundene struktur (principalkomponentanalyse) baseret på DNA (venstre ordinationsplot) og cDNA (højre ordinationsplot). Ikke-tilfældig fordeling af grupperne blev testet ved hjælp af en Monte-Carlo-simulering med 10.000 permutationer for begge BGA'er (DNA: inerti = 0,5, simuleret  $p < 1,0E-06$ ; B: inerti: 0,5, simuleret  $p < 1,0E-06$ ). Samfundsstrukturenes sammenhæng mellem de opnåede DNA- og cDNA BGA-profiler blev vurderet ved hjælp af Mantels test med 10.000 permutationer (inerti = 0,55\*\*\*, simuleret  $p < 1,0E-06$ ).

**TABEL 14.** Trevejs PERMANOVA til de testede faktorer på jordens bakteriesamfund behandlet i mikrokosmos. Den øverste del af tabellen viser, at PERMANOVA kun er begrænset til kontrolprøverne, mens delen nedenfor viser PERMANOVA udført på alle prøver (inklusive kontroller). Analysen blev udført på Bray-Curtis ulighedsindeks. PERMANOVA blev udført med 10.000 permutationer ( $p$ -signifikans \*\*\*  $< 0,001$ ; \*\*  $< 0,01$ ; \*  $< 0,05$ ;  $< 0,1$ ; -  $< 1$ .)

PERMANOVA on Bray-Curtis (10.000 permutations)				
Tested factors		$r^2$	$p$	Signif.
<b>Control microcosms only</b>	1: Time (t0, t40)	0,03	0,37	-
	2: Material (DNA, cDNA)	0,55	1,00E-06	***
	3: Control block (MIT, DCOIT)	0,21	1,60E-03	**
	1:2	0,05	0,18	-
	1:3	0,03	0,39	-
	2:3	0,06	0,14	-
	1:2:3	0,03	0,46	-
<b>Pollutant treated and control microcosms</b>	1: Material (DNA, cDNA)	0,34	1,00E-06	***
	2: Pollutant (Control, MIT, DCOIT)	0,11	1,00E-06	***
	3: Dose (mg.kg-1)	0,10	1,00E-06	***
	1:2	0,01	0,87	-
	1:3	0,04	0,02	*
	2:3	0,09	1,00E-06	***
	1:2:3	0,02	0,79	-

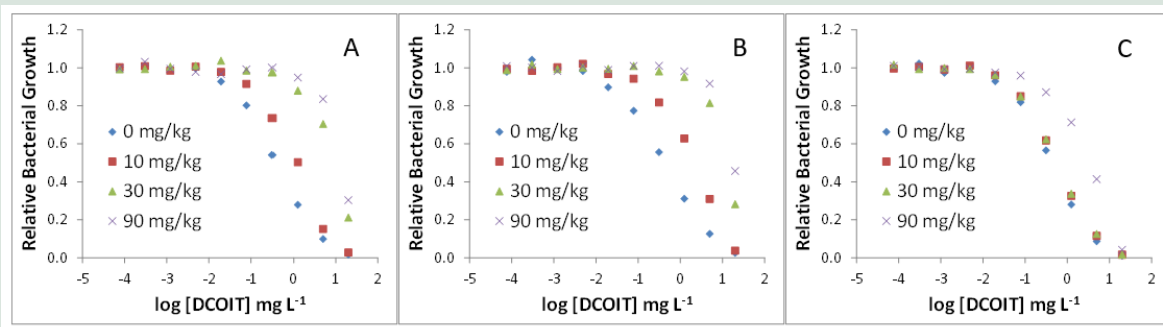
## 7.4 PICT feltforsøg

PICT udgør som tidligere nævnt en økologisk relevant integreret eksponerings- og effekt-indikator indenfor mikrobiel økotoxikologi (Brandt et al., 2015; Rotter et al., 2015; Tlili et al. 2016). PICT konceptets styrke ligger i den indbyggede kausalitet mellem eksponering for et toksisk stof og efterfølgende udvikling af tolerance overfor det pågældende stof. Denne indbyggede kausalitet mellem eksponering og effekt skyldes, at mikrobielle samfund generelt kun vil udvikle tolerance overfor et kemisk stof, hvis stoffets toksicitet er i stand til at selektere for resistente mikroorganismer ("toxicant-induced succession"). Udvikling af PICT indikerer derfor, at det kemiske stof har været biotilgængeligt i en tilstrækkelig lang periode til at kunne selektere for resistente mikroorganismer. Dette medfører, at PICT potentielt kan anvendes som en økologisk relevant indikator for tidligere eksponering overfor toksiske stoffer i forurenede jorder (Berg et al., 2012). Derudover kan fraværet af et PICT udvikling (med få undtagelser) betragtes som direkte evidens for negligerbare toksiske effekter af et kemisk stof i forurenede jorder. PICT adskiller sig herved fra andre mikrobielle testparametre i denne rapport som f.eks. mikrobiel vækst/aktivitet eller samfundsstruktur, idet disse parametre under feltbetingelser kan påvirkes ikke kun af toksiske stoffer, men ofte i langt højere grad af en lang række andre miljøfaktorer som f.eks. pH, organisk stof eller temperatur, hvilket i praksis gør det yderst vanskeligt at etablere kausale årsagssammenhænge mellem kemisk eksponering og tilhørende toksiske effekter.

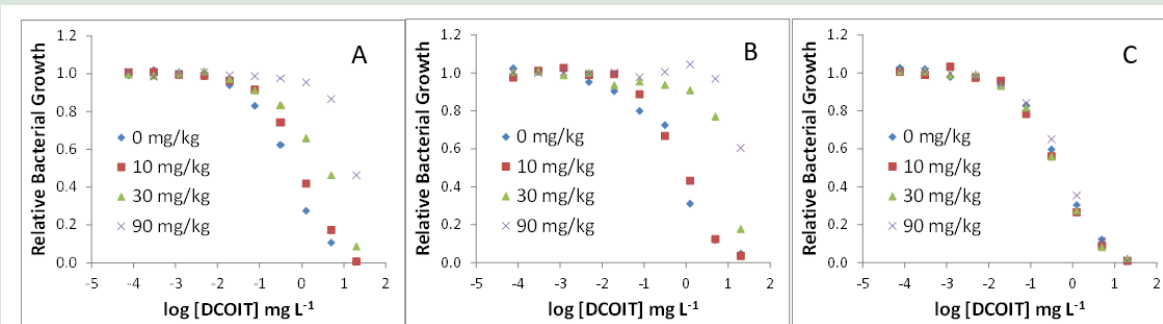
Vi undersøgte derfor PICT som en potentiel eksponeringsindikator i feltstudier udført i den samme jord, som blev anvendt laboriemikrokosmosforsøgene (her kaldet sandjord) samt i en mere lerrig havejord (lerjord) med højere indhold af organisk stof fra Greve Strand. Forsøgene blev udført med DCOIT som teststof, og blev for den lerblandede sandjords vedkommende udført parallelt i felten og i laboratoriet. Tilsætning af DCOIT til jorderne foregik i alle tilfælde i laboratoriet, hvorefter jorderne blev inkuberet i laboriemikrokosmos (22 °C) eller fordelt i potter, der blev nedgravet i en ikke-beplantet havejord (ugødet og usprøjtet græsplæne vendt med en spade). PICT blev målt henholdsvis 1½, 3 og 6 måneder efter tilsætning af DCOIT til jorderne. Forsøget foregik i perioden medio marts – medio september 2015. Efter 1½ måned havde sandjordens bakteriesamfund som forventet udviklet tolerance overfor DCOIT for alle testede DCOIT-koncentrationer (10, 30 og 90 mg/kg) med stort set identiske resultater i laboratoriet og i felten, mens PICT kun blev observeret for den højeste koncentration (90 mg/kg) sandsynligvis p.g.a. en lavere biotilgængelighed af DCOIT i lerjorden end i sandjorden (Figur 34). De stort set identiske resultater i laboratoriet og felten er bemærkelsesværdige, idet jordtemperaturen i felten var markant lavere (<ca. 10 °C) end i laboratoriet (22 °C; mørke, konstant jordfugtighed osv.), samtidig med, at feltjorderne i meget varierende grad blev påvirket af spirende planter, tilførsel af nedfaldne blomsterblade fra nærliggende træ, fugleekskremitter, svingninger i jordens fugtighed osv.).

Efter 3 måneder kunne der ikke længere detekteres PICT i lerjorden og kun for de højeste to koncentrationer (30 og 90 mg/kg) i sandjorden, men nu med en tendens til et stærkere PICT-signal i de laboratorie-inkuberede jorder end i den samme jord inkuberet under feltbetingelser (Figur 35).

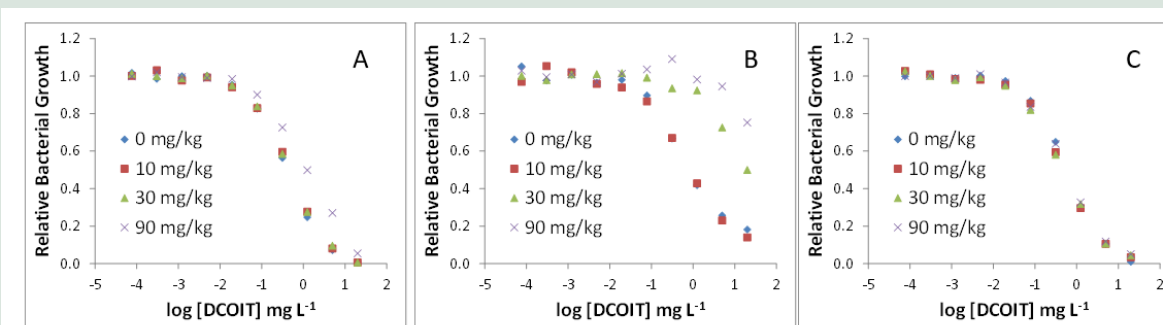
Efter 6 måneder kunne der ikke længere observeres PICT i sandjorden inkuberet under feltbetingelser for de to laveste DCOIT koncentrationer (10 og 30 mg/kg), og der var kun et svagt PICT signal tilbage (mindre end efter 3 måneder) for den højeste DCOIT koncentration (90 mg/kg) (Figur 36). Der var imidlertid stadig et markant og nærmest uændret PICT signal (i forhold til efter 3 måneder) i de tilsvarende laborieinkubationer med 30 og 90 mg/kg.



**FIGUR 34.** Dosisresponskurver efter 1,5 måned fra DCOIT-tilsætninger i jord med forskellige niveauer af giftstof i jorden. Sandjord ved feltforsøg (A); sandjord under laboratorieforhold (B); havejord ved markforsøg (C).



**FIGUR 35.** Dosisresponskurver efter 3 måneder fra DCOIT-tilsætninger i jord med forskellige niveauer af giftstof i jorden. Sandjord ved feltforsøg (A); sandjord under laboratorieforhold (B); havejord ved markforsøg (C).



**FIGUR 36.** Dosisresponskurver efter 6 måneder fra DCOIT-tilsætninger i jord med forskellige niveauer af giftstof i jorden. Sandjord ved feltforsøg (A); sandjord under laboratorieforhold (B); havejord ved markforsøg (C).

## 7.5 Screening af biocider i byjorder

5 ud af de 11 analyserede biocider blev detekteret ved udvaskning af facaden fra 8 ud af 16 huse: terbutryn, diuron, carbendazim, iodocarb and octylisothiazolinon. Methylisothiazolinon, benzisothiazolinon, dichlorooctylisothiazolinon, mecoprop, isoproturon, cybutryn, tebuconazol, and propiconazol blev ikke detekteret. Der blev primært fundet 1-2 stoffer i hver facadeprøve (Tabel 15).

Lodocarb blev fundet i 2 udvaskningsprøver men blev ikke fundet i jordprøverne (Tabel ). De andre biocider havde koncentrationer mellem 0,001 og 0,1 mg kg<sup>-1</sup> i jordprøver opsamlet ved husene (Figur 37a). Der blev fundet op til 0,15 mg kg<sup>-1</sup> af tebuconazol og propiconazol i enkelte jordprøver, mens disse ikke blev detekteret i udvaskningsprøverne. En mulig forklaring er, at der i jorden biocider, som stammer fra gammel maling, og ikke fra den maling der pt. er anvendt på overfladen af bygningerne.

Terbutryns nedbrydningsprodukter blev fundet med koncentrationer mellem 0,1 og 20 µg kg<sup>-1</sup> i jord, hvor de tilsvarende vandprøver fra facaderne indeholdt terbutryn

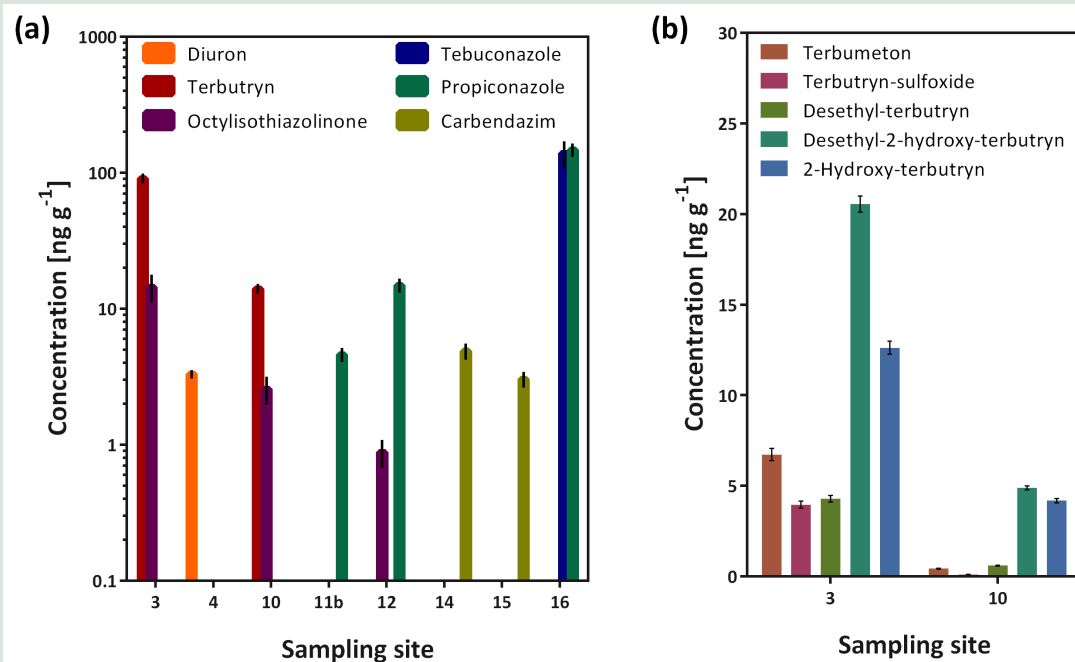
(Figur 37b), imens metabolitter af octylisothiazolinon var under detektionsgrænsen i alle prøver.

**TABEL 15.** Sammenligning af påvisning i perkolatet 'leachate' (L) og påvisning i jord (S).

Sample site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11b <sup>1</sup>	12	13	14	15	16
Iodocarb								L									L
Diuron				L, S													
Terbutryn			L, S							L, S							
OIT			L, S							L, S			L, S				L
Car- bendazim						L									L, S		L, S
Tebuconazole			S														S
Propiconazole												S	S				S

<sup>1</sup>Kun jord; modtaget vand fra en træfacade (leachate er ikke analyseret) og bygning nr. 11.





**FIGUR 37.** Koncentrationer af biocider (a) og b) nedbrydningsprodukter i urbane jorder. Kun sampling site 3 & 10 var tæt på de behandlede facader. (Error bars: metode relativ standardafvigelse).

# 8. Diskussion

## 8.1 Biocider i jord – forekomst og skæbne

Generelt var målingerne af jord konsistente med laboratorieeksperimenterne. Specielt for de biocider, som blev nedbrudt langsomt i laboratoriet. Især terbutryn, diuron og triazol er blev fundet i jordprøverne. Terbutryn metabolitter blev også detekteret i jordprøverne, mens OIT-metabolitter ikke blev detekteret.

Selv om OIT blev nedbrudt relativt hurtigt i laboratorieforsøgene, blev dette stof fundet i jordprøver på 3 lokationer, hvilket dokumenterer det høje forbrug af dette stof. På alle lokationer var facaderne blevet behandlet indenfor de sidste 3 år, så emissionerne var forventet at være høje (Bollmann et al., 2017). Gentagende udvaskning med regn betyder, at OIT må betragtes som pseudo-persistent (Mackay et al., 2014).

Tebuconazol og propiconazol blev målt i koncentrationer, der var henholdsvis lige over eller op til 7 gange højere end "predicated no effect concentrations" for jordorganismer:  $PNEC_{soil}$  (TBU, earthworm) = 0,1 mg a.i./kg ww (European Parliament and Council, 2007b);  $PNEC_{soil}$  (PPZ, earthworm) = 0,02 mg a.i./kg ww (European Parliament and Council, 2007a). Tebuconazol og propiconazol var ligeledes over effektkoncentrationerne. På den anden side var terbutryn koncentrationerne størrelsesordener under den letale koncentration på  $LC_{50}$ (TB,14 d, earthworm) = 107 mg  $kg^{-1}$  DW (US EPA).

## 8.2 Effekter af biocider på jordens mikroorganismer

Mikrobielle samfund kan respondere på biocider og andre toksiske stoffer på forskellige måder, og det er derfor ikke muligt at forstå biocidernes effekter alene ud fra en eller to økotoksikologiske tests som f.eks. OECD 216 (N omsætning; især nitrifikation) eller OECD 217 (SIR) (Brandt et al., 2015). PICT-RISK projektet er unikt i den forstand, at det efter vores bedste viden er det eneste studie af biocider, der både undersøger for selektiv inhibering af bakterie- og svampe-vækst og dertil knyttet udvikling af samfundstolerance (PICT) og ændringer i mikrobiomets diversitet. Dette mindsker risikoen for at overse toksiske effekter betydeligt, men det mindsker også risikoen for at overse mikrobiomets evne til at reetablere sin funktion og struktur efter biocid stress (resiliens).

PICT-RISK projektets resultater indikerer, at biocider i de fleste jorder vil findes i så lave koncentrationer, at de ikke vil have signifikante toksiske effekter på jordens mikroorganismer målt med de metoder, som indgik i PICT-RISK projektet. Biociders effekter på jordens mikroorganismer er dog generelt meget dårligt belyst sammenlignet med andre stofgrupper som f.eks. metaller og antibiotika. For de fleste biocidteststoffer i PICT-RISK projektet var vi således ikke i stand til at finde økotoksikologiske kvalitetsstudier, hvorfor PICT-RISK projektets resultater må siges at bidrage til en markant øget vidensbase om disse forhold. Selv om biociderne skønnes ikke at have toksiske effekter på jordens mikroorganismer kan vi dog ikke udelukke, at nogle biocider selv ved ekstremt lave miljørelevante koncentrationer kan selektive specifikke subpopulationer, forstyrre gensyntese og kemisk signalering mellem mikroorganismer etc. på samme måde, som det tidligere er vist for antibiotika (Davies et al., 2006; Andersson & Hughes, 2014; Brandt et al., 2015).

Selv i situationer, hvor ekstremt høje koncentrationer af biocidet DCOIT havde selekteret for biocid tolerance var vi i stand til at vise, at bakteriesamfundet i løbet af få måneder gradvist mistede den opbyggede biocid tolerance, når der ikke længere var "brug for den". Dette skyldes

antageligvis, at det koster cellerne energi at opretholde biocid resistens (Andersson & Hughes, 2010), hvorfor følsomme bakterier vil have en konkurrencefordel, når biocidet er nedbrudt. Bakteriesamfundet var altså meget robust (resilient), idet det var i stand til hurtigt at vende tilbage til sin originale tilstand eller til en ny stabil tilstand (Shade et al., 2012; Griffiths and Philippot, 2013; Pereira e Silva et al., 2013).

## 9. Konklusion

En række specifikke hypoteser opstillet ved PICT-RISK projektets start blev alle testet eksperimentelt i løbet af projektperioden. Det blev undersøgt om hypoteserne kunne falsificeres. Hypoteser, der ikke kunne falsificeres, betragtes i nedenstående tekst som værende "bekræftede", mens falsificerede hypoteser betragtes som værende "ikke-bekræftede". Konklusionerne må generelt betragtes som værende ret robuste, men det skal understreges, at der selvfølgelig er en vis biologisk, eksperimentel og statistisk usikkerhed forbundet med konklusionerne.

Hypotese 1) OECD 217 testmetoden underestimerer toksiske effekter af biocider i forhold til gruppe-specifikke vækstinhiberingsassays målrettet henholdsvis svampe eller bakterier.

Konklusion 1) Denne hypotese blev testet for alle de teststoffer, der gav anledning til akutte toksiske effekter på jordens mikrobielle aktivitet; dvs. for biociderne MIT, BIT, OIT, DCOIT, PPZ, TBU, MCPP og TB samt for referenceteststoffet 3,5-DCB. For alle teststoffer var mindst en af de to tests rettet mod mikrobiel vækst mere følsom end SIR metoden i den første uge efter tilførsel af teststofferne til jorden, og i de fleste tilfælde var både svampe- og bakterie-vækst mere følsomme end SIR. Derudover er det tydeligt, at SIR ikke afspejlede de faktiske mikrobielle processer i jorden, og at OECD 217 testen derfor ikke er egnet til at indikere, hvordan mikrobiel aktivitet genetableres i jord over tid. OECD-metoden har derfor begrænset økologisk relevans. OECD testens fordele er til gengæld, at den er simpel, billig og lidt mere reproducérbar end de to mikrobielle væksttests.

Hypotese 2) Svampemidler inhiberer svampevækst i jord, hvilket fører til, at bakteriers vækst stimuleres pga. mindre intens konkurrence fra svampe, mens der ikke kan måles hæmning af basal jordrespiration (BR) pga. funktionel redundans i jordens C mineraliseringsprocesser. Det forventes således, at tolerante mikroorganismer (her især bakterier) vil blive mere aktive i takt med at svampenes aktivitet inhiberes.

Konklusion 2) Denne hypotese blev testet for svampemidlerne PPZ og TBU og kunne kun delvist bekræftes. Begge svampemidler inhiberede som forventet svampevækst, men bakterievækst viste komplekse dosis-respons forløb, der indikerede, at svampemidlerne også i nogen kunne inhibere bakterievæksten. Til gengæld kunne der for den højeste PPZ koncentration observeres en stigning i bakterievæksten jf. vores hypotese. Basal respiration blev inhiberet for det ene svampemiddel (TBU; dog først efter 40 dage), mens der ikke sås nogen hæmning for det andet svampemiddel (PPZ). Samlet set bekræfter vores resultater, at svampemidler primært vil inhibere svampevækst. Vores resultater indikerer desuden, at svampemidlers effekter på bakterievækst kan forklares dels med direkte toksiske effekter i bakterier og dels med indirekte effekter af svampemidler som f.eks. øget bakterievækst pga. mindre konkurrence med svampe. Endelig viser vores resultater også, at der findes betydelig funktionel redundans i jordens C mineraliseringsprocesser, hvorfor BR er mindre påvirket af svampemidler end mikroorganismers vækst i jorden.

Hypotese 3) Biocider rettet mod både svampe og bakterier vil initielt inhibere både svampes og bakteriers vækst i jorden, men efter få dage/uger vil vækstinhiberingen ophøre enten fordi biociderne nedbrydes eller fordi de mikrobielle samfund udvikler biocid tolerance (PICT).

NOTE: PICT undersøges i dette projekt kun for jordens bakteriesamfund.

Konklusion 3) Denne hypotese blev testet i forsøgene med de fire isothiazolinoner (MIT, BIT, OIT og DCOIT). Hypotesen blev bekræftet for bakterier for alle fire stoffer og for svampe for MIT. Alle fire isothiazolinoner var nedbrydelige med halveringstider på under 10 dage, men bakterierne var i stand til at genetablere deres vækst hurtigere end svampene, hvilket giver mening ud fra den betragtning, at bakterier generelt kan vokse hurtigere end svampe. DCOIT selekterede for et biocidtolerant bakteriesamfund (PICT-respons  $\geq 6,25$  mg/kg), mens der ikke var noget tydeligt PICT-respons efter eksponering til de øvrige isothiazolinoner bortset fra for den højeste koncentration af OIT (50 mg/kg).

Hypotese 4) PICT overfor biocider vil kun forekomme i tilfælde, hvor biociderne initielt hæmmer jordbakteriernes vækst, da initial vækstinhibering er en indikator for selektionstrykket fra de testede stoffer.

Konklusion 4) Denne hypotese blev testet med DCOIT og kunne bekræftes for dette stof. Tærskelkoncentrationer for PICT-udvikling ( $\geq 6,25$  mg/kg) var 8 gange højere end tærskelkoncentrationer for initial hæmning af bakterievækst efter 4 timer eller 2 dage (0,8 mg/kg).

Hypotese 5) Initial vækstinhibering og PICT-effekter forårsaget af biocider i jordmikrokosmos kan valideres og korreleres til ændringer i den mikrobielle samfundsstruktur (PLFA profiler) eller i 'artssammensætningen' af bakterier (amplikon sekvensanalyser).

Konklusion 5) Denne hypotese blev undersøgt for stofferne MIT (kun vækstinhibering) og DCOIT (vækstinhibering og PICT). Bakterievækst blev var ikke påvirket af teststofferne efter 40 dage, og svampevæksten var også ved at genetablere sig (især for MIT) efter 40 dage. Alligevel havde begge stoffer klare effekter på den mikrobielle samfundsstruktur. Effekten var især tydelig for DCOIT, hvilket er konsistent med, at kun dette stof selekterede for et mere tolerant bakteriesamfund.

Hypotese 6) Biocid eksponering i jord kan føre til co-selektion af tetracyclin resistente jordbakteriesamfund.

Konklusion 6) Denne hypotese blev kun testet for DCOIT og kunne bekræftes for DCOIT koncentrationer  $\geq 100$  mg/kg. DCOIT selekterede dog for DCOIT tolerance for DCOIT koncentrationer  $\geq 6,25$  mg/kg, hvilket viser, at biocid-induceret co-selektion af antibiotika resistens ikke nødvendigvis sker, såfremt der selekteres for biocid tolerance.

Hypotese 7) Biocider nedbrydes i jord og nedbrydningskinetikken kan modelleres.

Konklusion 7) Denne hypotese blev testet for alle biocider valgt til PICT-RISK projektet. De testede biocider kunne opdeles i letnedbrydelige, moderat nedbrydelige og svært nedbrydelige (persistente) stoffer. Nedbrydning kunne modelleres med førsteordens kinetik med halveringstider helt ned til 0,28 dage for MIT til  $> 200$  dage (sandsynligvis op til flere år) for de mest persistente stoffer (azoler, diuron og triaziner). Nogle biocider kunne betragtes som værende pseudo-persistente i jorder, der påvirkes af udvaskning fra byggematerialer i forbindelse med regnhændelser.

Hypotese 8) Toksiske biocid nedbrydningsprodukter akkumulerer ikke i jorden.

Konklusion 8) Denne hypotese blev undersøgt med terbutryn (TB) og OIT: Hypotesen blev falsificeret for TB, idet der akkumulerede persistente nedbrydningsprodukter med 100 % genfindning af TB som enten TB eller akkumulerende TB nedbrydningsprodukter (perfekt massebalance). OIT nedbrydningsprodukter blev også identificeret i jord, men disse stoffer forsvandt efterfølgende fra jorden, hvilket sandsynligvis skyldes mineralisering af stofferne eller stoffernes indbygning i nedbryder mikroorganismer. Halveringstider for OIT nedbrydningsprodukter var på samme niveau som for OIT (9.3 dage).

Hypotese 9-10) PICT-konceptet kan anvendes til at teste toksiske effekter af biocider i felteksponerede jorder, og PICT-signalet er positivt korreleret til biocid eksponeringen.

Konklusion 9-10) Hypoteserne (overlappende) blev testet med DCOIT som model biocid og kunne begge bekræftes. På trods af stor heterogenitet i feltforsøgene pga. variabel plantevækst, påvirkning fra fugle (f.eks. via ekskrementer) osv. sås et meget klart dosis-afhængigt PICT-respons i begge jordtyper efter 1½ måned. Udviklingen af PICT over denne tidsperiode var endvidere nærmest identisk i felten og i parallelle mikrokosmos opsat med den samme lerblandede sandjord. Endelig viste laboratorieforsøg, at PICT-udviklingen kun i begrænset omfang var påvirket af tilsætning af formalet lucerne som C og N kilde til jorden. Samlet set viser alle disse forsøg, at udviklingen af PICT i jorden var uafhængig af forskelle i temperatur (22 °C i mikrokosmos versus lavere og fluktuerende temperaturer i felten; medio marts – medio september 2015), tilførsel af organisk stof (felt- versus laboratorieforsøg og laboratorieforsøg med/uden tilsætning af formalet lucerne) og af andre forskelle mellem de kontrollerede laboratorieforhold og felten.

Hypotese 11) PICT-dynamikken i feltjorder er anderledes end i laboratorie mikrokosmos udført jf. OECD 217 testmetoden (især forventes PICT at være mindre persistent i felten end i laboratorie mikrokosmos).

Konklusion 11) Hypotesen blev testet med DCOIT som model biocid og kunne bekræftes. PICT effekten var som forudsagt betydeligt mindre persistent i felten end i lukkede laboratorie mikrokosmos, der som forudsagt underestimerede det mikrobielle samfunds resiliens (= hastigheden hvormed det mikrobielle samfund kan "komme sig" efter at have været eksponeret overfor DCOIT). Biocid tolerancen i feltinkuberede jorders bakteriesamfund forsvandt således progressivt 3 og 6 måneder efter forsøgets start, mens dette ikke var tilfældet for jorder inkuberet under stabile laboratoriemikrokosmos betingelser uden tilførsel af organisk stof jf. OECD 217 protokollen.

Hypotese 12) PICT har potentiale som en kombineret eksponerings- og effekt-feltindikator for skadelige effekter af biocider på jordens mikroorganismer.

Konklusion 12) Hypotesen blev testet med DCOIT som model biocid og kunne bekræftes. Vores resultater viser, at såvel PICT udvikling som efterfølgende PICT persistens kan kobles direkte til biocideksponering under varierende jordforhold i både laboratorie mikrokosmos og i felten. Til sammenligning kan mikrobiel samfundsstruktur kun vanskeligt kobles direkte til biocideksponering i felten, da artssammensætningen af mikroorganismer vil påvirkes af mange andre forhold end biocid eksponering som f.eks. temperatur og tilførsel af organisk stof til jorden. Vi konkluderer derfor, at PICT har potentiale til at blive anvendt som en kombineret eksponerings- og effekt-feltindikator for skadelige effekter af biocider på jordens mikroorganismer.

Hypotese 13) Jordens organismer eksponeres kontinuert eller semi-kontinuert overfor biocider i jorder, der modtager afløbsvand fra bygningsfacader.

Konklusion 13) En screening af højrisiko byjorder fandt meget forskellige biocid koncentrationniveauer. De højeste koncentrationer (op til 0,2 mg/kg) blev fundet for persistente biocider som tebuconazole, propiconazole, og terbutryn, mens andre biocider (diuron og carbendazim) blev detekteret i lave koncentrationer op til 0,01 mg/kg. Der blev også fundet letnedbrydelige biocider (octylisothiazolinone) i nogle af jorderne. Disse letnedbrydelige biocider kan i visse tilfælde karakteriseres som 'pseudo-persistente' som følge af hyppig udvaskning fra bygningsfacader.

To **overordnede hypoteser** opstillet ved PICT-RISK projektets start blev testet eksperimentelt i løbet af projektperioden:

Hypotese I: Effektkoncentrationer for toksiske effekter af biocider på jordens mikroorganismer er højere end målte koncentrationer af biocider i danske jorder, der modtager udvaskede biocider fra bygningsfacader, og biocider i byggematerialer forventes derfor at udgøre en ret lav risiko for økotoksikologiske effekter på jordens mikroorganismer.

Konklusion I: Hypotesen blev testet, og i alle tilfælde bekræftet, for biociderne MIT, BIT, OIT, DCOIT, PPZ, TBU, carbendazim, mecoprop, terbutryn og diuron samt for nedbrydningsproduktet 1,2,4-triazol ved at sammenholde estimerede og målte biocid koncentrationer i højrisiko byjorder med resultater fra økotoksikologiske tests rettet mod jordens mikroorganismer. De opnåede resultater viste generelt en lav risiko for skadelige effekter af biocider selv i forventede højrisikojorder tæt ved bygningsfacader. Målte koncentrationer for biocider og deres nedbrydningsprodukter var således mindst 1-2 størrelsesordener lavere end de koncentrationer, der forvoldte toksiske effekter på jordens mikrobielle samfund.

Hypotese II: EU medlemslandenes fremgangsmåde i forhold til at teste skadelige effekter af nye biocider på jordens mikroorganismer og deraf afledte økosystem tjenester kan forbedres ved at indføre mere relevante og følsomme økotoksikologiske tests. En initial måling af biociders effekter på henholdsvis svampes og bakteriers vækstrate i jorden vil udgøre en nyttig Fase 1 test, der kan forudsige potentielle effekter på mikrobielle samfunds biocid tolerance (PICT) og samfundsstruktur. PICT og molekylær mikrobiel samfundsanalyse kan udgøre nyttige Fase 2 tests i forhold til at opnå en mere informativ og sikker økotoksikologisk vurdering af biociders effekter på jordens mikroorganismer i tilfælde, hvor Fase 1 data indikerer en betydelig risiko for skadelige effekter på jordens mikroorganismer.

Konklusion II: Hypotesen blev bekræftet i varierende omfang og detaljegrad for de i PICT-RISK anvendte biocider. Baseret på vores resultater, foreslår vi, at eksisterende økotoxikologiske test metoder rettet mod jordens mikroorganismer revurderes, og at OECD 217 testen udbygges ved inddragelse af nyere og mere følsomme testmetoder, der belyser toksiske effekter på svampe- og bakterievækst (tier 1) med mulig inddragelse af yderligere tests (tier 2), der er målrettet kemiske stoffers effekter på resistensudvikling og diversitet blandt jordens mikroorganismer.

# 10. Perspektiver

## 10.1 Videnskabelige perspektiver

PICT-RISK projektet har vist, at forskellige biocider opfører sig meget forskelligt i jordmiljøet; både mht. forekomst i byjorder, nedbrydelighed og effekter på jordens mikroorganismer. Selv tætbeslægtede stoffer som f.eks. forskellige isothiazolinoner kan have ekstremt forskellige typer af effekter på jordens mikrobiom som eksemplificeret ved PICT udvikling efter eksponering til DCOIT, men ikke efter eksponering til andre isothiazolinoner. I et andet tilfælde (terbutryn) blev det fundet, at et biocid blev mere toksisk over tid i jorden, og mecoprop gav svært-forklarlige, dynamiske effekter på mikrobiel vækst i jord på trods af ekstremt stabile testresultater over tid med OECD 217 SIR metoden. Resultaterne viser, at kemiske stoffers effekter på jordens mikrobiom kan være yderst komplekse, og at vores forståelse af de underliggende processer er mangelfulde (Brandt et al., 2015). Der er derfor behov for en polyfasisk fremgangsmåde, hvor uafhængige, komplementære metoder anvendes parallelt, hvis vi skal kunne forstå og forudsige forskellige stoffers effekter på jordens mikrobiom. Der er også behov for en bedre forståelse af de underliggende økologiske processer ("community assembly processes"), der former mikrobiomet før, under og efter eksponering overfor biocider og andre toksiske stoffer: diversificering (evolution), selektion, spredning og drift (stokastiske effekter).

Der er også behov for mere viden om biociders forekomst i jord og om eventuelle toksiske nedbrydningsprodukter, der kan akkumulere i jorden. Det er således ikke nok blot at forstå moderstoffernes forekomst og skæbne i jordmiljøet. I fremtiden bliver det også nødvendigt at sammenligne forskellige enantiomerer for kirale stoffer som f.eks. tebuconazole, propiconazole og deres nedbrydningsprodukter, fordi enzymer (og dermed nedbrydningsforhold og toksicitet) ser enantiomerer som forskellige stoffer.

## 10.2 Administrative perspektiver

Forskellige biocider og andre regulerede kemikalier opfører sig meget forskelligt i jordmiljøet, og der er derfor brug for et agilt, fleksibelt økotoksikologisk testkoncept til risikovurdering af disse stoffer, hvis man skal undgå at overse skadelige kemikalieeffekter på jordens mikrobiom og de mange økosystemtjenester, som jordens mikroorganismer er ansvarlige for. Specifikt foreslår vi, at der gives øget opmærksomhed til udvikling og standardisering af testmetoder rettet mod henholdsvis bakteriers og svampes vækst i jordmiljøet, idet disse processer er mere følsomme og økologisk relevante end den konventionelle OECD 217 SIR test. Mikroorganismers vækst i jorden kan endvidere kobles til mange af de økosystemtjenester, som risikovurdering af kemikalier har til hensigt at beskytte (Brandt et al., 2015).

Derudover foreslår vi, at der på sigt udvikles et samlet testkoncept baseret på forskellige faser ("tiers"), hvor resistensudvikling og ændringer i mikrobiel diversitet indgår i den sidste fase. I den forbindelse skal det bemærkes, at DNA sekventeringsteknologi og bioinformatiske værktøjer undergår en "demokratisering" i disse år, hvorfor denne type analyser vil være meget realistiske at anvende til risikovurderingsformål indenfor en overskuelig fremtid. Der er imidlertid behov for standardisering af metoderne (Philippot et al., 2012).

Vi foreslår endvidere, at der altid anvendes to kategorier af økotoksikologiske tests: dels tests, der undersøger effekter på jordens økosystem som gjort i PICT-RISK projektet for mikroorganismer og dels tests med enkelt arter, der introduceres til jorden (Marques et al., 2018). En britisk standardprotokol til risikovurdering af forurenede grunde eksemplificerer den foreslåede tilgang (BS ISO 19204:2017 Soil quality — Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach)).

De høje persistens af tebuconazol, propiconazol, terbutryn og diuron og pseudo-persistens af diuron og isoproturon indikerer, at der er en relativ stor risiko for, at biociderne eller deres nedbrydningsprodukter akkumulerer i jord. Det kan heller ikke udelukkes, at stofferne eller deres



nedbrydningsprodukter kan udvaskes til grundvand. Der er derfor behov for en udvidet vurdering af disse stoffer (og eventuelle nedbrydningsprodukter) med henblik på at etablere et forbedret vidensgrundlaget for regulering af biocider i jordmiljøet.

# 11. Referencer

- Alletto, L., Coquet, Y., Benoit, P., Bergheaud, V., 2006. Effects of temperature and water content on degradation of isoproturon in three soil profiles. *Chemosphere* 64, 1053-1061.
- Andersson D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 12, 465-478.
- Andersson D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* 8, 260-271.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221.
- Ashbolt, N.J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, S.P., Brandt, K.K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W.H., Heberer, T., Lawrence, J.R., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Ryan, J.J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J.R., van den Eede, C., Topp, E., 2013. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* 121, 993-1001.
- Berg, J., Brandt, K.K., Al-Soud, W.A., Holm, P.E., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Nybroe, O., 2012. Selection for Cu-Tolerant Bacterial Communities with Altered Composition, but Unaltered Richness, via Long-Term Cu Exposure. *Appl Environ Microbiol* 78, 7438-7446.
- Berger, S., El Chazli, Y., Babu, A.F., Coste, A.T., 2017. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Frontiers in Microbiology* 8, 1024.
- Blanck, H., 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 1003-1034.
- Bollmann, U.E., Minelgaite, G., Schlüsener, M., Ternes, T., Vollertsen, J., Bester, K., 2016. Leaching of Terbutryn and Its Photodegradation Products from Artificial Walls under Natural Weather Conditions. *Environmental Science & Technology* 50, 4289-4295.
- Bollmann, U.E., Minelgaite, G., Schlüsener, M., Ternes, T.A., Bester, K., 2017. Photodegradation of octylisothiazolinone and semi-field emissions from facade coatings. *Scientific Reports* 7, 41501.
- Bollmann, U.E., Vollertsen, J., Carmeliet, J., Bester, K., 2014. Dynamics of biocide emissions from buildings in a suburban stormwater catchment - Concentrations, mass loads and emission processes. *Water Research* 56, 66-76.
- Brandhorst Daho, M., 1994. Ecotoxicological evaluation of the herbicide terbutryn, Ekotoxikologiska avdelningen. Uppsala University, Uppsala.
- Brandt, K.K., Amézquita, A., Backhaus, T., Boxall, A., Coors, A., Heberer, T., Lawrence, J.R., Lazorchak, J., Schönfeld, J., Snape, J.R., Zhu, Y.G., Topp, E., 2015. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environment International* 85, 189-205.
- Brandt, K.K., Frandsen, R.J.N., Holm, P.E., Nybroe, O., 2010. Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 748-757.
- Brandt, K.K., Sjøholm, O.R., Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., Nybroe, O., 2009. Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environmental Science & Technology* 43, 2963-2968.

- Bromilow, R.H., Evans, A.A., Nicholls, P.H., 1999. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations. *Pesticide Science* 55, 1129-1134.
- BS ISO 19204:2017. Soil quality — Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach). ISBN 978 0 580 84444 7.
- Burkhardt, M., Junghans, M., Zuleeg, S., Schoknecht, U., Lamani, X., Bester, K., Vonbank, R., Simmler, H., Boller, M., 2009. Biozide in Gebäudefassaden – ökotoxikologische Effekte, Auswaschung und Belastungsabschätzung für Gewässer (Biocides in building facades – ecotoxicological effects, leaching and environmental risk assessment for surface waters). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 21, 36-47.
- Burkhardt, M., Zuleeg, S., Vonbank, R., Bester, K., Carmeliet, J., Boller, M., Wangler, T., 2012. Leaching of Biocides from Facades under Natural Weather Conditions. *Environmental Science & Technology* 46, 5497-5503.
- Bååth, E., Pettersson, M., Söderberg, K.H., 2001. Adaptation of a rapid and economical microcentrifugation method to measure thymidine and leucine incorporation by soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1571-1574.
- Bååth, E., 2001. Estimation of fungal growth rates in soil using <sup>14</sup>C-acetate incorporation into ergosterol. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 2011-2018.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Tumbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335-336.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* 31, 442-443.
- Danish Environmental Protection Agency, 2011a. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2010 (Pesticides and biocides statistic 2010). Copenhagen, Denmark.
- Danish Environmental Protection Agency, 2011b. Salg af pesticider til brug i private haver – 2010 (Sales of pesticides for private gardening - 2010). Copenhagen, Denmark.
- Danish Veterinary and Food Administration, 2011. Pesticidrester i fødevarer 2011 (Pesticide residues in food 2011). Technical report. Copenhagen, Denmark.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 9, 445-453.
- Demoling, L.A., Bååth, E., Greve, G., Wouterse, M., Schmitt, H., 2009. Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 840-848.
- Demoling, L.A., Bååth, E., 2008. No Long-Term Persistence of Bacterial Pollution-Induced Community Tolerance in Tylosin-Polluted Soil. *Environmental Science & Technology* 42, 6917-6921.
- ECHA. 2014. Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume IV: Environment Part A: Information Requirements.
- European Commission. 2002. Guidance document on terrestrial ecotoxicology under council directive 91/414/EEC, SANCO/10329/2002, p1-39.
- European Commission, 2013a. List of approved substances. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/biocides/active-substances/approved-substances\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/biocides/active-substances/approved-substances_en.htm) (assessed 16/10/2013).

- European Commission, 2013b. List of participants and applicants whose dossiers are being examined under the Review Programme for existing active substances used in biocidal products.  
[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/biocides/pdf/list\\_participants\\_applicants\\_subs.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/biocides/pdf/list_participants_applicants_subs.pdf) (assessed 16/10/2013). Brussels, Belgium.
- European Environment Agency, 2009. Simulated land average maximum number of consecutive dry days for different European regions (1860-2100), Copenhagen, Denmark.
- European Parliament and Council, 2007a. Assessment Report Propiconazole (PT8 wood preservative).
- European Parliament and Council, 2007b. Assessment Report Tebuconazole (PT 8 wood preservative).
- European Parliament and Council, 2008. Assessment Report IPBC (PT6 in-can preservative).
- European Parliament and Council, 2009. REGULATION (EC) No. 1223/2009 on cosmetic products. Official Journal of the European Union L342, 59-209.
- European Parliament and Council, 2012. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Official Journal of the European Union L167, 1-122.
- Fernández-Calvino, D., Rousk, J., Bååth, E., Bollmann, U.E., Bester, K. and Brandt, K.K. 2017. Ecotoxicological assessment of propiconazole using soil bacterial and fungal growth assays. *Applied Soil Ecology* 115, 27-30.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3605-3617.
- Frostegård, Å., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.
- Giller, K.E., Witter, E. and McGrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414.
- Griffiths, B.S., Philippot, L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37, 112-129.
- Hansen, C.H.F., Krych, L., Nielsen, D.S., Vogensen, F.K., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Buschard, K., Hansen, A.K., 2012. Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia* 55, 2285-2294.
- Harada, N., Takagi, K., Fujii, K., Iwasaki, A., 2006. Transformation of methylthio-s-triazines via sulfur oxidation by strain JUN7, a *Bacillus cereus* species. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2952-2957.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2011. Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1480-1488.
- Jacobson, A., Williams, T.M., 2000. The environmental fate of isothiazolinone biocides. *Chimica Oggi* 18, 105-108.
- Juergensen, L., Busnarda, J., Caux, P.Y., Kent, R., 2000. Fate, behavior, and aquatic toxicity of the fungicide IPBC in the Canadian environment. *Environmental Toxicology* 15, 201-213.
- Kaufman, D.D., Kearney, P.C., 1976. Microbial transformations in the soil., In: Audus, L.J. (Ed.), *Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology* Academic Press, London, UK.

- Kim, I.S., Shim, J.H., Suh, Y.T., 2003. Laboratory studies on formation of bound residues and degradation of propiconazole in soils. *Pest Management Science* 59, 324-330.
- Kirchman, D., K'nees, E., Hodson, R., 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 599-607.
- Krzeminski, S.F., Brackett, C.K., Fisher, J.D., 1975a. Fate of microbicide 3-isothiazolone compounds in the environment: Modes and rates of dissipation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23, 1060-1068.
- Krzeminski, S.F., Brackett, C.K., Fisher, J.D., Spinnler, J.F., 1975b. Fate of microbicide 3-isothiazolone compounds in the environment: Products of degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23, 1068-1075.
- Lekfeldt, J.D.S., Magid, J., Holm, P.E., Nybroe, O., Brandt, K.K., 2014. Evaluation of the leucine incorporation technique for detection of pollution-induced community tolerance to copper in a long-term agricultural field trial with urban waste fertilizers. *Environmental Pollution* 194, 78-85.
- Luft, A., Wagner, M., Ternes, T.A., 2013. Transformation of Biocides Irgarol and Terbutryn in the Biological Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology* 48, 244-254.
- Mackay, D., Hughes, D.M., Romano, M.L., Bonnell, M., 2014. The role of persistence in chemical evaluations. *Integr Environ Assess Manag* 10, 588-594.
- Marques, C.R., El-Azhari, N., Martin-Laurent, F., Pandard, P., Meline, C., Petre, A.L., Eckert, S., Zipperle, J., Vána, M., Maly, S., Sindelárová, L., Amemori, A.S., Hofman, J., Kumar, A., Doan, H., McLaughlin, M., Richter, E., Römbke, J., 2018. A bacterium-based contact assay for evaluating the quality of solid samples - Results from an international ring-test. *Journal of Hazardous Materials* 352, 139-147.
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Jakobsen, M., 2011. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal* 21, 142-148.
- McGrath, S.P., Checkai, R.T., Scott-Fordsmand, J.J., Glazebrook, P.W., Paton, G.I. and Visser, S. (2002) Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds), pp. 17-49, SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- Modrzynski, J.J., Christensen, J.H., Brandt, K.K., 2019. Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds. *Ecotoxicology* 28, 1136-1141.
- Newell, S.Y., Fallon, R.D., 1991. Toward A Method For Measuring Instantaneous Fungal Growth Rates In Field Samples. *Ecology* 72, 1547-1559.
- OECD, 2000a. Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 216 "Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation test". OECD Publishing, Paris, France.
- OECD, 2000b. Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 217 "Soil Microorganisms: Carbon Transformation test". OECD Publishing, Paris, France.
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D., 2015. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16, 964.
- Paszko, T., Muszyński, P., Materska, M., Bojanowska, M., Kostecka, M., Jackowska, I., 2016. Adsorption and degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides in soils: A review. *Environ Toxicol Chem*, 35 35, 271-286.
- Paulus, W., 2005. *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook*. Springer, Dordrecht, Netherlands.

- Pereira e Silva, M., Semenov, A.V., Schmitt, H., van Elsas, J.D., Falcao Salles, J., 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biol.Biochem.* 57, 955-1002.
- Philippot, L., Ritz, K., Pandard, P., Hallin, S., Martin-Laurent, F., 2012. Standardisation of methods in soil microbiology: progress and challenges. *FEMS Microbiol Ecol* 82, 1-10.
- Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Text with EEA relevance, *official Journal of the European Union L 167, 27.6.2012, p. 1–123.*
- Rotter, S., Gunold, R., Mothes, S., Paschke, A., Brack, W., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2015. Pollution-induced community tolerance to diagnose hazardous chemicals in multiple contaminated aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 49, 10048-10056.
- Rousk,J., Brookes,P.C., Bååth,E., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1589-1596.
- Rousk, J. and Bååth, E. 2011. Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 17-30.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D., Berga, M., Buergmann, H., Huber, D.H., Langenheder, S., Lennon, J.T., Martiny, J.B.H., Matulich, K.L., Schmidt, T.M., Handelsman, J., 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* 3.
- Singer, A.C., Shaw, H., Rhodes, V., Hart, A., 2016. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front Microbiol* 7:1728.
- Song, J., Rensing, C., Holm, P.E., Virta, M.P.J., Brandt, K.K., 2017. Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. *Environmental Science & Technology* 51, 3040-3047.
- Sørensen, S.R., Bending, G.D., Jacobsen, C.S., Walker, A., Aamand, J., 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 1-11.
- SRC, 2014. PhysProp Database <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp> (assessed 25/02/2014).
- Tiili, A., Berard, A., Blanck, H., Bouchez, A., Cássio, F., Eriksson, K.M., Morin, S., Montuelle, B., Navarro, E., Pascoal, C., Pesce, S., Schmitt-Jansen, M., Behra; R., 2016. Pollution-induced community tolerance (PICT): towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biology* 61, 2141-2151.
- US-EPA, 2000. Memorandum: Ecological Risk Assessment of Tebuconazole, Washington, D.C.
- US EPA, ECOTOX Knowledgebase <https://cfpub.epa.gov/ecotox> (last accessed 11/08/2016).
- Wangler,T.P., Zuleeg,S., Vonbank,R., Bester,K., Boller,M., Carmeliet,J., Burkhardt,M., 2012. Laboratory scale studies of biocide leaching from facade coatings. *Building and Environment* 54, 168-173.
- Williams, T.M., Jacobson, A.H., 1999. Paper No. 303: Environmental fate of isothiazolone biocides, Corrosion. NACE International, Houston, TX, USA.
- Zelles,L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.

# Bilag 1.

## Bilag 1.1 Massespektrometriske data for biocider

ID	Name	Supplier	Precursor	Product	DP	EP	CE	CX P
MI	Methylisothiazolinone	Sigma-Aldrich	116	101	77	10	32	<b>20</b>
				98	75	10	25	<b>18</b>
MI-D3	Methylisothiazolinone-D3	TRC	119	101	55	10	29	<b>19</b>
				74	45	10	31	<b>13</b>
BIT	Benzisothiazolinone	Sigma-Aldrich	152	134	80	10	32	<b>26</b>
				109	90	10	28	<b>21</b>
OIT	<i>N</i> -Octylisothiazolinone	Sigma-Aldrich	214	102	55	10	22	<b>19</b>
				57	84	10	30	<b>10</b>
OIT-D17	<i>N</i> -Octylisothiazolinone-D17	TRC	231	103	47	10	22	<b>5</b>
				66	54	10	34	<b>12</b>
DCOIT	Dichloro- <i>N</i> -octylisothiazolinone	Thor	282	170	67	10	21	<b>32</b>
				71	68	10	27	<b>27</b>
IPBC	Iodocarb	Sigma-Aldrich	282	165	62	10	26	<b>32</b>
				57	62	10	22	<b>10</b>
IPBC-D6	Iodocarb-D6	TRC	291	165	55	10	24	<b>9</b>
				66	55	10	24	<b>11</b>
CD	Carbendazim	Sigma-Aldrich	192	160	82	10	29	<b>31</b>
				132	73	10	42	<b>24</b>
CD-D4	Carbendazim-D4	Dr. Ehrenstorfer	196	164	78	10	28	<b>11</b>
				136	81	10	45	<b>13</b>
IP	Isoproturon	Sigma-Aldrich	207	72	84	10	36	<b>29</b>
				165	81	10	23	<b>31</b>
IP-D6	Isoproturon-D6	Sigma-Aldrich	213	78	77	10	31	<b>15</b>

				171	79	10	22	17
DR	Diuron	Sigma-Aldrich	233	72	70	10	38	13
			235	72	72	10	38	13
DR-D6	Diuron-D6	Sigma-Aldrich	239	78	48	10	38	8
			240	78	51	10	35	8
TB	Terbutryn	Sigma-Aldrich	242	186	65	10	35	19
				158	58	10	34	31
TB-D5	Terbutryn-D5	Dr. Ehrenstorfer	247	191	89	10	32	9
				91	91	10	39	8
IRG	Cybutryn (Irgarol 1051)	Dr. Ehrenstorfer	254	198	83	10	30	22
				156	77	10	36	30
IRG-D9	Cybutryn-D9 (Irgarol-D9)	CDN Isotopes	263	199	87	10	29	14
				126	90	10	36	12
TBU	Tebuconazole	Dr. Ehrenstorfer	308	70	85	10	47	13
				125	81	10	51	12
TBU-D5	Tebuconazole-D6	Dr. Ehrenstorfer	314	72	91	10	44	13
				125	57	10	54	23
PPZ	Propiconazole	Sigma-Aldrich	342	159	91	13	40	15
				69	34	7	37	13
PPZ-D5	Propiconazole-D5	Dr. Ehrenstorfer	347	159	74	10	42	9
				74	63	10	35	13
MCPPP	Mecoprop*	Dr. Ehrenstorfer	213	141	-65	-10	-22	-10
				71	-64	-10	-15	-10
MCPPP-D3	Mecoprop-D3*	Dr. Ehrenstorfer	216	71	-65	-10	-15	-10
				144	-64	-10	-22	-10

\*Analyseret med elektronspray-ionisering i negativ tilstand (ESI(-)).



**Bilag 1.2 Massespektrometriske data for TP'er**

ID	Name	Supplier	Precursor	Product	DP	EP	CE	CX P
OT	3-Octylthiazol-2(3 <i>H</i> )-one	Uorsy	214	57	84	10	30	<b>10</b>
				57	60	10	35	<b>9</b>
OFA	<i>N</i> -Octylformamide	TCI-Chemicals	158	57	68	10	25	<b>10</b>
				71	64	10	19	<b>12</b>
OPA	<i>N</i> -Octylprop-2-enamide	Uorsy	184	55	61	10	42	<b>9</b>
				43	45	10	41	<b>7</b>
OAA	<i>N</i> -Octylacetamide	Uorsy	172	60	61	10	26	<b>12</b>
				43	69	10	44	<b>7</b>
OA	Octylamine	Sigma-Aldrich	130	57	60	10	25	<b>12</b>
				71	48	10	22	<b>12</b>
OMA	<i>N</i> -Octyl malonamic acid	Chemspace	216	71	48	10	27	<b>13</b>
				156	50	10	17	<b>9</b>
OOA	<i>N</i> -Octyl oxamic acid	Chemspace	202	71	48	10	17	<b>13</b>
				156	45	10	13	<b>9</b>
TB-OH	2-Hydroxy-4- <i>N</i> -ethyl-6- <i>N</i> -tertbutyl-1,3,5-triazine-4,6-diamine	Sigma-Aldrich	212	86	35	10	35	<b>4</b>
				156	33	10	22	<b>9</b>
MEBT	2- <i>N</i> -Tertbutyl-4- <i>N</i> -ethyl-6-methoxy-1,3,5-triazine-2,4-diamine	Sigma-Aldrich	226	114	46	10	35	<b>7</b>
				170	46	10	32	<b>24</b>
TB-SO	2- <i>N</i> -Tertbutyl-4- <i>N</i> -ethyl-6-methane-sulfinyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	MicroCombiChem	258	184	48	10	26	<b>12</b>
				240	50	10	20	<b>15</b>
M1	2- <i>N</i> -Tertbutyl-6-methylsulfanyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	MicroCombiChem	214	158	50	10	36	<b>16</b>
				85	50	10	37	<b>16</b>
TB-OH-DesE	2-Hydroxy-4- <i>N</i> -tertbutyl-1,3,5-triazine-4,6-diamine	Synchem	184	128	60	10	22	<b>7</b>
				86	45	10	35	<b>17</b>
TB-OH-DesB	2-Hydroxy-4- <i>N</i> -ethyl-1,3,5-triazine-4,6-diamine	Synchem	156	114	70	10	23	<b>6</b>
				128	68	10	24	<b>7</b>

TB-DesS	2- <i>N</i> -Tertbutyl-4- <i>N</i> -ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	FCH Group	196	140	77	10	32	<b>8</b>
				70	49	10	45	<b>12</b>
TB-DesS-DesB	2- <i>N</i> -Ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	FCH Group	140	70	45	10	31	<b>12</b>
				98	43	10	24	<b>10</b>
TB-DesS-DesE	2- <i>N</i> -Tertbutyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	FCH Group	168	112	46	10	25	<b>10</b>
				70	42	10	36	<b>12</b>

## PICT-RISK

Biocider er potente stoffer designet til at dræbe eller hæmme skadelige organismer. Denne rapport fra projektet PICT-RISK undersøger forekomsten, skæbnen og de toksiske effekter af udvalgte biocider i jordmiljøet. Rapporten belyser biocidernes forekomst, nedbrydningskinetik, dannelse af nedbrydningsprodukter og deres økotoxikologiske effekter på jordens svampe- og bakteriesamfund. Vores nye testkoncept viste, at OECD 217-standardtesten undervurderer biociders effekter på jordens mikroorganismer, men også at selv kemisk beslægtede biocider kan have yderst forskelligartede effekter.

Vi foreslår, at eksisterende økotoxikologiske testmetoder anvendt til godkendelse af biocider og pesticider i EU revurderes og udbygges med mere følsomme tests, der undersøger effekter på både svampe- og bakterievækst i jord og på det mikrobielle samfunds struktur og biocid resistensudvikling.

Enkelte biocider viste sig at være yderst persistente eller forårsagede akkumulering af ukendte nedbrydningsprodukter, og et enkelt persistent biocid blev overraskende fundet at blive mere giftigt overfor jordens mikroorganismer over tid. Andre biocider var let-nedbrydelige, men pga kontinuerlig biocidudvaskning fra byggematerialer kan disse stoffer alligevel klassificeres som semi-persistente i det danske klima med hyppige regnvejrhændelser.

Samlet konkluderer vi, at vores resultater indikerer en lav risiko for akutte skadelige effekter af biocider på jordens mikroorganismer i en dansk kontekst, da målte biocidkoncentrationer i jordmiljøet lå markant under de koncentrationer, der gav anledning til giftvirkning på jordens mikroorganismer. Der er dog stadig behov for mere viden om biocideksponeringsniveauer i jordmiljøet og dertil knyttet resistensudvikling i både svampe og bakterier. Dette inkluderer en undersøgelse af biociders nedbrydningsprodukter og deres effekt på grundvandsforurening.



Miljøstyrelsen  
Tolderundsvej 5  
5000 Odense C

[www.mst.dk](http://www.mst.dk)