

Bekæmpelsesmiddel forskning fra Miljøstyrelsen
Nr. 75 2003

Ferskvandsinvertebraters bevægelsesadfærd som biomarkør for pesticideksponering og -effekt

Ulrik Nørum og Poul Bjerregaard
Syddansk Universitet

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	6
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	8
SUMMARY AND CONCLUSIONS	10
1 INDLEDNING	12
1.1 BAGGRUND OG NUVÆRENDE VIDENGRUNDLAG	12
1.1.1 <i>Pesticider i ferskvandssystemer</i>	12
1.1.2 <i>Fastsættelse af PNEC</i>	12
1.1.3 <i>Drift hos vandløbsinvertebrater</i>	12
1.1.4 <i>Videosporing og adfærdsundersøgelser</i>	13
1.2 FORMÅL	13
2 METODER	14
2.1 FORSØGSDYR: <i>GAMMARUS PULEX</i> OG <i>ASELLUS AQUATICUS</i>	14
2.2 FORSØGSBETINGELSER	15
2.3 PESTICIDVALG	15
2.3.1 <i>Cypermethrin</i>	15
2.3.2 <i>Esfenvalerat</i>	16
2.3.3 <i>Dimethoat</i>	16
2.3.4 <i>Azoxystrobin</i>	17
2.4 VIDEOSPORING	17
2.4.1 <i>Videosporingssystemet (EthoVision Pro)</i>	17
2.4.2 <i>Adfærdsparametre</i>	18
2.4.3 <i>Metodeudvikling og baggrundsadfærd</i>	19
2.4.4 <i>Databehandling</i>	21
2.5 ADFÆRDSTOKSIKOLOGISKE FORSØG	21
2.5.1 <i>Akut adfærdstoksicitet af udvalgte pesticider</i>	21
2.5.2 <i>Relativ følsomhed af juvenile Gammarus pulex</i>	22
2.5.3 <i>Restituering efter esfenvalerat-eksponering</i>	22
2.5.4 <i>Kombinationseksponering</i>	23
2.6 MORTALITETSSTUDIER	23
2.7 PESTICIDKVANTIFICERING	24
2.7.1 <i>Metodebeskrivelse</i>	24
2.7.2 <i>Cypermethrin</i>	25
2.7.3 <i>Esfenvalerat</i>	25
2.7.4 <i>Dimethoat</i>	25
2.7.5 <i>Azoxystrobin</i>	25
2.7.6 <i>Metodevalidering</i>	26
2.7.7 <i>Nominelle koncentrationer</i>	26
2.8 STATISTIK	26
3 RESULTATER	28
3.1 AKUT ADFÆRDSTOKSICITET	28
3.1.1 <i>Cypermethrin</i>	28
3.1.2 <i>Esfenvalerat</i>	36

3.1.3 Dimethoat	40
3.1.4 Azoxystrobin	40
3.2 RELATIV FØLSOMHED AF JUVENILE <i>GAMMARUS PULEX</i>	41
3.3 RESTITUERING EFTER ESFENVALERAT-EKSPONERING	43
3.4 KOMBINATIONSEKSPONERING	45
3.5 MORTALITETSSTUDIER	46
3.5.1 Cypermethrin	46
3.5.2 Esfenvalerat	47
3.5.3 Dimethoat	48
3.6 SAMMENLIGNING AF ADFÆRDSTOKSICITET OG MORTALITET	48
4 DISKUSSION	50
4.1 PESTICIDER OG BEVÆGELSESAADFÆRD I LABORATORIET	50
4.2 PESTICIDER OG DRIFTADFÆRD I FELTEN	52
4.3 MILJØRELEVANS – KOBLING FRA LABORATORIE TIL FELT	53
4.4 METODEEVALUERING OG PERSPEKTIVERING	53
5 REFERENCER	54
Bilag A: Flow-kamre	59
Bilag B: Strømrender	60
Bilag C: Statistiske styrkeberegninger for videosporingssystemet	61

Forord

Nærværende rapport indeholder resultater fra et to-årigt pesticidforskningsprojekt med titlen "Pesticiders effekt på bevægelsesadfærd hos ferskvandstangloppen *Gammarus pulex*". I løbet af projektperioden er forsøg med 4 pesticider blevet udført på ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og vandbænkebidderen *Asellus aquaticus*. Nærværende rapport har derfor fået titlen "Ferskvandsinvertebraters bevægelsesadfærd som biomarkør for pesticideksponering og -effekt. Effekter af cypermethrin, esfenvalerat, dimethoat og azoxystrobin på *Gammarus pulex* og *Asellus aquaticus*". Projektet blev, sammen med tre andre, igangsat i 2001 af Miljøstyrelsens Pesticidkontor inden for indsatsområdet "Vandløb og vandhuller", og er løbende blevet evalueret af en følgegruppe bestående af: Jørn Kirkegaard (formand), Vibeke Møller og Alf Aagaard, Miljøstyrelsen; Ivan Karottki og Gitte Larsen, Skov- og Naturstyrelsen; Peter Wiberg-Larsen, Fyns Amt; Niels-Martin Frost, DuPont Danmark ApS; Poul Henning Petersen, Landbrugets Rådgivningscenter; Jørgen Jakobsen og Niels Henrik Spliid, DJF, Forskningscenter Flakkebjerg; Merete Styczen, Hanne Kaas og Flemming Møhlenberg, DHI - Institut for Vand og Miljø; Nikolai Friberg og Torben L. Lauridsen, Danmarks Miljøundersøgelser; Jens Carl Streibig og Nina Cedergreen Forchhammer, KVL, Institut for Jordbrugsvidenskab; Kirsten Christoffersen, Københavns Universitet, Ferskvandsbiologisk Laboratorium; Valery Forbes og Anders Cold, Roskilde Universitetscenter, Institut for Biologi og Kemi.

Ulrik Nørum og Poul Bjerregaard
Biologisk Institut
Syddansk Universitet
Juli 2003

Sammenfatning og konklusioner

Formål

Driftadfærd hos vandløbsinvertebrater kan induceres ved udsættelse for forholdsvis lave koncentrationer af pesticider. Da forøget drift hos akvatiske invertebrater i rindende vand kan forventes at medføre en nedgang i populationers størrelse, ville det være formålstjenligt, om ændringer i bevægelsesadfærd, der medfører øget drift, kunne undersøges i laboratoriet i stedet for som hidtil kun i mesocosm- eller feltstudier. Formålet med projektet har været at opbygge og anvende et computerstyret videosporingssystem til kvantificering af pesticiders effekt på bevægelsesadfærden hos vandløbsinvertebrater.

Metoder

Bevægelsesadfærden hos ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og vandbænkebideren *Asellus aquaticus* anbragt i petriskåle blev registreret v.hj.a. et state-of-the-art videosporingssystem (EthoVision Pro fra Noldus Information Technology, Holland) under eksponering for pesticider, enkeltvis eller i kombination. For at vurdere den relative følsomhed af det adfærdstoksiske respons blev pesticidernes effekt på dødelighed undersøgt.

Pesticidvalg

Pesticider blev udvalgt til undersøgelse i samråd med Miljøstyrelsens Pesticidkontor bl.a. på baggrund af kriterier for anvendelse i Danmark, biologisk aktivitet og forekomst i overfladevand. Forsøg blev gennemført med pyrethroid-insekticiderne cypermethrin og esfenvalerat, organofosfat-insekticidet dimethoat, samt strobilurin-fungicidet azoxystrobin. For at opnå realistiske koncentration-respons forhold blev metoder til bestemmelse af de reelle koncentrationer af pesticider i eksponeringssystemerne udviklet under anvendelse af væsekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS).

Forsøgsoversigt

Videosporingssystemet blev anvendt til tre typer forsøg, nemlig til kortlægning af dyrenes baggrundsadfærd i ukontamineret vand, til test af pesticiders akutte adfærdstoksicitet og til restitueringstudier, d.v.s. studier af evnen til at komme sig efter en kortvarig pesticideksponering. Undersøgelserne af den akutte adfærdstoksicitet inkluderede effektstudier af cypermethrin, esfenvalerat, dimethoat og azoxystrobin hos voksne *G. pulex*, af cypermethrin hos juvenile *G. pulex*, samt af esfenvalerat hos voksne *A. aquaticus*.

Resultater

De gennemførte videospøringsforsøg med pyrethroiderne cypermethrin og esfenvalerat på såvel voksne *G. pulex* og *A. aquaticus* som juvenile *G. pulex* viser entydigt, at dyrene under eksponering for lave, miljørealistiske pyrethroidkoncentrationer udviser et maksimalt flugtrespons. Denne flugadfærd opretholdes så længe som muligt, indtil den ved højere eksponeringskoncentrationer efterfølges af immobilisering. Immobilisering er tilsyneladende irreversibel; immobiliserede *G. pulex* og *A. aquaticus*, der efter endt eksponering overføres til ukontamineret vand, er efter 24 timer stadig inaktive. *G. pulex* udviste flugadfærd ved lavere pyrethroidkoncentrationer end *A. aquaticus*, mens *A. aquaticus* var mere følsom m.h.t. immobilisering. Der blev ikke fundet nogen markante forskelle i det akutte adfærdsrespons mellem juvenile og voksne *G. pulex*. Dimethoat og azoxystrobin havde, selv ved høje eksponeringskoncentrationer, ingen effekt på bevægelsesadfærd hos *G. pulex*.

Konklusioner

De i projektet anvendte metoder til automatiseret adfærdsregistrering er nu så veletablerede, at videospøringssystemet kan producere resultater, der umiddelbart kan anvendes til at bedømme risikoen for ferskvandsinvertebrater ved spild eller afledning af pesticider til vandløb. Videospøringsystemet er i stand til omkostnings-effektivt at generere adfærdstoksikologiske koncentrations-respons data, og vil bl.a. kunne anvendes som et screeningsværktøj for myndigheder. Med systemet er det muligt at undersøge kombinationseffekter, hvor forsøgsdyr udsættes for pesticidblandinger. Efter en fremtidig metodevalidering i felten, vurderes det anvendte system endvidere potentielt at kunne anvendes i forbindelse med monitoring af vandløb.

Summary and conclusions

Aim

Drift in stream invertebrates is induced upon exposure to comparatively low concentrations of pesticides. Increased drift in aquatic invertebrates in running water may lead to a decline in population size. The present project was initiated to investigate the feasibility of quantifying drift related changes in locomotory behaviour in the laboratory rather than using the current approach employing mesocosm or field studies. The aim of the project was to develop and implement a computer automated video tracking system for quantification of the effects of pesticides on locomotory behaviour in stream invertebrates.

Methods

The locomotory behaviour of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the isopod *Asellus aquaticus* placed in petri dishes was recorded by using a state-of-the-art video tracking system (EthoVision Pro, Noldus Information Technology, Holland) during exposure to pesticides. In order to evaluate the relative sensitivity of the behavioural response, the effect of the pesticides on mortality was investigated.

Pesticides

Pesticides were selected in collaboration with the Danish Environmental Protection Agency based on criteria for use in Denmark, biological activity and occurrence in surface water. Studies were performed using the pyrethroid insecticides cypermethrin and esfenvalerate, the organophosphate insecticide dimethoate and the strobilurin fungicide azoxystrobin. In order to obtain realistic concentration-response relationships, methods were developed to determine the real pesticide concentrations during exposure by using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS).

Experiments

The video tracking system was used for three types of experiments, i.e. for studying the background behaviour in uncontaminated water, for testing the acute behavioural toxicity of pesticides and for studying the ability of the animals to recover following a transient pesticide exposure. Investigations of acute behavioural toxicity included effect studies of cypermethrin, esfenvalerate, dimethoate and azoxystrobin in adult *G. pulex*, of cypermethrin in juvenile *G. pulex*, and of esfenvalerate in adult *A. aquaticus*.

Results

The video tracking experiments using the pyrethroids cypermethrin and esfenvalerate on both adult *G. pulex* and *A. aquaticus* and on juvenile *G. pulex* unambiguously show that during exposure to low, environmentally realistic concentrations of pyrethroids the animals display a maximum flight response. This avoidance behaviour is maintained as long as possible, being followed by immobilisation at higher exposure concentrations. Immobilisation appears to be irreversible; immobilised *G. pulex* and *A. aquaticus* are still immobile 24 hours after transfer to uncontaminated water. *G. pulex* displays avoidance behaviour at lower pyrethroid concentrations than *A. aquaticus* while *A. aquaticus* is more sensitive as far as immobilisation is concerned. No marked differences in the acute behavioural response of juvenile and adult *G. pulex* were noted. Dimethoate and azoxystrobin did not affect the locomotory behaviour of *G. pulex* even at high exposure concentrations.

Conclusions

The method for automated behavioural monitoring implemented in the present project has the potential for generating results that may be utilised for evaluating risks related to contamination by or discharge of pesticides into stream ecosystems. The video tracking system is capable of generating cost-effective concentration-response data on behavioural toxicity, and could be employed by environmental authorities as a screening tool. The video tracking system facilitates combination exposure studies where experimental animals are exposed to mixtures of pesticides. Following future method validation in the field, the system may be applied in relation to monitoring in streams.

1 Indledning

1.1 Baggrund og nuværende videngrundlag

1.1.1 Pesticider i ferskvandssystemer

Anvendelse af pesticider på dyrkede arealer kan ved vinddrift, atmosfærisk deposition, nedvaskning fra behandlede marker og transport via drænrør eller grundvand, og overfladisk afstrømning føre til kontaminering af vandløb (Mathiessen et al. 1995; Felding et al. 1997; Schulz & Liess 1999a, b). Forekomsten af pesticider i danske vandløb er for perioden 1989-1996 opsummeret i Bichel-rapporten (Bichel-udvalget 1999), hvor det konkluderes, at der er påvist 32 forskellige pesticider. Undersøgelser i fynske vandløb har ydermere dokumenteret forekomst af op til 18 pesticider i samme vandløb inden for ét døgn (Fyns Amt 1997). Forskellige undersøgelser (summeret i Bichel-rapporten) antyder, at mellem 0,01 og 0,3% af den anvendte pesticidmængde, typisk i forbindelse med nedbørshændelser, ender i vandløb. Som det fremgår af Bichel-rapporten, er effekterne af disse pesticider i overfladevandet endnu kun ufuldstændigt klarlagte.

1.1.2 Fastsættelse af PNEC

De data, der i forbindelse med godkendelse ligger til grund for vurdering af pesticiders toksicitet i akvatiske systemer, er i de fleste tilfælde opnået ved brug af et begrænset antal arter (oftest laboratorieundersøgelser af 1 eller 2 algearter, andemad, dafnier, myggelarver og 2 fiskearter). I en nyligt publiceret, omfattende undersøgelse har man sammenlignet PNEC (Predicted No-Effect Concentration) for 4 kemikalier (lindan, 3,4-dichloranilin, atrazin og kobber) opnået ved denne fremgangsmåde med PNEC opnået ved undersøgelser af en langt bredere gruppe af ferskvandsinvertebrater såvel i laboratoriet som i mesokosmosstudier (Girling et al. 2000a, b; Pascoe et al. 2000). Undersøgelserne viste, at nogle af de mest følsomme parametre ved påvirkning med de valgte kemikalier var adfærdsændringer hos bl.a. ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* (Girling et al. 2000a); driftadfærd blev undersøgt i mesokosmosstudier, mens parringsadfærd blev undersøgt i laboratoriet.

1.1.3 Drift hos vandløbsinvertebrater

På grund af strømmen i vandløb er organismer udsat for drift. Dyrene kan også selv lade sig drive, hvis der er plads- eller fødemangel på deres opholdssted. Katastrofedrift kan forekomme f.eks. ved kraftige ændringer i vandføringen og ved udledning af miljøgifte. Kontaminering med insekticiderne methoxychlor, cypermethrin, permethrin, fenvalerat og parathion-ethyl har i feltundersøgelser forårsaget drift hos en række ferskvandsinvertebrater (oversigt i Schulz & Liess 1999b), og i mesokosmosforsøg er bl.a. lindan og kobber vist at inducere drift (Girling et al. 2000a).

1.1.4 Videosporing og adfærdsundersøgelser

Mens parametre med forholdsvis lave NOEC- eller LOEC-værdier såsom juvenil dødelighed, vækst af unge dyr og prækopula-adfærd kan undersøges i laboratoriet, har det hidtil kun været muligt at studere pesticidinduceret drift i felt- eller mesokosmosundersøgelser. Indenfor det seneste tiår er der imidlertid udviklet computerstyrede videosporingssystemer, der tillader effektiv kvantificering af bevægelsesadfærd i laboratoriesystemer. Et ældre system har været særdeles effektivt i undersøgelser af kemikaliers, herunder pesticiders, indvirkning på terrestriske invertebraters bevægelsesadfærd (Baatrup & Bayley 1993; Bayley & Baatrup 1996; Bayley et al. 1995, 1997; Jensen et al. 1997; Sørensen et al. 1995, 1997). I vort laboratorium har et tilsvarende system været anvendt til studiet af metallers indvirkning på akvatiske invertebraters bevægelsesadfærd (Depledge et al. 1995; Jensen 1999; Poulsen 2000). For såvel terrestriske som akvatiske invertebrater udtrykker ændringer i parametre som tilbagelagt afstand, gennemsnitshastighed, tid i bevægelse og drejningsrater effekten af kemikaliepåvirkning.

1.2 Formål

Formålet med projektet var at udvikle og anvende et laboratoriebaseret videosporingssystem til kvantificering af effekten af miljørealistiske pesticideksponeringer på bevægelsesadfærden hos vandløbsinvertebrater. Systemet blev anvendt på ferskvandstangloppen *G. pulex* og vandbænkebideren *A. aquaticus*. For at vurdere følsomheden af forskellige effektparametre blev effekten på bevægelsesadfærd sammenlignet med effekten på mortalitet.

2 Metoder

2.1 Forsøgsdyr: *Gammarus pulex* og *Asellus aquaticus*

Ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og vandbænkebideren *Asellus aquaticus* blev valgt som forsøgsdyr, da de begge har følgende karakteristika: De er almindeligt forekommende i danske ferskvandssystemer, dyrenes biologi er velbeskrevet i litteraturen, og de er lette at holde i laboratoriet. Såvel *G. pulex* som *A. aquaticus* spiller en central rolle i forbindelse med den biologiske bedømmelse af vandløbskvalitet v.h.j.a. Dansk Vandløbsfaunaindeks (Miljøstyrelsen 1998). Såvel forekomst som antal af begge arter er afgørende i forbindelse med fastsættelse af nøglegruppe. Ved fastsættelse af den endelige faunaklasse v.h.j.a. diversitetsgrupper indgår *G. pulex* som positiv og *A. aquaticus* som negativ diversitetsgruppe. Denne kategorisering er bl.a. baseret på arternes forskellige tolerance over for organisk forurening, der kan medføre forøgelse af ammoniakkoncentration og reduktion i koncentrationen af opløst ilt (hypoxi). Maltby (1995) fandt, at *A. aquaticus* var fem gange mere tolerant over for hypoxi, og to gange mere tolerant over for uioniseret ammoniak, end *G. pulex*. For begge arter blev det endvidere observeret, at juvenile var mere tolerante end voksne individer både med hensyn til hypoxi og ammoniak. *A. aquaticus* er endvidere mere tolerant over for lave pH-værdier end *G. pulex* (Hargeby 1990; Naylor et al. 1990). Baseret på korrelationer mellem forekomsten af de to arter og en række miljøfaktorer foreslog Whitehurst (1991), at forholdet mellem antallet af *G. pulex* og *A. aquaticus* kunne anvendes til en simpel biologisk monitoring af vandkvalitet i vandløb udsat for organisk forurening.

G. pulex og *A. aquaticus* er begge vigtige detritivore, og *G. pulex* er fundet i tætheder op til 10.000 individer pr. kvadratmeter (Welton 1979; Andersen et al. 1993). Begge arters reproduktion, vækst, og populationsdynamik er velundersøgt (Willoughby & Sutcliffe 1976; Marcus et al. 1978; Welton & Clarke 1980; Sutcliffe & Carrick 1981; Sutcliffe et al. 1981; Gee 1988; Sutcliffe 1992; Graça et al. 1993a; Sutcliffe 1993a, b; Graça et al. 1994a). Welton & Clarke (1980) estimerede levetiden for *G. pulex* til 17-23 måneder for hunner, og 2,5 år for hanner. *G. pulex* og *A. aquaticus* findes ofte sammen, hvilket har givet anledning til adskillige studier af deres fødepræferencer (Moore 1975; Graça et al. 1993a, b), indbyrdes konkurrenceforhold (Hargeby 1990; Graça et al. 1994a, b) og rovdyr-byttedyrsinteraktioner (Bengtsson 1982). *G. pulex* udgør et vigtigt fødeemne for fisk, som f.eks. ørreder (Friberg 2000).

Indsamlingen af *G. pulex* foregik ved to lokaliteter i Lindved Å på en strækning, hvor åen er klassificeret som faunaklasse 5 ud fra Dansk Vandløbsfaunaindeks, hvilket vil sige, at vandløbet betegnes som ret svagt påvirket (Fyns Amt 2003). *A. aquaticus* var relativt let tilgængelig og kunne indsamles sammen med *G. pulex* ved den ene af de to ovennævnte lokaliteter. De i forsøgene anvendte juvenile gammarider var mindre end 3 mm, mens voksne *G. pulex* og *A. aquaticus* var større end 8 mm. Denne inddeling af aldersgrupper stemmer overens med den af Welton (1979) anvendte. For *G. pulex* vedkommende indeholder den ikke-anvendte størrelsesgruppe på 3-8

mm en blanding af juvenile, umodne og modne voksne. Welton (1979) fandt, at den juvenile aldersklasse på alle tider af året udgjorde den største andel af populationen. Ved indsamlingen af forsøgsdyr blev juvenile *A. aquaticus* observeret, dog ikke i et tilstrækkeligt stort antal til at kunne gennemføre forsøg med disse.

2.2 Forsøgsbetingelser

Opbevaring af dyr og udførelsen af forsøg foregik i Biologisk Instituts akvarierum ved 15°C med en fotoperiode på 12 timers lys og 12 timers mørke. Ved hjemkomst til akvarierummet blev dyrene, efter et døgn temperaturakklimering i gennemluftet åvand, overført til kunstigt ferskvand (OECD 2000, ISO 6431 test water) (Tabel 1).

Tabel 1 Kunstigt ferskvand (ISO 6431 test water, OECD 2000)

Salt	Koncentration (mg/l)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123,25
NaHCO ₃	64,75
KCl	5,75

Dyrene blev sorteret efter størrelse ved hjælp af tre sigter med maskestørrelser på 355, 720 og 1500 µm. Voksne individer blev tilbageholdt i 1500 µm sigten, mens juvenile passerede gennem 720 µm sigten og blev tilbageholdt på 355 µm sigten. Længden af de sorterede dyr blev målt ved digital billedbehandling, og var >8 mm for voksne, og <3 mm for juvenile. Dyrene blev fodret med plantemateriale fra indsamlingsstedet, og opbevaret i 10 l plastakvarier med gennemluftet, kunstigt ferskvand. Forsøgsdyrene blev akklimeret til laboriebetingelser i mindst 1 uge inden forsøgsstart. Under såvel akklimering som forsøg anvendtes udelukkende kunstigt ferskvand. Vandskifte blev foretaget to gange om ugen. Forsøgsdyr, der havde været opbevaret i mere end én måned i laboratoriet, blev ikke anvendt.

2.3 Pesticidvalg

I forbindelse med iværksættelsen af pesticidforskningsprojekterne inden for indsatsområdet "Vandløb og vandhuller" blev pesticider udvalgt til undersøgelse i samråd med Miljøstyrelsens Pesticidkontor bl.a. på baggrund af kriterier for anvendelse i Danmark, biologisk aktivitet og forekomst i overfladevand. Forsøg er blevet gennemført med cypermethrin, esfenvalerat, dimethoat og azoxystrobin.

2.3.1 Cypermethrin

CAS Nummer: 52315-07-8
Navn: (R,S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(1-R,S)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanocarboxylat
Molekylærformel: C₂₂H₁₉Cl₂NO₃
Molvægt: 416,31
Smeltepunkt: 80,5°C
Kogepunkt: -
Vandopløselighed: 0,004 mg/l
Log K_{ow} (Log P): 6.60

Cypermethrin er et syntetisk pyrethroid-insekticid, der virker agonistisk på, d.v.s. forlænger åbningstiden af, spændingsafhængige natriumkanaler i nervesystemet hos både target og non-target organismer. I 2001 blev der i Danmark solgt 3202 kg cypermethrin til anvendelse i landbrugets planteavl, hvilket placerede cypermethrin som det fjerde mest solgte af de 10, i 2001 anvendte, insekticider, efter dimethoat, tau-fluvalinat og pirimicarb. Cypermethrin anvendes i stort set alle landbrugets afgrødetyper; det teoretisk behandlede areal udgjorde i 2001 219448 ha, hvilket er 29% af det samlede antal insekticid-behandlede hektarer; det placerer cypermethrin som det arealmæssigt mest anvendte insekticid. Af det anvendte cypermethrin sprøjtes 68% af det til korn anvendte areal. Cypermethrin anvendes med en normaldosering på 12,5-20 g/ha (Ny beregningsmetode, Bekæmpelsesmiddelstatistik 2001, Miljøstyrelsen 2002). Det var ikke muligt at finde data for cypermethrin-koncentrationer i danske ferskvandssystemer.

2.3.2 Esfenvalerat

CAS Nummer: 66230-04-4
Navn: (S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(S)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrat
Molekylærformel: $C_{25}H_{22}ClNO_3$
Molvægt: 419,91
Smeltepunkt: 59,5°C
Kogepunkt: -
Vandopløselighed: 0,002 mg/l
Log K_{ow} (Log P): 6,22

Esfenvalerat er et syntetisk pyrethroid-insekticid, der som cypermethrin virker agonistisk på spændingsafhængige natriumkanaler i nervesystemet hos både target og non-target organismer. Salget af esfenvalerat var i 2001 på 1887 kg, og esfenvalerat var det femte mest solgte insekticid, efter dimethoat, tau-fluvalinat, pirimicarb og cypermethrin. Esfenvalerat var i 2001 det arealmæssigt anden mest benyttede insekticid, efter cypermethrin, med et behandlet areal på 177258 ha, svarende til 23% af det samlede antal insekticid-behandlede hektarer. Som for cypermethrin anvendes esfenvalerat i de fleste afgrødetyper, dog især i korn, hvor 62% af arealerne sprøjtes. Normaldosering for esfenvalerat er 8,8-25 g/ha (Ny beregningsmetode, Bekæmpelsesmiddelstatistik 2001, Miljøstyrelsen 2002). Esfenvalerat er i danske vandløb fundet i koncentrationer op til 0,66 µg/l (Fyns Amt 1997; Århus Amt 1999).

2.3.3 Dimethoat

CAS Nummer: 60-51-5
Navn: O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioat
Molekylærformel: $C_5H_{12}NO_3PS_2$
Molvægt: 229,26
Smeltepunkt: 52°C
Kogepunkt: 107°C (ved 0,05 mmHg)
Vandopløselighed: 25 g/l
Log K_{ow} (Log P): 0,78

Dimethoat er et organophosphat-insekticid, der inhiberer acetylcholinesterase-aktiviteten i nervesystemet. Dimethoat var i 2001 det mest solgte insekticid med et salg på 32987 kg, fulgt af tau-fluvalinat (5160 kg) og pirimicarb (3902

kg). Arealmæssigt var dimethoat i 2001 det tredje mest anvendte insekticid med et behandlet areal på 107977 ha, svarende til 14% af det samlede antal insekticid-behandlede hektarer. Dimethoat anvendes især i korn, men også i majs, hvor det arealmæssigt er det vigtigste insekticid. Normaldoseringen er 300-750 g/ha (Ny beregningsmetode, Bekæmpelsesmiddelstatistik 2001, Miljøstyrelsen 2002). Dimethoat er i danske vandløb fundet i koncentrationer op til 0,7 µg/l (Fyn County 2001).

2.3.4 Azoxystrobin

CAS Nummer: 131860-33-8
Navn: methyl (E)-2-((6-(2-cyanophenoxy)-4-pyrimidinyl)oxy)-
alpha-(methoxymethylen)benzenacetat
Molekylærformel: $C_{22}H_{17}N_3O_5$
Molvægt: 403,39
Smeltepunkt: 116°C
Kogepunkt: -
Vandopløselighed: 10 mg/l
Log K_{ow} (Log P): 2,50

Azoxystrobin er et strobilurin-fungicid, der inhiberer mitokondriel respiration ved at blokkere elektronoverførslen mellem cytochrom b og cytochrom c ved det ubiquinol-oxiderende site. Azoxystrobin-salget udgjorde i 2001 76689 kg, og fungicidet var det tredje mest solgte af 13, efter mancozeb (265962 kg) og fenpropimorph (104238 kg). Azoxystrobin var i 2001 det arealmæssigt mest anvendte fungicid med et behandlet areal på 304756 ha, efterfulgt af tebuconazol (197670 ha), mancozeb (177308 ha) og fenpropimorph (138984 ha). Af de i Bekæmpelsesmiddelstatistikken angivne afgrøder anvendes azoxystrobin kun i korn, med en normaldosering på 250 g/ha (Ny beregningsmetode, Bekæmpelsesmiddelstatistik 2001, Miljøstyrelsen 2002). Azoxystrobin indgår, så vidt vides, ikke i de analysemetoder, der hidtil er anvendt ved ferskvandsmonitoring i Danmark.

2.4 Videosporing

2.4.1 Videosporingssystemet (EthoVision Pro)

Et state-of-the-art videosporingssystem, EthoVision Pro (Noldus Information Technology, Holland) blev anvendt til automatiseret adfærdsregistrering. Hardware- og softwareopsætning samt adfærdsarena- og eksponeringsdesign blev optimeret, og videosporingssystemets funktion kan opsummeres som følger (Fig. 1): et videokamera observerer objekternes bevægelser, og videobillederne overføres til en computer. Her transformeres det analoge videosignal (frame) til et digitalt signal (bitmap) v.h.j.a. en frame grabber. Det digitale billede viderebehandles af computerens software (EthoVision Pro), der først detekterer objektet, dernæst bestemmer tidspunktet, og beregner objektets størrelse og position/massemidtpunkt (x,y-koordinat). Disse informationer lagres i en rådatafil, udfra hvilken EthoVision Pro siden beregner de forskellige adfærdsparametre. Systemet kan maksimalt observere 16 objekter i separate arenaer samtidigt.

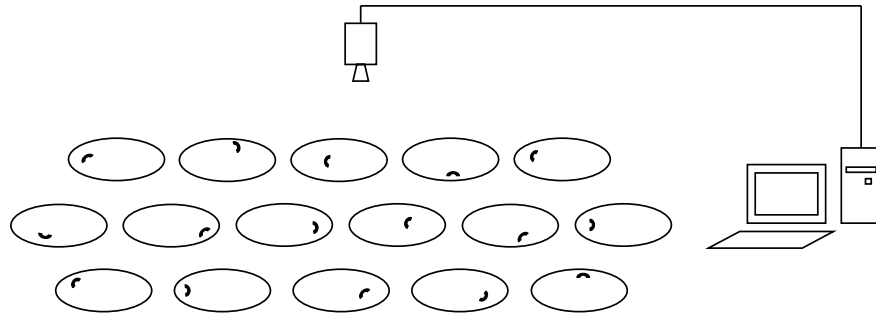


Fig. 1. Videosporingsystemet (EthoVision Pro)

2.4.2 Adfærdsparmetre

Videosporingsystemet muliggør effektiv analyse af bevægelsesadfærd; dyrenes bevægelsesmønstre kvantificeres ved vektorregning (Fig. 2) og nedbrydes i en række adfærdsparmetre. Adfærdsparmetrene kan opdeles i to hovedkategorier:

Afstand og tid:

- Tilbagelagt afstand (vejlængde)
- Hastighed
- Antal bevægelser/pauser
- Varighed af bevægelser/pauser

Bevægelsessporets form:

- Drejningsvinkel (antal grader drejet)
- Drejningsrate (antal grader drejet pr sekund eller pr tilbagelagt cm)
- Drejningsskævhed (præference for drejning til højre eller venstre)

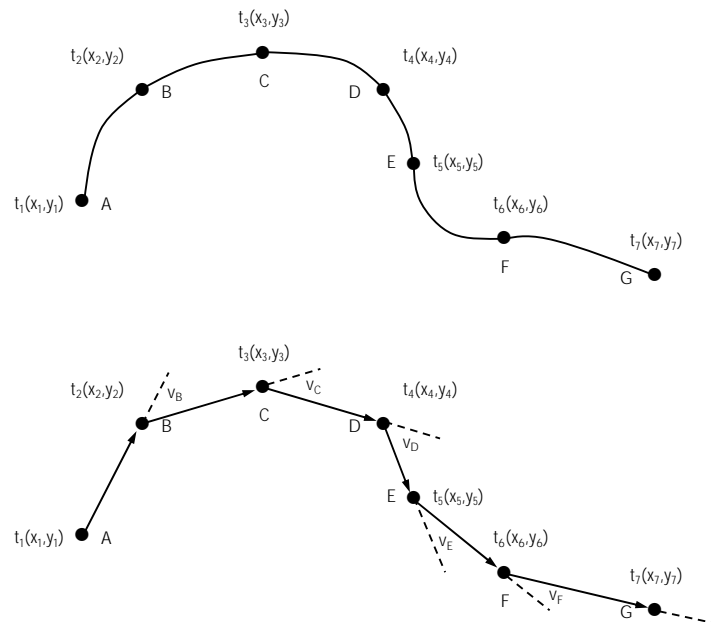


Fig. 2. Kvantificering af bevægelsesadfærd ved vektorregning
Den faktiske bevægelsesadfærd (øverst) estimeres ved vektorregning (nederst) baseret på rådatafiler indeholdende information om ændringer i objektets x,y-koordinater over tid

Videosporingsystemets software kan for adfærdsparametrene beregne en række statistiske størrelser, såsom sum, gennemsnit, maximums- og minimumsværdi, hyppighed, varighed, spredning, etc. Beregningerne foregår i brugerdefinerede tidsintervaller, så det er muligt at opnå den ønskede tidsopløsning. Indledende studier viste, at det optimale forhold mellem en præcis beskrivelse af dyrets bevægelse og en minimering af individuel variabilitet blev opnået ved at inddele observationstiden i 5-minutters intervaller. Flere af adfærdsparametrene er interkorrelerede, og indledende undersøgelser viste, at eftersom forsøgsdyrene har en præference for at bevæge sig langs arenaens kant, og da arenaen (glaspetriskål) er rund, vil et individ, der tilbagelægger en stor vejlængde, samtidigt have drejet et stort antal grader. Bevægelsessporets form er således primært bestemt af valget af arena, og ikke nødvendigvis relateret til et adfærdstoksikologisk respons. Adfærdsparametre baseret på vinkler blev derfor ikke anvendt, og nærværende rapport indeholder ingen informationer om bevægelsessporets form.

Følgende adfærdsparametre blev udvalgt for *G. pulex*, da de detaljeret beskriver ændringerne i adfærd forårsaget af pesticideksponering:

- tilbagelagt afstand (cm/5 min)
- gennemsnitshastighed i bevægelse (cm/s)
- andel af henholdsvis svømmeadfærd, kravleadfærd og inaktivitet (%)
- gennemsnitlig varighed af en svømmebevægelse (s)
- antal svømmebevægelser (antal/5 min)

Opdelingen af bevægelsesadfærden i svømmeadfærd, kravleadfærd og inaktivitet er baseret på eksperimentelt bestemte kriterier for bevægelseshastighed, således at en svømme- eller kravlebevægelse påbegyndes ved overstigelse af en given startværdi og afsluttes, når bevægelseshastigheden falder til under en given stopværdi. Bevægelseshastigheden beregnes for *G. pulex* som den gennemsnitlige hastighed i et 1-sekunders interval.

For voksne *G. pulex* blev hastighedskriterierne bestemt til:

- svømmeadfærd: starthastighed 2 cm/s og stophastighed 1 cm/s
- kravleadfærd: starthastighed 0,5 cm/s og stophastighed 0,25 cm/s

Resultater for alle valgte adfærdsparametre er kun vist for voksne *G. pulex* eksponeret for cypermethrin. Tilsvarende beregninger er lavet for alle udførte forsøg, men for de resterende forsøg med såvel *G. pulex* som *A. aquaticus* er kun adfærdsparameteren tilbagelagt afstand vist, da den vurderes at give en tilstrækkelig detaljeret beskrivelse af det adfærdstoksikologiske respons. Endeligt udviser *A. aquaticus* ikke svømmeadfærd.

2.4.3 Metodeudvikling og baggrundsadfærd

I projektets indledende fase blev forskellige arenatyper testet. Et flow-kammer, hvor forsøgsdyrene kunne observeres i gennemstrømmende vand, blev udviklet. Flow-kammeret med en arena afgrænset af to metalgitre er beskrevet i Bilag A, men er ikke blevet anvendt til egentlige forsøg, da forsøgsdyrene udviste for stor præference for disse gitre, hvor de kunne holde fast, og derfor ikke udviste nogen bevægelsesadfærd. Endvidere blev to parallelle strømrender udviklet. Det viste sig ikke at være muligt at holde forsøgsdyrene tilstrækkeligt længe i disse render. Strømrenderne er beskrevet i Bilag B.

Valget af arena til videosporingsforsøgene faldt på glaspetriskåle. Forsøgsdyrene udviste efter akklimatisering til petriskålene tilsyneladende en

forholdsvis ustresset bevægelsesadfærd, hvilket tillod observationer af såvel forøgelse som reduktion af bevægelsesaktivitet. Der er ingen vandbevægelse i de anvendte petriskåle, men såvel *G. pulex* som *A. aquaticus* ventilerer aktivt deres gæller (Maltby 1995), og klarer sig problemfrit i det stillestående vand. Vanddybden i petriskålene er kun 1,5 cm, og dette sikrer sammen med den store kontaktflade til atmosfæren tilgængeligheden af ilt.

Sammenhængen mellem tid tilbragt i glaspetriskåle og den tilbagelagte afstand (cm/15 min) er vist for *G. pulex* og *A. aquaticus* i Fig. 3. Der ses et markant fald i den tilbagelagte afstand i løbet af de første to timer efter overførslen til petriskålene. Dette studie blev gennemført tidligt i projektet, hvilket forklarer, at den tilbagelagte afstand er beregnet i 15-minutters intervaller, og ikke i 5-minutters intervaller som i de øvrige studier.

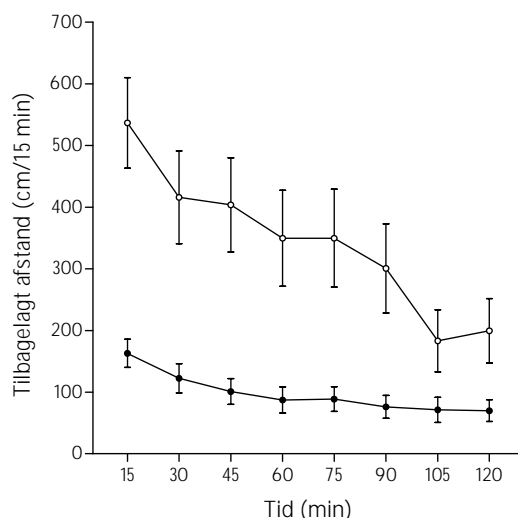


Fig. 3. Tilbagelagt afstand umiddelbart efter overførslen til glaspetriskålene. Tilbagelagt afstand i 15-min intervaller over en 2-timers observationsperiode for *G. pulex* (åbne symboler, n=16) og *A. aquaticus* (lukkede symboler, n=13). (Gennemsnit \pm SEM)

På grundlag af dette og en række lignende baggrundsadfærdsstudier blev det besluttet, at dyrene skal akklimatiseres i petriskålene natten over inden akutte eksponeringsforsøg. Som det fremgår af Fig. 4, hvor den tilbagelagte afstand (cm/5 min) efter akklimatisering er vist, er bevægelsesadfærd for dyr i ukontamineret vand herefter forholdsvis konstant.

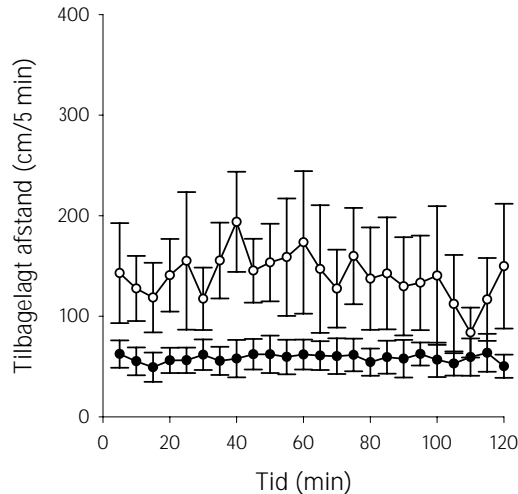


Fig. 4. Tilbagelagt afstand efter akklimatisering natten over i glaspetriskålene. Tilbagelagt afstand i 5-min intervaller over en 2-timers observationsperiode for *G. pulex* (åbne symboler, n=8) og *A. aquaticus* (lukkede symboler, n=8). (Gennemsnit \pm SEM)

2.4.4 Databehandling

Under alle videosporinger udarbejdes en videosporingsprotokol, hvor atypisk adfærd og mangelfuld sporing, i form af et for stort antal scans med manglende positionsbestemmelse af et dyr, noteres. Begge disse kriterier, atypisk adfærd i kontrolperioden og dårlig sporingskvalitet, er blevet anvendt til at udelade rådata fra den videre databehandling. En udeladelse af rådata begrundet med atypisk adfærd kan forekomme, hvis dyret udviser klare tegn på dårlig sundhedstilstand (f.eks. ligger helt stille) eller har et meget lavt aktivitetsniveau. Kriteriet for at udelade et dyr på grund af for lav aktivitet er empirisk bestemt til en gennemsnitlig tilbagelagt afstand <1 cm/min for *G. pulex* og $<0,5$ cm/min for *A. aquaticus*, beregnet som et gennemsnit i løbet af hele kontrolperioden. Det har vist sig, at dyr med så lavt et aktivitetsniveau ofte udviser manglende respons på pesticideksponering sammenlignet med de øvrige eksponerede dyr. Kriteriet skal sammenholdes med et typisk aktivitetsniveau i ukontamineret vand på ca. 20-40 cm/min for *G. pulex* og ca. 10-15 cm/min for *A. aquaticus*. Dyr ekskluderes ligeledes fra videre analyse, hvis antallet af scans med manglende positionsbestemmelse overstiger 1% af det samlede antal scans. Erfaringer viser, at det normalt er nødvendigt at ekskludere data for 0-1 dyr ved videosporing af 16 arenaer.

2.5 Adfærdstoksikologiske forsøg

2.5.1 Akut adfærdstoksicitet af udvalgte pesticider

Formålet med de akutte adfærdstoksikologiske studier var at undersøge de ændringer i bevægelsesadfærd, der måtte finde sted under en miljørealistisk, kortvarig pesticidpuls. Ud fra de foreliggende data for pulsvarigheder (internt følgegruppenotat med overvejelser omkring pulseksponering) blev det besluttet at følge adfærdsresponsen under en 90-minutters eksponering. Designet af et standardforsøg er følgende: Dyrene akklimeres natten over i glaspetriskåle med en indre diameter på 90 mm. Alle 16 dyrs baggrundsadfærd registreres derefter i 30 minutter i 80 ml ukontamineret vand. Dernæst afbrydes videosporingen midlertidigt. Det udvalgte pesticid,

opløst i 10 µl ethanol + 20 ml vand, tilføres 8 af petriskålene (den eksponerede gruppe). De resterende 8 petriskåle (kontrolgruppen) tilføres 10 µl ethanol + 20 ml vand. Tilsætningen af de 20 ml væske foretages længst muligt fra dyrets position, og videosporingen genoptages 2 minutter efter afbrydelsen. Kontrolgruppens og den eksponerede gruppes adfærd følges derefter i yderligere 90 minutter, hvorefter forsøget afsluttes og vandprøver indsamles. Den endelige koncentration af ethanol var 100 µl/l, hvilket er i overensstemmelse med OECD Test guidelines (OECD 2000). En oversigt over udførte studier af akut adfærdstoksicitet er givet i Tabel 2.

Tabel 2 Oversigt over studier af udvalgte pesticiders akutte adfærdstoksicitet hos *G. pulex* (*Gp*) og *A. aquaticus* (*Aa*)

Pesticid	Art	Eksponeringskoncentrationer
Cypermethrin (ng/l)	Voksne <i>Gp</i>	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 og 10000
	Juvenile <i>Gp</i>	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 og 10000
Esfenvalerat (ng/l)	Voksne <i>Gp</i>	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 og 10000
	Voksne <i>Aa</i>	1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 og 10000
Dimethoat (µg/l)	Voksne <i>Gp</i>	10000
Azoxystrobin (µg/l)	Voksne <i>Gp</i>	100

2.5.2 Relativ følsomhed af juvenile *Gammarus pulex*

For at vurdere forskellige livsstadiers relative følsomhed over for en pyrethroid-eksponering blev det akutte adfærdssrespons hos juvenile *G. pulex* undersøgt ved samme nominelle cypermethrin-koncentrationer som tidligere nævnt for voksne (Tabel 2). Under forsøget blev dyrenes baggrundsadfærd, efter akklimering natten over i petriskåle med en indre diameter på 35 mm, fulgt i 30 minutter. Dyrene blev herefter eksponeret i 90 minutter under fortsat adfærdregistrering.

2.5.3 Restituering efter esfenvalerat-eksponering

Med baggrund i pyrethroidernes observerede virkemekanisme (forøget aktivitet efterfulgt af immobilisering i løbet af minutter ved miljørealistiske koncentrationer) samt foreliggende data for varighed af pesticidpuls i vandløb blev et restitueringsforsøg gennemført. Formålet med restitueringsforsøget var at følge adfærden efter en enkelt-puls-eksponering for at vurdere, hvorvidt dyrene er i stand til at komme sig igen. De valgte koncentrationer (Tabel 3) muliggør undersøgelse af restitueringsvejen efter forskellige grader af adfærdændringer i eksponeringsperioden, fra forøget aktivitet til immobilisering. I forsøget blev dyrenes baggrundsadfærd, efter akklimering natten over, fulgt i 30 minutter. Dyrene blev herefter eksponeret i 90 minutter, mens deres adfærd blev registreret. Dernæst blev dyrene, efter gentagne, forsigtige skylninger i rent vand, overført til ukontamineret vand. Efter en 24-timers restitueringsperiode blev adfærden registreret i en 2-timers periode i ukontamineret vand.

Tabel 3 Oversigt over studie af restituering efter esfenvalerat-eksponering hos *G. pulex* (*Gp*) og *A. aquaticus* (*Aa*)

Pesticid	Art	Eksponeringskoncentrationer
Esfenvalerat (ng/l)	Voksne <i>Gp</i>	0.1, 1, 10, 100, 1000 og 10000
	Voksne <i>Aa</i>	0.1, 1, 10, 100, 1000 og 10000

2.5.4 Kombinationseksponering

Et studie af den akutte adfærdstoksicitet ved eksponering af voksne *G. pulex* for en kombination af pyrethroiderne cypermethrin og esfenvalerat blev gennemført. Formålet med forsøget var at illustrere videosporingsystemets anvendelighed i forbindelse med studier af kombinationseksponeringer. I alt 9 eksponeringer blev anvendt (Tabel 4). Under forsøget blev dyrenes baggrundsadfærd, efter akklimering natten over, fulgt i 30 minutter. Dyrene blev herefter eksponeret i 90 minutter under fortsat adfærdsregistrering.

Tabel 4 Oversigt over kombinationseksponeringsstudie med voksne *G. pulex*

Pyrethroid-konc.	Kombination	Eksponeringskoncentrationer
10 ng/l	Cyp 10 Cyp 5 + Esf 5 Esf 10	10 ng cypermethrin/l 5 ng cypermethrin/l + 5 ng esfenvalerat/l 10 ng esfenvalerat/l
100 ng/l	Cyp 100 Cyp 50 + Esf 50 Esf 100	100 ng cypermethrin/l 50 ng cypermethrin/l + 50 ng esfenvalerat/l 100 ng esfenvalerat/l
1000 ng/l	Cyp 1000 Cyp 500 + Esf 500 Esf 1000	1000 ng cypermethrin/l 500 ng cypermethrin/l + 500 ng esfenvalerat/l 1000 ng esfenvalerat/l

2.6 Mortalitätsstudier

Mortalitets- og immobiliseringsstudier blev gennemført for cypermethrin, esfenvalerat og dimethoat med eksponering af juvenile og voksne *G. pulex*. Endvidere blev mortalitet og immobilisering hos *A. aquaticus* eksponeret for esfenvalerat undersøgt. Der blev ikke gennemført mortalitetsforsøg med azoxystrobin. En oversigt over mortalitetsstudierne er givet i Tabel 5.

24 timer inden påbegyndelse af eksponering blev voksne dyr overført til 1,0 l pyrex krystallisationskar indeholdende 400 ml kunstigt ferskvand, mens juvenile dyr blev overført til 250 ml pyrex bægerglas indeholdende 80 ml kunstigt ferskvand. Ved hver eksponeringskoncentration blev 2 grupper af 10 juvenile/bægerglas og 2 grupper af 10 voksne/krystallisationskar anvendt. Inden eksponeringens begyndelse blev døde individer erstattet af ligeledes akklimerede dyr, og det udvalgte pesticid, opløst i ethanol + 100 ml vand for voksne og 20 ml vand for juvenile, blev forsigtigt tilsat til et slutvolumen på 500 ml for voksne og 100 ml for juvenile dyr. Der blev anvendt to kontrolgrupper; en kontrolgruppe fik udelukkende tilsat kunstigt ferskvand, mens en solventkontrolgruppe fik tilsat ethanol i kunstigt ferskvand. Den endelige koncentration af ethanol var 100 µl/l, som det var tilfældet ved videosporingsforsøgene, hvilket er i overensstemmelse med OECD Test guidelines (OECD 2000).

Efter 24, 48, 72 og 96 timer blev dyrene talt og inddelt i tre grupper: mobile, immobile og døde. Individer blev identificeret som mobile, hvis de var aktive umiddelbart under observationen eller ved en minimal mekanisk stimulering. Immobile var de individer, der ikke reagerede på mekanisk stimulus, men ved observation i stereolup kunne iagttages at bevæge kropsllemmer som f.eks. antenner eller ben. Døde dyr kunne som regel let identificeres, da de udviste markant farveskifte og/eller slet ikke reagerede på mekanisk stimulering eller udviste bevægelser ved observation i stereolup. Efter optællingerne ved 24, 48 og 72 timer blev der foretaget vandskifte. 400 ml vand for voksne og 80 ml vand for juvenile blev forsigtigt hældt fra, og et tilsvarende volumen frisk vand

indeholdende ethanol og pesticid blev forsigtigt tilsat. Dette blev gjort for at minimere håndteringsstress.

Tabel 5 Oversigt over mortalitetsstudier hos *G. pulex* (*Gp*) og *A. aquaticus* (*Aa*)

Pesticid	Art	Eksponeringskoncentrationer
Cypermethrin (ng/l)	Voksne <i>Gp</i>	3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000 og 100000
	Juvenile <i>Gp</i>	3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000 og 100000
Esfenvalerat (ng/l)	Voksne <i>Gp</i>	3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 og 30000
	Juvenile <i>Gp</i>	3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 og 30000
	Voksne <i>Aa</i>	3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 og 30000
Dimethoat (µg/l)	Voksne <i>Gp</i>	1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 og 30000
	Juvenile <i>Gp</i>	1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 og 30000

2.7 Pesticidkvantificering

For at opnå realistiske dosis-respons forhold ønskedes de reelle koncentrationer af pesticider bestemt i eksponeringssystemerne. Pesticidanalyser i vandige miljøer udføres mest rationelt (Vejrup & Ljungqvist 1998) under anvendelse af væskekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS). Med denne teknik er det realistisk at bestemme biologisk aktive koncentrationer for de fleste pesticider; pyrethroider, der har biologisk aktivitet nede i koncentrationer på få ng/l, udgør dog et problem. LC-MS metoder til bestemmelse af de reelle eksponeringskoncentrationer blev udviklet. Pesticiderne cypermethrin, esfenvalerat og azoxystrobin indgår ikke i LC-MS analysemetoder for det nationale grundvands-overvågningsprogram (1998-2003) (Vejrup & Ljungqvist 1998).

2.7.1 Metodebeskrivelse

Metodens princip er baseret på fastfaseekstraktion af pesticidkontamineret kunstigt ferskvand efterfulgt af opkoncentrering ved inddampning, samt kvantificering ved omvendt fase HPLC-MS. Metoden er baseret på vandprøver med et volumen på 100 ml.

2.7.1.1 Fastfaseekstraktion

Ekstraktionen af pesticiderne fra vandprøven foretages på en C18-søjle (Sep-Pak Vac, 3 cc, 500 mg, C18 cartridges, fra Waters). Søjlen konditioneres med 5 ml methanol, og vaskes med 5 ml Milli-Q vand. Prøven påsættes søjlen ved 20 kPa vacuum, svarende til ca. 3 ml/min. Dernæst vaskes søjlen med 5 ml Milli-Q vand, og tørres i 1-2 min ved 30-40 kPa vacuum. Pesticidet elueres med 8 ml methanol for cypermethrin og esfenvalerat og 4 ml methanol for dimethoat og azoxystrobin, og inddampes efterfølgende til tørhed under luftstrøm. Cypermethrin- og esfenvaleratprøver genopløses i 0,300 ml 75% methanol, mens dimethoat- og azoxystrobinprøver genopløses i 0,500 ml eluent A (methanol:10 mM ammoniumacetat, 10:990 (v:v)). Prøverne overføres til 2 ml vials og er klar til LC-MS. Denne ekstraktionsprotokol er fremkommet ved testning af flere forskellige ekstraktionssøjler.

2.7.1.2 LC-MS analyse

Det anvendte Hewlett Packard LC-MSD-system består af en HP Series 1100 HPLC (solvent degasser, binær pumpe, autosampler og termostatreguleret kolonneafdeling) og et G1946A MSD quadropole massespektrometer udstyret med electrospray ionisation (ESI) i positiv mode til cypermethrin og esfenvalerat, og atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) i positiv

mode til dimethoat og azoxystrobin, som ioniseringsprincipper. Samme HPLC-kolonne (C18, 150×2,1 mm, Phenomenex fra Subware) med forkolonne af samme materiale anvendes til kvantificering af alle fire pesticider i de ekstraherede prøver. For cypermethrins og esfenvalerats vedkommende blev en C8-kolonne testet, men ikke anvendt, da signalet var mindre. Der anvendes et væske-flow på 0,4 ml/min, en injection af 50 µl prøve, og en kolonnetemperatur på 25 °C. Følgende LC solventer blev brugt til alle fire pesticider: Eluent A: methanol:10 mM ammoniumacetat, 10:990 (v:v). Eluent B: methanol:10 mM ammoniumacetat, 90:10 (v:v). For cypermethrins og esfenvalerats vedkommende blev de af Spliid et al. (1998) beskrevne LC solventer til ESI (Eluent A: methanol:20 mM eddikesyre, 10:90 (v:v); Eluent B: methanol:20 mM eddikesyre, 90:10 (v:v)) afprøvet med ringere resultat.

2.7.2 Cypermethrin

Cypermethrin elueres med følgende gradient (Tid, % B): (0 min, 75%); (3 min, 100%); (15 min, 100%); (15,1 min, 75%); postrun-tid: 6 min, 25% B. Cypermethrin elueres som en dobbelt-top med maksimal intensitet ved 7,7 minutter. Massespektrometer-opsætning: Mode: ESI positiv (SIM: m/z 433). Drying gas temperature: 350 °C. Drying gas flow: 10 l/min. Nebulizer pressure: 40 psig. Capillary voltage: 5000 V. Fragmentor: 50 V. Der benyttes ekstern standardisering, og standardkurven beregnes ud fra standarderne: 10, 50, 250 og 1250 ng/ml injiceret standard.

2.7.3 Esfenvalerat

Esfenvalerat elueres med følgende gradient (Tid, % B): (0 min, 75%); (3 min, 100%); (15 min, 100%); (15,1 min, 75%); postrun-tid: 6 min, 25% B. Esfenvalerat elueres efter 8,7 minutter. Massespektrometer-opsætning: Mode: ESI positiv (SIM: m/z 437). Drying gas temperature: 350 °C. Drying gas flow: 10 l/min. Nebulizer pressure: 30 psig. Capillary voltage: 3500 V. Fragmentor: 50 V. Der benyttes ekstern standardisering, og standardkurven beregnes ud fra standarderne: 5, 10, 50, 250 og 1250 ng/ml injiceret standard.

2.7.4 Dimethoat

Dimethoat elueres med følgende gradient (Tid, % B): (0 min, 25%); (12 min, 100%); (13 min, 100%); (13,1 min, 25%); postrun-tid: 6 min, 25% B. Dimethoat elueres efter 7,5 minutter. Massespektrometer-opsætning: Mode: APCI positiv (SIM: m/z 230). Drying gas temperature: 350 °C. Drying gas flow: 2,5 l/min. Nebulizer pressure: 40 psig. Vaporizer temperature: 500 °C. Corona current: 8,0 µA. Capillary voltage: 2500 V. Fragmentor: 70 V. Der benyttes ekstern standardisering, og standardkurven beregnes ud fra standarderne: 2, 10, 25, 50, 250 og 1250 ng/ml injiceret standard.

2.7.5 Azoxystrobin

Azoxystrobin elueres med følgende gradient (Tid, % B): (0 min, 25%); (2 min, 75%); (8 min, 100%); (9 min, 100%); (9,1 min, 25%); postrun-tid: 6 min, 25% B. Azoxystrobin elueres efter 7,5 minutter. Massespektrometer-opsætning: Mode: APCI positiv (SIM: m/z 404). Drying gas temperature: 350 °C. Drying gas flow: 2,5 l/min. Nebulizer pressure: 40 psig. Vaporizer temperature: 350 °C. Corona current: 8,0 µA. Capillary voltage: 3500 V. Fragmentor: 70 V. Der benyttes ekstern standardisering, og standardkurven beregnes ud fra standarderne: 2, 10, 50, 250 og 1250 ng/ml injiceret standard.

2.7.6 Metodevalidering

En reduceret metodevalidering blev gennemført i overensstemmelse med retningslinier for validering af biologiske analyser (Braggio et al. 1996; Causon 1997). Genfindning og intra-assay-præcision blev bestemt ved oprensning og analyse af 6 spikede prøver à 100 ml kunstigt ferskvand med følgende koncentrationer: cypermethrin: 1000 ng/l, esfenvalerat: 250 ng/l, dimethoat: 250 ng/l og azoxystrobin: 100 ng/l. Intra-assay-præcisionen blev beregnet som den procentvise variationskoefficient (% C.V.), hvilket er synonymt med den relative standardafvigelse (RSD), for disse 6 prøver. Detektionsgrænser for de fire pesticider blev bestemt ved oprensning og analyse af 6 spikede prøver à 100 ml kunstigt ferskvand med følgende koncentrationer: cypermethrin: 250 ng/l, esfenvalerat: 50 ng/l, dimethoat: 100 ng/l og azoxystrobin: 20 ng/l. Detektionsgrænserne blev beregnet som 3 gange standardafvigelsen for disse 6 prøver. Resultaterne for genfindning, intra-assay-præcision og detektionsgrænser fremgår af Tabel 6.

Tabel 6 LC-MS metodevalidering: Genfindning, intra-assay-præcision og detektionsgrænser for cypermethrin, esfenvalerat, dimethoat og azoxystrobin

Pesticid	Genfindning (%)	Intra-assay-præcision (% C.V.)	Detektionsgrænse (ng/l)
Cypermethrin	30	9	18
Esfenvalerat	51	13	6
Dimethoat	98	5	13
Azoxystrobin	109	6	18

2.7.7 Nominelle koncentrationer

I forbindelse med færdiggørelsen af LC-MS metodevalideringen blev det observeret, at især cypermethrin nedbrydes hurtigt under prøveforberedelse og -analyse. Halveringstider ned til under et døgn blev registreret, hvilket umuliggjorde kvantificering af tidligere indsamlede vandprøver, der havde været opbevaret i et halvt år. Esfenvalerat viste sig at være mere stabilt, men heller ikke for dette pesticid var det muligt at kvantificere tidligere indsamlede vandprøvers indhold. Alle eksponeringskoncentrationer for cypermethrin og esfenvalerat er i nærværende rapport angivet som nominelle. Årsagen til den hurtige forsvinden af cypermethrin er endnu ikke kendt, men kunne skyldes fotolyse eller adsorption til glasvarer. Ved fremtidige studier af pyrethroiders effekter vurderes anvendelsen af esfenvalerat som modelforbindelse samt en mere veldefineret protokol for vandprøveindsamling at kunne sikre kvaliteten af LC-MS-kvantificeringen. For dimethoat og azoxystrobin blev eksponeringskoncentrationerne bestemt.

2.8 Statistik

Statistisk evaluering blev foretaget ved hjælp af SigmaStat (version 2.03, SPSS Inc., Chicago, IL). Resultater fra videosporingsforsøgene blev evalueret med repeated measures ANOVA og *t*-test. Om nødvendigt blev data transformeret for at opfylde betingelser om normalitet og varianshomogenitet (Zar, 1984). Studier af mortalitet og immobilisering blev evalueret med logistisk regressionsanalyse. Et signifikansniveau på $\alpha = 0,05$ blev anvendt i alle statistiske analyser. Det anvendte design for videosporingsforsøgene med kun en forsøgsrunde pr. pyrethroid-koncentration er evalueret v.h.j.a. statistiske styrkeberegninger i Bilag C.

3 Resultater

3.1 Akut adfærdstoksicitet

3.1.1 Cypermethrin

Fig. 5-10 viser effekten af cypermethrin på bevægelsesadfærden hos voksne *Gammarus pulex*, og en række udvalgte adfærdsparemetre gennemgås i detaljer for at illustrere de typer af informationer, der er tilgængelige v.h.j.a. videosporingssystemet.

På Fig. 5 er den tilbagelagte afstand afbildet som funktion af tiden, og det fremgår, at der er tale om et bifasisk adfærdrespons. Ved lavere cypermethrin-koncentrationer (≥ 10 ng/l) observeres en markant stigning i den tilbagelagte afstand, indtil et konstant maksimum på ca. 600 cm/5 min nås, efter en times eksponering ved 10 ng/l. Med stigende koncentration nås dette hyperaktive maksimumniveau tidligere og tidligere, mens varigheden af maksimumniveauet aftager. Ved højere koncentrationer (≥ 300 ng/l) aftager den tilbagelagte afstand markant, og immobilisering observeres tidligere og tidligere ved koncentrationer ≥ 1000 ng/l.

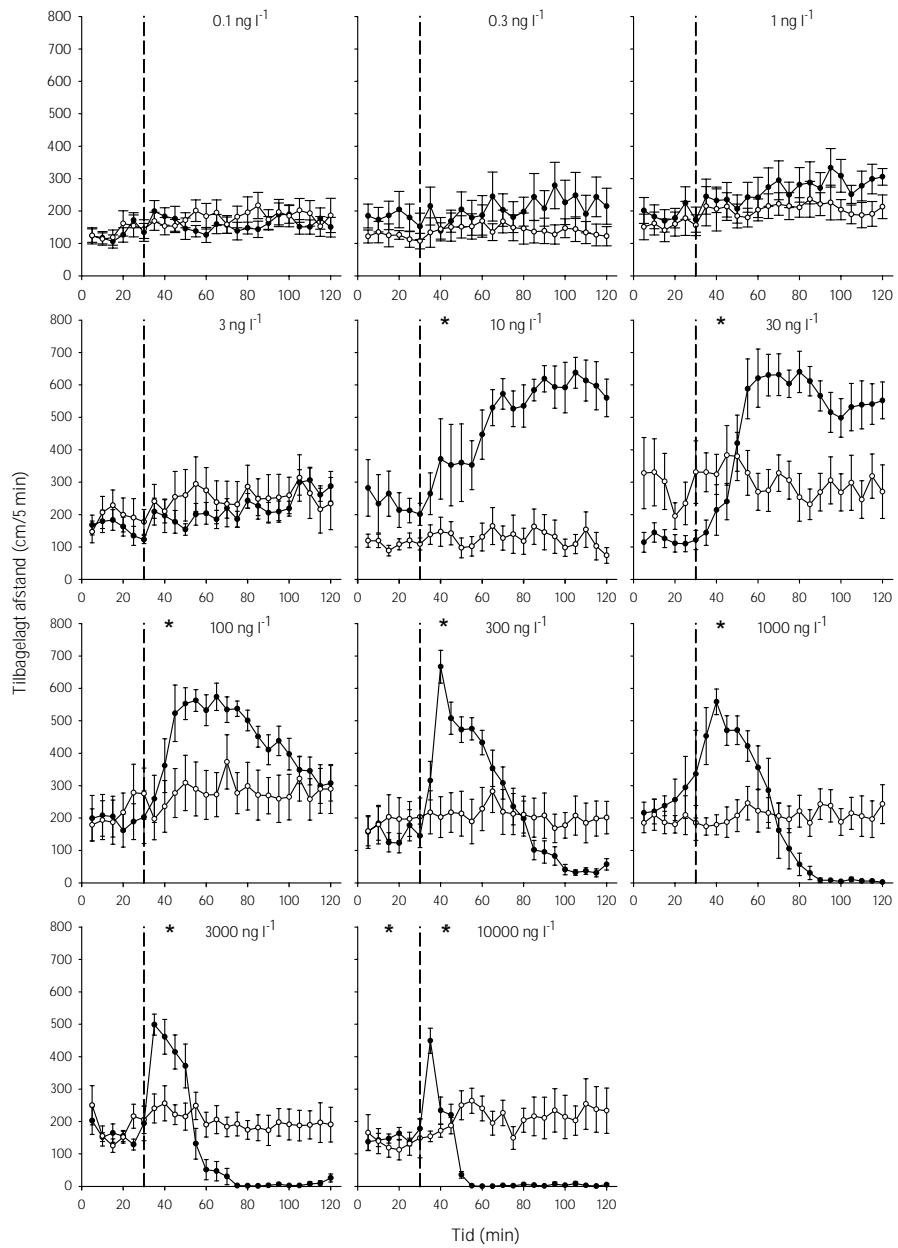


Fig. 5. Effekt af cypermethrin på tilbagelagt afstand
 Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

Fig. 6 viser gennemsnitshastigheden (i bevægelse; der ses bort fra inaktive perioder) som funktion af tiden og understøtter resultaterne for tilbagelagt afstand. Signifikante forskelle mellem kontrolgruppen og den eksponerede gruppe observeres ved koncentrationer ≥ 10 ng/l, og det fremgår, at dyrene tilbagelægger større afstande, fordi de vandrer hurtigere.

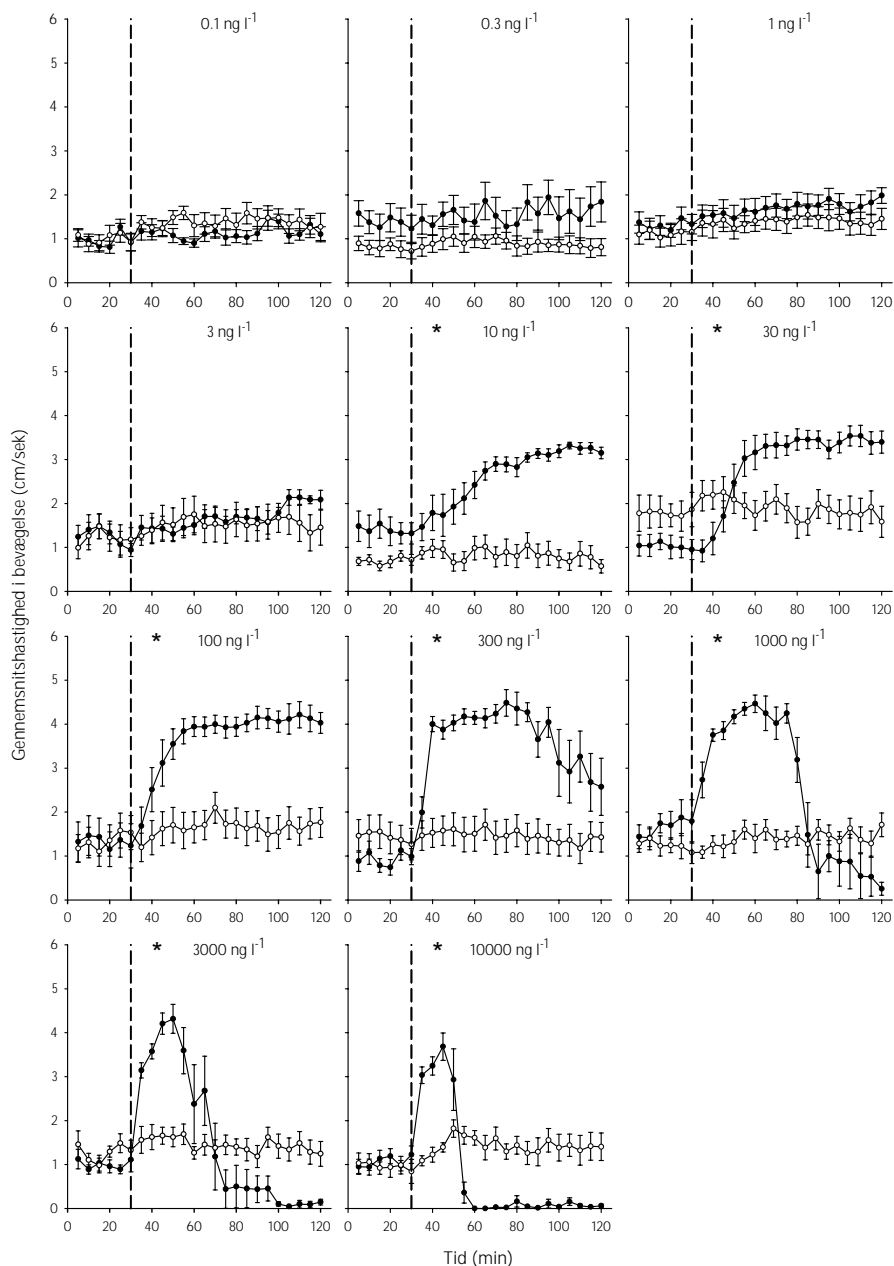


Fig. 6. Effekt af cypermethrin på gennemsnitshastighed i bevægelse. Baggrundsadfærd i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærd i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

Bevægelsesadfærden for *G. pulex* kan inddeles i svømmeadfærd, kravleadfærd og inaktivitet. Fig. 7 viser den gennemsnitlige andel af disse tre adfærdstyper som funktionen af tiden i den eksponerede gruppe, mens Fig. 8 og 9 henholdsvis angiver den gennemsnitlige varighed af en svømmebevægelse og antallet af svømmebevægelser hos såvel kontrol- som eksponerede dyr. *G. pulex* bevæger sig følgerigt længere og hurtigere ved lave eksponeringskoncentrationer (≥ 10 ng/l), fordi en større andel af tiden tilbringes med svømning, mens andelen af kravleadfærd er forholdsvis konstant. Den enkelte svømmebevægelses varighed er relativt uændret, mens antallet af svømmebevægelser øges. Ved højere koncentrationer (≥ 1000 ng/l) mistes evnen til koordineret svømning tilsyneladende, og dyrene immobiliseres.

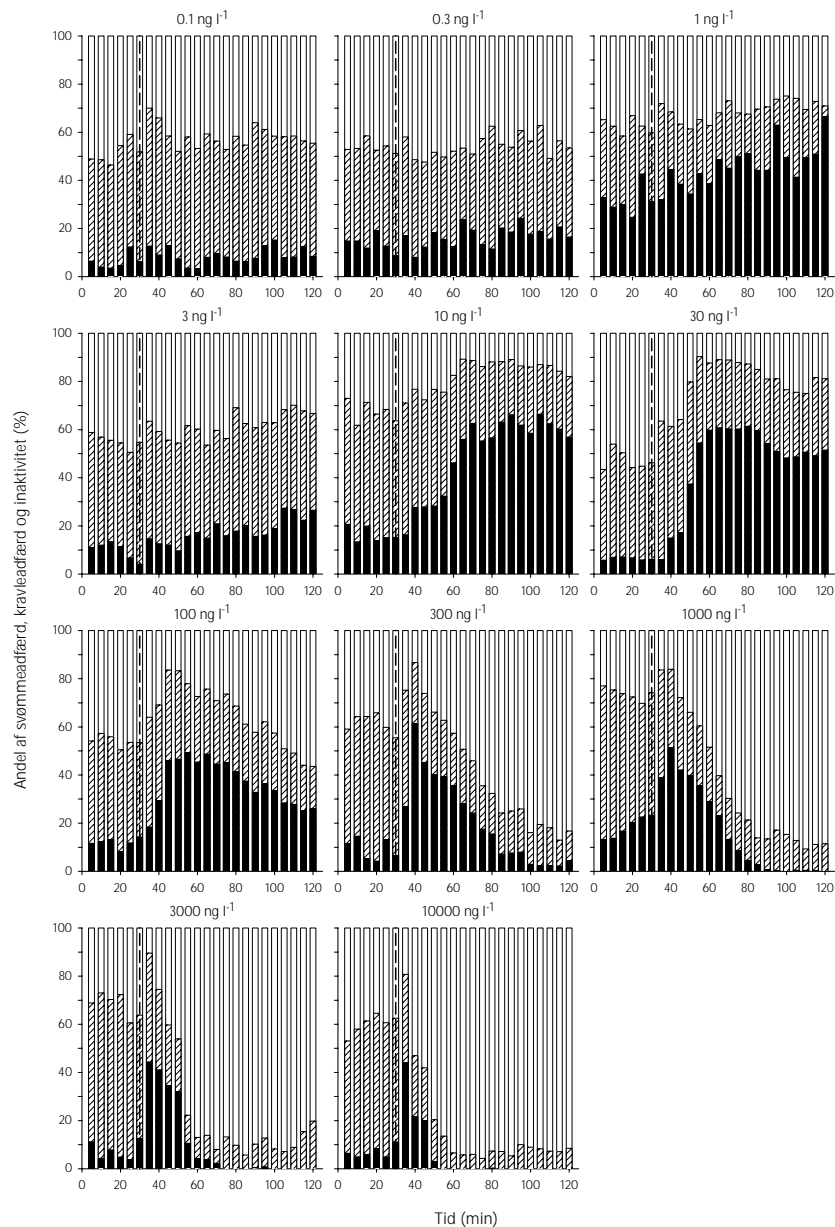


Fig. 7. Effekt af cypermethrin på svømmeadfærd, kravleadfærd og inaktivitet Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Sorte søjler: gennemsnitlig andel af svømmeadfærd; skraverede søjler: gennemsnitlig andel af kravleadfærd; hvide søjler: gennemsnitlig andel af inaktivitet. (n=7-8)

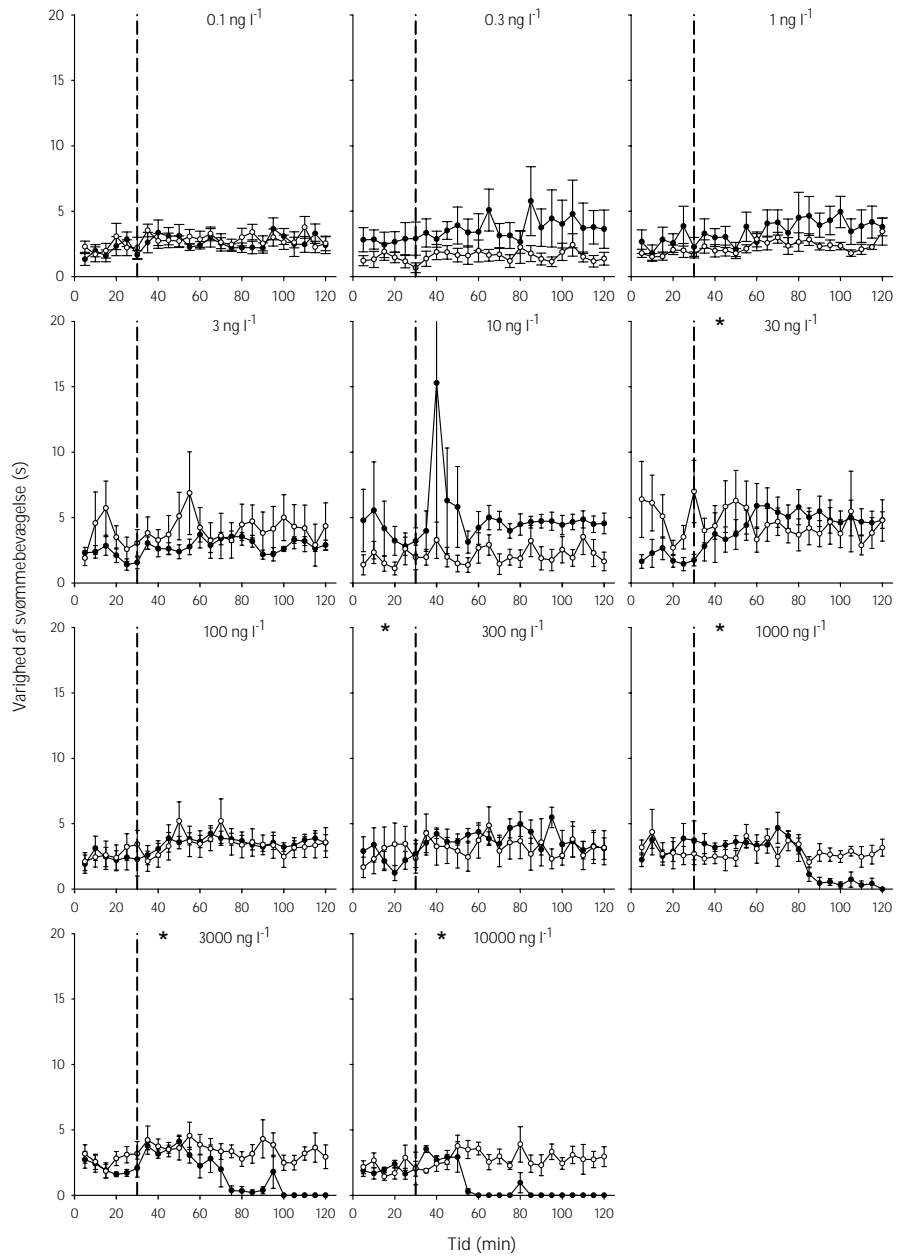


Fig. 8. Effekt af cypermethrin på gennemsnitlig varighed af svømmebevægelse. Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

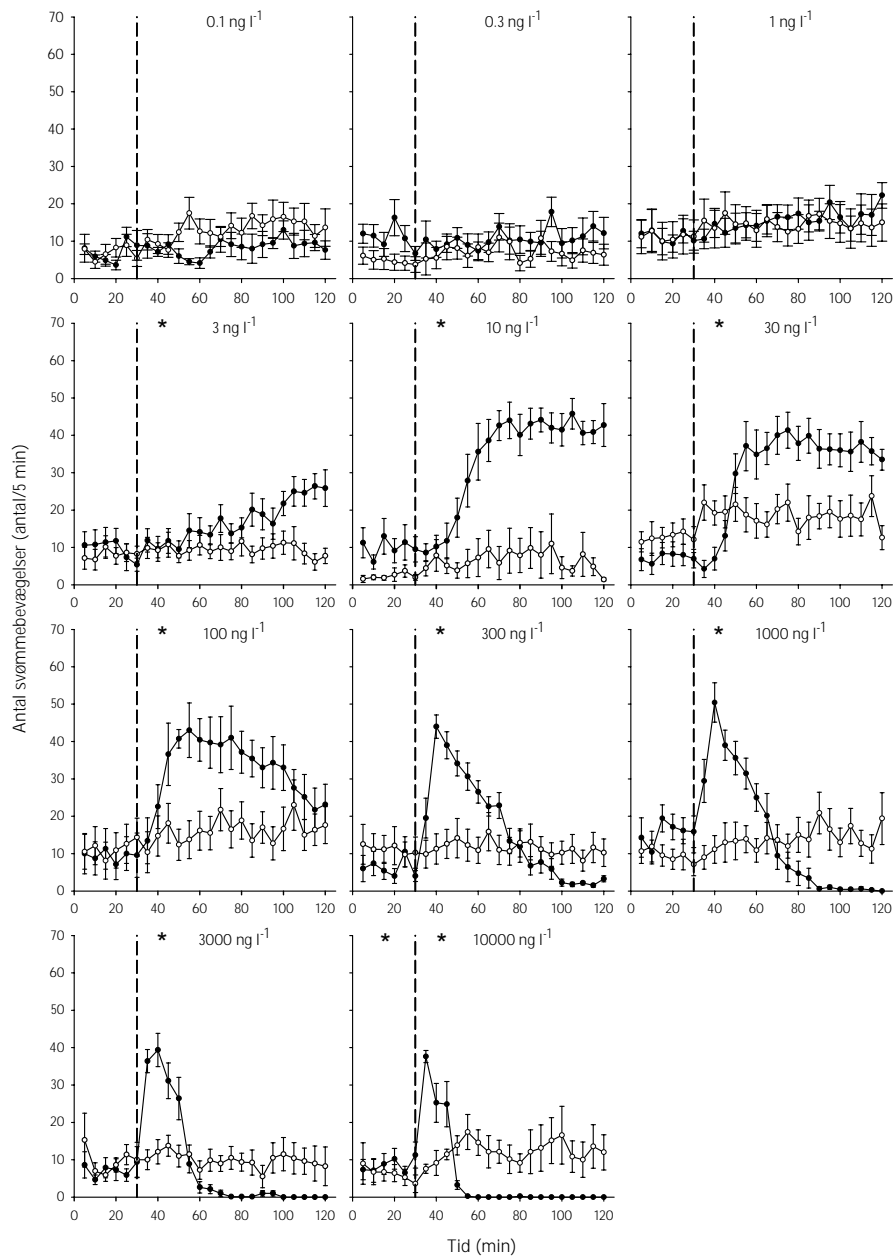


Fig. 9. Effekt af cypermethrin på antal let af svømmebevægelser. Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, $n=7-8$)

Fig. 5-9 viser ændringer i nogle udvalgte adfærdsparametre som funktion af tiden ved stigende cypermethrin-koncentrationer. Forskellige angrebsvinkler kan benyttes, når de komplekse ændringer i bevægelsesadfærd skal opsummeres i koncentrations-respons-sammenhænge. Det koncentrationsafhængige, bifasiske adfærdsrespons, med hyperaktivitet efterfulgt af immobilisering, evalueres effektivt ved at reducere datamængden for det enkelte individ til nogle få talværdier, der repræsenterer ekstremerne for individets bevægelsesadfærd. I Fig. 10 er en sådan analyse foretaget på

adfærdsparemetere tilbagelagt afstand. Fig. 10a viser, hvordan den maksimale tilbagelagte afstand, defineret som det største antal centimeter vandret/5 min, ændres med stigende cypermethrin-eksponering. Figuren indeholder alene data for den maksimale afstand for den eksponerede gruppe, i såvel kontrolperioden (0-30 minutter), hvor baggrundsadfærden registreres, som under eksponering (31-120 minutter). Fig. 10b viser den minimale tilbagelagte afstand, defineret som det mindste antal centimeter vandret/5 min, som funktion af eksponeringskoncentrationen for den eksponerede gruppe i kontrolperioden og under eksponering. Fig. 10c og 10d illustrerer, hvor længe det varer efter påbegyndt eksponering, før den maksimalt henholdsvis minimalt tilbagelagt afstand observeres. Af Fig. 5 fremgår, at varigheden af hyperaktiviteten ændres som funktion af eksponeringsgraden. Varigheden af hyperaktiviteten, beregnet som varigheden af de sammenhængende 5-minutters intervaller, der inkluderer intervallet for den maksimalt tilbagelagte afstand, og hvor den tilbagelagte afstand/5 min er større end 75% af den maksimalt tilbagelagte afstand, er vist som funktion af eksponeringskoncentrationen i Fig. 10e. Ved en cypermethrin-koncentration på 1000 ng/l observeres immobilisering hos nogle individer (Fig. 5). Med stigende koncentration ses immobilisering tidligere, og rammer flere af de eksponerede dyr. Det anvendte kriterie for at klassificere et individ som værende immobiliseret var for *G. pulex*, at individets tilbagelagte afstand i et løbende 30-minutters tidsvindue var mindre end 30 cm/30 min. Dette svarer til kriteriet (gennemsnitlig tilbagelagt afstand <1 cm/min), der blev anvendt til at udelade et dyr fra yderligere dataanalyse på grund af for lav aktivitet i kontrolperioden. Tidspunktet for immobilisering blev bestemt som det første 5-minutters interval i ovennævnte 30-minutters tidsvindue, og fig. 10f viser tiden til immobilisering efter påbegyndt eksponering som funktion af cypermethrin-koncentrationen.

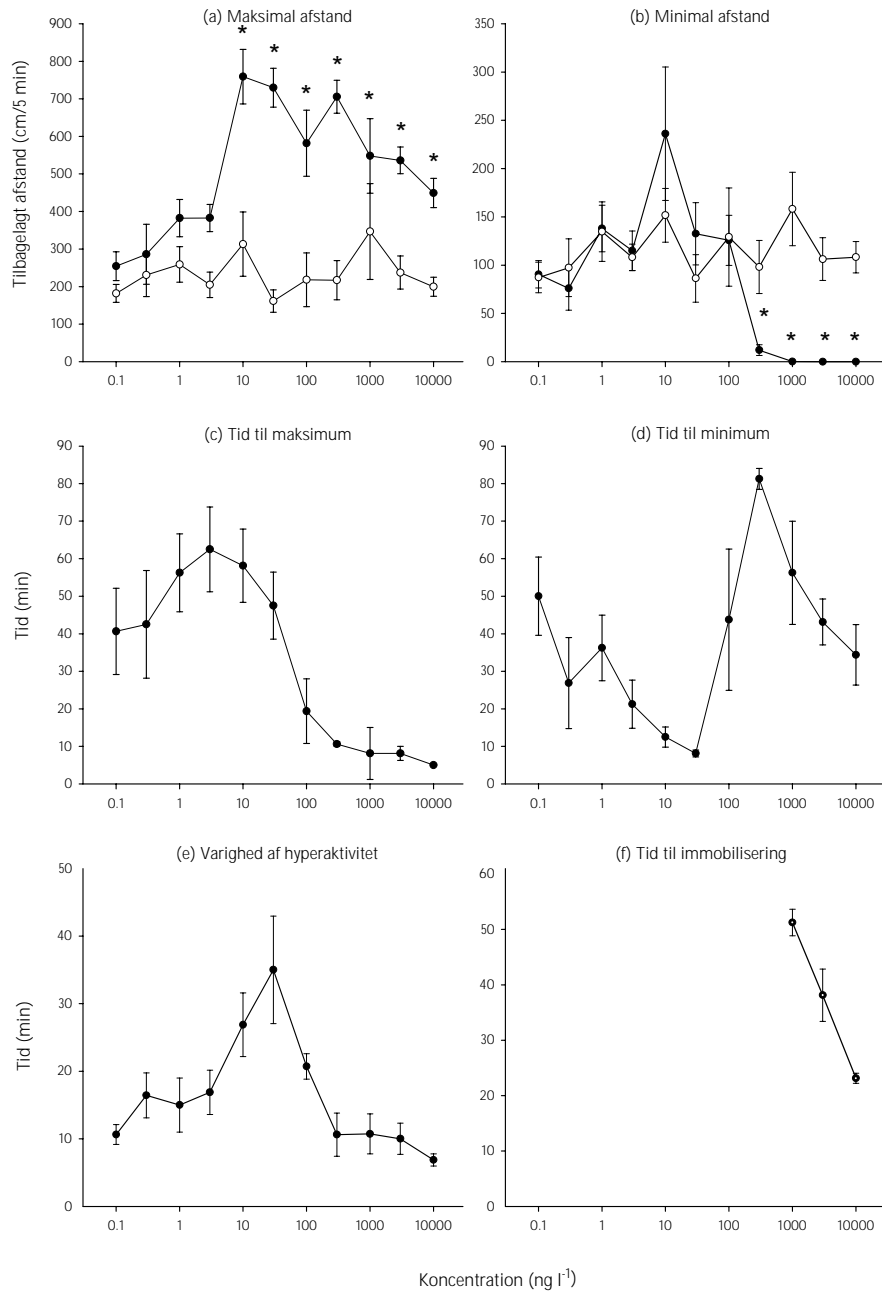


Fig. 10. Koncentrations-respons-sammenhænge ved cypermethrin-eksponering *G. pulex*. (a) Maksimalt tilbagelagt afstand. (b) Minimalt tilbagelagt afstand. (c) Tid til maksimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (d) Tid til minimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (e) Varigheden af hyperaktiviteten. (f) Tid til immobilisering efter påbegyndt eksponering. Åbne symboler: kontrolperioden (0-30 min); lukkede symboler: eksponeringsperioden (31-120 min). Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponeringsperioden. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

3.1.2 Esfenvalerat

Effekten af esfenvalerat på den tilbagelagte afstand hos voksne *G. pulex* er afbildet som funktion af tiden i Fig. 11, og adfærdsresponsen ligner det for cypermethrin observerede. En signifikant effekt af eksponering observeres ved 0,3 ng/l. En markant stigning i den tilbagelagte afstand observeres ved esfenvalerat-koncentrationer ≥ 1 ng/l, indtil et konstant maksimum på ca. 600 cm/5 min nås, efter en times eksponering ved 1 ng/l. Med stigende koncentration når dette hyperaktive maksimumniveau tidligere og tidligere, mens varigheden af maksimumniveauet aftager. Ved højere koncentrationer (≥ 300 ng/l) aftager den tilbagelagte afstand markant, og immobilisering observeres tidligere og tidligere ved koncentrationer ≥ 1000 ng/l.

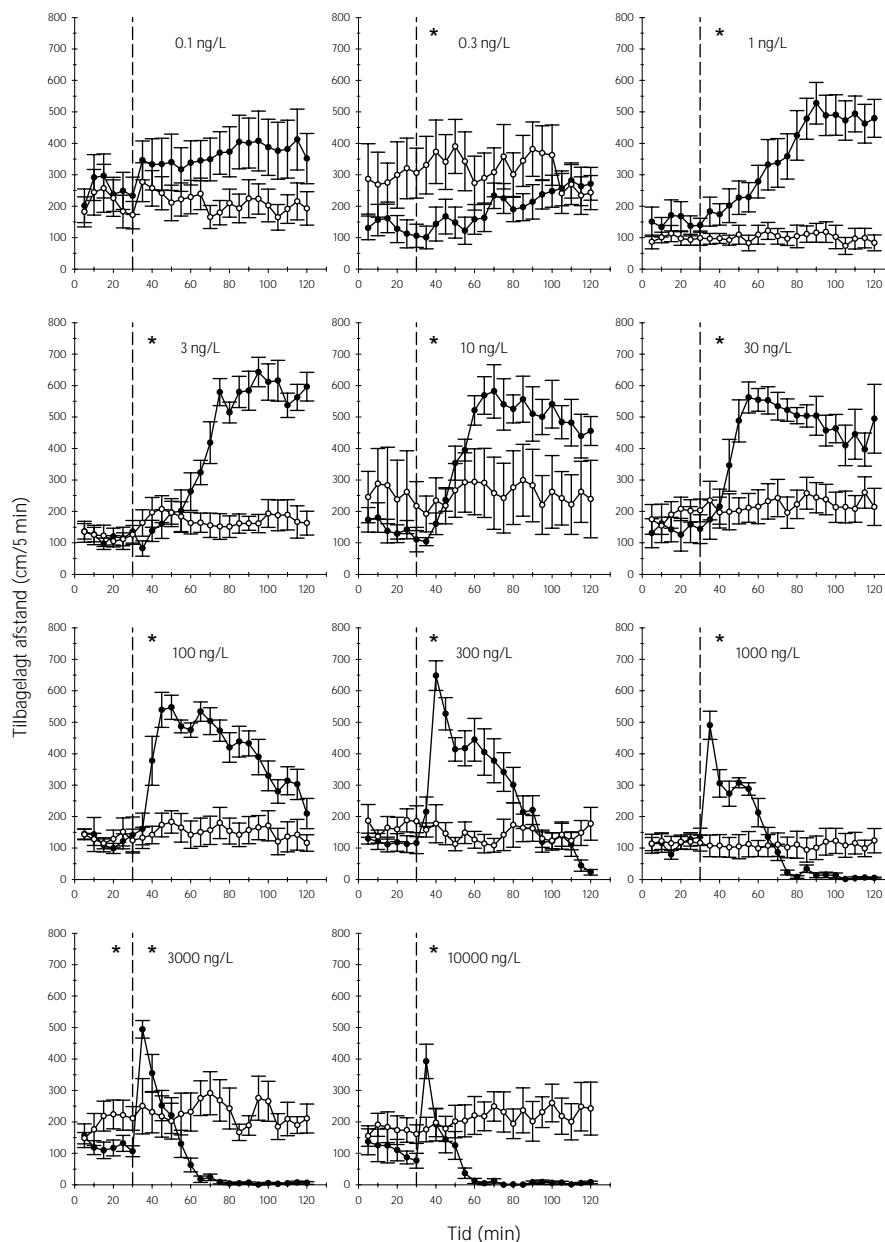


Fig. 11. Effekt af esfenvalerat på tilbagelagt afstand
Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i esfenvalerat-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, n=6-8)

Ændringerne hos *G. pulex* i tilbagelagt afstand som funktion af esfenvalerat-koncentrationen er opsummeret i Fig. 12.

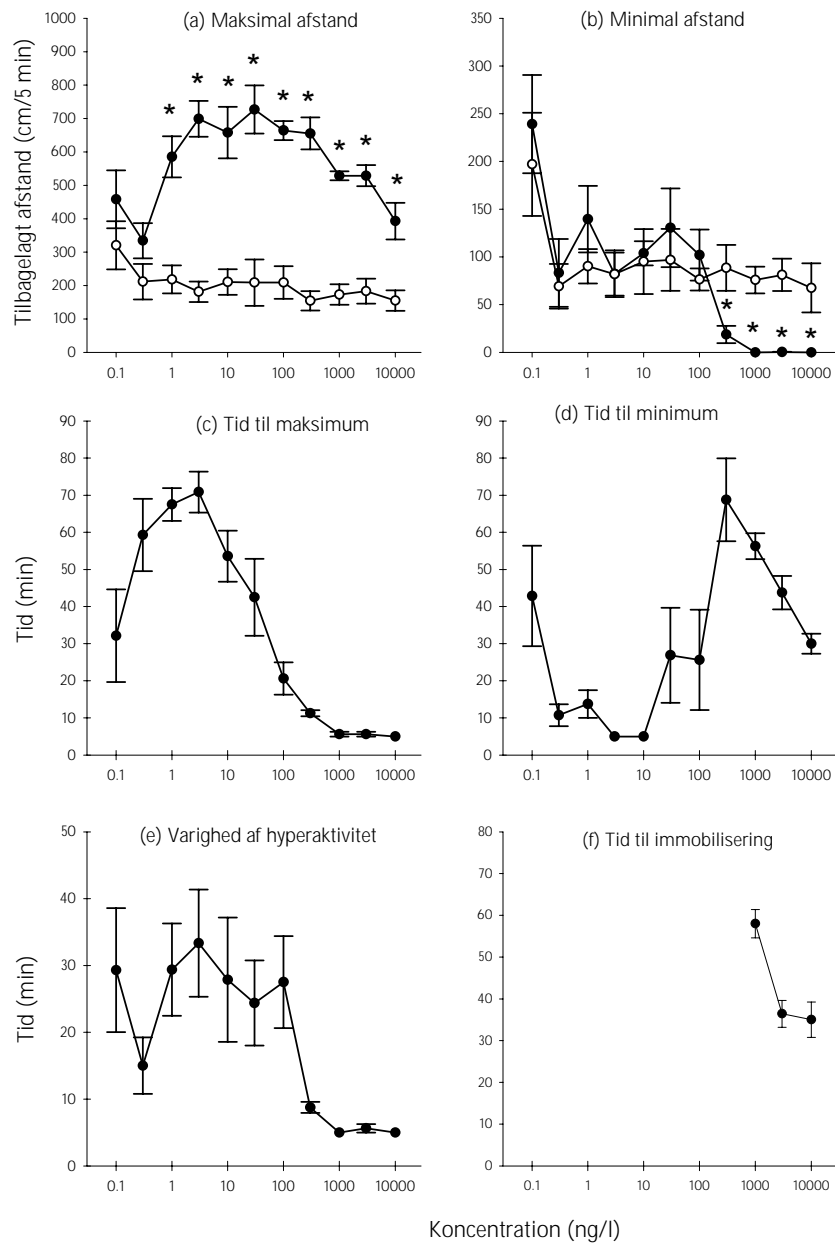


Fig. 12. Koncentrations-respons-sammenhænge ved esfenvalerat-eksponering *G. pulex*. (a) Maksimalt tilbagelagt afstand. (b) Minimalt tilbagelagt afstand. (c) Tid til maksimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (d) Tid til minimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (e) Varigheden af hyperaktiviteten. (f) Tid til immobilisering efter påbegyndt eksponering. Åbne symboler: kontrolperioden (0-30 min); lukkede symboler: eksponeringsperioden (31-120 min). Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponeringsperioden. (Gennemsnit \pm SEM, n=6-8)

Fig. 13 angiver effekten af esfenvalerat på den tilbagelagte afstand hos voksne *Asellus aquaticus* som funktion af tiden. Som for *G. pulex* observeres et bifasisk adfærdsrespons. En signifikant effekt af eksponering blev fundet ved 1 og 3 ng/l, men ikke ved 10 ng/l. Ved esfenvalerat-koncentrationer ≥ 30 ng/l observeres en markant stigning i den tilbagelagte afstand, indtil et konstant maksimum på ca. 125 cm/5 min nås, efter 15 minutters eksponering ved 30 ng/l. Dette hyperaktive maksimumniveau nås tidligere og tidligere med stigende koncentration, mens varighed af maksimumniveauet aftager. Ved højere koncentrationer (≥ 100 ng/l) aftager den tilbagelagte afstand markant, og immobilisering observeres tidligere og tidligere ved koncentrationer ≥ 300 ng/l. For *A. aquaticus* var kriteriet for at klassificere et individ som værende immobiliseret, at individets tilbagelagte afstand i et løbende 30-minutters tidsvindue var mindre end 15 cm/30 min. Dette svarer til kriteriet (gennemsnitlig tilbagelagt afstand $< 0,5$ cm/min), der blev anvendt til at udelade et dyr fra yderligere dataanalyse på grund af for lav aktivitet i kontrolperioden.

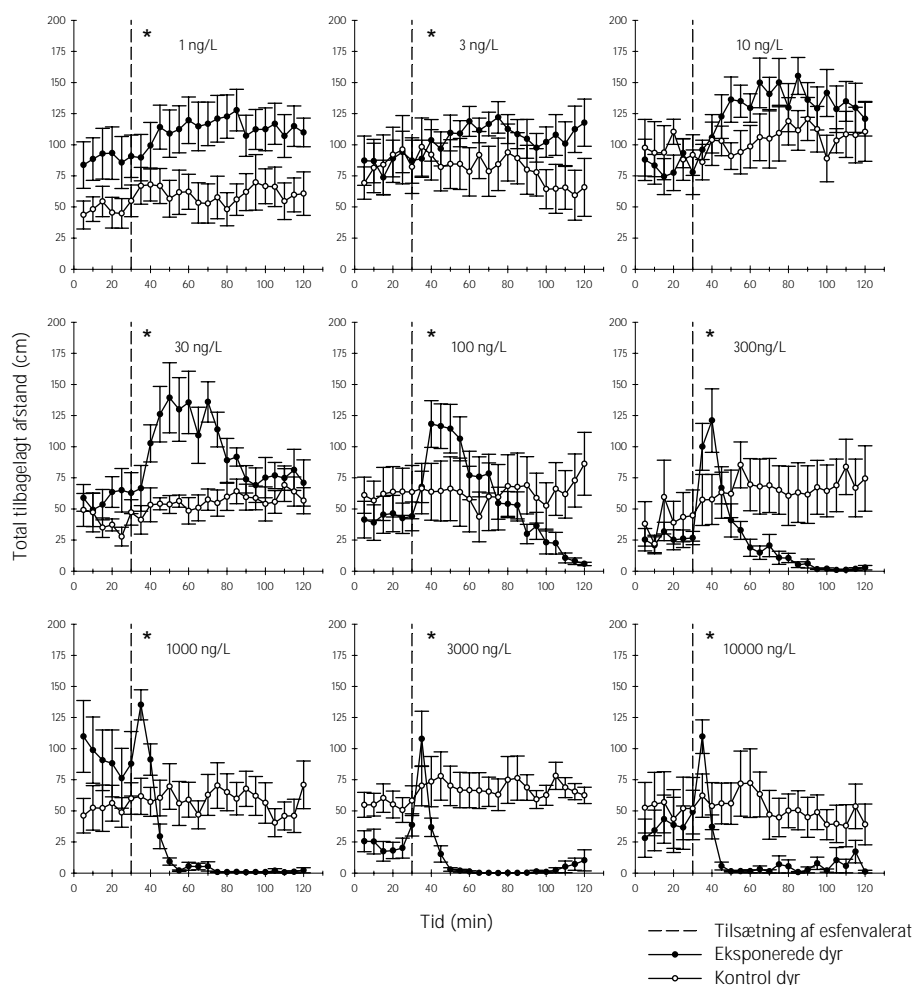


Fig. 13. Effekt af esfenvalerat på tilbagelagt afstand
 Baggrundsadfærden for *A. aquaticus* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i esfenvalerat-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

Ændringerne hos *A. aquaticus* i tilbagelagt afstand som funktion af esfenvalerat-koncentrationen er opsummeret i Fig. 14.

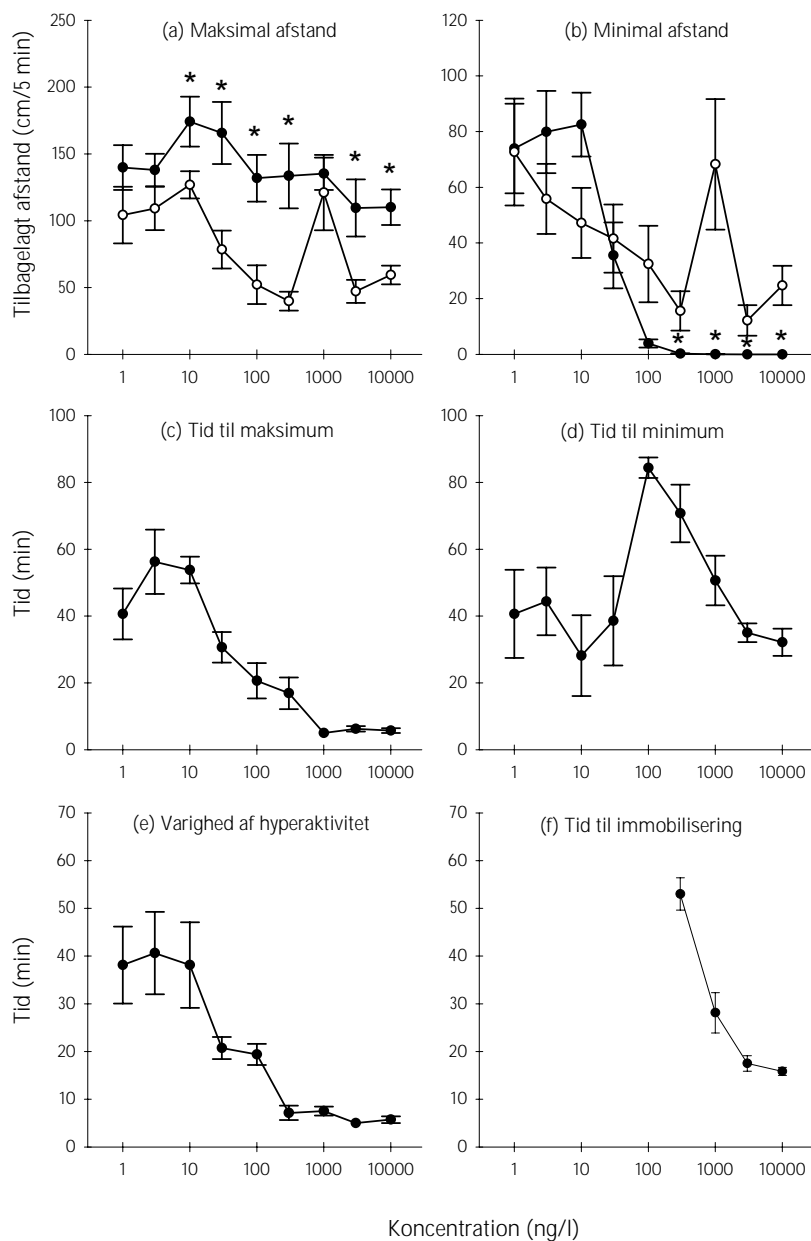


Fig. 14. Koncentrations-respons-sammenhænge ved esfenvalerat-eksponering *A. aquaticus*. (a) Maksimalt tilbagelagt afstand. (b) Minimalt tilbagelagt afstand. (c) Tid til maksimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (d) Tid til minimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (e) Varigheden af hyperaktiviteten. (f) Tid til immobilisering efter påbegyndt eksponering. Åbne symboler: kontrolperioden (0-30 min); lukkede symboler: eksponeringsperioden (31-120 min). Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponeringsperioden. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

3.1.3 Dimethoat

Fig. 15 viser den tilbagelagte afstand hos voksne *G. pulex* eksponeret for en dimethoat-koncentration på 10 mg/l. Der blev ikke observeret adfærdsændringer under eksponering.

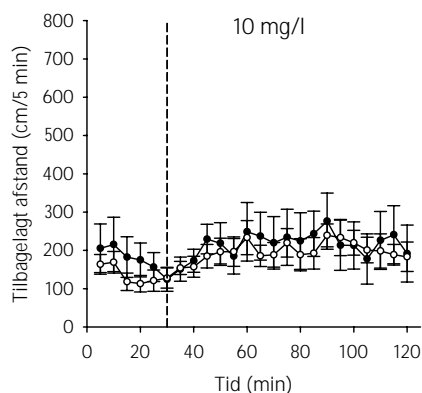


Fig. 15. Effekt af dimethoat på tilbagelagt afstand
Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i dimethoat-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr (n=7); lukkede symboler: eksponerede dyr (n=8). (Gennemsnit ± SEM)

3.1.4 Azoxystrobin

Fig. 16 viser den tilbagelagte afstand hos voksne *G. pulex* eksponeret for en azoxystrobin-koncentration på 100 µg/l. Der blev ikke observeret adfærdsændringer under eksponering.

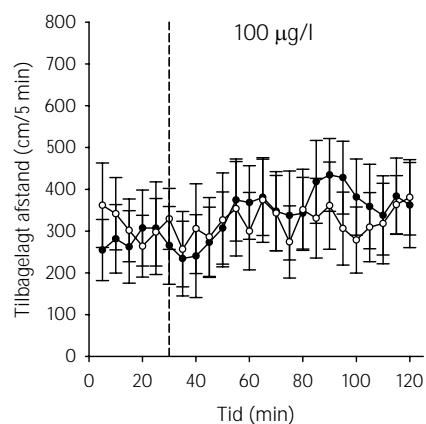


Fig. 16. Effekt af azoxystrobin på tilbagelagt afstand
Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i azoxystrobin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr (n=8); lukkede symboler: eksponerede dyr (n=7). (Gennemsnit ± SEM)

3.2 Relativ følsomhed af juvenile *Gammarus pulex*

Fig. 17 viser effekten af cypermethrin på den tilbagelagte afstand hos juvenile *G. pulex* som funktion af tiden. Resultaterne ligner meget de tilsvarende for voksne *G. pulex*. En signifikant effekt af eksponering blev fundet ved 3 ng/l. Ved lave cypermethrin-koncentrationer (≥ 10 ng/l) observeres en markant stigning i den tilbagelagte afstand, indtil et konstant maksimum på ca. 300-400 cm/5 min nås, efter 30 minutters eksponering ved 10 ng/l. Med stigende koncentration når dette hyperaktive maksimumniveau tidligere og tidligere, mens varighed af maksimumniveauet aftager. Ved højere koncentrationer (≥ 300 ng/l) aftager den tilbagelagte afstand markant, og immobilisering observeres tidligere og tidligere ved koncentrationer ≥ 1000 ng/l.

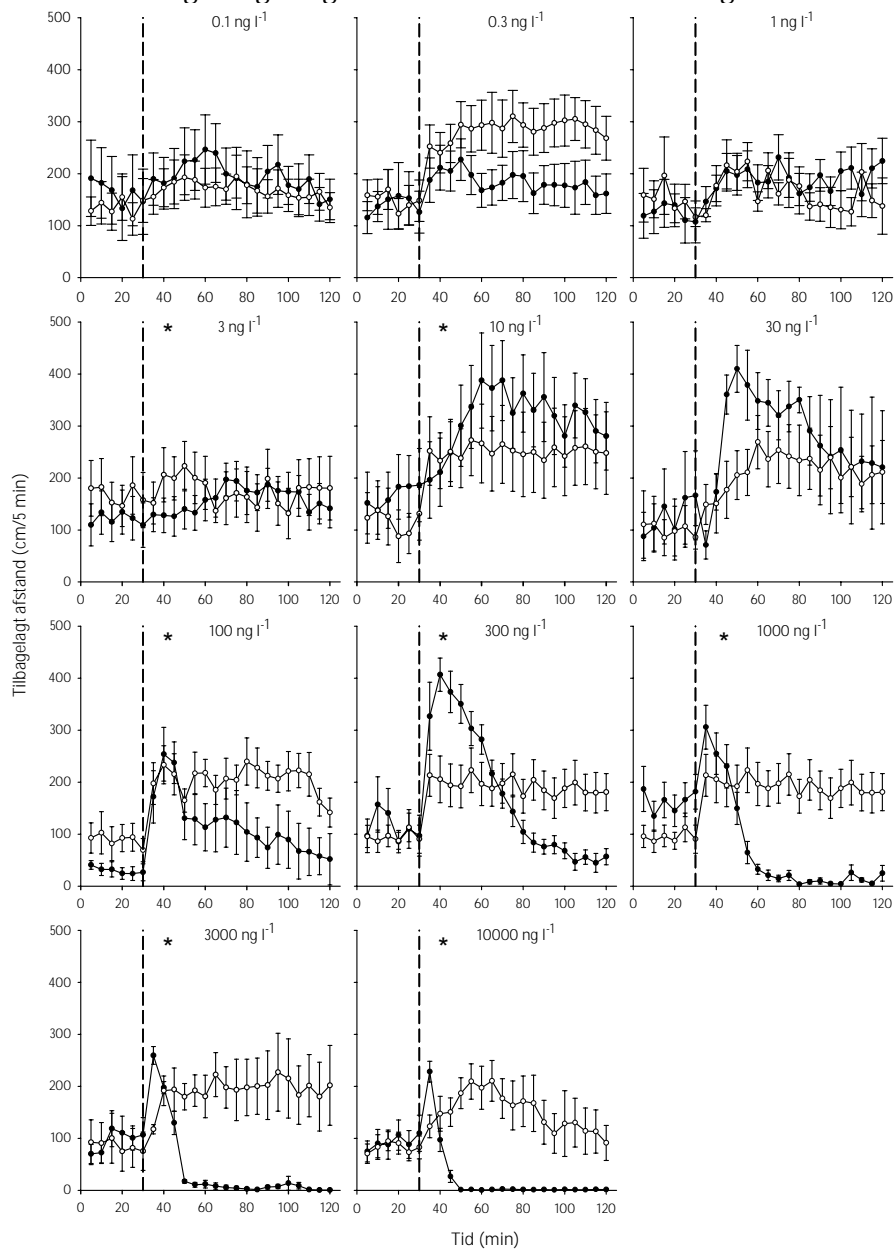


Fig. 17. Effekt af cypermethrin på tilbagelagt afstand
Baggrundsadfærden for juvenile *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i cypermethrin-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, $n=5-8$)

Ændringerne hos juvenile *G. pulex* i tilbagelagt afstand som funktion af cypermethrin-koncentrationen er opsummeret i Fig. 18.

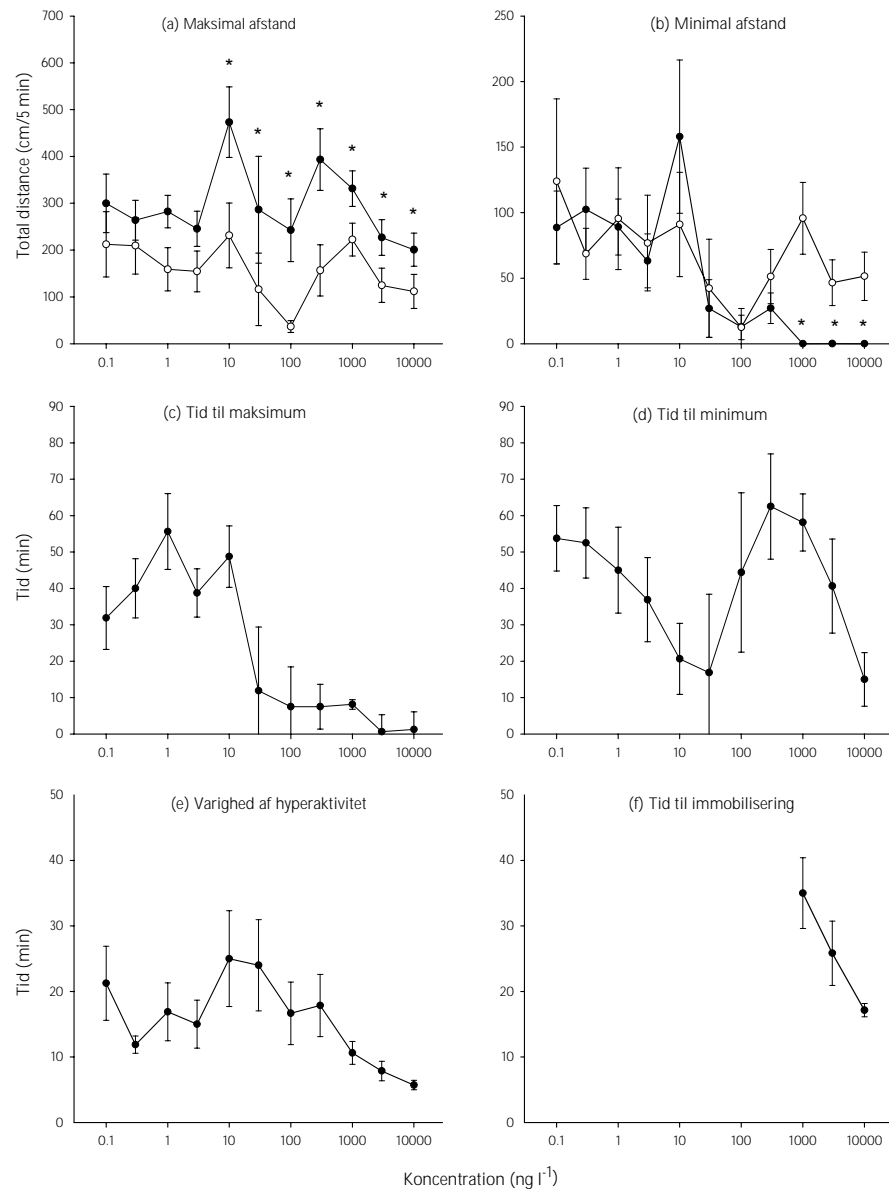


Fig. 18. Koncentrations-respons-sammenhænge ved cypermethrin-eksponering juvenile *G. pulex*. (a) Maksimalt tilbagelagt afstand. (b) Minimalt tilbagelagt afstand. (c) Tid til maksimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (d) Tid til minimalt tilbagelagt afstand efter påbegyndt eksponering. (e) Varigheden af hyperaktiviteten. (f) Tid til immobilisering efter påbegyndt eksponering. Åbne symboler: kontrolperioden (0-30 min); lukkede symboler: eksponeringsperioden (31-120 min). Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponeringsperioden. (Gennemsnit ± SEM, n=5-8)

3.3 Restituering efter esfenvalerat-eksponering

Den tilbagelagte afstand hos voksne *G. pulex* eksponeret for esfenvalerat, og derefter overført til ukontamineret vand, er afbildet som funktion af tiden i Fig. 19. Der er tale om en samlet videosporingstid på 240 minutter, og tidsaksenbruddet ved 120 minutter indikerer, at den indledende 2-timers pulseksponeringsfase efterfølges af en ét-døgns restitueringssfase, inden adfærden i rent vand registreres i tidsrummet 121-240 minutter. I modsætning til det tidligere studie af esfenvalerats akutte adfærdstoksicitet hos *G. pulex* blev der ikke observeret ændringer i bevægelsesadfærden under pulseksponeringen med 1 ng/l. Resultaterne ved højere eksponeringskoncentrationer stemmer overens med de tidligere observerede. Det fremgår af Fig. 19, at kontrolgruppens adfærd tilsyneladende i flere tilfælde ændres fra den indledende 2-timers videosporing til 2-timers sporingen efter restitueringssperioden. Inden for hver 2-timers periode er adfærden dog konstant.

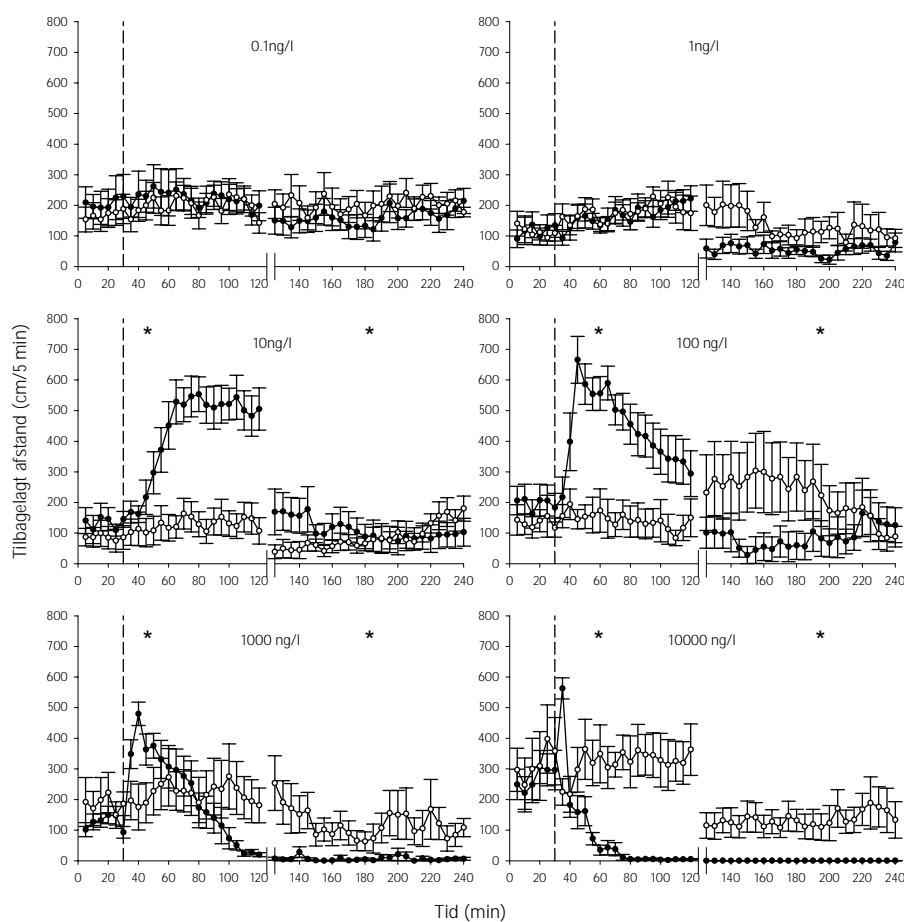


Fig. 19. Tilbagelagt afstand under og efter esfenvalerat-puls
Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i esfenvalerat-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Dernæst blev dyrene overført til ukontamineret vand i en 24-timers restitueringssperiode, hvorefter adfærden blev registreret i en 2-timers periode i ukontamineret vand. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, $n=7-8$)

Der blev udført et tilsvarende restitueringsforsøg med voksne *A. aquaticus*, og effekten af esfenvalerat på den tilbagelagte afstand er afbildet som funktion af tiden i Fig. 20. Adfærdsændringer blev observeret ved ≥ 1 ng/l i overensstemmelse med det tidligere studie af esfenvalerats akutte adfærdstoksicitet. I modsætning til restitueringsforsøget med *G. pulex* var kontrolgruppens adfærd hos *A. aquaticus* relativt konstant ved sammenligning af den indledende 2-timers videosporing og 2-timers sporingen efter restitueringsperioden.

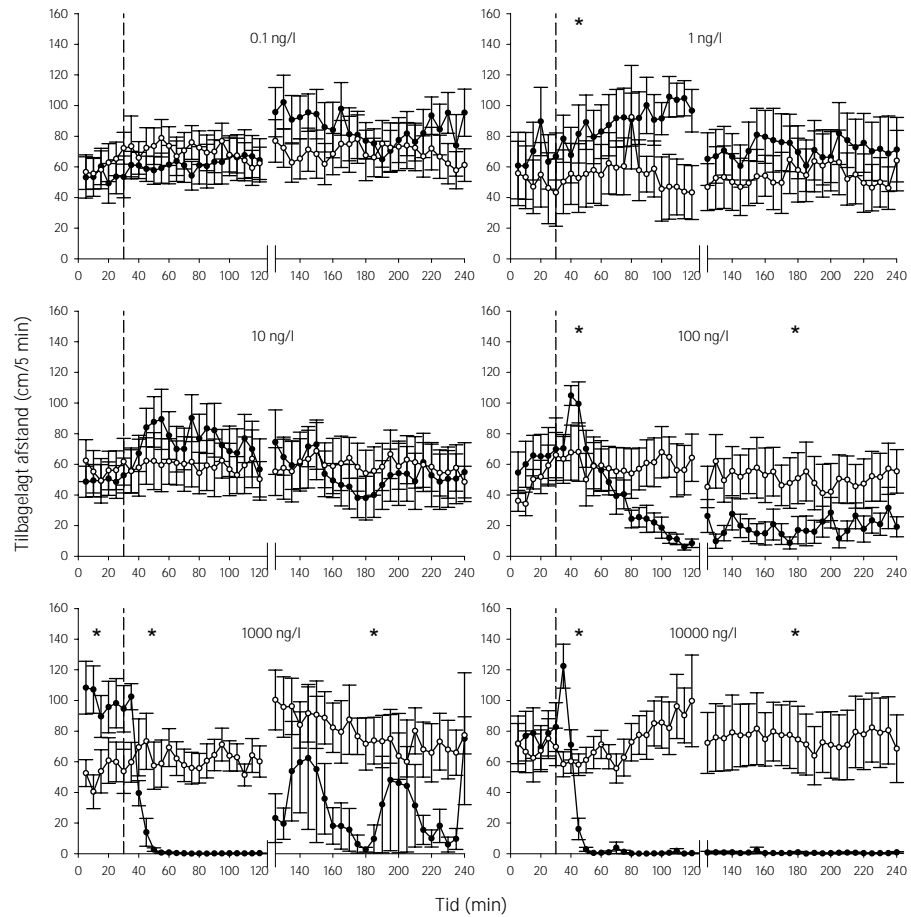


Fig. 20. Tilbagelagt afstand under og efter esfenvalerat-puls. Baggrundsadfærden for *A. aquaticus* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i esfenvalerat-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Dernæst blev dyrene overført til ukontamineret vand i en 24-timers restitueringsperiode, hvorefter adfærden blev registreret i en 2-timers periode i ukontamineret vand. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. (Gennemsnit \pm SEM, $n=7-8$)

3.4 Kombinationseksponering

Den tilbagelagte afstand hos voksne *G. pulex* eksponeret for en kombination af pyrethroiderne cypermethrin og esfenvalerat er afbildet som funktion af tiden i Fig. 21. Der blev generelt ikke, ved sammenligning af den kombinationseksponerede gruppe med de to enkeltstofeksponerede grupper, fundet signifikant forskelle. En signifikant forskel mellem gruppen eksponeret for 5 ng cypermethrin/l i kombination med 5 ng esfenvalerat/l og gruppen eksponeret for 10 ng esfenvalerat/l skyldes et enkelt, tilsyneladende atypisk individ i sidstnævnte gruppe.

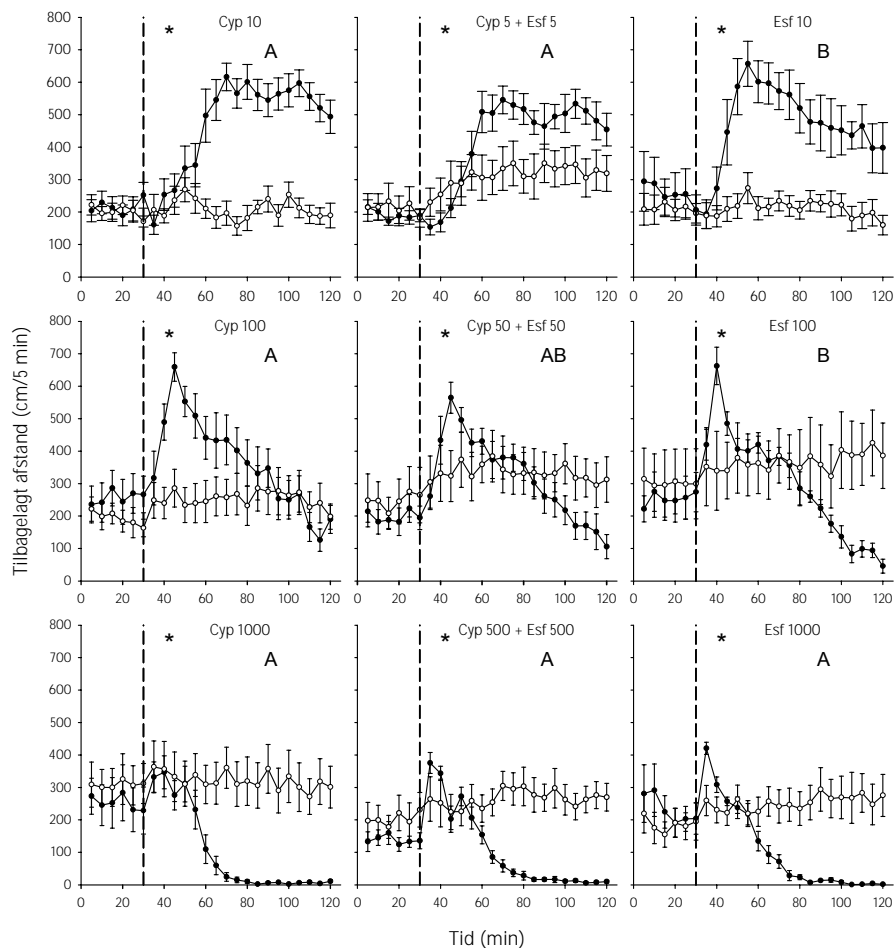


Fig. 21. Effekt af cypermethrin og esfenvalerat på tilbagelagt afstand. Baggrundsadfærden for *G. pulex* i ukontamineret vand blev registreret i 30 min, og adfærden i pyrethroid-kontamineret vand dernæst fulgt i yderligere 90 min. Åbne symboler: kontrol dyr; lukkede symboler: eksponerede dyr. Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponerede dyr. Ved sammenligning af de eksponerede grupper inden for hvert pyrethroid-niveau (10, 100 eller 1000 ng/l) er eksponerede grupper, der ingen bogstaver har fælles, signifikant forskellige. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

3.5 Mortalitätsstudier

3.5.1 Cypermethrin

Resultaterne fra mortalitetsstudiet, hvor juvenile og voksne *G. pulex* er blevet eksponeret for cypermethrin, er angivet i Fig. 22.

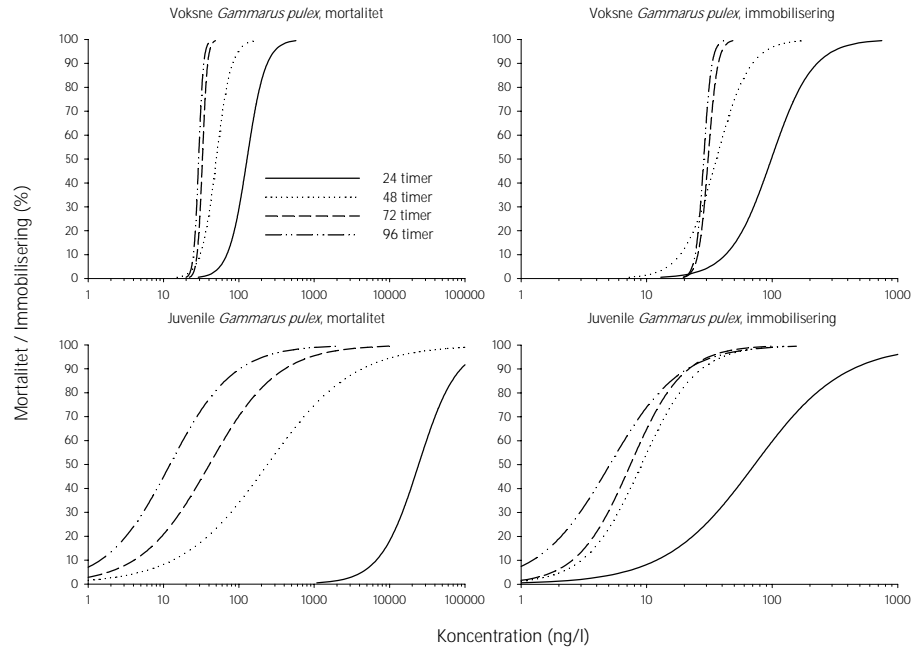


Fig. 22. Effekt af cypermethrin på mortalitet og immobilisering

3.5.2 Esfenvalerat

Resultaterne fra mortalitetsstudiet, hvor juvenile og voksne *G. pulex* samt voksne *A. aquaticus*, er blevet eksponeret for esfenvalerat, er angivet i Fig. 23.

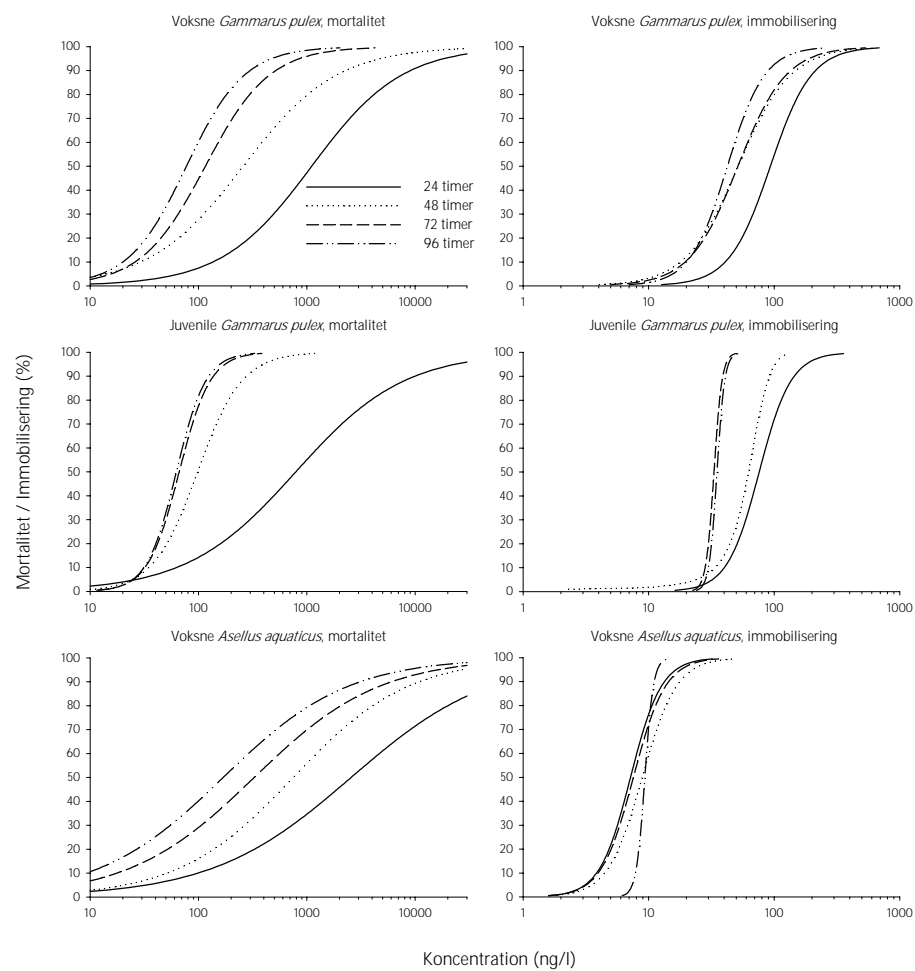


Fig. 23. Effekt af esfenvalerat på mortalitet og immobilisering

3.5.3 Dimethoat

Resultaterne fra mortalitetsstudiet, hvor juvenile og voksne *G. pulex* er blevet eksponeret for dimethoat, er angivet i Fig. 24.

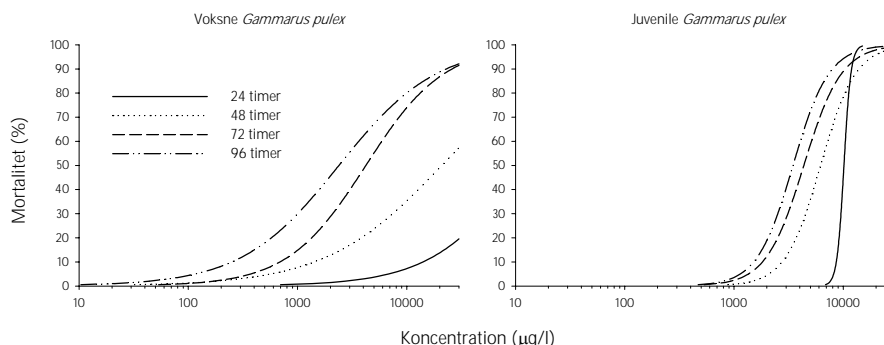


Fig. 24. Effekt af dimethoat på mortalitet

3.6 Sammenligning af adfærdstoksicitet og mortalitet

De observerede adfærsændringers potentiale som biomarkør for subletal pesticideksponering og/eller -effekt kan vurderes ud fra en sammenligning med mortalitetsstudierne. Følsomhed af det akutte adfærdstoksikologiske respons er i Tabel 7 sammenlignet med pesticidernes effekt på mortalitet og immobilisering efter 96 timers eksponering.

Tabel 7 Relativ følsomhed af det adfærdstoksikologiske respons under en 90-minutters eksponering, mortalitet (LC₅₀-96 timer) og immobilisering (EC₅₀-96 timer) hos *G. pulex* (*Gp*) og *A. aquaticus* (*Aa*)

Forsøg	Art	Pesticidkoncentration (µg/l)			
		Cypermethrin	Esfenvalerat	Dimethoat	Azoxystrobin
Videosporing					
LOEC	Voksne <i>Gp</i>	0.010	0.0003	> 10000	> 100
	Juvenile <i>Gp</i>	0.003	-	-	-
	Voksne <i>Aa</i>	-	0.001	-	-
Hyperaktivitet	Voksne <i>Gp</i>	0.010	0.001	> 10000	> 100
	Juvenile <i>Gp</i>	0.010	-	-	-
	Voksne <i>Aa</i>	-	0.030	-	-
Immobilisering	Voksne <i>Gp</i>	1.0	1.0	> 10000	> 100
	Juvenile <i>Gp</i>	1.0	-	-	-
	Voksne <i>Aa</i>	-	0.30	-	-
Mortalitetsstudie					
Mortalitet (LC ₅₀ -96 timer)	Voksne <i>Gp</i>	0.029	0.077	2400	-
	Juvenile <i>Gp</i>	0.012	0.063	3480	-
	Voksne <i>Aa</i>	-	0.169	-	-
Immobilisering (EC ₅₀ -96 timer)	Voksne <i>Gp</i>	0.029	0.043	-	-
	Juvenile <i>Gp</i>	0.005	0.035	-	-
	Voksne <i>Aa</i>	-	0.009	-	-

4 Diskussion

4.1 Pesticider og bevægelsesadfærd i laboratoriet

Det primære formål med projektet var at opbygge og anvende et computerstyret videosporingssystem til kvantificering af pesticiders effekt på bevægelsesadfærden hos vandløbsinvertebrater i laboratoriet. Studier af dyrenes baggrundsadfærd blev gennemført for at optimere det eksperimentelle design med henblik på at kunne detektere ændringer i bevægelsesadfærd forårsaget af pesticideksponering. Nærværende projekt havde ikke til formål at kortlægge invertebraternes naturlige adfærd. Videosporingssystemet blev i projektet anvendt til tre typer forsøg: til test af pesticiders akutte adfærdstoksicitet, til restitueringsstudier, d.v.s. studier af evnen til at komme sig efter en kortvarig pesticideksponering, og til et kombinationseksponeringsforsøg.

De gennemførte videospøringsforsøg med pyrethroiderne cypermethrin og esfenvalerat på såvel voksne *Gammarus pulex* og *Asellus aquaticus* som juvenile *G. pulex* viser entydigt, at dyrene efter få minutter eksponering for lave, miljørealistiske pyrethroidkoncentrationer udviser et maksimalt, hyperaktivt adfærdsrespons, der opretholdes så længe som muligt. Ved højere eksponeringskoncentrationer efterfølges hyperaktiviteten af immobilisering. Lignende effekter (hyperaktivitet efterfulgt af immobilisering) er blevet observeret en time efter påbegyndt eksponering hos rygsvømmere (Notonectidae) og hvirvlere (Gyrinidae) i et mesokosmos-studie af Farmer et al. (1995), som følge af pyrethroid-eksponering med lambda-cyhalothrin og cypermethrin.

Hyperaktivitet og mortalitet (LC_{50} -96 timer) blev observeret ved lavere esfenvalerat-koncentrationer hos *G. pulex* end hos *A. aquaticus* (Tabel 7). *G. pulex* regnes generelt for værende mere følsom end *A. aquaticus* overfor toksiske forbindelser (Mulliss et al. 1996; Wogram & Liess 2001), og resultaterne stemmer overens med et laboratoriestudie af Stephenson (1982), hvor en række fiske- og invertebratarter, herunder *G. pulex* og *A. aquaticus*, blev eksponeret for cypermethrin, og med ovennævnte mesokosmos-studie af Farmer et al. (1995), hvor de to arter ligeledes blev studeret.

På trods af at hyperaktivitet og mortalitet hos *G. pulex* optrådte ved lavere esfenvalerat-koncentrationer end hos *A. aquaticus*, var *A. aquaticus* mere følsom med hensyn til immobilisering (Tabel 7), hvilket også blev observeret af Stephenson (1982). I restitueringsforsøget blev adfærden efter en enkelt-puls-eksponering med esfenvalerat registreret for at vurdere, hvorvidt dyrene er i stand til at komme sig igen inden for en 24-timers periode i ukontamineret vand. På baggrund af observationer konkluderes følgende for såvel *G. pulex* som *A. aquaticus*. Ved lavere esfenvalerat-koncentrationer, hvor hyperaktivitet men ikke immobilisering observeres, er adfærdsresponsen reversibelt, og dyrene er efter en restitueringsperiode på 24 timer tilsyneladende i stand til at vende tilbage til en bevægelsesadfærd, der ligner den, der registreres i de indledende 30 minutter. Ved højere esfenvalerat-koncentrationer, hvor hovedparten af dyrene immobiliseres i løbet af eksponeringsperioden, er

adfærdsændringen irreversibel, og immobiliserede individer er efter en restitueringsperiode på 24 timer i ukontamineret vand døde eller fortsat immobile. For endeligt at kunne afgøre hvorvidt individer, der efter 24 timer i ukontamineret vand stadig er levende, men immobiliserede, er i stand til at komme sig, ville det sandsynligvis være nødvendigt at forlænge observationsperioden, da restitueringsprocessen f.eks. for jagtedderkopper (*Pardosa amentata*) eksponeret for cypermethrin varede mindst 9 dage (Baatrup & Bayley 1993).

Der blev ikke fundet markante forskelle i det akutte adfærdsrespons mellem juvenile og voksne *G. pulex* under cypermethrin-eksponering, hverken med hensyn til hyperaktivitet eller immobilisering inden for en 90-minutters eksponeringsperiode (Tabel 7). Mortalitetstudierne viste en tendens til, at de juvenile *G. pulex* ved en 96-timers eksponering for cypermethrin eller esfenvalerat var mere følsomme end voksne individer, både med hensyn til mortalitet og immobilisering (Tabel 7). Dette er det modsatte af situationen efter 24 timers eksponering (Fig. 22-23). Der findes i litteraturen kun få studier af den aldersspecifikke mortalitet. Maltby (1995) fandt for såvel *G. pulex* som *A. aquaticus*, at juvenile individer var mere tolerante end voksne under en 24-timers eksponering for hypoxi eller ammoniak. Et andet studie har vist, at juvenile individer af den marine copepod *Acartia tonsa* var 28 gange mere følsomme end voksne efter 96 timers eksponering for cypermethrin, med LC₅₀-værdier på henholdsvis 5 ng/l og 142 ng/l (Medina et al. 2002). McCahon & Pascoe (1988) fandt, at juvenile *G. pulex* var væsentligt mere følsomme over for cadmium-eksponering end voksne. I nærværende rapport er juvenile *G. pulex* efter 24 timers dimethoat-eksponering mere følsomme med hensyn til mortalitet end voksne, mens det modsatte er gældende efter 96 timer. Det er på baggrund af ovennævnte undersøgelser vanskeligt at udtale sig om den relative følsomhed af juvenile og voksne *G. pulex*.

En række kvalitative ændringer i bevægelsesadfærden blev bemærket under eksponeringsforsøgene. Hos *G. pulex* blev det observeret, at den markante stigning i tilbagelagt afstand som følge af pyrethroid-eksponering skyldtes en væsentlig forøgelse af tiden tilbragt med svømning i vandoverfladen. Kontroldyrenes svømmeadfærd foregik primært langs bunden af petriskålene. Lignende effekter på svømmeadfærd blevet fundet i et mesokosmosstudie af Pedersen (1999), der observerede en markant forøget hyperaktivitet i vandoverfladen hos især vandkalve (Dytiscidae) og bugsvømmere (Corixidae) efter 1½ times esfenvalerat-eksponering ved 35 ng/l.

For *A. aquaticus* blev det observeret, at esfenvalerat-eksponering fører til lammelse af det bagerste benpar med en reduktion i den tilbagelagte afstand til følge, før egentlig immobilisering indtræder. En tilsvarende lammelse af bagbenene som følge af cypermethrin-eksponering er blevet observeret hos jagtedderkoppen *P. amentata*, og tilskrevet påvirkning af bagbenenes flexormuskler (Baatrup & Bayley 1993). Selv om en tilsvarende lammelse af baglemmerne ikke blev observeret hos *G. pulex*, kunne en lignende effekt muligvis forklare tabet af evnen til at opretholde koordineret svømmeadfærd.

Formålet med forsøget, hvor voksne *G. pulex* blev eksponeret for en kombination af pyrethroiderne cypermethrin og esfenvalerat, var at illustrere videosporingssystemets potentiale i studiet af kombinationseffekter, og ikke at teste en given miljørelevant pesticidkombination. De to pyrethroider havde i enkeltstof-eksponeringsforsøgene vist sig at have sammenlignelige effektkoncentrationer, hvilket blev bekræftet af kombinationsstudiet.

Dimethoat og azoxystrobin havde, selv ved høje eksponeringskoncentrationer, ingen effekt på bevægelsesadfærden hos *G. pulex* (Tabel 7). I studier af de terrestriske invertebrater, bænkebidere *Porcellio scaber* (Isopoda) og springhalen *Folsomia candida*, forårsagede dimethoat henholdsvis hyperaktivitet og reduceret bevægelsesaktivitet (Bayley 1995; Sørensen et al. 1995; Bayley & Baatrup 1996). I nærværende projekt havde dimethoat-koncentrationer på op til 10 mg/l ingen effekt på bevægelsesadfærden hos *G. pulex*. En mulig årsag til en manglende påvirkning af bevægelsesadfærden kan findes i dimethoats fysisk-kemiske egenskaber; dimethoat er i sammenligning med de øvrige anvendte pesticider meget vandopløselig ($\text{Log } K_{ow}=0,78$) og optages eventuelt kun meget vanskeligt i akvatiske invertebrater, da pesticidet forbliver i vandfasen.

4.2 Pesticider og driftadfærd i felten

I forbindelse med monitoring af vandløbsforurening i Danmark anvendes invertebratfaunaens sammensætning til biologisk bedømmelse af vandløbenes miljøtilstand v.h.j.a. Dansk Vandløbsfaunaindeks (Miljøstyrelsen 1998). Faunasammensætningen kan påvirkes af en række faktorer, herunder vandløbenes fysiske forhold og tilledningen af spildevand. Studier har endvidere vist, at pulskontaminering af vandløb med pesticider i forbindelse med almindelig landbrugsdrift kan føre til effekter på populations- og økosystemniveau (oversigt i Schulz & Liess 1999b). Pesticidtilledningen til vandløbene sker typisk, når en marksprøjtning efterfølges af betydelige mængder nedbør, hvorved pesticiderne transporteres til vandløbet ved overfladisk afstrømning eller eventuelt via drænrør og giver anledning til kortvarige pesticidpulse. Pesticider kan endvidere tilføres vandløb ved vinddrift, via grundvandet eller ved ulovlige forureningshændelser, f.eks. direkte oversprøjtning eller udslip fra punktkilder som vaske- og fyldepladser. Betydningen af disse ulovlige tilledninger fra punktkilder er endnu kun ufuldstændigt belyst.

Et af de centrale fænomener, der observeres i forbindelse med pesticidpulse i vandløb, er drift, hvor en lang række af vandløbsinvertebrater føres med strømmen, og helt eller delvist kan forsvinde fra den belastede vandløbsstrækning. Kontaminering med insekticiderne methoxychlor, cypermethrin, permethrin, fenvalerat og parathion-ethyl har i feltundersøgelser forårsaget drift hos en række ferskvandsinvertebrater (Crossland et al. 1982; Scherer & McNicol 1986; Dossdall & Lehmkuhl 1989; Kreutzweiser & Sibley 1991; Sibley et al. 1991; Davies & Cook 1993; Liess & Schulz 1999; Schulz & Liess 1999a; Schulz & Dabrowski 2001). I forbindelse med disse feltstudier har pyrethroid-kontaminering af vandløb som følge af almindelig landbrugsdrift ført til drift hos en række vandløbsinvertebrater ved pyrethroid-koncentrationer ned til ca. 100 ng/l (Crossland et al. 1982; Sibley et al. 1991; Davies & Cook 1993; Schulz & Liess 1999a, b). Schulz & Liess (1999b) undersøgte i et feltstudie effekten af tre insekticidafstrømningshændelser (to med parathion-ethyl og en med fenvalerat) og fandt, at 8 ud af 11 ferskvandsarter helt forsvandt efter afstrømningshændelserne, mens de resterende tre arter havde en markant nedgang i populationstæthed. Af de 8 mest påvirkede arter var 5 endnu efter en 5-måneders restitueringsfase ikke blevet observeret. Sibley et al. (1991) derimod udsatte et makroinvertebratsamfund for en enkelt permethrinpuls og viste, at for de fleste påvirkede invertebratarter var der efter en kun 6 uger lang

restitueringsfase ingen forskel mellem de behandlede stationer og kontrolstationerne.

4.3 Miljørelevans – kobling fra laboratorie til felt

Det er på baggrund af de hidtil gennemførte studier ikke muligt at ekstrapolere fra de akutte adfærdsændringer i laboratoriet til drift i felten. Cypermethrin er ikke inkluderet i de standardmetoder, man anvender til pesticidmonitoring i Danmark, og der foreligger ingen data for vandkoncentrationer. For esfenvalerat er der i Århus Amt målt op til 660 ng/l i vandløb. 20% af alle udtagne vandprøverne indeholdt mere end 100 ng/l (Århus Amt 1999). I Fyns Amt er der målt esfenvalerat-koncentrationer på op til 200 ng/l i vandløb (Fyns Amt 1997). I parentes bemærket er 100 ng/l, d.v.s. 0,1 µg/l, grænseværdien for enkeltstoffer i drikkevand i Danmark, og 10 ng/l er kravet til detektionsgrænse for de målemetoder, man anvender i overvågningsprogrammerne. De danske esfenvalerat-målinger ville i de i nærværende rapport beskrevne adfærdstoksikologiske studier medføre hyperaktivitet hos såvel *G. pulex* som *A. aquaticus*. For *G. pulex* vedkommende foregår hyperaktiviteten som aktiv svømning i vandoverfladen, og det er sandsynligt, at en sådan overfladeaktivitet vil føre til drift i et vandløb. Hyperaktivitetens betydningen for drift hos *A. aquaticus* er mindre entydig, ligesom det er vanskeligt at vurdere den hos såvel *G. pulex* som *A. aquaticus* observerede immobiliserings betydning for drift. Endelige kunne ændringer i bevægelsesadfærd påvirke dyrenes evne til at søge føde og mager eller til at undgå rovdyr.

4.4 Metodeevaluering og perspektivering

De overordnede konklusioner på projektet er, at der er udviklet en omkostnings-effektiv metode til evaluering af pesticiders subletale effekter på akvatiske dyr. Markante ændringer i bevægelsesadfærd observeres efter få minutter ved lave, miljørealistiske pyrethroid-koncentrationer; koncentrationer, hvorved mortalitet først observeres efter dages kronisk eksponering. Videosporingsystemet er med succes blevet anvendt til 3 typer forsøg, nemlig akut adfærdstoksikologi, restitution efter eksponering og kombinationseksponering. Systemets maksimale kapacitet er en samtidig registrering af 16 individer (8 kontrol dyr + 8 eksponerede dyr) i separate arenaer. Det anvendte forsøgsdesign med kun en forsøgsrunde pr. pyrethroid-koncentration er v.h.j.a. statistiske styrkeberegninger vist at være tilstrækkeligt (Bilag C).

De i projektet anvendte metoder til automatiseret adfærdsregistrering er nu så veletablerede, at videosporingsystemet kan producere resultater, der umiddelbart kan anvendes til at bedømme risikoen for ferskvandsinvertebrater ved spild eller afledning af pesticider til vandløb. Systemet er i stand til at generere adfærdstoksikologiske koncentrations-respons data og vil bl.a. kunne anvendes som et screeningsværktøj for myndigheder. Med systemet er det muligt at undersøge kombinationseffekter, hvor forsøgsdyr udsættes for miljørealistiske pesticidblandinger. Efter en fremtidig metodevalidering i felten, vurderes det anvendte system endvidere potentielt at kunne anvendes i forbindelse med monitoring af vandløb.

5 Referencer

Andersen, TH, N Friberg, HO Hansen, TM Iversen, D Jacobsen, L Krojgaard. 1993. The effects of introduction of brown trout (*Salmo trutta* L) on *Gammarus pulex* L drift and density in 2 fishless Danish streams. Archov fur hydrobiologie 126, 361-371.

Baatrup, E, M Bayley. 1993. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on the locomotor activity of the wolf spider *Pardosa amentata* quantitative analysis employing computer automated video tracking. Ecotox. Environ. Safe. 26, 138-152.

Bayley, M. 1995. Prolonged effects of the insecticide dimethoat on locomotor behaviour in the woodlouse, *Porcellio scaber* Latr. (Isopoda). Ecotoxicology 4, 79-90.

Bayley, M, E Baatrup, U Heimbach, P Bjerregaard. 1995. Elevated copper levels during larval development cause altered locomotor behavior in the adult carabid beetle *Pterostichus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). Ecotoxicol. Environ. Safe. 32, 166-170.

Bayley, M, E Baatrup. 1996. Pesticide uptake and locomotor behaviour in the woodlouse: An experimental study employing video tracking and C 14 labelling. Ecotoxicology 5, 35-45.

Bayley, M, E Baatrup, P Bjerregaard. 1997. Woodlouse locomotor behaviour in the assessment of clean and contaminated field sites. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2309-2314.

Bengtsson, G. 1982. Energetic costs of amino-acids exudation in the interaction between the predator *Gammarus pulex* L and the prey *Asellus aquaticus* L. J. Chem. Ecol. 8, 1271-1281.

Bichel-udvalget. 1999. Rapport fra Underudvalget for Miljø og Sundhed. 244 s.

Braggio, S, RJ Barnaby, P Grossi, M Cugola. 1996. A strategy for validation of bioanalytical methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 375-388.

Causon, R. 1997. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoints and discussion. J. Chromatogr. B. 689, 175-180.

Crossland, NO, SW Shires, D Bennett. 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. III. Fate and biological effects of spray drift deposits in fresh-water adjacent to agricultural Land. Aquatic toxicology 2, 253-270.

Davies, PE, LSJ Cook. 1993. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by Cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. Aquatic toxicology 27, 201-224.

- Depledge MH, A Aagaard, P Gyorkös. 1995. Assessment of trace-metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 19-27.
- Dosdall, LM, DM Lehmkuhl. 1989. Drift of aquatic insects following methoxychlor treatment of the Saskatchewan river system Canada. *Can. Ent.* 121, 1077-1096.
- Farmer, D, IR Hill, SJ Maund. 1995. A Comparison of the fate and effects of 2 Pyrethroid Insecticides (Lambda-Cyhalothrin and Cypermethrin) in Pond Mesocosms. *Ecotoxicology* 4, 219-244.
- Felding, G, BB Mogensen, JB Sørensen, AC Hansen. 1997. Surface run-off of pesticides from farmland to streams and lakes. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 29, 76 s.
- Friberg, N. 2000. Små dyr – store samspil. I: Sand-Jensen, K, N Friberg (eds.). 2000. *De strømmende vande*. Gads Forlag, København. s116-125.
- Fyn County. 2001. Aquatic environment of Fyn, Denmark, 1976-2000. Streams and lakes, coastal waters, groundwater, environmental impact of wastewater and agriculture. Fyn County, Odense, Denmark. pp. 148.
- Fyns Amt. 1997. De fynske vandløb. *Vandmiljøovervågning. Tema: Ferskvand*. 210s.
- Fyns Amt. 2003. *Vandløbenes miljøtilstand 2002*.
- Gee, JR. 1988. Population dynamics and morphometrics of *Gammarus pulex* L – evidence of seasonal food limitations in a freshwater detritivore. *Freshwater Biology* 19, 333-343.
- Girling, AE, D Pascoe, CR Janssen, A Peither, A Wenzel, H Schäfer, B Neumeier, GC Mitchell, EJ Taylor, SJ Maund, JP Lay, I Jüttner, NO Crossland, RR Stephenson, G Persoone. 2000a. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 45, 148-176.
- Girling, AE, L Tattersfield, GC Mitchell, NO Crossland, D Pascoe, SJ Blockwell, SJ Maund, EJ Taylor, A Wenzel, CR Janssen, I Jüttner. 2000b. Derivation of predicted no-effect concentrations for lindane, 3,4-dichloroaniline, atrazine and copper. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 46, 148-162.
- Graca, MAS, L Maltby, P Calow. 1993a. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. 2. Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia* 96, 304-309.
- Graca, MAS, L Maltby, P Calow. 1993b. Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. 1. Feeding strategies. *Oecologia* 93, 139-144.
- Graca, MAS, L Maltby, P Calow. 1994a. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L) and *Asellus aquaticus* (L). I. Population-dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia* 281, 155-162.

- Graca, MAS, L Maltby, P Calow. 1994b. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L) and *Asellus aquaticus* (L). II. Fungal preferences. *Hydrobiologia* 281, 163-170.
- Hargeby, A. 1990. Effects of pH, humic substances and animal interactions on survival and physiological status of *Asellus aquaticus* (L) and *Gammarus pulex* (L) - A field experiment. *Oecologia* 82, 348-354.
- Jensen, A. 1999. Adfærd og hjerterate som biomarkører samt metalfordeling i strandkrabben *Carcinus maenas* påvirket med cadmium. Specialrapport ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet. 83 s.
- Jensen, CS, L Garsdal, E Baatrup. 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1727-1732.
- Kreutzweiser, DP, PK Sibley. 1991. Invertebrate drift in a headwater stream treated with permethrin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 330-336.
- Liess, M, R Schulz. 1999. Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1948-1955.
- Maltby, L. 1995. Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L) and *Asellus aquaticus* (L) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia - Observations and possible mechanisms. *Water Research* 29, 781-787.
- Marcus, JH, DW Sutcliffe, LG Willoughby. 1978. Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea canadensis*. *Freshwater Biology* 8, 505-?.
- Matthiessen P, D Sheahan, R Harrison, M Kirby, R Rycroft, A Turnbull, C Volkner, R Williams. 1995. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 30, 111-119.
- McCahon, CP, D Pascoe. 1988. Use of *Gammarus pulex* (L) in safety evaluation tests - culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 15, 245-252.
- Medina, M, C Barata, R Telfer, DJ Baird. 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 17-22.
- Miljøstyrelsen. 1998. Biologisk bedømmelse af vandløbskvalitet. Vejledning fra Miljøstyrelsen, nr. 5, 1998.
- Miljøstyrelsen. 2002. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2001. Orientering fra Miljøstyrelsen, nr. 5, 2002.
- Moore, JW. 1975. Role of algae in diet of *Asellus aquaticus* L. and *Gammarus pulex* L. *J. Anim. Ecol.* 44, 719-730.

Mulliss, RM, DM Revitt, RBE Shutes. 1996. A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. Water Research 30, 1237-1243.

Naylor, C, L Pindar, P Calow. 1990. Inter- and intraspecific variation in sensitivity to toxins; the effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans *Asellus aquaticus* (L) and *Gammarus pulex* (L). Water Research 24, 757-762.

OECD 2000. OECD guidelines for testing of chemicals, revised proposal for updating guideline 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test.

Pascoe, D, A Wenzel, C Janssen, AE Girling, I Jüttner, A Fliedner, SJ Blockwell, SJ Maund, EJ Taylor, M Diedrich, G Persoone, P Verhelst, RR Stephenson, NO Crossland, GC Mitchell, N Pearson, L Tattersfield, J-P Lay, A Peither, B Neumeier, A-R Velletti. 2000. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. Wat. Res. 34, 2323-2329.

Pedersen, CL. 1999. Effects of the pesticides esfenvalerat and prochloraz on pond ecology. With special attention on *Asellus aquaticus* (L). Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen, nr. 50, 1999.

Poulsen, I. 2000. Dyndsneglen *Hydrobia ventrosa*'s bevægelsesadfærd som biomarkør for TBT. Specialrapport ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet. 81 s.

Scherer, E, RE McNicol. 1986. Behavioural responses of stream-dwelling *Acroneuria lycorias* (Ins. Plecopt.) larvae to methoxychlor and fenitrothion. Aquat. Toxicol. 8, 251-263.

Schulz, R, M Liess. 1999a. Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2243-2250.

Schulz, R, M Liess. 1999b. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquat. Toxicol. 46, 155-176.

Schulz, R, JM Dabrowski. 2001. Combined effects of predatory fish and sublethal pesticide contamination on the behavior and mortality of mayfly nymphs. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2537-2543.

Sibley, PK, NK Kaushik, DP Kreutzweiser. 1991. Impact of a pulse application of permethrin on the macroinvertebrate community of a headwater stream. Environ. Pollut. 70, 35-55.

Stephenson, RR. 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. Aquatic Toxicology 2, 175-185.

Spliid, NH, B Køppen, AH Frausig, V Plesner, NA Sommer, K Mathiasen. 1998. Kortlægning af visse pesticider i grundvand - 2. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen, nr. 42, 1998.

- Sutcliffe, DW, TR Carrick. 1981. Number of flagellar segments and molting in the amphipod *Gammarus pulex*. Freshwater Biology 11, 497-509.
- Sutcliffe, DW, TR Carrick, LG Willoughby. 1981. Effects of diet, body size, age and temperature on growth-rates in the amphipod *Gammarus pulex*. Freshwater Biology 11, 183-214.
- Sutcliffe, DW. 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, amphipoda): Basic processes. Freshwater Forum 2, 102-128.
- Sutcliffe, DW. 1993a. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, amphipoda): Female strategies. Freshwater Forum 3, 26-64.
- Sutcliffe, DW. 1993b. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, amphipoda): Male strategies. Freshwater Forum 3, 97-109.
- Sørensen, FF, M Bayley, E Baatrup. 1995. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). Environ. Toxicol. Chem. 14, 1587-1590.
- Sørensen, FF, JM Weeks, E Baatrup. 1997. Altered locomotory behavior in woodlice (*Oniscus asellus* (L)) collected at a polluted site. Environ. Toxicol. Chem. 16, 685-690.
- Vejrup, KV, A Ljungqvist. 1998. Udvidet pesticidmetode i forbindelse med grundvandsovervågning. Faglig rapport fra DMU, nr 261.
- Welton, JS. 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Freshwater Biology 9, 263-275.
- Welton, JS, RT Clarke. 1980. Laboratory studies on the reproduction and growth of the amphipod *Gammarus pulex* (L). J. Anim. Ecol. 49, 581-592.
- Whitehurst, IT. 1991. The *Gammarus.Asellus* ratio as an index of organic pollution. Water Research 25, 333-339.
- Willoughby, LG, DW Sutcliffe. 1976. Experiments on feeding and growth of amphipod *Gammarus pulex* (L) related to its distribution in river Duddon. Freshwater Biology 6, 577-586.
- Wogram, J, M Liess. 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67, 360-367.
- Zar, JH. 1984. Biostatistical analysis. 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Århus Amt. 1999. Pesticider i vandløb, kilder og søer i Århus Amt. Teknisk Rapport. 46 s.

Flow-kamre

I projektets indledende fase blev forskellige arenatyper testet. Et flow-kammer, hvor forsøgsdyrene kunne observeres i gennemstrømmende vand, blev udviklet. Flow-kammeret med en arena afgrænset af to metalgitre er vist i Fig. A1. Det er ikke blevet anvendt til egentlige forsøg, da forsøgsdyrene udviste for stor præference for disse gitre, hvor de kunne holde fast, og derfor ikke udviste nogen bevægelsesadfærd. I stedet blev glaspetriskåle valgt som forsøgsarena.

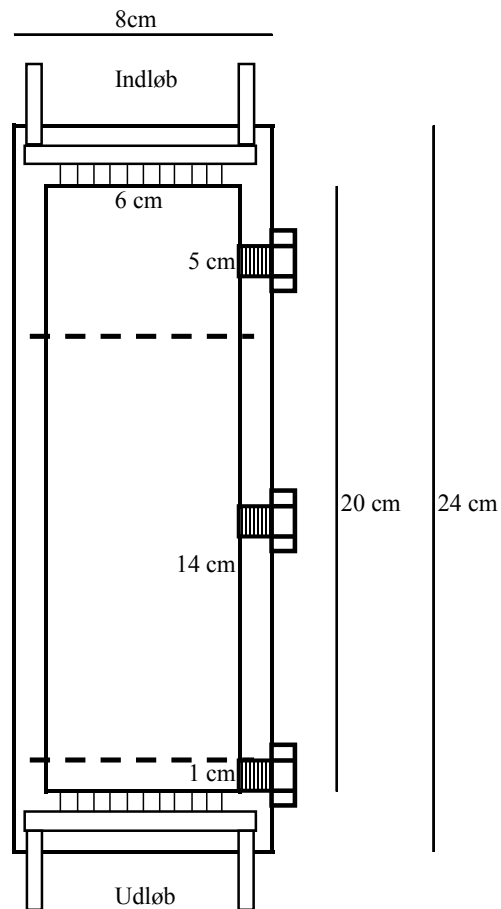


Fig. A1. Flow-kammer til videosporing af ferskvandsinvertebrater (set ovenfra)

Strømrender

To parallelle strømrender blev udviklet baseret på Lancaster & Mole (1999). Det viste sig ikke at være muligt at holde forsøgsdyrene tilstrækkeligt længe i disse åbne render; 50-75% af individerne driver eller svømmer aktivt ud af renderne inden for 1 time. Strømrenderne er vist i Fig. B1 og B2.

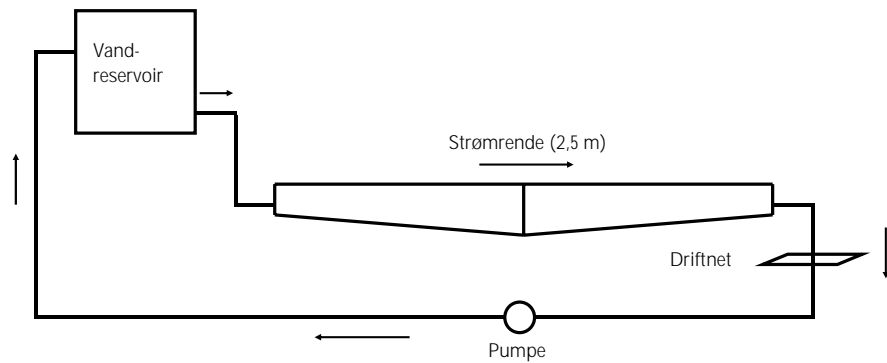
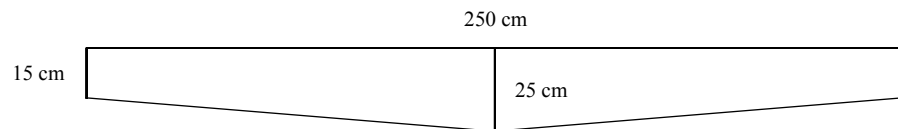


Fig. B1. Strømrendesystem (set fra siden)

Set fra siden



Set ovenfra

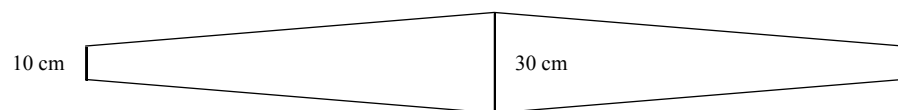


Fig. B2. Strømrendernes dimensioner

Reference:

Lancaster, J, A Mole. 1999. Interactive effects of near-bed flow and substratum texture on the microdistribution of lotic macroinvertebrates. Arch. Hydrobiol. 146, 83-100.

Statistiske styrkeberegninger for videosporingssystemet

1.1 Introduktion

Nærværende rapport indeholder en række informationer, der kan anvendes til overvejelser omkring den observerede statistiske styrke (power) af de udførte forsøg (post-hoc power-analyse). Endvidere er det muligt at estimere den forventede statistiske styrke ved kommende forsøg (a priori power-analyse). Statistisk styrke er sandsynligheden for korrekt at forkaste en falsk nul-hypotese, eller med andre ord: statistisk styrke er sandsynligheden for at opnå et statistisk signifikant resultat, givet at der er en reel biologisk effekt i den population, man undersøger. Power beregnes som $1-\beta$, hvor β er sandsynligheden for fejlagtigt at acceptere (egentligt unklare at forkaste) en falsk nul-hypotese. Normalt betragtes en styrke på 0,8, d.v.s. 80%, som værende tilstrækkelig. For at illustrere anvendelsen af styrkebetragtninger i videosporingssystemet anvendes resultater for cypermethrins akutte adfærdstoksiske effekt på ferskvandstangloppen *Gammarus pulex*. Beregningerne er udført ved hjælp af styrkeberegningsprogrammet G*Power; et freeware program, der kan downloades fra internettet: <http://www.psych.uni-duesseldorf.de/aap/projects/gpower/index.html>

1.2 Post-hoc power-analyse

Formålet med de gennemførte akutte adfærdstoksikologiske studier var at undersøge de ændringer i bevægelsesadfærd, der måtte finde sted under en miljørealistisk, kortvarig cypermethrin-puls. Resultaterne for den tilbagelagte afstand hos *G. pulex* eksponeret for cypermethrin viser et bifasisk adfærdrespons, med hyperaktivitet efterfulgt af immobilisering. På baggrund af de 11 undersøgte eksponeringsniveauer kan en række koncentrations-respons-sammenhænge opstilles, og Fig. C1 viser, hvordan den maksimale tilbagelagte afstand, defineret som det største antal centimeter vandret/5 min, ændres med stigende cypermethrin-eksponering. Figuren indeholder alene data for den maksimale afstand for den eksponerede gruppe, i såvel kontrolperioden (0-30 minutter), hvor baggrundsadfærden registreres, som under eksponering (31-120 minutter).

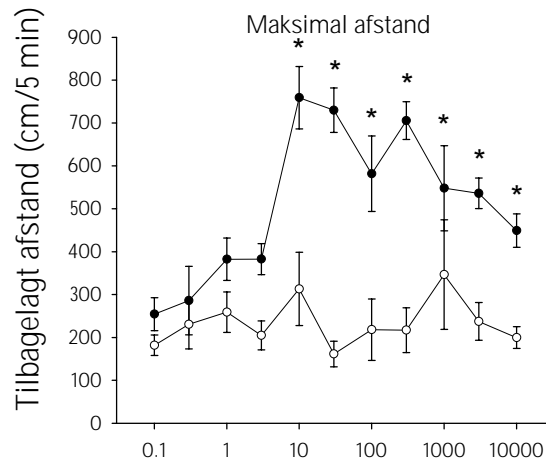


Fig. C1. Den maksimale tilbagelagte afstand ved cypermethrin-eksponering af *G. pulex*. Åbne symboler: kontrolperioden (0-30 min); lukkede symboler: eksponeringsperioden (31-120 min). Asterisk angiver signifikant forskel mellem kontrol- og eksponeringsperioden. (Gennemsnit \pm SEM, n=7-8)

Tabel C1 viser post-hoc styrkeberegningerne for de parrede t-tests for de eksponerede grupper før og under eksponering (se Fig. C1). Resultaterne fra post-hoc power-analysen viser ikke overraskende en høj styrke i de tilfælde, hvor en markant effekt af cypermethrin-eksponering blev observeret, d.v.s. ved cypermethrin-koncentrationer ≥ 10 ng/l, da styrkeberegningerne her blot afspejler de observerede *p*-værdier. Mere interessant er styrken i de tilfælde, hvor der ikke blev observeret en signifikant ændring i den maksimalt tilbagelagte afstand, d.v.s. ved koncentrationer ≤ 3 ng/l. Ved disse fire koncentrationer observeredes en gennemsnitlig power på 0,8, hvilket normalt betragtes som ønskværdigt. Den gennemsnitlige styrke for alle 11 koncentrationer var $0,90 \pm 0,16$ (mean \pm SD), hvilket illustrerer, at antallet af replikater i det anvendte forsøgsdesign (8 kontroldyr og 8 eksponerede dyr) var tilstrækkeligt.

Tabel C1 Post-hoc power-analyse (n=8, d.f.=7, $\alpha=0.05$)

Cypermethrin (ng/l)	Effect size	Power (1- β)
0.1	1.01	0.82
0.3	0.63	0.49
1	1.06	0.85
3	2.64	1.00
10	2.60	1.00
30	4.45	1.00
100	2.18	1.00
300	2.16	1.00
1000	0.97	0.79
3000	2.19	1.00
10000	1.55	0.99
Average	1.95	0.90
SD	1.09	0.16

1.3 A priori power-analyse

I forbindelse med planlægning af fremtidige forsøg er det en fordel at kunne estimere den forventede statistiske styrke (a priori power-analyse), da man derved kan træffe kvalificerede valg med hensyn til det nødvendige antal replikater. Fig. C2 viser styrken ($1-\beta$) som funktion af effektstørrelsen (effect size) for parrede t-tests af den maksimalt tilbagelagte afstand hos cypermethrin-eksponerede *G. pulex* (se også Fig. C1). I hidtidige forsøg er der kun blevet gennemført en forsøgsrunde pr. eksponeringskoncentration ($n=8$ eksponerede dyr, $df=7$), og Fig. C2 viser, hvorledes den estimerede styrke forbedres ved i stedet at gennemføre to forsøgsrunder pr. eksponeringskoncentration ($n=16$ eksponerede dyr, $df=15$).

Det fremgår, at den detekterbare effektstørrelse ved den ønskelige styrke ($1-\beta=0,8$) reduceres fra 0,98 ved 1 forsøgsrunde til 0,66 ved 2 forsøgsrunder. Dette er en tilsyneladende en markant forbedring, men post-hoc-beregninger for kontrolgrupperne (ikke vist) viser effektstørrelser på $0,97\pm 0,30$ (mean \pm SD) ved sammenligning af kontrol- og 'eksponerings'-perioden. Hos kontroldyrene er der altså generelt en (mindre) ikke-signifikant ændring fra kontrolperioden (0-30 minutter) til 'eksponerings'-perioden (31-120 minutter). *G. pulex's* adfærd i videosporingssystemet dikterer dermed en nedre grænse på ca. 1 for den detekterbare effektstørrelse. Dermed kan en forbedring i detektionsgrænsen ved at have 2 runder/koncentration i stedet for 1 runde/koncentration ikke umiddelbart realiseres. Det hidtidige design med 1 runde/koncentration har allerede den ønskede statistiske styrke på 0,8 ved den for kontroldyrene observerede effektstørrelse, og dette design opfylder dermed de konventionelle krav til styrke.

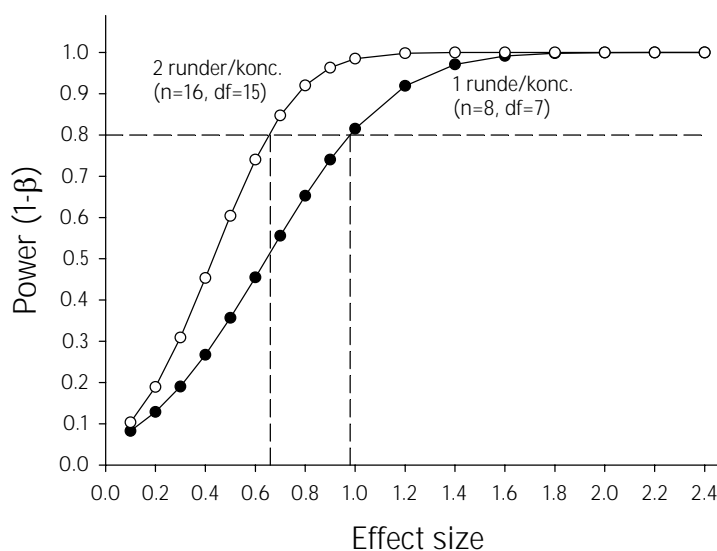


Fig. C2. Estimeret styrke ($1-\beta$) som funktion af effektstørrelse (effect size) for parrede t-tests af den maksimalt tilbagelagte afstand hos cypermethrin-eksponerede *G. pulex*. Lukkede symboler: 1 forsøgsrunde pr. eksponeringskoncentration ($n=8$, $df=7$); åbne symboler: 2 forsøgsrunder pr. eksponeringskoncentration

1.4 Konklusion

De foreslåede metoder til videosporing af *G. pulex* er ved såvel post-hoc som a priori power-analyser vist at opfylde kravet ($1-\beta=0,8$) til statistisk styrke med et signifikansniveau på $\alpha=0,05$. Der er ikke foretaget lignende beregninger for de øvrige forsøg.