



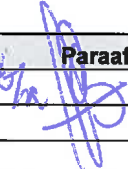
**Onderzoek afbraak
bestrijdingsmiddelen in het
laboratorium**

Alette Langenhoff

1202141-002

Titel
Onderzoek afbraak bestrijdingsmiddelen in het laboratorium

Project 1202141-002 **Kenmerk** 1202141-002-ZWS-0001

Versie	Datum	Auteur	Paraaf	Review	Paraaf	Goedkeuring	Paraaf
	dec. 2010	Alette Langenhoff		Jasperien de Weert		Harm Duel	

Inhoud

1 Inleiding	1
2 Selectie bestrijdingsmiddelen	2
3 Opzetten chemische analyses	3
4 Batchexperimenten naar de afbreekbaarheid van de geselecteerde bestrijdingsmiddelen	4
4.1 Materiaal en methoden	4
4.2 Resultaten en discussie batchexperimenten	5
5 Conclusies	8
6 Referentie	9
 Bijlage(n)	
A Details gebruikte bestrijdingsmiddelen	A-1
B Uitgevoerde extracties	B-1
C Overzicht van ingezette condities	C-1
D Overzicht van de gebruikte Media	D-1

1 Inleiding

Een van de nieuwe bodemthema's is het vóórkomen van bestrijdingsmiddelen en hun mogelijke afbraak. Bestrijdingsmiddelen zijn een potentiële bron voor diffuse grondwater- en oppervlaktewaterverontreiniging, wellicht boven de normen van de Kader Richtlijn Water (KRW).

Dit onderzoek is uitgevoerd als onderdeel van het SO project "Microverontreinigingen". Het doel van dit onderzoek is een eerste screening om uit te zoeken of geselecteerde bestrijdingsmiddelen afbreekbaar zijn onder verschillende redoxcondities of dat ze eventueel een risico kunnen vormen voor de doelstellingen van de Kader Richtlijn Water (KRW) omdat ze persistent zijn.

Voordat bestrijdingsmiddelen worden toegelaten door het College voor de Toelating van Gewasbeschermingsmiddelen en Biociden (Ctgb) ondergaan ze een uitgebreide screening. Een onderdeel hierbij is de aërobe afbreekbaarheid. Alle toegelaten stoffen zijn hierop getest en zijn gekwalificeerd als aëroob afbreekbaar.

Het uitgevoerde onderzoek bestond uit de volgende onderdelen:

Selectie van de te onderzoeken bestrijdingsmiddelen op basis van prioriteit binnen de KRW en het vóórkomen in Nederlands grond- en oppervlaktewater

Opzetten van de chemische analyses naar deze bestrijdingsmiddelen, zo mogelijk in samenwerking met het Utrechtse TNO lab.

Batchexperimenten in het lab naar de afbreekbaarheid van de geselecteerde stoffen onder verschillende redoxcondities. Hiermee willen we tot een uitspraak komen of de geselecteerde bestrijdingsmiddelen eventueel een risico kunnen vormen voor de doelstellingen van de KRW.

De resultaten van de batches moeten antwoord geven op de volgende vragen:

Is er van nature afbrekende activiteit aanwezig in het gebruikte sediment en is deze afbraak aantoonbaar in batchexperimenten.

Is de afbraakactiviteit te stimuleren door toevoegingen van een elektronen donor?

Is de afbraakactiviteit afhankelijk van deze toegevoegde elektronen donor?

2 Selectie bestrijdingsmiddelen

In een studie uit 2007¹ zijn in meerdere grond- en oppervlaktewatermonsters verspreid over Nederland de concentraties van meer dan 200 bestrijdingsmiddelen geanalyseerd. De oppervlaktewatermonsters lagen zowel in regionaal water als in rijkswateren.

Op basis van deze resultaten hebben we in dit onderzoek bestrijdingsmiddelen geselecteerd die in de hoogste concentratie voorkomen en/of het meest worden aangetroffen en relevant zijn voor de KRW, zie tabel 1.

Tabel 1 Geselecteerde bestrijdingsmiddelen

glyfosaat	
AMPA	
MCPA	
MCCP	(mecoprop)
DEET	(N,N-Diethyl-3-methylbenzamide)
BAM	(2,6-dichloorbenzamide)
diuron	
penconazol	
bentazon	
atrazine	
simazine	

Nadere details van deze bestrijdingsmiddelen staan weergegeven in bijlage A.

Van de geselecteerde bestrijdingsmiddelen kan het zijn dat de toelating inmiddels is ingetrokken, maar dat ze nog wel in het water worden aangetroffen als gevolg van een "na-ijl effect", bv. door nalevering vanuit de bodem, instroming vanuit het buitenland of illegaal gebruik.

¹ Vertrouwelijk onderzoek TNO Bouw en Ondergrond, Afdeling Milieuanalyse

3 Opzetten chemische analyses

De chemische analyses zijn uitgevoerd in samenwerking met TNO Bouw en Ondergrond in Utrecht, afdeling Milieuanalyse. Zij hebben ervaring en apparatuur voor deze analyses. De benodigde voorbereiding (bemonstering vanuit de batches en benodigde extracties) zijn door onszelf (BGS) uitgevoerd, zie bijlage B. Voor de analyses op glyfosaat en AMPA was geen voorbereiding nodig en zijn de analyses direct op de watermonsters uitgevoerd.

De analyses zijn vervolgens uitgevoerd mbv GC-MS, LC-MS of LC-Fluorescentie analyses, zie tabel 2

Tabel 2 Overzicht van de analyses en bijbehorende detectielimieten

Verbinding	Analyse	Detectielimiet
glyfosaat	LC-Fluorescentie	0,5 µg/l
AMPA	LC-Fluorescentie	0,5 µg/l
MCPA	GC-MS	1,0 µg/l
MCPP (mecoprop)	GC-MS	1,0 µg/l
DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide)	GC-MS	1,0 µg/l
BAM (2,6-dichloorbenzamide)	GC-MS	1,0 µg/l
diuron	LC-MS	5,0 µg/l
penconazol	LC-MS	5,0 µg/l
bentazon	GC-MS	1,0 µg/l
atrazine	GC-MS	1,0 µg/l
simazine	GC-MS	1,0 µg/l

Verdere details over de analyses staan omschreven in het TNO rapport "Bepaling van de afbraak diverse bestrijdingsmiddelen" (Beeltje, 2010).

4 Batchexperimenten naar de afbreekbaarheid van de geselecteerde bestrijdingsmiddelen

De geteste bestrijdingsmiddelen zijn bestrijdingsmiddelen waarvan het gebruik in Nederland is of ooit was toegestaan. De toegelaten stoffen zijn hiervoor eerder voor de Nederlandse wetgeving uitgebreid getest op o.a. hun afbreekbaarheid en zijn gekwalificeerd als aëroob afbreekbaar.

In dit onderzoek is gekeken naar de aerobe afbreekbaarheid van deze stoffen en is daarnaast ook de anaerobe afbraak getest. Bij het gebruik van bestrijdingsmiddelen in bijvoorbeeld de landbouw zullen een deel van deze stoffen eerst in het anaerobe grondwater terechtkomen, voordat ze in het aerobe oppervlaktewater terecht komen. Daarom kan het relevant zijn om ook inzicht te hebben in de anaerobe afbreekbaarheid van deze bestrijdingsmiddelen.

Een selectie van 11 bestrijdingsmiddelen is getest op de volgende condities (zie ook bijlage C):

Aërobe afbraak in aëroob medium en in aanwezigheid van voldoende zuurstof (serie 1).

Oxidatieve anaërobe afbraak, met nitraat-reducerend medium met nitraat als elektronen acceptor (denitrificerende condities, serie 2).

Reductieve anaërobe afbraak in methanogeen medium geschikt voor dechlorerende bacteriën met extra entmateriaal (waar dechlorerende bacteriën in aanwezig zijn) en elektronendonor (acetaat), voor stimulering reductieve omzetting (serie 3).

Steriele aerobe condities om het onderscheid te kunnen maken tussen biologische omzetting en andere niet-biologische processen (serie 4).

De afbreekbaarheid van de geselecteerde bestrijdingsmiddelen zijn getest onder gecontroleerde condities in het laboratorium.

4.1 Materiaal en methoden

De batches zijn uitgevoerd in 250 ml serumflesjes met daarin 90 ml van de een van de bovengenoemde genoemde media. Vervolgens is 5 gram sediment toegevoegd uit een helofytenfilter / moeras dat onderdeel uitmaakt van een Waterzuiveringsinstallatie (WZI). Dit sediment is gekozen als entmateriaal omdat in dit sediment een aantal van de bestrijdingsmiddelen kunnen voorkomen. De aanwezige micro-organismen kunnen zich daardoor al hebben aangepast aan de aanwezigheid van deze verbindingen en zijn mogelijk ook in staat om ze af te breken. Daarnaast is aan de reductieve anaerobe batches 4 mM acetaat en een extra ent van dechlorerende bacteriën toegevoegd.

De anaerobe batches (serie 2 en 3) zijn ingezet in een anaërobe kast, afgesloten met een viton stop en vervolgens is buiten de kast de gasfase gewisseld naar N₂/CO₂. De samenstelling van de gebruikte media voor de verschillende aërobe en anaërobe condities staan in bijlage D.

De steriele batches zijn geautoclaveerd gedurende 20 min. en vervolgens is HgCl₂ toegevoegd in een eindconcentratie van 0,05 g/L.

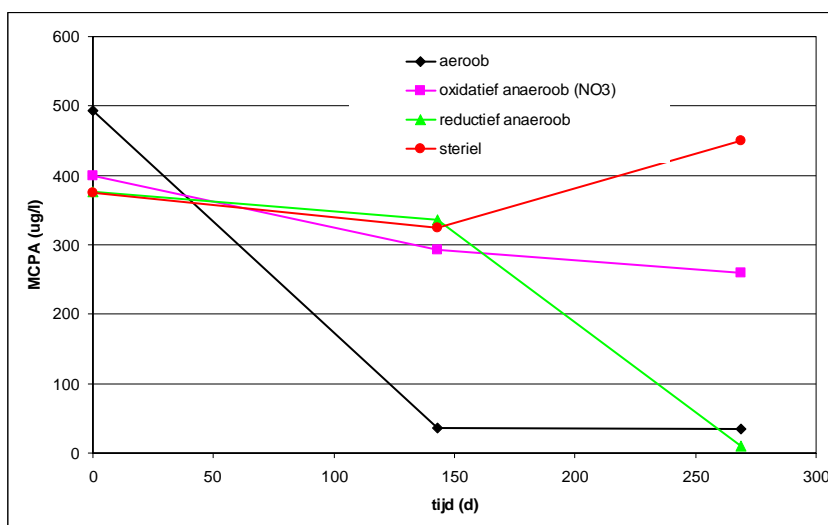
De bestrijdingsmiddelen zijn aan de batches toegevoegd in een eindconcentratie van 1 mg/L. Hiervoor is per bestrijdingsmiddel eerst een stockoplossing gemaakt van 5 g/L in aceton (high

purity grade) en is 20 µl vanuit de aceton oplossing aan de batches toegevoegd volgens het schema in bijlage C. Om de aceton uit de batches te verwijderen, zijn de batches vervolgens 5 min. geflusht met N₂/CO₂ (in- en uitgaande naald) om de aceton te verdampen.

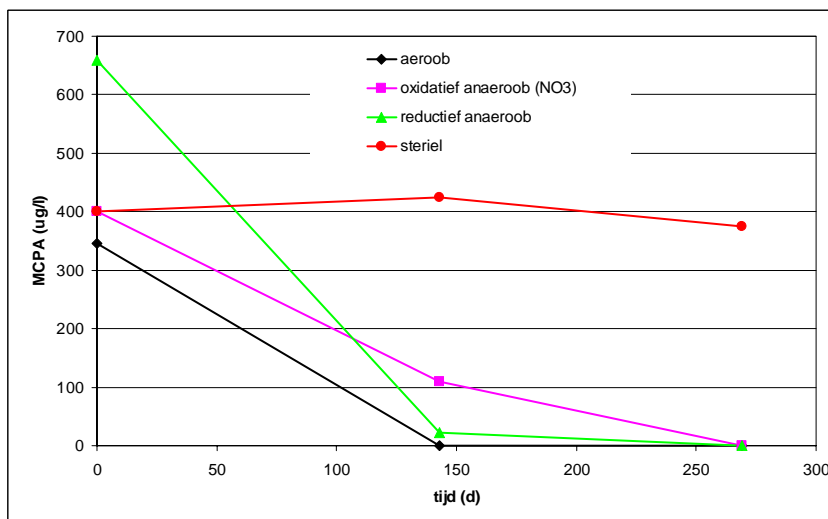
De batches zijn horizontaal schuddend geïncubeerd (100 rpm) bij 20°C en gedurende de incubatie zijn monsters opgenomen op t=0, 4 en 9 maanden geanalyseerd.

4.2 Resultaten en discussie batchexperimenten

De batches zijn gedurende 9 maanden gevolgd en de resultaten van de afbraak van MCPA en atrazine staan weergegeven in de onderstaande figuren.



Figuur 1 Concentratieprofiel van MCPA in de tijd in de verschillende batches.



Figuur 2 Concentratieprofiel van atrazine in de tijd in de verschillende batches.

Een overzicht van de resultaten staat weergegeven in tabel 3.

Tabel 3 Overzicht van de afbreekbaarheid van de geteste bestrijdingsmiddelen

Bestrijdingsmiddel (alternatieve naam)	Aeroob	Anaeroob	
		Oxidatief (NO ₃)	Reductief
atrazine	+	+	+
simazine	+	+	+
glyfosaat (round up)	?	?	?
AMPA	?	?	?
MCPA	+	-	+
MCPP (mecoprop)	-	-	-
DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide)	-	-	-
BAM (2,6-dichloorbenzamide)	-	-	-
diuron	?	?	?
penconazol	-	-	-
bentazon	-	-	-

+ = afbraak aangetoond

- = geen afbraak aangetoond

? = geen eenduidige conclusie te trekken

Uit de figuren en de tabel volgt dat er in de batches slechts onder een paar condities afbraak is aangetroffen, namelijk de afbraak van atrazine en simazine onder alle drie de uitgeteste condities en de afbraak van MCPA onder aerobe en reductieve condities.

Atrazine is een van de meest bestudeerde pesticiden en geeft in de literatuur een veelvoud van studies die elkaar bevestigen, maar ook tegenspreken. De afbraak onder aërobe condities is regelmatig aangetoond, onder anaërobe condities verloopt de afbraak een stuk langzamer of helemaal niet, zie hiervoor het reviewartikel van Pedersen (2000). In onze experimenten is niet te zeggen of de aërobe afbraak sneller loopt dan de anaërobe afbraak. Na 4 maanden incubatie onder aërobe en anaërobe condities was het toegevoegde atrazine op, maar in beide batches kan dit ook al binnen een paar weken zijn gebeurd.

Uit andere studies blijkt dat glyfosaat aëroob goed afbreekbaar is en via AMPA wordt omgezet. Er zijn weinig bacteriën bekend die daadwerkelijk groeien op glyfosaat, maar ze gebruiken de verbinding als fosfor-bron (Shushkova et al, 2009). In onze batches konden we de afbraak niet aantonen, vooral omdat op het moment van bemonstering op t=0 geen glyfosaat of AMPA meer in de batch aanwezig was. Ditzelfde verschijnsel is waargenomen in de steriele batches, zodat niet aan te tonen is dat de verdwijning het gevolg is van afbraak. Het is bekend dat zowel glyfosaat en AMPA sterk adsorberen aan sedimentdeeltjes (Schuette, 1998). Over het algemeen wordt aangenomen dat de afbraak van AMPA langzamer verloopt dan de afbraak van glyfosaat.

Net als glyfosaat en AMPA was het toegevoegde diuron op t=0 (een dag na toevoeging) niet meer aantoonbaar in onze batches. Na 4 maanden incubatie is diuron opnieuw toegevoegd, waarna de concentratie gelijk bleef en geen afbraak meer kon worden aangetoond. Uit de literatuur is echter bekend dat diuron zowel aëroob als anaëroob afbreekbaar is (Dellamatrice and Rosim Monteiro, 2004). Dit hebben wij in onze batches helaas niet aan kunnen tonen

Mecoprop bestaat uit 2 enantiomeren die allebei aëroob afbreekbaar zijn (Zipper et al, 1996; Rodriguez-Cruza et al, 2010). Dit hebben we niet kunnen aantonen, evenmin als mogelijke anaërobe afbraak van deze verbinding.

Over de afbraak van DEET is weinig bekend, maar er is afbraak van DEET aangetoond door de bacterie *Pseudomonas putida* DTB die DEET als koolstof- en energiebron gebruikt (Rivera-Cancel et al, 2007). De afbraak van DEET is in onze experimenten onder geen van de geteste condities aangetoond.

BAM zelf is geen bestrijdingsmiddel, maar is een intermediair dat wordt gevormd bij de omzetting van 2,6-dichlorobenzonitriël (dichlobenil). In onze experimenten konden we geen afbraak hiervan aantonen, terwijl in de literatuur studies bekend zijn waarbij in verschillende bodemonmonsters BAM afbraak is aangetoond (Simonsen et al, 2006).

Over de afbraak van penconazol is weinig bekend in de literatuur, behalve dat het erg sterk adsorbeert aan de bodem en niet beschikbaar is (EFSA, 2008). In onze experimenten is geen afbraak aangetoond.

Bentazon wordt vaak in combinatie met atrazine als bestrijdingsmiddel gebruikt en is volgens de literatuur aëroob afbreekbaar (Li et al, 2008). In onze experimenten is dit echter niet aangetoond.

Doordat de resultaten van onze experimenten nogal variëren van de literatuurgegevens is het lastig om eenduidige conclusies te trekken. Het lijkt alsof de meeste geteste bestrijdingsmiddelen niet onder anaërobe condities afbreekbaar zijn. In de literatuur is hier ook weinig over bekend, en dit is in lijn met de resultaten van onze experimenten. Echter, de aërobe experimenten laten ook in veel gevallen geen afbraak zien, wat niet in lijn is met literatuurgegevens en het feit dat deze middelen zijn toegelaten volgens de Ctgb. Zuurstof is niet gemeten in onze batches, maar er was een grote headspace in de batches aanwezig, en 10 ml zuurstof is een aantal keren toegevoegd.

Er lijkt van nature afbrekende activiteit voor bestrijdingsmiddelen in het gebruikte sediment aanwezig te zijn en deze is aantoonbaar in een aantal batchexperimenten. De afbraak is te stimuleren door toevoeging van zuurstof, maar is bij bv. atrazine ook mogelijk door toevoeging van een elektronendonor om de oxidatieve afbraak mbv nitraat, of reductieve dechlorering te stimuleren. Bij MCPA is reductieve afbraak mogelijk door de toevoeging van een elektronen donor.

5 Conclusies

Elf bestrijdingsmiddelen zijn geselecteerd omdat zij in hoge concentraties voorkomen en/of het meest worden aangetroffen in Nederlandse wateren en relevant zijn voor de Kaderrichtlijn water. Dit zijn glyfosaat, AMPA, MCPA, MCCP, DEET, BAM, diuron, penconazol, bentazon, atrazine en simazine.

De chemische analyses vanuit de batches zijn opgezet en uitgevoerd in samenwerking met het TNO Bouw en Ondergrond in Utrecht, afdeling Milieuanalyse.

In de batchexperimenten is de afbraak aangetoond van atrazine en simazine onder aërobe condities en onder anaërobe condities in aanwezigheid van nitraat (oxidatieve afbraak) of een elektronendonor (reductieve afbraak). De afbraak van MCPA is aangetoond onder zowel aërobe en reductieve condities. Ook glyfosaat en AMPA lijken te zijn afgebroken in de batches onder alle geteste condities, maar vanwege een slechte t=0 analyse is dit niet met zekerheid te concluderen.

Van de andere bestrijdingsmiddelen hebben we geen afbraak kunnen aantonen, terwijl dit uit de literatuur met name onder aërobe condities wel bekend is.

Er is van nature afbrekende activiteit voor bestrijdingsmiddelen in het gebruikte sediment aanwezig en deze is aantoonbaar in een aantal batchexperimenten. De afbraak is te stimuleren door toevoeging van zuurstof, maar is bij bv. atrazine ook mogelijk door toevoeging van elektronen donor om de oxidatieve afbraak met nitraat of reductieve dechlorering te stimuleren. Bij MCPA is reductieve afbraak mogelijk door de toevoeging van een elektronen donor.

De eerder gestelde vragen voor de batchexperimenten zijn hierdoor slechts gedeeltelijk beantwoord. Het verschil in met name de aerobe afbraak in onze batches en de literatuurgegevens tonen aan dat de bestrijdingsmiddelen afbrekende bacteriën niet overal in de natuur aanwezig zullen zijn. Dit is van belang voor het gebruik en de toepassing van bestrijdingsmiddelen en de veronderstelling dat ze in de natuur wel zullen worden omgezet in minder schadelijke tussen- of eindproducten.

6 Referentie

Beeltje, H. 2010, Bepaling van de afbraak diverse bestrijdingsmiddelen, TNO rapport TR 2010/80, 8 p.

Dellamatrice, PM and RT Rosim Monteiro, 2004, Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 999-1003.

EFSA, 2008, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penconazole. In: EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Report, 175, 1-104.

Li, KB, JT Cheng, XF Wang, Y Zhou and WP Liu, 2008, Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils, *Pedosphere*, 18: 265-272.

Pedersen, PG, 2000, Pesticide degradability in groundwater: Importance of redox conditions, PhD-thesis Department of Environmental Science and Engineering, Technical University of Denmark.

Rivera-Cancel, G, D Bocioaga and AG Hay, 2007, Bacterial degradation of N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET): Cloning and heterologous expression of DEET hydrolase. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3105–3108.

Schuette, J., 1998, Environmental fate of glyphosate. *Environmental Monitoring & Pest Management*, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, 13 p.

Shushkova, TV, GK Vasilieva, IT Ermakova and AA Leontievsky, 2009, Sorption and microbial degradation of glyphosate in soil suspensions, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45: 599-603.

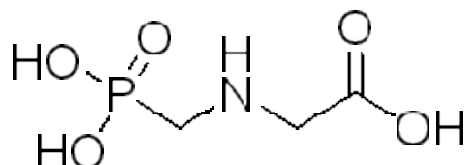
Simonsen, A, MS Holtze, SR Sørensen, SJ Sørensen and J Aamand, 2006, Mineralisation of 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in dichlobenil-exposed soils and isolation of a BAM-mineralising *Aminobacter* sp., *Environmental Pollution*, 144: 289-295.

Rodríguez-Cruza, MS, J. Bælumb, LJ Shawc, SR Sørensen, S Shia, T Aspraya, CS Jacobsen, and GD Bendinga, 2010, Biodegradation of the herbicide mecoprop-p with soil depth and its relationship with class III tfdA gene, *Soil Biology and Biochemistry* 42, 32-39.

Zipper, C, K Nickel, W Angst and HPE Kohler, 1996, Complete microbial degradation of both enantiomers of the chiral herbicide Mecoprop in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 4318-4327.

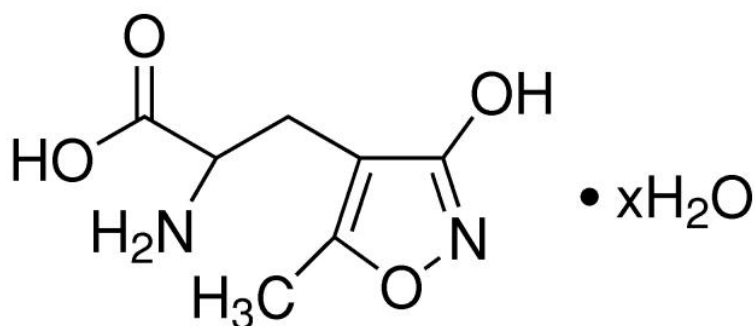
A Details gebruikte bestrijdingsmiddelen

Glyphosaat N-(Phosphonomethyl)glycine



CAS Number	1071-83-6
Linear Formula	(HO) ₂ P(O)CH ₂ NHCH ₂ CO ₂ H
Molecular Weight	169,07
Beilstein Registry Number	2045054
EC Number	213-997-4
MDL number	MFCD00055350
PubChem Substance ID	24869040

AMPA (±)-α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid hydrate

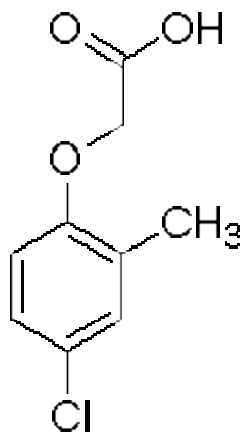


CAS Number	74341-63-2
Linear Formula	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₄
Molecular Weight	186,17
MDL number	MFCD00213388
PubChem Substance ID	24891141

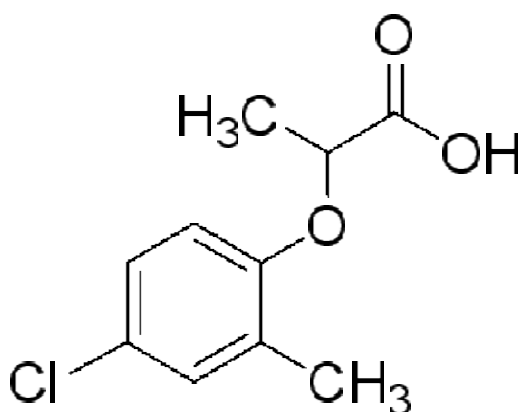
Form solid

Color white

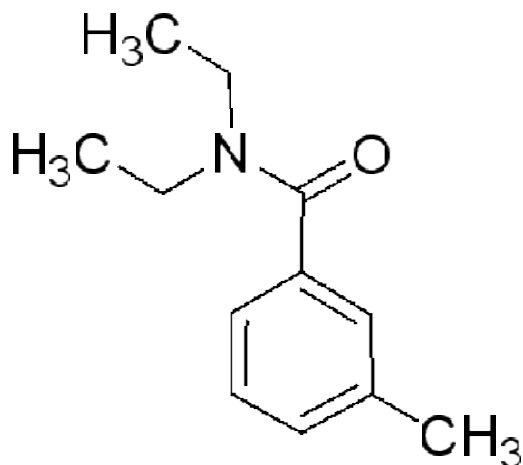
Solubility	H ₂ O	1 mg/mL warm
	0,1 M HCl	3,5 mg/mL
	0,1 M NaOH	4,3 mg/mL
	DMSO	4,3 mg/mL
	1 M HCl	50 mg/mL

MCPA **4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid or 4-Chloro-o-tolyloxyacetic acid**

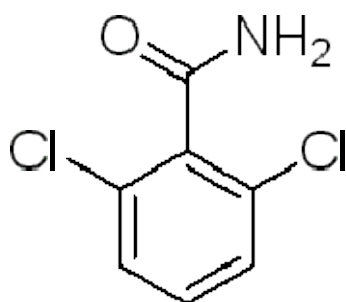
CAS Number	94-74-6
Linear Formula	$C_8H_7ClO_2$
Molecular Weight	200,62
Beilstein Registry Number	2051752
EC Number	202-360-6
MDL number	MFCD00004306
PubChem Substance ID	24868579

MCPP, Mecoprop **2-(4-Chloro-2-methylphenoxy)propionic acid**

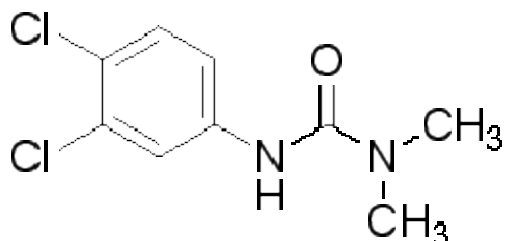
CAS Number	7085-19-0
Linear Formula	$C_{10}H_{11}ClO_3$
Molecular Weight	214,65
Beilstein Registry Number	6568283
EC Number	202-264-4
MDL number	MFCD00002648
PubChem Substance ID	24862227

DEET **N,N-Diethyl-m-toluamide of N,N-Diethyl-m-methylbenzamide**

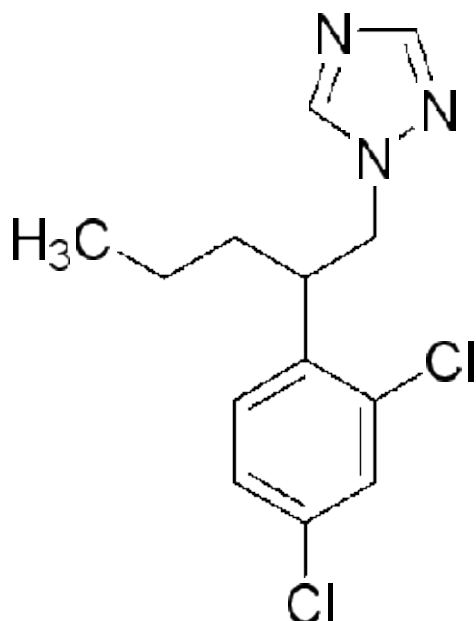
CAS Number	134-62-3
Linear Formula	C ₁₂ H ₁₇ NO
Molecular Weight	191,27
Beilstein Registry Number	2046711
EC Number	205-149-7
MDL number	MFCD00009046
PubChem Substance ID	24867898

BAM (Dichlorobenzamide)

CAS Number	2447-79-2
Linear Formula	Cl ₂ C ₆ H ₃ CONH ₂
Molecular Weight	190,03
EC Number	219-505-4
MDL number	MFCD00007974
Melting point	191-194 °C

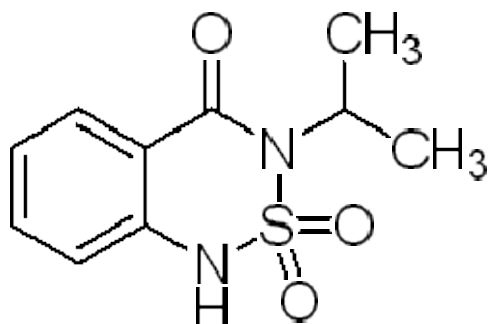
Diuron 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

CAS Number	330-54-1
Linear Formula	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O
Molecular Weight	233,09
Beilstein Registry Number	2215168
EC Number	206-354-4
MDL number	MFCD00018136
PubChem Substance ID	24893687

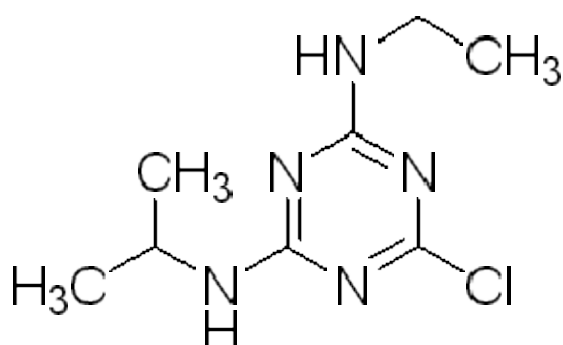
Penconazol

CAS Number	66246-88-6
Linear Formula	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃
Molecular Weight	284,18
Beilstein Registry Number	541488
EC Number	266-275-6

MDL number MFCD00078737
 PubChem Substance ID 24862275

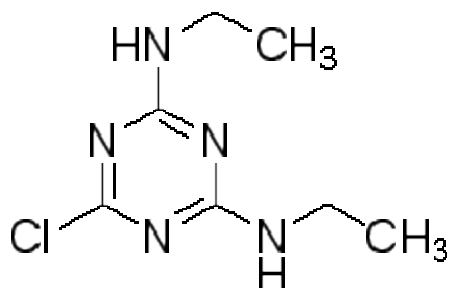
Bentazon

CAS Number 25057-89-0
 Linear Formula $C_{10}H_{12}N_2O_3S$
 Molecular Weight 240,28
 Beilstein Registry Number 530220
 EC Number 246-585-8
 MDL number MFCD00078640
 PubChem Substance ID 24868805

Atrazine 2-Chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine

CAS Number 1912-24-9
 Linear Formula $C_8H_{14}ClN_5$
 Molecular Weight 215,68
 Beilstein Registry Number 612020
 EC Number 217-617-8
 MDL number MFCD00041810
 PubChem Substance ID 24868787

Simazine 2,4-Bis(ethylamino)-6-chloro-1,3,5-triazine



CAS Number	122-34-9
Linear Formula	C ⁷ H ¹² ClN ⁵
Molecular Weight	201,66
Beilstein Registry Number	10895
EC Number	204-535-2
MDL number	MFCD00023174
PubChem Substance ID	24869206

B Uitgevoerde extracties

Extractiemethode voor de analyses van de geselecteerde bestrijdingsmiddelen.

Stap 1

10 ml water of slurrymonster extraheren met 2x5 ml dichloormethaan.

Water en dichloormethaanfractie scheiden

Waterfractie (10 ml) op pH 3 brengen met zwavelzuur.

Waterfractie nogmaals extraheren met 2x5 ml dichloormethaan.

Beide dichloormethaan fracties combineren en drogen met natriumsulfaat.

Concentreren dmv indampen met N₂-gas tot circa 0,9 ml.

Extract direct gebruiken voor stap 2 of in de vriezer bewaren (nu langer houdbaar)

Stap 2

Extract van stap 1 tot 1 ml aanvullen met dichloormethaan en verdelen over twee puntbuisjes voor GC-MS- en LC-MS- analyses .

Analyses op GC-MS:

Extract wordt eerst gederivatiseerd: 500 µl monster goed mengen met 2 ml diazom en 15 min laten staan. Oplossing moet geel blijven anders meer diazom toevoegen.

Indampen tot 500 µl .

Toevoegen van analysestandaard, 10 µl TCN oplossing (9,88 mg/l 1,2,3-tetrachloornaftaleen in hexaan).

Overbrengen naar GC-MS vials.

Analyses op LC-MS:

Aan 500 µl monster 2 ml acetonitril toevoegen en goed mengen

Indampen tot 200 µl en 300 µl ammoniumformiaat-oplossing (7mM in MQ) toevoegen.

Zonodig nog aanvullen tot 500 µl met acetonitril.

Overbrengen naar LC-MS vials.

C Overzicht van ingezette condities

conditie	Bestrijdingsmiddel	extra ent	Toevoegingen
aeroob	Glyphosate		
aeroob	AMPA		
aeroob	MCPA		
aeroob	Mecoprop		
aeroob	DEET		
aeroob	Dichlorobenzamide (BAM)		
aeroob	Diuron		
aeroob	Penconazol		
aeroob	Bentazon		
aeroob	Atrazine		
aeroob	Simazin		
aeroob, steriel	Glyphosate		HgCl ₂
aeroob, steriel	AMPA		HgCl ₂
aeroob, steriel	MCPA		HgCl ₂
aeroob, steriel	Mecoprop		HgCl ₂
aeroob, steriel	DEET		HgCl ₂
aeroob, steriel	Dichlorobenzamide (BAM)		HgCl ₂
aeroob, steriel	Diuron		HgCl ₂
aeroob, steriel	Penconazol		HgCl ₂
aeroob, steriel	Bentazon		HgCl ₂
aeroob, steriel	Atrazine		HgCl ₂
aeroob, steriel	Simazin		HgCl ₂
anaeroob	Glyphosate		NO ₃
anaeroob	AMPA		NO ₃
anaeroob	MCPA		NO ₃
anaeroob	Mecoprop		NO ₃
anaeroob	DEET		NO ₃
anaeroob	Dichlorobenzamide (BAM)		NO ₃
anaeroob	Diuron		NO ₃
anaeroob	Penconazol		NO ₃
anaeroob	Bentazon		NO ₃
anaeroob	Atrazine		NO ₃
anaeroob	Simazin		NO ₃
anaeroob	Glyphosate	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	AMPA	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	MCPA	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Mecoprop	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	DEET	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Dichlorobenzamide (BAM)	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Diuron	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Penconazol	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Bentazon	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Atrazine	Brabob PER nr 5	acetaat
anaeroob	Simazin	Brabob PER nr 5	acetaat

D Overzicht van de gebruikte Media

Aerobe medium;

Mineraal medium (MM):

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,07 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/L
Sporenelementoplossing SL10	1,0 ml/L
Vitaminen oplossing	1,0 ml/L
Demiwater	1 liter

Anaeroob medium met nitraat

KH ₂ PO ₄	0,5 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,8 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g/L
NaNO ₃	1,25 g/L
NaHCO ₃	2,5 g/L
Sporenelement oplossing SL4	10 ml
Sporenelement oplossing "+"	1,0 ml/L (wolfram/selenium)
Vitaminen oplossing	1,0 ml/L
Demiwater	1 liter

Anaeroob medium, geschikt voor dechlorerende bacteriën²

Solution A:		
K ₂ HPO ₄	0.653	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0.173	g
Resazurin	0.500	mg
Na-acetate	0.460	g
Distilled water	1000.000	ml
Boil medium, cool to room temperature under 80% N ₂ + 20% CO ₂ gas,		
Solution B:		
NH ₄ HCO ₃	0.443	g
or (NH ₄) ₂ CO ₃	0.270	g
NaHCO ₃	3.730	g
Distilled water	100.000	ml
Flush solution with 80% N ₂ + 20% CO ₂ gas for 20 min, then close bottle.		
Solution C:		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.110	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.102	g
Distilled water	10.000	ml
Flush solution with N ₂ gas for 20 min, then close bottle.		
Solution D:		
Trace element solution SL-10 (see medium 320)		
To 10 ml of SL-10 in a Hungate tube add 5 mg of FeCl ₂ x 4 H ₂ O, 0.1 mg AlCl ₃ , and 5 mg Na ₂ -EDTA.		
Flush solution with N ₂ gas for 20 min, then close tube.		
Solution E:		
Vitamin solution of medium 141 and vitamin solution of medium 503 mixed 9+1 (v/v).		
Flush with N ₂ .		
Solution F:		
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0.300	g
Distilled water	10.000	ml
Autoclave under N ₂ gas atmosphere.		
To complete the medium, add to 90ml medium in 250 ml bottle:		
Solution B	10.000	ml
Solution C	1.00	ml
Solution D	0.10	ml
Solution E	1.00	ml
Solution F	1.00	ml

The pH of the completed medium should be at 7.2.

For *DSM 13726* and *DSM 15941* prepare medium only under 80% N₂ and 20% CO₂ gas mixture and add 2.5 q/l Na-lactate (*DSM 13726*) or 0.5 q/l Na-acetate (*DSM 15941*) from a sterile, anaerobic stock solution prepared under N₂.

² Medium 732; DSMZ, Deutsche Sammlung für Microorganismen (zonder pepton)