

HURTIG METODE TIL SCREENING FOR JORDS MINERALISERING AF PESTICIDER

Stud.scient. Jim Rasmussen
Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole

Seniorforsker Ole Stig Jacobsen
Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse

ATV MØDE
VINTERMØDE OM JORD- OG GRUNDVANDSFORURENING

VINGSTEDCENTRET
5.-6. marts 2002

RESUMÉ

En screeningsmetode for mineralisering af ^{14}C -mærkede stoffer er blevet udviklet. Opsamlingen af $^{14}\text{CO}_2$ fra mineralisering af ^{14}C -mærket pesticid sker på en rondel af glasfiber chromatografipapir (GFC) fugtet med $\text{Ca}(\text{OH})_2$. GFC rondellen fastholdes med silikone lim i låget på en 20 ml glasvial. Målingen af den opsamlede radioaktivitet sker med det autoradiografiske princip. Lågene eksponeres mod en Cyclone™ film i et døgn før fremkaldelse på en Cyclone™ scanner. Metoden har samme sikkerhed på målingerne som traditionel opsætning i 100 ml standflasker, hvor $^{14}\text{CO}_2$ opsamling sker i en basefælde med efterfølgende tælling på en væske scintillations tæller (LSC). Metoden er væsentlig hurtigere end den traditionelle, både hvad angår arbejdet med opsætning af prøver og prøveudtagning, men i høj grad også i forhold til analysen af den opsamlede $^{14}\text{CO}_2$ mængde.

1. INDLEDNING

I forbindelse med vurdering af risikoen for udvaskning af et pesticid spiller data for nedbrydning af stoffet en væsentlig rolle. Det optimale er at måle på den fuldstændige mineralisering til CO_2 og H_2O , idet nedbrydningsprodukterne af et pesticid kan være lettere udvaskelige end selve pesticidet. Mineraliseringsgraden undersøges typisk ved enten at følge O_2 forbruget eller CO_2 dannelsen ved nedbrydning af pesticidet. I mange tilfælde benyttes ^{14}C -mærkede stoffer, hvilket giver mulighed for at lave undersøgelser ved koncentrationer, der er realistiske i miljøet.

I nedbrydningsforsøg med ^{14}C -mærkede stoffer opsamles $^{14}\text{CO}_2$ normalt i en basefælde med efterfølgende tælling på en LSC. På GEUS udføres mineraliseringsforsøg i 100 ml standflasker med $^{14}\text{CO}_2$ opsamling i et reagensglas med 0,5 M NaOH. Metoden er plads-, arbejds- og tidskrævende. Især tællingen på LSC tager meget tid, idet hver prøve skal tælles i 10 minutter. Før tællingen på LSC kan ske, skal prøven tilsættes scintillationsvæske, som er en blanding af forskellige organiske opløsningsmidler, hovedsageligt benzen eller naphthalen forbindelser.

Formålet med dette projekt har været at udvikle en screeningsmetode til undersøgelse af nedbrydningen af ^{14}C -mærkede stoffer, som ikke er nær så plads- og tidskrævende, som det gælder for de mineraliseringsforsøg, der laves med den traditionelle metode. Ideen er, at opsamle $^{14}\text{CO}_2$ på basefugtet tyndtlags chromatografipapir (TLC). Disse analyseres for radioaktivt indhold ved eksponere dem mod en Cyclone™ film, som efterfølgende fremkaldes på en Cyclone™ scanner. Billedet af Cyclone™ filmen analyseres elektronisk for lysintensitet med OptiQuant™ software. Lysintensiteten er proportional med den radioaktive stråling med en linearitet på 10^5 digitale lysenheder (dlu).

Ideen med at opsamle $^{14}\text{CO}_2$ på en basefugtet TLC-plade er tidligere afprøvet af Bostwick og Le /1/, som lavede opsamling over micro titer bakker. I et andet forsøg opsamlede Pfaender og Bartholomew /2/ $^{14}\text{CO}_2$ på en TLC-plade placeret på en teflon membran i låget på 250 ml Erlenmeyer flasker. I begge disse forsøg blev prøverne analyseret for radioaktivt indhold efter opløsning af TLC-pladen i scintillationsvæske og tælling på LSC. Metoderne giver i forhold til den traditionelle metode ikke nogen tidsreduktion for tællingen af prøverne. Metoden, der

er udviklet i dette projekt, er i forhold hertil meget tidsbesparende, da tællingen af $^{14}\text{CO}_2$ sker med en teknik, som kun tager 5 minutter per analyse, og samtidigt kan rumme 32 prøver på én gang.

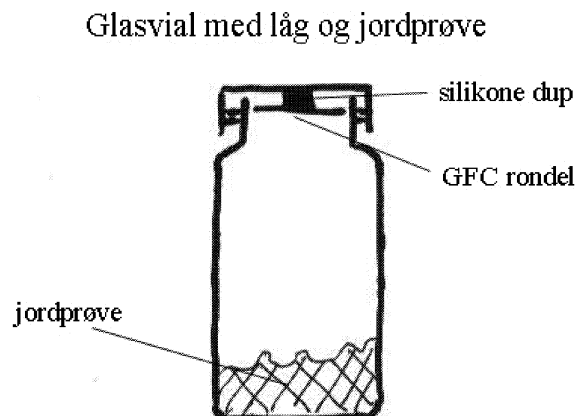
2. BESKRIVELSE AF PRINCIPPERNE BAG CYCLONE™ TEKNIKKEN

Teknikken der ligger til grund for Cyclone™ filmene er det autoradiografiske princip. Tidligere blev der arbejdet med sværtning af et sølv-halogenid indstøbt i en gel /3/, men nu arbejdes der med phosphor krystaller på en tynd og fleksibel film. Princippet for Cyclone™ filmen er, at der ved eksponering af filmen mod en radioaktiv kilde, sker en excitering af phosphor krystallerne i forhold til styrken af den radioaktive kilde. Med Cyclone™ teknikken sker aflæsningen af filmen ved belysning af filmen med rød laser, hvorved de exciterede phosphor krystaller afgiver blåt lys, som registreres og danner et billede af filmen. Efter fremkaldelse af Cyclone™ filmen kan billedet analyseres for lysintensitet ved hjælp af OptiQuant™ software. Lysintensiteten er proportional med eksponeringstiden og den radioaktive mængde, der var i prøven. Cyclone™ filmen reetableres ved at belyse den med hvidt lys i fem minutter /4/.

Cyclone™ teknikken benyttes i dag hovedsageligt indenfor den medicinske forskning, hvor der er brug for meget præcise billeder af radioaktivt mærket medicins placering i eksempel en vævsprøve fra rotter /5/.

3. BESKRIVELSE AF DEN NYE METODE TIL $^{14}\text{CO}_2$ OPSAMLING

Metoden til $^{14}\text{CO}_2$ opsamling benytter 20 ml glasvials som prøvebeholder. Brugen af glasvials betyder en væsentlig pladsreduktion, idet prøver i glasvials fylder en tiende del af prøver opsat med den traditionelle metode. I låget på glasvialen fastgøres med silikone en GFC rondel til opsamlingen af $^{14}\text{CO}_2$, så rondellen kommer til at hænge ned fra låget uden at berøre glasset. GFC rondeller er valgt, idet de er væsentligt tyndere end TLC rondeller uden det betyder, at rondellen kan indeholde mindre fangvæske. Tykkelsen af rondellen har betydning for den skygning, der sker af den radioaktive stråling ved eksponering mod Cyclone™ filmen. GFC rondellen fugtes med 75 μl 0,2 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ før inkubation og $^{14}\text{CO}_2$ opsamling starter. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ har vist sig overlegen i forhold til NaOH og KOH i forhold til at give høj opsamling af $^{14}\text{CO}_2$. Efter prøveudtagning, hvor lågene skiftes, tørres låg med rondeller for at undgå vanddæmpning af den radioaktive stråling. Ved eksponeringen mod Cyclone™ filmen placeres lågene i en lågholder med plads til 32 låg, fire rækker af otte låg. For hver eksponering med tages interne standarder med kendt radioaktiv mængde, så det er muligt at omregne lysintensiteten til antallet af radioaktive henfald. Lågholderen er skåret ud i træ og beklædt med aluminiumsfolie for at mindske baggrundsstrålingen.

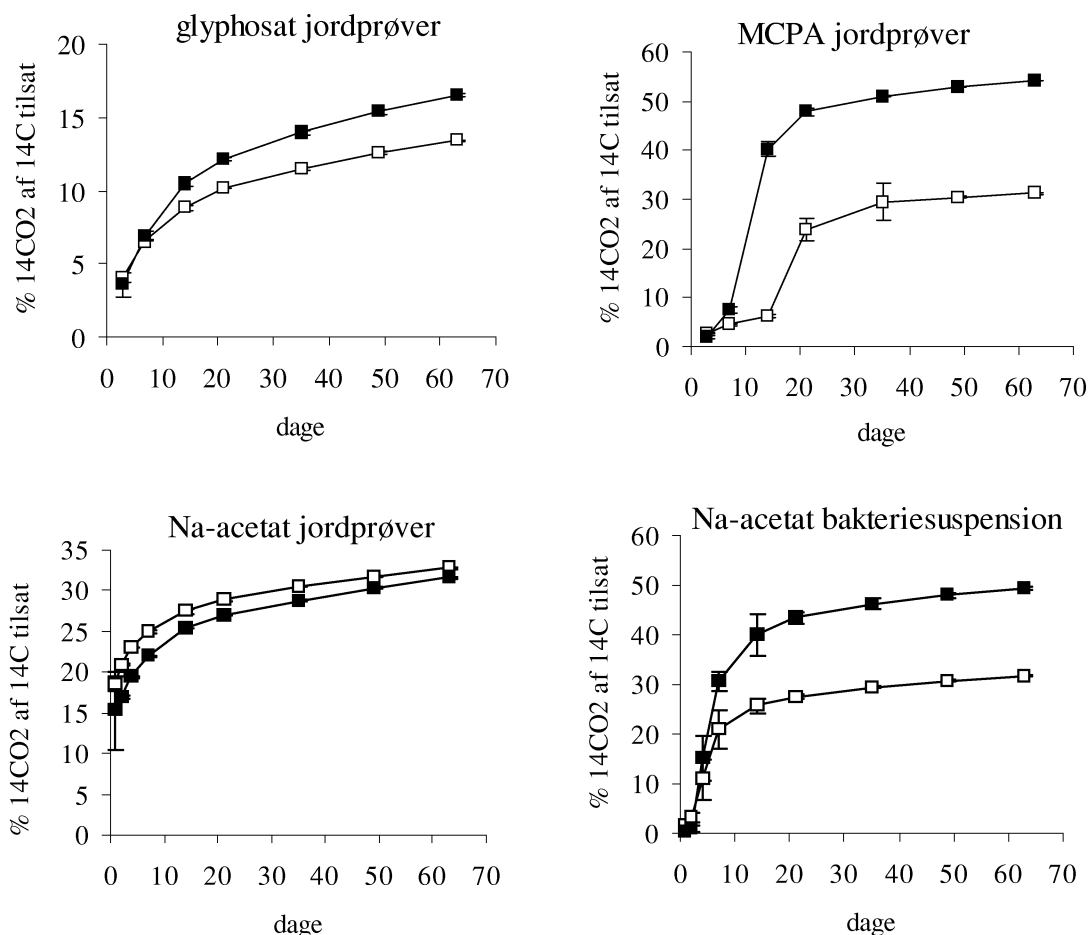


Figur 1. Tværsnit af glasvial med jordprøve og låg med GFC rondel

4. AFPRØVNING AF DEN NYE METODE TIL $^{14}\text{CO}_2$ OPSAMLING

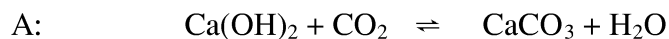
Den nye metode til $^{14}\text{CO}_2$ opsamling er afprøvet i forhold til den traditionelle metode med $^{14}\text{CO}_2$ opsamling i et reagensglas med 1 ml 1 M KOH. Dette er sket i forsøg med mineralisering af ^{14}C -mærket glyphosat og MCPA. Desuden er mineralisering af ^{14}C -mærket Na-acetat undersøgt for at bestemme jordens mikrobielle aktivitet. Mineraliseringen er målt i henholdsvis jordprøver og bakteriesuspensioner. Bakteriesuspension blev fremstillet ved at blende 10 gram frisk jord med 100 ml fysiologisk saltvand (0,9 %) og benytte supernatanten som bakteriesuspension efter sedimentation. Koncentrationen af pesticiderne og Na-acetat var på 1 ppm og prøverne blev inkuberet ved 10 grader i mørke i 9 uger. For hver behandling blev der lavet 5 gentagelser med $^{14}\text{CO}_2$ opsamling med både den nye og den traditionelle metode. For den nye metode er låg med rondeller tørret ved 35 grader i cirka 1 time før eksponering i 24 timer mod en Cyclone™ film.

Figur 2 viser mineraliseringskurverne for MCPA og glyphosat i jordprøver, samt for Na-acetat i både bakteriesuspension og jordprøve. Produktionen af $^{14}\text{CO}_2$ fra mineralisering af MCPA og glyphosat i bakteriesuspensioner oversteg ikke isotopernes radiokemiske urenhed. Det ses ved sammenligning mellem den nye og den traditionelle metode, at kurverne generelt har samme forløb. Hertil kommer, at spredningen mellem fem gentagelser for den nye metode ligger indenfor samme interval, som det er tilfældet for den traditionelle metode. For nedbrydning af MCPA i jordprøver og Na-acetat i bakteriesuspension er der dog en klar tendens til, at den nye metode måler for lille en mineralisering i forhold til den traditionelle metode. Dette skyldes formodentlig at kapaciteten for CO_2 opsamling er blevet opbrugt.



Figur 2. $^{14}\text{CO}_2$ opsamling i procent af ^{14}C -mængde tilsat for opsamling med ny metode (—□—) og den traditionelle metode (—■—). Mineralisering i jordprøver for glyphosat, MCPA og Na-acetat, samt i bakteriesuspension for Na-acetat.

Ligning A viser den reaktion, der sker ved opsamling af $^{14}\text{CO}_2$ i $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Et simpelt regnestykke siger, at 1 ml 1 M KOH kan rumme 1 mmol CO_2 , mens 75 μl 0,2 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kan rumme 0,015 mmol CO_2 .



MCPA nedbrydningen har et vækst relateret forløb, hvor der først ses en lag-fase, derefter en kraftig stigning, hvorefter nedbrydningen klinger af /6/. Det samme forløb ses for nedbrydningen af Na-acetat bakteriesuspension. Forskellen mellem kurverne for $^{14}\text{CO}_2$ opsamling for den nye metode og for den traditionelle metode kommer ved de prøveudtag, hvor stigningen i nedbrydningen viser sig. Det ses især for MCPA nedbrydningen, hvor den forskel, der er på $^{14}\text{CO}_2$ opsamlingen fra dag 7 til 14 for den traditionelle metode og fra dag 14 til 21 for den nye metode, er den samme forskel, der ses for den samlede nedbrydning af stoffet efter 9 uger. For Na-acetat i bakteriesuspension er der ikke nær så stort et spring mellem $^{14}\text{CO}_2$ opsamlingen for de to metoder, som ses for MCPA. Dette hænger sammen

med, at der blev udtaget prøver i et tættere interval. Når der alligevel fremkommer en forskel på 20 procent i mineraliseringsgraden mellem den nye og gamle metode, kan det skyldes, at der har været en meget stor generel CO₂ udvikling på grund af nedbrydning af organisk stof fra jorden, som er blevet tilgængeligt for mikroorganismene efter fremstillingen af bakteriesuspensionen. Dette bekræftes af, at Na-acetat nedbrydning i jordprøver ikke har samme forskel mellem de to ¹⁴CO₂ opsamlingsmetoder, her ligger kurverne nærmest limet op af hinanden.

Den umiddelbare løsning på kapacitetsproblemet med den generelle CO₂ opsamling for den nye metode vil være at forøge antallet af prøveudtagninger i den periode, hvor der forventes en stor mineralisering. Dette vil indebære en større risiko for tab af ¹⁴CO₂, idet prøverne skal åbnes oftere. Modsat vil det dog betyde en større sikkerhed for, hvordan mineraliseringen forløber i den periode, hvor der virkelig sker en stor mineralisering. Rent tidsmæssigt vil ekstra prøveudtagninger for den nye metode naturligvis ikke være at foretrække. Men da metoden i forvejen er omkring tre gange så hurtig som den traditionelle metode, når der skal udtages prøver, er det måske en acceptabel idé, hvis det samtidigt betyder større sikkerhed for mineraliseringsforløbet. Alternativt skal der laves yderligere optimering i forhold til at opnå en større opsamlingskapacitet for den nye metode.

Mineraliseringsresultaterne fra dette forsøg stemmer med, hvad der i øvrigt findes i litteraturen. Glyphosat nedbrydes co-metabolsk, idet mikroorganismene ikke kan udnytte stoffet til direkte vækst /7/, mens MCPA nedbrydes metabolsk og giver anledning til det vækst relaterede kurveforløb, som fremgår af figur 2. Mineraliseringsgraden af MCPA i dette forsøg stemmer overens med de resultater Helweg /8/ opnåede i et forsøg under lignende forsøgsbetingelser. Det samme er gældende for nedbrydningen af glyphosat /9;10;11/.

5. UNDERSØGELSE AF VARIATION PÅ CYCLONE™ SCANNER OG FILM

Instruktionsbogen for Cyclone™ scanneren oplyser, at der skal forventes en variation på op til 5 procent for måling med teknikken /4/. Mange målinger med teknikken tydede dog på, at variationen var større. For at undersøge variationen på Cyclone™ teknikken både for selve scanneren, men også for den enkelte film, blev følgende forsøg sat op. Ti låg med GFC rondeller blev fugtet med 75 µl 0,2 M Ca(OH)₂ før tilførsel af 100 µl NaH¹⁴CO₃. Lågene blev tørret ved 35 grader i 1 time før eksponering mod Cyclone™ filmen i 24 timer. Eksponeringen blev foretaget tre gange med samme film, hvor lågene mellem hver eksponering skiftede plads i lågholderen for at undgå, at variation i start tildelingen af radioaktivt stof til hvert låg fik betydning for resultatet. Herudover blev en af eksponeringerne gentaget med den ændring, at Cyclone™ filmen blev placeret omvendt vej på karrusellen ved fremkaldelsen i Cyclone™ scanneren. Resultaterne fremgår af skema 1 og 2, hvor A, B, C, D refererer til række nummeret i lågholderen og tallene fra 1 til 8 refererer til kolonne nummeret.

Skema 1. Forholdstal for måling på prøver med standardbehandling (100 µl NaH¹⁴CO₃ på 75 µl Ca(OH)₂) normaliseret i forhold til middelværdi. Tre eksponeringer mod samme Cyclone™ film. Lågene har skiftet plads i lågholderen mellem hver eksponering. A, B, C, D refererer til rækken i lågholderen mens tallene fra 1 til 8 refererer til kolonnen i lågholderen.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,96						1,08	
B	0,99		0,92		1,01	1,05		
C								1,05
D	0,94	0,97				1,04		

Skema 2. Forholdstal for måling på prøver med standardbehandling (100 µl NaH¹⁴CO₃ på 75 µl Ca(OH)₂) normaliseret i forhold til middelværdi. Cyclone™ film placeret ”rigtig” og ”omvendt” vej ved fremkaldelse i Cyclone™ scanneren. A, B, C, D refererer til rækken i lågholderen mens tallene fra 1 til 8 refererer til kolonnen i lågholderen.

Rigtige vej	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,92						1,10	
B	0,90		0,94		0,97	1,09		
C								1,10
D	0,91	0,98				1,08		
Omvendt vej	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,98						1,00	
B	1,00		1,02		0,94	1,04		
C								1,01
D	0,94	1,07				1,01		

Resultaterne af skema 1 viser, at variationen for teknikken er på op til 8 procent i forhold til den samlede middelværdi. Den fundne variation er en smule større end den forventede. Variationen er systematisk fordelt over måleområdet. Den ene ende af Cyclone™ filmen giver generelt for høje udslag i forhold til den anden ende. Skema 2 viser de normaliserede resultater for én eksponering, hvor filmen er fremkaldt både den ”rigtige” og den ”omvendte” vej i scanneren. Det ses, at fremkaldelse den ”omvendte” vej nærmest neutraliserer den systematiske variation, der ses ved fremkaldelse den ”rigtige” vej. Dette tyder på, at der er en systematisk variation for både film og scanner. Disse variationer forstærker hinanden, når filmen fremkaldes den ”rigtige” vej, mens de ophæves, når filmen placeres den ”omvendte” vej på karrusellen.

I dette projekt er variationen på Cyclone™ filmen kun undersøgt for én film. I forhold til troværdigheden af Cyclone™ teknikken og resultaterne fra den nye metode til ¹⁴CO₂ opsamling er det væsentligt at disse forhold undersøges nærmere.

Perspektiverne for den nye metode til ¹⁴CO₂ opsamling ligger især indenfor screening af miljøfremmede stoffers nedbrydelighed. Typisk vil det være sådan at et stof, der nedbrydes i

en screeningstest også nedbrydes i andre forsøg /12/, hvorfor det vil være relevant at benytte metoden i godkendelses øjemed. Men også indenfor data indsamling til simuleringsmodeller er det relevant at have en metode, der hurtigt og let kan give gode resultater for nedbrydningen af et givent stof. Sådanne simuleringsmodeller kunne tænkes anvendt i forbindelse med amternes udpegning af pesticidfølsomme områder, SFL-områderne.

6. LITTERATUR

- /1/ Bostwick, J.R. og Le, W.D., 1991. A Tyrosine Hydroxylase Assay in Microwells Using Coupled Nonenzymatic Decarboxylation of Dopa. *Anal. Biochem.*, 192; 125-130
- /2/ Pfaender, F.K. og Bartholomew, G.W., 1982. Measurement of Aquatic Biodegradation Rates by Determining Heterotrophic Uptake of Radiolabeled Pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 (1); 159-164
- /3/ Gomme, J., 1997. Isotopteknik 1. Radioaktive isotoper og ioniserende stråling i biologi og medicin. G.E.C Gads Forlag, København
- /4/ Packard, 1997. Cyclone™ Storage Phosphor System. Operation Manual. Packard Instrument Company, Meriden, U.S.A.
- /5/ Tian, L., 1998. Two Quantitative Methods for Imaging Samples in Molecular Biology. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36 (8); 589-591
- /6/ Helweg, A., 1983. Mikrobiologisk nedbrydning og effekt af maleinhydrazid, carbendazim og 2-aminobenzimidazol i jord. Doktor afhandling, Den kongelige veterinær og landbohøjskole, København
- /7/ Sprankle, P., Meggitt, W.F. og Penner, D., 1975. Adsorption, Mobility and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil. *Weed Science*, 23 (3); 229-234
- /8/ Helweg, A., 1987. Degradation and adsorption of ¹⁴C-MCPA in soil – influence of concentration, temperature and moisture content on degradation. *Weed Research*, 27; 287-296
- /9/ Nielsen, M.B., 1998. Mikrobiel nedbrydning og adsorption af glyphosat i jord. Master thesis, KVL, Frederiksberg, Danmark
- /10/ Smith, A.E. og Aubin, A.J., 1993. Degradation of ¹⁴C-Glyphosate in Saskatchewan Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50; 499-505
- /11/ Moshier, L.J. og Penner, D., 1978. Factors Influencing Microbial Degradation of ¹⁴C-glyphosate to ¹⁴CO₂ in Soil. *Weed Science*, 26 (6); 686-691
- /12/ Blok, J., 1979: A repetitive die-away test combining several biodegradability test procedures. *Int. Biodeterior. Bull.*, 15 (2); 57-63