

Bekæmpelsesmiddel forskning fra Miljøstyrelsen  
Nr. 76 2003

## Effekter af cypermethrin, azoxystrobin og bentazon på limniske invertebrater

Torben L. Lauridsen  
Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Ferskvandsøkologi;

Ursula Friberg-Jensen og Kirsten Christoffersen  
Københavns Universitet, Ferskvandsbiologisk Laboratorium

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	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSION	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
1 INDLEDNING	15
1.1 FORMÅL	15
1.2 BAGGRUND OG NUVÆRENDE VIDENGRUNDLAG	15
1.2.1 <i>Pesticider i søer og vandhuller</i>	15
1.2.2 <i>Zooplanktons og makroinvertebraters funktion i søer</i>	17
1.2.3 <i>Letale og subletale effekter</i>	18
1.2.4 <i>Definition af toksikologiske termer</i>	18
1.2.5 <i>Nuværende viden om letale og subletale effekter</i>	19
2 METODER	21
2.1 PESTICIDVALG	21
2.1.1 <i>Cypermethrin</i>	21
2.1.2 <i>Azoxystrobin</i>	22
2.1.3 <i>Bentazon</i>	22
2.1.4 <i>Stofkoncentrationer</i>	23
2.2 VALG AF FØRSØGSDYR	23
2.2.1 <i>Cladoceer: Daphnia magna, Daphnia galeata, Diaphanosoma brachyurum og Chydorus sphaericus</i>	23
2.2.2 <i>Vandlopper: Cyclops vicinus og Eudiaptomus graciloides</i>	24
2.2.3 <i>Makroinvertebrater: Chaoborus, Chironomus, Cloeon og Hydropsyche</i>	26
2.3 FØRSØGSBETINGELSER	28
2.3.1 <i>Dyrkning af algekultur</i>	28
2.3.2 <i>Zooplankton dyrkningsmedium</i>	28
2.3.3 <i>Kultivering af forsøgsdyr</i>	28
2.3.4 <i>Indsamling af forsøgsdyr i felten</i>	29
2.4 KONCENTRATION-RESPONS FØRSØG	29
2.4.1 <i>Formål og forsøgsprincip</i>	29
2.4.2 <i>Forsøgsdyr</i>	30
2.4.3 <i>Forsøgsopstilling</i>	30
2.4.4 <i>Databehandling</i>	31
2.5 REPRODUKTIONSFØRSØG	32
2.5.1 <i>Formål og forsøgsprincip</i>	32
2.5.2 <i>Forsøgsdyr</i>	32
2.5.3 <i>Forsøgsopstilling</i>	32
2.5.4 <i>Databehandling</i>	33
2.6 VIDEOREGISTRERING AF FYSIOLOGISKE PARAMETRE	34
2.6.1 <i>Formål og forsøgsprincip</i>	34
2.6.2 <i>Forsøgsdyr</i>	34

<b>2.6.3</b>	<b><i>Forsøgsopstilling</i></b>	<b>34</b>
<b>2.6.4</b>	<b><i>Databehandling</i></b>	<b>36</b>
2.7	SVØMMEADFÆRD	38
<b>2.7.1</b>	<b><i>Formål</i></b>	<b>38</b>
<b>2.7.2</b>	<b><i>Forsøgsdyr</i></b>	<b>38</b>
<b>2.7.3</b>	<b><i>Forsøgsopstilling</i></b>	<b>38</b>
<b>2.7.4</b>	<b><i>Databehandling</i></b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>RESULTATER</b>	<b>41</b>
3.1	KONCENTRATION-RESPONS FORSØG	41
<b>3.1.1</b>	<b><i>Cypermethrin</i></b>	<b>41</b>
<b>3.1.2</b>	<b><i>Azoxystrobin</i></b>	<b>43</b>
<b>3.1.3</b>	<b><i>Bentazon</i></b>	<b>45</b>
3.2	REPRODUKTIONSFORSØG	46
<b>3.2.1</b>	<b><i>Cypermethrin</i></b>	<b>46</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Azoxystrobin</i></b>	<b>49</b>
3.3	VIDEOREGISTRERING AF FYSIOLOGISKE PARAMETRE	53
<b>3.3.1</b>	<b><i>Cypermethrin</i></b>	<b>53</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Azoxystrobin</i></b>	<b>61</b>
3.4	SVØMMEADFÆRD	68
<b>3.4.1</b>	<b><i>Cypermethrin</i></b>	<b>68</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Azoxystrobin</i></b>	<b>71</b>
3.5	PESTICIDKONCENTRATIONER	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>73</b>
4.1	CYPERMETHRIN	73
<b>4.1.1</b>	<b><i>Overlevelse</i></b>	<b>73</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Adfærd</i></b>	<b>76</b>
4.2	AZOXYSTROBIN	79
<b>4.2.1</b>	<b><i>Overlevelse</i></b>	<b>79</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Adfærd</i></b>	<b>81</b>
4.3	BENTAZON	82
<b>4.3.1</b>	<b><i>Overlevelse</i></b>	<b>82</b>
4.4	SAMLET VURDERING PÅ TVÆRS AF STOFFER	83
4.5	EVALUERING AF DE ANVENDTE METODER	84
4.6	MILJØRELEVANS	87
<b>5</b>	<b>REFERENCE- OG LITTERATURLISTE</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>BILAG</b>	<b>94</b>
6.1	OVERSIGT OVER UDFØRTE KONCENTRATION-RESPONS PILOTFORSØG.	94
6.2	OVERSIGT OVER UDFØRTE REPRODUKTION PILOTFORSØG	95
6.3	OVERSIGT OVER UDFØRTE PILOTFORSØG TIL BESTEMMELSE AF SVØMMEHASTIGHEDS-RESPONS	96
6.4	OVERSIGT OVER UDFØRTE PILOTFORSØG TIL BESTEMMELSE AF RESPONS I FORHOLD TIL EN PRÆDATOR	97

# Forord

Denne rapport beskriver indholdet af et to-årigt pesticidforskningsprojekt med titlen "Forekomster og økologiske konsekvenser af pesticider i vandfasen og sedimentet i vandhuller". Før projektets iværksættelse blev en screening af pesticidforekomster i vandhuller på anbefaling af bevillingsgiver taget ud af det oprindelige projektforslag. Vi har derfor valgt at give denne afsluttende rapport titlen "Effekter af cypermethrin, azoxystrobin og bentazon på limniske invertebrater". Projektet er et ud af i alt 4 projekter, som i 2001 blev iværksat af Miljøstyrelsen inden for indsatsområdet "Vandløb og vandhuller". Projektet har været et samarbejdsprojekt mellem Københavns Universitet - Ferskvandsbiologisk Laboratorium i Hillerød og Danmarks Miljøundersøgelser - Afdeling for Ferskvandsøkologi i Silkeborg. Det er gennem hele projektperioden blevet evalueret af en følgegruppe bestående af repræsentanter fra Miljøstyrelsen, Skov- og Naturstyrelsen, Amtsrådsforeningen, industrien (repræsenteret ved DuPont Danmark ApS), Landbrugets Rådgivningscenter, Dansk Jordbrugsforskning - Forskningscenter Flakkebjerg, DHI - Institut for Vand og Miljø, Danmarks Miljøundersøgelser, KVL - Institut for Jordbrugsvidenskab, Københavns Universitet og Roskilde Universitet.

Rapportens forfattere vil gerne rette en stor tak til Leif Michaelsen, Lone Nørgaard og Jane Stougaard-Pedersen, uden hvis tekniske assistance det ikke havde været muligt at gennemføre projektet. Desuden takkes Winnie Nielsen og Birthe Christensen for hjælp i forbindelse med gennemførelse af pilotforsøg.



# Sammenfatning og konklusion

## Formål

Pesticider kan sandsynligvis forekomme i alle danske søer og vandhuller, men målinger har indtil videre vist, at koncentrationerne som oftest er beskedne sammenholdt med kendte letale effektkoncentrationer. På den baggrund er det væsentligt at fokusere på subletale effekter for at kunne vurdere, hvorvidt der kan forventes effekter forbundet med de pesticidforekomster, der findes i vore søer og vandhuller. Det har derfor været projektets formål, gennem først koncentration-respons forsøg og efterfølgende subletale effektforsøg, at undersøge, hvorledes letale og subletale koncentrationer af tre pesticider indvirker på limnisk invertebrater, herunder fire typiske zooplanktonarter: *Daphnia magna*, *D. galeata*, *Eudiaptomus graciloides* og *Cyclops vicinus* samt fire makroinvertebrater: *Chaoborus flavicans*, *Chironomus plumosus*, *Cloeon dipterum*-gr. og *Hydropsyche angustipennis*.

## Metoder

Den akut letale effekt af udvalgte pesticider blev undersøgt på forsøgsdyr vha. koncentration-respons forsøg med immobilitet som effektparameter, mens subletale effekter blev undersøgt vha. flere metoder. Reproduktionsforsøg blev udført med hhv. ægs og ungers udviklingstid, kuld størrelse mm. som effektparameter. Fysiologiske effekter på *D. magna*'s hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo blev undersøgt ved anvendelse af videooptagelser af fikserede og eksponerede forsøgsdyr. Svømmeforsøg blev udført med svømmehastighed som effektparameter.

## Pesticidvalg

I projektet er der anvendt hhv. pyrethroid-insekticidet cypermethrin, strobilurin-fungicidet azoxystrobin og triazin-herbicidet bentazon. Pesticiderne blev valgt i samråd med Miljøstyrelsen på baggrund af pesticidernes anvendelse i Danmark, stoffernes aktivitet og den nuværende viden om stoffernes effekt i vandmiljøet. Cypermethrin virker som en nervegift, der påvirker dele af insekters nervesystem, azoxystrobin hæmmer den mitochondrielle respiration og dermed ATP-dannelsen i eukaryote celler, og bentazon er en elektrontransporthæmmer, som blokerer fotosyntesen i ukrudtsplanter. Der er arbejdet med nominelle koncentrationer i forsøgene, men to gange i løbet af projektperioden blev der udtaget prøver til analyse af aktuelle koncentrationer. Prøverne blev analyseret vha. gas-kromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS) og væskechromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) af firmaet Miljøkemi a/s (nu EUROFINS).

## Forsøgsoversigt

Der blev først gennemført koncentration-respons forsøg for cypermethrin og azoxystrobin på 7 af de 8 forsøgsorganismer. Bentazon blev testet på *D. magna* og *E. graciloides*. På baggrund af koncentration-respons resultaterne blev der, så vidt muligt, udført forsøg ved subletale koncentrationer. Reproduktionsforsøg blev gennemført for cypermethrin og azoxystrobin på to

arter af hhv. cladoceer og copepoder. Effekter på fysiologien blev undersøgt for cypermethrin og azoxystrobin på *D. magna*. På baggrund af data fra fysiologiforsøgene blev der gennemført effektforsøg på *D. magna*'s svømmehastighed, ligeledes for både cypermethrin og azoxystrobin.

#### Resultater

Koncentration-respons-forsøgene for cypermethrin viste, at *D. magna* var den mest tolerante af alle testede dyr, mens *E. graciloides* og *D. galeata* var de mest sensitive zooplanktonorganismer. Døgnfluenymfen *C. dipterum-gr.* var imidlertid den mest sensitive organisme af alle. For azoxystrobin var mønsteret det samme; *D. magna* var den mest tolerante zooplanktonorganisme, mens *E. graciloides* og *D. galeata* var de mest sensitive zooplankton. Makroinvertebraterne *C. flavicans* og *H. angustipennis* var de mest tolerante af de testede arter. For både cypermethrin og azoxystrobin var neonate (unger mellem 24 og 48 timer gamle) *D. magna* mere sensitive end adulte *D. magna*, og for *D. galeata*'s vedkommende var laboratoriekulturen mere sensitiv end feltpopulationen. Bentazon blev testet på *D. magna* og *E. graciloides*, og der blev kun fundet effekter ved meget høje koncentrationer ( $> 3000 \times$  worst case situation). Af samme årsag blev der ikke gennemført yderligere forsøg med bentazon.

Reproduktionsforsøgene med cypermethrin viste, at zooplankton, som udviklede æg, videreudviklede disse til unger. Ved anvendelse af ægudviklingstid og udviklingstid for levende afkom var *D. galeata* den mest sensitive af de testede zooplankton, mens *C. vicinus* var den mest tolerante. Ved anvendelse af en anden effektparameter, fx. kuldstørrelse, var *C. vicinus* ligeså sensitiv som dafnie-arterne. Det er derfor ikke nødvendigvis den samme parameter, der er den mest sensitive hos de forskellige arter. Forsøgene med azoxystrobin viste generelt, at videreudviklingen fra æg til unger hæmmes hos dafnie-arterne. Ved anvendelse af dette som effektparameter var *D. galeata* mere sensitiv end *D. magna*. Ved inddragelse af andre effektparametre var *E. graciloides* den mest sensitive zooplanktonart. Generelt var *D. magna* den mest tolerante art.

I de fysiologiske forsøg med *D. magna* medførte eksponering for cypermethrin en reduktion i aktiviteten af brystlemmer og mandibler, mens aktiviteten af hjerte og bagklo blev forøget. Aktiviteten af bagkloen var den mest sensitive responsparameter, mens den mest tolerante parameter var bevægelsen af mandiblerne. Brystlemmeaktiviteten ændrede sig mest over tiden, mens hjerteaktiviteten ændrede sig mindst. For alle parametre indtrådte den maksimale effekt af stoffet inden for 3 timer, men allerede efter 15 minutters eksponering for  $> 1 \mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$  kunne der observeres effekter på aktiviteten af brystlemmer, mandibler og bagklo. Azoxystrobin eksponering af *D. magna* medførte en reduktion i aktiviteten af hjerte, brystlemmer og mandibler, mens aktiviteten af bagkloen stort set var upåvirket. Effekten indtrådte efter ca. 1 time og tiltog med eksponeringstiden. Brystlemmeaktiviteten var den mest sensitive parameter over for azoxystrobin, mens bagkloaktiviteten var den mest tolerante parameter. Mandibelaktiviteten ændrede sig mest over tiden, og aktiviteten af bagkloen ændrede sig mindst.

Den maksimale svømmehastighed hos *D. magna* blev reduceret med op til 68 %, når dyrene var eksponeret for subletale koncentrationer af cypermethrin, mens azoxystrobin kun havde en begrænset effekt.



## Konklusioner

Som repræsentant for zooplanktonorganismer i økotoksikologiske tests anvendes normalt *D. magna* som testorganisme. Dette projekt har vist, at *E. graciloides* og *D. galeata* er en faktor 10 - 100 mere sensitive end *D. magna*, overfor cypermethrin og azoxystrobin. I forbindelse med godkendelsesproceduren af et pesticid som cypermethrin vil det, på baggrund af toksikologiske tests udført på *D. magna*, derfor ikke kunne konkluderes, at der ikke vil være effekter på zooplanktonsamfundet i et givet ferskvandssystem med mindre der anvendes en sikkerhedsfaktor > 100. På trods af en betydelig forskel i organismestørrelse viste koncentration-responsforsøgene, at makroinvertebraterne *C. plumosus* og *C. flavicans* (myggelarver) og *C. dipterum*-gr. (døgnfluenymfe) også var mere sensitive end *D. magna* ved eksponering for cypermethrin.

På baggrund af pesticidmålinger foretaget i danske søer og vandhuller og effektresultaterne fra dette projekt kan det ikke forventes, at der er effekter på zooplanktonsamfundet som følge af bentazon og azoxystrobin. Passerer en marksprøjte med azoxystrobin imidlertid hen over et vandhul, vil der opstå en koncentration (33 – 83 µg azoxystrobin l<sup>-1</sup>), som vil hæmme dafniers reproduktion. En cypermethrinkoncentration på fx. 0,5 µg l<sup>-1</sup> (hvilket er realistisk i et dansk ferskvandssystem) vil påvirke *D. magna*'s fødeoptagelse, reproduktion og svømmeevne negativt. Desuden vil det påvirke overlevelse og reproduktion hos *D. galeata* samt overlevelsen hos de testede makroinvertebrater.



# Summary and conclusions

## PURPOSE

Pesticides are found in almost all investigated Danish lakes and ponds. Measurements have shown that the concentrations are modest compared with known lethal effect concentrations, so to evaluate whether impacts can be expected to occur under the present conditions it is of essential importance to focus on the sublethal effects. Hence, the purpose of the project has been, using concentration-response experiments and subsequent sublethal effect experiments, to evaluate sublethal effects on a number of limnic invertebrates, including 4 typical zooplankton species: *Daphnia magna*, *D. galeata*, *Eudiaptomus graciloides* and *Cyclops vicinus*, and 4 macroinvertebrates: *Chaoborus flavicans*, *Chironomus plumosus*, *Cloeon dipterum*-gr. and *Hydropsyche angustipennis*.

## Methods

The immediate effects of pesticides on experimental organisms were investigated via concentration-response experiments with immobility as effect parameter. The sublethal effects were studied by means of i) physiological, ii) reproduction, and iii) swimming behaviour experiments. Thus, the physiological effects were investigated via analyses of video recordings of a fixed and an exposed animal to observe for effects on antennae, pectoral limbs, heart and hind claw. The reproduction experiments were undertaken using, respectively, egg and nauplii development time and clutch size as effect parameters, while swimming behaviour investigations were made using swimming velocity as effect parameter.

## Pesticides

In the project the pyrethroid-insecticide "cypermethrin", the strobilurin-fungicide "azoxystrobin" and the triazin-herbicide "bentazone" were used. These pesticides were selected in consultation with the Danish Environmental Protection Agency on the basis of the present knowledge of use, activity and effects of pesticides on the aquatic environment. Cypermethrin acts as a neurotoxin, influencing sodium-channels of the nervous system of insects, azoxystrobin inhibits mitochondrial respiration and thus the formation of ATP in eukaryote cells, and bentazone is an electron transport inhibitor blocking the photosynthesis of weeds. Generally, nominal concentrations were used in the experiments, but twice during the project period samples were taken for analyses of actual concentrations. The samples were analysed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and fluid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) by the company Miljøkemi a/s (now EUROFINS).

## Sample survey

First, concentration-response experiments were made for cypermethrin and azoxystrobin on 7 of the 8 experimental organisms. Bentazone was only tested on *D. magna*. Based on the concentration-response results, experiments were

undertaken at sublethal concentrations. As for cypermethrin and azoxystrobin the reproduction experiments were made for the 4 zooplankton species. Effects on physiology using cypermethrin and azoxystrobin were investigated as for *D. magna*. Using data from the physiology investigations, effect experiments of cypermethrin and azoxystrobin were made of *D. magna* swimming behaviour.

## Results

The concentration-response experiments using cypermethrin showed that *D. magna* was the most tolerant test organism, *E. graciloides* and *D. galeata* being the most sensitive zooplankton species. Overall, the May fly nymph *C. dip-terum*-gr. was the most sensitive organism. A similar pattern was found as to that of azoxystrobin; *D. magna* being the most tolerant and *E. graciloides* and *D. galeata* the most sensitive zooplankton organism. *H. angustipennis* was generally the most tolerant of the tested species. For both cypermethrin and azoxystrobin neonate *D. magna* were more sensitive than adult *D. magna*, and *D. galeata* the laboratory culture was more sensitive than the field culture. Bentazone was only tested for *D. magna* and *E. graciloides*, and effects were only found at very high concentrations ( $> 3000 \times$  worst case situation), and, for the same reason, no further experiments were made with bentazone.

The reproduction experiments with cypermethrin showed that the eggs of egg-laying zooplankton developed into hatched nauplii. As to egg development time and development of live nauplii, *D. galeata* turned out to be the most sensitive of the tested zooplankton, while *C. vicinus* was the most tolerant species. When using a different effect parameter, e.g. clutch size, *C. vicinus* was as sensitive as the *Daphnia* species. Thus, the most sensitive effect parameter need not be the same for all species. The experiments with azoxystrobin generally showed that the development from egg into nauplii was hampered for *Daphnia* species and when using this as an effect parameter, *D. galeata* appeared to be more sensitive than *D. magna*. When including other effect parameters *E. graciloides* turned out to be the most sensitive zooplankton species. Overall, *D. magna* was the most tolerant species.

The physiological experiments with cypermethrin and *D. magna* showed that the hind claw was the most sensitive response parameter, the most tolerant parameter being the mandibles. Over time the pectoral limb activity changed most significantly, while heart activity changed the least. For all parameters the maximum effect of the pesticide occurred within 3 hours, but already after 15 minutes of exposure to  $> 1 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$  effects could be observed on pectoral limbs, mandibles and hind claw. Exposure of azoxystrobin to *D. magna* led to reduced activity of all 4 response parameters. Pectoral limb activity was the most sensitive parameter relative to azoxystrobin exposure, hind claw activity being the most tolerant parameter. Mandible activity changed most significantly over time, while the hind claw activity changed the least.

The physiological experiments clearly demonstrated that cypermethrin and azoxystrobin effect zooplankton in different ways. For instance, there was a tendency to increasing activity of response parameters at increased cypermethrin concentrations, while the tendency was opposite at increased azoxystrobin concentrations.

## Conclusions

The most frequently applied zooplankton test organism in eco-toxicological tests is *D. magna*. In this project *E. graciloides* and *D. galeata* proved to be significantly more sensitive than *D. magna* when exposed to cypermethrin and azoxystrobin. In connection with the approval procedure for a pesticide such as cypermethrin, it cannot on the background of the toxicological tests undertaken on *D. magna* be concluded that no effects will be seen on the zooplankton community in a given freshwater system unless a safety factor > 100 is used. Despite a marked difference in the size of organisms, the concentration-response experiments showed that also the macroinvertebrates *C. plumosus* and *C. flavicans* (mosquito larvae) and *C. dipterum*-gr. (May fly nymph) were more sensitive than *D. magna* when exposed to cypermethrin.

On the background of the pesticide measurements made in Danish lakes and ponds and the effect results obtained in this project, it seems unlikely that bentazon and azoxystrobin should have an impact on the zooplankton community. However, if a field sprinkler holding azoxystrobin passes over or partly over a pond, a concentration impeding *Daphnia* reproduction can be reached (33 – 83 µg azoxystrobin l<sup>-1</sup>). A cypermethrin concentration of, say, 0.5 µg l<sup>-1</sup> (which is realistic in a Danish freshwater system) will negatively influence the food intake, reproduction and swimming capacity of *D. magna*. In addition it will influence the survival and reproduction of *D. galeata* as well as the survival of the tested macroinvertebrates.



# 1 Indledning

## 1.1 Formål

Målinger af pesticidforekomster i søer og vandhuller i Danmark har vist, at stofferne ofte findes. Målingerne har også vist, at koncentrationerne som oftest er beskedne sammenholdt med letale effektkoncentrationer fundet vha. enkeltartstests og fx. mesokosmosforsøg. På den baggrund er det væsentligt at fokusere på subletale effekter for at kunne vurdere, hvorvidt der kan forventes effekter på samfundene i vore søer ved de aktuelle koncentrationer.

Hovedformålet med projektet "Effekter af cypermethrin, azoxystrobin og bentazon på limnisk invertebrater" har været at undersøge for effekter af udvalgte pesticider på økologiske nøgleorganismer i søer og vandhuller og herunder at teste et antal limnisk invertebrater vha. koncentration-respons forsøg. På baggrund af resultaterne herfra blev der udført forsøg ved ikke-letale koncentrationer med det formål at bestemme subletale effekter på fysiologi, reproduktion, vækst og mobilitet hos typiske zooplankton-organismer.

## 1.2 Baggrund og nuværende videngrundlag

### 1.2.1 Pesticider i søer og vandhuller

Pesticider er en fællesbetegnelse for stoffer til bekæmpelse af skadevoldere herunder svampe, ukrudt og insekter. I 2000 blev der solgt 2841 tons aktivt stof til landbruget (Miljøstyrelsen, 2001), hertil skal lægges de mængder, som blev solgt til gartnerier, frugtplantager, skovbrug, offentlige institutioner og private. Godkendelsesproceduren for de enkelte stoffer skal bl.a. sikre, at stofferne ikke havner de forkerte steder, samt hvis de havner forkerte steder ikke giver uacceptable effekter. Men selv ved korrekt håndtering kan der ske udledning i bl.a. søer og vandhuller (Merete Styczen, internt notat). En forkert håndtering af stofferne kan betyde udledninger i større mængder og deraf meget uheldige følgevirkninger for plante- og dyreliv (f.eks. Wiberg-Larsen et al., 1991).

Pesticider kan tilføres søer og vandhuller ad flere spredningsveje: Ved overfladeafstrømning eller via drænvand i forbindelse med kraftig nedbør, ved vinddrift, ved atmosfærisk deposition eller ved punktkilde udledning. Hvad der er den væsentligste kilde er usikkert, men overfladeafstrømning og vinddrift vil formentlig være af størst betydning i vandhuller p.g.a. et lille overfladeareal i forhold til bredzonen, ligesom vandvolumenet er lille i forhold til bredden. I større søer er tilførsel via tilløb formentlig den væsentligste kilde.

Indtil 2001 var der ikke foretaget systematiske undersøgelser af pesticider i søer og vandhuller. Det betyder, at det eksisterende datamateriale stammer fra enkeltundersøgelser udført over en længere årrække. Flere forhold varierer derfor undersøgelserne imellem, fx. antal stoffer, der er analyseret for (mellem 2 og 90), detektionsgrænser, tidspunktet for prøvetagningen o.s.v. Det betyder, at forudsætningerne for en direkte sammenligning af data ikke er til stede; derimod giver dataene et generelt billede af koncentrationsniveauerne i

danske søer. Tilbage i 1993-95 blev der i forbindelse med en paddeundersøgelse analyseret for udvalgte pesticider i 11 fynske vandhuller (Briggs & Damm, 2001). I perioden 1999-2001 har Ribe, Ringkøbing og Århus Amter desuden gennemført undersøgelser i mindre søer (<5 ha) og vandhuller. Her har indsatsen været koncentreret om hyppigt anvendte stoffer samt stoffer, som ofte er fundet i vandløb (se bl.a. Århus Amt, 2002). I 2001 blev der for første gang målt for pesticider i overvågningsammenhæng. Der blev indsamlet 6 prøver gennem sommersæsonen i 8 søer. Prøverne blev analyseret for i alt 48 pesticider.

I tabel 1 er vist de maksimale koncentrationer af stoffer registreret i både vandhuller og søer. Generelt er koncentrationerne overvejende lave i søerne. Femten af stofferne ligger under grænseværdien for drikkevand ( $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) eller  $10 \times$  detektionsgrænsen, og kun to stoffer ligger over (bentazon og isoproturon). I vandhullerne er der derimod registreret 12 stoffer med maksimalkoncentrationer over grænseværdien. Desuden ligger 7 stoffer over grænseværdien for total pesticidindhold ( $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Sammenholdt med kendte  $EC_{50}$  eller  $LC_{50}$  værdier (effekt eller letal effekt på 50 % af en testpopulation) på fisk, dafnier eller alger kan der ikke forventes en akut effekt under de givne omstændigheder.

I dette projekt arbejdes med cypermethrin, azoxystrobin og bentazon (for en beskrivelse af stofferne se afsnit 2.1). Cypermethrin har ikke være inddraget i undersøgelser i danske ferske vande. Derimod er der målt for esfenvalerat, et insekticid, der ligner og har samme virkemekanisme som cypermethrin. Dette stof er målt i koncentrationer op til  $0,66 \mu\text{g l}^{-1}$  i ferskvand (Århus Amt, 1999). Azoxystrobin er et forholdsvis nyt, men meget anvendt svampemiddel i Danmark. Det har hidtil ikke indgået i måleprogrammer. Århus Amt har undersøgt for stoffet i en række vandhuller i 2001 og fandt op til  $0,026 \mu\text{g l}^{-1}$  (Århus Amt, 2002). Bentazon er der målt for i en del søer og vandhuller (tabel 1) og den maksimale koncentration er hidtil  $0,12 \mu\text{g l}^{-1}$  (ikke publ. data).

TABEL 1. PESTICIDER OG DERES MAKSIMALKONCENTRATIONER REGISTRERET I BÅDE SØER OG VANDHULLER. MATERIALET ER BASERET PÅ DATA FRA 69 DANSKE SØER OG 47 VANDHULLER.

Stof	Søer*	Vandhuller**
	max konc., $\mu\text{g l}^{-1}$	
2,6-dichlorbenza. (BAM), met	0,09	1,1
atrazin, h	0,02	0,2
bentazon, h	0,12	0,03
bromoxynil, h	0,04	0,02
desethylatrazin, met	0,04	0,16
dichlorprop, h	0,02	0,3
dimethoat, i	0,04	0,13
dinoseb, h	0,02	0,04
DNOC, h	0,02	0,85
glyphosat, h	0,07	0,92
AMPA, met	0,08	1,8
ioxynil, h	0,01	1,0
isoproturon, h	3,9	2,7
MCPA, h	0,04	1,0
meclorprop, h	0,02	0,12
pendimethalin, h	0,02	0,03
pentachlorphenol, h	0,05	0,05

\* Ikke publicerede amtsdata, Århus Amt (1999), Lauridsen & Wiggers (2001)

\*\* Århus Amt (2002), Mogensen & Spliid (1997), Ringkøbing, Ribe og Århus Amter (ej publ.).

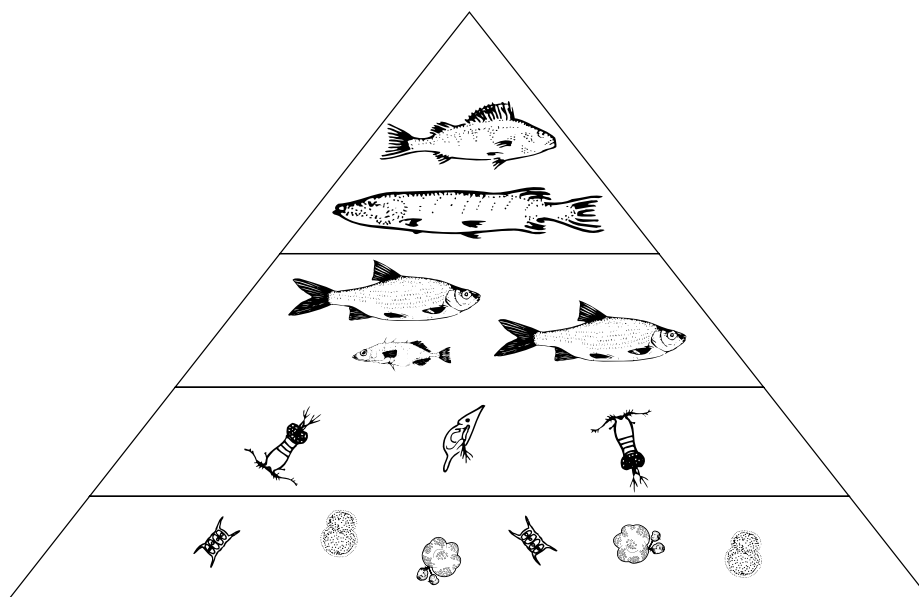


## 1.2.2 Zooplanktons og makroinvertebraters funktion i søer

Zooplanktonet i vore søer består primært af Rotifera (hjuldyr), Cladocera (dafnier), Copepoda (copepoder) og Ostracoda (muslingekrebs). I dette projekt fokuseres på fritlevende dafnier og copepoder. Dafnier og copepoder udgør et vigtigt led i søernes fødekæde som primærkonsumenter (figur 1). Dafnierne er filtratorer, og føden består bl.a. af fytoplankton. Det betyder, at dafnierne kan nedgræsse alger og dermed bidrage til opretholdelse af klart vand (Jeppesen et al., 1999). Dafnierne er også en vigtig fødekilde for visse fiskearter, herunder specielt karpefisk, men også aborrengel.

Copepoderne anvendt i dette projekt kan inddeles i to grupper: de cyclopoide (*Cyclops vicinus*) og de calanoide copepoder (*Eudiaptomus graciloides*). Copepodernes funktion i søerne er meget lig dafniernes, de græsser dels på andre planktoniske organismer og er samtidig selv føde for bl.a. fisk og andre større invertebrater. Det er forskelligt, hvilke organismer copepoderne græsser på. De cyclopoide copepoder tager på nauplie- og copepoditstadierne visse fytoplanktonarter. I de senere stadier og som adulte individer tager de også nauplier, hjuldyr og små dafniearter (Hansen & Jeppesen, 1992). Calanoide copepoder er primært filtratorer ligesom dafnierne, dvs. de tager fytoplankton og bidrager dermed også til klart vand i søerne. De er dog ikke så effektive filtratorer som dafnierne (Wetzel, 1983).

Makroinvertebrater er en fællesbetegnelse, som dækker over adskillige grupper som fx. bløddyr, ledorme, krebsdyr og insekter. I dette projekt fokuseres på døgnfluen *Cloeon*, dansemyggen *Chironomus*, glasmyggen *Chaoborus* og vårfluen *Hydropsyche*. Disse organismer har en noget anden funktion i søerne end zooplanktonet. *Cloeon* bidrager til nedbrydning af benthosalger og detritus, da dette er dens primære føde. Tilsvarende bidrager *Chironomus* til nedbrydning af detritus, ligesom den spiser sedimenterede alger. *Chaoborus* er den eneste planktoniske organisme af de valgte makroinvertebrater. Den er et rovdyr, som primært tager zooplankton, det være sig både hjuldyr og dafnier. Den har normalt ikke afgørende betydning for zooplanktonmængden i søer, men kan i fisketomme vandhuller og småsøer godt reducere zooplanktonbiomassen (Wissel & Benndorf, 1998). *Hydropsyche* er en netspindende vårflue. Den findes typisk i søers afløb. Her sidder de som omnivorer og fanger såvel planteplankton, planterester og zooplankton. De har som sådan ikke en egentlig funktion i søen, men omsætter organisk materiale der skylles ud af søen. Fælles for alle de anvendte makroinvertebrater er, at de udgør en vigtig del af føden for både fredfisk og rovfisk.



FIGUR 1. FORSIMPLET FØDEKÆDE I SØER. FØRSTE LED (NEDERST) BESTÅR AF PRIMÆRPRODUCENTERNE (FYTOPLANKTON), ANDET LED AF PRIMÆRKONSUMENTERNE (ZOOPLANKTON), TREDJE LED AF FREDFISKENE OG FJERDE LED (ØVERST) BESTÅR AF ROVFISKENE.

### 1.2.3 Letale og subletale effekter

I toksikologi og økotoxikologi opereres med letale og subletale effekter dvs. dødelige og før-dødelige effekter. Subletale effekter udelukker ikke, at der kan være en letal effekt af stoffet. Letale effekter måles i form af dødsfald eller immobilitet af forsøgsorganismer i kortvarige tests (akut test) på 24 - 96 timer eller i længerevarende tests (kroniske tests) typisk af 21 dages varighed, ofte kombineret med undersøgelse af subletale effekter på reproduktion og vækst. Subletale effekter kan omfatte ændringer i adfærd (fx. svømmeaktivitet), fysiologi (fx. reproduktion og vækst) biokemi (fx. ion-koncentrationer) og histologi (Rand et al., 1995) og undersøges efter både akut og kronisk eksponering.

Måling af letalitet/immobilitet samt effekter på reproduktion og vækst anvendes som indledende tests i undersøgelser af pesticiders toksicitet. Det er vigtigt at have subletale effektkriterier, der kan registrere toksisk stress, før dødelige og andre vitale effekter forekommer. Ikke mindst fordi pesticider ud fra foreliggende målinger sjældent forekommer i søer og vandhuller i koncentrationer, der er letale for limniske invertebrater (jf. 1.2.1). Subletale effekter kan derimod forventes at forekomme ved de målte koncentrationer i Danmark. Hidtil har effektstudier på limniske invertebrater i felten ofte været udført ved relativt høje koncentrationer, og det er et mindretal af pesticidstudier, der har koncentreret sig om subletale effekter (Møhlenberg et al., 2001). Der er derfor grund til at fokusere på lavere koncentrationer i effektstudier, som skal simulere danske forhold, ligesom der skal arbejdes med effektparametre, som kan demonstrere subletale effekter.

### 1.2.4 Definition af toksikologiske termer

Toksiciteten af et stof udtrykkes som den stoffekonzentration, hvor der forekommer en defineret effekt på forsøgsorganismerne.

Følgende termer anvendes i rapporten:

EC <sub>x</sub>	Effect Concentration for X %. Koncentrationen af teststof, hvor der observeres effekt hos X % af forsøgspopulationen. Anvendes som toksicitetsmål for immobilitet.
LC <sub>x</sub>	Lethal Concentration for X %. Koncentrationen af teststof, der er letal for X % af forsøgspopulationen.
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration. Laveste teststofkoncentration, hvor der observeres en effekt på forsøgspopulationen.
NOEC	No Observed Effect Concentration. Koncentrationen af teststof, hvor der ikke observeres nogen effekt på forsøgspopulationen.

### 1.2.5 Nuværende viden om letale og subletale effekter

De pyrethroide insekticider, som cypermethrin tilhører, har været hyppigt anvendt siden slutningen af 1970'erne, og der eksisterer efterhånden en mængde data på koncentrationsniveauet for letale effekter af denne stofgruppe på limniske invertebrater herunder særligt dafnier. Effektkoncentrationer (EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>) på limniske invertebrater ligger i intervallet 0,05 - 5 µg pyrethroid l<sup>-1</sup> (Stephenson, 1982; Day, 1989) og omfatter bl.a. arter inden for grupperne dafnier, storkrebs, døgnfluer og biller. Subletale effekter på dafniers reproduktion og filtrationsrate er observeret ved koncentrationer omkring 0,01 - 0,06 µg pyrethroid l<sup>-1</sup> (Day et al., 1987; Day & Kaushik, 1987b). For reproduktion og vækst hos dafnier er NOEC observeret til henholdsvis 0,02 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> og 0,009 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> (Miljøstyrelsen, 1990). For vårfluelarver er det endvidere vist, at deres netspindingsadfærd påvirkes ved subletale koncentrationer på 0,5 µg fenvalerat l<sup>-1</sup> (Wendt-Rasch et al., 1998). Nye studier udført under naturlige forhold (mesokosmos) har vist, at direkte effekter på dafnier og copepoder ved enkeltdoseringer også har en række indirekte effekter på andre dele af den akvatiske fødekæde (Wendt-Rasch et al., 2003, Friberg-Jensen et al., 2003).

Vidensgrundlaget for effekter af azoxystrobin og bentazon på limniske invertebrater er sparsomt. Det skal formentlig ses i lyset af, at stoffernes målorganismer er terrestriske svampe og planter, hvilket ikke tidligere har vakt den store bekymring omkring eventuelle effekter på limniske invertebrater. I følge Miljøstyrelsen er den letale koncentration af azoxystrobin over for *D. magna* og *Macrocyclops fuscus* henholdsvis 0,28 mg l<sup>-1</sup> (Miljøstyrelsen, 1994a) og 0,13 mg l<sup>-1</sup> (Miljøstyrelsen, 1995). LOEC og NOEC for dafniers reproduktion er henholdsvis 0,084 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> og 0,044 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> (Miljøstyrelsen, 1994b). At vi alligevel har valgt at inddrage stofferne i undersøgelsen skyldes at vidensgrundlaget stadig er sparsomt, at vi fokuserer på sub-letale effekter samt at vi undersøger effekten på flere og andre zooplanktonarter end *D. magna*.

For bentazon rapporteres om meget lav giftighed med letale koncentrationer (LC<sub>50</sub>) > 100 mg l<sup>-1</sup> for dafnier (Miljøstyrelsen, 1994c; British Crop Council, 1997).



## 2 Metoder

### 2.1 Pesticidvalg

I samråd med Miljøstyrelsen blev det fastlagt at anvende hhv. et insekticid, et fungicid og et herbicid i undersøgelserne. Valget af pesticider blev foretaget ud fra Miljøstyrelsens pesticidliste til overfladevandsprojekter og gjort på baggrund af pesticidernes anvendte mængde i Danmark, deres biologiske aktivitet og forekomst i vandmiljøet og den nuværende viden om stoffernes effekt i vandmiljøet. Følgende 3 pesticider, som alle anvendes i dansk landbrug, blev udvalgt: cypermethrin, azoxystrobin og bentazon.

#### 2.1.1 Cypermethrin

Cypermethrin er et pyrethroid-insekticid.

Navn:	Cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl-3-(2,2-dimethylcyclopropancarboxylat)
CAS Nummer:	52315-07-8
Molekylformel:	$C_{22}H_{19}C_{12}NO_3$
Molvægt:	416,3
Smeltepunkt:	60-80°C
Kogepunkt:	220°C
Damptryk:	$2,3 \times 10^{-4}$ m Pa (20°C)
Densitet:	1,23 g cm <sup>-3</sup> (20°C)
Opløselighed:	Vand: 0,004 mg l <sup>-1</sup> (20°C, pH 7) Acetone: > 450 g l <sup>-1</sup> (20°C)
Log K <sub>ow</sub> :	6,6
K <sub>oc</sub> :	1000000
Stabilitet:	Relativt stabilt i neutralt og svagt surt medium. Optimal stabilitet ved pH 4. Hydrolyseres i alkaliske medier. Relativt stabilt over for lys. Varmestabilt op til 220°C.
Virkemekanisme:	Cypermethrin er en nervegift der påvirker flere dele af insekters nervesystem: presynaptiske terminaler og sensoriske, motoriske og neurosekretoriske nerveceller. Effekten på nervesystemet skyldes overvejende en påvirkning af strukturen og kinetikken af nervecellernes natrium-kanaler, hvilket resulterer i en vedvarende stimulus af cellemembranen. Reaktionen hos insekter er manglende evne til at koordinere bevægelser, periodiske kramper, lammelser og død (Bloomquist, 1996).

I en "worst case" situation (sprøjtebom passerer hen over et 0,3 m dybt vandhul) vil der ved anvendelse af normal markdosis (Friis et al., 2002) skabes en cypermethrin koncentration på 4,1 – 6,6 µg l<sup>-1</sup>, afhængig af afgrødetype (korn og majs).

### 2.1.2 Azoxystrobin

Azoxystrobin er et strobilurin-fungicid.

Navn:	methyl (E)-2-[[6-(2-cyanophenoxy)-4-pyrimidinyl]oxy]- $\alpha$ (methoxymethylene)benzeneacetate
CAS Nummer:	131860-33-8
Molekylformel:	$C_{22}H_{17}N_3O_5$
Molvægt:	403,4
Smeltepunkt:	116°C
Damptryk:	$7 \times 10^{-9}$ m Pa (25°C)
Densitet:	1,34 g cm <sup>-3</sup> (20°C)
Opløselighed:	Vand: 6 mg l <sup>-1</sup> (20°C) Acetone: Moderat opløselighed i acetone
Log K <sub>ow</sub> :	2,5 (20°C)
Stabilitet:	DT <sub>50</sub> for fotolyse i vand 11 - 17 dage
Virkemekanisme:	Azoxystrobin hæmmer den mitochondrielle respiration ved at blokere elektrontransporten i elektrontransportkæden. Det sker ved specifik binding til cytochrome <i>b</i> i cytochrome <i>bc</i> <sub>1</sub> komplekset, som er lokaliseret i mitochondriernes indermembran, og som katalyserer elektrontransport fra ubiquinol til cytochrome <i>c</i> (Clough et al., 1998).

I en "worst case" situation (sprøjtebom passerer hen over et 0,3 m dybt vandhul) vil der ved anvendelse af normal markdosis (Friis et al., 2002) skabes en azoxystrobin koncentration på 33 - 83 µg l<sup>-1</sup>, afhængig af afgrødetype.

### 2.1.3 Bentazon

Bentazon er et "triazin"-herbicid.

Navn:	3-(1-methylethyl)-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one2,2-dioxide
CAS Nummer:	25057-89-0
Molekylformel:	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$
Molvægt:	240,3
Smeltepunkt:	139,4 - 141°C
Damptryk:	0,17 m Pa (20°C)
Densitet:	1,41 g cm <sup>-3</sup> (20°C)
Opløselighed:	Vand: 570 mg l <sup>-1</sup> (20°C, pH 7) Acetone: 1191g l <sup>-1</sup> (20°C)
Log K <sub>ow</sub> :	0,77 (pH 5), -0,46 (pH 7), -0,55 (pH 9)
K <sub>oc</sub> :	140
Pk <sub>a</sub> :	3,3 (24°C)
Stabilitet:	Meget modstandsdygtigt over for hydrolyse i sure og alkaliske medier. Nedbrydes af lys.
Virkemekanisme:	Bentazon hæmmer elektrontransporten. Midlet blokerer fotosyntesen ved at hæmme elektrontransporten på følsomme ukrudtsplanter. Stoffet virker bedst på kimbladsstadiet.

I en "worst case" situation (sprøjtebom passerer hen over et 0,3 m dybt vandhul) vil der ved anvendelse af normal markdosis (Friis et al., 2002) skabes en bentazon koncentration på 0,16 – 0,48 mg l<sup>-1</sup>, afhængig af afgrødetype.

#### 2.1.4 Stofkoncentrationer

Der blev i hele projektet arbejdet med nominelle koncentrationer, som alle er beskrevet i tabel 3 og tabel 4. Til kontrol af de nominelle koncentrationer blev der i de to forsøgsår udtaget hhv. 4 og 6 prøver til analysering. Prøverne blev udtaget i udglødede glasflasker umiddelbart før forsøgsstart. Hvis ikke prøverne blev sendt til analysering umiddelbart efter udtagelsen, blev de nedfrosset indtil analysering. Under transport blev de opbevaret ved < 4 °C. Prøverne blev analyseret hos Miljøkemi a/s (nu EUROFINs) ved anvendelse af gas- og væskechromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS og LC-MS).

#### 2.2 Valg af forsøgsdyr

##### 2.2.1 Cladoceer: *Daphnia magna*, *Daphnia galeata*, *Diaphanosoma brachyurum* og *Chydorus sphaericus*

***Daphnia magna*** og ***D. galeata*** består af et tveklappet kropsskjold, der omslutter krop og kropfødder, men ikke hovedet (figur 2). På hovedet sidder et stort sammensat øje. Foruden dette øje findes som regel det lille uparrede pandeøj. Dafnierne har to par antenner. Det forreste par er normalt korte og besat med sansehår. Det andet par antenner er kraftige svømmeredskaber. Kroppen er forsynet med 4-6 par kropslømmer, som er i stadig bevægelse og bidrager til respiration og fødeoptagelse ved at frembringe en vandstrøm ned mellem de to kropsskjolde. Halen er bøjet om mod bugsiden, og på halen sidder en bagklo. Hjertet sidder dorsalt over rugehulen (Røen, 1995).

***Daphnia magna*** tilhører underslægten ***Ctenodaphnia*** og bliver op til 6 mm lang; hannen bliver maksimalt 3 mm. På grund af dens størrelse og bevægelsesmønster er den et eftertragtet fødeemne for fisk. Dens levesteder er derfor vandhuller og småsøer med ingen eller meget lille fiskebestand (Røen, 1995).

***D. galeata*** tilhører underslægten ***Daphnia*** og bliver maksimalt 2,5 mm lang; hannen maksimalt 1,5 mm. Den ringere størrelse betyder, at den er mindre eftertragtet som føde for fisk. Derfor kan den forekomme i stort set alle danske søtyper, men vil, sammen med de øvrige dafniearter, blive kraftigt reduceret eller elimineret i eutrofe søer med stor fisketæthed (Jeppesen et al., 2000).

***Diaphanosoma brachyurum*** tilhører slægten ***Diaphanosoma***. I Danmark findes kun én art. Den er karakteriseret ved et langt og smalt hoved uden rostrum. Hovedet er tydeligt afgrænset fra kroppen med en indskæring. 1. benpar hos hannen er forsynet med gribehage. Arten er karakteristisk ved at have 3 dorsalt siddende grove torne på furcackløerne (Røen, 1995). Hunnen bliver 0,75 – 1,2 mm og hannen ca. 0,75 mm. Pga. størrelsen er den mindre udsat for fiskepredation end de større ***Daphnia***-arter.

***Chydorus sphaericus*** tilhører underfamilien Chydorinae. ***Chydorus*** består af et hoved- og et kropsskjold, som til sammen dækker hele kroppen. Der er ingen tydelig adskillelse mellem de to skjolde. Arterne er afrundede, kugleformede til aflange. Forrest på hovedskjoldet sidder et kort og spidst rostrum ("snabel").

Fremme på hovedskjoldet sidder et hoved- og biporearrangement. *C. sphaericus* har to antennepar ligesom *Daphnia*, 1. par er meget korte, 2. par lidt længere og bruges som svømmeredskaber. Hunnen bliver maksimalt 0,5 mm og hannen 0,4 mm lang.

Hos dafnierne forekommer heterogoni. Størstedelen af individerne er hunner, som forplanter sig parthenogenetisk. De ubefrugtede æg gennemgår en hurtig udvikling i rugehulen under kropsskjoldet. Ungerne, der forlader rugehulen, ligner de voksne dafnier. Normalt følger et antal parthenogenetiske generationer efter hinanden. I stress-situationer (fx. ved lave temperatur eller dårlige fødeforhold) udvikles der hanner fra de ubefrugtede æg. Samtidig danner hunnerne mørkfarvede hvileæg, som befrugtes. Efter en hvileperiode klækkes disse og danner hunner, der igen kan formere sig parthenogenetisk.

*D. magna* og *D. galeata* er fritsvømmende arter, der findes i de åbne vandmasser. Ved tilstedeværelse af prædatorer udviser de i dagtimerne flugtadfærd ved i dybe søer at flygte ud af epilimnion (overfladevandet i temperatur-lagdelte søer) mod metalimnion (springlaget i temperatur-lagdelte søer), hvor prædationsrisikoen er mindre (von Elert & Loose, 1996; Dodson et al., 1997). I lavvandede søer viser dafnier en alternativ flugtadfærd ved at flygte horisontalt mod vegetationsdækkede områder (se fx. review af Burks et al., 2002). Er der ikke prædatorer til stede, vil både *D. magna* og *D. galeata* svømme omkring i de åbne vandmasser døgnet rundt.

Dafniernes føde består af fytoplankton, flagellater, bakterier og detritus. De har således flere fødekilder. Det betyder, at de ikke kun er afhængige af, hvad der findes i det åbne vand, men også kan finde føde på plante- eller sedimentoverflader. Hvad angår fytoplankton, er der størrelsesbegrænsninger på, hvad dafnierne kan håndtere, typisk algearter med GALD-værdier (største længde) på op til 40 µm (fx. Kasprzak & Lathrop, 1997).

*Diaphanosoma brachyurum* er en planktonisk sommerform, dvs. den findes fritsvømmende i det åbne vand, men kan også forekomme i littoralen. I modsætning til *Daphnia* svømmer den med "hoppende" bevægelser. Den findes i både større og mindre søer (Røen, 1995).

*C. sphaericus* findes i alle søtyper og lever normalt i bredzonen mellem vegetationen, men kan i klarvandede søer også forekomme planktonisk. Den lever af fytoplankton og kan i søer med blågrøn alger fasthæfte sig på større kolonier (Røen, 1995). *C. sphaericus* findes overalt i Danmark og er vores almindeligste dafnieart.

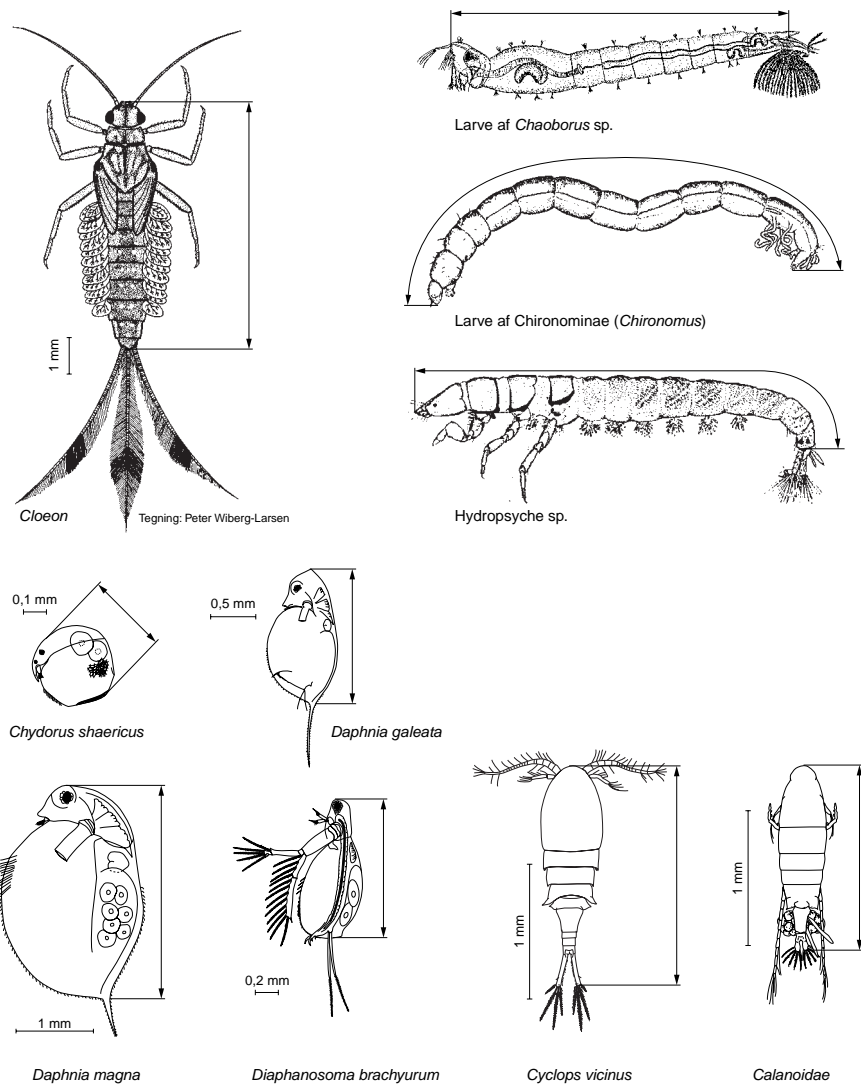
### 2.2.2 Vandlopper: *Cyclops vicinus* og *Eudiaptomus graciloides*

Copepoderne mangler et egentligt skjold (figur 2), men hele kroppen er omgivet af et kitinskelet. Hovedet er forsynet med et stort pandeøjne, sideøjne mangler. De har to par antenner, hvoraf det første par er de længste. Hos de calanoide copepoder (*E. graciloides*) er første antennepar lige så lange som dyrets forkrop og ca. dobbelt så lange som hos de cyclopoide copepoder (*C. vicinus*). Forkroppen består af fem frie kropsled, som hvert bærer et benpar. Herefter følger fem lemmeløse led, som udgør bagkroppen. Herpå sidder et par uledede halenokker (furca). Æggene bæres af hunnen i én (*E. graciloides*) eller to (*C. vicinus*) ægsække, som er fastgjort ved grunden af bagkroppen. *E. Graciloides* hunnen bliver 1 – 1,5 mm og *C. vicinus* hunnen 1,5 - 2,3 mm. Hannerne er noget mindre.



Copepoderne forekommer i alle typer af danske søer og vandhuller. Calanoide og cyclopoide copepoder vil også ofte forekomme sammen, men typisk vil en af typerne dominere over den anden. I eutrofe søer er det normalt cyclopoide copepoder, der dominerer. Dette er fx. kendt fra Søbygaard Sø, hvor *C. vicinus* i lange perioder fuldstændigt dominerer zooplanktonsamfundet (Hansen & Jeppesen, 1992). I mesotrofe og oligotrofe søer vil de calanoide copepoder normalt dominere copepodsamfundet. I dybe, lagdelte søer forekommer den calanoide type næsten altid uanset søens trofegrad.

Reproduktion hos copepoderne sker ved kønnet formering. Hannen fanger hunnen med den ene antenne og afsætter en spermatofor på hunnens genitalsegment. Hunnen kan herefter blive befrugtet med spermatozoer fra denne spermatofor. De befrugtede æg opbevares i ægsække, som bæres på hunnens bagkrop (se ovenfor). Æggene klækkes, og nauplier forekommer nu fritsvømmende i søen. Nauplierne gennemgår 6 forskellige stadier, hvorefter der følger 5 copepoditstadier med hudskifte mellem hvert stadie. Hvilket copepoditstadie, dyret er på, afgøres af antal svømmeben og antal segmenter på bagkroppen. Herefter når de voksenstadiet. Undervejs i udviklingen går copepoderne i diapause (hvilestadie), hvor de i en periode, typisk ved ugunstige forhold, ligger inaktive i sedimentet. Dette sker typisk ved copepoditstadie 4 eller 5. Copepodernes livscyklus varierer mellem få uger og tre år. I danske søer forekommer normalt 3-6 generationer pr år.



Figur 2. DE I PROJEKTET ANVENDTE FORSØGSDYR. PILENE ANGIVER DE ANVENDTE LÆNGDEMÅL.

***E. graciloides*** og ***C. vicinus*** er begge fritsvømmende arter, hvis adfærd er afhængig af dels deres føde og dels af prædatorer. Ved tilstedeværelse af prædatorer flygter de tilsvarende dafnierne, hvilket vil sige, at de i dagtimerne søger mod bunden, hvor prædationsrisikoen er mindre, mens de om natten søger mod optimale fødebetingelser. Vigtige prædatorer er planktivore fisk (skaller og brasen), men også ***Chaoborus*** kan være en betydelig prædator og kan inducere migration.

Copepodernes føde varierer med arten. De cyclopoide copepoder er ofte omnivorer. Eksempelvis er ***C. vicinus*** en meget effektiv prædator, som både tager hjuldyr, nauplier, copepoditer og små dafnier (Einsle, 1996). Derudover kan den også tage flagellater og alger, hvilke dog er en mindre vigtig fødekilde. På nauplie-stadiet er algerne en vigtig fødekilde.

### 2.2.3 Makroinvertebrater: *Chaoborus*, *Chironomus*, *Cloeon* og *Hydropsyche*

***Chaoborus flavicans*** tilhører en lille familie af Chaoboridae (glasmyg) i insektklassen, hvor larverne er rovdyr og lever i stillestående vand (figur 2).

Larverne klækkes typisk fra æg i løbet af sommeren/efteråret og gennemfører en række larvestadier (I-IV). Larverne er 10-20 mm lange og ernærer sig primært af små zooplankton (fx. *Bosmina* og mindre *Daphnia*-arter) fra vandfasen.

*Chaoborus*-larverne kan være særdeles hyppige i eutrofe søer og damme, hvor de opholder sig i det dybeste vand og gerne i sedimentoverfladen i dagtimerne for at undgå prædation fra planktivore fisk og stiger op i de åbne vandmasser i nattetimerne for at jage zooplankton. Larverne har to luftfyldte sække i kroppen og kan ved hjælp af disse foretage de horisontale vandringer i vandsøjlen. Larverne må betragtes som ganske hårdføre, idet de kan tolerere meget lave iltkoncentrationer gennem længere tid. Interaktionerne mellem zooplankton og *Chaoborus* er bl.a. beskrevet i Christoffersen (1990), og en generel beskrivelse af Chaoboridae findes i Dall & Lindegaard (1995).

Glasmyggelarver i 3. og 4. stadie kan ofte købes i akvarieforretninger, og alle stadier kan i vækstsæsonen indsamles i søer og damme med planktonet om natten eller med bundprøvetagere om dagen. Det er normalt ikke vanskeligt at fremskaffe materiale til eksperimenter.

*Chironomus plumosus* tilhører en meget stor og divers underorden (Chironominae) af ordenen Chironomidae (dansemyg) i insektklassen. Der er mange slægter repræsenteret i Danmark, men taksonomien er dog vanskelig, og en egentlig artsbestemmelse kan kun foretages af eksperter.

*C. plumosus*-larver (indtil 20 mm lange) lever i bunden af søer og rindende vand, hvor larverne sidder i U-formede rør dannet af mudderet. *C. plumosus*-larver findes typisk i store tætheder og udgør et vigtigt element i fødekæden som bl.a. føde for fisk. Larverne lever af organiske partikler (detritus, alger og bakterier), som synker ned på bunden. Partiklerne fanges med et klæbrigt fangstnet, som etableres inde i dyndrøret. Larverne æder det opfangede materiale fra nettets inderside, men kan også æde direkte fra sedimentoverfladen ved at strække forenden ud af røret. De har et højt indhold af hæmoglobin og har derfor en høj tolerance over for lave iltkoncentrationer.

En generel beskrivelse af Chironomidae findes i Dall & Lindegaard (1995), hvor der også er henvisninger til speciallitteraturen.

*Cloeon dipterum/inscriptum* (herefter kaldet *C. dipterum*-gr.) tilhører familien Baetidae i ordenen Ephemeroptera (døgnfluer) og er meget almindelig i damme og vandhuller. Det vandlevende nymfestadie er op til 20 mm lang og har en karakteristisk kropsform med tre haletråde med et tydeligt mørkt bånd og store afrundede gælleblade fastsiddende på bagkroppen. Gællernes placering og form anvendes ved artsidentifikation. Arten er almindelig og kan forekomme hele året i stillestående vand (damme og vandhuller). Det formodes, at dyrene kan klare en betydelig sænkning i iltkoncentrationen p.g.a. de veludviklede gæller. Dyret bevæger sig normalt rundt ved at kravle, men kan svømme ved at bugte kroppen op og ned og ved at bruge haletrådene som vifte.

Nymferne lever af alger, krebsdyr og små insekter, som jages visuelt. En generel beskrivelse af Ephemeroptera samt henvisning til speciallitteraturen findes i Dall & Lindegaard (1995).

*Hydropsyche angustipennis* tilhører familien Hydropsychidae i ordenen Trioptera (Vårfluer) og er meget almindelig i rindende vand. Det vandlevende larvestadie er op til 30 mm lang med en delvist pansret krop med gælvedhæng på bagkroppen og krogformede fødder på bageste led. *Hydropsyche angustipennis* bygger fastsiddende huse på større sten og spinder et pladeformet net og placerer dette vinkelret på strømretningen således det opfanger fødepartikler fra vandet. Dyret æder dette materiale.

Arten findes i eutrofierede vandløb og i afløb fra søer, hvor den bl.a. fanger zooplankton og er medtaget i dette projekt, da den er en repræsentant for faunaen knyttet til søafløb. En generel beskrivelse af Hydropsychidae findes i Dall & Lindegaard (1995) og Wiberg-Larsen (1980), som også henviser til mere specialiseret litteratur.

## 2.3 Forsøgsbetingelser

### 2.3.1 Dyrkning af algekultur

Til fodring af zooplanktonkulturer blev der dyrket kulturer af grønalg *Scenedesmus acutus*. Algekulturerne blev dyrket som semi-kontinuerlige kulturer i Z8-vækstmedium (Kotai, 1972) i klimarum ved 20°C og en lystintensitet omkring  $28 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Kulturerne blev gennemluftet med atmosfærisk luft forfiltreret med et 0,2  $\mu\text{m}$  sterilfilter. Hver anden dag blev algekulturerne fortyndet med Z8-vækstmedium til en celletæthed på  $50 \text{ mm}^{-3}$ .

Algekultur anvendt til fodring blev centrifugeret ved 150 G i 10 minutter, hvorefter supernatanten blev hældt bort og erstattet af et zooplanktonmedium (se nedenfor) før måling af absorbans i spektrofotometer ved 800 nm. Denne procedure sikrede, at der ikke blev overført næringsstoffer mm. til zooplanktonkulturene. Fodermængden til zooplanktonkulturerne blev beregnet ud fra en tidligere bestemt relation mellem cellevolumen af algen udtrykt i absorbans-enheder (800 nm) og kulstofindholdet per cellevolumen-enheder.

### 2.3.2 Zooplankton dyrkningsmedium

Et standardiseret zooplankton dyrkningsmedium, ADaM-zooplanktonmedium (Klüttgen et al., 1994), blev anvendt til dyrkning af zooplanktonkulturer samt som medie i alle udførte forsøg. ADaM-zooplanktonmedium fremstilles ud fra stamopløsninger af syntetisk havsalt,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$  og  $\text{SeO}_2$  blandet med MilliQ-vand. Før anvendelse gennemluftes mediet med atmosfærisk luft forfiltreret med et 0,2  $\mu\text{m}$  sterilfilter i mindst 1/2 time, hvorefter det filtreres gennem et 0,7  $\mu\text{m}$  filter og henstår i ca. 1/2 time.

### 2.3.3 Kultivering af forsøgsdyr

Laboratoriekulturer af *Daphnia magna*, *Daphnia galeata* og *Chydorus sphaericus* blev dyrket i ADaM-zooplanktonmedium i 750 ml glas med et stort overflade-volumen forhold. *D. magna* og *D. galeata* blev dyrket med en tæthed på 20 individer  $\text{l}^{-1}$ , mens antallet af *C. sphaericus* var variabelt og lå på over 100 individer  $\text{l}^{-1}$ . Kulturerne blev overført med plasticpipette (dafnier) eller filtreret på 50  $\mu\text{m}$  net (*C. sphaericus*) til frisk zooplanktonmedium hver anden dag og samtidig fodret med et frisk koncentrat af grønalg *Scenedesmus acutus*.

svarende til en slutkoncentration på 1 mg C l<sup>-1</sup>. Laboratoriekulturene blev opbevaret overdækket med stanniol i klimarum med en temperatur på 20°C og konstant svagt lys (~1,5 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>).

Visse dafniearter kan ved kultivering have tendens til at blive fanget i vandhinden i vandoverfladen. Specielt neonate (unger der blev eksponeret fra de var 24-48 timer gamle) individer af *D. galeata* viste sig ved overførsel til rent zooplanktonmedium ofte at blive fanget i vandhinden uden evne til at komme fri. Det resulterede i, at dyrene ikke voksede op til det adulte stadie. For at forhindre dette blev der i kulturglas med *D. galeata* lagt et stykke tyndt gennemsigtigt plastic oven på vandoverfladen. Generelt var *D. galeata* følsom over for håndtering, og individer anvendt til forsøg blev derfor dyrket i det samme testmedium indtil forsøgstidspunktet. Oprindelsen af de anvendte laboratoriekulturer kan ses i tabel 2.

TABEL 2. OPRINDELIG INDSAMLINGSLOKALITET FOR ANVENDTE LABORATORIESTAMMER (L) SAMT LOKALITETER FOR FORSØGSDYR INDSAMLET I FELTEN.

ART	LOKALITET
<i>Daphnia magna</i> (24 t)	L Langedam, Birkerød, 1978
<i>Daphnia magna</i> (m. æg)	L Langedam, Birkerød, 1978
<i>Daphnia magna</i> *	F Gammelmosen, Århus, 2002
<i>Daphnia galeata</i>	F Esrum sø, Esrum, 2002
<i>Daphnia galeata</i>	L Müggel See, Berlin, 1980
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	F Frederiksborg Slotssø, Hillerød, 2002
<i>Chydorus sphaericus</i>	L Ring Sø, Brædstrup, 2001
<i>Cyclops vicinus</i> **	F Søbygaard sø, Silkeborg, 2002
<i>Eudiaptomus graciloides</i>	F Frederiksborg Slotssø, Hillerød, 2002/
<i>Eudiaptomus graciloides</i> **	Lyng sø, Silkeborg, 2002
<i>Chironomus plumosus</i>	F Frederiksborg Slotssø, Hillerød, 2002
<i>Chaoborus flavicans</i>	F Frederiksborg Slotssø, Hillerød, 2002
<i>Cloeon dipterum</i> -gr.	F Dam ved Pårup, Gilleleje, 2002
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	F Pøle Å, udløb fra Strødam Enge, Hillerød, 2002

\* *Daphnia magna* fra Gammelmosen blev anvendt til svømmeforsøg, \*\* *Cyclops vicinus* fra Søbygaard Sø og *Eudiaptomus graciloides* fra Lyng Sø blev anvendt i reproduktionsforsøg.

### 2.3.4 Indsamling af forsøgsdyr i felten

Zooplanktonarterne *D. galeata*, *Diaphanosoma* sp., *E. graciloides* og *C. vicinus* blev indsamlet ved planktontræk med et 140 eller 200 μm net.

Makroinvertebraterne *C. dipterum*-gr. og *H. angustipennis* blev indsamlet med ketcher, *C. flavicans* med vandhenter, mens *C. plumosus* blev indsamlet vha. en Eckmann-sampler. De indsamlede dyr blev frasorteret med plasticpipette, ske eller spatel og akklimatiserede i ADaM-zooplanktonmedium i 2 - 24 timer ved 20°C, inden forsøg blev påbegyndt. Indsamlingslokaliteter kan ses i tabel 2.

## 2.4 Koncentration-respons forsøg

### 2.4.1 Formål og forsøgsprincip

Formålet er, ud fra en akut eksponering af forsøgsorganismer, at bestemme pesticiders toksicitet som EC<sub>50</sub>- og NOEC-værdier på baggrund af effektkriteriet immobilitet. Forsøgsprincippet er, ud fra standardiserede procedurer og betingelser (International Standard, 1996), at eksponere et antal forsøgsdyr for forskellige koncentrationer af pesticid og registrere antallet af immobile individer efter hver 24. time. Koncentrationsgradienten

fastlægges på baggrund af forudgående pilotforsøg, således at der registreres: ingen, middel og maksimal effekt af stoffet.

## 2.4.2 Forsøgsdyr

Den akutte toksicitet af cypermethrin og azoxystrobin blev undersøgt på 5 arter af zooplankton og 4 arter af insektlarver. For to zooplanktonarter, *D. magna* og *C. sphaericus*, blev der udelukkende udført test med individer fra laboratoriekulturer. For *D. galeata* blev udført test med individer fra både en laboratoriekultur og på individer indsamlet i felten. For alle øvrige anvendte arter blev individer indsamlet i felten. For herbicidet bentazon blev den akutte toksicitet testet på en laboratoriekultur af *D. magna* og på individer af arten *E. graciloides* indsamlet i felten.

## 2.4.3 Forsøgsopstilling

Alle forsøg blev udført under dyrkningsforholdene beskrevet i afsnit 2.3.3 og uden tilsætning af føde. Testmediet var ADaM-zooplanktonmedium tilsat forskellige mængder af pesticid fra en stamopløsning af stoffet i acetone (99,5 %) og justeret til pH  $7,8 \pm 0,2$ . Alle testopløsninger inklusiv kontrollen, som ikke indeholdt pesticid, blev tilsat den samme mængde acetone. Det relative volumetriske indhold af acetone i hver forsøgsrække fremgår af tabel 3. I forsøg, hvor indholdet af acetone var  $\geq 0,3 \text{ ml l}^{-1}$ , blev der ligeledes lavet en kontrol, som ikke var tilsat acetone. Indledningsvist var det i pilotforsøg konstateret, at koncentrationer på  $1 \text{ ml acetone l}^{-1}$  ikke havde nogen effekt på adfærden af neonate *D. magna*.

TABEL 3. OVERSIGT OVER KONCENTRATION-RESPONS FORSØG.

Pesticid	Testorganisme	Koncentrations gradient	No. ind. x no. rpl.	Acetone (ml l <sup>-1</sup> )
Cypermethrin (µg l <sup>-1</sup> )	<i>D. magna</i>	0; 0.04; 0.08; 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; 5.0; 10.0	5 × 4	0.039
	<i>D. magna</i> (m. æg)	0; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0; 16.0	5 × 4	0.032
	<i>D. galeata</i> (F)	0; 0.010; 0.032; 0.102; 0.328; 1.049; 3.355; 10.737	5 × 4	0.043
	<i>D. galeata</i> (L)	0; 0.010; 0.032; 0.102; 0.328; 1.049; 3.355; 10.737	5 × 4	0.043
	<i>Diaphanosoma</i>	0; 0.005; 0.016; 0.051; 0.164; 0.524; 1.678; 5.367	5 × 4	0.022
	<i>C. sphaericus</i>	0; 0.010; 0.035; 0.125; 0.43; 1.5; 5.25	5 × 4	0.021
	<i>E. graciloides</i>	0; 0.010; 0.032; 0.102; 0.328; 1.049; 3.355; 10.737	5 × 4	0.043
	<i>C. plumosus</i>	0; 0.005; 0.015; 0.045; 0.135; 0.405; 1.215; 3.645	2 × 10	0.015
	<i>C. flavicans</i>	0; 0.005; 0.015; 0.045; 0.135; 0.405; 1.215; 3.645	4 × 5	0.015
	<i>C. dipterum-gr.</i>	0; 0.004; 0.01; 0.026; 0.064; 0.16; 0.4; 1.0	2 × 10	0.004
	<i>H. angustipennis</i>	0; 0.026; 0.058; 0.128; 0.282; 0.62; 1.364; 3.0	2 × 10	0.012
Azoxystrobin (mg l <sup>-1</sup> )	<i>D. magna</i>	0; 0.184; 0.239; 0.311; 0.404; 0.525; 0.683; 0.888; 1.154; 1.5	5 × 4	0.075
	<i>D. magna</i> (m. æg)	0; 0.9; 1.3; 1.8; 2.6; 3.6; 5.0	5 × 4	0.250
	<i>D. galeata</i> (F)	0; 0.08; 0.124; 0.192; 0.298; 0.462; 0.716; 1.109	5 × 4	0.055
	<i>D. galeata</i> (L)	0; 0.08; 0.124; 0.192; 0.298; 0.462; 0.716; 1.109; 1.72	5 × 4	0.086
	<i>C. sphaericus</i>	0; 0.15; 0.26; 0.456; 0.798; 1.396; 2.442	5 × 4	0.122
	<i>E. graciloides</i>	0; 0.01; 0.015; 0.022; 0.034; 0.051; 0.076; 0.144	5 × 4	0.006
	<i>C. plumosus</i>	0; 0.082; 0.119; 0.172; 0.25; 0.362; 0.525; 0.761; 1.103; 1.6	4 × 5	0.080
	<i>C. flavicans</i>	0; 0.093; 0.188; 0.375; 0.75; 1.5; 3.0; 6.0	2 × 10	0.3
	<i>C. dipterum-gr.</i>	0; 0.093; 0.188; 0.375; 0.75; 1.5; 3.0; 6.0	2 × 10	0.3
	<i>H. angustipennis</i>	0; 0.093; 0.188; 0.375; 0.75; 1.5; 3.0; 6.0	2 × 10	0.3
	Bentazon (mg l <sup>-1</sup> )	<i>D. magna</i>	0; 15.63; 31.25; 62.5; 125; 250; 500	5 × 4
<i>E. graciloides</i>		0; 15.63; 31.25; 62.5; 125; 250; 500	5 × 4	0.6

No. ind. x no. rpl.: Antal individer pr. replikat og antal replikater. F = indsamlet i felten, L = laboratoriekultur.

I forsøgene indgik 7 - 11 forskellige pesticidkoncentrationer inklusiv kontrol i en eksponentiel gradient bestemt på baggrund af indledende pilotforsøg (se bilag 6.1). De anvendte koncentrationer for alle forsøg fremgår af tabel 3.

I hvert forsøg blev den samlede mængde forsøgsdyr poollet i en bakke. Herfra blev 20 individer pr. pesticidkoncentration udtaget tilfældigt og overført til et antal 20 ml steriliserede glasvials (5 ml glas i forsøg med *C. sphaericus*), som blev påført låg. Antallet af replikater pr. testopløsning fremgår af tabel 3. Dyrene blev overført med plasticpipette, ske eller spatel. Efter hver overførsel blev det eftersat, at dyrene bevægede sig normalt. Efter 24 og 48 timers (evt. også 72 og 96 timers) eksponering blev antallet af immobile individer registreret. Et individ blev karakteriseret som immobilt, hvis det ikke svømmede eller bevægede sig efter en let omrystning af glasset (zooplankton) eller en let berøring med en podenål (*C. sphaericus* og makroinvertebrater).

Ved start og efter 48 timer (evt. 72 og 96 timer) blev iltkoncentration og pH målt med henholdsvis mini-iltelektrode og pH-meter i et enkelt glas fra samtlige testopløsninger. Til bestemmelse af forsøgsdyrenes gennemsnitslængde blev 20 individer tilfældigt udtaget og konserveret i lugol ved forsøgets start. Længden af dyrene blev enten målt i stereolup ved 10 - 30 × forstørrelse, i omvendt mikroskop ved 400 × forstørrelse (*C. sphaericus*) eller med digital skydelære (*C. plumosus*). Målskitser fremgår af figur 2.

I forsøg med ægbærende *D. magna* blev der anvendt individer, der havde dannet deres første kuld æg i rugehulen inden for de sidste 48 timer. Alle andre forsøg blev udført med individer, der ikke bar æg. I forsøg med neonate *D. magna* stammede individerne fra moderdyrenes 3. kuld unger. I forsøg med *H. angustipennis* blev forsøgsglassene opbevaret på rystebord med lav hastighed, da arten bedst trives, i rindende vand (jf. 2.2.3).

#### 2.4.4 Databehandling

Antallet af immobile individer ved hver pesticidkoncentration blev anvendt til at estimere effektkoncentrationen for 50 % af testpopulationen ( $EC_{50}$ ) hver 24. time i alle forsøg.  $EC_{50}$  med tilhørende 95 konfidensgrænser blev bestemt ved probit analyse metoden vha. programmet Probit Analysis 2.3 (Probit Analysis 2.3, 90).

Her findes der på baggrund af immobilitetsdata en passende normalfordeling til forudsigelse af sandsynligheden for, at et individ vil reagere på et toksisk stof.  $EC_{50}$  blev beregnet i forsøg, hvor kontrolimmobiliteten var  $\leq 25$  %.

Bestemmelse af signifikante forskelle i sensitivitet ( $EC_{50}$ -værdier) over tid, mellem arter, mellem laboratoriekulturer og feltpopulationer og mellem neonate og ægbærende dafnier blev gjort ud fra kriteriet om ikke overlappende 95 % konfidensgrænser.  $EC_{50}$  blev valgt som sammenligningsgrundlag, fordi denne værdi er karakteriseret ved at besidde den laveste variation på koncentration-respons kurven (Rand et al., 1995).

Bestemmelse af NOEC-værdier blev gjort vha. en-vejs ANOVA ( $P < 0,05$ ) på arcsin-transformerede data efterfulgt af post-hoc test med Dunnett's test. Disse analyser blev gjort i programmet Statistica. På baggrund af ligningerne for de vægtede regressioner bestemt ved probitanalyse blev den forventede grad af effekt i form af % immobile individer til de fundne NOEC beregnet.

## 2.5 Reproduktionsforsøg

### 2.5.1 Formål og forsøgsprincip

Formålet er, ud fra en eksponering af udvalgte zooplanktonorganismer, at bestemme pesticiders toksicitet som NOEC og LOEC-værdier på baggrund af effektkriteriet reproduktion. Forsøgsprincippet er, ud fra standardiserede procedurer og betingelser, at eksponere forsøgsdyr for forskellige koncentrationer af pesticid og registrere, hvornår der dannes afkom i en periode på op til 3 uger efter eksponeringsstart. Undersøgelsen er et supplement til den traditionelle akutte toksicitetstest med det formål at vurdere, hvorvidt reproduktion er en anvendelig effektparameter til vurdering af effekter af subletale pesticidkoncentrationer.

### 2.5.2 Forsøgsdyr

I reproduktionsforsøgene blev anvendt 4 forskellige zooplanktonarter. To dafniearter: *Daphnia magna* og *D. galeata*, og to copepodarter: *Eudiaptomus graciloides* og *Cyclops vicinus*. *D. magna* og *D. galeata* var to laboratoriekulturer dyrket under standardiserede forhold som beskrevet i afsnit 2.3.3. De to copepodarter blev begge indsamlet i felten som voksne ægbærende individer umiddelbart inden gennemførelsen af forsøgene (tabel 2).

TABEL 4. OVERSIGT OVER REPRODUKTIONSFORSØG

Testorganisme	Pesticid gradient
<i>D. magna</i>	C: 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0
<i>D. magna</i>	C: 0; 0,001; 0,01; 0,02; 0,025; 0,03; 0,035; 0,04; 0,05; 0,08
<i>D. magna</i>	A: 0; 0,01; 0,04; 0,08; 0,1; 0,12; 0,16; 0,2; 0,24; 0,28
<i>D. galeata</i>	A: 0; 0,001; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,08; 0,15
<i>D. galeata</i>	C: 0; 0,001; 0,01; 0,02; 0,025; 0,03; 0,035; 0,04; 0,05; 0,08
<i>C. vicinus</i>	A: 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,5
<i>C. vicinus</i>	C: 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,1; 0,5
<i>E. graciloides</i>	A: 0; 0,05; 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10
<i>E. graciloides</i>	C: 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,3; 0,5; 1

A = Azoxystrobin (mg l<sup>-1</sup>), C = Cypermethrin (µg l<sup>-1</sup>)

### 2.5.3 Forsøgsopstilling

Alle forsøg blev udført under betingelser som dyrkningsforholdene for laboratoriekulturerne af zooplankton og med tilsætning af føde. Testmediet var ADaM-zooplanktonmedium tilsat forskellige mængder af pesticid fra en stamopløsning i acetone. Der blev anvendt 7 – 10 koncentrationer inklusiv kontrol i en gradient bestemt på baggrund af koncentration-respons forsøgene og indledende pilotforsøg (se bilag 6.2). De anvendte koncentrationer fremgår af tabel 4. Som udgangspunkt blev der anvendt en koncentrationsgradient, hvor de fleste koncentrationer lå under den letale dosis bestemt ved koncentration-respons forsøgene, afsnit 2.4. I reproduktionsforsøgene blev forsøgsdyrene eksponeret for pesticid igennem hele forsøgsperioden (se nedenfor), dvs. igennem en længere periode end i koncentration-respons forsøgene. Derfor forekom der letale effekter ved koncentrationer, som ikke var letale i koncentration-respons forsøgene.

I hvert forsøg blev det samlede antal forsøgsdyr poollet i en bakke, hvorfra 10 tilfældigt udvalgte dyr pr. pesticidkoncentration blev overført med plasticpipette til det samme antal glasvials (et dyr pr. vial). Alle forsøg blev gennemført med 10 stk. replikater. Dyrene blev herefter tilset, at de bevægede sig normalt. Glasvials blev herefter monteret i et planktonhjul, som gennem



hele forsøgsperioden roterede med en hastighed af ca. én omdr./min. Herved forblev den tilsatte føde suspenderet i vandfasen. Efter 24 og 48 timer og herefter hver anden dag blev de enkelte dyr tilset, og det blev registreret, hvorvidt de var døde (immobile efter let omrystning), og hvorvidt der var dannet æg og/eller unger. I forbindelse med tilsynet blev dyrene overført til en ny vial med frisk ADaM zooplanktonmedium, føde og pesticid. Første gang der blev observeret unger i en vial, blev indholdet i pågældende vial konserveret. Forsøgene er således ikke gennemført efter International Standard (1997). Udviklingsstadiet for de forskellige zooplanktonarter varierede.

I forsøg med *D. magna* blev der anvendt neonate dyr (48 – 72 timer), hvor individerne stammede fra moderdyrenes 3. eller senere kuld unger. Ved forsøgsafslutning blev antal unger og æg registreret, og længden af moderdyrene blev målt vha. billedbehandlingsudstyr monteret på en Wild stereolup.

I *D. galeata* forsøg blev anvendt 6 – 8 dage gamle dyr. Årsagen var, at juvenile *D. galeata* ikke tåler håndtering med plasticpipette, som *D. magna* gør det. Derfor blev de holdt i kultur og samtidig fodret i det ADaM medie, hvori de var klækket, indtil de havde opnået en tilstrækkelig størrelse til, at håndtering var mulig. Herefter blev de overført til glasvials som nævnt ovenfor. Ved forsøgsafslutning blev antal æg og unger registreret, samt moderdyrenes størrelse målt.

I *C. vicinus* forsøg blev anvendt voksne ægbærende individer indsamlet i felten (se tabel 2). De indsamlede dyr blev akklimatiseret i laboratoriet først ved 10°C i 24 timer og herefter ved 20°C. Forsøgsdyr med en synlig spermatofor blev bedøvet vha. kuldioxid-holdigt vand (danskvand). Under en stereolup blev ægsække pillet fra den enkelte hun vha. skalpel og dissektionsnål. Hunnen blev herefter anbragt i en glasvial og behandlet som nævnt ovenfor. Når hunnen havde dannet nye ægsække, blev hunnen igen bedøvet, ægsækkene pillet fra, disse blev fortsat eksponeret for pesticid, mens hunnen blev fikseret. Når der fremkom nauplier fra ægsækkene, blev forsøget stoppet, og antal nauplier og æg talt op. Ægsækkene blev isoleret fra moderdyret fordi de voksne dyr udviser kannibalisme, altså spiser nauplierne.

I *E. graciloides* forsøg blev ligeledes anvendt voksne ægbærende individer indsamlet i felten (se tabel 2). Forsøgsdyrene blev akklimatiseret tilsvarende *C. vicinus*. Ægsækken hos *Eudiptomus* har en helt anden konsistens, den er mere geléagtig end ægsækken hos *C. vicinus*. Under de givne forhold kunne *Eudiptomus*' ægsæk derfor ikke håndteres uden samtidig at beskadige den. Derfor blev de indsamlede individer med ægsække eksponeret for pesticiderne. Når der første gang blev observeret nauplier, blev forsøget stoppet, og antal nauplier og æg blev optalt.

#### 2.5.4 Databehandling

I forbindelse med alle gennemførte forsøg, det være sig både pilot- og endelige forsøg, blev der udarbejdet en protokol, hvori alle typiske og atypiske observationer blev noteret. Dette gjorde det muligt umiddelbart efter et forsøg at sammenligne observationer og data med tidligere gennemførte forsøg. Eksempelvis kunne der forekomme pludselige og uforklarlige dødsfald blandt kontroldyrene, eller der kunne forekomme dødsfald blandt dyr behandlet ved lave koncentrationer, mens dyr i højere koncentrationer overlevede. I sådanne

tilfælde blev forsøget kasseret, da vi måtte antage, at enten var der sket en fejl i håndteringen, eller også var dyrene svækkede allerede ved forsøgsstart, hvilket formentlig ville gøre dyrene mere følsomme end dyr i optimal kondition.

I reproduktionsforsøgene blev udviklingstiden for æg- eller ægsækdannelsen samt udviklingstiden for neonate dafnier og nauplier og de forskellige behandlinger testet i forhold til kontrolbehandlingerne. Hertil blev anvendt en-vejs ANOVA. Data blev logaritme-transformeret for at opfylde normalitetskravet og varianshomogenitet. Der blev ligeledes testet for forskelle i antal afkom (levende unger plus æg), her blev også anvendt en-vejs ANOVA på logaritme transformerede data. Forskelle i dyrenes størrelser blev testet på ikke-transformerede data under antagelse af, at disse data var normalfordelte.

## 2.6 Videoregistrering af fysiologiske parametre

### 2.6.1 Formål og forsøgsprincip

Formålet med disse studier er at undersøge pesticid-inducerede ændringer på essentielle fysiologiske parametre hos krebsdyret *D. magna*, således at den traditionelle akutte toksicitetstest med *D. magna* kan udbygges gennem identifikation af parametre, som er sensitive over for subletale pesticidkoncentrationer. Dette kan anvendes til at vurdere, hvilke parametre der kan bruges som effekt-kriterier for subletale effekter i standardiserede økotoksikologiske tests baseret på subletale pesticidkoncentrationer.

Teknikken består i at iagttage aktiviteten af hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo hos ægbærende *D. magna* eksponeret for pesticider vha. videooptagelse. I hvert forsøg er et enkelt individ af *D. magna* fasthæftet i et forsøgskammer, der gennemstrømmes af testmedium. Forsøgskammeret placeres under et mikroskop, og det fasthæftede dyr overvåges kontinuerligt gennem 26 timer med et kamera.

### 2.6.2 Forsøgsdyr

De anvendte forsøgsdyr var hunner af en laboratoriekultur af *D. magna* (jf. tabel 2) dyrket under standardiserede forhold som beskrevet i afsnit 2.3.3.

Individer, som inden for 24 timer havde dannet deres første kuld af parthenogentiske æg i rugehulen, blev udtaget til forsøg. Dafnierne var på dette tidspunkt  $8 \pm 1$  dage gamle og havde en længde på 2,43 – 2,96 mm (målt fra hovedspids til basis af haletoenen, figur 2). Dette udviklingsstadium blev anvendt for at sikre, at dafnierne ikke havde hudskifte inden for de følgende 26 timer.

### 2.6.3 Forsøgsopstilling

Alle forsøg blev udført i et 5 ml polycarbonatkammer, der blev gennemstrømmet ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) af ADaM-zooplanktonmedium (jf. 2.3.2) tilsat forskellige koncentrationer af pesticid. Forsøgskammeret var forbundet med siliconeslanger til en peristaltisk pumpe (Gilson M312), der opsugede testmediet fra en bluecap-glasflaske. Testmediet blev gennemboblet af sterilfiltreret ( $0,2 \mu\text{m}$ ) luft og havde en temperatur og pH på henholdsvis  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  og  $7,8 \pm 0,2$ .

I hvert forsøg blev et enkelt individ af *D. magna* fæstnet ventralt med vaseline til et stykke glas. Glasset blev derefter påmonteret forsøgskammeret, således at

dyret kunne observeres lateralt under mikroskop (Olympus SZ-CTV, 40 × forstørrelse). Kammeret blev oplyst nedenfra med en koldtlyslampe (Olympus highlight 2100). Et kamera (SONY DXC-101P) påmonteret mikroskopet registrerede dyret kontinuert over de følgende 26 timer, og alle optagelser blev lagret på videobånd (Sanyo VHR-776G recorder). Hele forsøgsopstillingen ses på figur 3.

De første 2 timer af forsøgsperioden var en akklimatiseringsperiode, hvor dafnien blev eksponeret for pesticidfrit medium, mens de efterfølgende 24 timer var med pesticideksponering. I kontrolforsøg blev individerne eksponeret for rent ADaM-zooplanktonmedium i hele forsøgsperioden. Der blev ikke tilsat føde under forsøgene.



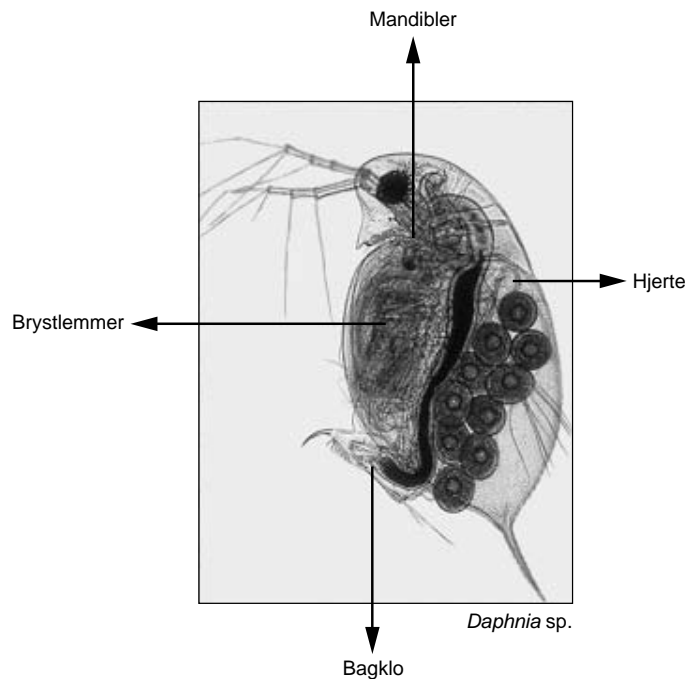
FIGUR 3. FORSØGSOPSTILLING TIL VIDEOREGISTRERING AF EFFEKTER PÅ FYSIOLOGISKE PARAMETRE HOS *D. MAGNA*.

Pesticidkoncentrationer på 0,1, 1,0, 10 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> og 0,5, 1,0, 2,0 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> blev fremstillet ud fra stamopløsninger af pesticiderne i acetone ved yderligere fortynding med ADaM-zooplanktonmedium. Den maksimale acetonekoncentration i forsøg med cypermethrin og azoxystrobin var henholdsvis 0,04 ml l<sup>-1</sup> og 0,1 ml l<sup>-1</sup>. Kontrolforsøg blev ikke tilsat acetone. Til hver pesticidkoncentration blev der anvendt særskilte siliconeslangere, og forsøgskammeret blev rengjort i 99 % ethanol efter hvert forsøg.

For hver koncentration af cypermethrin og azoxystrobin blev der udført forsøg på henholdsvis 5 og 3 individer, og yderligere 5 og 3 individer blev testet i pesticidfrit medium og fungerede som kontrol.

Ud fra videooptagelserne blev der foretaget en manuel registrering over tiden af slagfrekvens af hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo samt tidspunkt for evt. varigt ophør i aktivitet af de undersøgte parametre, se figur 4. Aktiviteten blev registreret i 8 observationsperioder i løbet af forsøgsperioden på 24 timer. Den tidsmæssige placering af observationsperioderne blev bestemt på baggrund af flere forudgående pilotforsøg, hvor hele effektforløb blev gennemset for at vurdere de mest hensigtsmæssige observationstidspunkter til beskrivelse af forløbet. Den tidsmæssige placering af observationsperioderne for cypermethrin og azoxystrobin blev forskellig, på grund af stoffernes forskellige effekt på dafnierne.

I forsøg med cypermethrin var en observationsperiode 5 minutter, hvor der for hver parameter (undtagen bagkloen) blev talt i 30 sekunder efterfulgt af 30 sekunders pause gentaget 5 gange. For bagkloen blev aktiviteten talt kontinuert i 5 minutter. Observationsperioderne svarede til tidspunkterne 0, 15, 60, 180, 600, 960, 1320 og 1440 minutter, efter cypermethrin blev pumpet ind i forsøgskammeret. I forsøg med azoxystrobin var en observationsperiode 10 minutter, hvor der for hvert parameter (undtagen bagkloen) blev talt i 15 sekunder efterfulgt af 45 sekunders pause gentaget 10 gange. For bagkloen blev aktiviteten talt i 30 sekunder efterfulgt af 30 sekunders pause gentaget 10 gange. Observationsperioderne svarede til tidspunkterne 0, 60, 240, 420, 600, 780, 960 og 1440 minutter, efter azoxystrobin blev pumpet ind i forsøgskammeret.



FIGUR 4. *DAPHNIA* SP. MED ANGIVELSE AF DE PARAMETRE, SOM BLEV OBSERVERET PÅ VIDEO-OPTAGELSERNE TIL REGISTRERING AF ÆNDRINGER I SLAGFREKVENNS.

Aktiviteten af bagkloen er ikke kontinuert i normalt fungerende dafnier under de givne betingelser. Derfor var observationsperioden for denne parameter af længere varighed end de øvrige undersøgte parametre.

Til registrering af aktiviteten af brystlemmer, mandibler og bagklo blev der opstillet en række definitioner, mens tælling af hjerteslag var entydig. Et slag med brystlemmerne blev defineret som en koordineret bevægelse af alle brystlemmer, et slag med mandiblerne blev defineret som en bevægelse med samme amplitude, som under de respektive dyrs kontrolbetingelser (de første 2 timer af forsøgsperioden), og et slag med bagkloen blev defineret som en bevægelse, der rakte ud af dafniens skjolddele.

#### 2.6.4 Databehandling

Multivariat (MANOVA) og univariat (ANOVA) variansanalyse blev anvendt til statistisk behandling af data.

De 4 responsvariable: slagfrekvens af hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo, blev målt samtidig på de samme individer. De uafhængige variable var Tid, Pesticidbehandling og Individer, som var parrede inden for pesticidbehandlingerne (skrevet Ind(Pest)), men ikke inden for tid, eftersom de samme individer (5 individer i cypermethrin forsøg og 3 individer i azoxystrobin forsøg) blev fulgt igennem hele forsøgsperioden. De gentagne observationer på hvert individ inden for en observationsperiode blev behandlet som replikerede observationer parret inden for individer. Replikaterne inden for en observationsperiode (5 i cypermethrin forsøg og 10 i azoxystrobin forsøg) blev alle udpeget til endepunktet i tidsintervallet. Variablen Tid blev behandlet som en kvalitativ variabel med 8 niveauer, svarende til et niveau for hver observationsperiode. Det første niveau (kaldet "0") henviser til observationer foretaget umiddelbart før, at pesticid blev tilsat mediet. Den kvalitative variabel Pesticidbehandling havde 4 niveauer (kontrol, 0,1, 1 og 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  i cypermethrin forsøg og kontrol, 0,5, 1 og 2  $\text{mg l}^{-1}$  i azoxystrobin forsøg).

Før de egentlige statistiske analyser blev påbegyndt, blev det undersøgt, hvorvidt data var normalfordelte med ens varianser. Nødvendige datatransformationer blev identificeret vha. Taylor's power law (Elliott, 1971). Varianshomogenitet blev opnået ved at kvadratrodstransformere data for mandibler og bagklo i cypermethrin forsøg, mens kvadratrodstransformation og transformationen  $y^* = y^{0.18}$  blev anvendt på data for henholdsvis mandibler og bagklo i forsøg med azoxystrobin.

Eftersom de samme individer blev fulgt både før og efter pesticidtilsætning, var det vigtigt at bekræfte, at de 4 grupper af forsøgsdyr ikke var signifikant forskellige fra hinanden, allerede inden pesticid blev tilsat. Til at teste for overordnet homogenitet mellem behandlingsgrupper før pesticidtilsætning blev data for tid = "0" analyseret vha. MANOVA. Den overordnede effekt var Pesticidbehandling (en fast faktor), mens den tilfældige faktor Ind(Pest) blev brugt som "error term", når der blev testet for forskelle mellem behandlingsgrupper. Forskelle mellem individer inden for behandlingsgrupper blev testet ved brug af "mean squares" af Ind(Pest) i tælleren, og "residual mean squares" i nævneren. Pillau's trace (se fx. Quinn et al., 2002) blev brugt som testkriterium i de multivariate tests. Hvis MANOVA viste en overordnet forskel mellem behandlingsgrupperne før tilsætning af pesticid, blev univariate ANOVA anvendt til at identificere, hvilke af de 4 responsvariable, som udviste heterogenitet. Tukey's multiple comparison test (Zar, 1984) blev anvendt til bestemmelse af, hvilke behandlingsgrupper der var signifikant forskellige.

Forskelle i de 4 responsvariable efter tilsætning af pesticid blev analyseret vha. MANOVA, med Pesticidbehandling, Tid og interaktionen mellem Pesticidbehandling og Tid som faste faktorer og Ind(Pest) som en tilfældig faktor. På grund af manglende data til visse tidspunkter i forsøget med cypermethrin er test for behandlings- og tidsforskelle ubalancerede og derfor kun omtrentlige.

Hvis MANOVA viste en overordnet effekt af pesticidbehandlingen på responsparametrene, blev separate analyser udført for at teste for forskelle mellem behandlinger, mht. hvordan handlingerne påvirkede responsparametrene over tid. Forskelle mellem behandlinger efter justering for tidseffekter blev analyseret vha. Tukey test, når forsøget var balanceret (azoxystrobin) eller ved least-squares means (Littell et al., 1991), når forsøget var ubalanceret (cypermethrin). Ved brug af den sidstnævnte metode blev **P**-

værdier efterfølgende justeret vha. Bonferroni proceduren (Haccou & Meelis, 1992). Dunnett's test (Zar, 1984) blev brugt til at teste gennemsnittet af kontrolniveauet mod de andre niveauer af en given responsparameter.

Alle statistiske analyser blev udført i SAS version 8e. *P*-værdier mindre end 0.05 blev betegnet som signifikante, undtagen i test med flere samtidige sammenligninger. Her blev signifikansniveauet justeret i overensstemmelse med antallet af samtidige sammenligninger.

## 2.7 Svømmeadfærd

### 2.7.1 Formål

Forsøgene har til formål at bestemme, i hvilken grad cypermethrin og azoxystrobin påvirker dafniers evne til at foretage en retningsbestemt svømmeaktivitet udløst af en stimulus. I naturen anvender dafnierne denne iboende egenskab til at placere sig optimalt i forhold til fødeindtagelse og som beskyttelse mod prædatorer. Lys blev anvendt som stimulus i dette projekt.

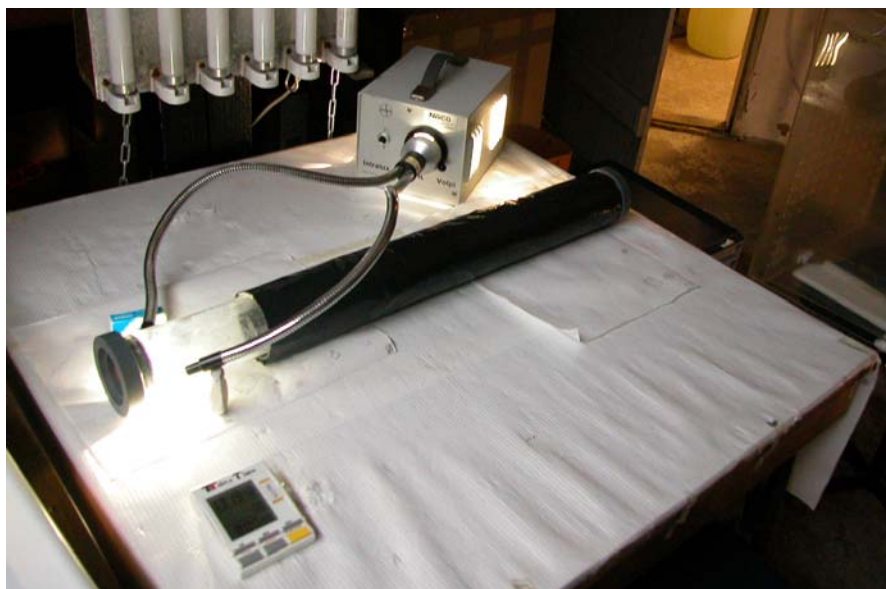
### 2.7.2 Forsøgsdyr

*D. magna* blev indsamlet i felten (tabel 2) med planktonet i september og oktober og blev holdt i 3-4 uger under standardbetingelser som laboratoriekulturerne (se afsnit 2.3.3). Dog med undtagelse af mediet som var GF/C-filteret søvand. Til hvert forsøg udvalgte 15 ensartede individer dvs. voksne hunner med æg.

### 2.7.3 Forsøgsopstilling

Der anvendes et svømmekammer fremstillet af et transparent plexiglasrør med en indre diameter på 5,4 cm og en totallængde på 65 cm. Røret er forsynet med vandtætte polyethylenpropper i begge ender, og i hver prop er der boret et hul med en diameter på 0,25 cm, som kan lukkes med en gummiprop. Uden om dette rør er monteret et 10 cm kortere mørkfarvet (ikke-transparent) rør. Ved at forskyde det yderste rør kan den ene ende af det inderste blotlægges og resten holdes mørklagt. Udvendige markeringer ca. 5 cm fra hver ende i det inderste rør angiver start og slut af den afstand i svømmekammeret, som dafnierne kan svømme. Denne banes længde er 60 cm.

I den faste forsøgsopstilling indgår det beskrevne dobbelte rør placeret vandret på et dertil indrettet bord, en lyskilde bestående af en koldtlyslampe med to bøjelige punktlys, et stopur samt en bærbar pc til indtastning af rådata. Se figur 5. Lysintensiteten i den mørklagte ende er ca.  $1 \mu\text{mol fotoner m}^{-1} \text{s}^{-1}$  og  $232 \mu\text{mol fotoner m}^{-1} \text{s}^{-1}$  i den belyste ende.



FIGUR 5. FORSØGSOPSTILLING ANVENDT I SVØMMEFORSØGENE. DAFNIERNE BLEV TILSAT I DEN MØRKE ENDE AF RØRET OG TIDEN FOR AT SVØMME HEN TIL DEN OPLYSSTE ENDE BLEV REGISTRERET.

Umiddelbart før et forsøg placeres ca. 15 dafnier i 1 l ADaM-medium uden føde i 1 time. I slutningen af denne periode fyldes svømmekammeret med ADaM-medium og placeres i lodret position. Ti dyr overføres herefter til svømmekammeret vha. en pipette, som indføres gennem det lille hul i den ene prop. Proppen lukkes og røret bringes herefter i vandret position, således at lyskilderne findes i modsatte ende af dyrene, hvorefter stopuret startes, og det ydre rør skubbes hen over området med dyr.

Tidspunktet for den første dafnies ankomst ved en markering ca. 5 cm fra rørets modsatte ende registreres manuelt og tilsynekomst af de øvrige dafnier sammesteds registres herpå efter 1, 1,5, 2, 3, 4 og 5 minutter. Når alle dafnier er samlet, vendes røret, således at lyskilden er placeret modsat dafnierne. Registrering af dafnierne foretages som omtalt. Disse procedurer gentages i alt fem gange umiddelbart efter hinanden og betegnes **kontrollforsøg**. Herefter overføres dafnierne og mediet til en plasticbeholder.

Svømmekammeret fyldes herefter med nyt ADaM-medium tilsat cypermethrin i den ønskede koncentration (0,05; 0,075; 0,1; 0,5 eller 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Dafnierne overføres atter til røret, deres svømmeaktivitet registreres efter samme princip som beskrevet ovenfor. Denne del af forsøget betegnes **eksponeringsforsøget**.

Efter sidste registrering opsamles alle 10 dafnier i en glasvial og konserveres med sur lugol-opløsning (3%). Dafniers længde fra øje til basis af halehorn måles efterfølgende i et Wild stereomikroskop ved 30 gange forstørrelse.

Der blev udført et hhv. kontrol- og eksponeringsforsøg med azoxystrobin efter samme principper som beskrevet ovenfor. Den anvendte stofkoncentration var 1  $\text{mg l}^{-1}$ .

Alle eksperimenter er udført i et termosteret rum med dæmpet belysning ( $< 1 \mu\text{mol fotoner m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) og ved 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) samt med samme megapopulation af ***D. magna***.

#### 2.7.4 Databehandling

Alle tidsregistreringer omsættes til minut-decimaltal. Den maksimale svømmehastighed beregnes ( $m \text{ min}^{-1}$ ) ved at dividere svømmetiden for den først registrerede dafnie med svømmebanens længde. Svømmehastigheden i eksponeringsforsøgene udtrykkes som procent af hastigheden i de respektive kontrolforsøg. I samtlige forsøg beregnes det geometriske gennemsnit og standardafvigelsen (SD) til dette.

Svømmeaktiviteten for de øvrige registrerede dafnier er udtrykt som den andel af den samlede population i røret, der har tilbagelagt den samlede distance på en given tid. Den tilsvarende svømmehastighed udtrykker kun en minimumssvømmehastighed, idet det ikke kunne undgås (se bilag 6.3), at dafnierne efter en vis tid (ca. 2 min i kontrolforsøgene og 2-5 min i eksponeringsforsøgene) svømmede frem og tilbage i synsfeltet.

Det skal noteres, at hastighedsudtrykkene kun angiver den målte en-dimensionelle (lineære) distance, som et givent dyr har svømmet, og ikke den faktiske tredimensionelle længde.

Envejsfaktor ANOVA blev anvendt til at teste, hvorvidt: 1) den maksimale svømmehastighed i mellem kontrolforsøgene var signifikant forskellig, 2) der ved pesticideksponeringen kunne registreres en signifikant ændring i den maksimale svømmehastighed sammenlignet med det respektive kontrolforsøg, 3) der var signifikante forskelle i den maksimale svømmehastighed og i den procentvise reduktion af svømmehastigheden mellem de forskellige koncentrationer af pesticid (kun for cypermethrin). Sammenhængen mellem den procentvise reduktion af den maksimale svømmehastighed og koncentrationen af cypermethrin blev fastlagt ved regressionsanalyse, hvor  $EC_{50}$  for den maksimale svømmehastighed kunne bestemmes.



# 3 Resultater

## 3.1 Koncentration-respons forsøg

### 3.1.1 Cypermethrin

Sammenligning af  $EC_{50}$ -værdier efter 24 og 48 timers eksponering viste, at sensitiviteten for alle arter undtaget makroinvertebraterne *C. dipterum*-gr. og *H. angustipennis* steg med eksponeringstiden (tabel 5). For 5 af arterne steg sensitiviteten signifikant svarende til et signifikant fald i  $EC_{50}$ -værdien fra 24 – 48 timers eksponering. Forskellen i sensitivitet med tiden var størst for ægbærende *D. magna*, hvor  $EC_{50}$ -værdien til eksponeringstiden 48 timer var en faktor 32 mindre end  $EC_{50}$  til eksponeringstiden 24 timer. *E. graciloides* havde den mindste forskel i sensitivitet med tiden. Her var  $EC_{50}$  til eksponeringstiden 48 timer 1,4 gange lavere end  $EC_{50}$  til eksponeringstiden 24 timer (tabel 5).

Sammenligning af  $EC_{50}$ -værdier for de testede arter viste, at *D. magna* var signifikant mindre sensitiv end alle andre arter efter 24 timers eksponering, mens *D. magna*'s sensitivitet lå på samme niveau som både *C. sphaericus* og *H. angustipennis* efter 48 timers eksponering (tabel 5). *E. graciloides* og laboratoriekulturen af *D. galeata* var de mest sensitive zooplanktonorganismer med  $EC_{50}$  på henholdsvis 0,14 (0,08 – 0,21) µg cypermethrin l<sup>-1</sup> og 0,08 (0,05 – 0,12) µg cypermethrin l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering. Makroinvertebraterne *C. plumosus*, *C. flavicans* og *C. dipterum*-gr. havde alle samme sensitivitetsniveau på 0,02 – 0,06 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering. *C. dipterum*-gr. var dog signifikant mere sensitiv end de øvrige makroinvertebrater efter 24 timers eksponering (tabel 5). *H. angustipennis* var den mindst sensitive makroinvertebrat.

Overordnet var døgnfluenymfen *C. dipterum*-gr. den mest sensitive af de testede invertebrater efter 24 timers eksponering ( $EC_{50}$  = 0,05 (0,04 – 0,07) µg cypermethrin l<sup>-1</sup>) og var ligeledes sidestillet med myggelarven *C. flavicans* de mest sensitive testede arter efter 48 timers eksponering med  $EC_{50}$  på henholdsvis 0,05 (0,04 – 0,06) µg cypermethrin l<sup>-1</sup> og 0,02 (0,01 – 0,04) µg cypermethrin l<sup>-1</sup> (tabel 5). *C. flavicans* havde også den laveste NOEC på 0,005 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering, mens ægbærende *D. magna* havde den højeste NOEC på 0,25 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> (tabel 5).

TABEL 5. RESULTATER AF KONCENTRATION-RESPONS FORSØG MED CYPERMETHRIN. EC<sub>50</sub> OG NOEC ER BEREGET EFTER EKSPONERING I 24 OG 48 TIMER. EC-VÆRDIER ER ANGIVET MED TILHØRENDE 95% KONFIDENSGRÆNSER. (24 T) = JUVENILE DYR, 24 TIMER GAMLE, (ÆG) = VOKSNE ÆGBÆRENDE DYR, (L) = LABORATORIEKULTUR, (F) = ORGANISMER INDSAMLET I FELTEN. KONCENTRATIONER ER OPGIVET I µG CYPERMETHRIN L<sup>-1</sup>.

Forsøgsdyr	Størrelse (mm ± stdev)	EC <sub>50</sub>		NOEC samt tilsvarende effektniveau (EC <sub>x</sub> )	
		24 t	48 t	24 t	48 t
<i>D. magna</i> (24 t)	0,88 ± 0,04	2,76 (1,80 - 4,84)	0,34 (0,23 - 0,49)	0,31 / EC <sub>12</sub>	0,08 / EC <sub>16</sub>
<i>D. magna</i> (æg)	2,56 ± 0,24	21,19 (7,83 - 475)	0,65 (0,46 - 0,86)	0,25 / EC <sub>9</sub>	0,25 / EC <sub>17</sub>
<i>D. galeata</i> (F)	1,68 ± 0,12	0,65 (0,33 - 1,09)	#	0,102 / EC <sub>10</sub>	#
<i>D. galeata</i> (L)	1,42 ± 0,07	0,30 (0,20 - 0,45)	0,08 (0,05 - 0,12)	0,102 / EC <sub>18</sub>	0,01 / EC <sub>5</sub>
<i>Diaphanosoma</i> sp.	1,04 ± 0,14	0,23 (0,11 - 0,40)	#	0,164 / EC <sub>42</sub>	#
<i>C. sphaericus</i>	0,25 ± 0,03	0,89 (0,69 - 1,19)	0,65 (0,41 - 1,03)	0,125 / EC <sub>9</sub>	0,125 / EC <sub>10</sub>
<i>E. graciloides</i>	1,04 ± 0,08	0,19 (0,13 - 0,29)	0,14 (0,08 - 0,21)*	0,102 / EC <sub>31</sub>	< 0,032 / EC <sub>&lt;13</sub>
<i>C. plumosus</i>	24,40 ± 1,69	0,19 (0,15 - 0,26)	0,06 (0,05 - 0,09)	0,045 / EC <sub>7</sub>	0,015 / EC <sub>4</sub>
<i>C. flavicans</i>	11,18 ± 1,11	0,21 (0,16 - 0,28)	0,02 (0,01 - 0,04)	0,015 / EC <sub>10</sub>	0,005 / EC <sub>11</sub>
<i>C. dipterum-gr.</i>	2,73 ± 0,23	0,05 (0,04 - 0,07)	0,05 (0,04 - 0,06)	0,01 / EC <sub>1,4</sub>	0,01 / EC <sub>5</sub>
<i>H. angustipennis</i>	9,76 ± 0,65	0,31 (0,25 - 0,40)	0,37 (0,31 - 0,46)	0,128 / EC <sub>19</sub>	0,128 / EC <sub>11</sub>

# Kontrolimmobilitet > 25 %

\* Responset til koncentrationen 0,01 µg l<sup>-1</sup> er udeladt p.g.a. meget afvigende respons.

Sammenligning af EC<sub>50</sub>-værdier for neonate og ægbærende *D. magna* viste, at neonate dafnier var mere sensitive over for cypermethrin end ægbærende dafnier efter både 24 og 48 timers eksponering. Forskellene var dog kun signifikante efter 24 timers eksponering. Forskellen i EC<sub>50</sub>-værdier mellem neonate og ægbærende dafnier var ca. en faktor 8 efter 24 timers eksponering (tabel 5). De brede konfidensgrænser omkring EC<sub>50</sub>-værdien for ægbærende *D. magna* til tiden 24 timer skal bemærkes og er resultatet af et manglende maksimalt respons (for få dyr dør) ved de anvendte koncentrationer.

Sammenligning af EC<sub>50</sub>-værdier for felt- og laboratoriekulturer af *D. galeata* viste ingen signifikante forskelle i sensitivitet over for cypermethrin (tabel 5).

På baggrund af koncentration-respons sammenhængen blev det forventede respons i form af immobilitet ved de fastlagte NOEC fundet til at variere mellem EC<sub>1,4</sub> og EC<sub>42</sub> (tabel 5). Det betyder med andre ord, at 1,4 – 42 % af forsøgspopulationen kunne forventes at være påvirket ved de fastlagte NOEC. For 50 % af NOEC-værdierne kunne det forventes, at ≤ 10 % af forsøgspopulationen blev immobiliseret, mens kun 20 % af NOEC-værdierne ville kunne forventes at give en immobilisering på ≤ 5 % af forsøgspopulationen.

Ud over effekten af cypermethrin på mobiliteten af de anvendte invertebrater blev der også observeret en subletal effekt på *H. angustipennis*'s netspindingsadfærd. Efter 48 timers eksponering blev det i alle forsøgsglas

med koncentrationer  $\geq 0,62 \mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$  observeret, at der ikke var spundet net i disse glas modsat glas med koncentrationer  $< 0,62 \mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$ , hvor der var net til stede.

I alle forsøg var mængden af opløst oxygen  $\geq 6,6 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$  efter 48 timers eksponering, undtagen i forsøg med ægbærende *D. magna*, *C. plumosus* og *C. flavicans*, hvor iltindholdet var henholdsvis  $\geq 3,73$ ,  $\geq 2,42$  og  $\geq 3,19 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$  efter 48 timers eksponering.

For alle forsøg varierede pH mellem 6,23 – 7,84 målt efter 48 timer. I de enkelte forsøg lå pH i opløsninger med pesticid inden for  $\pm 0,91$  enheder i forhold til pH i kontrolopløsningerne.

Immobilisering af 10 % og 15 % af kontrolindividerne blev observeret i forsøg med henholdsvis *D. galeata* (F) og *Diaphanosoma* sp. efter 24 timers eksponering. Kontrolimmobiliseringen var 5 % for *E. graciloides*, 10 % for *C. flavicans*, 65 % for *D. galeata* (F) og 75 % for *Diaphanosoma* sp. efter 48 timers eksponering. I alle øvrige forsøg var der ingen immobiliserede kontrolindivider.

### 3.1.2 Azoxystrobin

For alle testede makroinvertebrater undtagen myggelarven *C. plumosus* var sensitiviteten over for azoxystrobin meget lav. For *C. flavicans* kunne der ikke observeres nogen effekt ved den maksimale testkoncentration på 6 mg azoxystrobin  $\text{l}^{-1}$ . For *C. dipterum*-gr. og *H. angustipennis* blev der observeret en koncentration-respons sammenhæng efter henholdsvis 48 og 24 timer, mens der på trods af immobile individer i de højeste testkoncentrationer ikke kunne observeres en koncentration-respons sammenhæng til de øvrige tidspunkter (tabel 6). Modsat makroinvertebraterne var alle testede zooplanktonorganismer følsomme over for azoxystrobin.

Sammenligning af  $\text{EC}_{50}$ -værdier efter 24 og 48 timers eksponering for de følsomme arter viste, at sensitiviteten over for azoxystrobin steg med eksponeringstiden for 6 af de 7 arter, hvor  $\text{EC}_{50}$ -værdier lod sig beregne til begge tidspunkter (tabel 6). For 4 af disse arter faldt  $\text{EC}_{50}$ -værdien signifikant med ca. en faktor 2 fra 24 til 48 timers eksponering.

Sammenligning af  $\text{EC}_{50}$ -værdier for de følsomme arter viste, at efter 24 timers eksponering var *D. magna* signifikant mindre sensitiv end alle andre arter undtagen vårfluelarven *H. angustipennis*. *H. angustipennis* blev beregnet på baggrund af kun 5 immobile individer, heraf 3 immobile i den højeste koncentration, og konfidensgrænserne omkring  $\text{EC}_{50}$ -værdien er derfor brede.

TABEL 6. RESULTATER AF KONCENTRATION-RESPONS FORSØG MED AZOXYSTROBIN. EC<sub>50</sub> OG NOEC ER BEREGNET EFTER EKSPONERING I 24 – 96 TIMER. EC<sub>x</sub>-VÆRDIER ER ANGIVET MED TILHØRENDE 95 % KONFIDENSGRÆNSER. (24 T) = JUVENILE DYR, 24 TIMER GAMLE, (ÆG) = VOKSNE ÆGBÆRENDE DYR, (L) = LABORATORIEKULTUR, (F) = ORGANISMER INDSAMLET I FELTEN. KONCENTRATIONER ER OPGIVET I MG AZOXYSTROBIN L<sup>-1</sup>.

Forsøgsdyr	Størrelse (mm ± stdev)	EC <sub>50</sub>		NOEC samt tilsvarende effektniveau (EC <sub>x</sub> )					
		24 t	48 t	72 t	96 t	24 t	48 t	72 t	96 t
<i>D. magna</i> (24 t)	0,91 ± 0,04	0,89 (0,78 - 1,00)	0,53 (0,48 - 0,57)			0,525 / EC <sub>8</sub>	0,404 / EC <sub>2</sub>		
<i>D. magna</i> (æg)	2,39 ± 0,21	3,16 (2,76 – 3,68)	1,57 (1,34 - 1,80)			0,9 / EC <sub>7</sub>	0,9 / EC <sub>12</sub>		
<i>D. galeata</i> (F)	1,69 ± 0,10	0,39 (0,33 – 0,46)	0,18 (0,13 - 0,23)			0,124 / EC <sub>9</sub>	0,08 / EC <sub>12</sub>		
<i>D. galeata</i> (L)	1,41 ± 0,11	0,18 (0,15 – 0,21)	0,095 (0,08 - 0,11)			0,08 / EC <sub>5</sub>	< 0,08 / EC <sub>32</sub>		
<i>C. sphaericus</i>	0,25 ± 0,03	0,54 (0,44 – 0,67)	0,37 (0,30 - 0,45)			0,460 / EC <sub>40</sub>	0,15 / EC <sub>13</sub>		
<i>E. graciloides</i>	1,08 ± 0,06	0,038 (0,03 - 0,04)	0,038 (0,03 - 0,04)			0,034 / EC <sub>35</sub>	0,034 / EC <sub>36</sub>		
<i>C. plumosus</i>	23,02 ± 1,23	0,65 (0,57-0,76)	0,54 (0,46 - 0,63)			0,525 / EC <sub>32</sub>	0,250 / EC <sub>8</sub>		
<i>C. flavicans</i>	9,57 ± 0,73	*	*	*	*	>6	>6	>6	>6
<i>C. dipterum</i> -gr.	3,11 ± 0,19	*	3,56 (2,72 - 5,12)			1,5 <sub>α</sub>	1,5 / EC <sub>14</sub>		
<i>H. angustipennis</i>	8,89 ± 0,84	12,69 (7,60 - 162)	*	*		3 / EC <sub>4</sub>	3	3	

\* ingen dosis-respons sammenhæng.

α NOEC på 1,5 mg l<sup>-1</sup> for *C. dipterum*-gr. er en konservativ værdi, idet responset ved 3 mg l<sup>-1</sup> og 6 mg l<sup>-1</sup> blev fundet henholdsvis at være signifikant og ikke signifikant forskellig fra kontrolresponset (jf. tabel 3).

Efter 48 timers eksponering var *C. dipterum*-gr. den mindst sensitive art med en EC<sub>50</sub> = 3,56 (2,72 – 5,12) mg azoxystrobin l<sup>-1</sup>, mens *E. graciloides* var den signifikant mest sensitive art med en EC<sub>50</sub> = 0,038 (0,03 – 0,04) mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> (tabel 6). *C. flavicans* havde den højeste NOEC på > 6 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup>, mens *E. graciloides* havde den laveste NOEC på 0,034 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> (tabel 6).

Sammenligning af EC<sub>50</sub>-værdier for neonate og ægbærende *D. magna* viste, at neonate dafnier var signifikant mere sensitive over for azoxystrobin end ægbærende dafnier efter både 24 og 48 timers eksponering. Forskellen i EC<sub>50</sub>-værdier mellem neonate og ægbærende dafnier efter 24 og 48 timers eksponering var henholdsvis en faktor 3,6 og 3 (tabel 6).

Sammenligning af EC<sub>50</sub>-værdier for laboratoriekulturen af *D. galeata* og *D. galeata* indhentet i felten viste, at laboratoriekulturen var signifikant mere sensitiv over for azoxystrobin end feltpopulationen efter både 24 og 48 timers eksponering (tabel 6).

På baggrund af koncentration-respons sammenhængen blev det forventede respons i form af immobilitet ved de fastlagte NOEC-værdier fundet til at variere mellem EC<sub>2</sub> og EC<sub>40</sub> (tabel 6). For omtrent 45 % af NOEC-værdierne kunne det forventes, at < 10 % af forsøgspopulationen blev immobiliseret, mens 19 % af NOEC-værdierne ville kunne forventes at immobilisere ≤ 5 % af forsøgspopulationen.

I alle forsøg var mængden af opløst oxygen ≥ 6,5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering, undtagen i forsøg med ægbærende *D. magna* og *C. plumosus*,

hvor mængden af opløst oxygen var henholdsvis  $\geq 2,24$  og  $\geq 2,15$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering.

For alle forsøg varierede pH mellem 6,4 – 8,19 målt efter 48 timer. I de enkelte forsøg lå pH i opløsninger med pesticid inden for  $\pm 0,8$  enheder i forhold til pH i kontrolopløsningerne.

Immobilisering af 5 % af kontrolindividerne blev observeret i forsøg med neonate *D. magna* og *C. sphaericus* efter henholdsvis 24 og 48 timer. Kontrolimmobiliseringen var 10 % og 20 % efter henholdsvis 24 og 48 timer i forsøg med *E. graciloides* og 25 % efter 48 timer i forsøg med *D. galeata* (F). I alle øvrige forsøg var der ingen immobiliserede kontrolindivider.

### 3.1.3 Bentazon

Bentazon havde ingen effekt på *E. graciloides* ved koncentrationer op til 500 mg l<sup>-1</sup>, mens stoffet var meget svagt toksisk over for *D. magna*, med en EC<sub>50</sub> efter 48 timer på 3797 mg l<sup>-1</sup> og en NOEC efter 48 timer på 125 mg l<sup>-1</sup> (tabel 7). EC<sub>50</sub> for *D. magna* skal tages med forbehold, da bestemmelsen er gjort på baggrund af kun 2 og 4 immobile individer efter henholdsvis 24 og 48 timers eksponering registreret ved eksponeringskoncentrationer  $\geq 250$  mg bentazon l<sup>-1</sup>. NOEC-værdien til tiden 48 timer skal ligeledes tages med forbehold, idet eksponering for 250 mg l<sup>-1</sup> gav et signifikant anderledes respons end kontrollen, mens responset ved eksponering for 500 mg l<sup>-1</sup> ikke var signifikant forskellig fra kontrollen (jf. tabel 3). For mobile *D. magna* var der både efter 24 og 48 timers eksponering for  $\geq 250$  mg bentazon l<sup>-1</sup> flere individer, der lå i vandhinden. Effekten synes at opstå i forbindelse med hudskifte, hvor dafnierne havde svært ved at komme fri af den gamle hud.

TABEL 7. RESULTATER FOR KONCENTRATION-RESPONS FORSØG MED BENTAZON. EC<sub>50</sub> OG NOEC ER BEREGNET EFTER EKSPONERING I 24 OG 48 TIMER. EC-VÆRDIER ER ANGIVET MED TILHØRENDE 95 % KONFIDENSGRÆNSER. KONCENTRATIONER ER OPGIVET I MG BENTAZON L<sup>-1</sup>. (24 T) = JUVENILE DYR, 24 TIMER GAMLE.

Forsøgsdyr	Størrelse (mm $\pm$ stdev)	EC <sub>50</sub>		NOEC	
		24 t	48 t	24 t	48 t
<i>D. magna</i> (24 t)	0,97 $\pm$ 0,04	4369	3797	500	125
<i>E. graciloides</i>	1,08 $\pm$ 0,07	>500	>500	500	500

NOEC på 125 mg l<sup>-1</sup> for *D. magna* er en konservativ værdi, idet responset ved 250 mg l<sup>-1</sup> og 500 mg l<sup>-1</sup> blev fundet at være henholdsvis signifikant og ikke signifikant forskellig fra kontrolresponsen (jf. tabel 3).

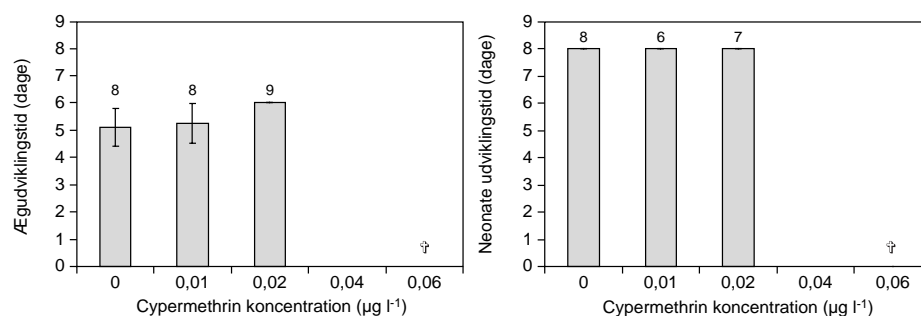
I alle forsøg var mængden af opløst oxygen  $\geq 7,6$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering. pH varierede mellem 7,2 – 7,6, og i de enkelte forsøg lå pH i opløsninger med pesticid inden for  $\pm 0,2$  enheder i forhold til pH i kontrolopløsningerne. Ingen kontrolindivider var immobiliseret eller udførte unormal adfærd.

## 3.2 Reproduktionsforsøg

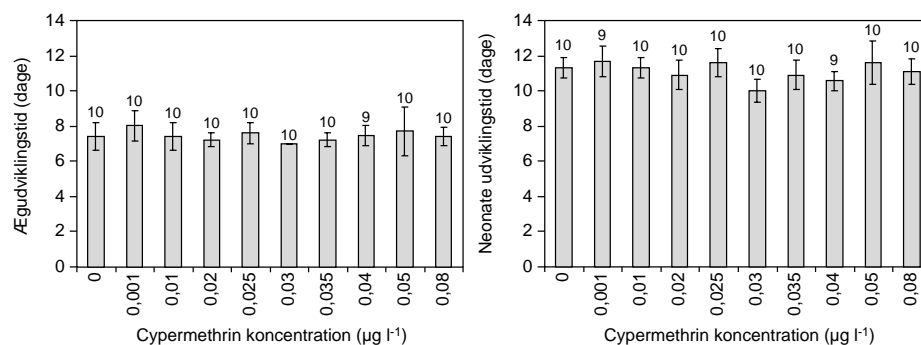
### 3.2.1 Cypermethrin

Her er beskrevet to forsøg med *D. magna*. I første forsøg blev der fokuseret på koncentrationer op til  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Mellem 80 – 90 % af forsøgsdyrene overlevede koncentrationer op til  $0,02 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ved  $0,04 \mu\text{g l}^{-1}$  (LOEC, tabel 8) døde 80 % af dyrene døde efter 4-6 dage og de overlevende udviklede ikke æg (figur 6). Ved højere koncentrationer døde alle dyr efter 4 døgn. Ægudviklingstiden lå på 5 – 6 dage og var ikke længere ved  $0,02 \mu\text{g l}^{-1}$  end i kontrolbehandlingerne. I alle tre behandlinger med ægudvikling skete der også en videreudvikling til neonate indenfor 8 dage (figur 6). Pesticidpåvirkningen havde ikke effekt på moderdyrenes længde.

I det andet forsøg blev der fokuseret på koncentrationer  $< 0,04 \mu\text{g l}^{-1}$  (figur 7). Der var ikke nogen effekt af cypermethrin på hverken ægudviklingstiden eller udviklingstiden af neonate inden for koncentrationsgradienten 0 –  $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ved alle behandlinger overlevede 90 – 100 % af forsøgsdyrene. Forsøgsdyrenes størrelse varierede heller ikke som følge af pesticidpåvirkningen, kontroldyrene målte  $3,03 \pm 0,06 \text{ mm}$ , mens dyrene ved  $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$  målte  $2,95 \pm 0,1 \text{ mm}$ .



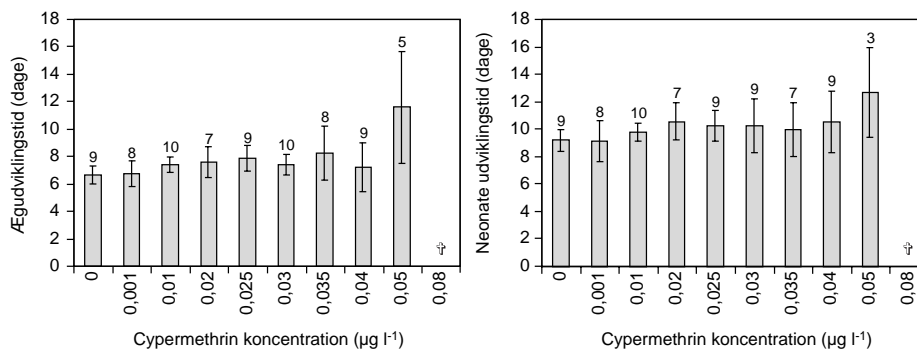
FIGUR 6. *D. MAGNA*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NEONATES UDVIKLINGSTID (HØJRE)  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NEONATE DAFNIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.



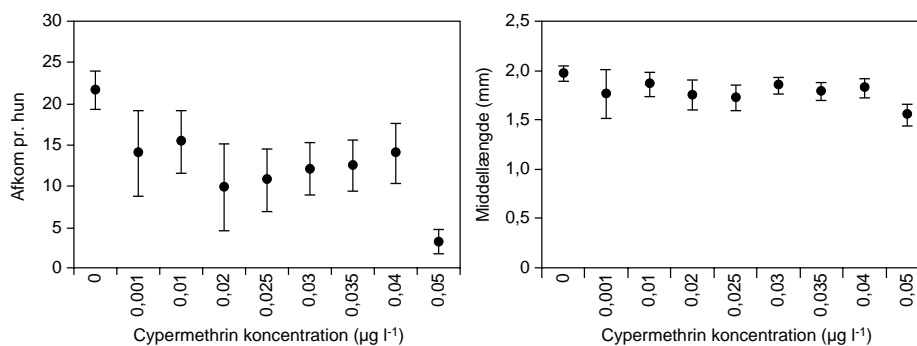
FIGUR 7. *D. MAGNA*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NEONATES UDVIKLINGSTID (HØJRE)  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NEONATE DAFNIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.

Reproduktionen hos *D. galeata* blev testet ved cypermethrin koncentrationer op til  $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$  (figur 8). Op til  $0,04 \mu\text{g l}^{-1}$  var der ingen signifikant forskel i ægudviklingstiden (NOEC, tabel 8), men dog tendens til en svag stigning i udviklingstiden. Ved  $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (LOEC, tabel 8) var ægudviklingstiden

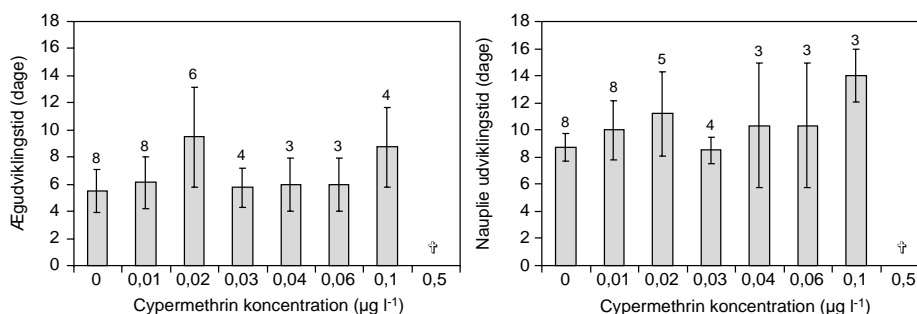
signifikant ( $p = 0,039$ ) længere, 11,6 dage mod 6,6 dage i kontrolbehandlingen. Samtidig reduceredes antallet af ægproducerende dafnier også fra 7 – 10 i kontrolbehandlingen og de lavere koncentrationer til 5 ved  $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ved  $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$  døde alle dafnier indenfor 2 – 7 dage og dermed inden ægdannelsen. Havde *D. galeata* udviklet æg skete der en videreudvikling til neonate hos næsten alle dafnier (figur 8). Der var ikke forskel på udviklingstiden fra æg til neonate, den varierede i alle behandlinger mellem 2 – 3 dage. Imidlertid var antal neonate plus æg pr. *D. galeata* signifikant ( $p < 0,001$ ) mindre ved  $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (3,3 neonate + æg) end i kontrolbehandlingen (21 neonate + æg), ligesom de eksponerede dafnier var mindre end i kontrolbehandlingen ( $p < 0,001$ ) ved forsøgsafslutningen (figur 9).



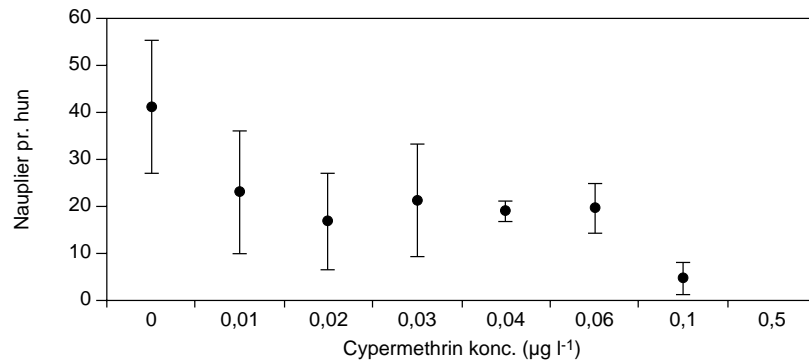
FIGUR 8. *D. GALEATA*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NEONATES UDVIKLINGSTID (HØJRE)  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NEONATE DAFNIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.



FIGUR 9. ANTAL AFKOM (NEONATE + ÆG) PR. *D. GALEATA*  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER (VENSTRE) OG *D. GALEATA*'S MIDDELLÆNGDE  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER (HØJRE) SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION VED FORSØGSAFSLUTNING.



FIGUR 10. *C. VICINUS*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NAUPLIERNES UDVIKLINGSTID (HØJRE)  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NAUPLIER. KORS ANGIVER, AT ALLE



FIGUR 11. ANTAL AFKOM (NAUPLIER) PR. *C. VICINUS* ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION.

***C. vicinus*** blev testet ved cypermethrin koncentrationer op til 0,5 µg l<sup>-1</sup> (figur 10). Ved koncentrationer over 0,02 µg l<sup>-1</sup> overlevede kun 30 – 40 % af forsøgsdyrene, de resterende dyr døde inden for 5 – 20 dage og ved 0,5 µg l<sup>-1</sup> døde alle forsøgsdyr inden for 72 timer. Alle overlevende dyr udviklede ægsække inden for 5 – 9 dage, og der var ikke signifikante forskelle på ægudviklingstiden mellem behandlingerne. Hos næsten alle dyr, der havde udviklet ægsække, skete der en videreudvikling til nauplier (figur 10) inden for en periode på 1,5 – 6 dage i forhold til tidspunktet, hvor ægsækkene var dannet. Ved 0,1 µg l<sup>-1</sup> (LOEC, tabel 8) var nauplie udviklingstiden signifikant (p = 0,008) længere end hos kontroldyrene, og ved koncentrationer > 0,03 udvikledes der signifikant færre nauplier pr. ***C. vicinus***, helt ned til kun 4 nauplier pr. hun mod 42 nauplier pr. hun i kontrolbehandlingen (figur 11).

TABEL 8. EFFEKTPARAMETRE ANVENDT I REPRODUKTIONSFORSØGENE OG DE TILHØRENDE LOEC OG NOEC'ER FOR HHV. CYPERMETHRIN OG AZOXYSTROBIN PÅ *D. MAGNA*, *D. GALEATA*, *C. VICINUS* OG *E. GRACILOIDES*.

	Cypermethrin, µg l <sup>-1</sup>		Azoxystrobin, mg l <sup>-1</sup>	
	LOEC	NOEC	LOEC	NOEC
<i>D. magna</i>				
Reproduktion	0,04 <sup>1)</sup>	0,02		
Ægudviklingstid		0,02		0,28
Neonate, udviklingstid		0,02	0,08	0,04
Kuld størrelse				0,28 <sup>2)</sup>
Længde		1,0		0,28
<i>D. galeata</i>				
Reproduktion				
Ægudviklingstid	0,05	0,04		0,08
Neonate, udviklingstid			0,03	0,02
Kuld størrelse	0,05	0,04	0,08	0,06 <sup>2)</sup>
Længde	0,05	0,04	0,02	0,01
<i>C. vicinus</i>				
Reproduktion			0,02 <sup>3)</sup>	
Ægudviklingstid		0,1		0,01
Nauplier, udviklingstid	0,1	0,06		0,01
Kuld størrelse	0,04	0,03		0,01
<i>E. graciloides</i>				
Reproduktion		(1,0) <sup>4)</sup>	0,01 <sup>3)</sup>	
Nauplier, udviklingstid				0,005
Kuld størrelse			0,005	0,002

1): Letal effekt på 80 % af dyrene efter 4 – 6 dage. De overlevende producerede ikke æg.

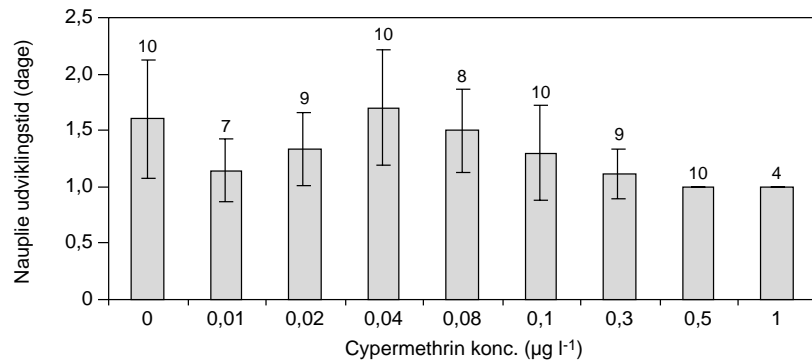
2): For dafniernes vedkommende omfatter kuld størrelse både æg og levende afkom.

3): Alle forsøgsdyr døde indenfor 48 timer.

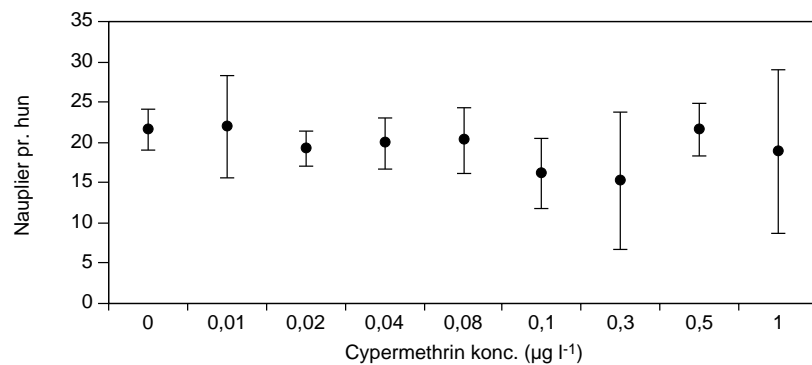


4):  $EC_{50}$  (24 timer) =  $0,19 \mu\text{g l}^{-1}$  (jf. afsnit 3.1.1).

**E. graciloides** blev testet ved koncentrationer op til  $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$  (figur 12). Ægudviklingstiden blev ikke undersøgt for denne art p.g.a. metodevalget (se afsnit 2.5.3). Hos **Eudiaptomus** var det meget variabelt, hvor mange forsøgsdyr der overlevede. Der var ikke noget generelt mønster for, ved hvilke behandlinger dyrene overlevede. Dog var der færrest overlevende dyr (4) ved den højeste cypermethrinkoncentration. Udviklingstiden fra æg til nauplie varierede mellem 1 – 1,7 dage ligeledes uden et egentligt mønster i forhold til behandling. Antal dannede nauplier ved forsøgsafslutningen varierede mellem 16 og 23 nauplier pr. **Eudiaptomus**, men uden signifikante forskelle (figur 13).



FIGUR 12. *E. GRACILOIDES*' NAUPLIE-UDVIKLINGSTID  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE NAUPLIER. UDVIKLINGSTIDEN KAN IKKE UMIDDELBART SAMMENLIGNES MED NAUPLIERNES UDVIKLINGSTID HOS FX. *C. VICINUS* (SE AFSNIT 2.5.3).

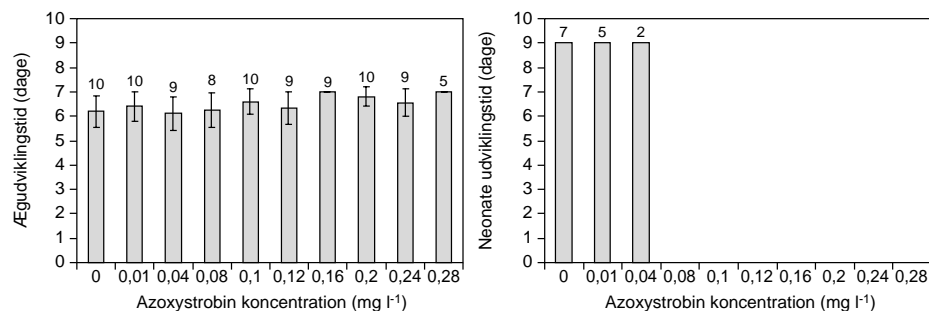


FIGUR 13. ANTAL AFKOM (NAUPLIER) PR. *E. GRACILOIDES*  $\pm$  95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF CYPERMETHRINKONCENTRATION.

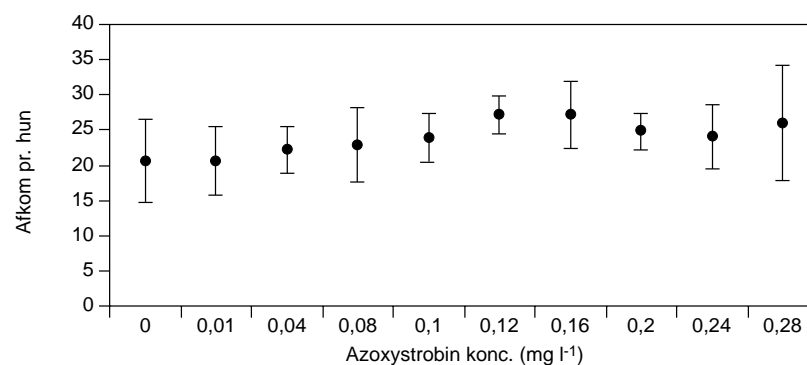
### 3.2.2 Azoxystrobin

**D. magna** blev testet ved azoxystrobin koncentrationer op til  $0,28 \text{ mg l}^{-1}$  (figur 14). Næsten alle forsøgsdyr overlevede eksponeringen, kun ved den højeste koncentration døde et større antal dyr (50 %). Disse døde indenfor en periode på 2 – 5 dage. Alle overlevende dyr udviklede æg inden for en periode på 6 – 7 dage, og der var ingen forskelle i udviklingstiden. I løbet af yderligere 2 – 3 dage blev der udviklet neonate, men kun ved koncentrationer på op til  $0,04 \text{ mg l}^{-1}$ . Ved de højere koncentrationer skete der ingen videreudvikling af æggene, på trods af, at alle ægbærende dyr overlevede (figur 14). LOEC var således  $0,08 \text{ azoxystrobin mg l}^{-1}$  (tabel 8). I de tre behandlinger, hvor der skete

en udvikling af neonate, faldt antallet af individer, som udviklede neonate med øget pesticidkoncentration, fra 7 i kontrollen til 2 ved 0,04 mg l<sup>-1</sup>. Betragtes det totale antal afkom (neonate + æg) pr. *D. magna* varierede det mellem 21 og 27, uden at der var nogen forskelle mellem behandlingerne (figur 15). Evnen til at udvikle æg blev således ikke svækket af azoxystrobinpåvirkningen, kun videreudviklingen til neonate.



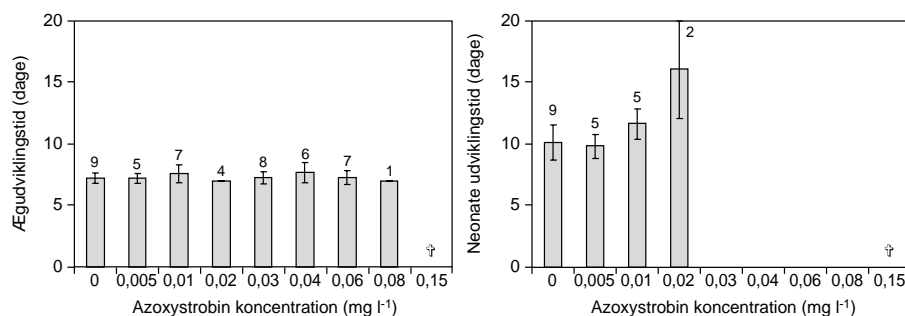
FIGUR 14. *D. MAGNA*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NEONATES UDVIKLINGSTID (HØJRE) ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NEONATE DAFNIER.



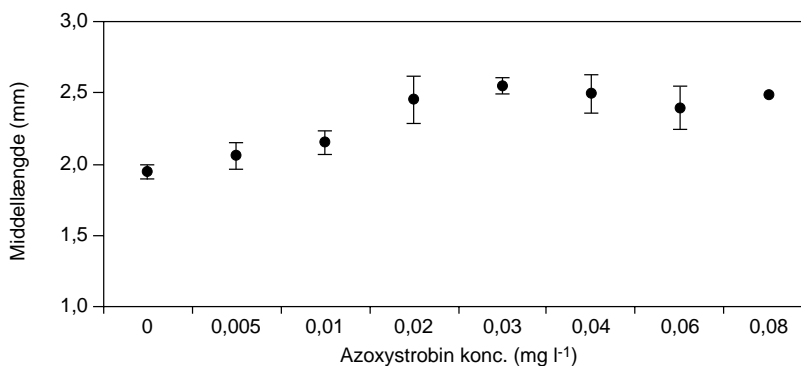
FIGUR 15. ANTAL AFKOM (NEONATE + ÆG) PR. *D. MAGNA* ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBINKONCENTRATION.

*D. galeata* blev testet ved koncentrationer op til 0,15 mg l<sup>-1</sup> (figur 16). De ægudviklende dafnier udviklede æggene inden for ca. 7 dage uanset azoxystrobin-koncentrationen. Ved 0,15 mg l<sup>-1</sup> døde alle forsøgsdyr inden for 48 timer, og ved 0,08 mg l<sup>-1</sup> overlevede kun en enkelt dafnie behandlingen helt indtil udviklingen af neonate. Efter yderligere 3 – 7 dage blev der udviklet neonate. Neonate blev kun udviklet i azoxystrobin-koncentrationer op til 0,02 mg l<sup>-1</sup>. Ved højere koncentrationer skete der ikke en udvikling fra æg til neonate. LOEC var 0,03 mg l<sup>-1</sup> (figur 16, tabel 8). Der var samtidig en tendens til, at udviklingstiden fra æg til neonat var positivt relateret til eksponeringskoncentrationen uden dog at være signifikant. Udviklingstiden i kontrollen var ca. 10 dage, mens den ved 0,02 mg l<sup>-1</sup> var ca. 15 dage (p = 0,06). Der var også tendens til, at antal neonate-udviklende dafnier faldt med øget eksponeringskoncentration.

Middellængden af *D. galeata* blev signifikant (p < 0,001) forøget ved koncentrationer ≥ 0,02 mg l<sup>-1</sup> (figur 17) sammenlignet med kontrolbehandlingen. Evnen til at udvikle æg var, ligesom hos *D. magna*, ikke entydigt svækket som følge af azoxystrobin-eksponeringen, men der var meget stor variation i ægdannelsen hos de eksponerede dyr.

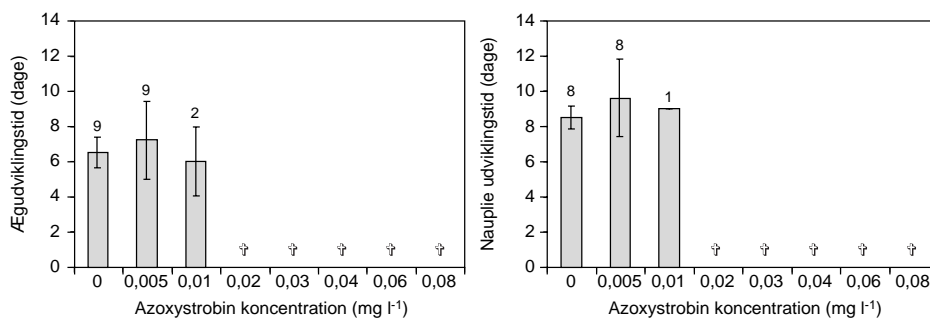


FIGUR 16. *D. GALEATA*'S ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NEONATES UDVIKLINGSTID (HØJRE) ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NEONATE DAFNIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.



FIGUR 17. *D. GALEATA*'S MIDDELLÆNGDE ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION VED FORSØGSAFSLUTNING.

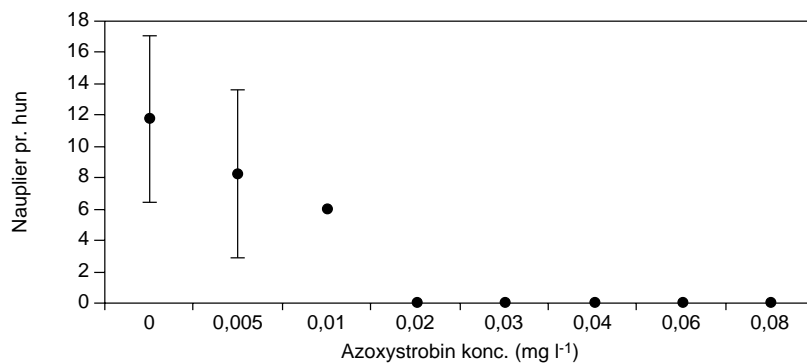
***C. vicinus*** blev testet ved koncentrationer op til 0,1 mg l<sup>-1</sup> (figur 18). Ved koncentrationer ≥ 0,02 mg l<sup>-1</sup> (LOEC, tabel 8) døde alle forsøgsdyr inden for 48 timer. Ved koncentrationerne < 0,02 mg l<sup>-1</sup> udvikledes ægsække; ved 0,01 mg l<sup>-1</sup> dog kun hos 25 % (2 dyr) af de overlevende dyr. Ægudviklingstiden var 6 – 7 dage uafhængig af azoxystrobin-koncentrationen. Efter yderligere 2 – 3 dage udvikledes der nauplier fra ægsækkene. Med undtagelse af et enkelt dyr pr. behandling udvikledes der nauplier fra alle ægbærende dyr (figur 18). Der var tendens til et reduceret antal nauplier pr. ***C. vicinus*** ved øget azoxystrobin-koncentration, men forskellen var ikke signifikant (figur 19).



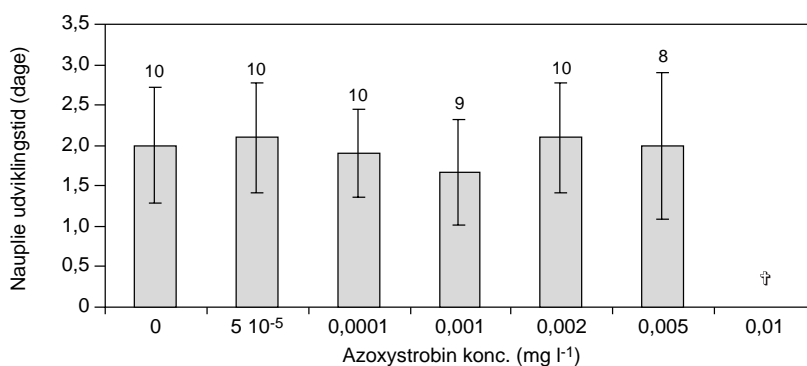
FIGUR 18. *C. VICINUS*' ÆGUDVIKLINGSTID (VENSTRE) OG NAUPLIERNES UDVIKLINGSTID (HØJRE) ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE HHV. ÆG OG NAUPLIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.

***E. graciloides*** blev testet ved koncentrationer op til 0,01 mg l<sup>-1</sup> (figur 20). Ved 0,01 mg l<sup>-1</sup> døde alle forsøgsdyr inden for 48 timer. Ved de lavere

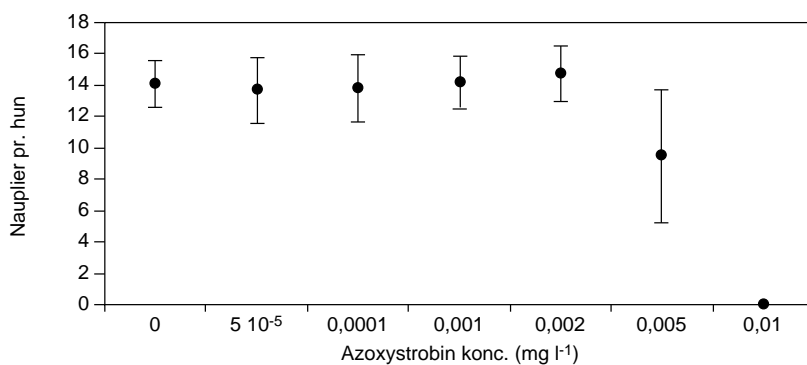
koncentrationer udvikledes der nauplier hos 80 – 100 % af forsøgsdyrene inden for 1,5 – 3 dage. Der var ikke signifikante forskelle i udviklingstiden uanset eksponeringskoncentration. Fra kontrolbehandlingen op til en azoxystrobinkoncentration på 0,002 mg l<sup>-1</sup> lå nauplie-antallet pr. *E. graciloides* mellem 14 – 15 nauplier. Ved 0,005 mg l<sup>-1</sup> (LOEC, tabel 8) var nauplie-antallet signifikant (p = 0,032) lavere (9,5 nauplier pr. *E. graciloides*, figur 21).



FIGUR 19. ANTAL AFKOM (NAUPLIER) PR. *C. VICINUS* ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION.



FIGUR 20. *E. GRACILOIDES* NAUPLIE-UDVIKLINGSTID ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION. TAL OVER SØJLEN ANGIVER ANTAL DYR, DER UDVIKLEDE NAUPLIER. KORS ANGIVER, AT ALLE FORSØGSDYR DØDE.



FIGUR 21. ANTAL AFKOM (NAUPLIER) PR. *E. GRACILOIDES* ± 95 % KONFIDENSGRÆNSER SOM FUNKTION AF AZOXYSTROBIN-KONCENTRATION.

### 3.3 Videoregistrering af fysiologiske parametre

#### 3.3.1 Cypermethrin

##### ***Kvalitative effekter på *D. magna****

Effekten af cypermethrin var afhængig af eksponeringskoncentrationen og eksponeringstiden.

De første symptomer på en effekt af cypermethrineksponeringen var en forøgelse i aktivitet af brystlemmer og mandibler, som udmøntede sig i sitrende bevægelser med lav amplitude (krampetilstand). De sitrende bevægelser blev hurtigt efterfulgt af en periode med helt eller delvist ophør i aktivitet, hvorfra der evt. kunne observeres en senere stigning i aktivitet. Samtidige effekter kunne observeres på aktiviteten af bagkloen og hjertet, som begge blev forøget. Effekterne opstod efter ca. 15 minutters eksponering.

##### ***Homogenitet af forsøgsdyr før cypermethrin tilsætning***

Overordnet viste MANOVA (tabel 9), at aktiviteten af de 4 responsparametre i de 4 behandlingsgrupper (kontrol; 0,1; 1; 10 µg l<sup>-1</sup>) før tilsætning af cypermethrin var svagt forskellige fra hinanden ( $F_{12,45} = 2,00$ ;  $P = 0,047$ ), mens forskellen på individerne inden for hver behandlingsgruppe var stærkt signifikant ( $F_{64,320} = 2,710$ ;  $P < 0,0001$ ). Hjerteaktiviteten varierede mellem 281 - 414 slag min<sup>-1</sup> i de 4 behandlingsgrupper før cypermethrintilsætning (figur 22) og var den mest heterogene responsparameter (univariat ANOVA,  $F_{3,16} = 3,49$ ,  $P = 0,04$ ) og samtidig også den eneste responsparameter, som var signifikant forskellig mellem behandlingsgrupperne (tabel 10). Før cypermethrintilsætning havde behandlingsgruppen, der senere blev eksponeret for 1 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>, således en signifikant ( $P < 0,05$ ) højere hjerteaktivitet end kontrolgruppen (Tukey's test, tabel 10).

##### ***Behandlings- og tidseffekter***

Efter cypermethrintilsætning viste MANOVA, at cypermethrinkoncentration, tid og interaktionen mellem cypermethrinkoncentration og tid havde en signifikant ( $P < 0,0001$ ) indflydelse på aktiviteten af dafniernes hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo (tabel 9). Den signifikante interaktion mellem tid og behandling ( $F_{72,2456} = 8,94$ ;  $P < 0,0001$ ) viste, at effekten af tiden afhang af eksponeringskoncentrationen, hvilket også blev bekræftet ved tests inden for behandlingsgrupperne. Med stigende cypermethrinkoncentration var graden af effekt over tiden kraftigere (1 µg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,568} = 12,65$ ; 10 µg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,636} = 11,05$ ;  $P < 0,0001$  for begge koncentrationer), og effekterne på dafnierne optrådte efter kortere eksponeringstid (se fx. effekten på brystlemmer og mandibler, figur 23 og 24).

Med stigende cypermethrinkoncentration og stigende eksponeringstid viser aktiviteten af responsparametrene efter cypermethrintilsætning også en klar tendens til at være mere forskellige fra aktiviteten før cypermethrintilsætning (tabel 10, signifikante forskelle markeret med kursiverede tal) og fra kontrolaktiviteten (tabel 10, signifikante forskelle markeret med \*).

TABEL 9. RESULTATER AF MULTIVARIATE VARIANSANALYSER (MANOVA) AF DATA FRA VIDEOREGISTRERINGSFORSØG MED CYPERMETHRIN. PILLAU'S TRACE OG DEN TILHØRENDE TEST FOR INGEN EFFEKT AF DEN GIVNE FAKTOR ER OPGIVET. EN SIGNIFIKANT VÆRDI INDIKERER, AT FAKTOREN HAVDE EN OVERORDNET EFFEKT PÅ DE 4 RESPONSPARAMETRE (AKTIVITET AF HJERTE, BRYSTLEMMER, MANDIBLER OG BAGKLO).

Behandling	Pre-behandlingseffekter	Post-behandlingseffekter		
	Effekt af behandling	Effekt af behandling	Effekt af tid	Interaktion mellem tid og behandling
Kontrol			0,624 $F_{24,616}=4,75; P<0,0001$	
0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$			0,472 $F_{24,636}=3,55; P<0,0001$	
1 $\mu\text{g l}^{-1}$			1,393 $F_{24,568}=12,65; P<0,0001$	
10 $\mu\text{g l}^{-1}$			1,177 $F_{24,636}=11,05; P<0,0001$	
Overordnet	1,042 $F_{12,45}=2,00; P=0,047$	1,643 $F_{12,45}=4,54; P<0,0001$	0,539 $F_{24,2456}=15,93; P<0,0001$	0,831 $F_{72,2456}=8,94; P<0,0001$

Tabel 10. RESULTATER AF UNIVARIATE STATISTISKE ANALYSER (ANOVA) AF DATA FRA VIDEOREGISTRERINGSFORSØG MED CYPERMETHRIN. PRE-BEHANDLINGS FORSKELLE VISER, I HVOR HØJ GRAD GRUPPERNE AF DAFNIER HVER BESTÅENDE AF 5 INDIVIDER KUNNE OPFATTES SOM ENS, FØR DE BLEV TILDELT EN AF FIRE BEHANDLINGER. POST-BEHANDLINGS FORSKELLE ER FORDELT I 3 KOMPONENTER SVARENDE TIL: (1) BEHANDLING, (2) TID OG (3) INTERAKTIONEN MELLEML BEHANDLING OG TID. DEN OVERORDNEDE FORSKEL MELLEML PRE- OG POSTBEHANDLINGS EFFEKTER ER TESTET VED LINEÆR KONTRASTANALYSE.

Parameter	Behandling	Pre-behandling	Minutter efter cypermethrin tilsætning♣							Post behandling gns.	Kontrast mellem pre- og post-behandling♦	Overordnet effekt af tid	
			15	60	180	600	960	1320	1440				
Hjerte aktivitet	Kontrol	140,7 <sup>a</sup>	142,4	134,4	135,1	124,0 <sup>***</sup>	125,0 <sup>***</sup>	132,2	136,9	132,6	$F_{1,178}=5,53 P=0,0197$ $F_{1,188}=0,12 P=0,7249$ $F_{1,166}=0,14 P=0,7116$ $F_{1,183}=47,9 P<0,0001$	$F_{6,619}=3,19 P=0,0043$	
	0,1 g l <sup>-1</sup>	159,0 <sup>ab</sup>	166,6	151,7	166,4	156,9	163,5	154,4	167,8	161,4			
	1 g l <sup>-1</sup>	206,8 <sup>b</sup>	203,5	239,6 <sup>**</sup>	207,4	202,7	194,8	200,7	209,2	208,2			
	10 g l <sup>-1</sup>	151,2 <sup>ab</sup>	160,6	197,5 <sup>**</sup>	191,5 <sup>***</sup>	203,5 <sup>***</sup>	205,7 <sup>***</sup>	202,1 <sup>***</sup>	198,8 <sup>***</sup>	195,2			
	Gennemsnit	164,4	167,5	180,2	175,1	171,8	172,3	171,5	177,5	173,6			
Pre-behandlings forskelle:		$F_{3,16}=3,49; P=0,040$	Overordnet forskel mellem behandlinger:							$F_{3,16}=12,25; P=0,0002$	Interaktion mellem behandling og tid:		
											$F_{18,619}=6,08; P<0,0001$		
Brystlemme aktivitet	Kontrol	222,8 <sup>a</sup>	223,1	214,1	222,4	216,2	211,7	206,7 <sup>***</sup>	214,3	215,6	$F_{1,178}=5,13 P=0,0247$ $F_{1,188}=21,6 P<0,0001$ $F_{1,173}=109 P<0,0001$ $F_{1,188}=423 P<0,0001$	$F_{6,631}=22,1 P<0,0001$	
	0,1 g l <sup>-1</sup>	224,5 <sup>a</sup>	220,6	211,2	176,9 <sup>***</sup>	196,1 <sup>**</sup>	185,7 <sup>***</sup>	191,2 <sup>***</sup>	180,3 <sup>***</sup>	194,6			
	1 g l <sup>-1</sup>	211,3 <sup>a</sup>	217,7 <sup>*</sup>	147,5 <sup>***</sup>	120,0 <sup>***</sup>	123,2 <sup>**</sup>	112,6 <sup>***</sup>	125,7 <sup>**</sup>	127,7 <sup>**</sup>	140,3			
	10 g l <sup>-1</sup>	219,2 <sup>a</sup>	48,9 <sup>**</sup>	117,0 <sup>**</sup>	65,4 <sup>**</sup>	66,7 <sup>**</sup>	65,5 <sup>**</sup>	64,6 <sup>**</sup>	71,8 <sup>**</sup>	71,4			
	Gennemsnit	219,5	177,6	172,4	146,2	150,5	143,9	147,1	143,9	154,9			
Pre-behandlings forskelle:		$F_{3,16}=0,17; P=0,914$	Overordnet forskel mellem behandlinger:							$F_{3,16}=18,12; P<0,0001$	Interaktion mellem behandling og tid:		
											$F_{18,631}=12,4; P<0,0001$		
Mandibel aktivitet	Kontrol	62,72 <sup>a</sup>	60,92	57,44	59,92	52,28 <sup>**</sup>	57,84	57,72	68,33	58,67	$F_{1,178}=2,89 P=0,0907$ $F_{1,188}=3,09 P=0,0802$ $F_{1,173}=60,9 P<0,0001$ $F_{1,188}=95,5 P<0,0001$	$F_{6,631}=18,3 P<0,0001$	
	0,1 g l <sup>-1</sup>	54,76 <sup>a</sup>	60,00	60,32	41,44 <sup>***</sup>	51,36	46,96	45,28	47,48	50,41			
	1 g l <sup>-1</sup>	65,72 <sup>a</sup>	50,60 <sup>**</sup>	5,08 <sup>***</sup>	17,88 <sup>***</sup>	15,00 <sup>***</sup>	45,64 <sup>**</sup>	48,04 <sup>*</sup>	52,30 <sup>*</sup>	31,74			
	10 g l <sup>-1</sup>	55,20 <sup>a</sup>	9,20 <sup>**</sup>	12,92 <sup>**</sup>	11,04 <sup>**</sup>	22,04 <sup>***</sup>	28,88 <sup>***</sup>	26,28 <sup>**</sup>	29,24 <sup>***</sup>	19,94			
	Gennemsnit	59,60	45,18	33,94	32,57	35,17	44,83	44,35	46,21	40,10			
Pre-behandlings forskelle:		$F_{3,16}=0,30; P=0,824$	Overordnet forskel mellem behandlinger:							$F_{3,16}=5,98; P=0,0062$	Interaktion mellem behandling og tid:		
											$F_{18,631}=14,5; P<0,0001$		
Bagklo aktivitet	Kontrol	1,96 <sup>a</sup>	3,28	6,08 <sup>*</sup>	3,96	2,44	0,56	1,64	1,47	2,85	$F_{1,178}=0,37 P=0,5449$ $F_{1,188}=9,59 P=0,0032$ $F_{1,173}=59,5 P<0,0001$ $F_{1,188}=823 P<0,0001$	$F_{6,626}=12,3 P<0,0001$	
	0,1 g l <sup>-1</sup>	5,48 <sup>a</sup>	5,20	9,72	17,72 <sup>**</sup>	17,60 <sup>**</sup>	16,26 <sup>**</sup>	11,90	14,64	13,34			
	1 g l <sup>-1</sup>	5,92 <sup>a</sup>	26,04 <sup>***</sup>	61,36 <sup>***</sup>	39,44 <sup>***</sup>	32,52 <sup>***</sup>	26,80 <sup>***</sup>	20,44 <sup>***</sup>	26,40 <sup>***</sup>	33,93			
	10 g l <sup>-1</sup>	6,24 <sup>a</sup>	67,56 <sup>***</sup>	92,20 <sup>***</sup>	64,16 <sup>***</sup>	102,6 <sup>***</sup>	110,0 <sup>***</sup>	107,8 <sup>***</sup>	103,0 <sup>***</sup>	92,47			
	Gennemsnit	4,90	25,25	42,34	31,32	32,8	38,40	36,67	43,04	36,34			
Pre-behandlings forskelle:		$F_{3,16}=2,44; P=0,102$	Overordnet forskel mellem behandlinger:							$F_{3,16}=89,2; P<0,0001$	Interaktion mellem behandling og tid:		
											$F_{18,626}=8,48; P<0,0001$		

• Alle statistiske analyser er baseret på kvadratrodstransformerede data. ♣ Parvise sammenligninger mellem behandlinger. Værdier efterfulgt af samme bogstav er ikke signifikant forskellig på 5 % signifikansniveau efter justering for antallet af samtidige tests (sequential Bonferroni). ♣ Gennemsnit for hver kombination af tid og behandling. Værdier efterfulgt af stjerne er signifikant forskellige fra pre-behandlingsaktiviteten for en given behandling (\*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ ). Værdier skrevet i kursiv er signifikant forskellige ( $P<0,05$ ) fra kontrolaktiviteten til det givne tidspunkt. Begge tests er justeret for antallet af samtidige tests (sequential Bonferroni). ♦ Udtrykker for en given behandling forskellen mellem pre-behandlingsaktiviteten og det totale aktivitetsgennemsnit for post-behandlingen.

Dafnierne i kontrollen ændrede også adfærd i løbet af de 24 timer, forsøget varede ( $F_{24,616} = 4,75$ ;  $P < 0,0001$ ). Men for alle responsparametre var det kun til enkelte tidspunkter, at aktiviteten var signifikant forskellig fra startniveauet i kontrollen (tabel 10, signifikante forskelle markeret med \*).

For alle responsparametre (undtaget bagkloen ved eksponering for  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) indtrådte den maksimale effekt af stoffet inden for en eksponeringstid på 3 timer (figur 22 - 25). Men allerede efter 15 minutters eksponering for  $1 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$  kunne der, sammenlignet med niveauet før cypermethrintilsætning, observeres effekter på aktiviteten af brystlemmer, mandibler og bagklo (signifikante forskelle markeret med \* i tabel 10).

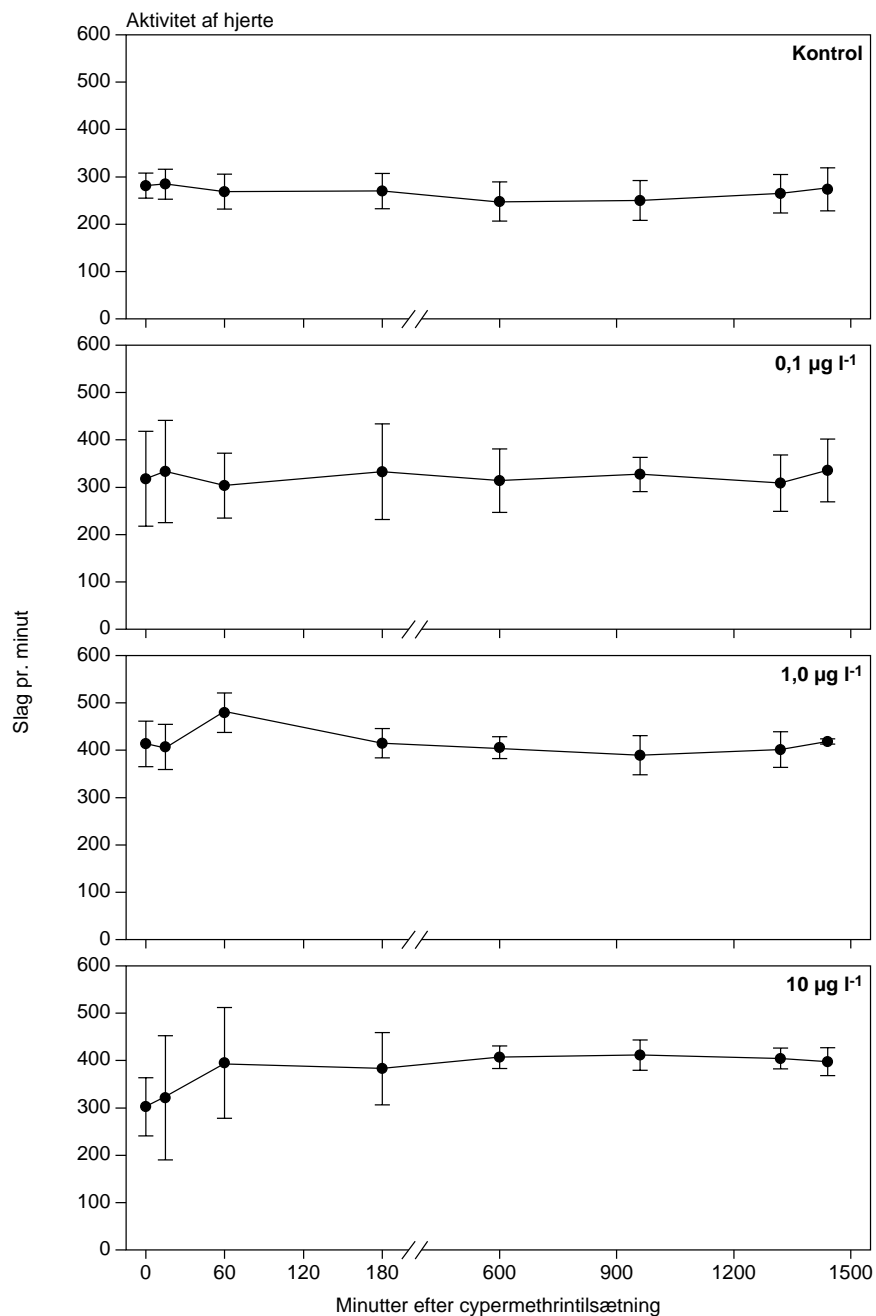
Overordnet medførte cypermethrineksponering en signifikant forøgelse af aktiviteten af hjertet og bagklo og en signifikant reduktion i aktiviteten af brystlemmer og mandibler hos dafnierne (jf. tabel 10, figur 22 - 25). Efter 24 timers eksponering for  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  var aktiviteten af hjertet, bagkloen, brystlemmerne og mandiblerne henholdsvis 131 %, 1650 %, 33 % og 53 % af aktiviteten før cypermethrin eksponering.

Bagkloen var den mest følsomme responsparameter over for cypermethrin ( $F_{3,16} = 89,2$ ;  $P < 0,0001$ ), mens effekten af cypermethrin var mindst for mandiblerne ( $F_{3,16} = 5,98$ ;  $P < 0,0062$ ). Brystlemmeaktiviteten var den parameter, der ændrede sig mest over tiden ( $F_{6,631} = 22,1$ ;  $P < 0,0001$ ), mens hjerteaktiviteten ændrede sig mindst ( $F_{6,619} = 3,19$ ;  $P < 0,0043$ ). Aktiviteten af brystlemmerne udviste størst interaktion mellem cypermethrinbehandling og tid ( $F_{18,631} = 12,4$ ;  $P < 0,0001$ ), men interaktionen for de 3 andre responsparametre var også stærkt signifikant (tabel 10).

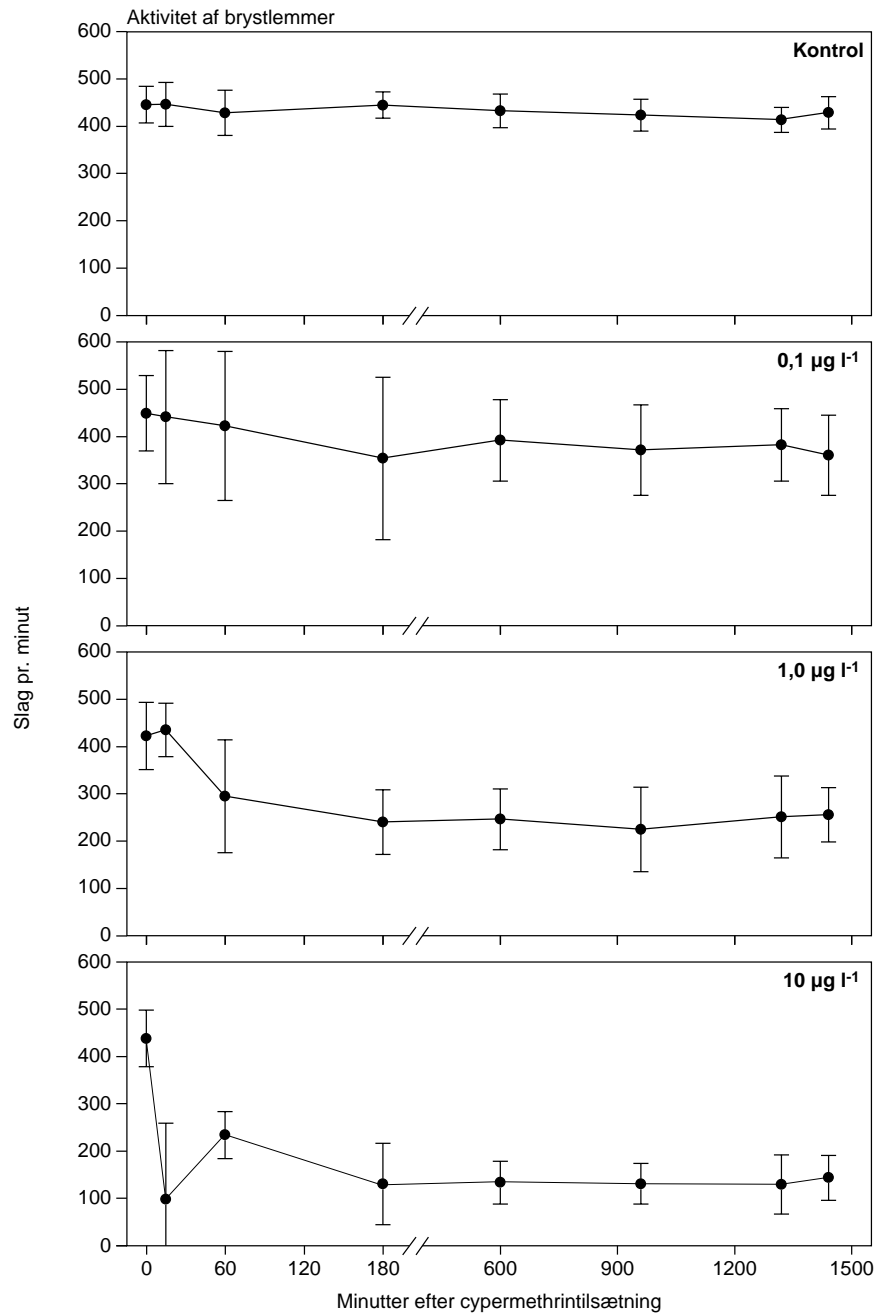
Lineær kontrastanalyse mellem aktiviteten af responsparametrene før og efter cypermethrintilsætning viste, at bagklo og brystlemmer blev signifikant påvirket ved en cypermethrinkoncentration på  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Mandibelaktiviteten blev signifikant påvirket ved en cypermethrinkoncentration på  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , mens hjerteaktiviteten var signifikant forskellig fra startaktiviteten ved eksponering for  $10 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$  (tabel 10). Eftersom hjerteaktiviteten som udgangspunkt var signifikant forskellig mellem dafnier i kontrollen og dafnier eksponeret for  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , ses der signifikante behandlingseffekter ved  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  (markeret ved kursiverede tal i tabel 10), men derimod ingen nævneværdige forskelle mellem aktiviteten før og efter cypermethrintilsætning (signifikante forskelle markeret med \* i tabel 10).

For mandiblerne var der en tendens til, at effekten af cypermethrin aftog med tiden, således at aktiviteten indstillede sig på et nyt niveau tættere på startaktiviteten efter 24 timers eksponering. Denne tendens blev observeret hos dafnier eksponeret for  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  og  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  efter henholdsvis 16 og 10 timers eksponering (figur 22 - 25). Selv om effekten på mandiblerne fortog sig med tiden, var aktiviteten dog stadig signifikant forskellig fra startniveauet (tabel 10). For de øvrige responsparametre indstillede aktiviteten sig efter ca. 6 timers eksponering omkring niveauet for den maksimale effekt ved den respektive koncentration (figur 22 - 25).

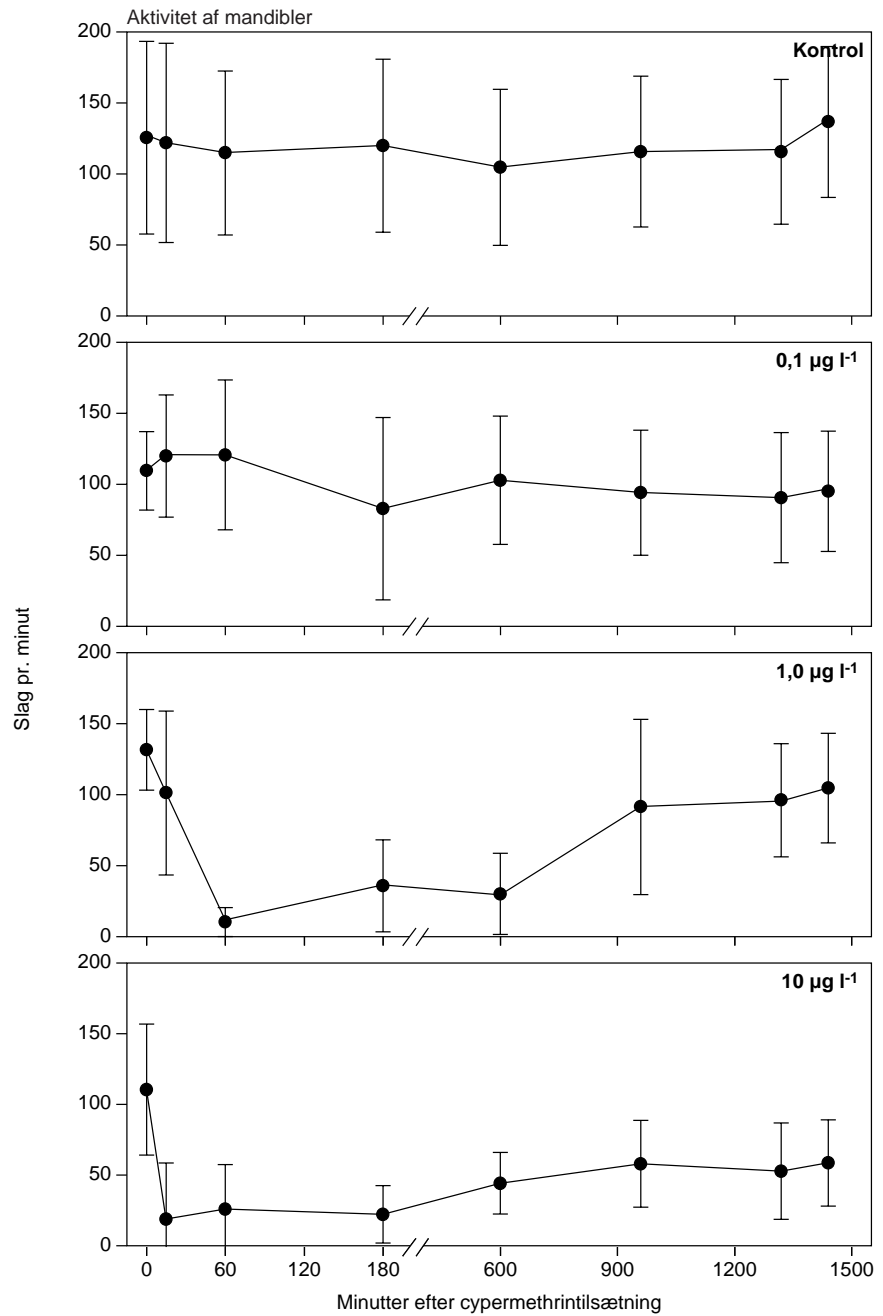




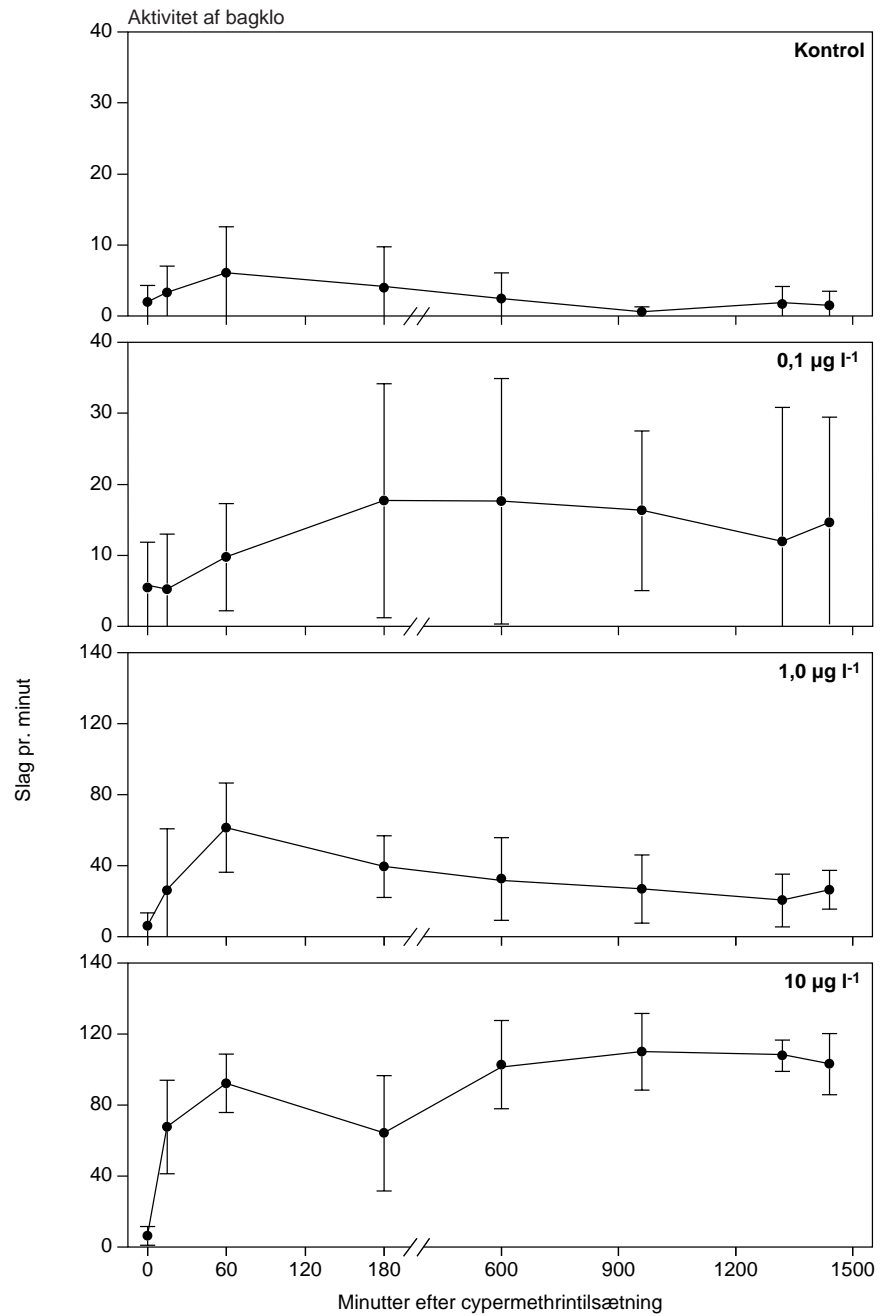
FIGUR 22. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF HJERTET HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER CYPERMETHRINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 CYPERMETHRIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSNIVEAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 5).



FIGUR 23. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF BRYSTLEMMERNE HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER CYPERMETHRINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 CYPERMETHRIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSLEVELAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 5).



FIGUR 24. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF MANDIBLER HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER CYPERMETHRINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 CYPERMETHRIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSNIIVEAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 5).



FIGUR 25. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF BAGKLOEN HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER CYPERMETHRINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 CYPERMETHRIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSNIIVEAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 5).

### 3.3.2 Azoxystrobin

#### ***Kvalitative effekter på D. magna***

For azoxystrobin var effekten afhængig af eksponeringskoncentrationen og eksponeringstiden. De første symptomer på effekt af azoxystrobineksponeringen var en reduktion i aktivitet af alle 4 responsparametre: hjerte, brystlemmer, mandibler og bagklo. Effekten var synlig efter ca. 1 times eksponering og tiltog afhængig af koncentrationen med eksponeringstiden.

#### ***Homogenitet af forsøgsdyr før azoxystrobin tilsætning***

Overordnet viste MANOVA (tabel 11), at aktiviteten af de 4 responsparametre i de 4 behandlingsgrupper (kontrol; 0,5; 1; 2 mg l<sup>-1</sup>) før tilsætning af azoxystrobin kunne betragtes ens ( $F_{12,21} = 1,30$ ;  $P = 0,289$ ). Individerne inden for hver behandlingsgruppe var derimod stærkt signifikant forskellige ( $F_{64,432} = 14,23$ ;  $P < 0,0001$ ).

Univariate ANOVA viste, at brystlemmeaktiviteten, der varierede mellem 428 – 518 slag min<sup>-1</sup> i de 4 behandlingsgrupper, var den mest heterogene responsparameter før azoxystrobintilsætning. Isoleret set var brystlemmeaktiviteten signifikant forskellig mellem behandlingsgrupperne ( $F_{3,8} = 6,18$ ;  $P = 0,018$ ), med en kontrolaktivitet signifikant ( $P < 0,05$ ) lavere end grupperne eksponeret for 0,5 og 2 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> (Tukey's test, tabel 11).

#### ***Behandlings- og tidseffekter***

Efter azoxytrobintilsætning viste MANOVA, at tid og interaktionen mellem azoxystrobinkoncentration og tid havde en stærk signifikant ( $P < 0,0001$ ) indflydelse på responsparametrene (tabel 11). Derimod var der ikke nogen hovedeffekt af azoxystrobinkoncentrationen ( $F_{12,21} = 1,59$ ;  $P = 0,170$ ). Den signifikante interaktion mellem tid og behandling ( $F_{72,3216} = 19,4$ ;  $P < 0,0001$ ) viste, at effekten af tiden afhang af azoxystrobinkoncentrationen, hvilket også blev bekræftet af tests inden for behandlingsgrupperne. De kraftigste effekter på responsparametrene over tid blev observeret i behandlinger tilsat azoxystrobin (0,5 mg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,804} = 12,64$ , 1 mg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,804} = 17,22$ , 2 mg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,804} = 17,56$ ;  $P < 0,0001$  for alle koncentrationer, tabel 11), hvor effekten steg jævnt med eksponeringstiden. For alle parametre sås den maksimale effekt af eksponeringen først til tiden 24 timer (figur 26 - 29). Dog var der en tendens til, at dafniernes hjerteaktivitet indstillede sig på et nyt signifikant lavere niveau efter 10 timers eksponering for 0,5 og 1,0 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> (figur 26). Dafnier i kontrollen ændrede også adfærd i løbet af de 24 timer, forsøget varede (0 mg l<sup>-1</sup>:  $F_{24,804} = 4,05$ ;  $P < 0,0001$ ), men det var særligt aktiviteten af hjerte og mandibler, der udviste signifikante forskelle til startniveauet (tabel 12, signifikante forskelle markeret med \*).

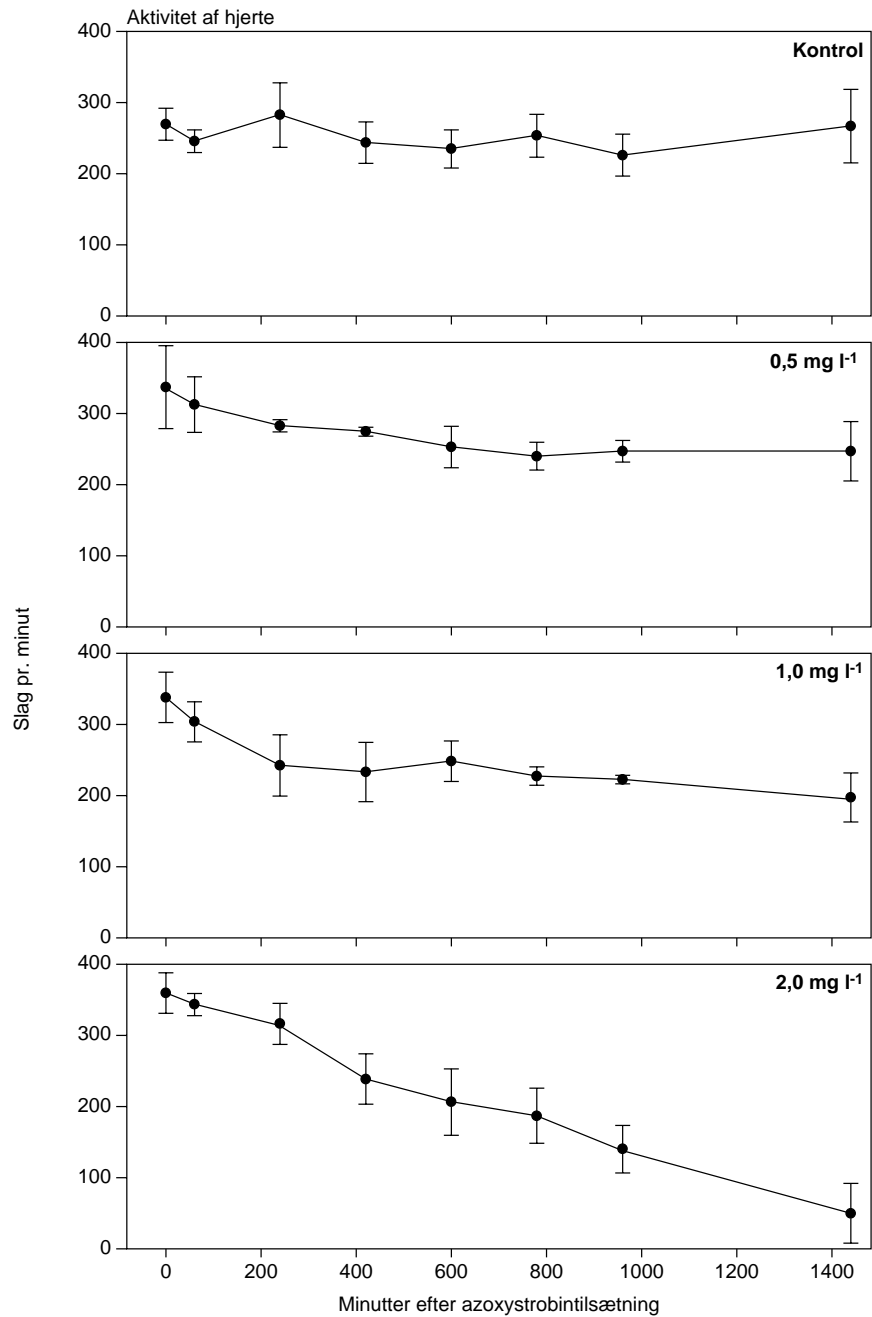
TABEL 11. RESULTATER AF MULTIVARIATE VARIANSANALYSER (MANOVA) AF DATA FRA VIDEOREGISTRERINGSFORSØG MED AZOXYSTROBIN. PILLAU'S TRACE OG DEN TILHØRENDE TEST FOR INGEN EFFEKT AF DEN GIVNE FAKTOR ER OPGIVET. EN SIGNIFIKANT VÆRDI INDIKERER, AT FAKTOREN HAVDE EN OVERORDNET EFFEKT PÅ DE 4 RESPONSPARAMETRE (AKTIVITET AF HJERTE, BRYSTLEMMER, MANDIBLER OG BAGKLO).

Behandling	Pre-behandlingseffekter	Post-behandlingseffekter		
	Effekt af behandling	Effekt af behandling	Effekt af tid	Interaktion mellem tid og behandling
Kontrol			0,474 $F_{24,804}=4,50; P<0,0001$	
0,5 mg l <sup>-1</sup>			1,096 $F_{24,804}=12,64; P<0,0001$	
1 mg l <sup>-1</sup>			1,358 $F_{24,568}=17,22; P<0,0001$	
2 mg l <sup>-1</sup>			1,376 $F_{24,636}=17,56; P<0,0001$	
Overordnet	1,279 $F_{12,21}=1,30; P= 0,289$	1,428 $F_{12,21}=1,59; P= 0,170$	0,957 $F_{24,3216}=42,1; P<0,0001$	1,213 $F_{72,3216}=19,4; P<0,0001$

TABEL 12. RESULTATER AF UNIVARIATE STATISTISKE ANALYSER (ANOVA) AF DATA FRA VIDEOREGISTRERINGSFORSØG MED AZOXYSTROBIN. PRE-BEHANDLINGS FORSKELLE VISER, I HVOR HØJ GRAD GRUPPERNE AF DAFNIER HVER BESTÅENDE AF 5 INDIVIDER KUNNE OPFATTES SOM ENS, FØR DE BLEV TILDELT EN AF FIRE BEHANDLINGER. POST-BEHANDLINGS FORSKELLE ER FORDELT I 3 KOMPONENTER SVARENDE TIL: (1) BEHANDLING, (2) TID OG (3) INTERAKTIONEN MELLEM BEHANDLING OG TID. DEN OVERORDNEDE FORSKEL MELLEM PRE- OG POSTBEHANDLINGSEFFEKTER ER TESTET VED LINEÆR KONTRASTANALYSE.

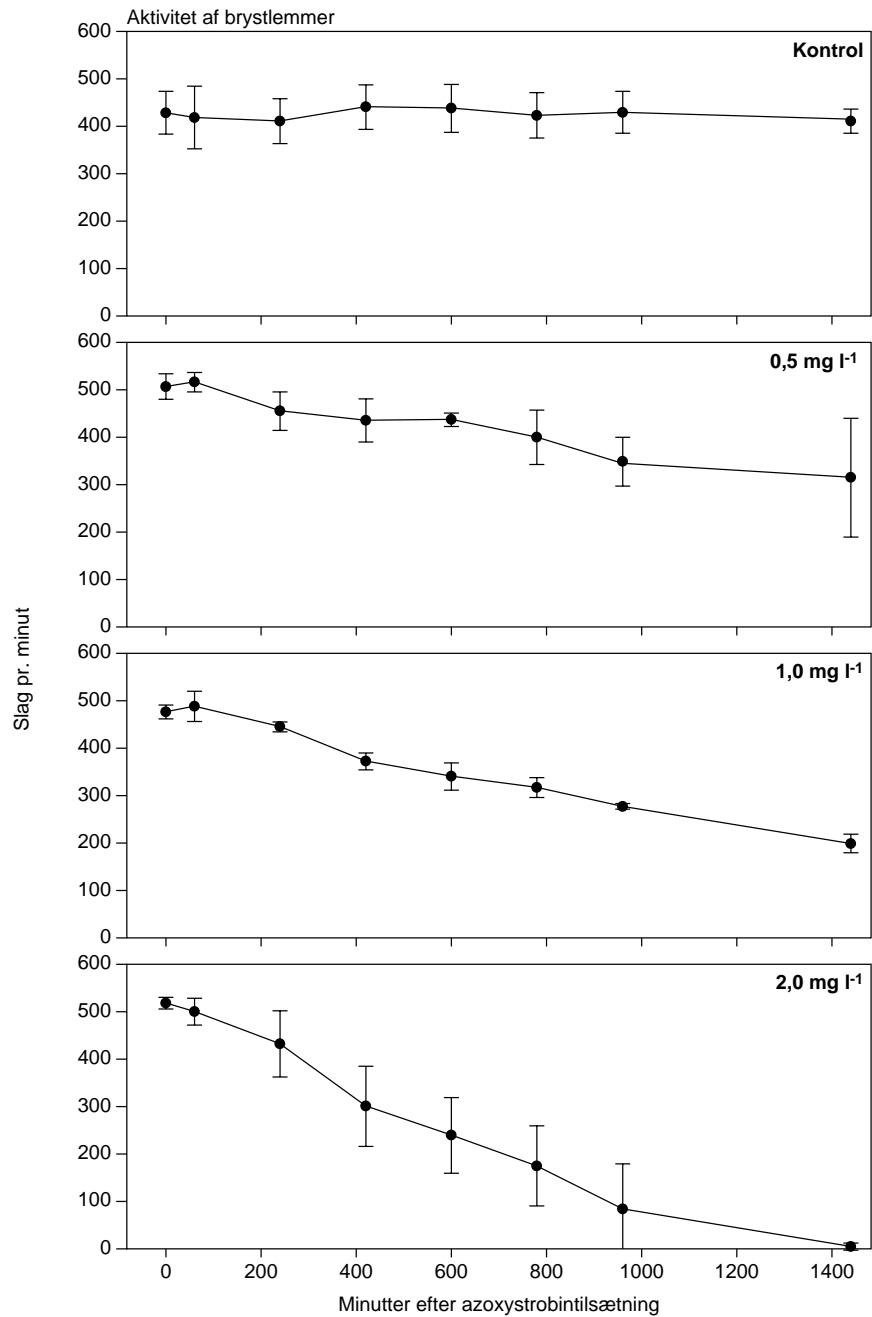
Parameter	Behandling	Pre-behandling♣	Minutter efter azoxystrobin tilsætning♣							Post – behandling gennemsnit♣	Kontrast mellem pre- og post-behandling♦	Overordnet effekt af tid
			60	240	420	600	780	960	1440			
Hjerte aktivitet	Kontrol	134,9 <sup>a</sup>	122,8 <sup>*</sup>	141,3	122,0 <sup>**</sup>	117,4 <sup>***</sup>	123,7	113,1 <sup>***</sup>	133,5	125,3	$F_{1,203}=10,6$ $P=0,0013$	$F_{6,804}=268$ $P<0,0001$
	0,5 mg l <sup>-1</sup>	168,5 <sup>a</sup>	156,3 <sup>*</sup>	141,5 <sup>***</sup>	137,3 <sup>***</sup>	126,5 <sup>***</sup>	119,9 <sup>***</sup>	123,7 <sup>***</sup>	123,4 <sup>***</sup>	132,7	$F_{1,203}=204$ $P<0,0001$	
	1 mg l <sup>-1</sup>	168,9 <sup>a</sup>	151,9 <sup>***</sup>	121,1 <sup>***</sup>	116,6 <sup>***</sup>	124,3 <sup>***</sup>	113,7 <sup>***</sup>	111,3 <sup>***</sup>	98,7 <sup>***</sup>	119,6	$F_{1,203}=495$ $P<0,0001$	
	2 mg l <sup>-1</sup>	179,8 <sup>a</sup>	171,7	158,1 <sup>***</sup>	119,3 <sup>***</sup>	103,3 <sup>***</sup>	93,5 <sup>***</sup>	70,7 <sup>***</sup>	25,0 <sup>***</sup>	105,9	$F_{1,230}=740$ $P<0,0001$	
	Gennemsnit	163,0	150,7	140,5	123,8	117,9	113,4	104,5	95,2	120,9		
Pre-behandlings forskelle: $F_{3,8}=3,07$ ; $P=0,091$		Overordnet forskel mellem behandlinger: $F_{3,8}=4,09$ ; $P=0,0494$							Interaktion mellem behandling og tid: $F_{18,804}=91,6$ ; $P<0,0001$			
Brystlemme aktivitet	Kontrol	214,2 <sup>a</sup>	209,0	205,4	220,2	218,8	211,4	214,5	205,3	212,1	$F_{1,230}=0,25$ $P=0,6170$	$F_{6,804}=379$ $P<0,0001$
	0,5 mg l <sup>-1</sup>	253,3 <sup>b</sup>	258,7	227,5	217,6 <sup>***</sup>	218,5 <sup>***</sup>	200,1 <sup>***</sup>	174,3 <sup>***</sup>	157,4 <sup>***</sup>	157,4	$F_{1,230}=71,4$ $P<0,0001$	
	1 mg l <sup>-1</sup>	238,3 <sup>ab</sup>	243,9	222,5 <sup>**</sup>	186,0 <sup>***</sup>	170,1 <sup>***</sup>	158,4 <sup>***</sup>	138,5 <sup>***</sup>	99,4 <sup>***</sup>	174,1	$F_{1,230}=383$ $P<0,0001$	
	2 mg l <sup>-1</sup>	259,1 <sup>b</sup>	250,1	215,9 <sup>**</sup>	150,3 <sup>***</sup>	119,6 <sup>***</sup>	87,4 <sup>***</sup>	41,8 <sup>***</sup>	2,3 <sup>***</sup>	123,9	$F_{1,230}=590$ $P<0,0001$	
	Gennemsnit	214,2	240,3	217,8	193,5	181,8	164,3	142,3	116,1	179,4		
Pre-behandlings forskelle: $F_{3,8}=6,18$ ; $P=0,018$		Overordnet forskel mellem behandlinger: $F_{3,8}=10,58$ ; $P=0,0037$							Interaktion mellem behandling og tid: $F_{18,804}=71,5$ ; $P<0,0001$			
Mandibel aktivitet•	Kontrol	73,53 <sup>a</sup>	66,60	66,40	66,67	62,00 <sup>***</sup>	66,07 <sup>*</sup>	60,87 <sup>***</sup>	69,67	65,47	$F_{1,230}=13,2$ $P=0,0003$	$F_{6,804}=244$ $P<0,0001$
	0,5 mg l <sup>-1</sup>	82,53 <sup>a</sup>	87,27	77,00	64,73 <sup>***</sup>	61,87 <sup>***</sup>	57,53 <sup>***</sup>	58,33 <sup>***</sup>	38,33 <sup>***</sup>	63,58	$F_{1,230}=48,8$ $P<0,0001$	
	1 mg l <sup>-1</sup>	85,80 <sup>a</sup>	83,13	80,73	72,20 <sup>***</sup>	60,00 <sup>***</sup>	54,33 <sup>***</sup>	45,67 <sup>***</sup>	27,67 <sup>**</sup>	60,53	$F_{1,230}=122$ $P<0,0001$	
	2 mg l <sup>-1</sup>	61,27 <sup>a</sup>	66,07	75,47	60,40	28,67 <sup>***</sup>	11,47 <sup>***</sup>	6,53 <sup>***</sup>	0,00 <sup>***</sup>	35,51	$F_{1,230}=112$ $P<0,0001$	
	Gennemsnit	75,8	75,77	74,90	66,00	53,13	47,35	42,85	33,92	56,27		
Pre-behandlings forskelle: $F_{3,8}=0,42$ ; $P=0,741$		Overordnet forskel mellem behandlinger: $F_{3,8}=3,48$ ; $P=0,070$							Interaktion mellem behandling og tid: $F_{18,804}=69,1$ ; $P<0,0001$			
Bagklo aktivitet#	Kontrol	1,87 <sup>a</sup>	1,40	3,03	1,27	1,13	1,40	0,57 <sup>**</sup>	1,77	1,51	$F_{1,230}=2,73$ $P=0,0996$	$F_{6,804}=5,09$ $P<0,0001$
	0,5 mg l <sup>-1</sup>	1,73 <sup>a</sup>	1,57	2,20	2,53	0,60	0,90	1,17	0,90	1,41	$F_{1,230}=1,18$ $P=0,2780$	
	1 mg l <sup>-1</sup>	1,83 <sup>a</sup>	0,87	0,09	2,33	1,37	1,80	1,50	1,30	1,44	$F_{1,230}=4,00$ $P=0,0466$	
	2 mg l <sup>-1</sup>	3,07 <sup>a</sup>	2,20	2,07	2,23	1,17	1,30	0,47 <sup>*</sup>	0,00 <sup>*</sup>	1,35	$F_{1,230}=1,77$ $P=0,1844$	
	Gennemsnit	2,13	1,51	2,05	2,09	1,07	1,35	0,93	0,99	1,43		
Pre-behandlings forskelle: $F_{3,8}=0,26$ ; $P=0,855$		Overordnet forskel mellem behandlinger: $F_{3,8}=1,98$ ; $P=0,195$							Interaktion mellem behandling og tid: $F_{18,804}=1,97$ ; $P=0,0095$			

• Alle statistiske analyser er baseret på kvadratrodstransformerede data. # Alle statistiske analyser er baseret på  $y^{0,18}$  transformerede data. ♣ Parvise sammenligninger mellem behandlinger. Værdier efterfulgt af samme bogstav er ikke signifikant forskellig på 5 % signifikansniveau efter justering for antallet af samtidige tests (Tukey's test). ♣ Gennemsnit for hver kombination af tid og behandling. Værdier efterfulgt af stjerne er signifikant forskellige fra pre-behandlingsaktiviteten for en given behandling (\*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ ). Værdier skrevet i kursiv er signifikant forskellige ( $P<0,05$ ) fra kontrolaktiviteten til det givne tidspunkt. Begge tests er baseret på Dunnett's test. ♦ Udtrykker for en given behandling forskellen mellem pre-behandlingsaktiviteten og det totale aktivitetsgennemsnit for post-behandlingen.

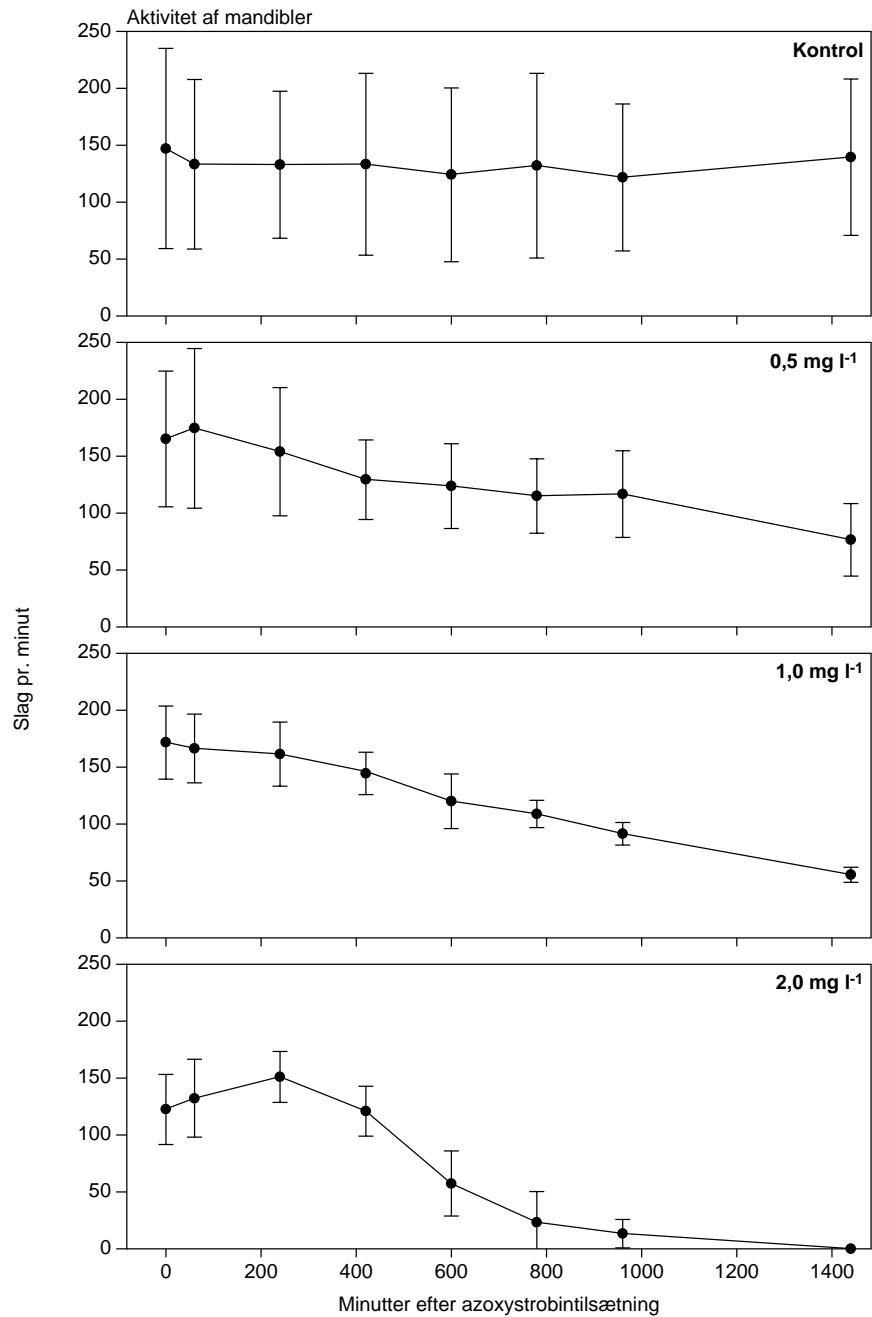


FIGUR 26. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF HJERTET HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER AZOXYSTROBINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 AZOXYSTROBIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSLEVELAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 3).

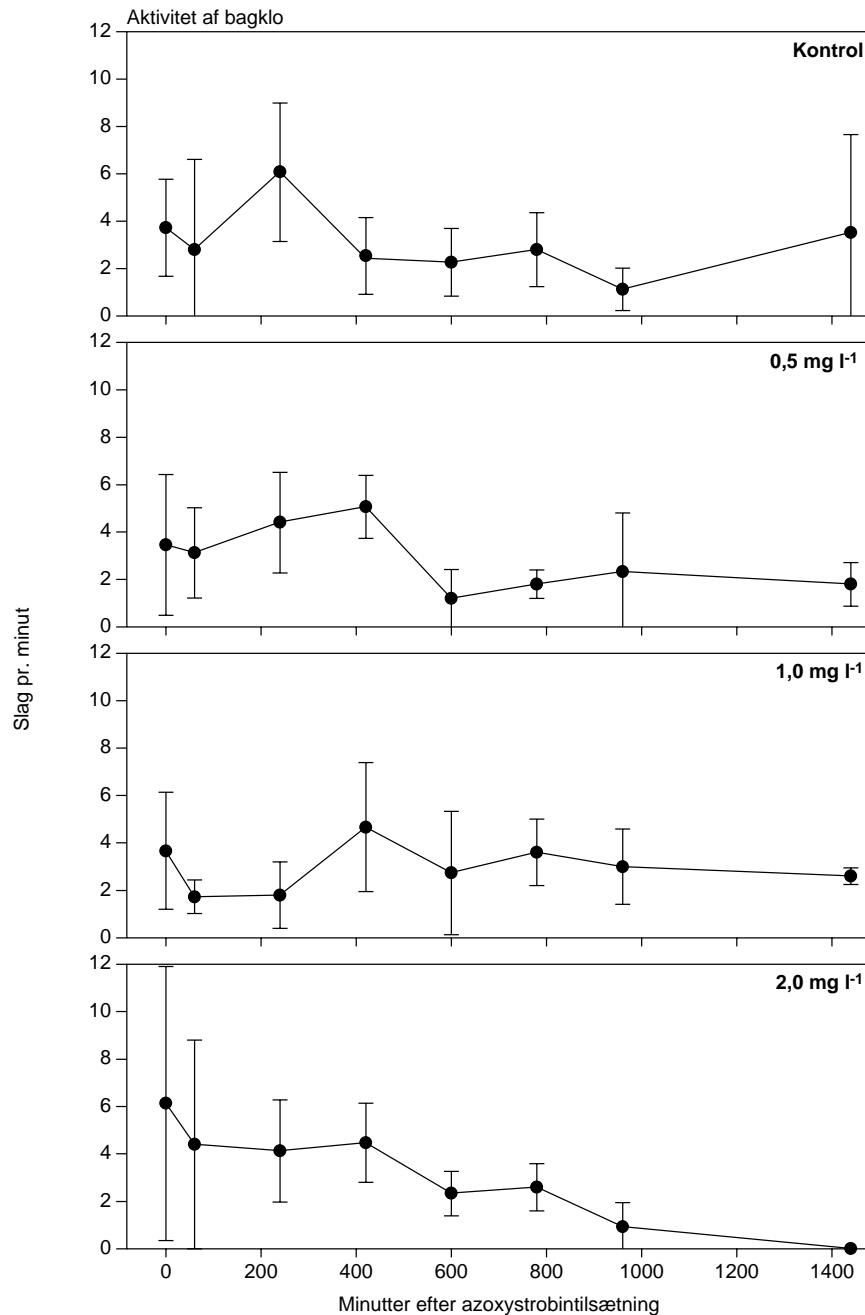




FIGUR 27. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF BRYSTLEMMERNE HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER AZOXYSTROBINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 AZOXYSTROBIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSNIVEAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 3).



FIGUR 28. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF MANDIBLER HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER AZOXYSTROBINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 AZOXYSTROBIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETSLEVELAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 3).



FIGUR 29. DEN GENNEMSNITLIGE AKTIVITET AF BAGKLOEN HOS *D. MAGNA* SOM FUNKTION AF TIDEN EFTER AZOXYSTROBINTILSÆTNING. AKTIVITETEN ER ANGIVET FOR 3 AZOXYSTROBIN KONCENTRATIONER SAMT KONTROL. TIDEN = 0 REPRÆSENTERER AKTIVITETS NIVEAUET FØR CYPERMETHRINTILSÆTNING. FEJLLINJER ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (N = 3).

Overordnet medførte azoxystrobineksponering en reduktion i aktiviteten af alle 4 responsparametre (ANOVA, tabel 12 og figur 26-29). Efter 24 timers eksponering for 2 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> var aktiviteten af hjertet og brystlemmer henholdsvis 14 % og 0,8 % af aktiviteten før azoxystrobineksponering, mens aktiviteten af mandibler og bagklo var ophørt. Brystlemmeaktiviteten var den mest følsomme responsparameter over for azoxystrobin ( $F_{3,8} = 10,58$ ;  $P < 0,0037$ ), mens effekten af

azoxystrobin var mindst og langt fra signifikant for bagkloen ( $F_{3,8} = 1,98$ ;  $P < 0,195$ ). Mandibelaktiviteten var den parameter, der ændrede sig mest over tiden ( $F_{6,804} = 244$ ;  $P < 0,0001$ ), mens aktiviteten af bagkloen ændrede sig mindst ( $F_{6,804} = 5,09$ ;  $P < 0,0001$ ). Hjerteraktiviteten udviste størst interaktion mellem azoxystrobinbehandling og tid ( $F_{18,804} = 91,6$ ;  $P < 0,0001$ ), men interaktionen for de 3 andre responsparametre var også signifikante (tabel 12). Lineær kontrastanalyse mellem aktiviteten af parametrene til tidspunkter svarende til før og efter azoxystrobintilsætning viste, at aktiviteten af hjertet og mandibler hos kontroldafnierne ikke var konstant over forsøgsperioden (hjerte:  $F_{1,203} = 10,6$ ;  $P < 0,0013$ , mandibler:  $F_{1,203} = 13,2$ ;  $P < 0,0003$ ). Forskellene i aktivitet før og efter azoxystrobintilsætning var dog langt mere udtalte hos dafnier eksponeret for azoxystrobin med undtagelse af aktiviteten af bagkloen (tabel 12). Aktiviteten af hjertet, brystlemmer og mandibler blev signifikant ( $P < 0,0001$ ) reduceret ved en azoxystrobinkoncentration på  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ , hvorimod aktiviteten af bagkloen kun blev påvirket ved en koncentration på  $2 \text{ mg azoxystrobin l}^{-1}$ , og effekten sås kun i slutningen af forsøget (tabel 12).

Ved sammenligning til forsøget med cypermethrin var der i azoxystrobinforsøget færre signifikante forskelle mellem kontrollen og de 3 øvrige behandlinger, men flere signifikante forskelle mellem aktiviteten før og efter pesticidtilsætning. Det skal bemærkes, at teststyrken for forskelle mellem behandlinger er lavere i azoxystrobinforsøget p.g.a. en mindre prøvestørrelse (3 dafnier) i hver behandling. Det modsatte er gældende for tests vedrørende tidseffekter, fordi der i azoxystrobinforsøget blev udført flere observationer (10 replikater) på hver dafnie pr. observationsperiode.

### 3.4 Svømmeadfærd

#### 3.4.1 Cypermethrin

De indledende forsøg (se bilag 6.3) viste tydeligt, at kun *D. magna* indsamlet fra en naturlig population umiddelbart før forsøgene blev udført, kunne foretage en reproducerbar retningsbestemt vandring med lys som stimulus. I samtlige forsøg blev der derfor anvendt en population af *D. magna* fra en mindre sø (Tabel 2).

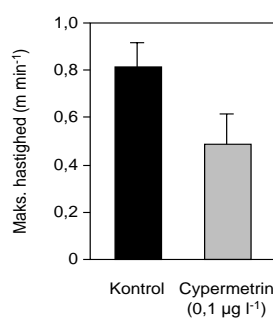
Til trods for en udtalt evne til at foretage vandringer viste der sig at være en vis individuel variation i responset. Dette blev imødegået ved dels at anvende samme forsøgsdyr til kontrol- og eksponeringsforsøg og dels ved at replikere alle forsøg 5 gange. Dafniernes gennemsnitsstørrelse var  $2,1\text{-}2,5 \text{ mm}$ .

Den gennemsnitlige maksimale svømmehastighed i kontrolforsøg var  $0,81\text{-}0,91 \text{ m min}^{-1}$  (tabel 13) med et gennemsnit på  $0,85 \text{ m min}^{-1}$ , og der var ikke signifikante forskelle (ANOVA,  $p > 0,05$ ) mellem de enkelte forsøg. Ved de fem testede koncentrationer af stoffet ( $0,05$  til  $1,0 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$ ) blev der observeret en reduktion i den maksimale svømmehastighed for *D. magna* (tabel 13). De gennemsnitlige værdier var alle indbyrdes signifikant forskellige, og alle på nær værdien for  $0,05 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$  var signifikant forskellige fra værdierne fra det respektive kontrolforsøg (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

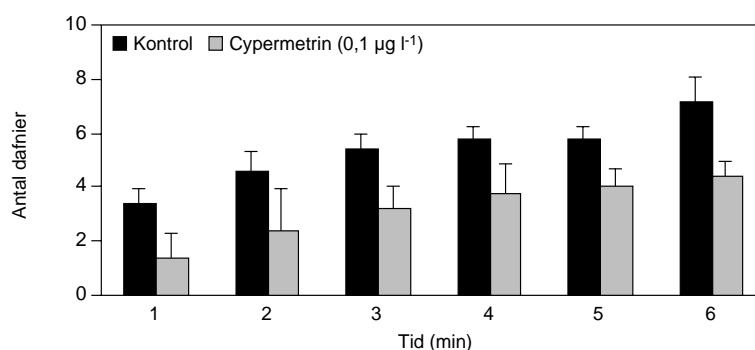
TABEL 13. GENNEMSNITLIGE MAKSIMALE SVØMMEHASTIGHEDER (GMS) FOR *D. MAGNA* AF SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG VED FEM KONCENTRATIONER AF CYPERMETHRIN. SD ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN AF DET GEOMETRISKE GENNEMSNIT.

Cypermethrin koncentration	GMS kontrol (m/min)	SD	GMS cypermethrin (m/min)	SD
0,05 µg l <sup>-1</sup>	0,91	0,20	0,82	0,10
0,075 µg l <sup>-1</sup>	0,91	0,09	0,65	0,03
0,1 µg l <sup>-1</sup>	0,81	0,10	0,49	0,13
0,5 µg l <sup>-1</sup>	0,81	0,15	0,41	0,07
1,0 µg l <sup>-1</sup>	0,83	0,11	0,26	0,10

Et eksempel på resultaterne af et sammenhørende kontrol- og eksponeringsforsøg med en cypermethrinkoncentration på 0,1 µg l<sup>-1</sup> er vist i figur 30. Den relative reduktion i den maksimale svømmehastighed er 40 % i eksemplet. Det kumulerede antal forsøgsdyr over tiden viste, at de eksponerede forsøgsdyr forblev langsommere end forsøgsdyrene i kontrolforsøgene (figur 31).

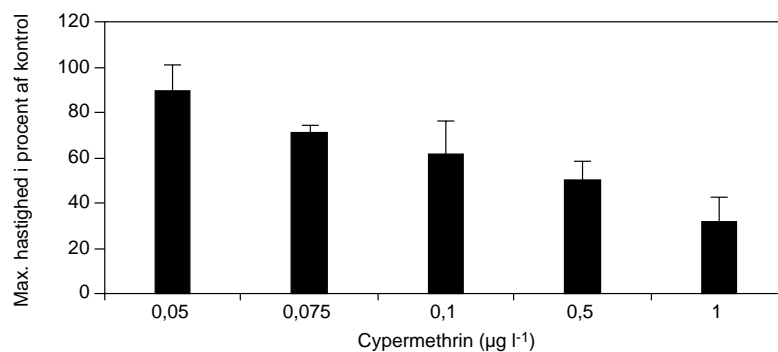


FIGUR 30. DEN GENNEMSNITLIGE MAKSIMALE SVØMMEHASTIGHED FOR *D. MAGNA* I ET SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG. FEJLLINIERNE ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (SD) PÅ GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

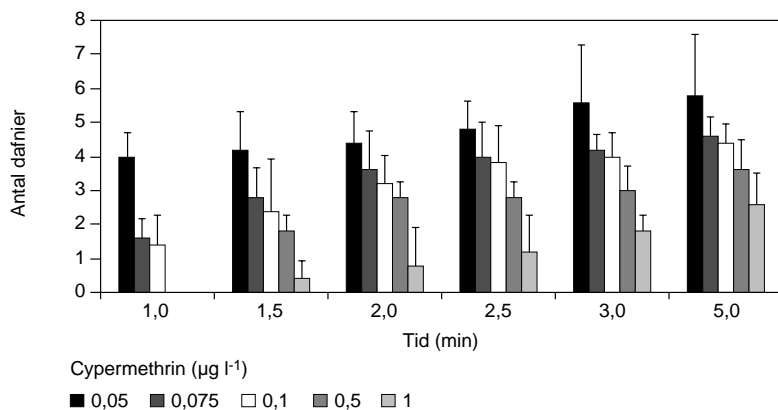


FIGUR 31. DET GENNEMSNITLIGE KUMULEREDE ANTAL *D. MAGNA* I SVØMMEKAMMERETS ENDE EFTER EN GIVEN TID I ET SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG. FEJLLINIERNE ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (SD) PÅ GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

Den maksimale svømmehastighed i procent af kontrol faldt med stigende koncentrationer af cypermethrin (figur 32). Det kumulerede antal forsøgsdyr i hhv. kontrol- og eksponeringsforsøg afspejlede også denne sammenhæng (figur 33).



FIGUR 32. DEN GENNEMSNITLIGE MAKSIMALE SVØMMEHASTIGHED I PROCENT AF KONTROLFORSØGET FOR *D. MAGNA* VED STIGENDE KONCENTRATION AF CYPERMETHRIN. FEJLLINIERNE ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (SD) PÅ GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.



FIGUR 33. DET GENNEMSNITLIGE KUMULEREDE ANTAL *D. MAGNA* I SVØMMEKAMMERETS ENDE OVER TIDEN VED STIGENDE KONCENTRATION AF CYPERMETHRIN. FEJLLINIERNE ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (SD) PÅ GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

Som omtalt i afsnit 2.7.4 og bilag 6.3 er det ikke muligt at beregne en egentlig gennemsnitlig svømmehastighed baseret på hele observationsperioden ud fra den anvendte forsøgsopstilling. Men, da ca. halvdelen af forsøgsdyrene i kontrolforsøgene (tabel 14) blev registreret entydigt (dvs. ingen af dyrene svømmede i den modsatte retning i svømmekammeret) ved registreringspunktet efter 1,5 min (= 0,38 m min<sup>-1</sup>), anvendes dette som en gennemsnitlig minimumssvømmehastighed.

TABEL 14. GENNEMSITLIGE ANDEL (%) AF DET SAMLEDE ANTAL FORSØGSDYR (*D. MAGNA*), SOM OPNÅEDE EN MINIMUMSSVØMMEHASTIGHED PÅ 0,38 M/MIN EFTER 1,5 MIN. I SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG VED FEM KONCENTRATIONER AF CYPERMETHRIN. SD ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN PÅ GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

Cypermethrin koncentration	Kontrol efter 1,5 min (%)	SD	Eksponeret 1,5 min (%)	SD
0,05 µg l <sup>-1</sup>	66	8,9	42	11,0
0,075 µg l <sup>-1</sup>	58	15,8	28	8,4
0,1 µg l <sup>-1</sup>	46	21,7	24	15,2
0,5 µg l <sup>-1</sup>	52	5,5	18	4,5
1,0 µg l <sup>-1</sup>	50	8,4	4	5,5

Ved alle koncentrationer af cypermethrin var den andel af de eksponerede forsøgsdyr, som opnåede denne svømmehastighed signifikant lavere (ANOVA,  $p < 0,05$ ) end den tilsvarende andel af kontroldyrene (Tabel 14). Den procentvise reduktion imellem de anvendte koncentrationer af cypermethrin var ligeledes signifikant forskellig (ANOVA,  $p < 0,05$ )

### 3.4.2 Azoxystrobin

Der blev udført hhv. et pilot- og et fuldt eksperiment med azoxystrobin, for at undersøge, om *D. magna* også udviste en negativ respons i svømmeaktivitet over for dette pesticid. Den anvendte pesticidkoncentration var 1,0 mg l<sup>-1</sup>.

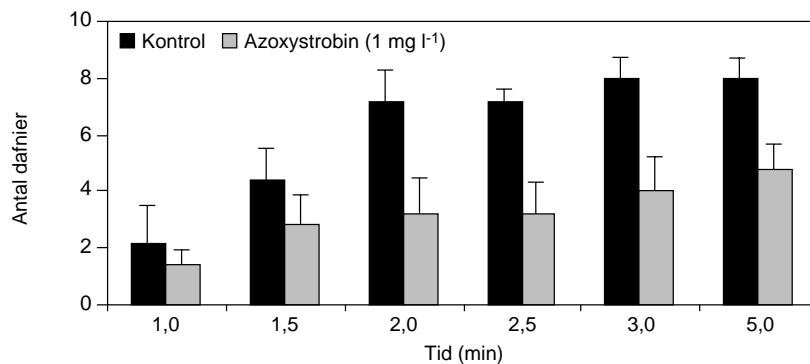
Den gennemsnitlige maksimale svømmehastighed i kontrolforsøget var ikke signifikant forskellig fra værdierne opnået i forsøg med cypermethrin (ANOVA,  $p < 0,05$ ; tabel 15). Der kunne konstateres en reduktion i den maksimale svømmehastighed for *D. magna* (tabel 16), som var signifikant forskellig fra kontrolværdien, men på et lavt signifikansniveau (ANOVA,  $p = 0,09$ ). Reduktionen i den maksimale svømmehastighed var ca. 14%.

TABEL 15. GENNEMSITLIGE MAKSIMALE SVØMMEHASTIGHEDER (GMS) FOR *D. MAGNA* AF SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG VED EN AZOXYSTROBINKONCENTRATION. SD ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN AF GENNEMSNITTET AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

Azoxystrobin koncentration	GMS kontrol (m/min)	SD	GMS Azoxystrobin (m/min)	SD
1,0 mg l <sup>-1</sup>	0,80	0,07	0,69	0,10

Det kumulerede antal forsøgsdyr over tiden viste, at de eksponerede forsøgsdyr forblev langsommere end forsøgsdyrene i kontrolforsøgene (figur 34).

Andelen af eksponerede forsøgsdyr, som opnåede en gennemsnitlig min. svømmehastighed på 0,38 m min<sup>-1</sup> var signifikant lavere (ANOVA,  $p < 0,05$ ) end den tilsvarende andel af kontroldyrene (tabel 16).



FIGUR 34. DET GENNEMSNITLIGE KUMULEREDE ANTAL *D. MAGNA* I SVØMMEKAMMERETS ENDE EFTER EN GIVEN TID I DE SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG. FEJLLINIERNE ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN (SD) PÅ GENNEMSNITTE AF 5 REPETEREDE DELFORSØG.

TABEL 16. GENNEMSNITLIGE ANDEL (%) AF DET SAMLEDE ANTAL FORSØGSDYR (*D. MAGNA*), SOM OPNÅEDE EN MINIMUMSSVØMMEHASTIGHED PÅ 0,38 M MIN<sup>-1</sup> EFTER 1,5 MIN. I SAMMENHØRENDE KONTROL- OG EKSPONERINGSFORSØG MED AZOXYSTROBIN. SD ANGIVER STANDARDAFVIGELSEN AF DET GEOMETRISKE GENNEMSNIT.

Azoxystrobin koncentration	Kontrol efter 1,5 min (%)	SD	Eksponeret 1,5 min (%)	SD
1,0 mg l <sup>-1</sup>	44	11,4	28	11,0

### 3.5 Pesticidkoncentrationer

I forsøgsperioden blev der udtaget 10 prøver, som blev analyseret for at sammenligne de nominelle pesticidkoncentrationer med de aktuelle. Resultaterne viste generelt god overensstemmelse med de nominelle koncentrationer (tabel 17). De aktuelle cypermethrinkoncentrationer lå lidt under de nominelle, mens de aktuelle azoxystrobinkoncentrationer lå svagt over i to tilfælde og ellers 20-30 % under de nominelle koncentrationer.

TABEL 17. NOMINELLE OG AKTUELLE CYPERMETHRIN- OG AZOXYSTROBINKONCENTRATIONER. DE AKTUELLE KONCENTRATIONER ER STARTKONCENTRATIONER UDTAGET UMIDDELbart FØR, AT DER BLEV TILSAT FORSØGSORGANISMER.

Stof	Nominel	Aktuel	Usikkerhed, %
Cypermethrin, µg l <sup>-1</sup>	0,1	0,085	15
	0,5	0,41	15
	0,05	0,046	50
	0,1	0,071	50
	0,8	0,78	15
Azoxystrobin, mg l <sup>-1</sup>	0,02	0,025	15
	0,08	0,084	15
	0,01	0,008	15
	0,05	0,035	15
	0,10	0,071	15



# 4 Diskussion

## 4.1 Cypermethrin

### 4.1.1 Overlevelse

#### **Koncentration-respons**

Resultaterne af koncentration-responsforsøgene viste, at gruppen af makroinvertebrater var mere sensitive over for cypermethrin end zooplanktonet. Særlig sensitive var døgnfluenymfen *C. dipterum*-gr. og myggelarverne *C. plumosus* og *C. flavicans* med  $EC_{50}$  i intervallet 0,02 – 0,06  $\mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$ . Dette  $EC_{50}$  niveau harmonerer med litteraturværdier for *C. dipterum*-gr. efter 24 timers eksponering, hvor  $EC_{50}$  angives til 0,07  $\mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$  og for myggelarver efter 24 timers eksponering, hvor  $EC_{50}$  angives til 0,03 – 0,2  $\mu\text{g}$  cypermethrin  $\text{l}^{-1}$  (Stephenson, 1982). Makroinvertebraternes større sensitivitet kan muligvis forklares ved en tættere beslægtning med målorganismerne (insekter) for pesticidet.

Copepoden *E. graciloides* og cladoceen *D. galeata* var de mest sensitive zooplanktonarter med en  $EC_{50}$  i den lave ende af det  $EC_{50}/LC_{50}$  interval på 0,12 - 5  $\mu\text{g}$   $\text{l}^{-1}$ , der er opgivet i litteraturen for zooplankton eksponeret for cypermethrin (Day, 1989). Neonate *D. magna*, som anvendes som standardtestorganismer i godkendelsesproceduren for pesticider, havde derimod en  $EC_{50}$ , som lå i den høje ende af intervallet, og kan derfor ikke karakteriseres som værende blandt de mest sensitive af de testede zooplanktonarter.

Neonate *D. magna* var mere sensitive over for cypermethrin end voksne ægbærende *D. magna*. Størrelsesrelaterede variationer i sensitivitet over for kemiske stoffer er beskrevet for zooplankton i tidligere studier. Forsøg med den marine copepod *Acartia tonsa* eksponeret for cypermethrin viste signifikante forskelle i sensitivitet mellem nauplier og voksenindivider i en 96 timers akut test (Medina et al., 2002) og Lotufo & Fleeger (1997) fandt også, at nauplier var mere sensitive end voksne copepoder ved eksponering for polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH). Forsøg med dafnier eksponeret for insekticiderne fenvalerate og carbaryl og herbicidet bromoxynil har ligeledes vist, at juvenile dafnier er mere sensitive end voksne individer (Buhl et al. 1993; Hanazoto, 1991, Day et al., 1987). Unge og voksne stadier kan være lige sensitive hvad angår stoffets toksicitet, men individstørrelse påvirker de kinetiske rater såsom optagelse og udskillelse, hvilket er afgørende for, hvornår der opstår en lethal koncentration af pesticidet i individet (Rand et al., 1995). Eksempelvis er kontaktfladen til pesticidet større for neonate end voksne dafnier i forhold til deres volumen, hvilket giver anledning til en forholdsmæssig større pesticidoptagelse, forudsat at optagelsen sker over organismens ydre overflade. Et mere veludviklet enzymssystem hos voksne individer øger også evnen til detoxificering af pesticidet (McKim, 1995). Endelig kan antallet

af hudskifter påvirke sensitiviteten, og unge individer har flere hudskifter end voksenindivider. Hos dafnier og krabber er der fundet større sensitivitet hos individer, der netop har haft hudskifte sammenlignet med individer, hvor der er gået længere tid siden sidste hudskifte (Mothershead et al., 1992; Gliwicz et al., 1986). Øget permeabilitet og vandoptagelse og nedsat metabolisme af fremmedstof under hudskifte foreslås som mulige årsager (Mothershead et al., 1992). Selv om der kunne ses en effekt af individstørrelsen på sensitiviteten inden for arten *D. magna*, kunne individstørrelse ikke forklare forskellene i sensitivitet mellem arter. Eksempelvis var *C. sphaericus* den mindste af de testede arter og samtidig den mindst sensitive art, mens den største art *C. plumosus* var blandt de mest sensitive arter.

Ud fra størrelsesmæssigt sammenlignelige populationer af *D. galeata*, henholdsvis indsamlet i felten og dyrket som laboratoriekulturer, kunne der ikke konstateres nogle signifikante forskelle i  $EC_{50}$ . Den større tolerance hos *D. magna* sammenlignet med det øvrige zooplankton kan heller ikke ud fra det foreliggende datamateriale tilskrives, hvorvidt forsøgspopulationerne stammer fra laboratoriekulturer eller naturlige populationer. Det var ellers forventet, at organismer, der var indsamlet i felten, ville være mere følsomme end laboratoriestammer, p.g.a. at livsvilkårene under naturlige forhold ofte er suboptimale og derved udgør en stressfaktor, som øger individernes følsomhed over for pesticider.

Individernes akutte respons var generelt negativt påvirket af eksponeringstiden. For arter som fx. *D. magna* og *C. flavicans* var der et stort fald i  $EC_{50}$  med tiden, mens der for arter som *E. graciloides*, *C. sphaericus* og *C. dipterum*-gr. ikke var forskel i  $EC_{50}$  efter 24 og 48 timers eksponering. Tolerancetærsklen og raten af optagelse og udskillelse/detoksificering af pesticidet samt individstørrelsen er af betydning for, hvornår et tidsafhængigt respons nås. Det vil sige, at det er muligt, at *E. graciloides*, *C. sphaericus* og *C. dipterum*-gr. allerede efter 24 timers eksponering havde nået effektniveauet for tidsafhængigt respons og derfor ikke kunne forventes at blive yderligere påvirket af pesticidet. Derimod kunne fx. *D. magna* eventuelt forventes at blive stærkere påvirket ved eksponering ud over de 48 timer. Tidspunktet for det tidsafhængige respons er under naturlige forhold af betydning i sammenhæng med varigheden af pesticidets tilstedeværelse i økosystemet, og dermed om maksimal effekt af stoffet kan forventes. Jo hurtigere det tidsafhængige (maksimale) respons indtræder, desto mere såbar vil arten sandsynligvis være over for pesticidet, idet en given pesticidkoncentration ved pulstilførsel vil falde med tiden blandt andet p.g.a. nedbrydning.

I koncentration-responsforsøgene med *D. magna*, *C. plumosus* og *C. flavicans* var iltindholdet efter 48 timer nede omkring 2 - 3 mg  $O_2$   $l^{-1}$ , uden at der dog blev observeret døde individer i kontrolbehandlingerne. Som beskrevet i afsnit 2.2 kan disse arter tolerere meget lave iltkoncentrationer (< 2 mg  $O_2$   $l^{-1}$ ) og for *C. plumosus* vedkommende også over lange perioder. Der er derfor ingen grund til at antage, at de relativt lave iltkoncentrationer har haft indflydelse på forsøgsresultaterne.

I koncentrations-responsforsøgene blev den laveste NOEC-værdi på 0,005 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> observeret for *C. flavicans* efter 48 timers eksponering, men også *C. plumosus*, *C. dipterum*-gr. og *D. galeata* (L) havde lave NOEC. Kun få af de fastlagte NOEC kunne reelt blive accepteret som nul effektkoncentrationer, fordi der rent faktisk kunne forventes en betydelig effekt på populationen ved disse koncentrationer. Ved kun 20 % af NOEC-værdierne kunne det forventes, at ≤ 5 % af forsøgspopulationen ville immobiliseres. Det lave antal af acceptable NOEC-værdier skal findes i, at fastlæggelsen af NOEC afhænger af antallet af teststofkoncentrationer, de anvendte koncentrationer og fortyndingsfaktoren (European Commission, 1995). Det vil sige, at er der et kraftigt respons mellem to koncentrationer (eks. 0 – 50 % effekt), vil det kunne afspejle sig i en høj forventet effekt ved NOEC-værdien.

### **Reproduktion**

I reproduktionsforsøgene blev flere effektparametre undersøgt, bl.a. ægudviklingstid, udviklingstid for unger, kuld størrelse og længde af moderdyr ved reproduktion. NOEC og LOEC værdier kunne derfor variere for den enkelte art afhængig af, hvilken parameter der blev valgt. Ved sammenligning af EC-værdier mellem arterne blev derfor anvendt den mest sensitive parameter.

I cypermethrinforsøgene viste det sig, at hvis zooplanktonet havde udviklet æg, skete der også en videreudvikling til neonate dafnier eller nauplier. Det eneste, som forhindrede dannelsen af unger, var, at moderdyrene døde som følge af en for høj cypermethrinkoncentration. Dette skete ved koncentrationer på 0,06 (forsøg 1), 0,08 og 0,5 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> for hhv. *D. magna*, *D. galeata* og *C. vicinus*. Et af *D. magna* forsøgene viste effekt på reproduktionen ved en så lav koncentration som 0,04 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> (LOEC). Her døde 80 % af dyrene, og de overlevende udviklede ikke æg. Dette er i overensstemmelse med Day et al. (1987) og Miljøstyrelsen (1990), som påviste subletale effekter ved 0,01 – 0,06 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>. Et efterfølgende forsøg viste imidlertid en NOEC større end 0,08 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>. Dette dokumenterer, at effektkoncentrationer kan variere inden for samme art fra det ene forsøg til det andet, hvilket også er kendt fra litteraturen (Møhlenberg et al., 2001).

Forsøgene med *D. galeata* viste en NOEC på 0,04 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> og en LOEC på 0,05 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>, hvor ægudviklingstiden blev forlænget signifikant, ligesom der udvikledes et mindre kuld neonate dafnier. Hos *C. vicinus* blev reproduktionstiden også forlænget, her var det imidlertid udviklingstiden for naupliedannelsen, der blev forlænget. Den mest sensitive parameter for *C. vicinus* var kuld størrelsen, som blev reduceret ved 0,04 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> (LOEC). NOEC var 0,03 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>.

Sammenlignes *D. magna*, *D. galeata* og *C. vicinus* var de lige sensitive i forhold til cypermethrin, idet de blev påvirket på den ene eller anden måde ved koncentrationer mellem 0,04 og 0,05 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>. Inddrages resultaterne fra det andet *D. magna* forsøg, var *D. galeata* den mest sensitive organisme af de to. Day og Kaushik (1987a) har tidligere vist, at

*D. galeata mendotae* kan være meget sensitiv over for pyrethroidet fenvalerate. Betragtes udviklingstiden alene var *D. galeata* den mest sensitive med en LOEC på 0,05 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> mod 0,1 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> for *C. vicinus*. I forbindelse med sammenligningen skal nævnes, at de anvendte *D. magna* var yngre end de øvrige arter ved starten af pesticidpåvirkningen. I litteraturen er det vist, at juvenile dyr er mere sensitive end voksne individer (jf. 4.1.1 (Koncentration-respons)), og på den baggrund antager vi, at forskellen i sensitivitet mellem de to dafniearter ville have været større, hvis der havde været anvendt voksne individer af *D. magna*.

I forhold til koncentrations-respons forsøgene var der overensstemmelse på den måde, at *D. galeata* var mere sensitiv end *D. magna*, dette hænger også sammen med teorien om øget optagelsesrate ved reduceret individstørrelse (Rand et al., 1995). Det behøver dog ikke være hele forklaringen, da fx. *C. sphaericus* (den mindste af de testede zooplanktonarter) var den mindst sensitive i koncentration-respons forsøgene. Det kan diskuteres, hvorvidt *C. vicinus* resultaterne kan sammenlignes med dafnie-resultaterne, da *C. vicinus* blev indsamlet i felten i modsætning til dafnierne, som var rene laboriestammer. *C. vicinus* kan herved have været relativt mere sensitiv end en tilsvarende laboriekultur p.g.a. flere stresspåvirkninger. Koncentration-respons forsøgene med hhv. laborie- og feltkulturer af *D. galeata* viste imidlertid ikke sådanne tegn, hvor sammenligningen er foretaget.

*E. graciloides* viste ikke tegn på påvirkninger ved de anvendte koncentrationer. På baggrund af koncentration-respons forsøgene, hvor den var blandt de mest sensitive arter, ville vi ellers forvente effekter ved den valgte koncentrationsgradient. Årsagen er formentlig, at den valgte metode ikke er sammenlignelig med metoderne anvendt ved de andre zooplanktonarter. *E. graciloides* blev indsamlet i felten som ægbærende voksne individer, som umiddelbart herefter blev eksponeret (se afsnit 2.4.3). Det betød en forholdsvis kort eksponeringstid over for cypermethrin sammenlignet med eksponeringstiden for de øvrige arter, hvilket også betyder, at risikoen for påvirkninger reduceres.

En kontinuert påvirkning med en cypermethrinkoncentration på fx. 0,08 µg cypermethrin l<sup>-1</sup> ville betyde forøget dødelighed hos begge dafniearter, en længere generationstid hos de overlevende *D. galeata* samt reduceret kuld størrelse hos både *D. galeata* og *C. vicinus*. Alle er faktorer, som vil resultere i færre zooplanktonindivider og specielt færre filtratorer i form af dafnier. Konsekvensen heraf vil være en reduceret græsningskapacitet på algerne.

#### 4.1.2 Adfærd

##### *Fysiologisk respons*

Resultaterne af videoregistreringsforsøgene med *D. magna* viste, at alle 4 responsparametre blev påvirket af cypermethrin. Aktiviteten af hjerte og bagklo blev forøget, mens aktiviteten af brystlemmer og mandibler blev reduceret ved cypermethrineksponering.

Bagkloen var den mest sensitive parameter og samtidig også den parameter, hvor responset var lettest og mest entydigt at registrere. En signifikant effekt i forhold til kontrolaktiviteten blev observeret ved  $0,1 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$  svarende til  $EC_{5,4}$  målt som immobilitet for ægbærende *D. magna*. På den baggrund kan bagkloen karakteriseres som en sensitiv og nemt registrerbar parameter til måling af subletal cypermethrintoksicitet. Yderligere vil vi forvente, at der også kan registreres effekter på bagkloen ved koncentrationer lavere end  $0,1 \mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$ . Derimod var aktiviteten af hjertet ikke en sensitiv responsparameter, idet der først blev registreret en signifikant effekt i forhold til kontrolaktiviteten ved  $EC_{41}$  for ægbærende *D. magna*, dvs. ved koncentrationer, som reducerer overlevelsen betydeligt. Hjerteraktivitet er derfor et uegnet effektkriterie for registrering af subletal effekt af cypermethrin.

Som i koncentration-responsforsøgene var effekten på de fysiologiske parametre afhængig af eksponeringstiden. På flere parametre kunne der ses effekter allerede efter 15 minutters eksponering, mens effekten på de fleste parametre var stabil efter omkring 6 timers eksponering. For mandiblerne var der ved visse eksponeringskoncentrationer tendens til restitution, selv om der stadig var en signifikant påvirkning.

Subletale koncentrationer af cypermethrin er kendt for at give en tilstand af lammelse, hvorfra restitution kan ske (Sattelle & Yamamoto, 1988; Bloomquist et al., 1986). Undersøgelser af bevægelsesadfærd hos terrestriske edderkopper har vist, at koordineret bevægelse og thigmotaxis gradvist, og afhængig af køn, restitueres 12 – 36 timer efter en pulsexponering for subletale cypermethrinkingoncentrationer. Edderkoppernes evne til at bevæge sig med deres initielt maksimale bevægelseshastigheder mangler dog stadig 9 dage efter cypermethrineksponeringen (Baatrup et al., 1993). Det antyder i forlængelse af resultaterne for *D. magna*, at nogle effekter restitueres hurtigere end andre. Udførelse af bevægelser med høj hastighed vil formentlig kræve en høj grad af neuronal kontrol og kan derfor forventes at blive særlig påvirket af en nervegift som cypermethrin.

Den økofysiologiske funktion af dafniens vedvarende bevægelse af brystlemmerne er at frafiltrere og tilbageholde fødepartikler, der føres med vandstrømmen ned gennem de to skjolddele, mens mandiblerne behandler fødepartiklerne, inden de føres til spiserøret og synkes. Fødepartiklerne føres til mandiblerne via en ventralt placeret fødefure, der kan renses ved bevægelse af bagkloen, hvis den er fyldt af for mange eller uhåndterbare fødepartikler (Lampert, 1987). Aktiviteten af brystlemmerne stoppes, når bagkloen er i bevægelse. Cypermethrin kan derfor potentielt reducere fødeoptagelsen hos *D. magna* ved at reducere brystlemme- og mandibelaktiviteten og forøge antallet af afvisninger af fødeemner, dvs. forøge bevægelsen af bagkloen. Under naturlige forhold kan fx. kolonidannende blågrønalger, pansrede og trådformede alger også reducere fødeoptagelsen (Lampert, 1987; Gliwicz, 1980), og effekten af cypermethrin og lignende pesticider, som reducerer *D. magna*'s filtreringsaktivitet, skal ses som en yderligere kilde til reduktion af fødeoptagelsen.

Pesticiders effekt på fødeoptagelsen hos zooplankton er tidligere undersøgt i laboratorie- og feltforsøg. F.eks. er subletale koncentrationer af fenvalerate ( $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ) påvist at reducere dafniers filtreringsaktivitet, og filtrationsrater for hele zooplanktonsamfund reduceres ved en fenvaleratekoncentration på  $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (Day et al., 1987).

Pesticideffekter direkte på aktiviteten af lemmer mm. der anvendes i fødeoptagelsesprocessen er derimod sjældent undersøgt. Gliwicz & Sieniawska, (1986) har dog vist, at subletale lindan koncentrationer reducerer brystlemme- og mandibelaktiviteten hos *D. pulex*.

### ***Svømmehastighed***

Dafniers evne til at foretage både horisontale og vertikale vandringer under naturlige betingelser er velkendt og kan relateres til forhold i det omgivende miljø som fx. til stede-værelse af føde og prædatorer (Christoffersen & Bosselmann, 1997; Lauridsen et al., 1997). De indledende forsøg viste imidlertid, at dafnie-arter og -kloner holdt i kulturer tilsyneladende kan mangle evnen til at foretage vandringer udløst af en lysstimulus. Dette er sandsynligvis en konsekvens af, at denne type respons ikke har nogen betydning for populationen under de givne forhold.

Den begrænsede eller manglende respons hos dafnier fra laboratoriekulturer må derfor tages i betragtning ved økotoxikologiske studier med retningsbestemt svømmeadfærd som effektkriterie.

Svømmehastighederne opnået i kontrolforsøgene er sammenlignelige med værdier opnået i andre studier af *D. magna* eller tilsvarende store cladoceer. Der er rapporteret om gennemsnitlige svømmehastigheder målt vha. videofilmning eller visuelle observationer fra  $0,2 \text{ m min}^{-1}$  (Baillieul & Blust, 1999) til  $0,9 \text{ m min}^{-1}$  (Larsson et al., 2000).

Den negative effekt af cypermethrin på *D. magna*'s evne til at foretage en retningsbestemt svømmeaktivitet var særdeles udtalt og medførte en reduktion i den maksimale svømmehastighed på 10-68% (figur 32) og nedsatte den gennemsnitlige svømmehastighed tilsvarende (tabel 14). Samme respons er fundet af Baillieul og Blust (1999), som undersøgte effekten af cadmium på *D. magna*. Reduktionen i svømmehastigheden var relateret til koncentrationen af cadmium og til størrelsen af forsøgsdyrene. Porter et al. (1982), Dodson et al. (1995) og Baillieul og Blust (1999) har desuden samstemmende vist, at der er klar sammenhæng mellem en reduceret hhv. svømmehastighed og observerede ændringer i fysiologiske og adfærdsmæssige forhold.

Ændringerne i den maksimale svømmehastighed opnået i dette projekt viste en klar sammenhæng med cypermethrinkoncentrationen. Relationen kunne beskrives med en eksponentiel aftagende funktion ( $y = 78,6 e^{-0,91x}$ ,  $R^2 = 0,91$ ), hvor hældningen var signifikant forskellig fra 0.

Der er hidtil kun lavet få studier af toksiske stoffers indvirkning på svømmeaktiviteten hos zooplankton, men resultaterne fra disse studier og fra dette projekt er, at svømmeaktiviteten er en følsom parameter, som repræsenterer væsentlige fysiologiske mekanismer (jf. afsnit 4.1.2

(Fysiologisk respons)). Denne parameter er derfor velegnet som effektkriterie i økotoxikologiske test.

Den økologiske konsekvens af en reduceret svømmehastighed kan illustreres med et eksempel.

Gammelmosen, hvor den anvendte population af *D. magna* findes, er en lavvandet sø (1-3 m dyb) på 3,8 ha og med en veludviklet littoralzone (5-10 bred) med emergente vandplanter (primært tagrør). Søen har en ringe fiskebestand, og der kan derfor i perioder opbygges tætte bestande af dafnier. Disse skal dog sameksistere med de eksisterende fisk og med invertebrat-prædatorer, bl.a. *Chaoborus flavicans*, hvilket er muligt, da dafnierne kan vandre ind i littoralzonen med planter i de lyse timer, hvor de er mest udsat for prædation.

Søen er ca. 150 m bred og 250 m lang. Hvis det antages, at *D. magna* populationen vil fordele sig ligeligt over hele søen, når forholdene tillod det (om natten), så vil den enkelte dafnie gennemsnitligt skulle svømme 100 m for at nå ind og ud af littoralzonen. Med en maksimal svømmehastighed,  $0,85 \text{ m min}^{-1}$  (gennemsnit af værdier fra alle kontrolforsøg), vil det tage ca. 2 timer at svømme en distance på 100 m. Hvis det videre antages, at en cypermethrin-koncentration på  $0,5 \text{ ug l}^{-1}$  realistisk set kan forekomme i en sø eller et vandhul i et landbrugsområde (se afsnit 1.2.1), vil den maksimale svømmehastighed være reduceret til  $0,41 \text{ m min}^{-1}$ , og dermed skal dafnierne bruge lidt over 4 timer på at tilbagelægge 100 m.

Ved at anvende den tilnærmede gennemsnitlige svømmehastighed vil scenariet være endnu mere udtalt, idet de 100 m vil tage over 4 timer at svømme for et ueksponeret dyr og 12 timer for et dyr eksponeret for  $0,5 \text{ }\mu\text{g cypermethrin l}^{-1}$ .

En forøgelse af den tid, dafnier skal bruge på at svømme, medfører dels, at der er mindre tid til at optage føde, og dels at risikoen for at blive opdaget som bytte øges. Begge forhold vil betyde mindre overlevelse og vækst af dafnie-populationen. Dafniernes rolle som konsument af alger og dermed bidrag til at opretholde en balanceret fødekæde kan derfor kraftigt forringes, hvis der blot kortvarigt (få døgn) findes cypermethrin i vandet.

## 4.2 Azoxystrobin

### 4.2.1 Overlevelse

#### **Koncentration-respons**

Resultaterne fra koncentration-respons forsøgene viste, at zooplanktonet var mere sensitivt over for azoxystrobin end makroinvertebraterne. Særligt sensitive var *E. graciloides* med  $EC_{50} = 0,038 (0,03 - 0,04) \text{ mg l}^{-1}$  og laboratoriekulturen af *D. galeata* med  $EC_{50} = 0,095 (0,08 - 0,11) \text{ mg l}^{-1}$  efter 48 timers eksponering. Disse værdier er op til 14 gange lavere end den fundne  $EC_{50}$  for neonate *D. magna* på  $0,53 (0,48 - 0,57) \text{ mg l}^{-1}$  efter 48 timers eksponering. I litteraturen opgives den nominelle  $EC_{50}$  for neonate *D. magna* efter 48 timers eksponering til  $0,28 (0,22 - 0,38) \text{ mg l}^{-1}$  (Miljøstyrelsen, 1994a). Et koncentrationsniveau, der er ca. 2 gange lavere

end  $EC_{50}$  for neonate *D. magna* bestemt i dette projekt, men samtidig et niveau, der er op til 7 gange højere end niveauet for de mest sensitive zooplanktonarter testet i dette projekt. Yderligere skal det bemærkes, at testene på *E. graciloides* og *D. galeata* er gjort på individer på ældre udviklingsstadier. Det kan derfor forventes (jf. 4.1.1), at juvenile stadier vil være mere sensitive. Tilsvarende forsøget med cypermethrin var *D. magna* således heller ikke blandt de mest sensitive arter ved eksponering for azoxystrobin.

Som observeret i koncentration-responsforsøget med cypermethrin var også neonate *D. magna* eksponeret for azoxystrobin signifikant mere sensitive end voksne ægbærende *D. magna* med forskelle op til en faktor 3,6. For yderligere diskussion af dette henvises til afsnit 4.1.1.

Hvorfor makroinvertebraterne generelt udviste meget lavere sensitivitet overfor azoxystrobin sammenlignet med zooplankton kan ikke umiddelbart forklares. *C. flavicans* var ikke påvirket af koncentrationer op til  $6 \text{ mg l}^{-1}$ , mens sensitiviteten af *C. plumosus* var på samme niveau som for neonate *D. magna*. Det illustrerer, at man skal være varsom med at fastsætte sensitivitetsniveauer for hele organismegrupper.

I koncentration-responsforsøgene blev den laveste NOEC-værdi på  $0,034 \text{ mg azoxystrobin l}^{-1}$  observeret for *E. graciloides* efter både 24 og 48 timers eksponering. Denne værdi er dog så tæt på  $EC_{50}$ , at den reelt ikke kan accepteres som en NOEC-værdi. Kun for 19 % af NOEC-værdierne kunne det forventes, at < 5 % af forsøgspopulationen ville blive immobiliseret.

Azoxystrobinforsøgene viste tilsvarende forsøgene med cypermethrin, at individernes akutte respons var negativt påvirket af eksponeringstiden. Dafniernes sensitivitet var ca. fordoblet efter 48 timer, mens sensitiviteten hos *E. graciloides* og *C. sphaericus*, ligesom i forsøget med cypermethrin, ikke blev forøget over de 48 timer. Det vil altså sige, at det er muligt, at *E. graciloides* og *C. sphaericus* også ved eksponering for azoxystrobin havde nået effektniveauet for tidsafhængigt respons allerede efter 24 timers eksponering. *Daphnia*-arterne kunne der i mod forventes at blive stærkere påvirket af stoffet ved eksponering ud over de 48 timer.

I koncentration-respons forsøgene med ægbærende *D. magna* og *C. plumosus* blev der efter 48 timer konstateret iltkoncentrationer omkring  $2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ , uden observation af døde individer i kontrolbehandlingen. Som tidligere beskrevet i afsnit 4.1.1 forventes det ikke at have haft indflydelse på forsøgsresultaterne.

### **Reproduktion**

Reproduktionsforsøgene med azoxystrobin viste en effekt der imidlertid var forskelligt fra cypermethrin, idet azoxystrobin, ved de anvendte koncentrationsgradienter, ikke hæmmede ægdannelsen, men derimod hæmmede den videre udvikling til neonate dafnier. For *D. magna*'s vedkommende således, at der ikke udvikledes neonate dafnier ved azoxystrobin koncentrationer over  $0,04 \text{ mg l}^{-1}$  (LOEC  $0,08 \text{ mg azoxystrobin l}^{-1}$ ). Dette er i overensstemmelse med Miljøstyrelsens



referencer, som giver en LOEC på 0,084 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> for *D. magna* (Miljøstyrelsen, 1994b). Til sammenligning var *D. galeata*, med en LOEC på 0,03 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> i overensstemmelse med de øvrige resultater i projektet, mere sensitiv end *D. magna*. Her er det igen værd at nævne, at *D. magna* var juvenile dyr sammenlignet med de øvrige testorganismer. For *D. galeata*'s vedkommende var der også effekt på moderdyrenes størrelse ved forsøgsafslutningen. Dyrene, som ikke udviklede neonate dafnier, blev større end forsøgsdyrene ved de lavere azoxystrobinkoncentrationer. Årsagen hertil kan have været, at æggene, som ikke videreudvikledes til levende afkom, blev reabsorberet af moderdyrene i sidste del af forsøgsperioden. Herved blev moderdyrene tilført en energimængde, som formentlig er omsat til øget vækst. Dette fænomen er kendt fra fisk, der forhindres i at gyde, men er hidtil ikke beskrevet for zooplankton.

De to dafnie-arter viste en klar tendens til, at antal individer, som udviklede neonate, faldt med øget eksponeringskoncentration. Dette kunne ikke testes p.g.a. det valgte forsøgs-design, men da begge arter viste samme tendens, er der stærke indicier for, at dafniernes evne til at videreudvikle æg til neonate gradvist hæmmes med øget azoxystrobinkoncentration.

Copepoderne viste et mønster, som lignede mønsteret ved en cypermethrinpåvirkning. Over en given azoxystrobinkoncentration døde copepoderne, inden der blev udviklet æg. Ved en sammenligning af denne parameter med de andre arter var *E. graciloides* den klart mest sensitive art, LOEC = 0,01 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup>. Både *C. vicinus* og *E. graciloides* viste tendens til reduceret kuld størrelse med øget azoxystrobin-koncentration. Hos dafnierne var der ingen effekt på kuld størrelsen. Disse resultater tyder på, at virkningen ikke er den samme hos hhv. dafnier og copepoder, hvilket kan hænge sammen med, at dafnierne bærer æggene under kropsskjoldet, mens copepoderne bærer æggene i en ægsæk fastgjort ved grunden af bagkroppen, hængende under kropfødderne (furca). På denne måde er æggene udsat for en mere direkte påvirkning, end det er tilfældet hos dafnierne.

Cypermethrin viste sig at kunne have effekter på zooplanktonets reproduktionsevne allerede ved 1 % af markdosis (forudsætninger: én procent af normal markdosis rammer hele vandfladen på et 30 cm dybt vandhul, svarende til ca. 0,05 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>).

Azoxystrobinresultaterne viste, at dette fungicid ligeledes kunne have effekter, om end der krævedes en højere grad af eksponering (ca. 30 % af markdosis). Ved en sådan dosis ville *D. galeata* være ude af stand til at reproducere sig, og såvel *C. vicinus* og *E. graciloides* ville dø inden for 48 timer ved en kontinuert azoxystrobin-påvirkning. Følggevirkningen ville igen være nedsat græsningskapacitet med forringet vandkvalitet til følge.

#### 4.2.2 Adfærd

##### *Fysiologisk respons*

Resultaterne af videoregistreringsforsøg med *D. magna* viste, at aktiviteten af hjerte, brystlemmer og mandibler blev reduceret ved eksponering for azoxystrobin, mens aktiviteten af bagkloen stort set var upåvirket. Brystlemmeaktiviteten var den mest sensitive parameter over for

azoxystrobin, men både brystlemmer, hjerte og mandibler blev signifikant påvirket ved 0,5 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> svarende til EC<sub>4</sub> målt som immobilitet for ægbærende *D. magna*. Bagkloen var kun påvirket efter 24 timers eksponering for 2 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup> svarende til EC<sub>22</sub> for ægbærende *D. magna*. Aktiviteten af hjerte, brystlemmer og mandibler er dermed alle sensitive effektkriterier for måling af subletale effekter af azoxystrobin, hvorimod aktiviteten af bagkloen ikke er et egnet effektkriterie.

En reduktion i aktivitet af de målte responsparametre på *D. magna* var forventet ud fra azoxystrobins virkemekanisme. En blokering af elektrontransporten i cytochrom *bc<sub>1</sub>* bevirker, at ATP-syntesen hæmmes, og energikrævende processer og funktioner vil gradvist ophøre, hvorefter organismen med tiden dør. De første effekter på aktiviteten af hjertet indtrådte efter 1 times eksponering, mens aktiviteten af brystlemmer og mandibler blev påvirket efter 4-7 timer.

Naturlige strobiluriner og deres syntetiske analoge vides at kunne forflytte hinanden fra bindingsstedet, hvorved bindingen må være reversibel (Clough et al., 1998). Vi observerede dog ingen tegn på restitution hos *D. magna*, men der i mod kun en gradvis reduktion i aktivitet af de målte responsparametre med tiden.

Tilsvarende cypermethrin vil effekten af eksponering for azoxystrobin potentielt kunne reducere fødeoptagelsen hos *D. magna* som diskuteret i afsnit 4.1.2 (Fysiologisk respons).

### ***Svømmehastighed***

Azoxystrobin har en effekt tilsvarende effekten af cypermethrin på *D. magna*. Evnen til at foretage en retningsbestemt svømmeaktivitet blev reduceret med ca. 15 % ved en koncentration på 1,0 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup>. Sammenlignet med effekter omtalt i afsnit 4.2.2. (fysiologisk respons) synes svømmeaktiviteten at være en usensitiv parameter.

Hvis de hidtidige koncentrationsniveauer af azoxystrobin på op til 0,026 µg l<sup>-1</sup> i danske vandhuller (Århus Amt, 2002) er repræsentative, er sandsynligheden for at dette medfører en målbar reduktion i *D. magna*'s svømmehastighed lille. Datamaterialet er dog begrænset, og der kan vanskeligt konkluderes om stoffets generelle effekt på svømmeadfærd.

## 4.3 Bentazon

### 4.3.1 Overlevelse

Bentazon var meget svagt toksisk over for zooplankton. Stoffet gav kun effekt på få forsøgsindivider ved koncentrationer > 250 mg l<sup>-1</sup>, og de beregnede EC<sub>50</sub>-værdier (3797 mg l<sup>-1</sup> efter 48 timer) skal derfor kun opfattes som et koncentrationsniveau for effekt. Grundet stoffets lave opløselighed i vand (jf. 2.1.3) var det ikke muligt at arbejde med højere koncentrationer og derved få fastlagt EC<sub>50</sub> mere præcist. I litteraturen beskrives bentazon ligeledes som svagt toksisk over for akvatiske invertebrater med EC<sub>50</sub> > 100 mg l<sup>-1</sup> efter 48 timers eksponering (Miljøstyrelsen, 1994c) og LC<sub>50</sub> = 125 mg l<sup>-1</sup> for dafnier (British Crop

Council, 1997). I ét forsøg er  $EC_{50}$  fundet til  $125 \text{ mg l}^{-1}$  efter 48 timers eksponering, men forfatterne påpeger selv, at resultatet er under indflydelse af en meget lav pH ( $< 4$ ) i de 2 højeste pesticidkoncentrationer, som var de eneste koncentrationer, hvor der blev observeret maksimal effekt (Miljøstyrelsen, 1994).

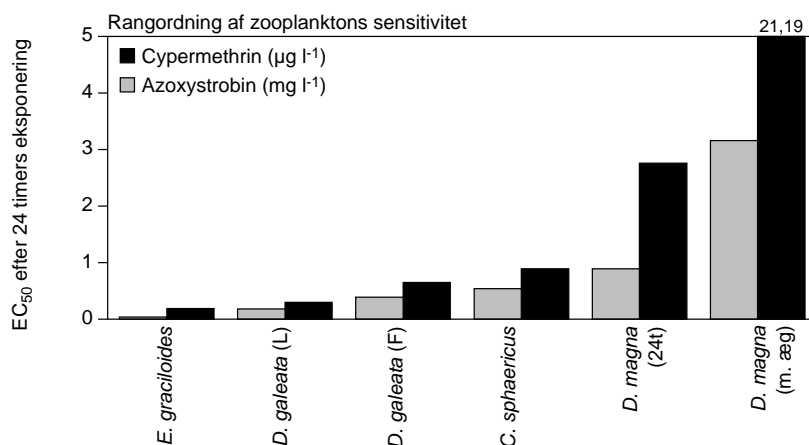
På baggrund af bentazons lave toksicitet over for zooplankton blev det prioriteret ikke at fortage yderligere undersøgelser med pesticidet i dette projekt.

Sammenlignet med målte koncentrationer af bentazon i danske søer og vandhuller (jf. 1.2.1) kan der på baggrund af de udførte koncentration-respons forsøg ikke forventes at forekomme nogle alvorlige effekter på zooplankton.

#### 4.4 Samlet vurdering på tværs af stoffer

Ved beskyttelse af limnisk økosystemer mod pesticidpåvirkninger må det overvejes, hvilken grad af beskyttelsesniveau der ønskes. Er beskyttelse af "nøgle"-arter tilstrækkelig, eller skal beskyttelsesniveauet indrettes, således at de mest sensitive organismer i økosystemet også bevares? Problematikken forstærkes af, at en art, slægt eller orden ikke nødvendigvis er lige sensitiv over for alle pesticider, og at organismegrupper også rummer relativt ufølsomme repræsentanter (Brock et al., 1992). Eksempelvis viste koncentration-respons forsøgene, at makroinvertebraterne er en mere sensitiv organismegruppe end zooplankton over for cypermethrin, men ikke over for azoxystrobin, og samtidig var dog 1 art ud af 4 arter af makroinvertebrater meget sensitiv over for azoxystrobin. En rangordning af de enkelte zooplanktonarters sensitivitet udtrykt som  $EC_{50}$  over for både cypermethrin og azoxystrobin viste en rimelig konsistens. Således kan *E. graciloides* rangordnes som den mest følsomme art efterfulgt af *D. galeata* (L), *D. galeata* (F), *C. sphaericus*, *D. magna* (neonat) og *D. magna* (ægbærende) (figur 35). Dette blev understøttet af reproduktionsforsøgene, hvor både *D. galeata*, *C. vicinus* og *E. graciloides* var mere sensitive end *D. magna* ved en azoxystrobinpåvirkning. For cypermethrins vedkommende var der i reproduktionsforsøgene ikke væsentlig forskel på zooplanktonets følsomhed.

På baggrund af ovennævnte bør det overvejes om anvendelse af et højt beskyttelsesniveau på økosystemniveau kræver identifikation af sensitiviteten af flere arter og organismegrupper over for pesticidstofgrupper eller anvendelse af applikationsfaktorer.



FIGUR 35. RANGORDNING AF DE ANVENDTE ZOOPLANKTON ORGANISMERES SENSITIVITET OVER FOR AZOXYSTROBIN OG CYPERMETHRIN PÅ BAGGRUND AF  $EC_{50}$  EFTER 24 TIMERS EKSPONERING. (L) = LABORATORIESTAMME, (F) = FELTSTAMME, (24T) = UNGER DER ER 24 TIMER GAMLE, (M. ÆG) = ÆGBÆRENDE DYR.

I godkendelsesproceduren af pesticider fungerer *D. magna* som standard-testorganisme repræsenterende det 2. trofiske led i den akvatiske græsserfødekæde. I dette projekt med stofferne cypermethrin og azoxystrobin var alle øvrige testede zooplanktonarter (undtagen *C. sphaericus* i cypermethrinforsøget) imidlertid mere sensitive end *D. magna* efter både 24 og 48 timers eksponering (målt som  $EC_{50}$ ). Yderligere skal det pointeres, at test med andre zooplanktonarter end *D. magna* blev udført på ældre udviklingsstadier af dyrene. Der kan derfor forventes en endnu større sensitivitet af yngre udviklingsstadier blandt disse andre zooplanktonarter.

#### 4.5 Evaluering af de anvendte metoder

Opretholdelse af *D. magna* og *C. sphaericus* laboratoriekulturer, som blev anvendt i projektet gennem ca. 2 år, var tidskrævende, men generelt uproblematisk. *D. galeata* var mere problematisk, da den var sart over for daglig håndtering. Som nævnt i 2.3.3. var det særligt på det neonate stadie, at *D. galeata* var sart. På trods af håndteringsvanskelighederne var *D. galeata* en god testorganisme p.g.a. dens relative store følsomhed sammenlignet med de øvrige zooplankton.

Indsamling af forsøgsdyr krævede viden om arternes forekomst, og indledende forsøg omkring arternes overlevelsessevne under standardiserede laboratorieforhold og sårbarhed ved håndtering var nødvendige. En højere kontrolimmobilitet i koncentrations-respons forsøgene blev observeret hos forsøgsdyr fra felten sammenlignet med individer fra laboratoriekulturer. På baggrund af erfaringer opnået i dette projekt kan forsøgsdyr fra naturlige populationer dog anbefales i den videre forskning omkring

pesticiders effekt på limnisk invertebrater. Forsøg med naturlige populationer afspejler alt andet lige bedre responset i en given lokalitet. Til gengæld må det forventes, at lokale tilpasningsforhold, samt det forhold at konditionen af individer indsamlet i felten vil variere over tid i relation til fx. fødetilgængelighed og temperatur, vil påvirke individernes sensitivitet. Naturlige populationer kan derfor forventes at give større variationer i respons. Men denne variation vil blot give et mere reelt billede af mulige konsekvenser af pesticideksponering under naturlige forhold.

I koncentration-responsforsøgene var brugbarheden af de fastlagte NOEC begrænset, idet koncentrationerne ofte tilsvarede niveauet for en betydelig forventet effekt. Normalt fastlægges NOEC ikke i koncentration-responsforsøg, idet man ud fra koncentration-respons sammenhængen bestemt ved lineær regression kan estimere sig frem til en koncentration, ved hvilken der kan forventes at forekomme en acceptabel effekt. Det skal dog pointeres, at sikkerheden på  $EC_x$ -værdierne falder med stigende afstand fra  $EC_{50}$ -værdien (Finney, 1971). Anvendelsen af begge beregningsmetoder illustrerer imidlertid, hvor forskellige niveauer for nul effekt koncentration der kan opnås afhængig af den anvendte metode.

Reproduktionsforsøgene var velegnede til at studere subletale effekter, idet de valgte effektparametre var sensitive ved en pesticidpåvirkning. Både udviklingstiden for ægdannelse og neonate dafnier eller nauplier var anvendelige, men også kuld størrelsen viste sig anvendelig. Kuld størrelsen ville dog stå stærkere som parameter, hvis den havde været opgjort på hhv. ikke-udviklede unger (æg) og levende unger. Dette var ikke muligt med den valgte metode. De valgte zooplanktonarter var dog ikke lige velegnede. Eksempelvis var *E. graciloides* resultaterne ikke umiddelbart sammenlignelige med resultaterne fra de øvrige arter, da den valgte metode betød en kortere eksponeringstid af *E. graciloides* i forhold til eksponeringstiden af de øvrige arter. I reproduktionsforsøgene valgte vi at betragte det enkelte individ, hvilket muliggjorde at teste for æg og ungers udviklingstid. Vil man teste for procentuel ægudviklingssucces hos de voksne individer, vil det være nødvendigt at fokusere på effekter på grupper af dyr jf. International Standard (1997).

I forsøgene med videoregistrering af *D. magna* var de undersøgte responsparametre velegnede til påvisning af subletale pesticideffekter. Ved databehandlingen blev det valgt at fokusere på effekter på grupper af dyr frem for på individer. Under naturlige forhold er responsparametrenes aktivitet bl.a. påvirket af fødekonzentration og individstørrelse. Eksempelvis falder hjerteaktivitet og brystlemmeaktivitet med individstørrelse mens brystlemmeaktivitet stiger med faldende fødekonzentration (Lampert, 1987). På trods af standardiserede forsøgsbetingelser og anvendelse af tilnærmelsesvis ens individer, hvad angår størrelse og reproduktionsstadium samt ved at udføre forsøgene uden fødetilførsel, blev der observeret en signifikant forskel på individerne inden for hver behandlingsgruppe. Derimod var der similaritet mellem behandlingsgrupper, hvor kun hjerte- og brystlemmeaktivitet var signifikant forskellig mellem enkelte grupper i henholdsvis cypermethrin- og azoxystrobinforsøgene. På trods af de individuelle forskelle i aktivitetsniveau viste forsøgsopstillingen sig dog egnet til påvisning af

pesticideffekter. For fremtidige studier kan det overvejes at anvende flere individer pr. behandling på bekostning af antal replikerede observationer pr. tidsinterval for derved at reducere variationen mellem individer og samtidig øge teststyrken for forskelle mellem behandlinger.

Generelt kunne det i videoregistreringsforsøgene forventes, at aktiviteten af responsparametrene ville falde gradvist med tiden, fordi dyrene p.g.a. manglen på føde ville blive udmattede. Kontroltyrene ændrede da også aktivitet i løbet af forsøgsperioden, men det var kun til få enkelte tidspunkter at aktiviteten var signifikant forskellig fra startaktiviteten, og der var ikke tendens til hverken en stigning eller et fald i aktivitetsniveauet. Vores erfaring er også, at neonate *D. magna* kan leve i flere dage uden føde, og vi mener ikke, at den manglende tilsætning af føde har haft nogen nævneværdig indflydelse på resultaterne. Forsøgene blev udført uden fødetilsætning for at undgå adsorption af pesticiderne til fødepartikler og dermed ukontrolleret pesticidoptagelse med føden (Day & Kaushik, 1987c) og reduktion af pesticidkoncentrationen i vandfasen.

Svømmestudierne viste på baggrund af forsøgene med cypermethrin, at svømmeaktiviteten var en følsom og reproducerbar parameter. Den repræsenterer væsentlige fysiologiske mekanismer, og må derfor karakteriseres som et velegnet effektkriterie i toksitetstests.

Sammenholdes de subletale effektstudier var der forskel på sensitiviteten. I de fysiologiske forsøg med *D. magna* og cypermethrin viste den mest følsomme parameter effekt ved 0,1 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>. Svømmeforsøgene viste effekt ved 0,05 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>, mens de mest følsomme reproduktionsforsøg med *D. magna* viste effekt ved 0,04 µg cypermethrin l<sup>-1</sup>. Tilsvarende viste de fysiologiske- og reproduktionsforsøg med *D. magna* eksponeret for azoxystrobin effekt ved hhv. 0,5 og 0,08 mg azoxystrobin l<sup>-1</sup>. Om forskellene skyldes de valgte koncentrationsgradienter kan ikke afgøres.

De fundne LOEC'er for cypermethrin på testede invertebrater var sammenlignelige med tidligere undersøgelser (Stephenson, 1982; Day, 1989). Det skal dog bemærkes at *E. graciloides* i denne undersøgelse var betydelig mere sensitiv (> 10×) end juvenile *D. magna* og end ægbærende *D. magna* (100×). LOEC for de subletale parametre var ligeledes indenfor samme størrelsesorden som LOEC fra tidligere undersøgelser (Day et al., 1987; Day & Kaushik, 1987b).

Dosis-responsforsøg med azoxystrobin er hidtil kun vurderet på *D. magna* og *Macrocyclus fuscus* (Miljøstyrelsen, 1994a og Miljøstyrelsen, 1995). Vores undersøgelse viser tilsvarende resultater som de hidtidige for *D. magna*, hvorimod *E. graciloides* er ca. en faktor 10-20× mere sensitiv end *D. magna*. LOEC for de subletale parametre er i vores undersøgelse en faktor 2-3× mere sensitiv (*D. galeata*) end hidtidige undersøgelser, men altså af samme størrelsesorden. Igen skal nævnes *E. graciloides*, der som den mest sensitive afveg med en faktor 10 i forhold til de hidtidige LOEC'er.

#### 4.6 Miljørelevans

De opnåede resultater er baseret på nominelle koncentrationer, hvilket betyder, at effektniveauer baseret på aktuelle koncentrationer vil være lavere. I rent vand og med hyppige medieskift må vi dog antage, at forsvindingsraterne grundet nedbrydning og adsorption er mindre end i et naturligt vandhul.

Sammenholdt med målte koncentrationer i danske søer og vandhuller viser projektets koncentration-respons resultater, at bentazon og azoxystrobin ikke kan forventes at give akutte effekter på de testede zooplankton eller makroinvertebrater. Sammenholdt med de registrerede subletale effektkoncentrationer er der heller intet, der tyder på, at der kan forventes subletale effekter på zooplankton. Ved ulovlig omgang med azoxystrobin, fx. ved at en marksprøjte passerer hen over et vandhul eller passerer meget tæt forbi, vil der imidlertid kunne forekomme effekter på dafniernes reproduktionsevne.

For cypermethrins vedkommende kan der i forbindelse med en pesticidpuls forventes akutte effekter på de mest følsomme zooplanktonarter (*D. galeata* og *E. graciloides*) og på makroinvertebraterne. Under forudsætning af at cypermethrin i forbindelse med en puls forekommer i koncentrationer som esfenvalerat (0,66 µg l<sup>-1</sup>; Århus Amt, 1999), viser projektets subletale effektforsøg, at der kan være effekter på *D. magna*'s, *D. galeata*'s og *C. vicinus*' reproduktionsevne. Projektet viser også, at der kan være fysiologiske effekter og hermed effekter på fødeoptagelse og svømmeevne hos *D. magna*.

## 5 Reference- og litteraturliste

- Baatrup, E., Bayley, M., 1993. Effects of the Pyrethroid Insecticide Cypermethrin on the Locomotor Activity of the Wolf Spider *Pardosa amenata*: Qualitative Analysis Employing Computer-Automated Quantitative Analysis Employing Computer-Automated Video Tracking. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26, 138-152.
- Baillieul, M., Blust, R. 1999. Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 44, 245-254.
- Bloomquist, J.R., 1996. Ion channels as targets for insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 163-190.
- Bloomquist, J.R., Adams, P.M., Soderlund, D.M. 1996: Inhibition of gamma-aminobutyric acid-stimulated chloride flux in mouse-brain vesicles by polychlorocycloalkane and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* 7, 11-20.
- Briggs, L., Damm, N., 2001. Effects of pesticides on *Bombina bombina* in natural pond ecosystems. Rapport til Miljøstyrelsen, 99 pp.
- British Crop Council, 1997. The Pesticide Manual, a World Compendium. British Crop Council.
- Brock, T.C.M., Crum, S.J.H., van Wijngaarden, R., Budde, B.J., Tijink, J., Zuppelli, A., Leeuwangh, P. 1992. Fate and Effects of the Insecticide Dursban 4E in Indoor *Elodea*-Dominated and Macrophyte-Free Freshwater Model Ecosystems: I. Fate and Primary Effects of the Active Ingredient Chlorpyrifos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 69-84
- Buhl, K.J., Hamilton, S.J., Schmulbach, J.C., 1993. Acute toxicity of the herbicide bromoxynil to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.* 12, 1455-1468.
- Burks, R., Lodge, D.M., Jeppesen, E., Lauridsen, T.L., 2002. Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshw. Biol.* 47, 343-365.
- Christoffersen, K., 1990. Evaluation of *Chaoborus* prædation on natural populations of herbivorous zooplankton in a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 200/201, 459-466.
- Christoffersen, K., Bosselman, S., 1997. Zooplankton: growth, grazing and interactions with fish. In: Sand-Jensen, K., Pedersen, O. (Eds.), *Freshwater Biology - Highlights and Priorities in Danish Limnology*. GAD, Copenhagen, Denmark, pp. 162-183.



- Clough, J.M., Godfrey, C.R.A., 1998. The Strobilurin Fungicides. In: Hudson, D., Miyamoto, J. (Eds.), *Fungicidal Activity Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*. John Wiley & Sons Ltd., pp. 109-148.
- Dall, P. C., Lindegaard, C., 1995. En oversigt over danske ferskvandsinvertebrater til brug ved bedømmelse af forureningen i søer og vandløb. Ferskvandsbiologiske Laboratorium, Københavns Universitet, 240 pp.
- Day, K.E., 1989. Acute, chronic and sublethal effects of synthetic pyrethroids on freshwater zooplankton. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 411-416.
- Day, K.E., Kaushik, N.K., 1987a. An assessment of the chronic toxicity of the synthetic pyrethroid, fenvalerate, to *Daphnia galeata mendotae* using life tables. *Environ. Poll.* 44, 13-26.
- Day, K.E.; Kaushik, N.K., 1987b. Short-term Exposure of Zooplankton to the Synthetic Pyrethroid, Fenvalerate, and Its Effects on Rates of Filtration and Assimilation of the Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 423-432.
- Day, K.E., Kaushik, N.K., 1987c. The adsorption of fenvalerate to laboratory glassware and the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, and its effect on uptake of the pesticide by *Daphnia galeata mendotae*. *Aquat Toxicol.* 10, 131-142.
- Day, K.E., Kaushik, N.K., Solomon, K.R., 1987. Impact of Fenvalerate on Enclosed Freshwater Planktonic Communities and on in situ Rates of Filtration of Zooplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1714-1728.
- Dodson, S.I., Hanazato, T., Gorski, P. R., 1995. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus* kairomone. *Env. Toc. Chem.* 14, 43-50.
- Dodson, S.I., Tollrian, R., Lampert, W., 1997. *Daphnia* swimming behavior during vertical migration. *J. Plank. Res.* 19, 969-978.
- Einsle, U., 1996. Copepoda: Cyclopoida. Genera Cyclops, Megacyclops, Acanthocyclops. In: Dumont, H.J.F. (Ed.), *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. SPB Academic Publishing bv, Amsterdam.
- Elliott, J.M., 1971. Some Methods for the statistical Analysis of Samples of Benthic Invertebrates. 25. Freshwater Biological Association. Scientific publication No. 25.
- European Commission, 1995. Risk assessment of existing substances. Technical guidance document in support of the commission regulation (EC) NO. 1488/94 on risk assessment for existing substances in accordance with council regulation (EEC) no. 793/93. European Commission, Directorate-general, Environment, nuclear safety and civil protection.

- Finney, D.J., 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Friberg-Jensen, U., Wendt-Rasch, L., Woin, P., Christoffersen, K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquat. Toxicol.*, 63: 357-371.
- Friis, K., Jensen, P.K., Jørgensen, L.N., Nielsen, G.C., Paaske, K., Petersen, P.H. (Eds.). Vejledning i planteværn 2002. Landbrugets Rådgivningsscenter. Landbrugsforlaget.
- Gliwicz, Z.M., 1980. Filtering Rates, Food Size Selection, and Feeding Rates in Cladocerans - Another Aspect of Interspecific Competition in Filter-feeding Zooplankton. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp.* 3, 282-291.
- Gliwicz, Z.M., Sieniawska, A., 1986. Filtering activity of *Daphnia* in low concentrations of a pesticide. *Limnol. Oceanogr.* 31, 1132-1138.
- Haccou, P., Meelis, E., 1992. Statistical Analysis of Behavioural Data. Oxford University Press, Oxford.
- Hanazato, T., 1991. Effects of long- and short-term Exposure to Carbaryl on Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia ambigua*. *Environ. Pollut.* 74, 139-148.
- Hansen, A-M., Jeppesen, E., 1992. Changes in the abundance and composition of cyclopoid copepods following fish manipulation in eutrophic Lake Væng, Denmark. *Freshw. Ecol.* 28, 183-193.
- International Standard, 1996. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Acute toxicity test. International Standard Organisation (ISO) 6341.
- International Standard, 1997. Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea). International Standard Organisation (ISO)/TC 147/SC 5: N209.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Søndergaard, M., Lauridsen, T., 1999. Trophic dynamics in turbid and clearwater lakes with special emphasis on the role of zooplankton for water clarity. *Hydrobiologia* 408/409, 217-231.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Søndergaard, M., Lauridsen, T., Landkildehus, F., 2000. Trophic structure, species richness and biodiversity in Danish lakes: changes along a phosphorus gradient. *Freshw. Biol.* 45, 201-218.
- Kasprzak, P.H., Lathrop, R.C., 1997. Influence of two *Daphnia* species on summer phytoplankton assemblages from eutrophic lakes. *J. Plank. Res.* 19, 1025-1044.

Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M., Ratte, H.T., 1994. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Wat. Res.* 28, 743-746.

Kotai, J., 1972. Instructions for the preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norsk Institutt for Vannforskning, Oslo, Publication B-11/69.

Lampert, W., 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. *Mem. Ist. Idrobiol.* 45, 143-192.

Larsson, P., Aasen, C., Cieplinska, T., Freitas, R., Fullwood, C.F., 2000. Aggregation and swimming speed of daphnids in a homogeneous environment. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 1803-1804.

Lauridsen, T.L., Jeppesen, E., Søndergaard, M., Lodge, D.M., 1997: Horizontal migration of zooplankton: predator-mediated use of macrophyte habitat. In: Jeppesen, E., Søndergaard, Ma, Søndergaard, Mo, Christoffersen, K. (Eds.), *The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes. - Ecological Studies Series 131.* Springer, New York, pp. 233-239.

Littell, R.D., Freund, R.J., Spector, P.C., 1991. *SAS System for Linear Models.* SAS Institute. Cary, North Carolina.

Lotufo, G.R., Fleeger, J.W., 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151, 91-102.

McKim, J.M., 1995. Early life stage toxicity tests. In: Rand, G. M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.* Taylor & Francis, pp. 975-1011.

Medina, M., Barata, C., Telfer, T., Baird, D.J., 2002. Age- and Sex-Related Variation i Sensitivity to the Pyrethroid Cypermethrin in the Marine Copepod *Arcartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 17-22.

Miljøstyrelsen, 1990. Cypermethrin: 21 day *Daphnia magna* life cycle study. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.

Miljøstyrelsen, 1994. Determination of the acute toxicity of bentazon to waterflea *Daphnia magna* Straus. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.

Miljøstyrelsen, 1994a. ICIA5504: Acute Toxicity of the Technical Material to First Instar *Daphnia magna*. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.

Miljøstyrelsen, 1994b. ICIA5504: Chronic Toxicity to *Daphnia magna*. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.

- Miljøstyrelsen, 1994c. Effect of BAS 351 45 H on *Daphnia magna* STRAUS in an Acute Toxicity Test. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.
- Miljøstyrelsen, 1995. ICIA5504: Comparative toxicity of the technical material in solution and a 500 g kg<sup>-1</sup> WG formulation to the freshwater copepod *Macrocyclus fuscus*. Registreringsdokumentation til Miljøstyrelsen.
- Miljøstyrelsen, 2001. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2000. Orientering fra Miljøstyrelsen. Miljø- og Energiministeriet.
- Mothershead, R.F., Hale, R.C., 1992. Influence of Ecdysis on the Accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Field Exposed Blue Crabs (*Callinectes Sapidus*). Mar. Environ. Res. 33, 145-156.
- Møhlenberg, F., Petersen, P., Gustavsson, K., Lauridsen, T., Friberg, N., 2001. Mesocosm experiments in the approval procedure for pesticides. Pesticide Research NO. 56. Miljøstyrelsen.
- Porter, K.G., Gerritsen, J., Occutt Jr., J.D., 1982. The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation and respiration by *Daphnia*. Limnol. Oceanogr. 27, 935-949.
- Probit Analysis, 2.3. 1990. National Swedish Environmental Protection Agency, The Data Section. Solna, Sweden.
- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S., 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. (Eds.), Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental fate and Risk Assessment. Taylor & Francis, pp. 3-67.
- Røen, U. 1995. Danmarks Fauna. Bd. 85: Krebsdyr V. Zoologisk Museum.
- Sattelle, D. B., Yamamoto, D., 1988. Molecular targets of pyrethroid insecticides. Advanc. Insect Physiol. 20, 147-213.
- Stephenson, R.R., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. Aquat. Toxicol. 2, 175-185.
- von Elert, E., Loose, C.J., 1996. Prædator induced diel vertical migration in *Daphnia*: Enrichment and preliminary chemical characterization of a kairomone exuded by fish. J. Chem. Ecol. 22, 885-895.
- Wendt-Rasch, L., Vought, L.B.M., Woin, P., 1998. Effects of fenvalerate on the net-spinning behavior of *Hydropsyche siltalai* (Döhler) (Trichoptera:Hydropsychidae). Hydrobiologia 382, 53-61.

Wendt-Rasch, L., Friberg-Jensen, U., Woin, P., Christoffersen, K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. *Aquat. Toxicol.*, 63: 373-389.

Wetzel, R.G. 1983. *Limnology*, 2nd ed. Saunders College Publishing, Philadelphia.

Wiberg-Larsen, P., 1980. Bestemmelsesnøgle til larver af de danske arter af familien Hydropsychidae (Trichoptera) med noter om arternes udbredelse og økologi. *Ent. Medd.* 47, 125-140.

Wiberg-Larsen, P., Adamsen, N.B., Knudsen, J., Larsen, F. G., 1991. Sprøjtegifte truer fynske vandløb. *Vand og Miljø* 7, 371-374.

Wissel, B., Benndorf, J., 1998. Contrasting effects of the invertebrate predator *Chaoborus obscuripes* and planktivorous fish on plankton communities of a long term biomanipulation experiment. *Arch. Hydrobiol.* 143, 129-146.

Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.

Århus Amt, 1999. Pesticider i vandløb, kilder og søer i Århus Amt. Århus Amt, Natur og Miljøkontoret, 46 s.

Århus Amt, 2002. Forekomst af pesticider i vandhuller i Århus Amt. Århus Amt, Natur og Miljøkontoret. 20s.

# 6 Bilag

## 6.1 Oversigt over udførte koncentration-respons pilotforsøg.

Pesticid	Testorganisme	Koncentrations gradient
Cypermethrin $\mu\text{g l}^{-1}$	<i>D. magna</i>	0; 0,12; 0,37; 1,11; 3,33; 10; 30
	<i>D. magna</i> (m. æg)	0; 1; 2; 4; 8; 16; 32
	<i>D. galeata</i> (F)	0; 0,01; 0,04; 0,16; 0,64; 2,56; 10
	<i>D. galeata</i> (L)	0; 0,01; 0,04; 0,16; 0,64; 2,56; 10
	<i>Diaphanosoma</i> sp.	0; 0,01; 0,04; 0,16; 0,64; 2,56; 10
	<i>C. sphaericus</i>	0; 0,050; 0,125; 0,310; 0,780; 1,950; 4,88
	<i>E. graciloides</i>	0; 0,01; 0,04; 0,16; 0,64; 2,56; 10
	<i>C. plumosus</i>	0; 0,04; 0,27; 1,6; 8
	<i>C. flavicans</i>	0; 0,008; 0,03; 0,125; 0,5; 2; 8
	<i>C. dipterum-gr.</i>	0; 0,006; 0,017; 0,045; 0,125; 0,345; 0,925; 2,5
	<i>H. angustipennis</i>	0; 0,005; 0,02; 0,08; 0,32; 1,28; 5,12
		0; 0,38; 0,61; 0,98; 1,56; 2,5; 4
		0; 0,001; 0,048; 0,240; 6
Azoxystrobin $\text{mg l}^{-1}$	<i>D. magna</i>	0; 0,063; 0,313; 1,563
		0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,2
	<i>D. magna</i> (m. æg)	0; 2,00; 3,00; 4,50; 6,75
	<i>D. galeata</i> (F)	0; 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1
	<i>D. galeata</i> (L)	0; 0,08; 0,12; 0,19; 0,29; 0,46; 0,72; 1,11
	<i>C. sphaericus</i>	0; 0,01; 0,04; 0,16; 0,64; 2,56
	<i>E. graciloides</i>	0; 0,001; 0,048; 0,240; 1,2; 6
		0; 0,003; 0,013; 0,063; 0,313; 1,563
	<i>C. plumosus</i>	0; 0,1; 0,4; 1,6; 6,4
	<i>C. flavicans</i>	0; 0,25; 0,52; 1,1
	0; 1; 2; 4	
	0; 0,01; 0,03; 0,09; 0,27; 0,81; 2,43	
	0; 0,07; 0,19; 0,51; 1,37; 3,7; 10	
Bentazon $\text{mg l}^{-1}$	<i>D. magna</i>	0; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150; 300; 600
	<i>E. graciloides</i>	0; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500

## 6.2 Oversigt over udførte reproduktion pilotforsøg

Testorganisme	Pesticidgradient
<i>Daphnia magna</i>	C: 0, 0,01, 5,0, 10,0
<i>D. magna</i>	C: 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0
<i>D. magna</i>	A: 0, 0,001, 0,013, 0,13
<i>Daphnia galeata</i>	A: 0, 0,002, 0,02, 0,2
<i>D. galeata</i>	A: 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08, 0,15
<i>D. galeata</i>	C: 0, 0,05, 0,1, 1,0
<i>Cyclops vicinus</i>	C: 0, 0,01, 0,1, 1,0, 5,0, 10,0
<i>C. vicinus</i>	A: 0, 0,01, 0,1, 1,0
<i>C. vicinus</i>	A: 0, 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,06, 0,1
<i>C. vicinus</i>	C: 0, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5
<i>Eudiaptomus graciloides</i> <sup>1</sup>	A: 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,06, 0,1
<i>E. graciloides</i> <sup>2</sup>	A: 0, 0,05, 0,1, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 20
<i>E. graciloides</i> <sup>3</sup>	A: 0, 0,5, 5
<i>E. graciloides</i> <sup>3,4</sup>	C: 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1

A = Azoxystrobin (mg/l), C = Cypermethrin (µg/l). \* Forsøg ikke anvendelige p.g.a. stort dødsfald blandt kontrolorganismer eller blandt organismer i tynde koncentrationer samtidig med organismer overlever i højere koncentrationer.

<sup>1</sup> hunner, hvor ægsække er pillet fra eksponeres, alle døde minus kontroller

<sup>2</sup> kasseret, da der ikke dannes nye ægsække hos kontrollerne

<sup>3</sup> hunner med ægsække eksponeres og observeres, indtil der dannes nauplier/eller dør

<sup>4</sup> hunnerne mister ægsækken – den forsvinder

### 6.3 Oversigt over udførte pilotforsøg til bestemmelse af svømmehastigheds-respons

En række indledende forsøg med *D. magna* fra hhv. laboratoriekulturer og indsamlet fra en naturlig population i Gammelmosen ved Galten (Århus Amt) blev gennemført for at fastlægge den optimale 1) forsøgsopstilling og -dyr, 2) den klonale og individuelle variation på de valgte forsøgsdyr samt 3) den potentielle respons i forhold til cypermethrin og azoxystrobin. De anvendte testkoncentrationer er valgt ud fra effektive niveauer opnået i reproduktionsforsøg (afsnit 2.5) og videoregistreringsforsøg (afsnit 2.6). Forholdene og resultaterne vedrørende de enkelte typer af test samt de opnåede resultater er kort gengivet i nedenstående tabel 6.3.1.

Tabel 6.3.1. Informationer over udførte pilotforsøg til bestemmelse af svømmehastighed med og uden eksponering for subletale koncentrationer af pesticiderne cypermethrin og azoxystrobin.

Testtype	Forsøgsdyr	Variationer	Resultater
Forsøgsopstilling	<i>D. magna</i> fra kultur <i>D. magna</i> fra en naturlig population	Kammerets dimensioner og placering <sup>1)</sup>	Plexiglasrørene fungerer godt som svømmekammer hvis anvendt i en vandret position
Forsøgsopstilling	<i>D. magna</i> fra kultur <i>D. magna</i> fra en naturlig population	Lyskildens styrke og placering <sup>2)</sup>	Koldtlyslampe med punktlýskilde placeret for enden af svømmekammeret fungerer optimalt hvis 2/3 af røret samtidig
Forsøgsdyr	<i>D. magna</i> fra kultur <i>D. pulex</i> fra kultur <i>D. pulicaria</i> fra kultur <i>D. magna</i> fra naturlig population	a) Evne til entydig adfærd b) Antal replikater <sup>3)</sup>	a) <i>D. magna</i> fra naturlig population udviser entydig retningsbestemt vandring b) 10 forsøgsdyr og 5 replikationer per forsøg giver en variationskoeff. på max 20%
Registreringsperiode	<i>D. magna</i> fra naturlig population	a) Intervaller på 0,5 min op til 10 min totalt b) Uden og med pesticid (cypermethrin)	Fra 0 til ca. 2,5 min ses en nettoakkumulering af forsøgsdyr i "lys-enden" og herefter en vis spredning
Cypermethrin	<i>D. magna</i> fra kultur <i>D. magna</i> fra naturlig population	0, 0,05 og 0,5 µg/l	Der opnås en detekterbar (begge konc.) og signifikant respons (0,5 µg/l)
Azoxystrobin	<i>D. magna</i> fra naturlig population	0, 1,0 mg/l	Der opnås en detekterbar og signifikant respons
Cypermethrin med samtidig fødetilførsel	<i>D. magna</i> fra naturlig population	0 og 0,1 µg/l	Svømmeaktivitet nedsættes i både kontrol og eksponeret forsøg

<sup>1)</sup> Som udgangspunkt anvendtes en tidligere benyttet opstilling bestående af Kajakrør (dvs. plexiglasrør med en indre diameter på 5,4 cm og en længde på 65 cm. Rørene var lukket i bunden vha. en gummiprop).

<sup>2)</sup> Der anvendes hhv. lysstofrør, alm. 60W pære og koldtlyslampe med punktlýs.

<sup>3)</sup> Der afprøves 5-10 i svømmekammeret og 3-12 replikationer af aktivitet inden for et forsøg.



#### 6.4 Oversigt over udførte pilotforsøg til bestemmelse af respons i forhold til en prædator

En række indledende forsøg med *D. magna* fra en naturlig population indsamlet i Gammelmosen ved Galten (Århus Amt) blev gennemført for at fastlægge den optimale forsøgsopstilling til undersøgelse af, hvorledes *D. magna*'s flugtrespons bliver påvirket under indflydelse af cypermethrin og azoxystrobin. I denne type forsøg er det nødvendigt at anvende en naturlig population af dafnier, idet dafnierne mister flugtresponset, når de gennem flere generationer har gået uden til stede-værelsen af en prædator. Forholdene og resultaterne vedrørende de enkelte typer af opstillinger samt de opnåede resultater er kort gengivet i nedenstående tabel 6.4.1.

De endelige forsøg blev ikke gennemført p.g.a. en kombination af isdække på søerne og den endelige deadline på projektet.

Tabel 6.4.1. Informationer over udførte pilotforsøg til bestemmelse af effekter af subletale koncentrationer af pesticiderne cypermethrin og azoxystrobin på flugtrespons i forhold til en prædator (fisk).

Testtype	Forsøgsdyr	Variationer	Resultater
Forsøgsopstilling	<i>D. magna</i> fra en naturlig population	Plexiglasrørs dimensioner, kammerets dimensioner, prædator og placering <sup>4)</sup>	Plexiglasrørene fungerer godt som svømmekammer, hvis anvendt i en vandret position. Fiskevand fungerer ikke tilstrækkelig effektivt på dafnierne. I fuldt sollys fungerede opstillingen, men ved delvis overskyet vejr var dafniernes svømmemønster påvirket af lysforskelle.
Forsøgsopstilling	<i>D. magna</i> fra en naturlig population	Placering, plexiglasrørs dimensioner, kammerets dimensioner, prædator <sup>5)</sup>	Plexiglasrørene fungerer godt som svømmekammer. Dafnierne reagerer meget svagt på det kemiske signal fra fiskene.
Forsøgsopstilling	<i>D. magna</i> fra naturlig population	Plexiglasrørs dimensioner, tilsætning af dafnier <sup>6)</sup>	Dafnierne reagerer lidt stærkere på fiskenes kemiske signal. Der er forskel mellem kontrolbehandlingen og fiskebehandlingen.
Registreringsperiode	<i>D. magna</i> fra naturlig population	Store rør: Intervaller fra 2 min. til 24 timer. Små rør (100 cm lange): Intervaller fra 10 sek. til 2 min.	Det tydeligste signal opstår indenfor de første 10 minutter. Efter 30 minutter sker en svækkelse af signalet, idet svømmemønsteret bliver mere diffust.

<sup>4)</sup> Som udgangspunkt anvendtes en tidligere benyttet udendørs opstilling bestående af plexiglasrør med en indre diameter på 8 cm og en længde på 250 cm. I hver ende var der pålimet et 2 liter kammer, hvori der kunne hældes fiskevand. Dafnierne kunne tilsættes i midten af røret gennem et hul.

<sup>5)</sup> Opstillingen blev flyttet indendøre i klimakammer. De store plexiglasrør (8 \* 250 cm) blev udskiftet med mindre rør med en indre diameter på 2,6 cm og en længde på 200 cm. I hver ende var der pålimet et 0,5 liter kammer, hvori der kunne tilsættes en fisk (aborre). Dafnierne kunne gennem et hul tilsættes i midten af røret.

<sup>6)</sup> Førnævnte rør blev afkortet til 100 cm stadig med en 0,5 l beholder i den ene ende. Dafnierne kunne gennem et hul i enden med beholderen tilsættes røret. Der blev gennemført 11 replikater.