

**Udvikling og afprøvning af nye metoder
til bestemmelse af pesticiders
forekomst og nedbrydning
i grundvand**

Midtvejsstatus for
GEUS projektkontrakt

Erik Thomsen




GEUS

**Udvikling og afprøvning af nye metoder
til bestemmelse af pesticiders
forekomst og nedbrydning
i grundvand**

Midtvejsstatus for
GEUS projektkontrakt

Erik Thomsen

Midtvejsstatus for GEUS projektkontrakt

Udvikling og afprøvning af nye metoder til bestemmelse af pesticiders forekomst og nedbrydning i grundvand

Projektleder

Erik Thomsen, Statsgeolog, lic. scient, GEUS, geokemisk afdeling

Følgegruppe

Erik Thomsen (fmd), GEUS
Niels Henrik Spliid, DMU
John W. Kohrtz, ENS
Bjørn R. Andersen, FSL
Steen Marcher, MST
Lene Holm, SNS

Endvidere deltager følgende medarbejdere ved GEUS, der er fast tilknyttet den daglige afvikling af projektkontraktens enkelte aktiviteter, i følgegruppens møder:

Jens Aamand, GEUS, geokemisk afdeling
Bo Lindhardt, GEUS, geokemisk afdeling
Walter Brüsich, GEUS, geokemisk afdeling

Herudover inddrages såvel eksterne som interne bidragsydere i fornødent omfang.

Budget

Det samlede budget for perioden 1. januar 1996 til 31. december 1999 er 11.713 kkr.

Projektstyring

Den daglige projektstyring varetages af GEUS, geokemisk afdeling med statsgeolog Erik Thomsen som projektleder.

Følgegruppen fungerer som faglig sparringspartner og sikrer den nødvendige koordination med tilsvarende aktiviteter indenfor ministeriets regi, herunder orientering af de respektive styrelser og sektorforskningsinstitutioners repræsentanter i Sektorforskningsudvalget.

Der har været afholdt følgegruppemøder den 13. september 1996 og den 10. marts 1997 (bilag 1 og 2).

Projektets formål

Projektet har til formål at teste, optimere og implementere nye metoder til påvisning og screening af pesticider og disses nedbrydningsprodukter, samt at kvalitetssikre metoderne ved afprøvning under forskellige geokemiske og geologiske forhold. Endvidere at beskrive forekomst og nedbrydning af udvalgte pesticider i forskellige grundvandsmiljøer under anvendelse af nye og konventionelle analysemetoder.

Projektet omfatter fire delprojekter:

1. State-of-the-art

Sammenstilling af tilgængelig viden om forekomsten af pesticider og disses nedbrydningsprodukter i grundvand, råvand og drikkevand i Danmark og i udlandet. Sammenstillingen vil indeholde en kortlægning af de mest betydende stofgrupper og nedbrydningsprodukter.

2. Nye analysemetoder

TLC metoder og kommercielle immunkemiske metoder testes og indkøres i laboratoriet. Der udføres interlaboratorie undersøgelser, hvor de nye metoder sammenlignes med konventionelle metoder (GC, GC-MS, HPLC m. fl.) på GEUS og andre laboratorier.

3. Udvikling af nye ikke-kommercielle immunkemiske metoder

Produktion af mono- og/eller polyklonale antistoffer, der specifikt genkender pesticider eller pesticidgrupper, der udgør en potentiel risiko for grundvandets kvalitet. På basis af de producerede antistoffer udvikles der immunoassays til analyse af de pågældende pesticider eller pesticidgrupper. Der udføres interlaboratorie undersøgelser, hvor de udviklede metoder sammenlignes med konventionelle metoder.

4. Forekomst og nedbrydning i forskellige grundvandsmiljøer

De udviklede TLC og immunkemiske metoder afprøves i karakteriserede grundvandsmiljøer, og anvendes sammen med de konventionelle metoder til at bestemme forekomsten af udvalgte pesticider. Med det formål at kortlægge pesticidernes transport og nedbrydningsmønstre aldersbestemmes grundvandet f.eks. ved brug af CFC-datering samt karakteriseres kemisk. Sedimenter fra enkelte grundvandsmagasiner karakteriseres yderligere med hensyn til geologi, geokemi og mikrobiologi samt redoxforhold og potentialet for nedbrydning af pesticider i disse miljøer bestemmes.

Under projektet er det planlagt at TLC screenings teknikken indkøres til analyse af ca. 40 forskellige pesticider omfattende forskellige phenoxysyrer, triaziner, carbamider, benzamider samt phenylureaforbindelser. Kommercielle immunologiske metoder afprøves i forhold til konventionelle analysemetoder. Nye, ikke-kommercielle immunologiske assays udvikles med henblik på analyse af få pesticider af særlig relevans for danske forhold.

Status for det faglige forløb for delprojekterne

Delprojekt 1 - State-of-the-art

Der er i projektperioden gennemført adskillige søgninger i internationale databaser via satellit samt i en række forskellige litteratur databaser som GeoRef og Current Content. Til disse søgninger er løbende udviklet forskellige søgeprofiler, med hovedvægten på egentlige monitoringsprogrammer i grundvand. Da antallet af publicerede monitoringsprogrammer er begrænset, har det været nødvendigt, at samle oplysninger direkte fra en række europæiske lande, dels gennem personlige kontakter og dels i form af såkaldt "grå litteratur", rapporter med primærdata. En del litteratur er således skaffet direkte fra forskere i f.eks. Sverige og Norge, hvor der først for nyligt er startet egentlige overvågningsprogrammer. En del data fra Norden stammer også fra kommuner og levnedsmiddelundersøgelsesrapporter.

De danske udvidede pesticidanalyseprogrammer, der omfatter mere end de 8 pesticider der indgår i grundvandsovervågningen, som er gennemført af amter og vandværker er løbende blevet tilsendt GEUS. Det er derfor muligt at sammensætte og vurdere de nye analyseresultater som GEUS er bekendt med, og at sammenholde disse data med de ofte mindst 2 år gamle analysedata som GEUS modtager i forbindelse med Det Nationale Overvågningsprogram. Det Nationale Overvågningsprogram omfatter dog kun 8 pesticider.

Ved søgningen i international litteratur og i udenlandsk "grå" litteratur er anvendt en database fra Miljøstyrelsen over pesticider og solgte mængder i perioden 1953-94. Denne base er løbende udbygget med nye stoffer samt med metabolitter fra stoffer anvendt i Danmark.

Databaser

Der er blevet oprettet 3 databaser i Access database format:

- Danske analyseprogrammer, som indeholder flere end de 8 pesticider, der indgår i Det Nationale Overvågningsprogram.
- Danske analyseprogrammer som indeholder analysedata fra vandløb.
- Udenlandske analyseprogrammer som indeholder data om pesticider og metabolitter i grundvand.

De tre databaser indeholder aggregerede oplysninger fra analyseprogrammerne om de analyserede stoffer: antal analyser/antal analyserede borer, antal fund over detektionsgrænse, antal fund over EU - grænseværdien, den anvendte detektionsgrænse, antal analyserede stoffer, etc.

Databasen om pesticider i dansk åvand indeholder kun et begrænset antal oplysninger, men det anses for væsentligt at forsøge at sammenholde oplysninger om pesticider i ungt dansk grundvand med pesticidindholdet i vandløb med forskellige oplandstyper.

Databasen med de udenlandske erfaringer indeholder et meget stort antal analyser for nogle stoffer, men datakvaliteten er ofte af forbavsende varierende kvalitet. Dette gør det ofte vanskeligt at vurdere og sammenholde de forskellige datasæt på en meningsfuld måde.

I den udenlandske database foreligger p.t. oplysninger om ca. 250 pesticider og metabolitter, som har været anvendt eller som stadig anvendes i Danmark, hvoraf ca 160 er fundet i udenlandsk grundvand. I Sverige er der f.eks. fundet 21 pesticider, alle over grænseværdien for drikkevand i EU. De almindeligt anvendte analysemetoder i Sverige anvender oftest 0.1µg/l som detektionsgrænse, i modsætning til i Danmark, hvor detektionsgrænserne normalt er ca. 0.01 µg/l.

Den danske database indeholder p.t. oplysninger om 48 pesticider og metabolitter som er blevet analyseret. Af disse er 26 fundet eller påvist i både ungt og ældre grundvand.

Som et eksempel er der i tabel 1, 2 og 3 vist et udtræk fra de tre baser omfattende 12 udvalgte stoffer, der alle anvendes eller har været anvendt i Danmark. Tabel 3 viser forbruget af de udvalgte pesticider i forskellige perioder.

stof	Danmark	Danmark	Fyn	Udland	Udland
	ungt grundvand* ¹	alle analyser* ²	overfladevand	ungt grundvand* ¹	alle analyser* ²
	antal analyser	antal analyser	antal analyser	antal analyser	antal analyser
Atrazin	376	724	84	513	106862
Bentazon	377	666	84	87	11916
Diuron	0	106	84	9	18118
Glyphosat	0	0	0	0	2175
Isoproturon	335	533	84	0	28725
MCPA	337	622	84	63	28110
Mechlorprop	336	621	84	87	21402
Metamitron	295	455	84	63	619
Metsulfuron methyl	0	0	84	0	0
Phenmedipham	0	43	84	9	88
Propiconazol	40	83	84	63	507
Triasulfuron	0	0	0	0	0

*1 samlet antal analyser for programmer i ungt grundvand, hvor der er sikkerhed for at grundvandet er udtaget nær terræn

*2: samlet antal analyser fra alle undersøgelsesprogrammer,(data fra overvågningsprogram ikke medtaget).

Tabel 1: Antal analyser i de aggregerede analyseprogrammer. Fra Danmark er kun medtaget programmer, hvor der er analyseret for mere end de 8 GRUMO pesticider.

stof	Danmark ungt grundvand* ¹	Danmark alle analyser* ²	Fyn overfladev.	Udland ungt grundvand* ¹	Udland alle analyser* ²
	fund%	fund%	fund%	fund%	fund%
Bentazon	20,7	16,8	16,7	6,9	3,8
Atrazin	11,2	7,6	29,8	22,0	16,2
Metamitron	6,1	5,3	0,0	0,0	2,3
MCPA	5,3	3,9	20,2	1,6	0,7
Mechlorprop	2,7	2,9	31,0	4,6	7,1
Diuron	-	1,9	25,0	0,0	3,4
Isoproturon	3,0	1,9	7,1	-	9,3
Phenmedipham	-	0,0	0,0	0,0	9,1
Propiconazol	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0
Glyphosat	-	-	-	-	0,5
Metsulfuron methyl	-	-	0,0	-	-
Triasulfuron	-	-	-	-	-

*1 samlet antal analyser for programmer i ungt grundvand, hvor der er sikkerhed for at grundvandet er udtaget nær terræn

*2: samlet antal analyser fra alle undersøgelsesprogrammer, (data fra overvågningsprogram ikke medtaget).

Tabel 2: Fundprocenter for de udvalgte stoffer i Danmark, i overfladevand og i udlandet, alle fund større end detektionsgrænse. -, ingen data.

Stof	1956-95	1985-94	1994	1956-95	1985-94	1994
Mechlorprop	2	1	4	8750127	4514687	291402
Glyphosat	3	2	1	6169601	4238545	450146
MCPA	1	3	3	24229159	4052847	293547
Metamitron	4	4	5	5605284	3835615	245112
Isoproturon	5	5	2	2136209	1539056	346767
Phenmedipham	6	6	8	2075748	961679	61857
Propiconazol	7	7	6	1427837	951659	84401
Atrazin	8	8	10	1312522	710047	665
Bentazon	9	9	7	835875	613443	69352
Diuron	10	10	9	404990	196001	23431
Metsulfuron methyl	11	11	11	6720	5952	661
Triasulfuron	12	12	12	283	0	0

Tabel 3: Forbruget af de udvalgte stoffer i Danmark i perioden 1956-1995, 1985-94 og fra 1994. Forbruget i kg aktivt stof, samt rangordning af forbruget vist for de samme perioder.

Rapportering

Der udarbejdes en rapport i løbet af sommeren 1997, som vil indeholde oplysninger om antal stoffer fundet i dansk og udenlandsk grundvand samt i dansk overfladevand, samt oplysninger om

forbrugsmønstre i Danmark. Oplysninger om de udenlandske og danske reservoirer og om geologi etc. vil, hvis muligt, blive sammenholdt og vurderet.

Delprojekt 2 - Nye analysemetoder

Der er i 1996 primært blevet arbejdet med indkøring af konventionelle analysemetoder og afprøvning af TLC som screening metode.

Indkøring af konventionelle metoder

Som forudsætning for testning af TLC og ELISA teknikkerne er der indkørt konventionelle teknikker til analyse af pesticider. Som del af denne aktivitet er der anskaffet et Varian Saturn 2000 GC/MS udstyr, som er et iontrap instrument. Instrumentet er monteret med autosampler, hvilket giver mulighed for SPME (mikro fastfase ekstraktion).

Primo 1997 er der indkørt en screeningmetode for 35 stoffer. Målet er at metoden skal omfatte 45 stoffer (bilag 3).

Metoden er baseret på fastfase ekstraktion på et kulbaseret filtermateriale (ENVI-carb). Med dette filtermateriale er det muligt at ekstrahere såvel neutrale/basiske og sure pesticider i en arbejdsgang. Det har dog været nødvendigt at opdele metoden i to oparbejdninger, henholdsvis for de stoffer der kan analyseres på GC/MS, og for de stoffer der kun kan analyseres på HPLC, f.eks Hydroxyatrazin.

Der har været arbejdet med andre filtermaterialer til fastfase ekstraktionen: C₁₈ filtre til den neutrale fraktion og SDB filtre for den sure fraktion.

I januar 97 deltog GEUS i en præstationsprøvning afholdt af DMU. Prøvningen omfattede 24 stoffer hvoraf GEUS afrapporterede værdier for 22 stoffer. For et stof var kvaliteten af de opnåede resultater ikke tilfredsstillende. Metoden der er indkørt på GEUS omfatter ikke det sidste stof (ETU), idet dette kræver en speciel analysemetodik. Den foreløbige tilbagemelding på denne prøvning viser at resultaterne generelt er tilfredsstillende.

Baggrund for valg af TLC-teknik

I foråret 1995 blev der publiceret en række artikler (Butz og Stan, 1995 og Burger, 1995) der præsenterer AMD-HPTLC teknikken som en ny og lovende kromatografisk teknik til screening for pesticider i blandt andet drikke- og grundvand. Butz og Stan, 1995, viste, at det er muligt at analysere 265 pesticider med en enkelt gradient. Bekræftigelse af positive fund ville dog kræve yderligere analyse. Der blev anvendt to forskellige metoder til opkoncentrering, henholdsvis en sur metode (pH < 2) og en basisk/neutral metode. Med disse to ekstraktions metoder (fastfase) ville det angiveligt være muligt at nå en detektionsgrænse på 50 ng/l for de fleste stoffer.

AMD-HPTLC svarer meget til HPLC med UV-diode-array detektor. Fordelen ved AMD-HPTLC teknikken i forhold til HPLC forventes at være, at metoden kan medtage stoffer med meget forskellig polaritet, at reproducerbarheden er bedre, at der ikke forekommer interferenser fra solvent i UV-spektrene og endelig at metoden er tidsbesparende ved rutine analyser. At metoden kunne være anvendelig for screening af drikke- og grundvand blev yderligere underbygget af Prof. Stan ved en præsentation af teknikken på et ATV-møde d. 18 april 1996, (Stan 1996).

Præsentationen af AMD-HPTLC teknikken rejste dog følgende spørgsmål:

- separationskapacitet
- følsomheden
- betydningen af matrix.

Forud for en investering i et TLC-udstyr, ønskede GEUS at få en nærmere forståelse af disse forhold. Derfor blev der gennemført en analyserunde af et mindre antal vandprøver på professor Stan's laboratorium (Institute of Food Chemistry, Technical University, Berlin) i perioden 2-5 juni 1996.

Den indledende testrunde gav ikke entydige resultater, og efter at have diskuteret resultaterne med Prof. Stan's gruppe i Berlin, blev der opnået enighed om at gennemføre endnu en testrunde, men denne gang i et højere koncentrationsområde.

Disse test er gennemført i December 96/ Januar 97, og det er med baggrund i de samlede resultater den endelige vurdering og indstilling foreligger.

Baggrund for opstilling af testrunderne

Butz og Stan, 1995, opkoncentrerede deres prøver 10.000 gange, hvorefter 50 µl ekstrakt blev påført TLC-pladen. Den af forfatterne angivende detektionsgrænse, er den mængde stof der skal overføres til pladen, for at der kan detekteres en top med et signal/støj forhold på 3:1. Med den anvendte opkoncentrering og injicerede mængde, skal den opgivende detektionsgrænse ganges med en faktor 2 for at få detektionsgrænsen i selve vandprøven.

Butz og Stan, 1995, anfører, at følsomheden kan forbedres med en faktor 2 ved anvendelse af TLC-plader med 100 µm silika gel, i forhold til plader med 200 µm silika gel, som de hidtil har anvendt. På baggrund af ovenstående blev der i første testrunde arbejdet med ca. 25 ng af hver enkelt pesticid påsat pladen, d.v.s 50 ng i 100 µl prøve. Kunne denne mængde kvantificeres ved teknikken, ville det ved en 10.000 ganges opkoncentrering svare til, at man ville kunne måle i området 50 ng/L. Dette er stadig ikke tilstrækkeligt i forhold til de krævede detektionsgrænser, men det ville være tilstrækkeligt til at teste metoden.

I anden testrunde blev der arbejdet med den dobbelte mængde pesticid påsat pladen. Med samme overvejelser som ovenfor angivet, svarer dette til et måleområde på 100 ng/L, hvilket vil svare til grænserne i Drikkevandsdirektivet. Dette er dog ikke tilfredsstillende i relation til de krav der er opstillet af Miljøstyrelsen, men kunne være relevant for screening opgaver.

Der er anvendt matricer der er relevante i forhold til drikke- og grundvand, idet der er arbejdet med millipore rensed vand (reference), drikkevand samt grundvand fra Grundfør og Fladerne Bæk. Begge grundvandstyper er belastet med humus stoffer i forskellig grad.

Der blev foretaget test på tre forskellige grupper af pesticider, der er relevante for danske forhold: triaziner, phenylurea forbindelser og phenoxysyrer, dog blev der i anden testrunde kun arbejdet med phenylurea og triaziner, idet det blev vurderet at oprensningsprocedurerne for de sure pesticider ikke var tilstrækkelig etableret. Tabel 4 angiver de enkelte udvalgte pesticider der er testet i de to runder.

Triaziner	Phenylurea	Phenoxysyrer
Desisopropylatrazin	Pirimicarb	2,4-D
Desethylatrazin	Isoproturon	MCPA
Hydroxyatrazin	Diuron	Dichlorprop
Chloridazon	Methabenzthiazuron	Mechlorprop
Simazin	Carbofuran	
Cyanazin	Phenmedipham	
Atrazin	Linuron	
Terbuthylazin		
Metamitron		

Tabel 4. Pesticider testet ved TLC metoden

Sammenfatning af resultater

Både i det høje og lave koncentrationsområde blev der konstateret betydelige matrix effekter. Kun ved analyse af "millipore rensed vand" og drikkevand kunne der opnås en basislinie, der var acceptabel for egentlig kvantificering. Selv ved koncentrationer der svarer til 200 ng/L i vandfasen, var matriceproblemet fremherskende. Problemet er primært relateret til opkoncentreringsmetoden, men det er GEUS's vurdering, at det er langt vanskeligere at håndtere disse problemer ved TLC teknikken end ved den klassiske HPLC metode. Testen af naturligt grundvand viste desuden en række toppe, der ikke kunne identificeres, hvilket gør at man i disse tilfælde må analysere prøven ved brug af en anden metode. Sker dette for ofte bliver formålet med en screeningmetode meningsløs.

To triaziner, Hydroxyatrazin og Metamitron, blev ikke genfundet i de undersøgte matricer ved TLC metoden. Separationskapaciteten for TLC metoden vurderes at være 3 gange mindre end for en klassisk HPLC metode. Dette beror på at forholdet mellem topbredde og kromatogrammets længde er betydeligt højere for TLC metoden. Dette giver sig bl. a. udslag i at Diuron og Methabenzthiazuron samt Carbofuran og Phenmedipham coeluerer, og ikke kan separeres kvantitativt med de anvendte gradienter.

Der har desuden været kørt en linearitets test på rene phenylurea standarder i tre niveauer svarende til 100, 200 og 400 ng/L i vandfasen. Resultaterne var præget af stor tilfældighed, og det gav derfor ingen mening at gennemføre en statistisk bestemmelse. Dette bekræftes af de genfindingstests, der iøvrigt er udført med stærkt varierende genfindingsprocenter.

Anbefaling

Et krav til en screeningmetode må bl.a. indebære at metoden på den ene side er simpel at operere og på den anden side er så sikker, at det kun undtagelsesvist er nødvendigt at genanalysere prøverne. Disse krav kan ikke opfyldes med TLC metoden. Metoden kræver stor omhyggelighed, og specielt er den meget krævende med hensyn til prøveoprensning, da metoden har en betydeligt dårligere følsomhed end de konventionelle metoder. Det må anses for usandsynligt eller praktisk uigennemførligt at bringe detektionsgrænserne bare i nærheden af de krævede 10 ng/L i vandfasen, da dette i gunstigste tilfælde ville medføre 100.000 ganges opkoncentrering.

TLC-metoden er generelt usikker, idet pesticider dels ikke kan genfindes og genfindingen iøvrigt er præget af usikkerhed og tilfældighed. Metodens følsomhed overfor matricen medfører desuden en betydelig risiko for falske positive og negative fund. Separationskapaciteten skønnes ikke at tillade samtidig analyse af de mange stoffer der må ventes ved pesticidanalyser, der i naturlige prøver desuden omfatter en del nedbrydningsprodukter.

Der er under projektet udviklet en kombineret HPLC og GC/MS screeningmetode for 35 pesticider og metabolitter, der er TLC teknikken overlegen, både med hensyn til sikkerhed (falske positive og negative fund), og med hensyn til separationskapacitet. Dette medfører at metoden i dag kan producere sikre resultater på mere komplicerede matricer end TLC teknikken.

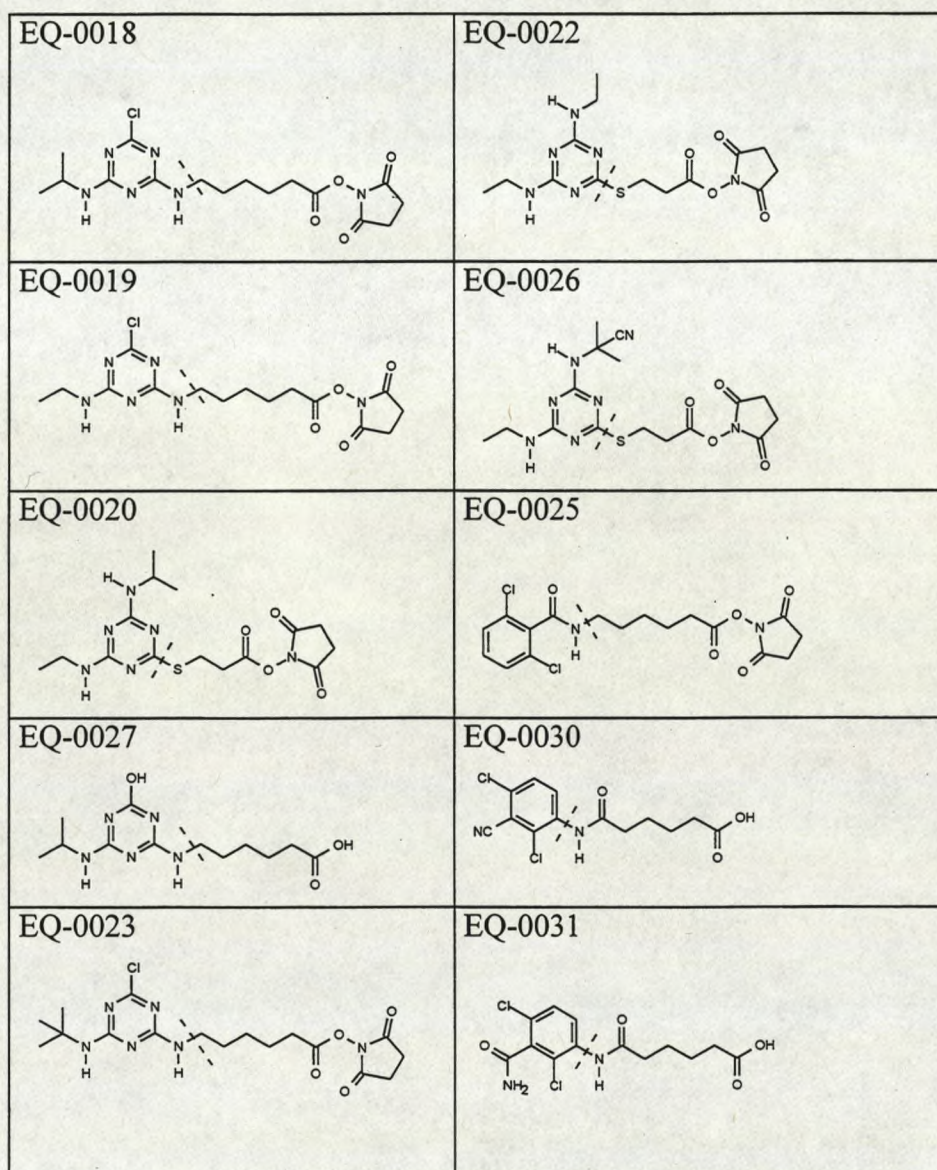
Slutteligt kan det anføres at TLC-metoden ikke er billigere end konventionelle metoder i anskaffelse, samt at udstyret i drift kræver store mængder opløsningsmidler, der dels er dyre og dels ud fra et miljømæssigt synspunkt, bør elimineres eller i det mindste begrænses til en absolut minimum. Specielt henledes opmærksomheden på at LC/MS teknikken er på vej ned i et prisleje, der gør denne teknik attraktiv i screeningsøjemed.

På ovennævnte baggrund er det GEUS opfattelse, at der inden for projektkontraktens rammer ikke skal arbejdes yderligere med TLC-metoden, og at instrumentet følgelig ikke skal anskaffes.

Dette blev tiltrådt af følgegruppen på følgegruppemødet d. 10 marts 1997.

Delprojekt 3 - Udvikling af immunkemiske metoder til kvantificering af pesticider i grundvand

Formålet med delprojektet er at udvikle og afprøve immunkemiske metoder til måling af pesticider og deres nedbrydningsprodukter i grundvand. Dette inkluderer dels en test af udvalgte kommercielle immunkemiske kits og dels udvikling af nye immunkemiske metoder mod specifikke pesticider. Som en del af projektet gennemføres der et Ph.D. studie med titlen "Udvikling og afprøvning af nye



Figur 1. Strukturer for de modificerede pesticider (haptener). Den stiplede linie angiver overgangen fra det normale pesticid og modificeringen.

metoder til bestemmelse af pesticiders forekomst og nedbrydning i grundvand". Ph.D. studiet blev påbegyndt 15 oktober 1996 med ansættelsen af biokemiker Leif Bruun.

De nye immunologiske metoder vil blive baseret på monoklonale antistoffer produceret ved immunisering af mus. Dette arbejde udføres på SSI. Da pesticidmolekylerne i sig selv er for små til at fremkalde en immunologisk reaktion er det nødvendigt at binde disse til såkaldte carrierproteiner. Etablering af denne binding er imidlertid kun mulig efter at der er foretaget en kemisk modifikation af molekylet. Til dette formål er der indgået kontrakt med firmaet EXIQON om syntese af forskellige modificerede pesticider, såkaldte haptener (figur 1). De syntetiserede haptener bliver på SSI koblet til carrierproteinerne og derefter anvendt til produktion af monoklonale antistoffer. De syntetiserede haptener vil gøre det muligt at udvikle immunologiske metoder til kvantificering af triaziner, 2,6 dichlorbenil samt forskellige nedbrydningsprodukter fra disse stoffer (figur 1).

Syntese af haptener (EXIQON)

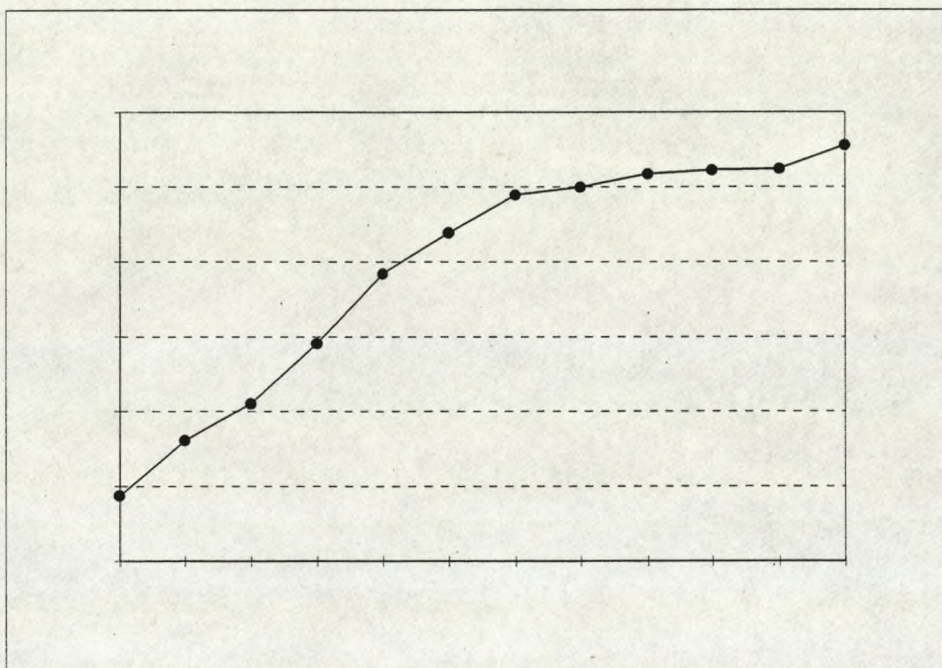
De i figur 1 viste haptener er i dag alle syntetiserede og der planlægges ikke yderligere haptensynteser. Haptenerne EQ-0018, EQ-0019, EQ-0020, EQ-0022, EQ-0023, EQ-0026 og EQ-0027 vil blive anvendt til udvikling af assays der specifikt genkender triaziner og disses nedbrydningsprodukter. Haptenerne EQ-0025, EQ-0030 og EQ-0031 vil blive anvendt til assays for kvantificering af 2,6 dichlorbenil og nedbrydningsprodukter fra dette stof. Renheden af de syntetiserede haptener er verificeret ved hjælp af smeltepunktsbestemmelse, GC-MS og NMR.

Produktion af monoklonale antistoffer (SSI)

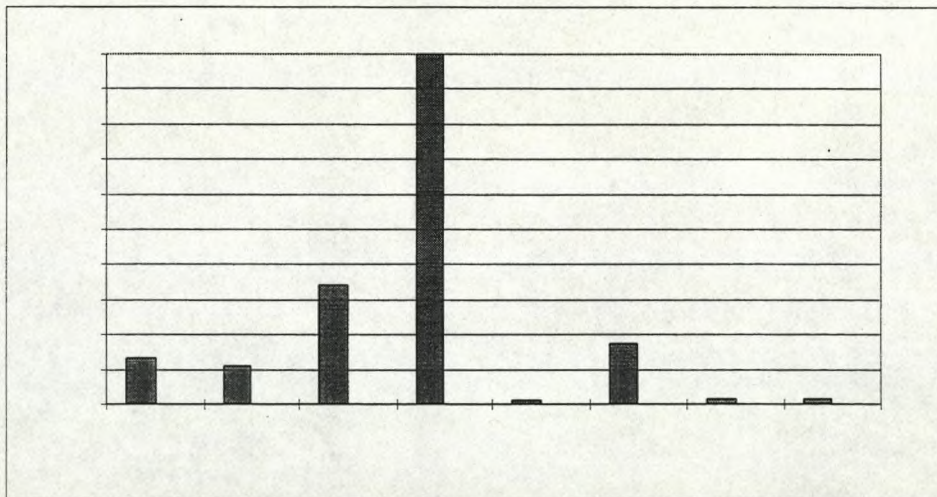
Der er produceret monoklonale antistoffer mod EQ-0018, EQ-0019 og EQ-0020 som alle står til rådighed for projektet. Derudover er der påbegyndt immuniseringer med EQ-0022, EQ-0023, EQ-0026 og EQ-0027. Immuniseringerne med EQ-0022 og EQ-0023 er længst fremme og har allerede været igennem de første screeninger af musesera. Her er der opnået tilstrækkelig respons over for EQ-0022 til at kloning er påbegyndt samt en svagere respons mod EQ-0023 der sandsynligvis efter endnu en immunisering vil være kraftig nok til at der også her kan påbegyndes kloning. Der påbegyndes immuniseringer med de sidste haptener i uge 15.

Udvikling af assayformat

Der er siden projektets start blevet arbejdet med optimering af detektion af simazin ved hjælp af de antistoffer der allerede var til rådighed (antistoffer rettet imod EQ-0018, EQ-0019 og EQ-0020). Detektionen er baseret på ELISA-teknologien (Enzyme Linked Immuno Sorbing Assay) der anvender mikrotiterplader som muliggør analyse af 96 separate prøver per plade. I løbet af dette arbejde er der opnået en foreløbig detektionsgrænse på 0,030 $\mu\text{g/L}$ simazin (figur 2) ved hjælp af et hæmningsassay, hvor mængden af simazin måles ved en hæmning af antistofbindingen til ELISA-pladen. Et assay med det viste kurveforløb vil dog kun kunne kvantificere simazin nøjagtigt ned til 0,25 $\mu\text{g/L}$. Det er målet at få rykket denne grænse ned til 0,01 $\mu\text{g/L}$. Det udviklede assay skal indgå i et kombinationsassay som beskrevet i den vedlagte projektbeskrivelse.

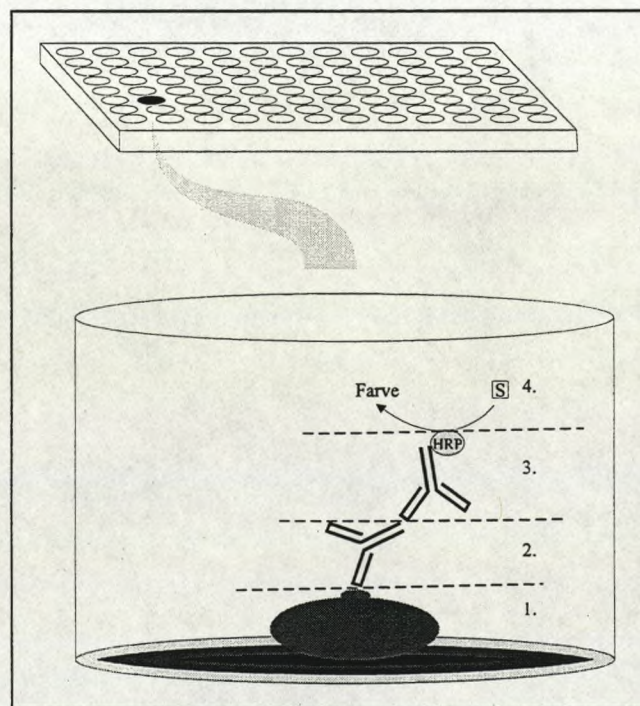


Figur 2. Hæmning af antistofbinding ved hjælp af simazin. Detektionsgrænsen defineres som den laveste mængde simazin som er i stand til at give en målelig hæmning af antistofbinding. En nøjagtig kvantisering vil dog kun være mulig i det lineære område. Dvs. i dette tilfælde mellem 0,25 og 16 $\mu\text{g/L}$ simazin.



Figur 3. Antistoffets relative evne til at binde de forskellige haptener (se figur 1). Sidste søjle viser "bindingen" til OA hvorpå der ikke er påsat pesticid. Man kan deraf slutte at antistoffet ikke genkender 0023 og 0027.

Som nævnt står Statens Serum Institut for produktionen af monoklonale antistoffer mens selve screeningerne af sera og senere også screeninger af kloner foretages af GEUS. Test af den første responderende mus viser en rimelig specificitet over for det hapten musen blev immuniseret med. I



Figur 4. De enkelte assay-trin i en enkelt brønd på en ELISA-plade.

1. Ovalbumin med hapten sættes fast i bunden af brønden.
2. Antistof mod hapten (pesticid) binder.
3. Antistof konjugeret med signalezym binder til "pesticid-antistof".
4. Mængden af bunden antistof kvantificeres ved at måle på farveudviklingen.

dette tilfælde drejer det sig om en mus immuniseret med EQ-0022 (figur 3). Museserumets reaktivitet overfor EQ-0022 er sat til 100 % og man kan så se at der er en krydsreaktivitet over for f.eks. EQ-0020 på ca. 34 %. Grunden til, at der i figuren står OA-0022 er at EQ-0022 kobles til Ovalbumin (OA), for at haptenet kan fastgøres til bunden af ELISA-pladen. Herved opnås et assay-system, der groft kan skitseres som i figur 4.

Det skal nævnes, at det antistof som testes i figur 3 endnu er polyklonalt (sera fra immuniseret mus) og derfor indeholder mange forskellige antistoffer med hver deres bindingstype over for haptenet 0022.

Det må derfor forventes at de viste krydsreaktiviteter kun kan blive formindsket ved den kommende kloning.

Delprojekt 4 - Forekomst og nedbrydning i forskellige grundvandsmiljøer

I overensstemmelse med tidsplanen blev der først indledt aktiviteter indenfor delprojekt 4 i starten af 1997.

Der er isoleret bakterier der kan nedbryde mechlorprop og iværksat internationalt samarbejde vedrørende mikrobiel nedbrydning af atrazin. Der er indledt studier af pesticidnedbrydning i grundvand baseret på dels naturlige populationer dels de ovenfor nævnte populationer.

Arbejdet intensiveres yderligere ved tilknytning af en Ph.D studerende. Stipendiet forventes besat sommeren 1997.

Justering af projektkontrakt

I konsekvens af at arbejdet med TLC-teknikken indstilles er der behov for en justering af projektkontrakten. GEUS skal foreslå, at der igangsættes studier af omsætning af sulfonyleurea herbicider (minimidler) i underjord og grundvand.

Sulfonyleurea herbicider er blandt de stoffer, der i stigende grad erstatter pesticider, hvis anvendelse ikke længere er tilladt. Sulfonyleurea herbicider kan undergå hurtig hydrolyse, hvorved der dannes et- eller flere hydrolyseprodukter. Det foreslåede projekt vil indeholde en beskrivelse af denne hydrolyse samt undersøgelser af omsætningen af hydrolyseprodukterne i grundvand under forskellige redox forhold.

Akkumulering af hydrolyseprodukter samt disses nedbrydning vil blive bestemt ved LC/MS, og fuldstændig mineralisering til CO₂ vil blive bestemt ved brug af ¹⁴C-mærkede sulfonyleurea forbindelser. Det forventes at undersøgelsen vil afklare om dannede hydrolyse- eller nedbrydningsprodukter fra sulfonyleurea kan være persistente i grundvandsmagasiner.

Projektet gennemføres sammen med DMU/MIKE, der vil deltage i arbejdet med LC/MS analyser indenfor en beløbsramme på Kr. 800.000. Projektet vil ikke indebære ændringer i den samlede beløbsramme for projektkontrakten.

Følgegruppen var enige i at GEUS skulle arbejde videre med dette projekt.

Projektøkonomi og fagligt forløb

I bilag 4 er anført budget for 1996 og de realiserede udgifter fordelt på anskaffelser, drift, samarbejdspartnere samt GEUS's lønomkostninger. Endvidere er anført oprindelig budget for 1997 samt forslag til revideret budget under henvisning til ovennævnte behov for justering af projektkontrakten.

Delprojekt 1 og 3 er forløbet planmæssigt, hvilket afspejles i forholdet mellem de budgetlagte og realiserede udgifter. Problemerne med afprøvning af TLC-teknikken i forhold til konventionelle metoder har medført et betydeligt, ikke planlagt merforbrug af timer. Dette afspejles i den betydelige meromkostning på lønninger under delprojekt 2 i forhold til budgettet. Der var planlagt gennemførelse af avancerede LC/MS analyser på DMU i forbindelse med verifikation af TLC-teknikkens bæredygtighed. Da sammenligning med konventionelle metoder viste at metoden ikke var anbefalelsesværdig, blev det ikke nødvendigt at inddrage avancerede analysemetoder. I konsekvens heraf er de realiserede udgifter til samarbejdspartnere væsentlig lavere end budgetteret. Endelig har beslutningen om ikke at anskaffe TLC-udstyr ført til et lavere forbrug på anskaffelser end oprindeligt budgetteret.

Særlige bemærkninger

På grund af pålagte opgaver i forbindelse med AMPA-sagen og vurdering af Miljøstyrelsens procedure for godkendelse af pesticider blev den planlagte udsendelse af statusrapporten den 1. april udskudt til 15. april 1997.

Referencer

- Burger, K. 1995: Thin Layer Chromatography with Automated Multiple Development (AMD-TLC) - in: Stan, H.-J. (ed.) Analysis of Pesticides in Ground and Surface Water II, Chemistry of Plant Protection Vol. 12, 181-195, Springer Verlag.
- Butz, S og H.-J. Stan, 1995: Screening of 265 Pesticides in Water by Thin-Layer Chromatography with Automated Multiple Development, Analytical Chemistry, Vol. 67, No.3, 620-630.
- Stan, H.-J. 1996: Soil and Groundwater Pollution.- How well can we **screen** for organic micro-pollutants? ATV møde, 18. April 1996.

Bilag

- Bilag 1: Referat af følgegruppemøde 13. september 1996
- Bilag 2: Referat af følgegruppemøde 10. marts 1997
- Bilag 3: Valgte pesticider og metabolitter til screening
- Bilag 4: Projektøkonomi 1996 og 1997

Referat af følgegruppemøde for GEUS projektkontrakt "Udvikling og afprøvning af nye metoder til bestemmelse af pesticiders forekomst og nedbrydning i grundvand". Mødet blev afholdt på GEUS d. 13/9-96 kl. 13.00.

Deltagere:

Niels Henrik Spliid	DMU
John W. Kohrtz	ENS
Steen Marcher	MST
Lene Holm	SNS (afbud)
Bjørn R. Andersen	FSL (afbud)
Walter Brüsch	GEUS
Jens Aamand	GEUS
Bo Lindhardt	GEUS
Erik Thomsen	GEUS

Dagsorden:

1. Velkomst
2. Orientering om projektets faglige indhold og målsætning
3. Status for state-of-the-art projekt
4. Status for arbejdet med afprøvning af nye analysemetoder
5. Eventuelt

ad 1) Erik Thomsen bød velkommen og orienterede kort om GEUS situation på grundvandsområdet.

ad 2) Erik Thomsen gennemgik projektets overordnede faglige indhold og målsætning. Projektet har til formål at teste, optimere og implementere nye metoder til påvisning og screening af pesticider og disses nedbrydningsprodukter, samt at kvalitetssikre metoderne ved afprøvning under forskellige geokemiske og geologiske forhold. Endvidere at beskrive forekomst og nedbrydning af udvalgte pesticider i forskellige grundvandsmiljøer under anvendelse af nye og konventionelle analysemetoder. Projektet omfatter fire delprojekter:

a) State-of-the-art

Sammenstilling af tilgængelig viden om forekomsten af pesticider og disses nedbrydningsprodukter i grundvand i Danmark og i udlandet.

b) Nye analysemetoder

TLC metoder og kommercielle immunologiske assays testes og indkøres i laboratoriet.

c) Udvikling af nye ikke-kommercielle immunkemiske metoder

På grundlag af antistoffer produceret på Statens Seruminstitut udvikles immunologiske assays til analyse af udvalgte pesticider, der udgør en risiko for grundvandet.

d) Forekomst og nedbrydning i forskellige grundvandsmiljøer

De nye metoder afprøves i karakteriserede grundvandsmiljøer, og anvendes sammen med konventionelle metoder til at bestemme forekomst og omsætning af udvalgte pesticider.

ad 3) Walter Brüsich redegjorde for status for state-of-the-art projektet.

Internationale programmer:

Der er gennemført en søgning i relevante databaser og indsamlet analyseresultater fra udenlandske monitoringsprogrammer. De udenlandske monitoringsprogrammer er af stærkt varierende omfang og beskrivelsen af baggrundskriterier varierende. F.eks. er der meget varierende detektionsgrænser og programmerne/projekterne omfatter forskellige stofvalg. De større nationale sammenskrivninger er ofte af ringe kvalitet. Der er på det internationale plan indledt et samarbejde med universitetet i Bremen, der er i forbindelse med en forskningskontrakt med CIBA undersøger forekomst af pesticider i Europæisk grundvand. I den forbindelse er der aftalt udveksling af data, samt et møde i november mellem repræsentanter fra de EU-landene der har ønsket et samarbejde med universitetsfolkene. Det er ikke muligt at fremskaffe et samlet overblik fra Tyskland, hvor det er de enkelte Länder der med varierende indsats står for overvågningen af grundvandet.

Som grundlag for hvilke stoffer der søges efter, er anvendt en liste udarbejdet af Miljøstyrelsen, der omfatter ca. 420 stoffer, der er anvendt i Danmark. Der er p.t. fundet oplysninger omfattende ca. 150 stoffer, hvoraf ca. 100 er fundet i grundvand. De 150 stoffer omfatter også metabolitter.

Indsamlingen af oplysninger via litteraturdatabaser fortsættes og den etablerede access database opdateres løbende.

Danmark:

Der er indgået aftale med de større vandforsyninger og med amterne der løbende fremsender resultater fra de analyseprogrammer, der omfatter flere end de 8 "grumo" pesticider. Sammendrag af disse analysedata lægges i access database. Der er p.t. analyseret for ca. 45 stoffer, hvoraf de 24 er fundet i dansk grundvand. De enkelte analyseprogrammer er af forskellig størrelse, omfatter forskellige stoffer, forskellige detektionsgrænser og formentlig med forskellige analysemetoder.

Sideløbende med indsamlingen af danske analysedata fra grundvand indsamles også data fra overfladevand. Hvad der i dag findes i vandløbsvand i lerede og drænedede oplande vil formodentlig også kunne findes i grundvand dannet under lerdække, såfremt stofferne ikke sorberes til ler eller omsættes under rodzonen.

Indsamlingen af danske data fortsættes løbende. Der er fremsendt et udtræk af de udvidede analyseprogrammer samt overvågningsresultater til de tyske universitetsfolk.

ad 4) Jens Aamand orienterede om arbejdet med immunologiske assays.

Overordnet set kan den del af projektet der involverer udvikling af immunologiske assays inddeles i tre trin: 1) produktion af haptener, dvs. kemisk modifikation af udvalgte pesticider således at disse kan bindes til carrierproteiner. Dette arbejde vil blive udført af det nystartede firma Exiqon. En samarbejdsaftale vedrørende haptenproduktion og afprøvning af plader produceret af Exiqon er under udarbejdelse. 2) immunisering (injektion af carrierproteiner i mus) og efterfølgende produktion af antistoffer genkendende specifikke pesticider. Dette arbejde vil blive udført af Statens Seruminstitut (SSI). Samarbejdsaftale er under udarbejdelse. 3) udvikling af immunologiske assays til analyse for pesticider i grundvand. Dette arbejde udføres af GEUS. Der vil i projektet primært blive arbejdet med udvikling af monoclonale antistoffer, da disse er mere specifikke (mindre krydsreaktion med andre pesticider), og i princippet kan designes således, at de genkender netop de strukturer på pesticid molekylet, der ønskes. Hermed er det muligt, både at udvikle assays der genkender enkelte pesticider og assays der genkender hele pesticidgrupper f.eks. alle triaziner. Der vil i projektet blive arbejdet med følgende pesticider: Atrazin, simazin, terbuthulazin, cyanazin, hydroxyatrazin, desethylatrazin, desisopropylatrazin., mechlorprop og 2,6-dichlorbenzamid. Et Ph.D. stipendium er under besættelse.

Bo Lindhardt redegjorde for arbejdet med indkøring af kommercielle metoder og afprøvning af tyndlagskromatografi (TLC) som screening værktøj

Til bl.a. pesticid screening har Dr. Stan, Institute of Food Chemistry Technical University of Berlin, i 1995 publiceret en række resultater opnået ved en særligt udviklet tyndlags kromatografisk (TLC) analysemetode. På baggrund af de meget lovende resultater blev det besluttet at undersøge metodens egnethed som en hurtig screeningsmetode for et stort antal stoffer. Dr. Stan har siden, ved et ATV møde d. 18/4-96, demonstreret metodens egnethed i forbindelse med screening af pesticider relevante for danske forhold. Da instrumentet er relativt dyrt, og da det er en nyudviklet metode blev det besluttet først at afprøve metoden i Berlin, men med prøver fra Danmark, før en endelig beslutning om

anskafelse bliver truffet. Der har været afholdt en afprøvningsrunde(juni). Efter bearbejdelse af de opnåede resultater er der taget kontakt til Dr. Stan med henblik på en diskussion af resultaterne samt en drøftelse af hvorvidt der skal etableres yderligere en afprøvningsrunde med et ændret forsøgs design.

Sideløbende med undersøgelserne af TLC metoden arbejdes der med udvikling og indkøring af HPLC metoder til screening af ca. 40 pesticider, se vedlagte bilag. Der arbejdes med fastfase ekstraktion, dels ved sur og dels ved neutral ekstraktion. Niels Henrik Spliid forespurgte om GEUS behov for LC/MS analyser på DMU i indeværende år. Bo Lindhardt oplyste at GEUS ikke påregner at anvende LC/MS i indeværende år.

Eventuelt

Intet. Næste møde afholdes ultimo februar 1997.

Erik Thomsen

Referat af følgegruppemøde for GEUS projektkontrakt "Udvikling og afprøvning af nye metoder til bestemmelse af pesticiders forekomst og nedbrydning i grundvand". Mødet blev afholdt på GEUS d. 10/3-97 kl. 10.00

John W. Kortz (afbud)	ENS
Steen Marcher (afbud)	MST
Niels Henrik Spliid	DMU
Rossanna Bossi	DMU
Pernille Karlog	SNS
Lene Holm (afbud)	SNS
Bjørn R. Andersen	FSL
Walther Brüschr	GEUS
Jens Aamand	GEUS
Bo Lindhardt	GEUS
Leif Bruun	GEUS
Per Rosenberg	GEUS
Erik Thomsen	GEUS

Dagsorden:

1. Status for projektet
 - Generelt forløb
 - "State of the art"
 - Indkøring af konventionelle metoder og afprøvning af TLC
 - Immunkemiske metoder
2. Justering af projektkontrakt
3. Statusrapportering - Disposition
4. Eventuelt

ad 1) - Generelt forløb:

Erik Thomsen orienterede om projektets generelle forløb, bemandsingssituation, Ph.D. forløb og behovet for justering af det faglige forløb i lyset af de indhøstede erfaringer.

- "State of the art"

Walther Brüschr redegjorde for arbejdet med indsamling af data vedrørende fund af pesticider i Danmark og i udlandet. Der er opbygget baser for fund af pesticider i dansk og udenlandsk grundvand samt en mindre base vedrørende fund i dansk overfladevand. Walther Brüschr viste anvendelsen af den opbyggede database eksemplificeret ved 12 stoffers forekomst i ungt og ældre dansk grundvand samt tilsvarende i udenlandsk grundvand. De danske fund blev sammenholdt med fund af samme pesticider i dansk overfladevand. Projektet forløber planmæssigt.

- Indkøring af konventionelle metoder og afprøvning af TLC

Bo Lindhardt orienterede om arbejdet med indkøring af konventionelle analysemetoder. Der er arbejdet med forskellige former for fastfase ekstraktion, herunder C18 filtre (47mm) til basiske og neutrale pesticider og et SDB filter (47mm, polystyrendivinyll) til sure pesticider og et aktivt kulfilter

(ENVI-CARB) til alle pesticider. Der er pt. indkørt analysemetoder for 35 stoffer. Geus tilstræber at opnå 45 stoffer. Geus har deltaget i den af DMU afholdte interkalibrering i januar 1997, der omfattede 22 stoffer.

Per Rosenberg redegjorde for arbejdet med AMD-HPTLC. Afprøvning af denne teknik er gennemført i samarbejde med Technisches Universität, Berlin, ved Professor H.J. Stan. Den første analyserunde blev gennemført i 1996 med et utilfredsstillende resultat, hvorfor det blev besluttet at gennemføre en ny. Andenrunde var gennemført med koncentrationer i størrelsesorden svarende til 100 ng/L af hver af de testede pesticider. Formålet var at undersøge metodens egnethed i et koncentrationsområde, der er optimal for denne teknik ifølge professor Stan. Der blev testet for triaziner og phenylurea som standarder, ekstraherede prøver fra henholdsvis ionbyttet (Millipore) vand, drikkevand og humusrigt grundvand fra Fladerne Bæk. Resultaterne gav anledning til følgende hovedkonklusioner vedrørende AMD-HPTLC teknikens egnethed som screening værktøj i forhold til HPLC:

AMD-HPTLC teknikken er mere følsom overfor matrix effekter end HPLC
Enkelte pesticider kan ikke genfindes
Kvantificering er ikke tilfredsstillende
Separationskapaciteten er ringere end HPLC teknikken
Betydelig risiko for falske positive og negative fund

Da metoden er testet ved den absolut højeste koncentration, der kan accepteres i relation til de krav, der er formuleret i henhold til Drikkevandsdirektivet, er resultaterne særdeles utilfredsstillende. Sammenlignet med HPLC er der ikke åbenbare fordele ved metoden, hverken i relation til præcision, pris for instrumentet eller tidsforbrug/pris ved analyse.

GEUS skal derfor anbefale at arbejdet med afprøvning af AMD-HPTLC metoden indstilles og at udstyret ikke anskaffes.

Deltagerne tilsluttede sig dette synspunkt. GEUS meddelte at ovennævnte problemer havde medført et betydeligt ikke planlagt merforbrug af timer.

- Immunkemiske metoder

Ph.D. studerende Leif Bruun orienterede om arbejdet med immunkemiske metoder. Leif Bruun, der er uddannet som biokemiker, blev ansat som Ph.D studerende under projektkontrakten den 15. oktober 1996. Leif Bruun redegjorde for den immunkemiske arbejdsmetodik. EXIQON har færdiggjort arbejdet med syntese af haptener. Der er syntetiseret haptener med henblik på udvikling af assays, der specifikt genkender triaziner og disses nedbrydningsprodukter. Endvidere haptener med henblik på udvikling af assays for kvantificering af 2,6 dichlorbenil og nedbrydningsprodukter fra dette stof. Arbejdet med produktion af monoklonale antistoffer udføres af Statens Serum Institut (SSI). Arbejdet forløber planmæssigt. GEUS har arbejdet med optimering af metoder til måling af simazin ved hjælp af foreliggende antistoffer. Metoderne er baseret på ELISA-teknologien, og der er opnået en foreløbig detektionsgrænse på 0,015 mikrogram/L simazin. Målet er at opnå en grænse på 0,01 mikrogram/L. Projektet forløber planmæssigt.

ad 2)

- Justering af projektkontrakt

I konsekvens af arbejdet med TLC-teknikken indstilles er der behov for en justering af projektkontrakten. Jens Aamand orienterede om planerne for en omformulering af projektkontrakten, med henblik på studier af omsætning af sulfonylurea herbicider (minimidler) i underjord og grundvand.

Sulfonylurea herbicider er blandt de stoffer, der i stigende grad erstatter pesticider hvis anvendelse ikke længere er tilladt. Sulfonylurea herbicider kan undergå hurtig hydrolyse, hvorved der dannes et eller hydrolyseprodukter. Det foreslåede projekt vil indeholde en beskrivelse af denne hydrolyse samt undersøgelser af omsætningen af hydrolyseprodukterne i grundvand under forskellige redox forhold.

Akkumulering af hydrolyseprodukter samt disses nedbrydning vil blive bestemt ved HPLC-MS, og fuldstændig mineralisering til CO₂ vil blive bestemt ved brug af ¹⁴C-mærkede sulfonylurea forbindelser. Det forventes at undersøgelsen vil afklare om dannede hydrolyse- eller nedbrydningsprodukter fra sulfonylurea kan være persistente i grundvandsmagasiner. Projektet gennemføres sammen med DMU/MIKE, der vil deltage i arbejdet med HPLC-MS analyser indenfor en beløbsramme på Kr. 800.000. Projektet vil ikke indebære ændringer i den samlede beløbsramme for projektkontrakten. Deltagerne var enige i at GEUS skulle arbejde videre med forslaget.

ad 3) - Statusrapportering - Disposition

Erik Thomsen orienterede om arbejdet med udarbejdelse af statusrapport, der vil omfatte de emner der er berørt under mødet samt projektets økonomi. Rapporten skal foreligge den 1. april 1997.

ad 4) -Eventuelt

Intet

Erik Thomsen

Bilag 3: Pesticider der vil indgå i den endelige screeningsundersøgelse.

Navn	Stof gruppe
Atrazin	triazine
Atrazin, desethyl-	triazine
Atrazin, desethyldeisopropyl-	triazine
Atrazin, desisopropyl-	triazine
Atrazin, hydroxy-	triazine
Bentazon	benzothiadiazinone
Bromoxynil	hydroxybenzotrile
Carbofuran	carbamate
Chloridazon	pyridazinone
Chlorsulfuron	sulfonylurea
Cyanazin	triazine
D, 2,4-	phenoxy acid
Dicamba	carboxylic acid
Dichlobenil	benzotrile
Dichlorbenzamid, 2,6-	benzamid
Dichlorprop	phenoxy acid
Dimethoat	organophosphorus
Dinoseb	dinitrophenol
Diuron	phenylurea
DNOC	dinitrophenol
Ethofumesat	benzofuran
Fenpropimorph	morpholine
Hexazinon	triazinone
Ioxynil	hydroxybenzotrile
Isoproturon	phenylurea
Lenacil	uriacil
Lindan	organochlorine
Linuron	phenylurea
Malathion	organophosphorus
MCPA	phenoxy acid
Mechlorprop	phenoxy acid
Metamitron	triazinone
Methabenzthiazuron	phenylurea
Metribuzin	triazinone
Metsulfuron methyl	sulfonylurea
Parathion	organophosphorus
Pendimethalin	dinitroaniline
Pirimicarb	carbamate
Propiconazol	conazole
Simazin	triazine
Simazin, Hydroxy	triazine
Terbuthylazin	triazine
Terbuthylazin, desethyl-	triazine
Terbuthylazin, hydroxy-	triazine

	BILAG 4													
	GEUS Projektkontrakt													
	Udvikling og afprøvning af nye metoder til bestemmelse af pesticiders forekomst og nedbrydning i grundvand													
	Regnskab		Budget 1996		Real. 1996		Budget 1997		Justeret budget 1997					
	Anskaffelser		kr 1.100.000,00		kr 601.086,88		kr 561.000,00		kr 561.000,00					
	Drift		kr 200.000,00		kr 183.498,36		kr 355.000,00		kr 355.000,00					
	Samarbejdspartnere		kr 525.000,00		kr 200.000,00		kr 350.000,00		kr 766.666,00					
	Udlæg		kr 1.825.000,00		kr 984.585,24		kr 1.266.000,00		kr 1.682.666,00					
	Lønomsstninger													
	1. State-of-the-art		kr 304.000,00		kr 330.544,58		kr 228.000,00		kr 228.000,00					
	2. Indkøring af nye(kommercielle) metoder		kr 799.000,00		kr 1.223.260,71		kr 356.000,00		kr 108.988,00					
	3. Udvikling af nye immunkemiske metoder		kr 201.000,00		kr 199.171,82		kr 692.000,00		kr 692.000,00					
	4. Forekomst og nedbrydning						kr 363.000,00		kr 363.000,00					
	Udlæg		kr 1.304.000,00		kr 1.752.977,11		kr 1.639.000,00		kr 1.391.988,00					
	Total		kr 3.129.000,00		kr 2.737.562,35		kr 2.905.000,00		kr 3.074.654,00					
	Bevilling		kr 3.129.000,00		kr 3.129.000,00		kr 2.905.000,00		kr 3.296.437,70					
	Overføres til 1997				kr 391.437,65		kr 391.437,65		Overføres til 1998 kr 221783,7					