



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

# Betydningen af gentagne pulse af lambda-cyhalothrin for makroinvertebrat- faunaen i vandløb (PESTPULS)

Bekæmpelsesmiddelforskning nr.  
145, 2013

**Titel:**

Betydningen af gentagne pulse af lambda-cyhalothrin for makroinvertebratfaunaen i vandløb (PESTPULS)

**Redaktion:**

Peter Wiberg-Larsen, Ulrik Nørum & Nikolai Friberg

**Udgiver:**

Miljøstyrelsen  
Strandgade 29  
1401 København K  
www.mst.dk

**År:**

2013

**ISBN nr.**

978-87-92903-36-5

**Ansvarsfraskrivelse:**

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.

Må citeres med kildeangivelse.

# Indhold

<b>FORORD</b>	<b>5</b>
<b>SAMMENFATNING</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>11</b>
<b>1 INDLEDNING</b>	<b>15</b>
1.1 BAGGRUND OG NUVÆRENDE VIDENSGRUNDLAG	15
1.2 FORMÅL	17
1.3 PROJEKTETS OVERORDNEDE STRUKTUR	18
<b>2 METODER</b>	<b>19</b>
2.1 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB	19
2.1.1 <i>Etablering af forsøgsrender</i>	19
2.1.2 <i>Eksponering med pyrethroidet lambda-cyhalothrin</i>	20
2.1.3 <i>Udtagning af prøver</i>	21
2.1.4 <i>Andre målinger</i>	24
2.2 EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUNSTIGE VANDLØB	24
2.2.1 <i>Etablering af forsøgsrender</i>	25
2.2.2 <i>Eksponering med pyrethroidet lambda-cyhalothrin</i>	27
2.2.3 <i>Udtagning af prøver</i>	28
2.2.4 <i>Andre målinger</i>	29
2.3 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ OVERLEVELSE, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS <i>GAMMARUS PULEX</i> I LABORATORIEFORSØG	30
2.3.1 <i>Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos Gammarus pulex</i>	30
2.3.2 <i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af Gammarus pulex</i>	35
2.3.3 <i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af Gammarus pulex</i>	37
2.4 STATISTISKE METODER	38
2.4.1 <i>Effekter af gentagne pulseksponeringer med pyrethroid på smådyr i et naturligt vandløb</i>	38
2.4.2 <i>Effekter på biodiversitet og funktion hos smådyrssamfund i kunstige vandløb</i>	40
2.4.3 <i>Effekter på overlevelse, reproduktion og stofomsætning hos Gammarus pulex i laboratoriet</i>	40
2.5 KVANTIFICERING AF LAMBDA-CYHALOTHRIN	41
2.5.1 <i>Forbehandling af vandprøver</i>	41
2.5.2 <i>Fastfaseekstraktion</i>	41
2.5.3 <i>LC-MS analyse</i>	41
<b>3 RESULTATER</b>	<b>43</b>
3.1 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB	43
3.1.1 <i>Makroinvertebrater</i>	44

3.1.2	<i>Stofomsætning</i>	52
3.2	EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUNSTIGE VANDLØB	53
3.2.1	<i>Makroinvertebrater</i>	54
3.2.2	<i>Stofomsætning</i>	61
3.3	EFFEKTER PÅ OVERLEVELSE, VÆKST, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS <i>GAMMARUS PULEX</i> I LABORATORIET	62
3.3.1	<i>Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos Gammarus pulex</i>	62
3.3.2	<i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af Gammarus pulex</i>	65
3.3.3	<i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af Gammarus pulex</i>	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
4.1	EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB	71
4.2	EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUNSTIGE VANDLØB	75
4.3	EFFEKTER PÅ OVERLEVELSE, VÆKST, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS <i>GAMMARUS PULEX</i> UNDER LABORATORIEFORHOLD	78
4.3.1	<i>Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos Gammarus pulex</i>	78
4.3.2	<i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af Gammarus pulex</i>	79
4.3.3	<i>Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af Gammarus pulex</i>	81
4.4	SAMMENFATTENDE DISKUSSION	81
4.4.1	<i>Scenarier for forekomst af 1-flere pyrethroidpulse i vandløb</i>	81
4.4.2	<i>Betydning af enkelte og gentagne pyrethroidpulse</i>	84
<b>5</b>	<b>KONKLUSIONER</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>PERSPEKTIVERING</b>	<b>91</b>
	<b>REFERENCER</b>	<b>95</b>

# Forord

Denne rapport er resultatet af laboratorie-, mesokosmos og feltundersøgelser, som i perioden oktober 2009 – maj 2011 er blevet gennemført af medarbejdere ved Institut for Bioscience (tidligere Danmarks Miljøundersøgelser, Afd. for Ferskvandsøkologi), Aarhus Universitet. Projektet er blevet finansieret via midler fra Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning (MST j. nr. 667-00059).

Projektledelsen er gennem hele projektet blev varetaget af Peter Wiberg-Larsen. Sent i projektføreløbet (1. august 2011) fratrådte Ulrik Nørum sin stilling ved Institut for Bioscience, men har efterfølgende bidraget til færdiggørelse af rapporten. Derudover er Nikolai Friberg indtrådt i projektets sidste fase med henblik på at styrke det afsluttende arbejde med rapporten.

Projektet har haft deltagelse af en lang række personer. Det videnskabelige personale har omfattet:

Peter Wiberg-Larsen, Ulrik Nørum, Nikolai Friberg og Frank Landkildehus.

Derudover har følgende medarbejdere ved Bioscience, AU, og Syddansk Universitet ydet teknisk bistand ved projektets gennemførelse:

Bente Frost Holbech (SDU): kvantificering af lambda-cyhalothrin i vandprøver

Johnny Nielsen (Bioscience): feltforsøg, laboratorieforsøg, bearbejdelse af makroinvertebratprøver m.v.

Tommy Silberg (Bioscience): feltarbejde, bearbejdning af makroinvertebratprøver

Lissa Skov Hansen (Bioscience): bearbejdning af makroinvertebratprøver

Kirsten Landkildehus Thomsen (Bioscience): bearbejdning af makroinvertebratprøver

Dorthe Nedergaard (Bioscience): feltforsøg, klorofyl-a analyser

Erling Pedersen (Bioscience): opbygning/opsætning af strømrender og anden teknisk bistand.

Naturstyrelsen Fyn (v/Hans Brendstrup) har velvilligt stillet data for vandføring fra Stavis Å til vores rådighed.

Projektet er under sit forløb blevet understøttet af en følgegruppe med følgende sammensætning: Jørn Kirkegaard (Miljøstyrelsen, fmd.), Anne Louise Gimsing (MST), Claus Hansen (MST, udtrådt 2011), Rasmus Søgaard (MST), Hans Jørgen Albrechtsen (Danmarks Tekniske Universitet, udtrådt ultimo 2011), Poul Løgstrup Bjerg (Danmarks Tekniske Universitet), Walter Brüsich (GEUS), Dean Jacobsen (Københavns Universitet), Peter R. Jørgensen (PJ-Bluetech), Niels Lindemark (Dansk Planteværn), Hans Roust Thyssen (Videncenter for Landbrug) og Jørgen Jakobsen (tidl. forskningschef DJF, udtrådt ultimo 2011). Walter Brüsich, Dean Jacobsen, Jørgen Jakobsen, Bjarne Strobel og Rasmus Søgaard har kommenteret udkast til rapporten og derved bidraget til forbedringer af denne.



# Sammenfatning

## BAGGRUND OG FORMÅL

Projektets formål var at undersøge betydningen af gentagne pulse med pyrethroider, som er de mest anvendte insekticider i Danmark, på makroinvertebratfaunaen (dvs. smådyr) i vandløb. Den overordnede hypotese var, at en forøget hyppighed af pulse med overvejende sublethale (ikke-dødelige) koncentrationer af pyrethroid medfører en reduktion i biodiversitet, stofomsætning, overlevelse og reproduktion hos disse. Hensigten var derved at perspektivere, hvilken betydning ændringer i behandlingshyppighed med fx pyrethroider kan tænkes at have på vandløbsøkosystemers biologiske struktur og funktion, idet man kan forestille sig en sammenhæng mellem behandlingshyppigheden og antallet af pulse, som et givet vandløb udsættes for.

Der blev fokuseret på netop makroinvertebrater, fordi disse indtager en central rolle i vandløbs stofomsætning (nedbrydning af udefra kommende dødt organisk stof og græsning på fx alger), er gode indikatorer for miljøkvalitet (konkret afspejlet via Dansk vandløbs Fauna Indeks), og i særlig grad er påvirkelige af pyrethroider, der er designet til at slå skadevoldende insekter ihjel.

## DE UDFØRTE UNDERSØGELSER

Projektet omfattede tre typer af studier, som samlet kunne anvendes til at teste den opstillede hypotese. Der blev herved anvendt forsøgsopstillinger af forskellig størrelse (skala) og kompleksitet.

To af studierne omfattede eksponering af hele samfund af makroinvertebrater med 0, 1, 2 eller 4 pulse af pyrethroidet lambda-cyhalothrin i en miljørealistisk koncentration på  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ . Pulsene varede hver især 90 minutter og blev ved gentagelse udført med 2 dages mellemrum. Det korte tidsinterval mellem pulserne blev valgt for at skabe en form for "worst case scenarie". Det ene studie blev udført i et naturligt ureguleret og uforurenet vandløb, Stavis Å, hvor 4 (ikke replikerede) 25 m lange forsøgsrender blev eksponeret for hver sin behandling. I det andet studie udførtes lignende forsøg i 6 m lange og 0,3 m brede strømrender, forsynet med naturligt forekommende bundmateriale, og forsynet passende gennemstrømning af vand indpumpet fra den nærliggende Lemming Å, og efterfølgende "podet" med makroinvertebrater fra dette vandløb. Der blev anvendt i alt 12 render, således at der var triplikater af hver behandling. Under og umiddelbart efter eksponeringerne i såvel forsøgsrenderne i Stavis Å som strømrenderne i Lemming blev der målt, hvilke af makroinvertebraterne og hvor mange af disse, som med strømmen transporteredes ud af forsøgsrenderne. Denne såkaldte "drift" var – sammen med dødelighed – en vigtig årsag til efterfølgende ændringer i sammensætningen af makroinvertebratsamfundene. Driften ud af renderne blev mellem og efter eksponeringerne i et vist omfang kompenseret via drift af individer ind i renderne fra den opstrøms beliggende strækning (Stavis Å) eller via det indpumpe vand (strømrenderne). Denne drift blev også søgt kvantificeret. Ændringerne i artssammensætningen i renderne blev undersøgt med sammenligning af kvantitative bundprøver indsamlet umiddelbart før første eksponering og 30 dage herefter. For enkelte insektarter blev specifikt undersøgt graden af succesfuld forvandling fra nymfe-/larvestadium til voksent individ. Derudover blev omsætningen (nedbrydningen) af udlagte elleblade undersøgt ved bereg-

ning af vægttab over samme periode, ligesom sammensætning og mængde af de primære nedbrydere i form af makroinvertebrater ligeledes blev målt hhv. umiddelbart før og 30 dage efter første eksponering. Endelig blev biomassen af bundlevende alger undersøgt umiddelbart før og 30 dage efter første eksponering med henblik på at belyse, om eksponeringerne havde indflydelse på makroinvertebraternes græsning på algerne. Såvel omsætning af blade som græsning på bundlevende alger er vigtige økologiske processer i vandløb, især i de mindste af disse.

Det tredje studie blev alene udført med en enkelt art, ferskvandstangloppen *Gammarus pulex*, som ikke blot er en af de mest udbredte og talrigt forekommende arter i danske vandløb, men som også regnes som en af de mest følsomme over for pyrethroider. Forsøgene blev alene udført i beluftede beholdere under laboratorieforhold, og omfattede undersøgelse af dødelighed, trivsel og reproduktion i form af pardannelse og ungeproduktion. I en række indledende forsøg blev over 38 dage undersøgt dødelighed og dyrenes omsætning af elleblade efter eksponering med 0, 1, 2 eller 4 pulse ved flere koncentrationer, forskellig pulslængde og forskellig varighed af perioden mellem de enkelte pulse (ikke som ved forsøgene i Stavis og strømrenderne ved blot én koncentration, én pulslængde og én periodelængde mellem pulsene). Der blev herved anvendt såkaldte ækvivalenteksponeringer, hvor den samme mængde pyrethroid blev tilført med varierende koncentration, varierende pulsvarighed og varierende antal pulse (hvor fx 2 pulse med  $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$  i 90 minutter svarede til 4 pulse med  $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$  i 180 minutter). I forsøgene med reproduktion blev ligeledes anvendt ækvivalenteksponeringer, men i færre kombinationer, og nogle af forsøgene forløb op til 44 dage.

#### RESULTATER OG HOVEDKONKLUSIONER

Forsøgene blev generelt gennemført med succes, specielt taget i betragtning at forsøg med hele samfund af organismer er væsentlig vanskeligere at kontrollere end ”simplere” laboratorieforsøg med en enkelt art. Specielt var forsøgene i de kunstige vandløb vellykkede. I fuldskalaforsøget i Stavis Å blev vandløbet og forsøgsrenderne udsat for en helt usædvanlig afstrømningshændelse midtvejs i perioden efter eksponeringen. Alligevel var det muligt også her at påvise markante effekter af de forudgående eksponeringer med pyrethroid. Modsat optrådte der i enkelte af laboratorieforsøgene en uventet høj dødelighed hos forsøgsdyrene i kontrolforsøgene (hvor der ikke blev eksponeret med pyrethroid), hvilket vanskeliggjorde påvisning af statistisk signifikante effekter.

Ved forsøgene i det naturlige vandløb og de kunstige vandløb medførte enkelte såvel som gentagne pulse med en miljørealistisk koncentration ( $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ ) af opløst pyrethroid markante effekter i de eksponerede samfund af makroinvertebrater i form af øget drift (dvs. transport med strømmen) hos flertallet af arter. Desuden medførte de enkeltstående pulse ændringer i samfundene (primært i den samlede artssammensætning) i de kunstige vandløb inden for den undersøgte 1 måned lange periode.

Ligeledes udviste *Gammarus pulex* i laboratorieforsøgene forøget dødelighed og forstyrret reproduktion, herunder reduktion i antal af producerede unger efter (op til 1½ måned) efter at forsøgsdyrene blev eksponeret med enkeltstående og gentagne pulse i koncentrationer på  $0,05$ - $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ .

Effekterne på samfundene af makroinvertebrater i det naturlige og de kunstige vandløb – inden for den undersøgte periode på 1 måned – blev markant forstærket af gentagne (2 eller 4 pulse) sammenlignet med enkeltstående pulse.



Effekterne omfattede mere end halvdelen af en række undersøgte parametre ("endpoints"). Der var tale om ændret artssammensætning på selve vandløbsbunden, ændret artssammensætning i udlagte bladpakker (i de kunstige render), reduktion i antallet af visse arter på bund og i bladpakker (primært i de kunstige render), reduceret forvandling fra nymfer/larver til voksne insekter hos to undersøgte arter, samt reduceret omsætning af udlagte bladpakker (i de kunstige render).

Derimod lykkedes det hverken i Stavis Å eller de kunstige vandløb at påvise effekter i form af nedsat græsning af bundlevende alger hos makroinvertebraterne. Dette er dog ikke ensbetydende med, at der ikke kan forekomme en sådan effekt, men snarere at forsøgsomstændighederne ikke var optimale til belysning af denne.

Ændringerne i artssammensætning og stofomsætning skyldtes primært tabet af individer som følge af drift under og umiddelbart efter eksponeringerne - samt manglende kompensering via efterfølgende rekolonisering. Derudover formodes dødelighed at have spillet en vis rolle.

Selvom gentagne pulse med kort interval imellem således havde større negativ effekt end bare én puls, sandsynliggjorde laboratorieforsøgene med *Gammarus pulex*, at én puls med relativt høj koncentration over kort tid har større negativ effekt i form af dødelighed, end hvis den samme såkaldte "ækvivalenteksponering" fordeltes over flere pulse, lavere koncentrationer og længere pulsvarighed. Desuden blev forsøgsdyrene tilsyneladende ramt hårdest, når der kun var kort tid mellem de enkelte pulse, således at dyrene ikke kunne nå at restituere sig.

Samlet set understøtter resultaterne den opstillede hypotese om, at "en forøget hyppighed af pulse med overvejende sublethale (ikke-dødelige) pyrethroid-koncentrationer medfører en øget reduktion i biodiversitet, stofomsætning, overlevelse og reproduktion hos makroinvertebrater i danske vandløb".

#### RESULTATERNE I ET STØRRE PERSPEKTIV

Generelt er det vanskeligt fuldstændig realistisk at efterligne de forhold, som organismerne er udsat for i vandløb, som måtte blive påvirket af pyrethroider én eller flere gange i løbet af en givet periode. Det er imidlertid meget tænkeligt, at de fundne effekter formodentlig vil være større i "virkeligheden", fordi der her vil være tale om påvirkning af større områder, som det vil tage længere tid at rekolonisere med individer hhv. opstrøms som nedstrøms fra. Effekter vil derfor kunne forventes at blive mere tydelige og ses længere end den måned, som var tidshorizonten ved vores forsøg. På den anden side blev forsøgene udført i naturlige/kunstige vandløb, som ikke (eller kun i minimal grad) var påvirkede af andre menneskeskabte påvirkninger (stressorer). Ingen af miljøerne var således påvirket af spildevand og havde gode og varierede fysiske forhold. Det betyder, at de fundne effekter må formodes at have været mere tydelige, end hvis der også havde været tale om vandløbsmiljøer med dårlige iltforhold og /eller ensartede fysiske forhold (med fx sandbund og slamaflejringer). I et allerede stresset vandløbsmiljø ville biodiversiteten og forekomsten af særligt pesticidfølsomme arter formodentlig være mindre end i et "upåvirket" miljø, hvilket ville have vanskeliggjort påvisningen og tolkningen af pesticideffekterne. Dette er vigtigt at holde sig for øje, fordi en meget betydelig del af danske vandløb netop er påvirket af miljøfaktorer som organisk spildevand og dårlige fysiske forhold.



# Summary and conclusions

## BACKGROUND AND AIM

The purpose of the project was to study the effects of repeated pulse exposure with pyrethroids on stream macroinvertebrate communities, the pyrethroids being the mostly used insecticides in Denmark. The overall hypothesis was that increased frequency of pulses at sublethal concentrations would reduce biodiversity, survival, food procession, and reproduction. The study was meant to put the importance of the frequency of pesticide treatments of cropped fields, an indicator of pesticide impact used in Danish environmental administration, into a stream protection perspective.

The study focussed on macroinvertebrates as these play an essential role in the biological structure of streams, are excellent indicators of environmental quality, and are especially sensitive to pyrethroids which are designed to kill pest insects.

The project included three studies designed to test the hypothesis, with each study representing a different scale and complexity.

## THE STUDY

In two of the studies, we exposed macroinvertebrate communities to 0, 1, 2 and 4 pulses of the pyrethroid lambda-cyhalothrin at an environmentally realistic concentration of  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ . The duration of the pulses was 90 minutes and the time between pulses 2 days. One study was carried out in a natural stream, Stavis Aa, exposing four 25 m long and 0.6 m wide parallel unreplicated reaches to each of the treatments. Another study using the same exposure set-up was carried out in twelve artificial six meter long and 0.3 m wide stream channels, each supplied by natural bottom substrate and in-pumped water ( $1.9\text{-}3.9 \text{ L s}^{-1}$ ) from the nearby stream, Lemming Aa. The channels, triplicated for each of the four treatments, were stocked with macroinvertebrate communities sampled by standard kick sampling in Lemming Aa. During and immediately after the exposures of the experimental channels in Stavis Aa and Lemming, the drift of macroinvertebrates out of the channels was measured. This loss, however, was compensated by natural drift from upstream (for the artificial channels the drift was due to the water pumped in), and this in-drift was also estimated. In both studies, changes in macroinvertebrate density were studied by comparing Surber-samples from the day before and 29 days after the first exposure. For two insect species, we also estimated emergence success. In addition, macroinvertebrate density and breakdown (weight loss) of alder leaves (placed in net bags) and biomass (as chlorophyll a) of epilithic algae were studied over the 30 day period. Both decomposition of allochthonous leaf material and algal grazing are important processes in small Danish streams.

The third study was carried out under laboratory conditions using the amphipod *Gammarus pulex* as the only test organism, this being the most widespread and abundant macroinvertebrate in Danish streams as well as being known to be highly sensitive to pyrethroids. The experiments were performed in aerated tanks and included endpoints like mortality, procession of leaf material, and mating behaviour and production of juveniles. In preliminary experiments

lasting 38 days, mortality and decomposition of alder leaves were studied among adults exposed to 0, 1, 2 and 4 pulses at different concentrations, pulse length, duration of the pulses, and time between pulses. We used so-called equivalent exposures, where the same dose of lambda-cyhalothrin was given varying number of pulses, concentration, and duration of the pulses (e.g. 2 pulses with  $0.2 \mu\text{L}^{-1}$  for 90 min equalled 4 pulses with  $0.05 \mu\text{L}^{-1}$  for 180 min). We also used equivalent exposure in experiments with reproduction, but in fewer combinations and in some cases for periods up to 44 days.

#### RESULTS AND MAIN CONCLUSIONS

The experiments were generally carried out with great success in Stavis Aa and the artificial streams, considering that studies of such complex communities are more difficult to control than simple single-species laboratory studies. Thus, despite an unexpected flood in Stavis Aa that occurred midway during the experiment and that had the potential to mask any effects of pyrethroid exposure, it was possible to show such effects. On the contrary, we experienced an unexpectedly high mortality among un-exposed *G. pulex* in some of the the laboratory experiments, making it difficult to detect statistically significant effects of pyrethroid exposures.

In both Stavis Aa and Lemming all pyrethroid exposures induced markedly increased drift out of the experimental channels for most macroinvertebrate species. Furthermore, single pulses induced changes in species composition in the artificial streams detectable after 30 days. Likewise in *G. pulex*, exposure with single pulses of  $0.05\text{-}0.2 \mu\text{gL}^{-1}$  increased mortality and disrupted pair-formation among adults, and reduced the number of produced juveniles.

The effects on the macroinvertebrate communities were markedly increased by repeated pulses. The effects included more than half of the studied end-points, including altered general species composition on the stream bottom as well as in the leaf packs (artificial channels only), reduction in the density of some species on stream bottom and in leaf packs, reduced emergence in two specific insect species, and reduced breakdown of leaf packs (in artificial channels). However, it was not possible to detect any effects on epilithic algal biomass, e.g. reduced macroinvertebrate grazing. This was primarily caused by the experimental conditions that influenced the algal growth (flood, natural changes in light regime, delayed colonisation of algae prior to exposures) and does not mean that effects of pyrethroid exposure on grazing may not occur in real life.

The changes in species composition and reduction in leaf litter breakdown may primarily depend on loss of individuals due to drift under and immediately after the exposures and to insufficient recolonization. In addition, mortality may no doubt have played a secondary role.

Despite the fact that repeated pulses with the same pyrethroid concentration had more severe effects on the macroinvertebrate communities studied than single pulses, the laboratory experiments with *G. pulex* revealed that one pulse with relatively high pyrethroid concentration over a short time had a larger negative effect than if the same equivalent dose was distributed over more pulses, lower concentrations, and over longer duration of exposure. Furthermore, the experimental animals apparently were affected the most if the time between exposures was so short that they were unable to recover.

In summary, the hypothesis that “an increased frequency of pulse exposure with sublethal concentrations of pyrethroids leads to increased reduction in biodiversity, survival, processing of organic matter, and reproduction among stream macroinvertebrates in Danish streams” could not be rejected.

#### PERSPECTIVES

However by using experiments as in the present study, it is difficult realistically to copy the conditions that macroinvertebrates generally face in streams affected by single or repeated pulses within a given period. Thus, it is likely that the effects recognised in the present study may be more severe in real life where larger areas than in our experimental channels are affected, and that it therefore may take longer to recolonize from upstream and downstream unaffected reaches. Such effects are therefore expected to be more clear and visible for a longer period than just one month. On the other hand, we studied species-rich communities apparently unaffected by other commonly occurring anthropogenic stressors like wastewater and physical impoverishment. This means that the effects found may have been more distinct than would have been the case in the majority of Danish streams. Here, the macroinvertebrate communities are much reduced and dominated by generally stress tolerant species, making it more difficult to detect and interpret possible effects of pyrethroids.



# 1 Indledning

## 1.1 BAGGRUND OG NUVÆRENDE VIDENSRUNDLAG

Pesticider anvendes i betydeligt omfang til at forhindre og begrænse tab på afgrøder i landbrug og skovbrug. Der anvendes således herbicider mod uønsket plantevækst (ukrudt), der konkurrerer med afgrøderne, fungicider mod svampesygdomme, og insekticider mod en række skadevoldende insekter. De nævnte stoffer gennemgår en godkendelse, før de bliver tilladt til brug, og der er fastsat specifikke regler for deres anvendelse.

Trods dette fører brugen af pesticider på dyrkede arealer til, at en del af disse stoffer utilsigtet havner i ferskvandsøkosystemer som vandløb og søer (fx Mathiessen et al. 1995; Felding et al. 1997; Schulz & Liess 1999a, b). Der er i Danmark påvist mindst 44 forskellige pesticider i vandløb (Bøgestrand et al., 2003). Nogle vandløb – især i det østlige Danmark – er i særlig grad belastet (Bøgestrand et al., 2007). De højeste koncentrationer findes typisk i forbindelse med større nedbørshændelser og forekommer som pulse (Styczen et al., 2003). Stofpulsene kan dog også skyldes afstrømning fra vaskepladser eller vinddrift under sprøjtning. Effekterne af disse pesticider på organismerne i vandområderne er trods en betydelig mængde ny viden stadig langt fra klarlagt.

Da de anvendte pesticider ikke kun rammer skadevoldende organismer, men også den øvrige flora og fauna, fx i vandløb og søer, har det været Regeringens mål at mindske dette problem ved at nedsætte pesticid-forbruget, bl.a. ved at reducere behandlingshyppigheden fra 2,04 i 2002 til 1,7 i 2009. Dertil kommer ny initiativer i forbindelse med ”Grøn Vækst” aftalen mellem Regeringen og Dansk Folkeparti fra sommeren 2009. Den seneste opgørelse viser imidlertid, at behandlingshyppigheden for samtlige kategorier af pesticider har været 2,51-3,19 i perioden 2006-2010 (Miljøstyrelsen 2010, 2011). For insekticiderne alene har behandlingshyppigheden været 0,30-0,63 i samme periode.

Der er stort set ingen viden om, i hvilken grad behandlingshyppigheden vil påvirke ferskvandsorganismene. Der findes ganske vist forsøg fra naturlige nordamerikanske vandløb med gentagne sprøjtninger med insekticider (Wallace et al. 1991; Whiles & Wallace 1992), men de anvendte koncentrationer har været urealistisk høje, idet formålet har været at eliminere smådyrsfaunaen fuldstændig for derefter at følge rekoloniseringen i detaljer. Der er tilsyneladende ikke foretaget undersøgelser af effekten af gentagne behandlinger med subletale koncentrationer på smådyrene, endsize gjort forsøg på at klarlægge sammenhængen mellem behandlingshyppighed på dyrkede marker og effekter på smådyr (eller andre organismer) i vandløb. Fuldskalaundersøgelser af effekten af varierende behandlingshyppighed er stort set umulige at udføre i praksis. En mulighed kunne være at analysere ændringer i fx artssammensætning af smådyr på vandløbsstationer inden for et givet område gennem en årrække, hvor behandlingshyppigheden (dokumenteret via fx oplysninger fra landmændene inden for området) har varieret. Det forudsætter først og fremmest, at der foreligger en egentlig (og lang) tidsserie fra sådanne stationer, at forskelle i behandlingshyppighed kan dokumenteres, og at variationen i

sidstnævnte er tilpas stor. Dernæst må smådyrsfaunaen ikke være påvirket af andre forhold, som varierer fra år til år. For danske vandløb findes stort set ingen data, som opfylder disse krav. En alternativ fremgangsmåde er - under kontrollerede forhold - at udsætte udvalgte, naturlige vandløbsstrækninger, kunstige vandløb eller testsystemer i laboratoriet for et varierende antal kortvarige pulse (om muligt med forskellige koncentrationer). Antallet af pulse kan herved betragtes som en "erstatningsparameter" for behandlingshyppighed, fordi chancen for forekomst af pulse i vandløb må formodes at øges med stigende behandlingshyppighed.

For de fleste pesticider gælder, at de højeste koncentrationer, som er fundet i danske ferske vandområder, ikke kan forventes at være akut dødbringende for organismerne. Det gælder således generelt for herbicider og visse fungicider. Til gengæld har ny dansk forskning vist, at den mikrobielle nedbrydning af løvfældede blade blev klart reduceret i vandløb, der var påvirket af især svampemidler, og at effekterne blev yderligere forstærkede, hvis de fysiske forhold var forarmede, som det er tilfældet i kanaliserede og hårdt vedligeholdte vandløb (Rasmussen et al. 2012a). Dette giver umiddelbart god mening, fordi den primære gruppe af mikrobielle nedbrydere er mikrosvampe, og fordi disse optager ilt og næringsstoffer fra vandfasen, og derfor begunstiges, når iltforholdene er optimale. Optimale iltforhold forekommer i naturligt slyngede vandløb med stedvis hurtig strøm og dermed god tilførsel af ilt fra luften. Den nedsatte mikrobielle omsætningshastighed kunne desuden i laboratoriet sammenkædes med en ernæringsmæssig forringelse af bladene (lavere indhold af især kvælstof), hvilket kan skyldes en mindre mængde mikrosvampe på bladene (svampene indeholder væsentlig mere kvælstof end bladene selv) (Rasmussen et al. 2012b).

Udenlandske studier har imidlertid vist, at pulse af visse insekticider, især pyrethroiderne, ved almindelig landbrugsdrift kan føre til effekter på populations- og økosystemniveau i vandløb (Schulz & Liess 1999b). Dette er ikke overraskende, fordi pyrethroiderne er særligt designet til at slå skadevoldende insekter ihjel. Mekanismen bag virkningen er, at stofferne dels let trænger igennem insekternes skelet, dels holder nervecellernes natriumkanaler åbne, således at nervesignalerne ikke deaktiveres. Herved paralyseres de forgiftede dyr og dør efter nogen tid. Pyrethroiderne påvirker ikke blot insekter, men også de nært beslægtede krebsdyr og andre arthropoder. En af de afledte effekter på vandløbsinsekter og krebsdyr, som observeres i forbindelse med kortvarige pesticidpulse i vandløb, er, at dyrene føres med strømmen og eventuelt helt forsvinder fra den belastede strækning (Schulz & Liess 1999b). Dette fænomen, som kaldes for drift, forekommer også under naturlige forhold, men forøges markant under indvirkning af pesticider, fordi dyrenes adfærd ændres (dvs. bliver mere eller mindre aktive). Sådanne sublethale effekter undersøges normalt ikke med de traditionelle metoder til vurdering af pesticiders toksicitet i akvatiske systemer, da disse primært bygger på studier af dødelighed hos udvalgte organismer, som under laboratorieforhold udsættes for konstante eksponeringskoncentrationer i et givet tidsrum. Det er også karakteristisk for disse laboratorietests, at eksponeringens varighed er længere end den korte tid, som pulsene i vandløbene strækker sig over.

Effekterne er naturligvis afhængige af de koncentrationer, som organismerne udsættes for. Pulse med pyrethroidet lambda-cyhalothrin (som er repræsentativt for gruppen af pyrethroider (Nørum et al. 2006)) i koncentrationer af størrelsesordenen  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  vil slå størstedelen af smådyrene (primært insekter og krebsdyr) ihjel, og omsætningen af organisk stof vil efterfølgende være væ-



sentligt nedsat (Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Pulse med koncentrationer i størrelsesordenen  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  vil medføre øget dødelighed hos visse insekter og krebsdyr, ligesom de overlevende individer vil være mindre aktive og deres omsætning af organisk stof efterfølgende nedsat. Koncentrationer i størrelsesordenen af  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  vil desuden forurene smådyrenes levesteder og fødeemner i en sådan grad, at det bidrager til, at disse bliver mindre attraktive for smådyrene. Dette vil medvirke til at bremse stofomsætningen og forsinke genindvandringen af dyr til den berørte vandløbsstrækning (Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

Andre pesticidforskningsprojekter, bl.a. finansieret af Miljøstyrelsen, har vist, hvorledes smådyr fra både vandløb og søer/vandhuller påvirkes ved kortvarige, ikke-dødelige pyrethroidpulse. Således øges driften hos *Gammarus pulex* allerede ved ca.  $0,0002 \mu\text{g}$  esfenvalerat  $\text{L}^{-1}$  (Møhlenberg et al. 2004) og ved  $0,001 \mu\text{g}$  lambda-cyhalothrin  $\text{L}^{-1}$  (Lauridsen & Friberg, 2005). Heckmann & Friberg (2005) fandt ligeledes, at en række vandløbsmakroinvertebrater øgede deres drift signifikant ved lambda-cyhalothrin-koncentrationer fra  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  og opefter i mesokosmos (strømrrender) placeret i et vandløb. Derudover er det vist, at *G. pulex*'s parringsadfærd hæmmes ved koncentrationer af lambda-cyhalothrin ( $\text{EC}_{50}$ ) på  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Heckmann et al. 2005). Undersøgelser fra Tyskland tyder endvidere på, at forvandlingen fra larver over pupper til voksne dyr hos visse vandinsekter også påvirkes ved sådanne lave koncentrationer af pyrethroider (Schulz 1997).

Til sammenligning med de fundne effektkoncentrationer er der i vandløb i Århus Amt fundet op til  $0,66 \mu\text{g}$  i fynske vandløb op til  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  af pyrethroidet esfenvalerat (Fyns Amt 1997; Wiggers 1999), mens der er målt op til  $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$  af fenvalerat i tyske vandløb (Liess et al. 1999). Samtidig er pyrethroiderne den vigtigste gruppe af insekticider i Danmark, idet 91% af de i 2010 insekticidbehandlede arealer blev sprøjtet med netop denne stofgruppe (Miljøstyrelsen, 2011). Der er derfor grundlag for at forvente, at pyrethroider i betydeligt omfang, og på en lang række områder, påvirker smådyrene i danske vandløb.

## 1.2 FORMÅL

Det foreliggende projekts formål er at perspektivere, hvilken betydning ændringer i behandlingshyppighed med fx pyrethroider har på vandløbsøkosystemers biologiske struktur og funktion. Det er som tidligere nævnt vanskeligt i praksis direkte at måle effekten af ændringer i behandlingshyppighed på smådyrsfaunaen i vore vandløb. Det skyldes bl.a., at det ikke er behandlingshyppigheden som sådan, men derimod antallet af enkelthændelser i form af ”skadelige udledninger”, som kan påvirke økosystemerne. Imidlertid må antallet af enkelthændelser formodes at øges med stigende behandlingshyppighed, og det er førstnævntes betydning for vandløbenes makroinvertebrater (smådyr), som er målet for projektet. Smådyr har en central rolle i vandløbs stofomsætning, ligesom de i særlig grad er påvirkelige af pyrethroider, der er designet til at slå skadevoldende insekter ihjel. Det er med projektet hensigten at kvantificere ændringer i biologiske parametre som biodiversitet, stofomsætning, samt overlevelse og reproduktionspotentialer hos disse smådyr.

Den overordnede hypotese er således at:

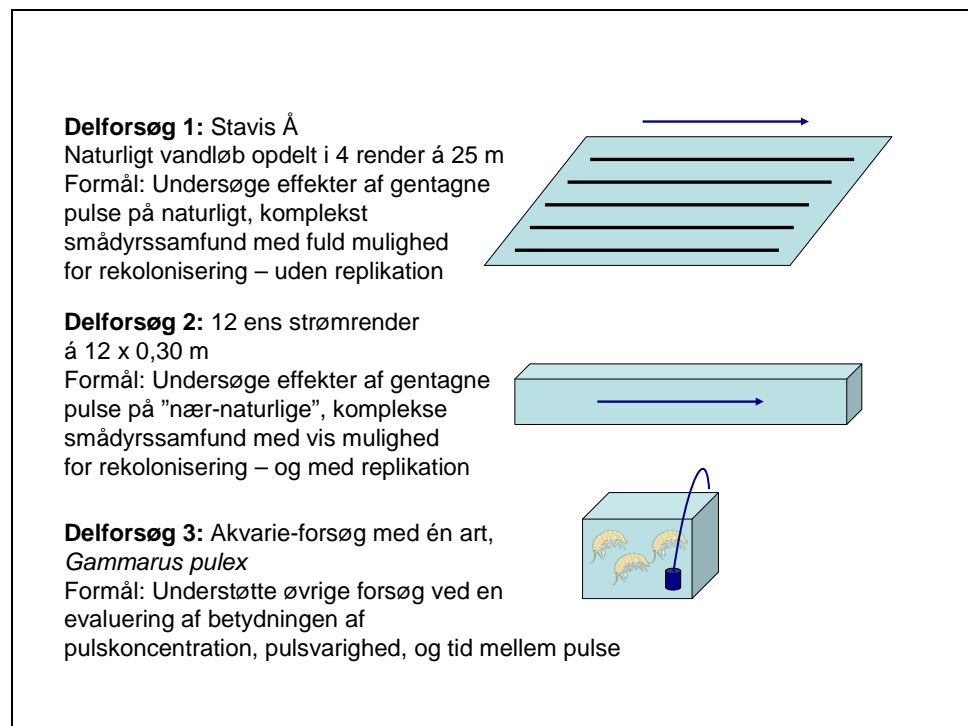
- en forøget hyppighed af pulse med overvejende sublethale (ikke-dødelige) pyrethroidkoncentrationer medfører en øget reduktion i bio-

diversitet, stofomsætning, overlevelse og reproduktion hos makroinvertebrater i danske vandløb.

### 1.3 PROJEKTETS OVERORDNEDE STRUKTUR

Der er gennemført undersøgelser i både et naturligt vandløb og kunstige (men miljørealistiske) vandløb, de såkaldte strømrender, samt akvarier under laboratorieforhold for at studere effekten af gentagne pulseksponeringer med pyrethroider på smådyrsfaunaen. Der er fokuseret på undersøgelser med overvejende subletale, i Danmark målte og sandsynligvis almindeligt forekommende koncentrationer (Wiggers 1999), der kan belyse ændringer i artssammensætning, stofomsætning, overlevelse, udvikling fra larve- til voksenstadium, og reproduktionspotentiale. Ved samtlige forsøg er anvendt lambda-cyhalothrin som model-pyrethroid, som deltagerne i projektgruppen tidligere har opnået stor erfaring i anvendelsen af (Nørum et al. 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Dette stof påvirker, ligesom de øvrige i Danmark anvendte pyrethroider, mange makroinvertebrater ved stort set de samme koncentrationer og på samme måde (fx Nørum et al. 2006). De anvendte nominelle koncentrationer er blevet verificeret via kemiske analyser i alle delforsøg.

Sammenhængen mellem projektets delforsøg er illustreret i Figur 1.1, hvor også hovedformålene med hvert af delforsøgene er angivet.



FIGUR 1.1. SAMMENHÆNGEN MELLEML PROJEKTETS TRE DELFORSØG.

## 2 Metoder

### 2.1 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB

Der blev udført undersøgelser af effekten af gentagne pulseksponeringer med pyrethroidet lambda-cyhalothrin på sammensætning og funktion af makroinvertebratsamfund i et naturligt vandløb. Der blev dels undersøgt ændringer i samfundet, dels undersøgt ændringer i makroinvertebraternes stofomsætning i form af nedbrydning af dødt plantemateriale og græsning af alger.

#### 2.1.1 Etablering af forsøgsrender

Forsøget blev udført i Stavis Å, umiddelbart opstrøms for Rugårds Landevej ved Morud (Fyn). Vandløbet strømmer her gennem Langesø Skov, har et stort set ureguleret forløb, og er uden væsentlig belastning med spildevand. Til gengæld modtager vandløbet vand via afløbet fra den stærkt næringsrige Langesø, herunder i perioder betydelige mængder plante- og dyreplankton. Faunasammensætningen på forsøgsstrækningen er dog ikke væsentlig præget af dette, men udviser typiske karaktertræk for et middelstort skovvandløb. Faunaklassen målt ved Dansk Vandløbs Faunaindeks har gennem en lang årrække været 7, svarende til høj økologisk tilstand og dermed miljømæssigt stort set upåvirket.

Til selve forsøget blev udvalgt en 25 m lang ensartet stryg-lignende strækning (ens bredde, retlinjet forløb, relativt lavvandet, og med en bund primært bestående af sten og grus). Denne strækning blev 27. april 2010 opdelt i 4 ca. ½ m brede render, afgrænset ved opsætning af skillevægge. Disse skillevægge bestod af kraftig transparent plastikfolie, lagt dobbelt og svejset sammen for oven (og således også lukket mod bunden). Mod bunden blev folievæggen tynget ned af en kraftig jernkæde ( $2,5 \text{ kg m}^{-1}$ ) og foroven holdt oppe af nylon-tov fastgjort til pæle af tentorstål, solidt fastgjort i vandløbsbunden, på tværs støttet af kraftige elektrikerør fastgjort til stålpælene (se figur 2.1). Denne fleksible form for afgrænsning af renderne blev valgt, fordi det vurderedes umuligt/uhensigtsmæssigt at etablere faste skillevægge i den overvejende stenede/grusede vandløbsbund. De fleksible skillevægge vurderedes desuden egnede til sikre en tæt kontakt med den meget uregelmæssige bund.

Tætheden af skillevæggene mod bunden blev undersøgt ved tilsætning af farvestof (uranin) til hver rende efter tur. Ved forsøgets start blev tætheden vurderet tilfredsstillende (figur 2.1), selvom det i praksis var umuligt at sikre, at der ikke stedvis var mindre huller mellem væggene og bunden.

De 4 render blev placeret i den midterste strømmende del af vandløbet for at sikre ensartede strømningforhold (ved at undgå de mere stillestående områder langs bredden). Renderne blev nummereret fra 1 til 4 regnet fra vandløbets venstre bred (set fra rendernes opstrøms ende og nedstrøms). Rende 1 blev eksponeret med pyrethroid 4 gange, rende 2 eksponeret 2 gange, rende 3 eksponeret 1 gang og rende 4 ikke eksponeret (se afsnit 2.1.2).



FIGUR 2.1. FORSØGSSTRÆKNINGEN I STAVIS Å VISENDE DE 4 FORSØGSRENDER (SET I NEDSTRØMS RETNING). RENDERNE ER NUMMERET 1 TIL 4 REGNET FRA VENSTRE: R1 – EKSPONERET MED PYRETHROID 4 GANGE, R2 – EKSPONERET 2 GANGE MED PYRETHROID, R3 – EKSPONERET 1 GANG MED PYRETHROID, R4 – IKKE EKSPONERET MED PYRETHROID. FOTO'ET VISER OGSÅ AFPRØVNINGEN AF TÆTHEDEN AF RENDERNE VED BRUG AF GRØNT FARVESTOF (URANIN). FOTO: P. WIBERG-LARSEN.

Ved forsøgets start og prøvetagningen inden der blev eksponeret med pyrethroid var løvspringet kun stort set lige startet pga. det kølige forår. Forsøgsstrækningen og renderne var dermed relativt stærkt eksponeret for sollys. Senere ved den sidste prøvetagning var træerne fuldt udsprungne og forsøgsstrækningen og renderne stærkt beskyggede.

### 2.1.2 Eksponering med pyrethroidet lambda-cyhalothrin

Udledning af det anvendte pyrethroid, lambda-cyhalothrin, kræver tilladelse efter Miljøbeskyttelseslovens § 27, stk. 3. En sådan tilladelse blev givet af By- og Landskabsstyrelsen ved brev af 13. april 2010. Der indkom ingen klager over den meddelte tilladelse. Tilladelsen blev givet på en række vilkår, som alle er blevet overholdt.

Der blev foretaget i alt 4 eksponeringer: 4. maj 2010 i renderne 1, 2 og 3, 6. maj 2010 i renderne 1 og 2, samt hhv. 8. og 10. maj 2010 i rende 1.

Ved eksponeringen blev der doseret en stamopløsning af lambda-cyhalothrin i hele en given rendes bredde via en ”4-huls diffuser” (4 slanger fordelt på tværs af renden) placeret i indløbet til renden. Der blev til doseringen anvendt justerbare, batteridrevne pumper (Ole Dich Instrumentmakers ApS, Danmark; type 110AC R40 G38 CH 10A).

Der blev i alle tilfælde doseret over 90 min med konstant koncentration pyrethroid til estimeret nominal koncentration på  $0,100 \mu\text{L}^{-1}$ . Ved beregningen af den tilførte koncentration blev der anvendt aktuelle målinger af vandføringen ud af hver af de 4 render (Tabel 2.1). Vandføringen blev målt ved brug af vingemåler (OTT, kleinflügel, Ø30 mm vinge).

TABEL 2.1. VANDFØRING ( $L s^{-1}$ ) I FORSØGSRENDERNE I STAVIS Å. FØR OG I FORBINDELSE MED EKSPONERINGERNE MED PYRETHROID BLEV DER MÅLT I UDLØBET FRA HVER AF DE 4 RENDER TIL KARAKTERISERINGEN AF DRIFTEN AF MAKROINVERTEBRATER UD AF RENDERNE, MENS DER BLEV MÅLT I INDLØBET I FORBINDELSE MED UNDERSØGELSE AF DRIFTEN IND I RENDERNE.

Dag Aktivitet	-1 Før- målinger (udløb)	0 1. ek- spo. (udløb)	2 2. ek- spo. (udløb)	4 3. ek- spo. (udløb)	6 4. ek- spo. (udløb)	19/20 Under natdrift (indløb)	20 Under dagdrift (indløb)
Rende 1	17,1	12,7	11,5	27,5	16,0	#	18,5
Rende 2	18,1	17,6	13,4	35,1	17,7	#	17,6
Rende 3	14,4	14,1	11,5	27,9	14,5	#	16,7
Rende 4	15,9	15,4	10,9	24,7	17,8	#	22,9

# Der blev ikke målt vandføring ind i renderne på dag 19/20. Vandføringerne vurderes at være de samme, som målt 7 timer senere på dag 20.

Efter 60 min's dosering blev der udtaget vandprøver (glasflasker) i samtlige render hhv. i den opstrøms, midtvejs (dog kun i render, som blev eksponeret med pyrethroid) og nedstrøms del. Vandprøverne blev analyseret for indhold af pyrethroid inden for 24 timer ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet, som beskrevet i afsnit 2.5, og de aktuelle koncentrationer fremgår af tabel 2.2.

TABEL 2.2. LAMBDA-CYHALOTHRIN KONCENTRATIONER ( $\mu g L^{-1}$ ) I STAVIS Å. GNS $\pm$ SEM, N=3 OG N=2 I HENHOLDSVIS EKSPONEREDE OG UEKSPONEREDE RENDER.

Dag	0 1. eksponering	2 2. eksponering	4 3. eksponering	6 4. eksponering
Kontrol (R4)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
1 puls (R3)	0,065 $\pm$ 0,007	0,008 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
2 pulse (R2)	0,091 $\pm$ 0,003	0,070 $\pm$ 0,011	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
4 pulse (R1)	0,069 $\pm$ 0,004	0,073 $\pm$ 0,008	0,078 $\pm$ 0,011	0,140 $\pm$ 0,019

<sup>a</sup> På dag 2 blev der nedstrøms i den ueksponerende R3 fundet 0,017  $\mu g L^{-1}$

### 2.1.3 Udtagning af prøver

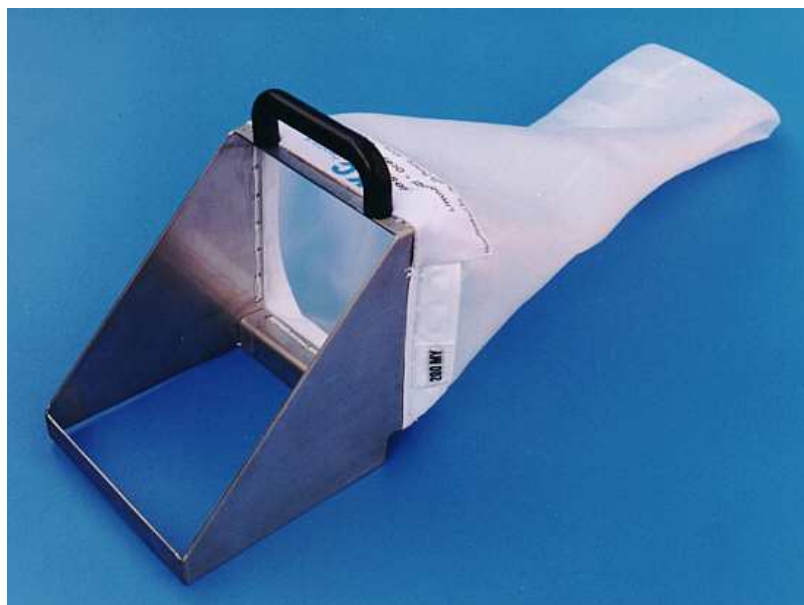
Der blev udtaget forskellige typer af prøver hhv. dagen før (3. maj 2010) og 29 dage (2. juni 2010) efter første dosering med pyrethroid, samt i forbindelse med selve eksponeringerne:

- Bundprøver af makroinvertebrater
- Bladpakkeprøver (makroinvertebrater og bladvægttab)
- Klorofylprøver (algebiomasse) fra sten
- Prøver af drift af makroinvertebrater ud af og ind i renderne.

Desuden blev der supplerende indsamlet:

e) Puppehuse af vårfluen *Agapetus ochripes* fra sten den 30. juni, dvs. på dag 57 efter første eksponering (se senere). Oprindeligt var det planlagt at undersøge klækkesuccesen hos denne art ved brug af klækkefælder (opsamler de voksne insekter, når de efter puppestadiet forlader vandet). Disse blev opsat som planlagt 4. maj 2010, men blev væltet over ende i forbindelse med en kraftig afstrømning omkring 15-16. maj 2010. Videre brug af disse blev derfor opgivet.

Bundprøverne (a) blev udtaget med Surbersamplers med et rammeareal på 200 cm<sup>2</sup> (figur 2.2). Ved prøvetagningen blev sampleren presset ned i bunden og materialet inden for rammen hvirvlet op med en 3-grenet håndkultivator (normalt anvendt til håndlugning i haver). Det ophvirvlede materiale blev derved skyllet ind i samplersens netpose (maskevidde 500 µm). Indholdet af netposen blev konserveret med 96 % ethanol, og dyrene senere frasorteret, identificeret og optalt i laboratoriet. Der blev udtaget i alt 10 prøver fra hver rende og dag (hhv. dag -1 og +29 i forhold til første eksponering med pyrethroid). Disse blev udtaget stratificeret tilfældigt langs hele den respektive rende.



FIGUR 2.2. SURBER SAMPLER (KCDENMARK INSTRUMENTS), BESTÅENDE AF STÅLRAMME PÅSAT NET MED MASKEVIDDEN 0,500 MM.

Der blev 27. april 2010 udlagt 22 (2 x 10 + 2 ekstra i reserve) bladpakker (b) i hver af de 4 render, i alt 88 bladpakker. Der blev anvendt blade af Rød-El (*Alnus glutinosa*) indsamlet 29. september 2009, umiddelbart inden løvfald, plukket af træer ved Lemming nord for Silkeborg. Bladene blev derefter lufttørret ved ca. 15 °C, hvorefter de blev opbevaret tørt og køligt indtil brug. Som forberedelse til forsøget blev bladene tørret ved 60 °C i 2 døgn. Derefter blev ti tørrede blade (svarende til ca. 3 g) afvejet (præcision: 1 mg) i nummererede foliebakker. Bladene blev overført til nummererede plastbakker og konditioneret i vandløbsvand i 6 dage, inden de blev overført til et net af plastik med maskevidde 5 mm, fastgjort til et stykke plastikrør ved hjælp af plaststrips (som ved tidligere forsøg, se Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Rørdelen af hver af disse bladpakker blev trukket uden på et jernrør – to pakker på hvert jernrør. De parvise bladpakker på hvert sit jernrør blev fordelt jævnt på langs af hver rende. Der blev udtaget i alt 10 prøver fra hver rende og dag (hhv. dag -1 og +29 i forhold til første eksponering med pyrethroid). Disse prøver blev udtaget stratificeret tilfældigt langs hele den respektive rende. Bladpakkernes indhold blev herefter placeret i prøvebeholdere og konserveret med 96 % ethanol. I laboratoriet blev makroinvertebraterne sorteret fra, identificeret og optalt. Bladresterne blev opsamlet og tørret (60 °C i 2 døgn) og afvejet (præcision: 1 mg). Vægttabet mellem udlægning og indsamling blev derefter beregnet ved simpel subtraktion.

Prøver til bestemmelse af algebiomassen (c) blev udtaget ved indsamling af 3 mindre sten på hvert af de steder, hvor surberprøverne blev udtaget (i alt 10 3-stens prøver pr. rende og tidspunkt). Stenene blev anbragt i prøvebeholdere og tilsat 96 % ethanol, således at stenene lige akkurat var dækket med væske. Indholdet af klorofyl-a som mål for algebiomassen blev målt spektrofotometrisk direkte på ethanolekstraktet (Dansk Standard 1986), og koncentrationen angivet som  $\text{mg L}^{-1}$ . Denne blev omregnet til  $\text{mg m}^{-2}$  efter korrektion for arealet af stenenes overflade. Sidstnævnte blev estimeret ud fra formlen:

$\frac{1}{2}\pi((L B)+(L H)+(B H))/3$ , hvor L, B og H er hhv. stenenes længde, bredde og højde (se Dall 1979), og hvor faktoren  $\frac{1}{2}$  korrigerer for at kun den øvre halvdel af en sten modtager lys til vækst af alger.

De indsamlede stens længde, bredde og højde blev målt til nærmeste hele mm ved brug af skydelære.

Der blev derudover målt drift af makroinvertebrater (d) i forbindelse med hver eksponering med pyrethroid, idet driften ud af samtlige render blev målt under og 2 timer efter eksponeringens ophør. Nette blev således tømt for dyr efter en samlet periode af  $3\frac{1}{2}$  times varighed. Der blev anvendt driftnet med en arealåbning på  $507 \text{ cm}^2$  (L: 35,0; B: 14,5 cm) og en maskevidde på  $200 \mu\text{m}$ . Driftnettene fik i siderne påsat vinger af aluminium, således at det sikredes at stort set hele vandføringen ud af renderne passerede igennem driftnettene (Figur 2.3). Denne vandføring blev målt i forbindelse med eksponeringerne (se 2.1.2). Derudover blev der målt drift ind i hver af de 4 render hhv. om natten (kl. 23:17-01:17) den 23.-24. maj 2010 og dagen (kl. 08:10-10:10) den 24. maj 2010. Der blev både målt nat- og dagdrift, fordi driften erfaringsmæssigt er størst om natten, hvor makroinvertebraterne generelt er mest aktive. Samtidig blev vandføringen igennem hver net målt med OTT Kleinflügel vingemåler som ved øvrige målinger af vandføringen. Endelig blev der målt drift ca. 10 m opstrøms for renderne under den meget store afstrømning den 16. maj 2010. Der blev herved anvendt 2 driftnet over en periode på 15 min (fra kl. 17:10). Strømhastigheden igennem nettene blev ved den lejlighed skønnet ved hjælp af ”Peter Plys metoden” (pind og stopur). Indholdet i driftnettene blev overført til prøvebeholdere og konserveret med 96 % ethanol. I laboratoriet blev makroinvertebraterne sorteret fra, identificeres og optalt.

Endelig blev puppehuse af *Agapetus ochripes* (e) indsamlet fra 6-10 sten i hver rende ca. 1 måned efter forsøgets afslutning. Dette ”sene” tidspunkt skyldes, at langt størstedelen af de voksne først da havde forladt vandløbet (se figur 3.9). Dette blev kontrolleret ved brug af Malaisefælder (”teltfælder”, se Malaise 1937), opsat hhv. 2, 5, 10 og 20 m vinkelret på vandløbet umiddelbart opstrøms for forsøgsstrækningen. Disse fælder blev tømt med ca. en uges interval i perioden medio maj-medio juli. Puppehusene blev indsamlet fra sten, som havde store koncentrationer af disse. De udvalgte sten indsamledes langs hele renden. Puppehusene blev frigjort fra stenene ved brug af skalpel og konserveret i 96 % ethanol. I laboratoriet blev puppekokonerne i puppehusene undersøgt for følgende:



FIGUR 2.3. DRIFTNET ANVENDT TIL OPSAMLING AF DE MAKROINVERTEBRATER, SOM MED STRØMMEN DREV UD AF RENDERNE I FORBINDELSE MED EKSPONERINGERNE MED PYRETHROID.

- Om de var ubrudte og udelukkende indeholdt larvedele: døde larver
- Om de var ubrudte med indhold af larve- og puppedele: døde pupper
- Om de var klippet op og kun indeholdt larvedele: pupper som må formodes at have forladt puppekoken og være klækket til voksne.

De indsamlede stens længde, bredde og højde blev målt til nærmeste hele mm ved brug af skydelære.

Der blev for såvel Surberprøver, bladpakkeprøver og driftprøver i vid udstrækning anvendt subsampling for de mest talrige taxa. Samtlige driftprøver, der bestod af store mængder materiale, blev subsamlet ved udtagning af en afvejet delmængde prøve, efter at driftsprøven forinden var blevet grundigt blandet. Antallet af individer fra de udtagne delprøver blev derefter ganget op til den fulde prøve.

#### 2.1.4 Andre målinger

Vandtemperaturen i vandløbet blev målt ”kontinuert” i to af forsøgsrenderne ved hjælp af dataloggere. Der blev registreret med 30 min’s intervaller.

Data for vandføring blev indhentet fra Naturstyrelsen Fyns’s automatiske målestation for vandspejlshøjde i Stavis Å, beliggende ved Stavis Bro (DMU nr. 45000005) ca. 7 km nedstrøms for forsøgsstrækningen.

## 2.2 EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUNSTIGE VANDLØB

Der blev udført undersøgelser af effekten af gentagne pulseksponeringer med pyrethroidet lambda-cyhalothrin på sammensætning og funktion af makroinvertebratsamfund i forsøgsrender. Der blev dels undersøgt ændringer i sam-



fundet, dels undersøgt ændringer i makroinvertebraternes stofomsætning i form af nedbrydning af dødt plantemateriale og græsning af alger.

### 2.2.1 Etablering af forsøgsrender

Der blev udført undersøgelser i forsøgsrender (figur 2.4), beliggende ved DMU's feltstation i Lemming. Renderne blev etableret under et tidligere pesticidforskningsprojekt (se Wiberg-Larsen & Nørum 2009) – i alt 6 render hver med en længde på 12 m og en bredde på 0,60 m. Renderne er opbygget med en bund af metalplade og 30 cm høje sider af akrylplast. Hver rende er placeret på et stativ af træ (hvilende på en række fliser på et underlag af stabilgrus) og har en hældning på 5 ‰. Til de aktuelle forsøg blev hver rende ”halveret” på langs ved isætning af ekstra skillevæg, således at der i alt blev 12 render til rådighed, hver med en bredde på 0,30 m. Hver rende blev forsynet med bundsubstrat af forskellige fraktioner af sten, grus og sand, som blev fordelt efter samme princip. I hver rende blev der således lavet i alt 5 stryg, hvoraf det ene var placeret midtvejs. Den midterste del af hvert stryg bestod af marksten op til ca. 15 cm i diameter og såvel ca. 0,6 m opstrøms og ca. 0,6 m nedstrøms for disse af småsten og groft grus i kornstørrelserne 48-96, 24-48 og 12-24 mm. Forholdet mellem de 3 kornstørrelser var 1:4:4. Imellem strygene var der områder med dybere vand (høller), i alt 6 høl-sektioner, hvor bunden blev opbygget af finere fraktioner med kornstørrelserne 6-12, 3-6 og 1-3 mm i forholdet 1:1:0,5. Tykkelsen af bundsubstratet varierede fra ca. 5-6 cm i høl-sektionerne til 10-20 cm i strygene (højest ved stenene).



FIGUR 2.4. DE 12 FORSØGSRENDER (KUNSTIGE VANDLØB) I LEMMING. HVER RENDE ER 0,3 M BRED OG 12 M LANG, ANBRAGT PÅ BUKKE AF TRÆ, OG HAR EN HÆLDNING PÅ 5 ‰. FOR NEDEN VIST AFLØBSENDEN AF TO AF FORSØGSRENDERNE. UD FRA VANDSPEJLSHØJDEN I DET SKARPKANTEDE 60 GRADERS V-OVERFALD KAN VANDFØRINGEN GENNEM HVER RENDE BEREGNES. FOTO: P. WIBERG-LARSEN.

Solindstrålingen til renderne blev dæmpet ved hjælp af en dug af hvidt stof fastgjort til træstativerne. Derved reduceredes lysindfaldet med ca. 2/3. Formålet var at forhindre opvarmning af vandet og mindske uhæmmet opvækst af bundlevende trådalger.

Renderne blev kontinuert tilført vand fra den nærliggende Lemming Å. Via en kort kanal blev åvandet naturligt ledt ind i et smalt, vandløbslignende bassin, hvori var placeret en aksialpumpe med en maksimal ydelse på ca. 45 l s<sup>-1</sup>. Vandet blev fra bassinet pumpet ca. 2 m op i et pumpetårn, opbygget af brøndringe med en diameter på 120 cm. Herfra blev vandet ført videre via naturligt fald i tætte pvc-rør til endnu en brønd placeret umiddelbart nær ved renderne. Herfra blev vandet, stadig via naturligt fald, fordelt via 6 pvc-rør til hver sin dobbeltrende. I indløbet til hver dobbeltrende var anbragt en fordelerkasse af metal, således at indløbsvandet blev nogenlunde jævnt fordelt mellem de to halvdele (render). Den valgte konstruktion betød, at det var relativt let for driftende makroinvertebrater at blive transporteret til renderne sammen med det indpumpede vand. Dyrene var så små, at de normalt ikke blev slået i stykker ved passagen af aksialpumpen. Vanddybden i renderne (over substratet) varierede mellem 2-3 cm over toppen af strygene til ca. 20 cm i hølsektionerne. Det resulterede i en variation i den gennemsnitlige vandhastighed gennem tværsnittet af renderne på 3-30 cm s<sup>-1</sup>. I udløbet fra hver rende var anbragt et 60° skarpt overfald til bestemmelse af vandføringen igennem renderen (Figur 2.3). Vandstrålen ud gennem overfaldet var ”luftet” (dvs. havde frit fald), således at vandføringen ved måling af vandspejlets højde i overfaldet og en standardformel kunne beregnes. Afløbsvandet fra hver rende blev via to samlebrønde og udløb ledt tilbage i Lemming Å, kun ca. 10-15 m nedstrøms for indvindingsstedet. Der blev indhentet tilladelse til indvindingen fra Silkeborg Kommune (jf. Vandforsyningsloven).

Under eksponeringerne med pyrethroid blev der ikke foretaget opsamling af kontamineret vand, således som det var tilfældet ved tidligere undersøgelser med væsentlig højere koncentrationer og mindre fortynding i Lemming Å. Det blev således beregnet, at koncentrationen af pyrethroid i Lemming Å under 1. eksponering, hvor flest render blev eksponeret, ville være væsentlig under 0,001 µg L<sup>-1</sup>, hvilket ikke forventedes at kunne medføre væsentlige påvirkninger af de biologiske forhold i vandløbet.

Funktionen af aksialpumpen blev overvåget med en telefonisk alarm, og der var mulighed for med kort varsel at tilslutte en reservepumpe (dog med mindre ydelse).

Renderne blev sat i drift 17. marts 2010 og fik tilført vandløbsvand som beskrevet ovenfor.

Den 12. april 2010 blev renderne koloniseret med makroinvertebrater fra Lemming Å. Dette foregik ved indsamling af sparkeprøver over en ca. 200 m strækning jf. metode angivet i Miljøstyrelsen (1998). Der blev kun taget prøver i områder med karakter af stryg. Der blev startet nedstrøms fra, idet første prøve blev anbragt i en spand mærket nr.1, anden prøve i en spand mærket nr. 2, og så videre indtil 12. prøve, som blev placeret i spand nr. 12. Herefter blev 13. prøve anbragt i spand nr. 1, 14. prøve i spand nr. 2 osv., indtil der i alt var 4 prøver i hver af de 12 spande. Formålet med den valgte procedure var at sikre en så ensartet artssammensætning af makroinvertebrater som praktisk muligt i hver spand. Antallet af prøver skulle endvidere sikre en naturlig indi-

vidtæthed i renderne. Podningen med dyr foregik ved, at dyrene i spand nr. 1 blev tilført opstrøms i rende 1, dyrene i spand nr. 2 på samme vis tilført rende 2 osv. Hver rende fik således tilført dyr svarende til 4 sparkeprøver, svarende til ca. 3 m<sup>2</sup> vandløbsbund. Til sammenligning var arealet af hver rende 3,6 m<sup>2</sup>. Dyrene fik herefter 29 dage til at akklimatisere sig i renderne inden de blev eksponeret med pyrethroid (se afsnit 2.2.2).

Lemming Å er såvel opstrøms som nedstrøms for forsøgsanlægget ureguleret med stor fysisk variation, relativt stort fald med forekomst af væsentlige områder med sten og grus, samt en generelt god miljøkvalitet. Således blev fauna-klassen efter Dansk Vandløbs Fauna Indeks målt til 7, svarende til høj økologisk tilstand. Vandløbet huser således en rig og varieret makroinvertebratfauna.

Den 5. maj 2010 blev der i hver rende udlagt i alt 20 bladpakker af samme type og med samme indledende behandling som beskrevet under afsnit 2.1.3. Bladpakkerne blev fordelt to og to jævnt gennem hver rende i de respektive hølsektioner. Bladpakkerne blev placeret på vandløbsbunden og holdt i position ved hjælp af fjederståltråd sat i spænd mellem rendens to vægge.

### **2.2.2 Eksponering med pyrethroidet lambda-cyhalothrin**

Med 12 render til rådighed var det muligt at eksponere 3 render (triplikater) med hhv. ingen (kontrol), 1, 2 eller 4 pulse af pyrethroid. De enkelte render blev udvalgt tilfældigt til en given behandling.

Der blev således foretaget i alt 4 eksponeringer med pyrethroid: 11. maj 2010 i renderne 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 og 12, 13. maj 2010 i renderne 1, 2, 7, 8, 9 og 10, samt hhv. 15. og 17. maj 2010 i rende 1, 7 og 9. Renderne 3, 5 og 11 var således kontrolrender og blev ikke eksponeret med pyrethroid.

Ved eksponeringen blev der tilsat en stamopløsning af lambda-cyhalothrin i hele en given rendes bredde via en "4-huls diffuser" (4 slanger fordelt på tværs af renden) placeret i indløbet til renden. Der blev til doseringen anvendt justerbare, batteridrevne pumper (Ole Dich Instrumentmakers ApS, Danmark; type 110AC R40 G38 CH 10A). Det var ved tidligere forsøg påvist, at opblandingen var effektiv inden for ca. ½ m nedstrøms for doseringsstedet.

Der blev i alle tilfælde doseret over 90 min med konstant koncentration pyrethroid til en estimeret nominal koncentration på 0,100 µg L<sup>-1</sup>. Ved beregningen af den tilførte koncentration blev der anvendt aktuelle målinger af vandføringen i de enkelte render (Tabel 2.3).

Efter 60 min's dosering blev der udtaget vandprøver (i glasflasker) i afløbet fra samtlige render på dag 0, og fra alle eksponerede render samt én kontrolrende (rende 3) på dag 2, 4 og 6. Vandprøverne blev analyseret for indhold af pyrethroid inden for 24 timer ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet, som beskrevet i afsnit 2.5, og de aktuelle koncentrationer fremgår af tabel 2.4.

TABEL 2.3. VANDFØRING ( $L s^{-1}$ ) I AFLØBENE FRA FORSØGSRENDERNE I LEMMING UNDER FORSKELLIGE FORSØG/PRØVETAGNINGER.

Dag	0	2	4	6	20	20	29
Aktivitet	1. eksp	2. eksp	3. eksp	4. eksp	Dagdrift	Natdrift	Afslutning
Rende 1	2,37	2,37	2,37	2,37	2,31	2,31	2,31
Rende 2	2,49	2,55	2,62	2,62	3,31	3,38	3,38
Rende 3	3,23	3,31	3,31	3,31	-	-	3,16
Rende 4	2,81	2,75	2,75	2,75	-	-	2,43
Rende 5	3,02	2,95	2,95	3,02	3,31	3,31	3,38
Rende 6	2,88	2,81	2,81	2,88	2,25	2,25	2,19
Rende 7	2,81	2,25	2,25	2,25	-	-	2,62
Rende 8	1,47	1,97	1,97	2,08	-	-	1,66
Rende 9	3,02	2,88	2,75	2,88	2,68	2,81	2,62
Rende 10	2,25	2,37	2,43	2,55	2,19	2,08	2,43
Rende 11	3,85	3,69	3,69	3,77	-	-	3,77
Rende 12	2,68	2,49	2,43	2,43	-	-	2,25

TABEL 2.4. LAMBDA-CYHALOTHRIN-KONCENTRATIONER ( $\mu g L^{-1}$ ) I RENDERNE I LEMMING.

Dag	0	2	4	6
	1. eksponering	2. eksponering	3. eksponering	4. eksponering
Kontrol (R3)	0	0	0	0
Kontrol (R5)	0	-	-	-
Kontrol (R11)	0	-	-	-
1 puls (R4)	0,082	-	-	-
1 puls (R6)	0,070	-	-	-
1 puls (R12)	0,078	-	-	-
2 pulse (R2)	0,067	0,074	-	-
2 pulse (R8)	0,043	0,049	-	-
2 pulse (R10)	0,081	0,065	-	-
4 pulse (R1)	0,067	0,063	0,064	0,067
4 pulse (R7)	0,095	0,069	0,061	0,071
4 pulse (R9)	0,081	0,067	0,046	0,057

### 2.2.3 Udtagning af prøver

Der blev udtaget forskellige typer af prøver umiddelbart før 1. eksponering med pyrethroid (11. maj 2010) og 29 dage (9. juni 2010) efter denne, samt i forbindelse med selve eksponeringerne:

- Bundprøver af makroinvertebrater fra strygene med sten/grus bund
- Bladpakkeprøver (makroinvertebrater og bladvægttab) fra høl-områderne
- Klorofylprøver (algebiomasse) fra sten på strygene
- Prøver af drift af makroinvertebrater ud af og ind i renderne.

Bundprøverne (a) blev udtaget med samme Surbersamplers og efter samme procedure som i Stavis Å. Indholdet af netposen blev konserveret med 96 % ethanol, og dyrene senere frasorteret, identificeret og optalt i laboratoriet. Der blev udtaget i alt 5 prøver fra hver rende og dag (hhv. dag 0 men før eksponering med pyrethroid, samt 29 dage efter eksponeringen). Disse blev udtaget stratificeret tilfældigt langs hele den respektive rende. Det samlede prøveantal var 120.

Ved forsøgets afslutning blev der supplerende optalt tomme nymfehuder (exuvier) af slørvinger på væggene af samtlige render – oven for vandfladen. Det er således normal adfærd hos slørvinger, at nymferne af disse kryber på land for at forvandle sig til voksne. Antallet af tomme nymfehuder repræsenterer derved vel gennemført klækning.

Der blev indsamlet 5 bladpakker (b) fra hver af renderne på såvel dag 0 (men før eksponering med pyrethroid) som dag 29 (efter eksponeringen), i alt 120 bladpakker, til registrering af makroinvertebrater og bladvægttab. På dag 29 blev yderligere 5 bladpakker indsamlet fra hver rende, i alt 60 bladpakker, alene til bestemmelse af bladvægttab. Alle bladpakker blev udtaget stratificeret tilfældigt langs hele den respektive rende. Bladpakkernes indhold blev herefter placeret i prøvebeholdere og konserveret med 96 % ethanol. I laboratoriet blev makroinvertebraterne sorteret fra, identificeret og optalt i de 120 prøver. Bladresterne fra alle 180 prøver blev opsamlet og tørret (60 °C i 2 døgn) og afvejet (præcision: 1 mg). Vægttabet mellem udlægning og indsamling blev derefter beregnet ved simpel subtraktion.

Prøver til bestemmelse af algebiomassen i hver rende på såvel dag 0 (men før eksponering med pyrethroid) som dag 29 (efter eksponeringen) blev udtaget ved indsamling af 3 mindre sten på hvert af de steder, hvor surberprøverne blev udtaget, svarende til 5 prøver pr. rende og tidspunkt. I alt blev indsamlet 120 prøver. Stenene blev anbragt i prøvebeholdere og tilsat 96 % ethanol, således at stenene lige akkurat var dækket med væske. Indholdet af klorofyl-a som mål for algebiomassen blev målt spektrofotometrisk direkte på ethanolekstraktet (Dansk Standard 1986), og koncentrationen angivet som mg L<sup>-1</sup>. Denne blev omregnet til mg m<sup>-2</sup> efter korrektion for arealet af stenenes overflade. Sidstnævnte blev estimeret som beskrevet i afsnit 2.1.3.

Der blev målt drift af makroinvertebrater (d) i forbindelse med hver eksponering med pyrethroid, idet driften ud af samtlige render blev målt under og 2 timer efter eksponeringens ophør, i alt 3½ time, ligesom ved forsøget i Stavis Å. Der blev anvendt samme driftnet til opsamlingen som beskrevet under afsnit 2.1.3. Hele vandføringen fra hver rende passerede gennem nettet. Denne vandføring blev målt i forbindelse med eksponeringen (se afsnit 2.2.2). Derudover blev der målt drift ind i hver af 3 tilfældigt udvalgte dobbeltrender den 31. maj 2010, hhv. om dagen (kl. 14:15-16:15) og natten (kl. 23:30-01:30). Samtidig blev vandføringen ud af renderne målt. Indholdet i driftnetene blev overført til prøvebeholdere og konserveret med 96 % ethanol. I laboratoriet blev makroinvertebraterne sorteret fra, identificeres og optalt.

Der blev ligesom ved forsøgene i Stavis Å anvendt subsampling for Surber-, bladpakke- og driftprøverne, for at minimere tidsforbruget, hvor dette var rationelt og forsvarligt.

#### **2.2.4 Andre målinger**

Vandtemperaturen i hhv. Lemming Å, rende 8 og 12 blev målt ”kontinuert” ved hjælp af temperaturloggere. Der blev registreret med intervaller af 30 min.

### 2.3 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ OVERLEVELSE, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS *GAMMARUS PULEX* I LABORATORIEFORSØG

Formålet med rækken af laboratorieforsøg var at understøtte generaliserbarheden af resultaterne fra projektets øvrige forsøg med samfund af makroinvertebrater under hhv. naturlige og næsten naturlige forhold. Dette foregik ved at undersøge betydningen af koncentration og varighed af pyrethroidpulsene, samt interpulsintervallet (tiden mellem de gentagne pulse) på overlevelse, reproduktion og stofomsætning hos en enkelt art, *Gammarus pulex*.

#### 2.3.1 Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos *Gammarus pulex*

##### 2.3.1.1 Overordnet forsøgsdesign

Med henblik på at undersøge effekten af forskellige pulsvarigheder og interpulsvarigheder blev grupper af voksne *G. pulex* udsat for en række direkte sammenlignelige eksponeringer, kaldet ækvivalenteksponeringer (Tabel 2.5, figur 2.5). En ækvivalenteksponering beregnes som produktet af antal pulse, eksponeringskoncentration og samlet eksponeringsvarighed, således at fx følgende behandlinger har samme ækvivalenteksponering:

- én puls på 90 min ved  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$
- to pulse hver på 90 min ved  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$
- fire pulse hver på 90 min ved  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Den i forsøget anvendte ækvivalenteksponering var  $36 \mu\text{g min L}^{-1}$ , og følgende kombinationer af følgende parametre blev undersøgt:

- eksponeringskoncentration (0,05, 0,1, 0,2 eller  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ )
- pulsvarighed (90, 180 eller 360 min)
- antal pulse (1, 2 eller 4)
- interpuls periode (2, 4, 8 eller 16 dage)

Forsøget blev udført ved  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  med en døgnrytme med 12 timers lys og 12 timers mørke. Overlevelsen blev registreret løbende over 38 dage, mens omsætningen af konditionerede blade af Rød-El over hele forsøgsperioden blev bestemt.

##### 2.3.1.2 Forsøgsdyr

*G. pulex* blev indsamlet i Hagenstrup Møllebæk 7 dage inden forsøgets start (eksponering 25. oktober 2009). Efter hjemkomsten blev dyrene overført til 10-liters akvarier indeholdende beluftet vand og plantemateriale fra indsamlingsstedet, og præ-akklimatiseret i to dage.

##### 2.3.1.3 Den eksperimentelle enhed

Den eksperimentelle enhed under forsøget var et 1-liters plast-akvarium indeholdende 500 mL vand fra indsamlingsstedet, og efter præ-akklimatiseringen blev 20 individer overført til hver enhed, og blev tilbudt konditionerede elleblade *ad libitum*. Dyrene blev fordelt tilfældigt, og der var ingen tydelig forskel i størrelsesfordelingen mellem grupperne. Dyrene blev derefter akklimatiseret i yderligere 5 dage. Vandet blev skiftet to gange ugentligt gennem hele forsøget. Tætheden af individer i akvarierne svarede til de naturlige tætheder, som findes i mindre danske vandløb (se fx Friberg 1996).

#### 2.3.1.4 Bladmateriale

Blade af Rød-El blev d. 29. september 2009, umiddelbart inden løvfald, plukket af træer ved Lemming. Bladene blev derefter lufttørret ved ca. 15 °C, hvorefter de blev opbevaret tørt og køligt indtil brug. Som forberedelse til forsøget blev bladene tørret ved 60 °C i 2 døgn. Derefter blev ti tørrede blade (svarende til ca. 3 g) afvejet (præcision: 1 mg) i nummererede foliebakker til hver eksperimentel enhed bestående af 20 *G. pulex*. Disse blade blev løbende konditioneret to ad gangen i 7 dage i 300 mL å-vand ved 10-15 °C, således at dyrene ved forsøgets start, og derefter én gang ugentligt i forbindelse med et vandskifte, blev tilbudt to frisk-konditionerede blade. Efter konditioneringen, og inden bladene blev givet til dyrene, blev bladene skyllet grundigt i å-vand for at fjerne lækkede organiske forbindelser fra bladoverfladen. Ved vandskiftet blev tilbageværende bladstykker opsamlet i nummererede foliebakker til senere vejning. Fem yderligere portioner à 10 blade blev afvejet, således at massetabet under de 7 dages konditionering kunne kvantificeres parallelt med de øvrige bladportioner. Ved forsøgets afslutning blev tilbageværende bladmateriale tørret (60 °C i 2 døgn) og afvejet (præcision: 1 mg).

#### 2.3.1.5 Gruppeinddeling

Forsøget blev udført med i alt 18 grupper af *G. pulex*, hver bestående af 10 af de ovenfor beskrevne eksperimentelle enheder (se tabel 2.5 og figur 2.5). I alt blev 15 grupper (D-R) ækvivalenteksponeret med pyrethroid svarende til 36 µg min L<sup>-1</sup>. Endvidere blev 3 kontrolgrupper anvendt: Én gruppe (A) uden *G. pulex* og kun med blade, der blev håndteret fire gange for at bestemme baggrundsomsætningen, én gruppe (B) kontrol dyr, der kun blev håndteret én gang, og endelig én gruppe (C) kontrol dyr, der blev håndteret fire gange med to dages mellemrum, da dette vurderedes at ville give maksimalt håndteringsstress i forhold til en tidsmæssigt mere adskilt håndtering. Det blev vurderet unødvendigt at lave fuldstændigt analoge kontrolgrupper til alle 15 eksponerede grupper.

TABEL 2.5. FORSØGSDESIGN: BETYDNINGEN AF PULSVARIGHED OG INTERPULS-VARIGHED FOR OVERLEVELSE OG STOFOMSÆTNING HOS *G. PULEX*. I HVER GRUPPE BLEV 10 STK 1-LITERS AKVARIER MED 20 *G. PULEX* ANVENDT.

Gruppe	Koncentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pulsvarighed (min)	Antal pulse	Interpulsvarighed (dage)	Eksponeringsdage
A (u. dyr)	0	90	4	2	0, 2, 4, 6
B	0	90	1	-	0
C	0	90	4	2	0, 2, 4, 6
D	0,4	90	1	-	0
E	0,2	180	1	-	0
F	0,1	360	1	-	0
G	0,2	90	2	4	0, 4
H	0,2	90	2	8	0, 8
I	0,2	90	2	16	0, 16
J	0,1	90	4	2	0, 2, 4, 6
K	0,1	90	4	4	0, 4, 8, 12
L	0,1	90	4	8	0, 8, 16, 24
M	0,1	180	2	4	0, 4
N	0,1	180	2	8	0, 8
O	0,1	180	2	16	0, 16
P	0,05	180	4	2	0, 2, 4, 6
Q	0,05	180	4	4	0, 4, 8, 12
R	0,05	180	4	8	0, 8, 16, 24

#### 2.3.1.6 Registrering af overlevelse

Overlevelsen blev registreret på følgende dage: Dag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 20, 24, 25, 28, 35 og 38 (Figur 2.5). Endvidere skulle overlevelsen have været registreret dag 31, men dette blev ikke gjort pga. sygdom.

#### 2.3.1.7 Eksponeringsprocedure

Umiddelbart inden den første eksponering på dag 0 blev dyrene i hver gruppe eftertalt og antallet om nødvendigt justeret til 20 med dyr, der havde været opbevaret under identiske betingelser. På de efterfølgende eksponeringsdage blev dyrene optalt inden eksponeringens påbegyndelse. Bladmaterialet blev derved midlertidigt fjernet fra akvarierne, og dyrene blev forsigtigt hældt gennem en sigte og overført til eksponeringsakvarier, hvorefter bladmaterialet blev lagt tilbage i de oprindelige akvarier. Eksponeringsakvarierne indeholdt 500 mL kunstigt ferskvand, hvortil der umiddelbart inden eksponeringens start var blevet tilsat de ønskede mængder lambda-cyhalothrin opløst i ethanol. Kontrolgrupperne og bladgruppen fik blot tilsat ethanol. Grundig omrøring sikrede en hurtig opblanding. Den anvendte koncentration af ethanol på 0,1 % oversteg ikke den vejledende grænse for opløsningsmidler anvendt i forbindelse med test af svært opløselige stoffer (OECD 2000). Det kunstige ferskvand bestod af omvendt osmose vand (ASTM Type 4) tilsat følgende salte (OECD 2004):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 294  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 123,25  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ : 64,75  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$ : 5,75  $\text{mg L}^{-1}$ . Det kunstige ferskvand blev anvendt under eksponeringen for at standardisere forsøgsbetingelserne og minimere bindingen (sorptionen) af lambda-cyhalothrin til opløst og partikulært materiale, som måtte være til stede hvis der i stedet var blevet anvendt vandløbsvand.

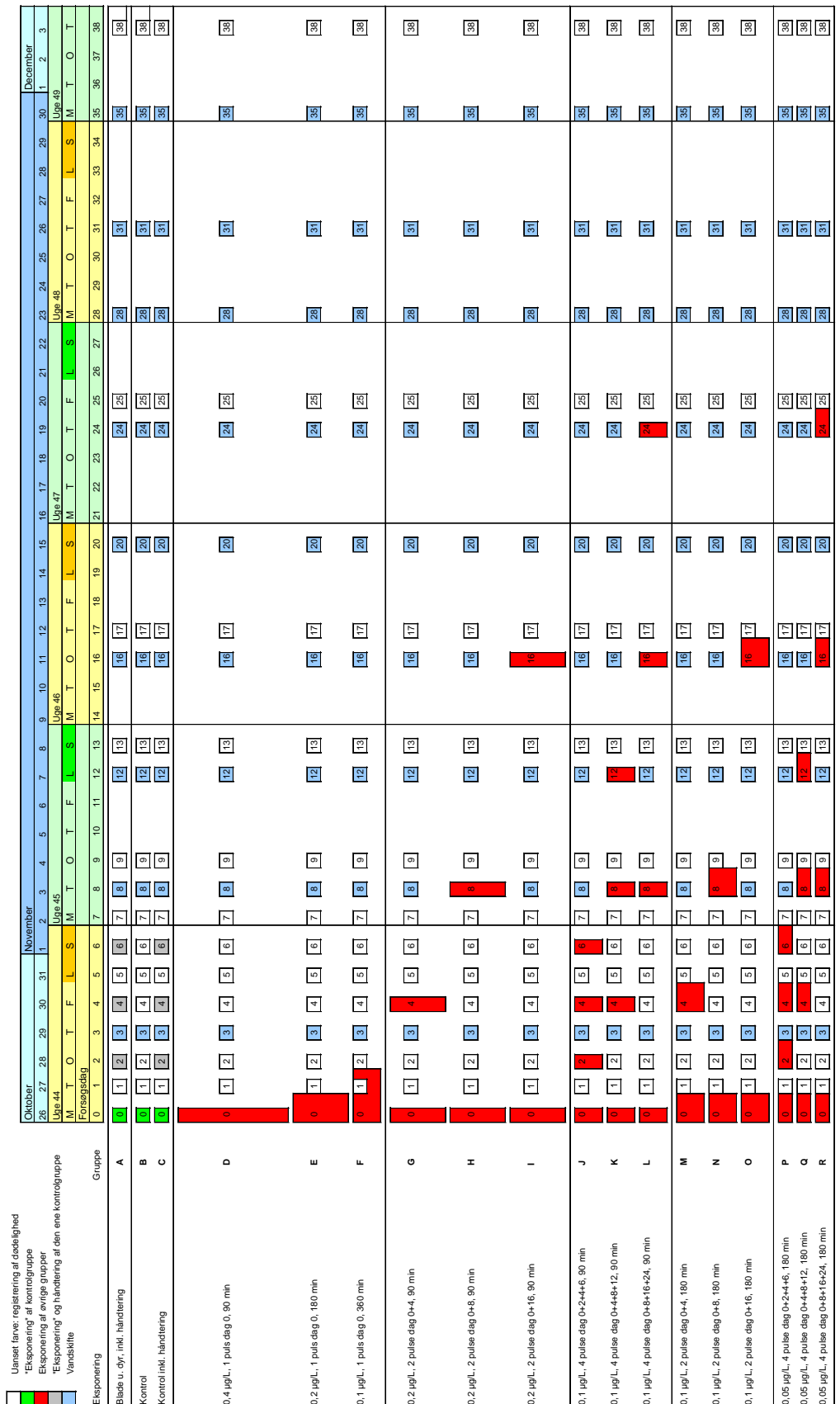


De aktuelle koncentrationer for lambda-cyhalothrin blev alene bestemt på dag 0, hvor alle grupper blev eksponeret. For hver gruppe blev tre 1-liters vandprøver, hver puljet fra to eksponeringsakvarier, analyseret. Af ressourcemæssige hensyn blev de aktuelle koncentrationer ikke bestemt på de efterfølgende eksponerings-dage, hvilket vurderes at have været forsvarligt, fordi eksponeringerne blev udført efter en stram protokol. Vandprøverne blev analyseret for indhold af pyrethroid inden for 24 timer ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet, som beskrevet i afsnit 2.5, og de nominelle og aktuelle koncentrationer fremgår af tabel 2.6. I resultatafsnittet er angivet de nominelle koncentrationer i tekst, tabeller og figurer.

Efter endt eksponering blev dyrene igen forsigtigt hældt gennem en sigte og skyllet 3 på hinanden følgende gange i akvarier med vandløbsvand, hvorefter de blev overført til de oprindelige akvarier, hvor vandet var blevet skiftet, og tilbudt to konditionerede elleblade.

TABEL 2.6. NOMINELLE OG AKTUELLE KONCENTRATIONER DAG 0 I FORSØGET OMHANDLENDE BETYDNINGEN AF PULSVARIGHED OG INTERPULS-VARIGHED FOR OVERLEVELSE OG STOFOMSÆTNING HOS *G. PULEX*.

Gruppe	Pulsvarighed (min)	Lambda-cyhalothrin-koncentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
		Nominel	Aktuel (gns $\pm$ SD, n=3)
B, C	90	0	ikke detekteret
D	90	0,4	0,266 $\pm$ 0,055
E	180	0,2	0,180 $\pm$ 0,026
F	360	0,1	0,055 $\pm$ 0,038
G, H, I	90	0,2	0,148 $\pm$ 0,002
J, K, L	90	0,1	0,080 $\pm$ 0,010
M, N, O	180	0,1	0,072 $\pm$ 0,013
P, Q, R	180	0,05	0,056 $\pm$ 0,009



FIGUR 2.5. FORSØGSDSIGN: BETYDNINGEN AF PULSVARIGHED OG INTERPULSVARIGHED FOR OVERLEVELSE OG STOFOMSÆTNING HOS *G. PULEX*. I HVER GRUPPE BLEV 10 STK 1-LITERS AKVARIER MED 20 *G. PULEX* ANVENDT.

### 2.3.2 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af *Gammarus pulex*

#### 2.3.2.1 Overordnet forsøgsdesign

Formålet med dette forsøg var at få en detaljeret indsigt i det tidlige forløb for reproduktionen, og fokus var derfor på at følge enkelte par med hyppige observationer. Hanner og hunner danner par, hvor hver han bærer rundt på en hun i 1-4 uger afhængigt af vandtemperaturen (Nilsson 1977, Sutcliffe 1992). Parringen foregår i forbindelse med hudskifte hos hunnen. Æggene lægges i en udvendig rugehule, hvori de befrugtes af hannen, og hvori ungerne udvikles, indtil de slippes ud i ”friheden”.

I alt 11 grupper af 11 par af voksne *Gammarus pulex* blev udsat for henholdsvis 0, 1, 2 eller 4 pulse à 90 minutters varighed med 2 dages mellemrum ved koncentrationer af lambda-cyhalothrin på enten 0, 0,05, 0,1 eller 0,2 µg L<sup>-1</sup>. To kontrolgrupper blev anvendt: Én gruppe (A) kontrolpar, der kun blev håndteret én gang, og én gruppe (B) kontroldyr, der blev håndteret fire gange, for at evaluere betydningen af håndteringsstress. Forsøgsdesignet er opsummeret i tabel 2.7, hvor også de aktuelle koncentrationer er angivet. Forsøget blev gennemført marts – april 2011.

TABEL 2.7. EFFEKTER AF GENTAGNE PYRETHROIDPULSE PÅ REPRODUKTION HOS PAR AF VOKSNE *GAMMARUS PULEX*. DER BLEV ANVENDT 11 PAR I HVER AF 11 GRUPPER. DER BLEV ANVENDT TO KONTROLGRUPPER, A OG B, DER GENNEMGIK EKSPONERINGSPROCEDUREN HENHOLDSVIS 1 OG 4 GANGE FOR AT UNDERSØGE EFFEKTEN AF HÅNTERINGEN ALENE. DE AKTUELLE KONCENTRATIONER ER FOR HVER EKSPONERINGSKONCENTRATION BESTEMT I TRIPLIKATER PÅ DAG 0, OG GENNEMSNIT±SEM ER ANGIVET

Gruppe	Koncentrationer (µg L <sup>-1</sup> )		Antal pulse	Eksponeringsdage
	Nominelle	Aktuelle		
A	0	0	1	0
B	0	-	4	0, 2, 4, 6
C	0,05	0,041±0,001	1	0
D	0,05	-	2	0, 2
E	0,05	-	4	0, 2, 4, 6
F	0,1	0,075±0,002	1	0
G	0,1	-	2	0, 2
H	0,1	-	4	0, 2, 4, 6
I	0,2	0,223±0,025	1	0
J	0,2	-	2	0, 2
K	0,2	-	4	0, 2, 4, 6

Overlevelsen af voksne individer, pardannelsen, produktionen af juvenile, samt den efterfølgende overlevelse af juvenile blev registreret. Endvidere blev de voksnes størrelse ved forsøgets start registreret. Med dette design er det således muligt at sammenligne effekten af 1, 2 eller 4 pulse ved forskellige koncentrationsniveauer. Endvidere muliggør kombinationen af de valgte antal af pulse og eksponeringskoncentrationer, som i ovennævnte forsøg (afsnit 2.3.1), visse direkte sammenligninger ved tre niveauer af ækvivalenteksponering:

Ækvivalenteksponering =  $9 \mu\text{g min L}^{-1}$

- én puls på 90 min ved  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$
- to pulse hver på 90 min ved  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$

Ækvivalenteksponering =  $18 \mu\text{g min L}^{-1}$

- én puls på 90 min ved  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$
- to pulse hver på 90 min ved  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$
- fire pulse hver på 90 min ved  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Ækvivalenteksponering =  $36 \mu\text{g min L}^{-1}$

- to pulse hver på 90 min ved  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$
- fire pulse hver på 90 min ved  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 2.3.2.2 *Forsøgsdyr*

Et stort antal *G. pulex* (>5000) blev indsamlet i Sandemandsbækken umiddelbart (1-3 dage) inden forsøgets start. Efter hjemkomsten blev dyrene overført til større baljer indeholdende beluftet vand og plantemateriale fra indsamlingsstedet, og præ-akklimeret i 1-3 dage. Kun de dyr, der blev tilbageholdt på en sigte med en maskestørrelse på 1,5 mm, blev anvendt i forsøgene, da disse dyr var større end 7-8 mm og dermed voksne (Welton 1979). Disse dyr blev brugt til begge reproduktionsforsøg med såvel par som forsøgspopulationer (2.3.3).

#### 2.3.2.3 *Den eksperimentelle enhed*

Den eksperimentelle enhed under forsøget var et 1-liters plast-akvarium indeholdende 250 mL vand fra indsamlingsstedet, og efter præ-akklimeringen kunne i alt 121 par udvælges i ovennævnte baljer. Disse blev dagen inden den første eksponering fordelt tilfældigt med 11 par i hver af de 11 grupper, og der var ingen forskel i størrelsesfordelingen mellem grupperne. Vandet blev skiftet to gange ugentligt gennem hele forsøget. Forsøget blev udført ved  $15^\circ\text{C}$  med en døgnrytme med 12 timers lys og 12 timers mørke.

#### 2.3.2.4 *Bladmateriale*

Til dette forsøg blev blade af Rød-El indsamlet og konditioneret som beskrevet ovenfor (afsnit 2.3.1.4). Omsætningen af blade pr. par blev ikke registreret, og dyrene blev under hele forsøget tilbudt konditionerede elleblade *ad libitum*.

#### 2.3.2.5 *Registrering af overlevelse og reproduktion*

Dyrenes overlevelse og reproduktion blev registreret på følgende dage efter den første eksponering: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 16, 23, 27, 30, 35, 37, 41 og 44. Dag 10 blev der ikke længere observeret parring, og hannerne blev taget fra hunnerne for at undgå kannibalistisk adfærd over for disse eller eventuelle frigivne juvenile (Lewis et al. 2010). Hannernes overlevelse er således kun fulgt indtil dag 10. Hunnernes kannibalistiske adfærd overfor de juvenile er undertrykt i tiden umiddelbart inden og efter frigivelsen af disse fra rugehulen (Lewis et al. 2010). Frigivne juvenile blev løbende taget fra moderdyret og overført til separate 1-liters plast-akvarier, og levedygtigheden af disse juvenile blev evalueret ved at registrere andelen af overlevende 14 dage efter deres frigivelse fra moderens rugehule. Enkelte hunner frigav juvenile over flere dage. Den sidste observation af frigivne juvenile var dag 37, og forsøget blev afsluttet dag 44, hvor overlevelsen af hunnerne blev registreret.

#### 2.3.2.6 Eksponeringsprocedure

Umiddelbart inden eksponeringerne blev bladmaterialet midlertidigt fjernet fra akvarierne, og dyrene (parrene) blev forsigtigt opfanget i en sigte og overført til eksponeringsakvarier, hvorefter bladmaterialet blev lagt tilbage i de oprindelige akvarier. Eksponeringsakvarierne indeholdt 250 mL kunstigt ferskvand (afsnit 2.3.1.7), hvortil der umiddelbart inden eksponeringens start var blevet tilsat de ønskede mængder lambda-cyhalothrin opløst i ethanol. Kontrolgrupperne fik blot tilsat ethanol. Grundig omrøring sikrede en hurtig opblanding. Den anvendte koncentration af ethanol var 0,1 ‰ (afsnit 2.3.1.7). De aktuelle koncentrationer for lambda-cyhalothrin blev alene bestemt på dag 0, hvor alle grupper blev eksponeret. For hver gruppe blev tre 1-liters vandprøver, hver puljet fra fem eksponeringsakvarier, analyseret for indhold af pyrethroid inden for 24 timer ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet, som beskrevet i afsnit 2.5. De nominelle og aktuelle koncentrationer fremgår af tabel 2.7. I resultatafsnittet er angivet de nominelle koncentrationer i tekst, tabeller og figurer. Efter endt eksponering blev dyrene igen forsigtigt hældt gennem en sigte og skyllet 3 på hinanden følgende gange i akvarier med vandløbsvand, hvorefter de blev overført til de oprindelige akvarier, hvor vandet var blevet skiftet, og tilbudt konditionerede elleblade *ad libitum*.

### 2.3.3 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af *Gammarus pulex*

#### 2.3.3.1 Overordnet forsøgsdesign

Formålet med dette forsøg var primært at få bedre kvantitative data for produktionen af juvenile, og derfor blev reproduktionen hos et stort antal mindre populationer fulgt med ugentlige observationer. Forsøgsdesignet til dette forsøg var stort set identisk med ovennævnte forsøg med par (afsnit 2.3.2), idet den eneste ændring var, at hver gruppe bestod af 5 eksperimentelle enheder bestående af 5 voksne *Gammarus pulex*. Kun en mindre del af disse voksne dyr var ved forsøgets start i par, og disse populationer repræsenterer således en naturlig situation i et vandløb, hvor visse hunner allerede er befrugtede, mens andre enten er i par eller uparrede. Gruppeinddeling, pulsantal, eksponeringskoncentrationer og -varighed var identiske med tabel 2.7 (afsnit 2.3.2.1), hvoraf forsøgsdesignet fremgår. Forsøget blev gennemført april – maj 2011.

#### 2.3.3.2 Forsøgsdyr

Indsamlingen, opbevaringen og sorteringen af forsøgsdyr er beskrevet ovenfor (afsnit 2.3.2.2). Den eneste forskel var, at dyrene blev præ-akklimeret i 8-10 dage.

#### 2.3.3.3 Den eksperimentelle enhed

Den eksperimentelle enhed under forsøget var et 10-liters plast-akvarium indeholdende 6-7 L vand fra indsamlingsstedet. I dette akvarium blev nedsænket et lidt mindre akvarium med netbund (maskevidde 1 mm) og indeholdende de voksne dyr. Netbunden tillod de juvenile at passere og søge væk fra de voksne dyrs mulige prædation (Lewis et al. 2010). Efter præ-akklimeringen blev 59 forsøgspopulationer à 50 voksne dyr udtaget fra baljerne omtalt under afsnit 2.3.2.2. Fire tilfældigt udvalgte forsøgspopulationer blev udtaget til bestemmelse af kønsratio. De resterende populationer blev inden den første eksponering tilfældigt fordelt med 5 populationer i hver af de 11 grupper. Vandet blev skiftet ugentligt gennem hele forsøget. Forsøget blev udført ved 15 °C med en døgnrytme med 12 timers lys og 12 timers mørke.

#### 2.3.3.4 *Bladmateriale*

Til dette forsøg blev blade af Rød-El indsamlet som beskrevet ovenfor (afsnit 2.3.1.4). Som forberedelse til forsøget blev blade tørret ved 60 °C i 2 døgn. Derefter blev 10 g tørrede blade afvejet (præcision: 1 mg) i nummererede foliebakker til hver eksperimentel enhed. Gennem forsøget blev 3-4 af disse blade ad gangen løbende konditioneret i 7 dage i 300 mL åvand ved 20-25 °C, således at dyrene ved forsøgets start, og derefter én gang ugentligt i forbindelse med et vandskifte, blev tilbudt frisk-konditionerede blade *ad libitum*. Efter konditioneringen, og inden bladene blev givet til dyrene, blev bladene skyllet grundigt i åvand for at fjerne lækkede organiske forbindelser fra bladoverfladen. Ved vandskiftet blev tilbageværende bladstykker opsamlet i nummererede foliebakker til senere vejning. Fem yderligere portioner à 10 g blade blev afvejet, således at massetabet under de 7 dages konditionering kunne kvantificeres parallelt med de øvrige bladportioner. Ved forsøgets afslutning blev tilbageværende bladmateriale tørret (60 °C i 2 døgn) og afvejet (præcision: 1 mg).

#### 2.3.3.5 *Registrering af overlevelse og reproduktion*

Antallet af producerede juvenile blev registreret på følgende dage efter den første eksponering: 28, 35, 42 og 49. Ved hver registrering blev de juvenile optalt og fjernet fra akvarierne. Der blev ikke foretaget yderligere målinger på disse dyr. Juvenile frigivet indtil dag 28 blev udeladt, da disse skyldtes parringer i felten, ligesom juvenile frigivet efter dag 49 kunne stamme fra en 2. parring i akvarierne. Disse grænser blev fastsat ud fra de detaljerede resultater for tidsudviklingen i reproduktion i forsøget med par (afsnit 2.3.2). Forsøget blev afsluttet dag 57, hvor overlevelsen af de voksne blev registreret. Under hele forsøget blev hanner og hunner holdt sammen, og muligheden for kannibalistisk adfærd, også over for juvenile, var således til stede, hvilket svarer til situationen i et naturligt vandløb. Antallet af par i løbet af forsøget blev ikke registreret.

#### 2.3.3.6 *Eksponeringsprocedure*

Proceduren for eksponering og prøvetagning foregik som beskrevet i afsnit (2.3.2.6), idet de eneste afvigelser var, at eksponeringsakvarierne indeholdt 500 mL kunstigt ferskvand, og at de tre udtagne vandprøver til analyse for indhold af pyrethroid var fra tre tilfældigt udvalgte akvarier for hvert koncentrationsniveau.

## 2.4 STATISTISKE METODER

Den statistiske analyse af de forskellige delforsøg er beskrevet i nedenstående. I alle tests var signifikansniveauet  $\alpha=0,05$ , og de i resultatafsnittet angivne p-værdier er ved multiple parvise sammenligninger korrigeret i overensstemmelse med nedenstående.

### **2.4.1 Effekter af gentagne pulseksponeringer med pyrethroid på smådyr i et naturligt vandløb**

#### 2.4.1.1 *Multivariat analyse af taxon sammensætning v.h.j.a. non-metric multidimensional scaling (MDS) og analyse af similaritet (ANOSIM)*

For at evaluere betydningen af gentagne pulseksponeringer for taxon sammensætningen i invertebratsamfundet i forsøgsstrækningerne i Stavis Å blev programmet PRIMER (version 5.2.0 for Windows, PRIMER-E Ltd., Plymouth, UK) anvendt. Dette program blev oprindeligt udviklet til at evaluere samfundsstruktur, f.eks. ved sammenligninger af artsdiversitet i faunaprøver

fra et større antal prøvetagningslokaliteter i forbindelse med feltstudier. Datagrundlaget til PRIMER er derfor typisk individantal eller biomasse for et større antal arter/taxa observeret på et antal forskellige lokaliteter, f.eks. langs en forureningsgradient. For såvel Surber- som bladpakkeprøverne blev taxon sammensætningen før eksponering (dag -1) og ved forsøgets afslutning (dag 29) analyseret hver for sig. Taxa med et samlet individantal under 20 blev udeladt af denne analyse, da de vurderes at være for sporadisk forekommende til statistisk evaluering.

Proceduren i PRIMER var følgende:

1) Bray-Curtis-similaritetskoefficienter for alle par af faunaprøver blev beregnet, på baggrund af fjerderods-transformerede ( $x' = x^{1/4}$ ) individantal for de forskellige taxa, og opstillet i en similaritetsmatrix. Transformationen blev foretaget for at nedvægte dominerende i forhold til mere sjældne taxa (Clarke & Warwick 1994).

Formlen for Bray-Curtis-similaritetskoefficienten for to faunaprøver  $j$  og  $k$  er:

$$S_{jk} = 100 \left( 1 - \frac{\sum_{i=1}^p |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^p (y_{ij} + y_{ik})} \right)$$

hvor  $y_{ij}$  og  $y_{ik}$  er individantallene for taxon  $i$  i henholdsvis faunaprøve  $j$  og  $k$ .

$S_{jk}$  varierer således fra 100, hvis individantallene for alle taxa er ens i faunaprøverne  $j$  og  $k$ , til 0, hvis ingen af de taxa, der findes i faunaprøve  $j$ , forekommer i faunaprøve  $k$ , og omvendt.

2) På baggrund af ovennævnte similaritetsmatrix blev faunaprøverne ordineret ved non-metric multidimensional scaling (MDS), idet similaritetskoefficienterne rangordnes og anvendes til at lave MDS-plot (i 2D eller 3D), hvor faunaprøver, der er meget ens, placeres tæt på hinanden, mens meget forskelligartede faunaprøver placeres langt fra hinanden. MDS-plottene er således en grafisk præsentation af den fuldstændige kompleksitet i mønstrene af taxa i faunaprøverne fra de forskellige grupper.

3) Grupperne blev herefter sammenlignet statistisk ved en multivariat test kaldet ANOSIM (analysis of similarities), der konceptuelt minder om ANOVA (analysis of variances). En global test med alle grupper blev efterfulgt af multiple parvise sammenligninger af grupperne, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt.

#### 2.4.1.2 Non-parametrisk variansanalyse af enkelt-taxa

For visse af de hyppigst forekommende taxa i såvel Surber- som bladpakkeprøverne var det muligt at evaluere betydningen af gentagne pyrethroidpulse for ændringer i individantallet. For hver af disse taxa blev en Kruskal-Wallis' non-parametrisk en-vejs ANOVA med alle grupper anvendt, efterfulgt af multiple parvise sammenligninger af grupperne ved non-parametriske Mann-Whitney tests, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt. Disse test blev udført i SAS<sup>®</sup> (version 9.1 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### 2.4.1.3 Evaluering af bladvægttab og klorofyl

Vægttabet fra bladpakkerne blev evalueret ved en to-vejs ANOVA, med antal pulse og forsøgsdag som de to faktorer, efterfulgt af en sekventielt Bonferroni-

korrigeret Fisher's Least Significant Difference test, idet data forinden var blevet logaritmisk transformeret ( $x' = \log x$ ) for at opfylde krav om varians-homogenitet og normalfordeling. For klorofylldata var det ikke ved transformation muligt at opnå varianshomogenitet for alle grupperne på de to prøvetagningsdage samtidigt. Derfor blev de to prøvetagningsdage indledningsvist evalueret separat ved en-vejs ANOVA på utransformeret data, og da disse analyser ikke kunne påvise forskelle mellem grupperne inden for samme dag, blev der ikke udført multiple parvise sammenligninger. Efterfølgende blev klorofylldata for de to dage sammenlignet for hver enkelt gruppe ved non-parametriske Mann-Whitney tests, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt. Disse test blev udført i SAS® (version 9.1 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### **2.4.2 Effekter på biodiversitet og funktion hos smådyrssamfund i kunstige vandløb**

##### *2.4.2.1 Multivariat analyse af artssammensætning v.h.j.a. non-metric multidimensional scaling (MDS) og analyse af similaritet (ANOSIM)*

Artssammensætningen i invertebratsamfundene i forsøgsrenderne i Lemming blev evalueret som beskrevet for Stavis Å i afsnit 2.4.1.1.

##### *2.4.2.2 Non-parametrisk variansanalyse af enkelt-taxa*

De hyppigst forekommende taxa i Surber- og bladpakkeprøverne fra forsøgsrenderne i Lemming blev evalueret som beskrevet for Stavis Å i afsnit 2.4.1.2.

##### *2.4.2.3 Evaluering af bladvægttab og klorofyl*

Vægttabet fra bladpakkerne skulle have været evalueret ved en nested to-vejs ANOVA, med antal pulse og forsøgsdag som de to faktorer, med renderne nested under faktoren antal pulse. Det var imidlertid ikke muligt at opnå varianshomogenitet ved transformering af data. Derfor blev de to prøvetagningsdage indledningsvist evalueret separat ved to nestede en-vejs ANOVA'er på utransformeret data, efterfulgt af en sekventielt Bonferroni-korrigeret Fisher's Least Significant Difference test. Desuden blev vægttabene på de to dage sammenlignet for hver enkelt gruppe ved  $t$ -test med korrektion for uens varianser. En sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm), baseret på det samlede antal parvise sammenligninger i ovennævnte ANOVA'er og  $t$ -tests, blev anvendt. Klorofylldata blev evalueret ved en nested to-vejs ANOVA, med antal pulse og forsøgsdag som de to faktorer, med renderne nested under faktoren antal pulse. Da der i denne test kun var en signifikant forskel mellem de to forsøgsdage, og ikke mellem grupperne, blev der ikke udført multiple parvise sammenligninger. Disse test blev udført i SAS® (version 9.1 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### **2.4.3 Effekter på overlevelse, reproduktion og stofomsætning hos *Gammarus pulex* i laboratoriet**

##### *2.4.3.1 Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos *Gammarus pulex**

Data for overlevelsen ved forsøgets afslutning blev evalueret ved parvise Chi<sup>2</sup>-tests, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt. Bladtabene blev evalueret ved en-vejs ANOVA, idet de utransformeret data opfyldte krav om normalitet og varianshomogenitet. Disse test blev udført i Excel 2010 og SigmaPlot® (version 11.0).



#### 2.4.3.2 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af *Gammarus pulex*

Overlevelsen hos hunner og hanner blev evalueret ved Kaplan-Meier Log-Rank overlevelsesanalyse, efterfulgt af sekventielt Bonferroni-korrigerede parvise sammenligninger. Data for antal reproducerende hunner, antal unger pr. gruppe og antal overlevende unger pr. gruppe efter 14 dage blev evalueret ved parvise  $\text{Chi}^2$ -tests, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt. Data for sidste dag i par, inkubationstiden og antallet unger pr. reproducerende hun blev evalueret ved en-vejs ANOVA, mens procentdelen af overlevende unger pr. kuld efter 14 dage blev evalueret ved en non-parametrisk Kruskal-Wallis en-vejs ANOVA. Disse test blev udført i Excel 2010 og SigmaPlot<sup>®</sup> (version 11.0).

#### 2.4.3.3 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af *Gammarus pulex*

Antallet af overlevende voksne og af unger produceret blev evalueret ved parvise  $\text{Chi}^2$ -tests, idet en sekventiel Bonferroni-korrektion (Bonferroni-Holm) blev anvendt. Omsætningen af blade blev evalueret ved en-vejs ANOVA, idet de utransformerede data opfyldte krav om normalitet og varianshomogenitet. Disse test blev udført i Excel 2010 og SigmaPlot<sup>®</sup> (version 11.0).

## 2.5 KVANTIFICERING AF LAMBDA-CYHALOTHRIN

Metoden til bestemmelse af lambda-cyhalothrin er udviklet i et tidligere pesticidforskningsprojekt (Nørum et al. 2006). Metodens princip er baseret på fastfaseekstraktion af pyrethroid kontamineret ferskvand efterfulgt af opkoncentrering ved inddampning, samt kvantificering ved omvendt-fase HPLC-MS.

### 2.5.1 Forbehandling af vandprøver

Umiddelbart efter opsamling af afmålt vandprøve indeholdende lambda-cyhalothrin tilsættes en kendt mængde intern pyrethroid standard (esfenvale-rat).

### 2.5.2 Fastfaseekstraktion

Ekstraktion af lambda-cyhalothrin fra vandprøven foretages på en C18-søjle (Sep Pak Vac, 6 cc, 1 g, C18 cartridges, fra Waters). Søjlen konditioneres med 5 mL metanol og vaskes med 5 mL Milli-Q vand. Prøven påsættes søjlen ved 20 kPa vakuum, svarende til ca. 3 mL  $\text{min}^{-1}$ . Prøvevolumen blev afpasset efter den forventede koncentration (og der blev taget højde for dette volumen ved beregning af koncentrationen i prøven). Dernæst vaskes søjlen med 5 mL Milli-Q vand og tørres i 1-2 minutter ved 30-40 kPa vakuum. Pesticidet elueres med 4 mL methanol. Eluatet inddampes efterfølgende til tørhed under luftstrøm og genopløses i 0,300 mL 75% metanol.

### 2.5.3 LC-MS analyse

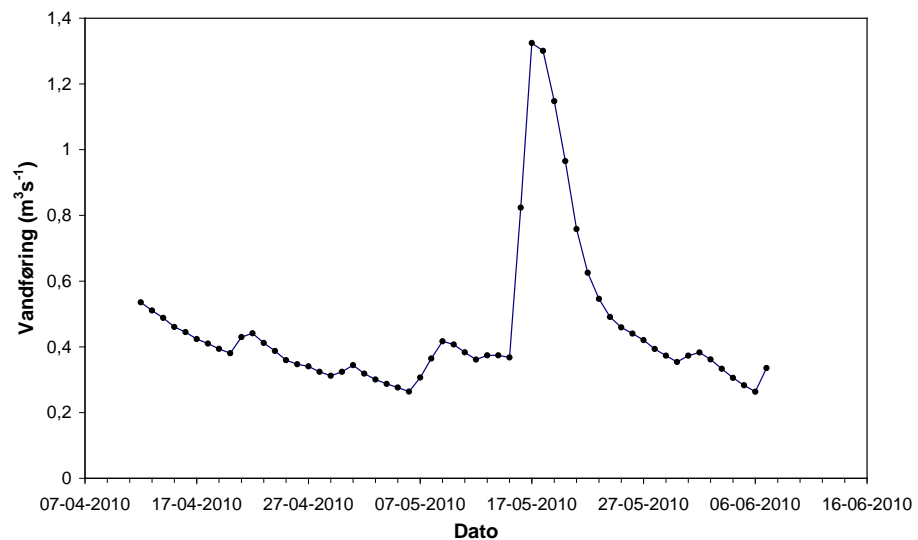
Det anvendte Hewlett Packard LC-MSD-system består af en HP Series 1100 HPLC (solvent degasser, binær pumpe, autosampler og termostatreguleret kolonneafdeling) og et G1946A MSD quadropole massespektrometer udstyret med electrospray ionisation (ESI) i positiv mode. Til kvantificeringen anvendes en HPLC-kolonne (C18, 150×2,1 mm, Phenomenex fra Subware) med forkolonne af samme materiale. Der anvendtes en væskegennemstrøm-

ning på  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , en injektion af  $50 \text{ }\mu\text{L}$  prøve, og en kolonnetemperatur på  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Følgende LC solventer blev brugt: Eluent A:  $10 \text{ mM}$  ammoniumacetat:methanol,  $990:10 \text{ (v:v)}$ . Eluent B:  $10 \text{ mM}$  ammoniumacetat:methanol,  $10:90 \text{ (v:v)}$ . Der elueres med følgende gradient (Tid, % B): ( $0 \text{ min}$ ,  $75\%$ ); ( $3 \text{ min}$ ,  $100\%$ ); ( $14 \text{ min}$ ,  $100\%$ ); ( $14,1 \text{ min}$ ,  $75\%$ ); postrun-tid:  $6 \text{ min}$ ,  $25\%$  B. Massespektrometer-opsætning: Mode: ESI positiv (SIM:  $m/z$   $467$  for lambda-cyhalothrin). Der benyttes intern standardisering med esfenvalerat (SIM:  $m/z$   $437$ ). Drying gas temperature:  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ . Drying gas flow:  $10 \text{ L min}^{-1}$ . Nebulizer pressure:  $30 \text{ psig}$ . Capillary voltage:  $3500 \text{ V}$ . Fragmentor:  $50 \text{ V}$ . Standardkurven beregnes ud fra standarderne:  $0,7$ ;  $3,5$ ;  $35,0$ ;  $70,0$  og  $350 \text{ ng mL}^{-1}$  injiceret standard. Lambda-cyhalothrin og esfenvalerat elueres efter henholdsvis  $7,4 \text{ min}$  og  $8,0 \text{ min}$ .

## 3 Resultater

### 3.1 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB

Forsøget blev teknisk gennemført stort set som planlagt. Imidlertid var det ikke forventet, at vandføringen under forsøget ville variere så meget, som det blev tilfældet. Fra at vandføringen var relativt lav ved forsøgets start, hvilket er normalt for det pågældende vandløb på den pågældende årstid, øgedes den med en faktor 3,5 over flere dage i midten af maj som følge af meget store mængder nedbør, som faldt inden for få timer (figur 3.1, tabel 3.1). Vandløbet blev derved bredfyldt, således som det ellers kun forekommer i det sene efterår. Det betød, at forsøgsrenderne blev helt overskyldt. Efter denne ekstreme hændelse faldt vandføringen til nær normalt niveau i løbet af ca. 1 uge.

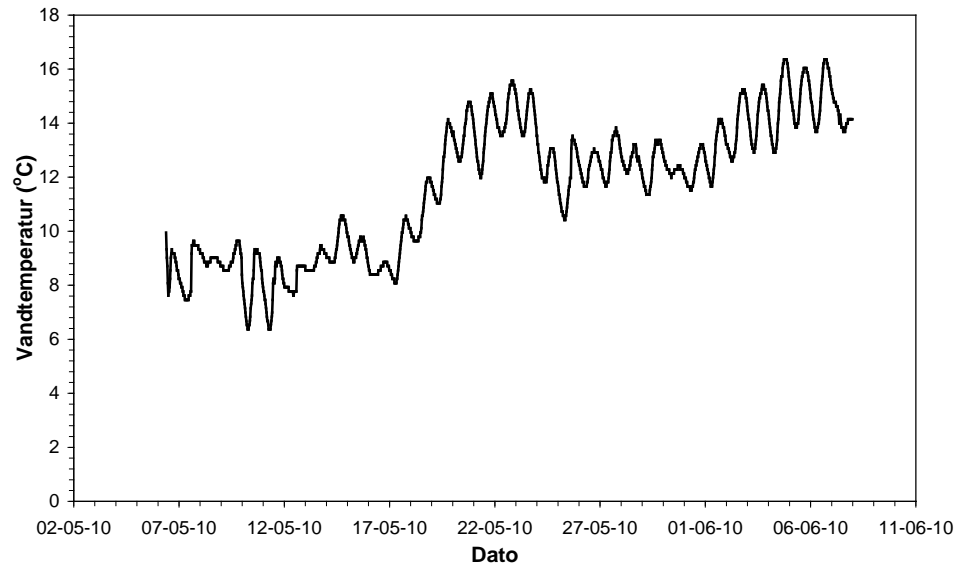


FIGUR 3.1. DAGLIG VANDFØRING I STAVIS Å V. STAVIS BRO I PERIODEN (27/4-2/6 2010). MÅLESTATIONEN ER PLACERET CA. 7 KM NEDSTRØMS FOR FORSØGSSTRÆKNINGEN, MEN AFSPEJLER VARIATIONERNE I VANDFØRING VED DENNE.

TABEL 3.1. NEDBØR OG LUFTEMPERATUR VED DMI'S MÅLESTATION I ODENSE.

Periode	Nedbør, i alt (mm)	Nedbør, max. døgn (mm)	Døgn med nedbør	Middel lufttemperatur (°C)	Normal lufttemperatur (°C)
26/4-3/5	10	5,6	4	8,5	10,5
3/5-10/5	17	13,9	3	6,3	9,7
10/5-17/5	33	24,1	5	7,6	10,9
17/5-24/5	4	3,7	4	13,7	11,9
24/5-31/5	18	11,7	5	10,3	12,9
31/5-7/6	23	23,0	2	14,5	13,8

Vandtemperaturen i Stavis Å varierede gennem forsøgsperioden fra 6,4 til 16,4 °C med et gennemsnit på 11,7 °C (Figur 3.2). Luftertemperaturen var gennemsnitlig 1,4 °C under normalen i løbet af forsøgsperioden (Tabel 3.1). Der var en tydelig døgnrytme i temperaturen med op til 3,3 °C's forskel mellem højeste dag og laveste nat værdi.



FIGUR 3.2. VANDTEMPERATUR I STAVIS Å MÅLT PÅ FORSØGSSTRÆKNINGEN I PERIODEN, HVOR FELTFORSØGENE BLEV GENNEMFØRT.

Forsøgsrenderne viste sig ikke at være 100 % tætsluttende mod bunden, hvilket blev mere tydeligt efterhånden som forsøget skred frem. Utæthederne blev især større som følge af den forøgede afstrømning midt i forsøgsperioden. Under selve eksponeringerne med pyrethroid var utæthederne dog minimale, hvilket fremgår af tabel 2.2, hvor der kun i et tilfælde blev målt (lavt) indhold af pyrethroid i en rende, som ikke blev eksponeret.

Der var ikke signifikant indbyrdes forskel i vandføringen igennem de 4 forsøgsrender (Friedman's  $\chi^2$  test,  $P=0,18$ ).

Under pulsbehandlingerne var de målte koncentrationer af lambda-cyhalothrin i de eksponerede render i gennemsnit  $0,084 \mu\text{gL}^{-1}$ .

### 3.1.1 Makroinvertebrater

Der blev i Surberprøverne fundet i alt 52 forskellige taxa fordelt på 9 226 individer. Dominerende taxa var ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og klobillen *Limnius volckmari*, der tilsammen udgjorde 60 % af det samlede individantal. Subdominerende var diverse børsteorme (Tubificidae, andre Oligochaeta), døgnfluen *Baetis rhodani*, slørvingen *Leuctra fusca*, klobillen *Elmis aenea*, vårfluen *Agapetus ochripes*, samt tovingerne *Dicranota*, Orthoclaadiinae og Tanytarsini, som hver udgjorde 1,7-6,3 % af individantallet (Tabel 3.2).

Før første eksponering med pyrethroid blev der samlet set på vandløbsbunden fundet en samlet tæthed af makroinvertebrater på  $5360 \pm 500$  individer  $\text{m}^{-2}$  (middelværdi  $\pm$  SD,  $N=40$ ) eller 4650 individer  $\text{m}^{-2}$  (median).

I de udlagte bladopaker blev tilsvarende fundet tilsammen 50 taxa fordelt på 11 258 individer. Dominerende taxa var *Gammarus pulex* og Orthoclaadiinae, der tilsammen udgjorde hele 78 % af de samlede individantal. Subdominerende var børsteorme (Oligochaeta), *Baetis rhodani*, *Leuctra fusca*, kvægmyg (Simuliidae) og dansemyg (Tanytarsini) som hver især udgjorde 1,5-6,9 % af det samlede individantal (Tabel 3.2).

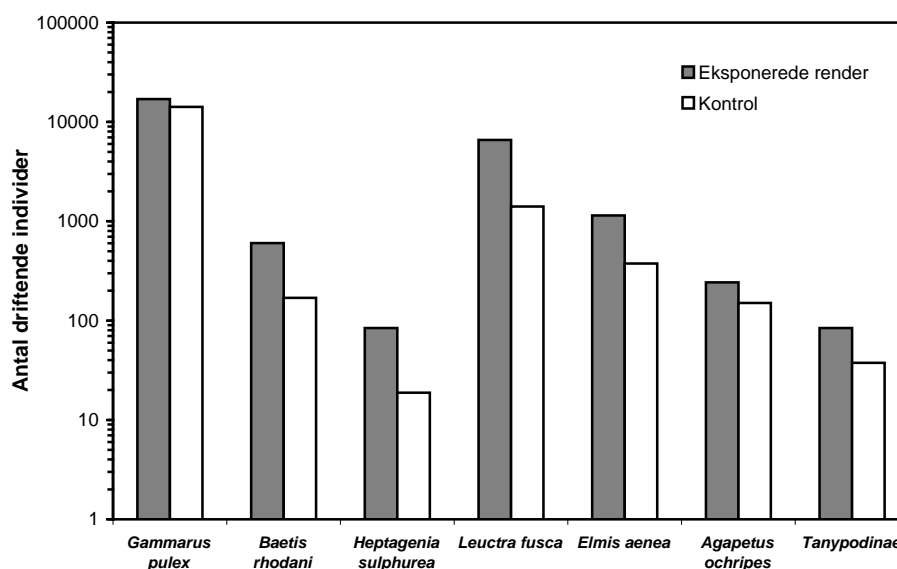
TABEL 3.2. OVERORDNET ARTSSAMMENSÆTNING AF MAKROINVERTEBRATER I PRØVER FRA FORSØGSRENDERNE I STAVIS Å.

Taxon	Surber prøver		Bladpakker prøver		Driftprøver prøver	
	Antal	%	Antal	%	Antal	%
<i>Dugesia gonocephala</i>	10	0,11	2	0,02		
Nematomorpha	1	0,01				
Nematoda	3	0,03				
Tubificidae	153	1,66	5	0,04	100	0,06
<i>Eiseniella tetraedra</i>	9	0,10				
Oligochaeta (indet)	386	4,20	259	2,30		
<i>Glossiphonia complanata</i>	9	0,10	13	0,12		
<i>Helobdella stagnalis</i>			1	0,01		
<i>Erpobdella octoculata</i>	2	0,02	9	0,08		
Hydrachnidia	2	0,02	2	0,02	12 275	7,54
<i>Asellus aquaticus</i>	14	0,15	18	0,16	187	0,11
<i>Gammarus pulex</i>	2 947	32,04	4 339	38,54	81 749	50,20
<i>Baetis rhodani</i>	578	6,29	178	1,58	4 256	2,61
<i>Heptagenia sulphurea</i>	110	1,20	9	0,08	281	0,17
<i>Caenis horaria</i>	3	0,03	2	0,02	173	0,11
<i>Paraleptophlebia submargi-</i>	1	0,01	1	0,01	13	0,01
<i>Ephemera danica</i>	20	0,22	1	0,01	9	0,01
<i>Taeniopteryx nebulosa</i>	1	0,01	1	0,01		
<i>Nemoura sp</i>	1	0,01	1	0,01		
<i>Leuctra fusca</i>	525	5,71	773	6,87	30 946	19,00
<i>Brychius elevatus</i>					8	0,00
Dytiscidae					218	0,13
<i>Orectochilus villosus</i>	8	0,09	6	0,05	229	0,14
Hydrophilidae	1	0,01	1	0,01	828	0,51
<i>Hydraena gracillis</i>	32	0,35	4	0,04	262	0,16
<i>Elmis aenea</i>	317	3,45	161	1,43	5 961	3,66
<i>Limnius volckmari</i>	2 600	28,27	34	0,30	1 439	0,88
<i>Oulimnius tuberculatus</i>	9	0,10	4	0,04	201	0,12
<i>Elodes minuta</i>	2	0,02	16	0,14	220	0,14
<i>Rhyacophila fasciata</i>	2	0,02	1	0,01	23	0,01
<i>Agapetus ochripes</i>	177	1,92	21	0,19	1 613	0,99
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	5	0,05	4	0,04	53	0,03
<i>Hydropsyche siltalai</i>	2	0,02	10	0,09		
<i>Limnephilus lunatus</i>			1	0,01		
<i>Halesus radiatus</i>	1	0,01	21	0,19		
<i>Potamophylax cingulatus</i>			1	0,01		
<i>Chaetopteryx villosa</i>			5	0,04		
Limnephilidae (indet)	3	0,03			32	0,02
<i>Silo pallipes</i>	7	0,08	4	0,04	172	0,11
<i>Athripsodes cinereus</i>	39	0,42	15	0,13	19	0,01
<i>Sericostoma personatum</i>	2	0,02			8	0,00
Psychodidae	1	0,01	1	0,01		
Culicidae					38	0,02
<i>Chaoborus sp</i>					30	0,02
Simuliidae	34	0,37	171	1,52	315	0,19
Heleinae	31	0,34	16	0,14	174	0,11
<i>Dicranota sp</i>	303	3,29	33	0,29	124	0,08
<i>Eleophila sp</i>	10	0,11			3	0,00
Tipulidae			3	0,02	33	0,02
Psychodidae					37	0,02
Tanypodinae	22	0,24	136	1,21	706	0,43
<i>Prodiamesa olivacea</i>	1	0,01	3	0,03	8	0,00
Orthoclaadiinae	247	2,69	4 415	39,22	10 964	6,73
Chironomini	118	1,28	122	1,08	1 475	0,91
Tanytarsini	272	2,96	370	3,29	3 643	2,24
Chironomidae (pupper)	89	0,97	45	0,40	3 830	2,35
Tabanidae	1	0,01				
Empididae	26	0,28	6	0,05	11	0,01
<i>Bithynia leachi</i>			2	0,02		
<i>Ancylus fluviatillis</i>	1	0,01	1	0,01		
<i>Radix balthica</i>	2	0,02				
<i>Pisidium sp</i>	47	0,51	2	0,02	21	0,01
<i>Sphaerium corneum</i>	8	0,09	6	0,05		
I alt	9 195	100	11 255	100	162 848	100

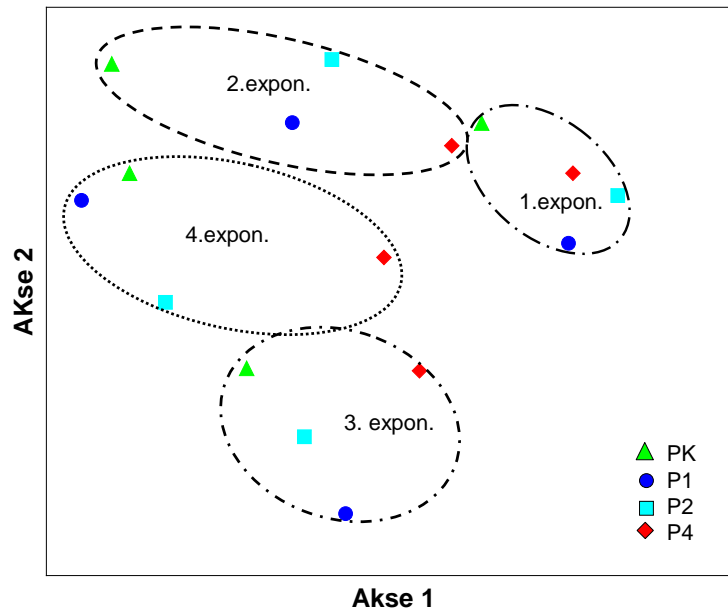
I driftprøverne blev i alt fundet 42 taxa (Tab. 3.2) med *Gammarus pulex* og *Leuctra fusca* som de dominerende arter (i alt 69 % af det samlede individantal). Der var betydelige forskelle mellem taxon sammensætningen i hhv. driften ud af renderne og ind i disse. Således dominerede *Gammarus pulex* (53,5 %), *Leuctra fusca* (20,5 %) og vandmider (Hydrachnidia) (8,1 %) i afløbet fra renderne i forbindelse med eksponeringen med pyrethroid (inkl. de ueksponerede render); de udgjorde således i alt 82 % af det samlede individantal. Mindre dominerende var *Baetis rhodani*, Orthoclaadiinae, og andre Chironomidae med i alt 8,7 %. I driften ind i renderne, som blev målt 14 dage efter sidste eksponering, dominerede Orthoclaadiinae fuldstændig (75,6 %), mens næst hyppigste taxa *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani* og *Leuctra fusca* tilsammen kun udgjorde 12,7 %. Driften ud af renderne var generelt større end driften ind i disse. Således var antallet af driftende individer ud af de eksponerede render i gennemsnit 4500 time<sup>-1</sup> og 1800 time<sup>-1</sup> i de ueksponerede render, mens der blev tilført 950 og 390 individer time<sup>-1</sup> hhv. om natten og dagen. Driften ind i renderne var desuden signifikant større om natten end om dagen for *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Oulimnius tuberculatus*, Tanytopodinae, Orthoclaadiinae, samt for samtlige taxa under ét (t-test, P<0,025; data ikke vist).

Under flommen den 16. maj blev der transporteret 3100 individer time<sup>-1</sup> gennem driftnettene opstrøms for renderne.

I forbindelse med eksponeringerne var driften ud af renderne – for arter/grupper som *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Heptagenia sulphurea*, *Leuctra fusca*, *Elmis aenea*, *Agapetus ochripes* og Tanytopodinae – signifikant størst i de render, som blev behandlet med pyrethroid. Det fremgår dels af figur 3.3, der viser resultaterne fra 1. eksponering, dels af en parvis t-test på data fra samtlige 4 eksponeringer (p<0,011, N=28). For en række andre talrige arter/grupper (Hydrachnidia, *Limnius volckmari*, Orthoclaadiinae, Tanytopodinae, Chironominae og Chironomidae-popper) var der imidlertid ingen forskel mellem pyrethroidbehandlede og ubehandlede render (parvis t-test, p=0,18, N=24).



FIGUR 3.3. DRIFT UD AF FØRSØGSRENDERNE I STAVIS Å UNDER OG UMIDDELBART EFTER FØRSTE EKSPONERING MED PYRETHROID. ANGIVET ANTAL INDIVIDER FOR HELE MÅLEPERIODEN (3,5 TIMER). FIGUREN VISER KUN TAXA, FOR HVILKE DRIFTEN UD AF DE PYRETHROIDEKSPONEREDE RENDER VAR STØRRE END DRIFTEN UD AF KONTROLRENDEREN.

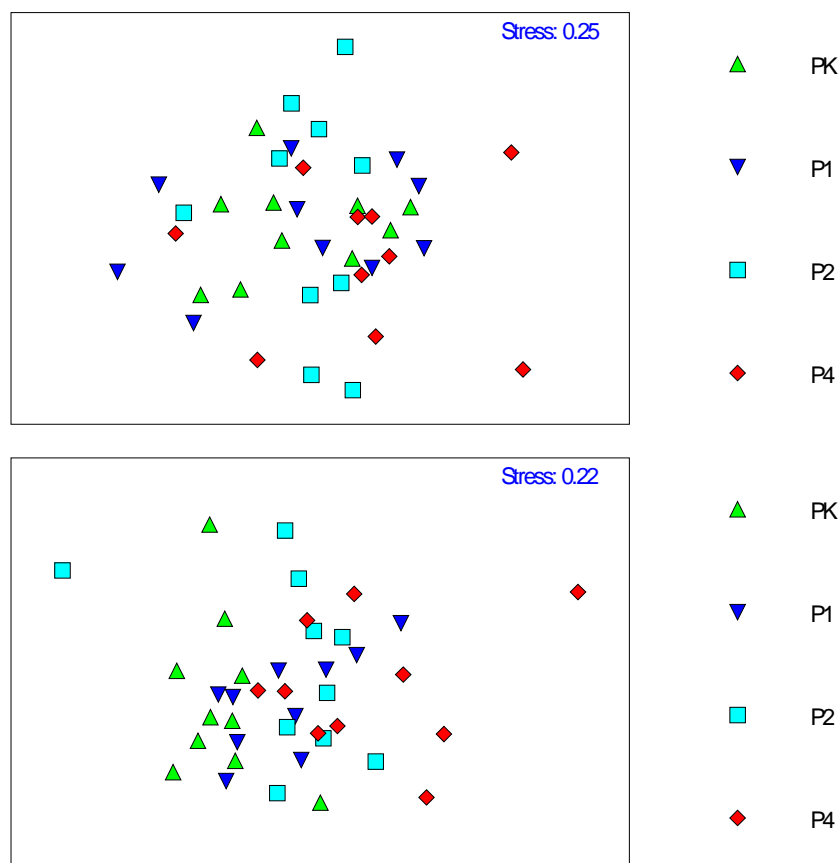


FIGUR 3.4. 2D-MDS BESKRIVELSE AF TAXON SAMMENSÆTNINGEN I DRIFT UD AF FORSØGSRENDERNE I STAVIS Å UNDER OG UMIDDELBART EFTER DE 4 EKSPONERINGER MED PYRETHROID. PK: UEKSPONEREREDE; P1: EKSPONERET DAG 0; P2: EKSPONERET DAG 0 OG 2; P4: EKSPONERET DAG 0, 2, 4 OG 6. JO TÆTTERE TO PUNKTER LIGGER, DES MERE LIG ER ARTSSAMMENSÆTNINGEN; LIGGER TO PUNKTER LANGT FRA HINANDEN, HAR DE MODSAT MEGET FORSKELLIG ARTSSAMMENSÆTNING.

De kvantitative forskelle i taxon sammensætning i driften ud af de enkelte render fremgår desuden af figur 3.4.

Der var markante forskelle mellem de enkelte eksponeringsrunder – uanset behandling/ikke-behandling med pyrethroid, ligesom der inden for den enkelte eksponeringsrunde var systematisk forskel mellem render behandlet med og ikke-behandlet med pyrethroid (ubehandlede i alle tilfælde liggende længst til venstre).

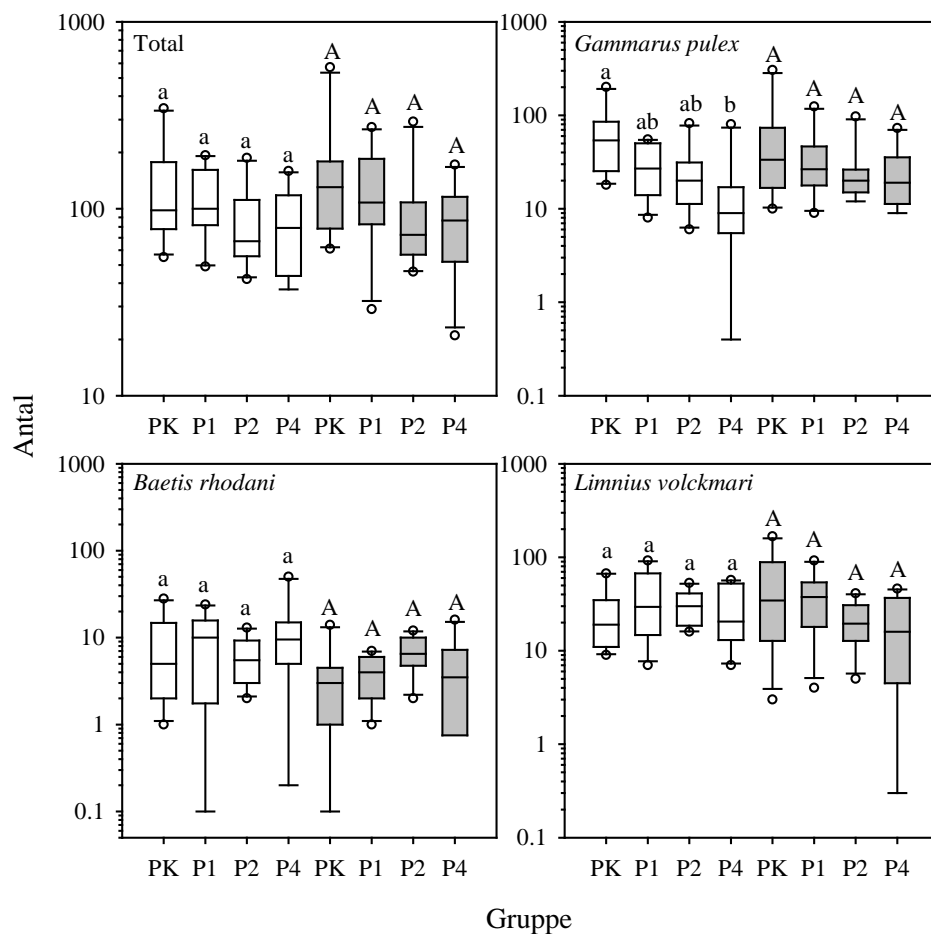
Taxon sammensætningen i Surberprøverne er illustreret i MDS-plottene i Figur 3.5. Selv om stress-værdierne på 0,25 og 0,22 indikerede, at plottene skulle fortolkes varsomt m.h.t. visuelt at evaluere gruppeforskelle, så understøttedes den umiddelbare vurdering af plottene af ANOSIM-analyserne. Før eksponeringerne (dag -1) var der i MDS-plottet en stor grad af overlap mellem de enkelte gruppers faunasammensætning. ANOSIM-analysen viste da også, at der ingen forskel var dag -1 (Global test:  $R=0,008$ ,  $p=0,39$ ; 9999 permutationer). Ved forsøgets afslutning på dag 29 viste MDS-plottet til gengæld en delvis adskillelse af kontrolgruppen (PK) i forhold til grupperne, der havde været udsat for 2 (P2) og 4 (P4) pulseksposeringer, hvilket blev bekræftet af ANOSIM-analysen, hvor PK var signifikant forskellig fra såvel P2 (Parvis test:  $R=0,199$ ,  $p=0,025$ ) som P4 (Parvis test:  $R=0,25$ ,  $p=0,006$ ), mens der ingen forskel var mellem PK og P1, P1 og P2, P1 og P4, eller P2 og P4.



FIGUR 3.5. 2D-MDS-PLOT FOR ARTSSAMMENSÆTNINGEN I SURBERPRØVER FRA STAVIS Å, HENHOLDSVIS FØR (ØVERST: DAG -1) OG EFTER (NEDERST: DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. JO TÆTTERE TO PUNKTER LIGGER, DES MERE LIG ER ARTSSAMMENSÆTNINGEN; LIGGER TO PUNKTER LANGT FRA HINANDEN, HAR MODSAT DE MEST FORSKELLIG ARTSSAMMENSÆTNING. STRESS-VÆRDIEN ANGIVER, HVOR GODT VARIATIONEN I DATA AFSPEJLES I DET 2-DIMENSIONALE PLOT. VÆRDIER OVER 0,2 GIVER EN RELATIVT DÅRLIGT BESKRIVELSE.

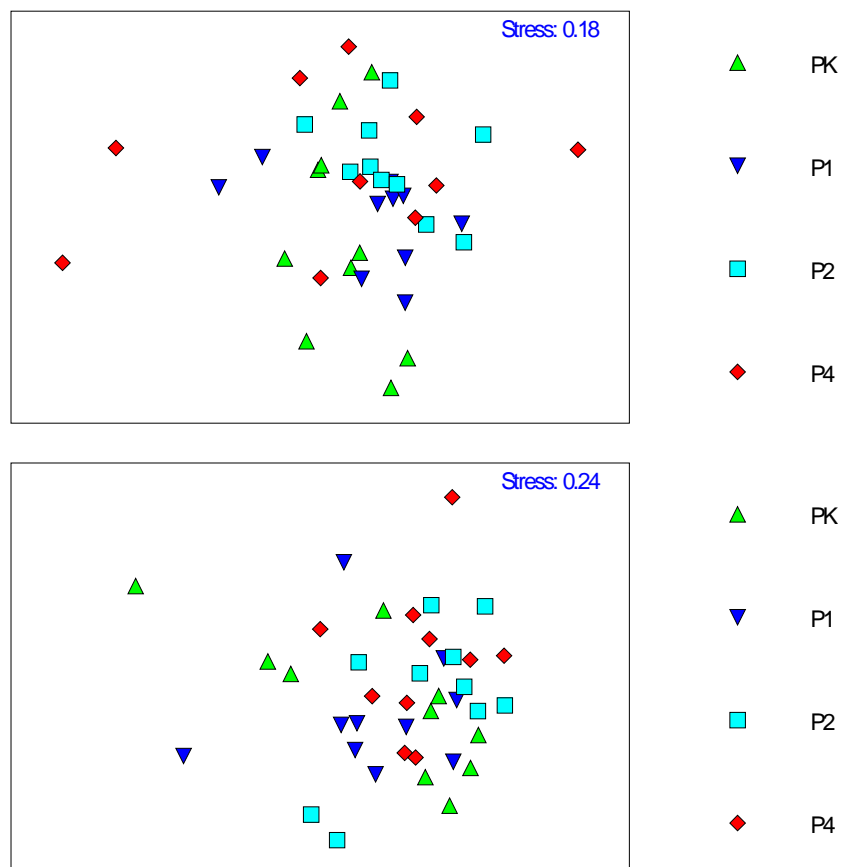
Der blev til gengæld ikke fundet nogen effekt af gentagne pulseksponeringer på individantallene af de hyppigst forekommende arter i Surberprøverne, d.v.s. *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani* og *Limnius volckmari*, ligesom der ikke var nogen effekt på det samlede individantal for alle taxa (Figur 3.6). *Heptagenia sulphurea* er ikke medtaget i figur 3.6, da der samlet set kun blev fundet 110 individer i de 80 Surberprøver. Imidlertid blev der fundet en signifikant pulsafhængig effekt på denne organisme, der stemte overens med ANOSIM-analysen af taxon sammensætningen, idet der på dag -1 ingen forskelle var mellem grupperne, mens PK (n=27 individer) på dag 29 var forskellig fra P2 (n=3, p=0,02) og P4 (n=2, p=0,01), men ikke fra P1 (n=7, p=0,18), ligesom P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige (p>0,50).





FIGUR 3.6. INDIVIDANTAL (BESKREVET VED BOX-PLOTS) HOS DE HYPPIGST FOREKOMMENDE ARTER, SAMT DET SAMLEDE INDIVIDANTAL, I SURBERPRØVER FRA STAVIS Å, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG -1) OG EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULS- EKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. BOX-PLOT MED MEDIANVÆRDI (TVÆRGÅENDE STREG I EN KASSE), 25 OG 75 % FRAKTILER (KASSENS NEDRE OG ØVRE VÆG), SAMT PRØVENS MINIMUM OG MAKSIMUM (ENDEN AF DE LODRETTE STREGER). SMÅ OG STORE BOGSTAVER ANGIVER STATISTISKE FORSKELLE HENHOLDSVIS DAG -1 OG DAG 29, IDET KUN GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE.

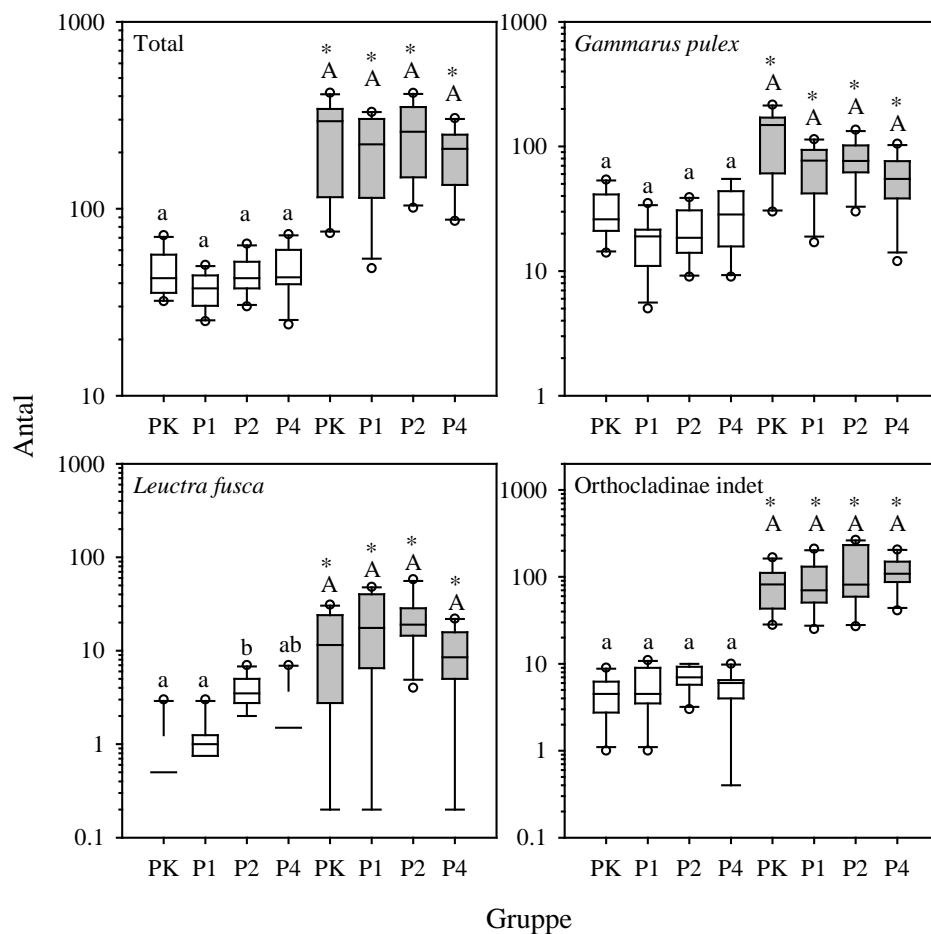
Taxon sammensætningen i bladpakkerne er illustreret i MDS-plottene i figur 3.7. Igen indikerede stress-værdierne på 0,18 og 0,24, at plottene skulle fortolkes varsomt. Ved en visuel vurdering af plottene syntes der ikke umiddelbart at være forskel hverken før eksponeringerne (dag -1) eller ved forsøgets afslutning (dag 29). ANOSIM-analysen viste, at der ingen forskel var dag -1 (Global test:  $R=0,05$ ,  $p=0,07$ ; 9999 permutationer). På dag 29 blev der kun fundet forskel mellem P1 og P4 (Parvis test:  $R=0,229$ ,  $p=0,006$ ), og der var således ingen tydelige effekter af et stigende antal pulse.



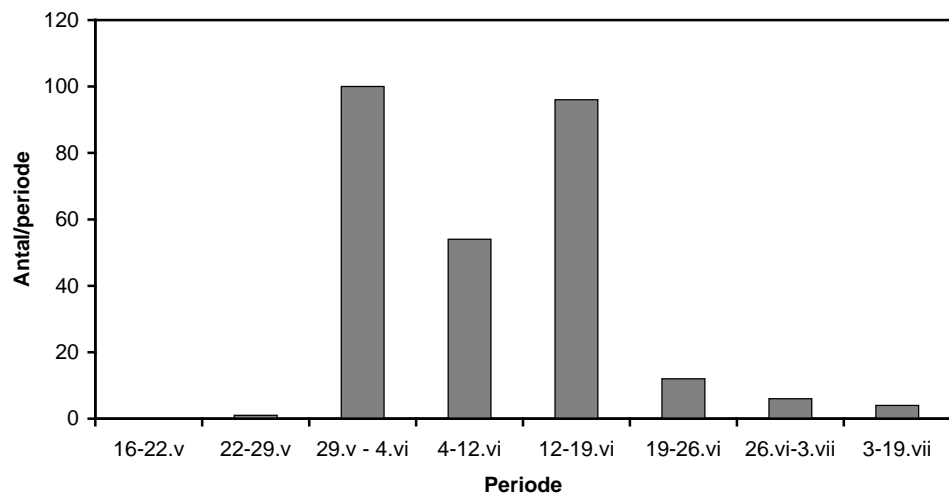
FIGUR 3.7. 2D-MDS-PLOT FOR ARTSSAMMENSÆTNINGEN I BLADPAKKER FRA STAVIS Å, HENHOLDSVIS FØR (ØVERST: DAG -1) OG EFTER (NEDERST: DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. JO TÆTTERE TO PUNKTER LIGGER, DES MERE LIG ER ARTSSAMMENSÆTNINGEN; LIGGER TO PUNKTER LANGT FRA HINANDEN, HAR MODSAT DE MEST FORSKELLIG ARTSSAMMENSÆTNING. STRESS-VÆRDIEN ANGIVER, HVOR GODT VARIATIONEN I DATA AFSPEJLES I DET 2-DIMENSIONALE PLOT. VÆRDIER OVER 0,2 GIVER EN RELATIVT DÅRLIGT BESKRIVELSE.

I bladpakkerne havde antallet af pyrethroidpulse ligeledes ingen effekter, hverken på individantallene af de hyppigst forekommende taxa, d.v.s. *Gammarus pulex*, *Leuctra fusca* og Orthocladinae, eller på det samlede individantal for alle taxa. Imidlertid var der en markant stigning i individtallene fra dag -1 til dag 29 (Figur 3.8). En tilsvarende stigning blev observeret for *Elmis aenea*, fra 7 individer dag -1 til 154 individer dag 29 (data ikke præsenteret).

Voksne individer af *Agapetus ochripes* klækkedes og var på vingerne fra slutningen af maj til begyndelsen af juli, med tyngdepunktet i de tre første uger af juni (Figur 3.9). Undersøgelsen af dødeligheden under det forudgående puppestadium blev derfor reelt afspejlet med indsamling af tomme puppehuse fra vandløbet den 30. juni (Tabel 3.3). Dødeligheden var signifikant større (ca. dobbelt så stor) i renden eksponeret for 4 pulse end i renderne som blev eksponeret for ingen, 1 eller 2 pulse (Chi<sup>2</sup>-test, P < 0,05).



FIGUR 3.8. INDIVIDANTAL HOS DE HYPPIGST FOREKOMMENDE TAXA, SAMT DET SAMLEDE INDIVIDANTAL, I BLADPAKKER FRA STAVIS Å, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG -1) OG EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. BOX-PLOT MED MEDIANVÆRDI (TVÆRGÅENDE STREG I EN KASSE), 25 OG 75 % FRAKTILER (KASSENS NEDRE OG ØVRE VÆG), SAMT PRØVENS MINIMUM OG MAKSIMUM (ENDEN AF DE LODRETTE STREGER). SMÅ OG STORE BOGSTAVER ANGIVER STATISTISKE FORSKELLE HENHOLDSVIS DAG -1 OG DAG 29, IDET KUN GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE. EN ASTERISK ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL MELLEM DAG -1 OG DAG 29 FOR DEN PÅGÆLDENDE GRUPPE.



FIGUR 3.9. UGENTLIGE FANGSTER AF VOKSNE *AGAPETUS OCHRIPES* I MALAISEFELDER VED STAVIS Å I FORBINDELSE MED FELTFORSØGENE 2010.

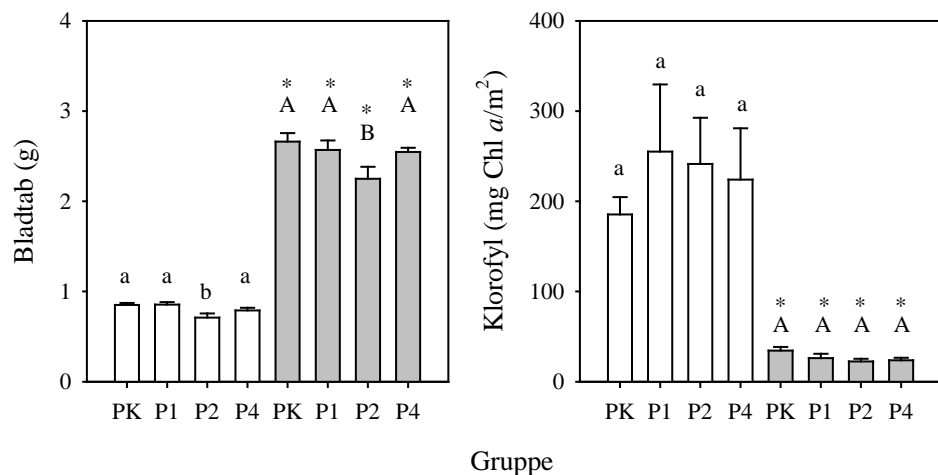
TABEL 3.3. DØDELIGHED I FORBINDELSE MED FORPUPNING OG KLÆKNING AF PUPPER HOS *AGAPETUS OCHRIPES* I FØRSØGSRENDERNE I STAVIS Å. DATA BASERET PUPPEHUSE INDSAMLET 30. JUNI 2010. \* BEHANDLINGER MARKERET MED FORSKELLIGT BOGSTAV ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE (CHI<sup>2</sup>-TEST, P < 0,05).

	Klækkede pupper	Levende pupper	Døde larver/pupper	% døde larver/pupper*	Puppehuse i alt
Kontrol	148	4	8	5,0 <sup>A</sup>	160
1 x puls	185	2	13	6,5 <sup>A</sup>	200
2 x pulse	166	0	11	6,2 <sup>A</sup>	177
4 x pulse	130	0	20	13,3 <sup>B</sup>	150

### 3.1.2 Stofomsætning

Omsætningen af blade målt som vægttab i de udlagte bladpakker var ikke forskellig mellem forsøgsrenderne umiddelbart før første eksponering (dag -1) med pyrethroid, og vægttabet udgjorde på dette tidspunkt ca. 25 % (Figur 3.10). Vægttabet ved forsøgets afslutning (dag 29) var ca. 80 %, men der kunne ikke påvises signifikante forskelle mellem de enkelte behandlinger.

Algebiomassen på sten, målt som klorofyl-a, var høj (ca. 200-250 mg m<sup>-2</sup>) i samtlige forsøgsrender umiddelbart før første eksponering med pyrethroid (Figur 3.10). Der var ingen forskel mellem de enkelte render, men variationen mellem de enkelte prøver var relativt stor. Algebiomassen var 29 dage efter første eksponering kun ca. 1/10 af niveauet før (ca. 25 mg klorofyl-a m<sup>-2</sup>), og der kunne ikke påvises nogen signifikant forskel mellem de enkelte render.



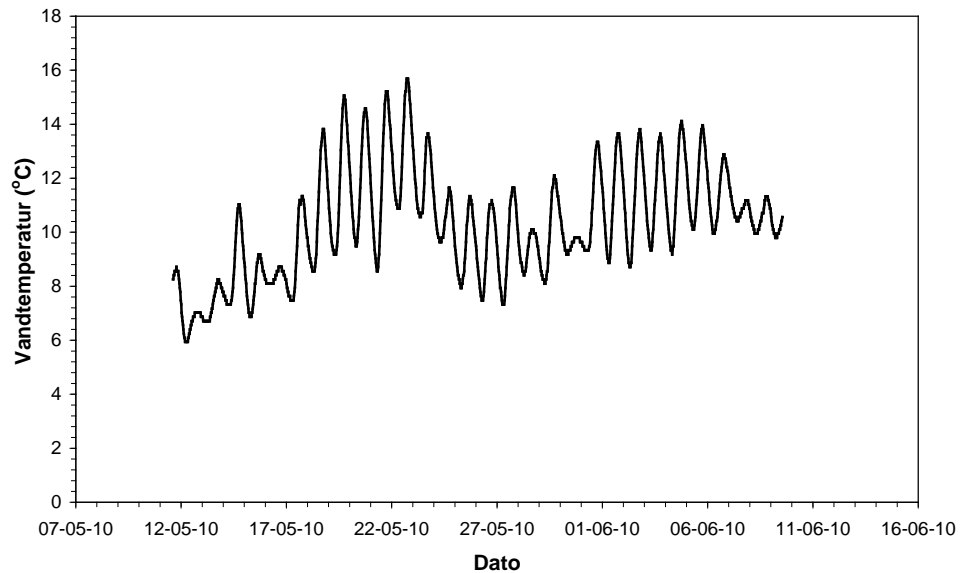
FIGUR 3.10. VÆGTTAB FRA UDLAGTE BLADPAKKER OG ALGEBIOMASSE, MÅLT SOM KLOROFYL-A, PÅ STEN I STAVIS Å, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG -1) OG EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. SMÅ OG STORE BOGSTAVER ANGI- VER STATISTISKE FORSKELLE HENHOLDSVIS DAG -1 OG DAG 29, IDET KUN GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE. EN ASTERISK ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL MELLEM DAG -1 OG DAG 29 FOR DEN PÅGÆLDENDE GRUPPE. GENNEMSNI $\pm$ SEM (N=10) ER ANGIVET.

### 3.2 EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUN- STIGE VANDLØB

Vandtemperaturen i forsøgsrenderne fulgte fuldstændig vandtemperaturen i selve Lemming Å, hvorfra vandet blev pumpet ind. Der var således heller ingen forskel i temperatur mellem de enkelte render. Vandtemperaturen varie- rede mellem 5,9 og 15,7 °C igennem forsøgsperioden med et gennemsnit på 10,4 °C (Figur 3.11). Der var en tydelig døgnrytme i temperaturen med op til 6,6 °C's forskel mellem højeste dag og laveste nat værdi.

Vandføringen igennem de 12 render var signifikant forskellig (Friedman's Chi<sup>2</sup> test, P<0,0001) på trods af forsøg på at gøre den ensartet. Specielt havde den ene af de render, som fik 2 pulse klart mindst vandføring (ca. 50 % af renderen med størst vandføring). Der var også forskel, når der blev sammenlig- net mellem grupperne, idet kontrolrenderne generelt havde større vandføring end de øvrige. Til gengæld var der ingen signifikant forskel mellem disse ind- byrdes. Vandføringen var stort set konstant over tid inden for de enkelte ren- der.

Under pulsbehandlingerne var de målte koncentrationer af lambda- cyhalothrin i de eksponerede render i gennemsnit 0,067 µgL<sup>-1</sup>.



FIGUR 3.11. VANDTEMPERATUR I FORSØGSRENDERNE I LEMMING I PERIODEN, HVOR EKSPONERINGSFORSØGENE BLEV GENNEMFØRT.

### 3.2.1 Makroinvertebrater

Forsøgene blev gennemført stort set som planlagt, herunder podningen af renderne med dyr fra Lemming Bæk. Dog flyttede nogle af de introducerede smådyr sig ikke væsentligt fra den opstrøms ende af renderne, hvor de blev introduceret ved forsøgets start. Det gjaldt eksempelvis en række vårfluer med transportable huse (*Ecclisopteryx dalecarlica* og andre Limnephilidae). Disse taxa blev derfor efterfølgende kun fundet sporadisk i de indsamlede prøver, som ikke blev taget i de øverste dele af renderne.

Der blev på sten-/grusbund (Surberprøver) fundet i alt 44 taxa af makroinvertebrater fordelt på i alt 16 681 individer (Tabel 3.4). Dominerende taxa var *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Amphinemura standfussi*, *Leuctra digitata/fusca* og Orthoclaadiinae, som tilsammen udgjorde 80,5 % af det samlede individantal. Derudover udgjorde andre Chironomidae 14 % på individbasis.

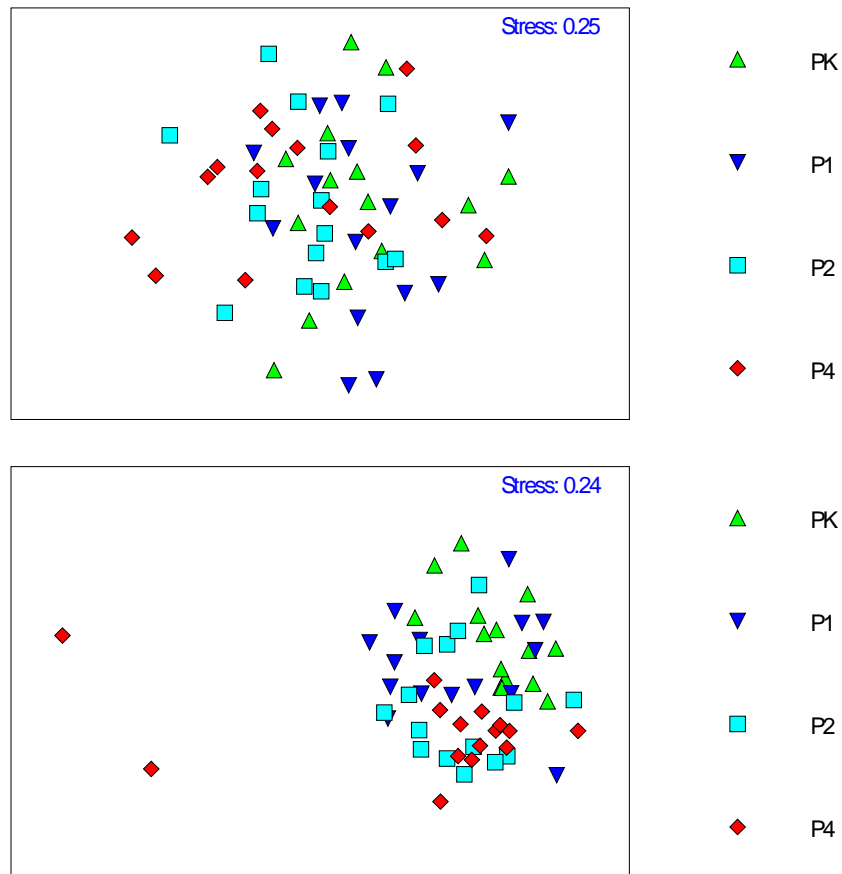
Før første eksponering med pyrethroid blev der samlet set på vandløbsbunden i renderne fundet en samlet tæthed af individer svarende til 5980 m<sup>-2</sup> (middelværdi, N=60).

I bladpakkerne blev der tilsvarende fundet tilsammen 39 taxa fordelt på 15 574 individer (Tabel 3.4). Dominerende taxa var *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Amphinemura standfussi*, *Leuctra digitata/fusca*, *Prodiamesa olivacea*, Orthoclaadiinae og Chironomini, der tilsammen udgjorde 85,3 % af det samlede individantal. Mindre dominerende var andre Chironomidae, som udgjorde 8,8 %.

Artssammensætningen på sten-/grusbund (Surberprøver) hhv. før og efter eksponeringerne med pyrethroid er illustreret i MDS-plottene i figur 3.12. Selv om stress-værdier på 0,25 og 0,24 indikerede, at plottene skulle fortolkes varsomt, så understøttedes den umiddelbare vurdering af plottene af ANOSIM-analyserne.

TABEL 3.4. OVERORDNET TAXON SAMMENSETNING AF MAKROINVERTEBRATER I FØRSØGSRENDERNE I LEMMING

Taxon	Surberprøver		Bladpakker	
	Antal	%	Antal	%
<i>Hydra sp</i>	98	0,58		
<i>Dugesia gonocephala</i>	6	0,04		
Tubificidae	70	0,41	100	0,64
<i>Eiseniella tetraedra</i>	2	0,01		
Oligochaeta (indet)	103	0,61		
<i>Erpobdella octoculata</i>			1	0,01
Hydrachnida	113	0,67	59	0,38
<i>Asellus aquaticus</i>	91	0,54	228	1,46
<i>Gammarus pulex</i>	4314	25,56	1013	6,50
<i>Baetis rhodani</i>	3742	22,17	181	1,16
<i>Paraleptophlebia submarginata</i>			8	0,05
<i>Leptophlebia marginata</i>	2	0,01		
<i>Ephemerella ignita</i>	61	0,36	64	0,41
<i>Caenis horaria</i>	3	0,02		
<i>Caenis rivulorum</i>	1	0,01	1	0,01
<i>Nemoura cinerea</i>	14	0,08	30	0,19
<i>Amphinemura standfussi</i>	1873	11,10	1012	6,50
<i>Nemurella picteti</i>			3	0,02
<i>Leuctra fusca/digitata</i>	1090	6,46	781	5,01
<i>Brychius elevatus</i>	1	0,01	1	0,01
<i>Oreodytes sanmarkii</i>	10	0,06	2	0,01
Dytiscidae (indet)	19	0,11	6	0,04
<i>Elmis aenea</i>	34	0,20	9	0,06
<i>Limnius volckmari</i>			1	0,01
<i>Elodes minuta</i>	1	0,01	2	0,01
<i>Hydraena gracillis</i>			1	0,01
<i>Sialis fuliginosa</i>	2	0,01		
<i>Rhyacophila fasciata</i>	12	0,07	1	0,01
<i>Hydropsyche siltalai</i>	1	0,01		
<i>Ecclisopteryx dalecarlica</i>	2	0,01		
<i>Anabolia nervosa</i>	1	0,01	1	0,01
<i>Limnephilus lunatus</i>			16	0,10
<i>Halesus radiatus</i>	1	0,01	3	0,02
<i>Chaetopteryx villosa</i>	12	0,07	3	0,02
<i>Potamophylax latipennis</i>			6	0,04
Limnephilidae (indet)	31	0,18	9	0,06
<i>Silo pallipes</i>	1	0,01		
<i>Dicranota sp</i>	32	0,19	7	0,04
<i>Eleophila sp</i>	1	0,01		
Tipulidae (indet)	7	0,04	2	0,01
Simuliidae	130	0,77	46	0,30
Dixidae			1	0,01
Psychodidae			1	0,01
<i>Chaoborus sp</i>	1	0,01		
Tanypodinae	614	3,64	756	4,85
<i>Prodiamesa olivacea</i>	63	0,37	872	5,60
Orthocladiinae	2560	15,16	7023	45,09
Chironomini	805	4,77	2591	16,64
Tanytarsini	634	3,76	611	3,92
Chironomidae (pupper)	310	1,84	121	0,78
Heleinae	3	0,02		
Empididae	7	0,04		
<i>Radix balthica</i>	3	0,02		
I alt	16 881	100,0	15 574	100,0



FIGUR 3.12. 2D-MDS-PLOT FOR ARTSSAMMENSÆTNINGEN I SURBERPRØVER FRA FORSØGSRENDERNE I LEMMING, HENHOLDSVIS FØR (ØVERST: DAG 0) OG EFTER (NEDERST: DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. JO TÆTTERE TO PUNKTER LIGGER, DES MERE LIG ER ARTSSAMMENSÆTNINGEN; LIGGER TO PUNKTER LANGT FRA HINANDEN, HAR MODSAT DE MEGET FORSKELLIG ARTSSAMMENSÆTNING. STRESS-VÆRDIEN ANGIVER, HVOR GODT VARIATIONEN I DATA AFSPEJLES I DET 2-DIMENSIONALE PLOT. VÆRDIER OVER 0,2 GIVER EN RELATIVT DÅRLIGT BESKRIVELSE.

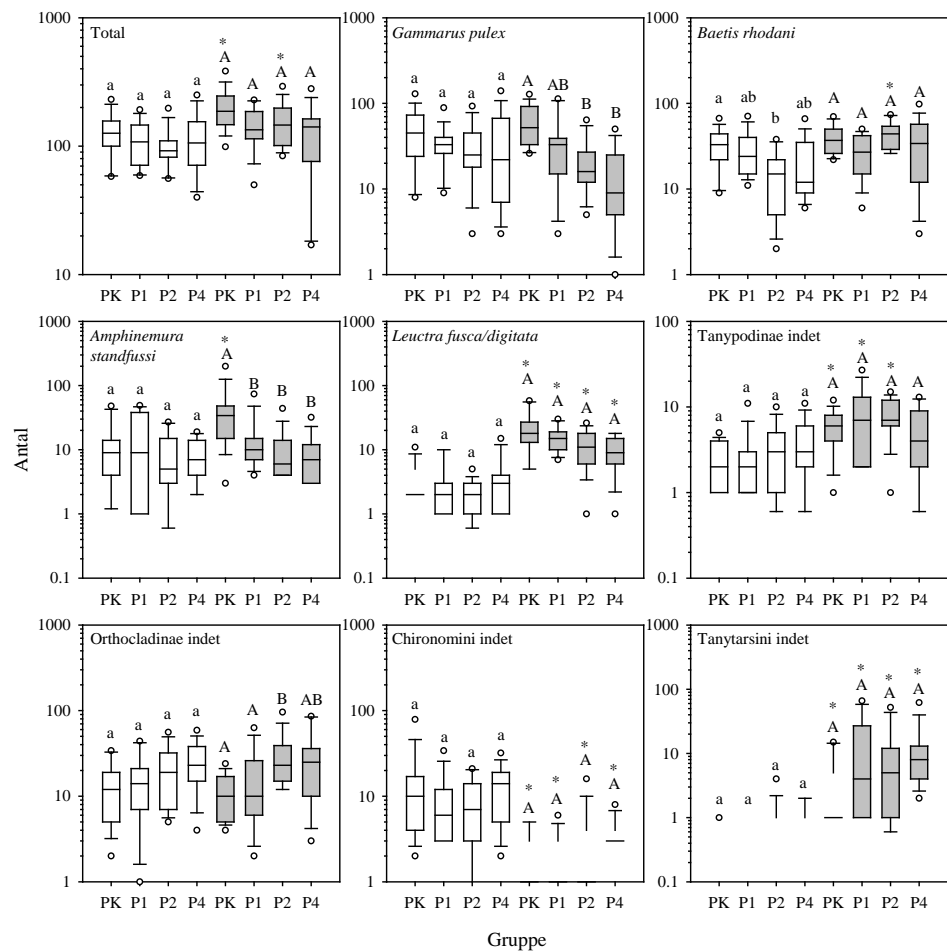
Før eksponeringerne (dag 0) var der i MDS-plottet en stor grad af overlap mellem de enkelte gruppers faunasammensætning, og ANOSIM-analysen viste, at der ingen forskel var dag 0 (Global test:  $R=0,037$ ,  $p=0,07$ ; 9999 permutationer). Ved forsøgets afslutning på dag 29 viste MDS-plottet derimod en delvis

adskillelse af PK i forhold P1, og en næsten fuldstændig adskillelse i forhold til P2 og P4, hvilket blev bekræftet af ANOSIM-analysen, hvor PK var signifikant forskellig fra såvel P1 (Parvis test:  $R=0,132$ ,  $p=0,02$ ) og P2 (Parvis test:  $R=0,373$ ,  $p<0,0001$ ) som P4 (Parvis test:  $R=0,322$ ,  $p<0,0001$ ). P1 var endvidere forskellig fra både P2 (Parvis test:  $R=0,151$ ,  $p=0,02$ ) og P4 (Parvis test:  $R=0,15$ ,  $p=0,006$ ), mens der ingen signifikant forskel var mellem P2 og P4.

Individantallene af de hyppigst forekommende taxa, samt det samlede individantal for alle taxa i Surberprøverne er angivet i figur 3.13. Der blev ikke observeret nogen forskel mellem grupperne på det samlede individantal dag 0, og heller ikke på dag 29. I løbet af forsøgsperioden var der dog en tendens til en stigning i det samlede individantal af alle grupperne, selv om det kun var signifikant for PK og P2.

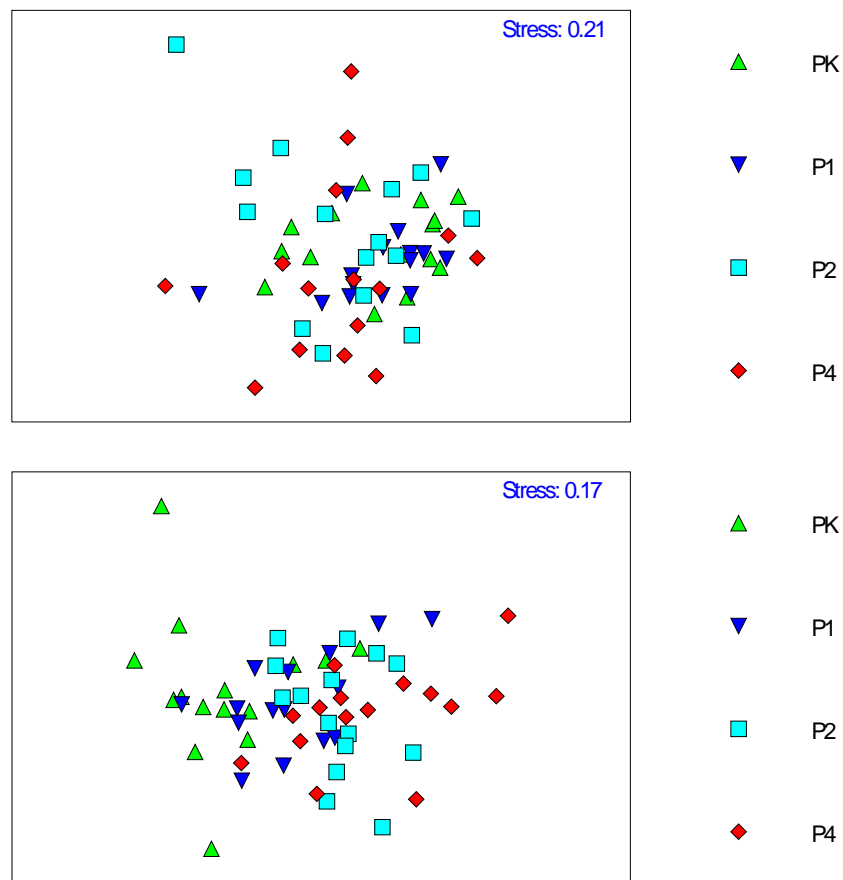


Mens der for enkelt-taxa generelt ingen forskelle blev observeret dag 0, blev der dag 29 fundet en signifikant pulsafhængig effekt på individantallene hos *Gammarus pulex* og *Amphinemura standfussi*, der overordnet set stemte overens med ANOSIM-analysen af artssammensætningen. For *Gammarus pulex* var PK på dag 29 forskellig fra P2 ( $p < 0,001$ ) og P4 ( $p < 0,0001$ ), men ikke fra P1 ( $p = 0,14$ ), ligesom P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige. For *Amphinemura standfussi* var PK på dag 29 forskellig fra både P1 ( $p = 0,02$ ), P2 ( $p = 0,01$ ) og P4 ( $p = 0,002$ ), mens P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige. Samtidig var det kun i PK, at individantallet for *Amphinemura standfussi* steg fra dag 0 til dag 29. For *Leuctra fusca/digitata*, Tanyodinae og Tanytarsini steg individantallet gennem forsøgsperioden for samtlige behandlinger, mens det faldt for Chironomini. Individantallet for *Baetis rhodani* og Orthocladiinae var relativt konstante over tid i de forskellige grupper.



FIGUR 3.13. INDIVIDANTAL HOS DE HYPPIGST FOREKOMMENDE TAXA, SAMT DET SAMLEDE INDIVIDANTAL, I SURBERPRØVER FRA FØR- OG EFTERSØGSGRENDERNE I LEMMING, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG 0) OG EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. BOX-PLOT MED MEDIANVÆRDI (TVÆRGÅENDE STREG I EN KASSE), 25 OG 75 % FRAKTILER (KASSENS NEDRE OG ØVRE VÆG), SAMT PRØVENS MINIMUM OG MAKSIMUM (ENDEN AF DE LODRETTE STREGER). SMÅ OG STORE BOGSTAVER ANGIVER STATISTISKE FØR- OG EFTERSØGSGRUPPER, IDET KUN GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FØR- OG EFTERSØGSGRUPPER. EN ASTERISK ANGIVER EN SIGNIFIKANT FØR- OG EFTERSØGSGRUPPER.

Artssammensætningen i bladpakkerne er illustreret i MDS-plottene i figur 3.14. Stress-værdier på 0,21 og 0,17 indikerede, at plottene skulle fortolkes varsomt, men alligevel understøttedes den umiddelbare vurdering af plottene af ANOSIM-analyserne. Før eksponeringerne (dag 0) var der i MDS-plottet en stor grad af overlap mellem de enkelte gruppers faunasammensætning. Selv om den globale ANOSIM-analyse indikerede en mindre forskel dag 0, d.v.s. at ikke alle grupper var ens (9999 permutationer gav: Global test:  $R=0,06$ ,  $p=0,01$ ), så kunne der ikke spores nogen forskelle i de parvise tests dag 0 ( $p>0,08$ ). Ved forsøgets afslutning på dag 29 viste MDS-plottet en forholdsvis klar adskillelse af PK i forhold til P2 og P4, hvilket blev bekræftet af ANOSIM-analysen, hvor PK var signifikant forskellig fra såvel P2 (Parvis test:  $R=0,322$ ,  $p=0,0005$ ) som P4 (Parvis test:  $R=0,375$ ,  $p<0,0001$ ), mens der ingen forskel var mellem PK og P1, P1 og P2, P1 og P4, eller P2 og P4.

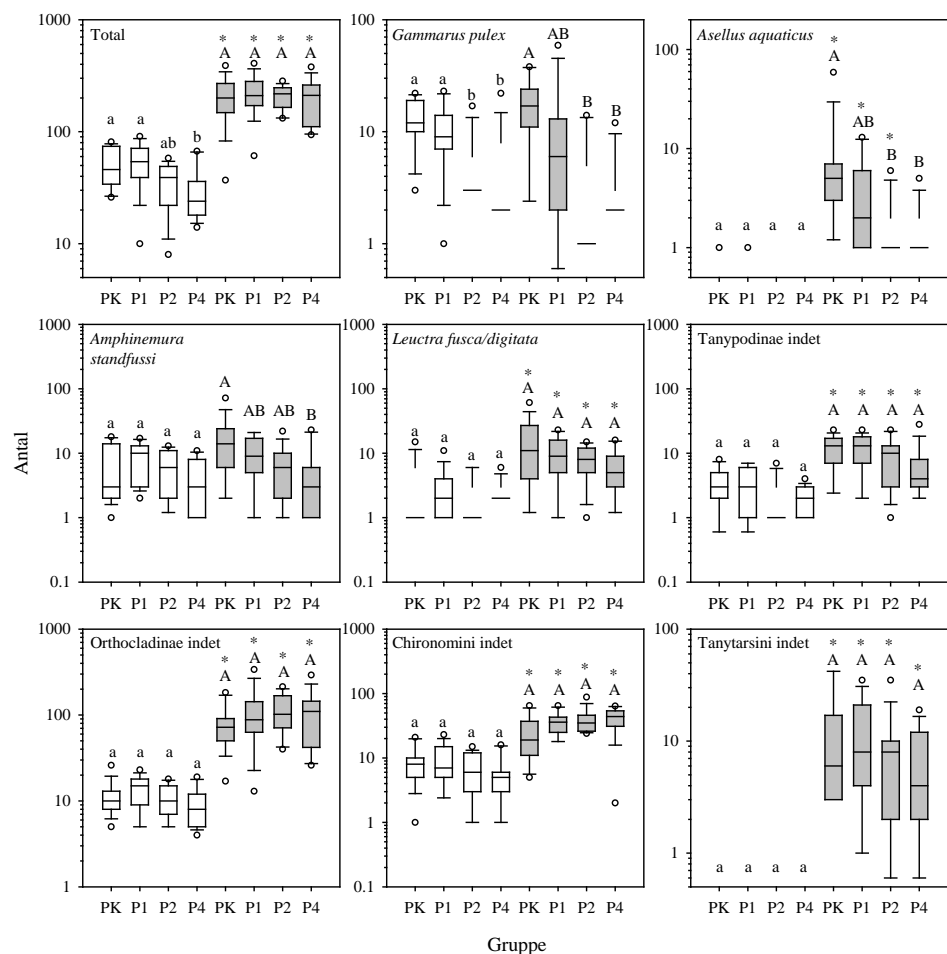


FIGUR 3.14. 2D-MDS-PLOT FOR ARTSSAMMENSÆTNINGEN I BLADPAKKER FRA FØRSTEDAGSRENDERNE I LEMMING, HENHOLDSVIS FØR (ØVERST: DAG 0) OG EFTER (NEDERST: DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. JO TÆTTERE TO PUNKTER LIGGER, DES MERE LIG ER ARTSSAMMENSÆTNINGEN; LIGGER TO PUNKTER LANGT FRA HINANDEN, HAR MODSAT DE MEGET FØRSKELLIG ARTSSAMMENSÆTNING. STRESS-VÆRDIEN ANGIVER, HVOR GODT VARIATIONEN I DATA AFSPEJLES I DET 2-DIMENSIONALE PLOT. VÆRDIER OVER 0,2 GIVER EN RELATIVT DÅRLIGT BESKRIVELSE.

Individantallene af de hyppigst forekommende taxa, samt det samlede individantal for alle taxa i bladpakkerne er angivet i figur 3.15. Generelt var der relativt få dyr i bladpakkerne dag 0, og der var stor variabilitet i individantallet i prøver fra samme rende. Det var derfor vanskeligt at sammenligne bladpakkerne dag 0. I løbet af forsøgsperioden var der dog en markant stigning i det

samlede individantal i alle grupperne, og ved forsøgets afslutning var der ingen forskel mellem grupperne.

Der blev generelt fundet relativt få *Gammarus pulex* i bladpakkerne, og data for denne organisme var vanskelige at fortolke. For såvel *Amphinemura standfussi* som *Asellus aquaticus* blev der imidlertid på dag 29 fundet en signifikant pulsafhængig effekt på individtallene, der overordnet set stemte overens med ANOSIM-analysen af artssammensætningen. For *Amphinemura standfussi* var PK på dag 29 forskellig fra P4 ( $p=0,04$ ), men ikke fra P1 ( $p>0,5$ ) og P2 ( $p=0,24$ ), ligesom P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige. For *Asellus aquaticus* var PK på dag 29 forskellig fra både P2 ( $p=0,0035$ ) og P4 ( $p=0,0008$ ), men ikke fra P1 ( $p=0,22$ ), ligesom P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige. For *Leuctra fusca/digitata*, Tanypodinae, Orthocladinae, Chironomini og Tanytarsini var der ingen effekt af de gentagne pulse, og individantallet steg markant gennem forsøgsperioden.



FIGUR 3.15. INDIVIDANTAL HOS DE HYPPIGST FOREKOMMENDE TAXA, SAMT DET SAMLEDE INDIVIDANTAL, I BLADPAKKER FRA FØR- OG EFTERSØGSGRENDERNE I LEMMING, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG 0) OG EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. BOX-PLOT MED MEDIANVÆRDI (TVÆRGÅENDE STREG I EN KASSE), 25 OG 75 % FRAKTILER (KASSENS NEDRE OG ØVRE VÆG), SAMT PRØVENS MINIMUM OG MAKSIMUM (ENDEN AF DE LODRETTE STREGER). SMÅ OG STORE BOGSTAVER ANGIVER STATISTISKE FORSKELLE HENHOLDSVIS DAG 0 OG DAG 29, IDET KUN GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE. EN ASTERISK ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL MELLEM DAG 0 OG DAG 29 FOR DEN PÅGÆLDENDE GRUPPE.

Ved forsøgets afslutning var antallet af nymfer af sløvringen *Amphinemura standfussi*, som forvandlede til voksne, signifikant større i de ueksponerede

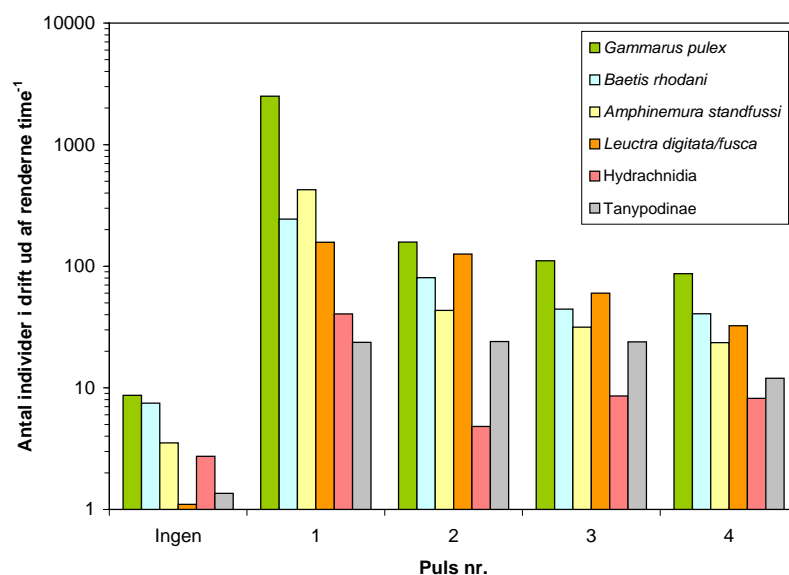
render (kontrol) sammenlignet med de pyrethroid eksponerede render (tabel 3.5). Ligeledes forvandlede signifikant flere individer i render der blev eksponeret med 1 puls sammenlignet med render der blev pulseksponeret 2 eller 4 gange. Der var dog ingen forskel mellem render, der blev pulseksponeret hhv. 2 og 4 gange.

TABEL 3.5 ANTAL EXUVIER AF SLØRVINGER (*AMPHINEMURA STANDFUSSI*) SIDDENE PÅ VÆGGENE AF STRØMRENDERNE OVER VANDOVERFLADEN, REPRÆSENTERENDE SUCCESFULDT KLÆKKEDE NYMFER. ANGIVET MEDIAN, MIDDELVÆRDI OG S.D. FOR HVER AF DE 4 BEHANDLINGER (N=3). MIDDELVÆRDIER MÆRKET MED FORSKELLIGT BOGSTAV ER SIGNIFIKANT FORSKELLIGE (T-TEST,  $p < 0,01$ ).

Behandling	Median	Middel	S.D.
Kontrol	63	68 <sup>A</sup>	8
1 puls	38	36 <sup>B</sup>	2
2 pulse	12	16 <sup>C</sup>	5
4 pulse	13	16 <sup>C</sup>	4

Under og umiddelbart efter eksponeringerne med pyrethroid blev der for en række taxa fundet en markant forhøjet drift ud af renderne sammenlignet med de ueksponerede render (kontrolrender), se figur 3.16. Således driftede ved første eksponering ca. 300 gange så mange *G. pulex* og *L. digitata/fusca*, 120 gange så mange *A. standfussi* og 15-30 gange så mange *B. rhodani*, Tanypodinae og Hydrachnidia ud af de med pyrethroid eksponerede render sammenlignet med kontrolrenderne (t-tests,  $p < 0,025$ ). Ved de efterfølgende eksponeringerne driftede ligeledes signifikant flere individer af *G. pulex*, *L. digitata/fusca*, *A. standfussi*, *B. rhodani* og Tanypodinae ud af de eksponerede render sammenlignet med de ueksponerede render ( $p < 0,025$ ). Der driftede dog relativt færre individer ud som følge af de gentagne pyrethroid eksponeringer, idet bestandene i renderne allerede var blevet væsentlig udtyndet den første/forudgående eksponering. Blandt de mindre individrige grupper viste også billen *Oreodytes sanmarki* og Simuliidae (kvægmyg) signifikant forhøjet drift-rate ved første pyrethroid eksponering, og den først nævnte forekom stort set ikke ved de efterfølgende eksponeringer. Til gengæld var individrige taxa som Orthocladiinae og Chironomini tilsyneladende upåvirkede af pyrethroid eksponeringerne (t-tests,  $p > 0,05$ ; data ikke vist).

Tabet af individer af de nævnte taxa i forbindelse med eksponeringerne blev i et vist omfang kompenseret via drift ind i renderne med det indpumpede vand fra Lemming Bæk (Tabel 3.6). Denne drift udviste et tydeligt døgnmønster for flere taxa, idet driftraten (drift pr. time) var signifikant forøget i nattetimerne hos *G. pulex*, *B. rhodani*, *L. digitata/fusca*, Simuliidae og Tanypodinae (t-test,  $p < 0,05$ ).



FIGUR 3.16. DRIFT AF MAKROINVERTEBRATER UD AF STRØMRENDERNE I FORBINDELSE MED EKSPONERING MED HHV. 1 (N=9), 2 (N=6), 4 (N=3) OG INGEN PULSE (N=12). MÅLT OVER 90 MIN UNDER EKSPONERING + 120 MIN EFTER DENNE.

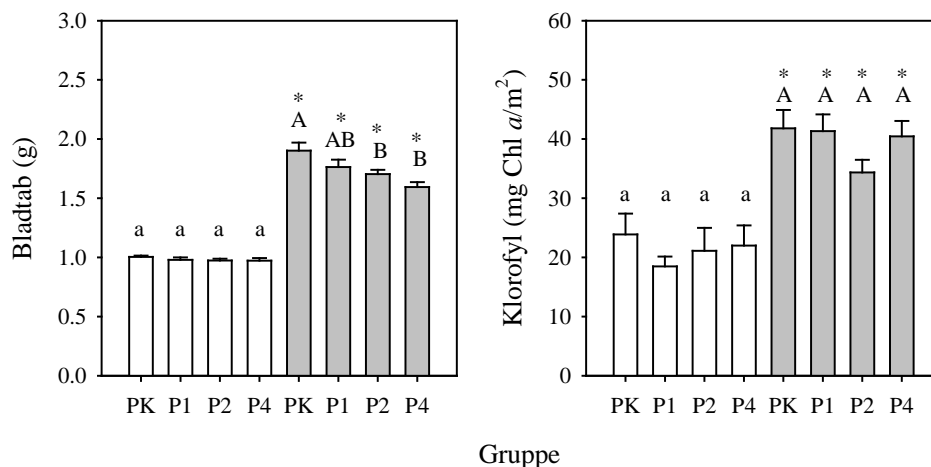
TABEL 3.6 DRIFT AF MAKROINVERTEBRATER IND I FORSØGSRENDERNE I LEMMING HHV. OM DAGEN OG NATTEN. ANGIVET GENNEMSNIT OG SD OG P-VÆRDI FOR FORSKEL MELLEM DAG- OG NATDRIFT (PARRET T-TEST, N=3).

Taxa	Dag		Nat		p-værdi
	Gns.	SD	Gns.	SD	
Hydrachnida	62	13	0	0	0,022
<i>Asellus aquaticus</i>	5	3	1	1	NS
<i>Gammarus pulex</i>	6	1	262	51	0,018
<i>Baetis rhodani</i>	25	4	139	10	0,004
Leptophlebiidae	0	0	7	4	NS
<i>Amphinemura standfussi</i>	26	3	81	13	NS
<i>Leuctra fusca/digitata</i>	13	3	191	15	0,003
<i>Elmis aenea</i>	3	1	4	3	NS
Simuliidae	7	0	13	1	0,007
Tanypodinae	4	2	114	9	0,002
Orthocladiinae	131	49	293	37	NS
Chironomini	15	13	25	10	NS
Tanytarsini	2	2	5	3	NS
Chironomidae (pupper)	2	1	24	7	NS

### 3.2.2 Stofomsætning

Omsætningen af blade, målt som vægttab i de udlagte bladpakker, var ikke forskellig mellem forsøgsrenderne umiddelbart før første eksponering (dag 0) med pyrethroid, og vægttabet udgjorde på dette tidspunkt ca. 32 % (Figur 3.17). Ved forsøgets afslutning (dag 29) var PK (vægttab=62 %) signifikant højere end P2 (vægttab=55 %, p=0,046) og P4 (vægttab=52 %, p=0,001), men ikke forskellig fra P1 (vægttab=58 %, p=0,19), ligesom vægttabene i P1, P2 og P4 ikke var indbyrdes forskellige. Sammenlignes omsætningsraterne i perioden fra dag 0 til dag 29, resulterede fire gentagne pulse således i en markant reduktion af bladomsætningen på 33 %, mens to pulse førte til en reduktion på 23 % i denne periode. I alle grupperne var vægttabet større på dag 29 end på dag 0 (p<0,001).

Algebiomassen på sten, målt som klorofyl-a, var ca. 21 mg m<sup>-2</sup> i forsøgsren-  
derne umiddelbart før første eksponering (dag 0) med pyrethroid (Figur  
3.17), og der var ingen forskel mellem grupperne. Algebiomassen var 29 dage  
efter første eksponering næsten fordoblet til ca. 39 mg klorofyl-a m<sup>-2</sup>, og der  
kunne heller ikke på dette tidspunkt påvises nogen forskel mellem de enkelte  
behandlinger.



FIGUR 3.17. VÆGTTAB FRA UDLAGTE BLADPAKKER OG ALGEBIOMASSE MÅLT SOM KLORO-  
FYL-A PÅ STEN I FØRSØGSRENDERNE I LEMMING, HENHOLDSVIS FØR (HVID=DAG 0) OG  
EFTER (GRÅ=DAG 29) GENTAGNE 90-MINUTTERS PULSEKSPONERINGER FOR LAMBDA-  
CYHALOTHRIN. PK=KONTROL, P1=1 PULS, P2=2 PULSE OG P4=4 PULSE. SMÅ OG STORE  
BOGSTAVER ANGIVER STATISTISKE FØRSKELLE HENHOLDSVIS DAG 0 OG DAG 29, IDET KUN  
GRUPPER DER INGEN BOGSTAVER HAR TILFÆLLES ER SIGNIFIKANT FØRSKELLEGE.  
EN ASTRISK ANGIVER EN SIGNIFIKANT FØRSKEL MELLEML DAG 0 OG DAG 29 FOR DEN PÅGÆL-  
DENDE GRUPPE. GENNEMSNIT±SEM (N=15) ER ANGIVET.

### 3.3 EFFEKTER PÅ OVERLEVELSE, VÆKST, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS *GAMMARUS PULEX* I LABORATORIET

#### 3.3.1 Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stof- omsætning hos *Gammarus pulex*

I kontrolgruppe B blev der midtvejs i forsøgsperioden observeret en pludselig,  
markant forhøjet dødelighed i 4 af de 10 akvarier, hvilket skyldtes et fuldstæn-  
digt ophør af lufttilførsel. Resultaterne for de øvrige 6 akvarier svarede til for-  
løbet for kontrolgruppe C, og det blev besluttet at anvende gruppe C som  
kontrol for alle de øvrige grupper, da denne gruppe havde været håndteret fire  
gange med to dages mellemrum, hvilket vurderedes at give maksimalt håndte-  
ringsstress. Resultaterne for gruppe B præsenteres således ikke.

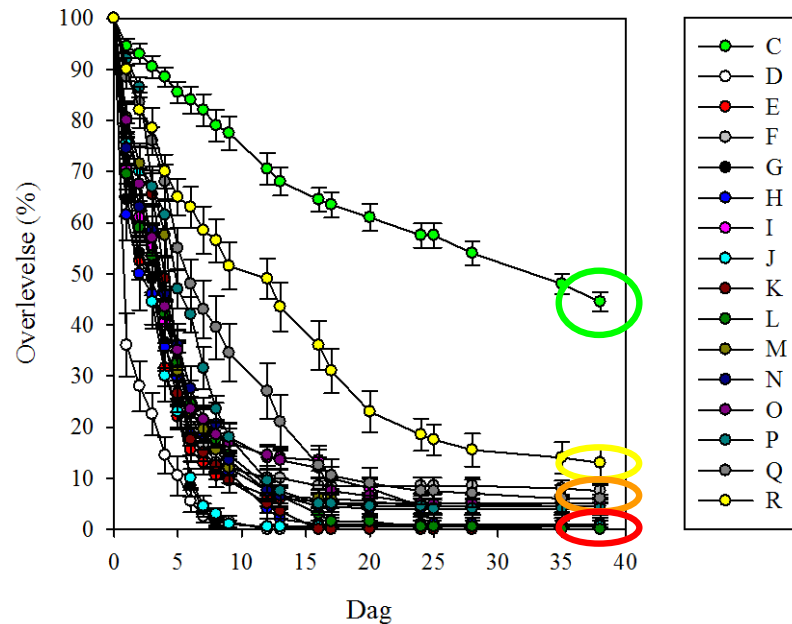
Generelt var dødeligheden høj i alle grupperne, inkl. kontrolgruppen (Figur  
3.18). Det var derfor vanskeligt at påvise statistisk signifikante forskelle mel-  
lem grupperne, ligesom det var vanskeligt alene at tilskrive den observerede  
dødelighed til de forskellige behandlinger. Overlevelsen i 15 ækvivalentekspo-  
nerede grupper var dog i alle tilfælde signifikant lavere end i kontrolgruppe C  
ved forsøgets afslutning på dag 38, mens det ikke var muligt at skelne de ek-  
sponerede grupper fra hinanden. Der var dog visse ikke-signifikante tenden-  
ser, der stemmer overens med tilsvarende tendenser for omsætningen af elle-  
bladene (se nedenfor), og disse præsenteres derfor i det følgende.

Overlevelsen ved forsøgets afslutning er opsummeret i tabel 3.7. Kontrolgruppens overlevelse var 44,5%, og selv om de ikke var indbyrdes signifikant forskellige, kan de eksponerede grupper overordnet set inddeles i 3 grader af påvirkning:

- Moderat reduceret overlevelse: R (13,0%)
- Markant reduceret overlevelse: F, Q, O, I, E, P, N, M (4,0-7,5%)
- Næsten ingen overlevelse: H, J, K, L, G, D (0,0-1,0%)

I tabel 3.7 og figur 3.18 er dette angivet med farvekoder, og følgende tendenser kan fremhæves ved sammenligning af de ækvivalente eksponeringer:

- Dødeligheden var højere ved kortvarige pulse med høj koncentration end ved længerevarende pulse med lavere koncentration
- For en given kombination af eksponeringskoncentration og pulsantal gjaldt generelt, at dødeligheden steg med faldende interpulsvarighed

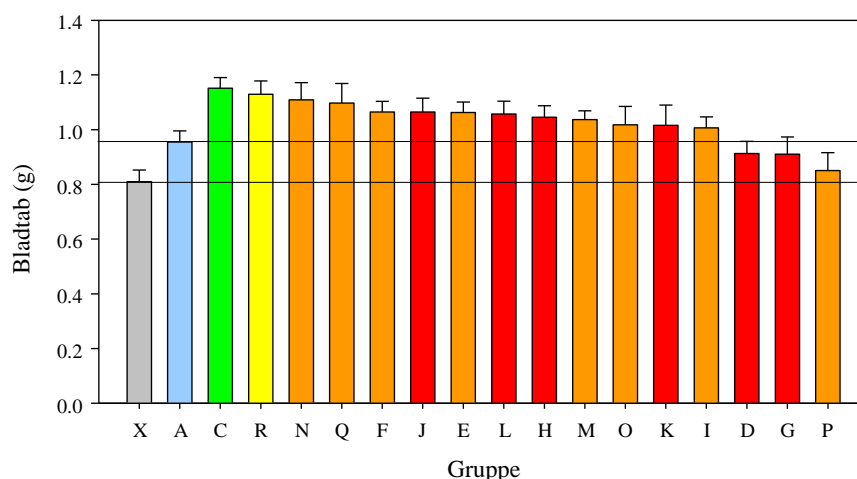


FIGUR 3.18. OVERLEVELSE HOS *G. PULEX* ÆKVIVALENTEKSPONERET FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. BOGSTAVERNE REFERERER TIL GRUPPENAVNENE I TABEL 2.5 OG FIGUR 2.4. DE FARVEDE OVALER VED FORSØGETS AFSLUTNING ANGIVER TENDENSER TIL FORSKELLE MELLEML GRUPPERNE.

TABEL 3.7. OVERLEVELSE VED FØRSØGETS AFSLUTNING, SORTERET EFTER FALDENDE OVERLEVELSE, OG HASTIGHEDEN HVORMED SLUTOVERLEVELSEN NÅS. BOGSTAVERNE REFERERER TIL GRUPPENAVNE I TABEL 2.5, MENS FARVEKODER ER FRA FIGUR 3.18.

Gruppe	Koncentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Pulsvarighed (min)	Antal pulse	Interpulsvarighed (dage)	Overlevelse (% gns $\pm$ SEM)
C	0	90	4	2	44,5 $\pm$ 1,9
R	0,05	180	4	8	13,0 $\pm$ 2,8
F	0,1	360	1	-	7,5 $\pm$ 1,5
Q	0,05	180	4	4	6,0 $\pm$ 2,7
O	0,1	180	2	16	5,0 $\pm$ 1,8
I	0,2	90	2	16	4,5 $\pm$ 1,6
E	0,2	180	1	-	4,5 $\pm$ 1,7
P	0,05	180	4	2	4,0 $\pm$ 1,8
N	0,1	180	2	8	4,0 $\pm$ 1,0
M	0,1	180	2	4	4,0 $\pm$ 1,2
H	0,2	90	2	8	1,0 $\pm$ 0,7
J	0,1	90	4	2	0,5 $\pm$ 0,5
K	0,1	90	4	4	0,0 $\pm$ 0,0
L	0,1	90	4	8	0,0 $\pm$ 0,0
G	0,2	90	2	4	0,0 $\pm$ 0,0
D	0,4	90	1	-	0,0 $\pm$ 0,0

Omsætningen af elleblade over hele forsøgsperioden fremgår af figur 3.19. Allerede under den 7 dage lange konditionering forekom der et vægttab på 0,81 g (gruppe X), mens yderligere 0,14 g blev tabt i den efterfølgende uge i de eksperimentelle enheder uden dyr (forskellen mellem grupperne A og X). I kontrolgruppe C omsatte dyrene blot yderligere 0,20 g (forskellen mellem grupperne C og A). Der blev ikke fundet statistiske forskelle mellem grupperne C-R, men der var, som det fremgår af figur 3.19, en vis overensstemmelse i forhold til de ovenfor beskrevne tendenser for dødelighed, og rækkefølgen af grupperne i tabel 3.7. Således var omsætningen af elleblade højest i kontrolgruppe C, mens blodomsætningen generelt faldt med stigende eksponeringskoncentration.



FIGUR 3.19. OMSÆTNING AF ELLEBLADE HOS *G. PULEX* ÆKVIVALENTEKSPONERET FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN, SORTERET EFTER FALDENDE OMSÆTNING. BOGSTAVERNE REFERERER TIL GRUPPENAVNE I TABEL 2.5, MENS FARVEKODERNE FRA FIGUR 3.18 ER ANVENDT. X: BLADTAB UNDER DEN 7 DAGE LANGE KONDITIONERING. A: BLADTAB UNDER HELE FØRSØGET, INKL. KONDITIONERINGSPERIODEN. VANDRETTE STREGER ANGIVER NIVEAUER FOR X OG A.



### 3.3.2 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af *Gamma-rus pulex*

Der blev for ingen af de målte parametre observeret signifikante forskelle mellem de to kontrolgrupper A og B, og selve håndteringsproceduren i forbindelse med eksponeringerne påvirkede således ikke resultaterne.

#### 3.3.2.1 Overlevelse hos hunnerne

Overlevelsen af hunner gennem forsøgsperioden fremgår af figur 3.20. I forhold til kontrolgrupperne A og B, blev en markant forøget dødelighed observeret i grupperne J og K, mens der var en tendens til forøget dødelighed i gruppe H. Endvidere blev der fundet signifikante forskelle mellem grupperne H og J, samt grupperne I og J. Selv om det ikke var muligt at finde yderligere signifikante forskelle, var der dog tydelige tendenser, der beskrives nedenfor.

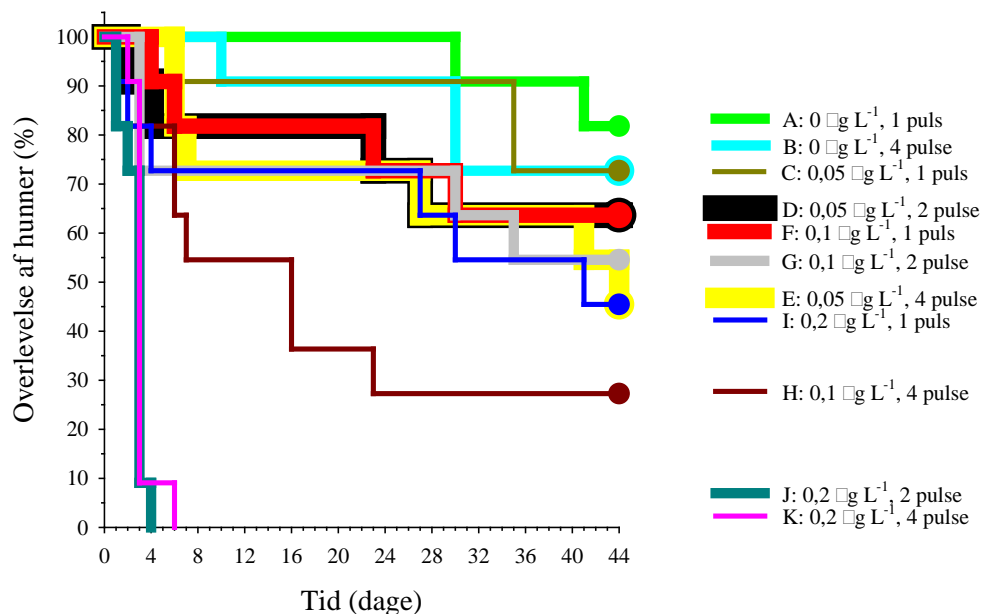


FIG. 3.20. OVERLEVELSE HOS HUNNERNE Gennem EKSPONERINGSPERIODEN (EKSPONERINGER DAG 0, 2, 4 OG 6) OG DEN EFTERFØLGENDE REPRODUKTIONSPERIODE IND TIL DAG 44. N=11 I HVER GRUPPE.

Sammenlignes grupperne inden for hvert koncentrationsniveau observeredes en tydelig tendens til positiv sammenhæng mellem antallet af pulse og den observerede dødelighed ved forsøgets afslutning: C<D<E, F<G<H, og I<J≈K. Ved den højeste koncentration, 0,2 µg L<sup>-1</sup>, var 2 pulse dog tilstrækkelig til at slå næsten alle dyrene ihjel, og der opnåedes derfor ingen yderligere effekt ved 4 pulse.

Resultaterne muliggør desuden følgende sammenligninger af ækvivalente eksponeringer, hvor koncentration×antal pulse=konstant:

- D (0,05 µg L<sup>-1</sup>, 2 pulse) og F (0,1 µg L<sup>-1</sup>, 1 puls), hvor dødeligheden var ens i de to grupper.
- E (0,05 µg L<sup>-1</sup>, 4 pulse), G (0,1 µg L<sup>-1</sup>, 2 pulse) og I (0,2 µg L<sup>-1</sup>, 1 puls), hvor dødeligheden var ens i de tre grupper.
- H (0,1 µg L<sup>-1</sup>, 4 pulse) og J (0,2 µg L<sup>-1</sup>, 2 pulse), hvor dødeligheden i gruppe J var markant højere end i gruppe H.

For sammenligningerne D-F og E-G-I var eksponeringerne således tilsyneladende ækvivalente, således at dobbelt så mange eksponeringer ved halv koncentration gav samme effekt som én eksponering med ”fuld” koncentration. For sammenligningen H-J observeredes tilsyneladende en overskridelse af en tærskel i gruppe J, hvor restituering ikke længere var mulig.

### 3.3.2.2 Overlevelse hos hannerne

Overlevelsen af hanner i løbet af forsøgets første 10 dage, indtil de efter endt parring blev taget fra hunnerne, fremgår af figur 3.21. I forhold til kontrolgrupperne A og B, blev en markant forøget dødelighed observeret i grupperne J og K, mens der var en tendens til forøget dødelighed i grupperne G og H. Endvidere blev der fundet signifikante forskelle mellem grupperne I og J. Selv om det ikke var muligt at finde yderligere signifikante forskelle, beskrives tydelige tendenser nedenfor.

Sammenlignes grupperne inden for hvert koncentrationsniveau observeredes følgende på dag 10:  $C \approx D \approx E$ ,  $F < G \approx H$ , og  $I < J \approx K$ . Der var således for de to højeste koncentrationer samme tendens, som hos hunnerne, nemlig at antallet af pulse havde betydning for den observerede dødelighed ved forsøgets afslutning, idet 1 puls resulterede i lavere dødelighed end 2 eller 4 pulse.

Resultaterne muliggør følgende sammenligninger af ækvivalente eksponeringer, hvor koncentration  $\times$  antal pulse = konstant:

- D ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ , 2 pulse) og F ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , 1 puls), hvor dødeligheden var ens i de to grupper.
- E ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ , 4 pulse), G ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , 2 pulse) og I ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , 1 puls), hvor der ikke var et tydeligt mønster i dødeligheden.
- H ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , 4 pulse) og J ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , 2 pulse), hvor dødeligheden i gruppe J var markant højere end i gruppe H.

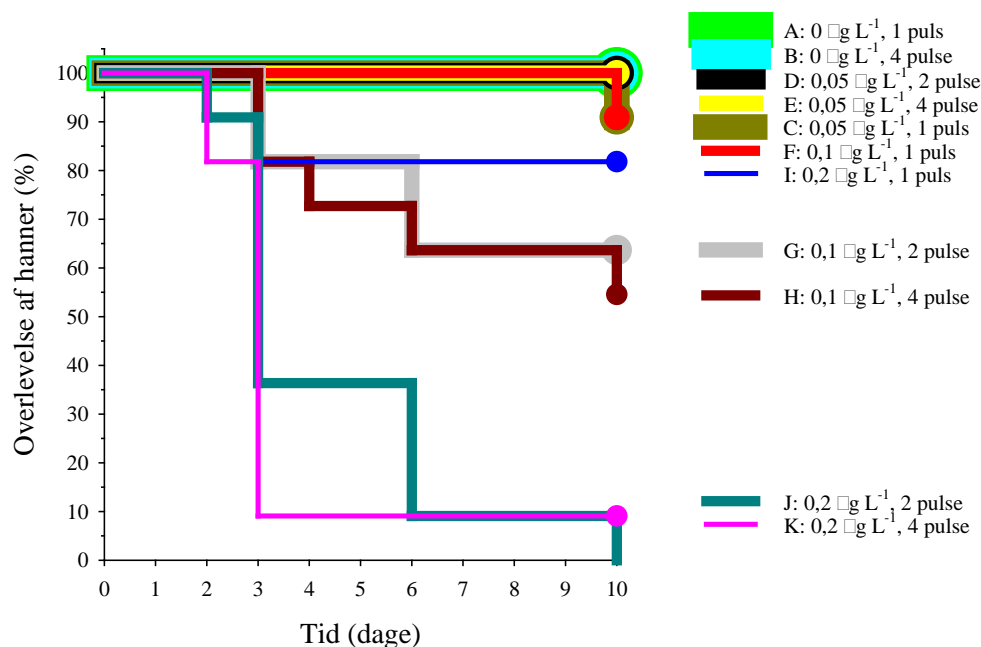


FIG. 3.21. OVERLEVELSE HOS HANNERNE Gennem forsøgets første 10 dage (eksponeringer dag 0, 2, 4 og 6), indtil de efter endt parring blev taget fra hunnerne.  $N=11$  i hver gruppe.

Med det forbehold, at der er tale om et begrænset antal dyr,  $n=11$ , vurderes sammenligningerne D-F og E-G-I at være tilnærmelsesvist ækvivalente, mens der for sammenligningen H-J tilsyneladende observeredes en overskridelse af en tærskel i gruppe J, hvor restituering ikke længere var mulig.

### 3.3.2.3 *Pardannelse og reproduktion*

Antallet af par og unger produceret gennem forsøgsperioden fremgår af figur 3.22, og centrale parametre er opsummeret i tabel 3.8.

Som det fremgår af det overordnede tidsforløb i figur 3.22, faldt antallet af par i kontrolgrupperne A og B i løbet af forsøgets første 6 dage, efterhånden som disse par færdiggjorde parringen. Samtlige eksponeringer med pyrethroid forårsagede konsekvent, at parrene slap hinanden i løbet af eksponeringsperioden, mens kontrolparrene ikke blev forstyrret af håndteringen. Efter endt eksponering gendannedes en del af parrene, på nær i grupperne J og K, hvor pargendannelsen stort set ophørte, og langt hovedparten af dyrene døde i løbet af de efterfølgende dage (Fig. 3.20 og 3.21). Enkelte par i grupperne D, E og F blev tilsyneladende forsinket i deres parring, men på dag 10 blev der ikke længere observeret par, og der blev ikke fundet forskelle mellem grupperne på tiden til sidste dag i par (Tabel 3.8).

Mens henholdsvis 9 og 8 hunner reproducerede sig i de to kontrolgrupper, A og B, var antallet af reproducerende hunner signifikant reduceret i grupperne H, J og K (Tabel 3.8). Med udgangspunkt i, at der er tale om et begrænset antal hunner ( $n=11$ ), vurderes alle eksponerede grupper på nær gruppe C, hvor 7 hunner reproducerede sig, at udvise tendenser til et reduceret antal reproducerende hunner.

Hunnerne fra de to kontrolgrupper A og B frigav deres unger meget synkront på dag 27, efter en gennemsnitlig inkubationstid på 25 dage, og der blev ikke fundet forskelle i inkubationstid mellem grupperne (Tabel 3.8). I alle eksponerede grupper, på nær gruppe F, blev en reduktion i antallet af unger pr. gruppe observeret. I grupperne J og K blev der ikke observeret unger, hvilket skyldes, at alle hunnerne var døde dag 6. I gruppe H blev der heller ikke observeret unger, selv om 3 ud af 11 hunner overlevede indtil forsøgets afslutning. Det fremgår af figur 3.22, at der især i grupperne D, E og F var enkelte hunner, der frigav deres unger senere end i kontrolgrupperne, hvilket stemmer overens med ovennævnte forsinkelse af parringen for enkelte par i disse grupper.

Som nævnt ovenfor faldt antallet af unger pr. gruppe markant i alle eksponerede grupper, på nær i gruppe F. I denne gruppe fik 2 ud af de 5 reproducerende hunner et stort antal unger (23 og 30). Blandt forsøgets øvrige hunner blev kun hos én yderligere hun (tilhørende gruppe A) observeret et antal unger over 20. Der blev dog ikke fundet forskelle mellem grupperne på det gennemsnitlige antal af unger pr. reproducerende hun (Tabel 3.8).

Ungernes levedygtighed blev evalueret ved at registrere deres overlevelse 14 dage efter frigivelsen fra hunnerne (Tabel 3.8). Mens det overlevende antal unger i grupper C, D, E, G og I var reduceret i forhold til kontrolgrupperne A og B, var der ingen forskelle på den procentvise overlevelse i kuldene fra de reproducerende hunner.

TABEL 3.8. OPSUMMERING AF MÅLTE PARAMETRE FOR REPRODUKTION HOS PAR AF VOKSNE *GAMMARUS PULEX* PULSEKSPONERET FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. DER BLEV ANVENDT 11 PAR I HVER AF 11 GRUPPER. DER BLEV ANVENDT TO KONTROLGRUPPER, A OG B, DER GENNEMGIK EKSPONERINGSPROCEDUREN HENHOLDSVIS 1 OG 4 GANGE FOR AT UNDERSØGE EFFEKTEN AF HÅNDTERINGEN ALENE. EN ASTERISK (\*) ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL I FORHOLD TIL KONTROLGRUPPE A.

Gruppe	Konc. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Antal pulse	Reproducerende hunner		Inkubationstid (dage)
			Antal	Sidste dag i par	
A	0	1	9	2,3 $\pm$ 0,4	25,0 $\pm$ 0,5
B	0	4	8	1,8 $\pm$ 0,7	25,3 $\pm$ 1,0
C	0,05	1	7	2,7 $\pm$ 0,8	24,6 $\pm$ 1,4
D	0,05	2	3	3,3 $\pm$ 1,3	27,3 $\pm$ 1,0
E	0,05	4	5	5,0 $\pm$ 0,7	25,0 $\pm$ 1,8
F	0,1	1	5	4,0 $\pm$ 0,8	24,6 $\pm$ 0,9
G	0,1	2	3	2,0 $\pm$ 1,2	25,7 $\pm$ 1,5
H	0,1	4	0*	-	-
I	0,2	1	4	3,0 $\pm$ 1,0	25,5 $\pm$ 1,7
J	0,2	2	0*	-	-
K	0,2	4	0*	-	-

Gruppe	Antal unger		Overlevelse af unger efter 14 dage	
	Pr. gruppe	Pr. reproducerende hun	Pr. gruppe	Pr. kuld fra reproducerende hun
A	104	11,6 $\pm$ 2,0	88	84,6 $\pm$ 4,0
B	105	13,1 $\pm$ 1,3	94	88,1 $\pm$ 4,1
C	51*	7,3 $\pm$ 1,7	37*	65,2 $\pm$ 10,2
D	27*	9,0 $\pm$ 3,8	19*	81,3 $\pm$ 13,0
E	39*	7,8 $\pm$ 2,4	13*	54,9 $\pm$ 19,7
F	83	16,6 $\pm$ 4,3	69	82,6 $\pm$ 3,9
G	28*	9,3 $\pm$ 1,2	23*	84,5 $\pm$ 10,8
H	0*	-	-	-
I	20*	5,0 $\pm$ 1,5	9*	54,0 $\pm$ 17,7
J	0*	-	-	-
K	0*	-	-	-

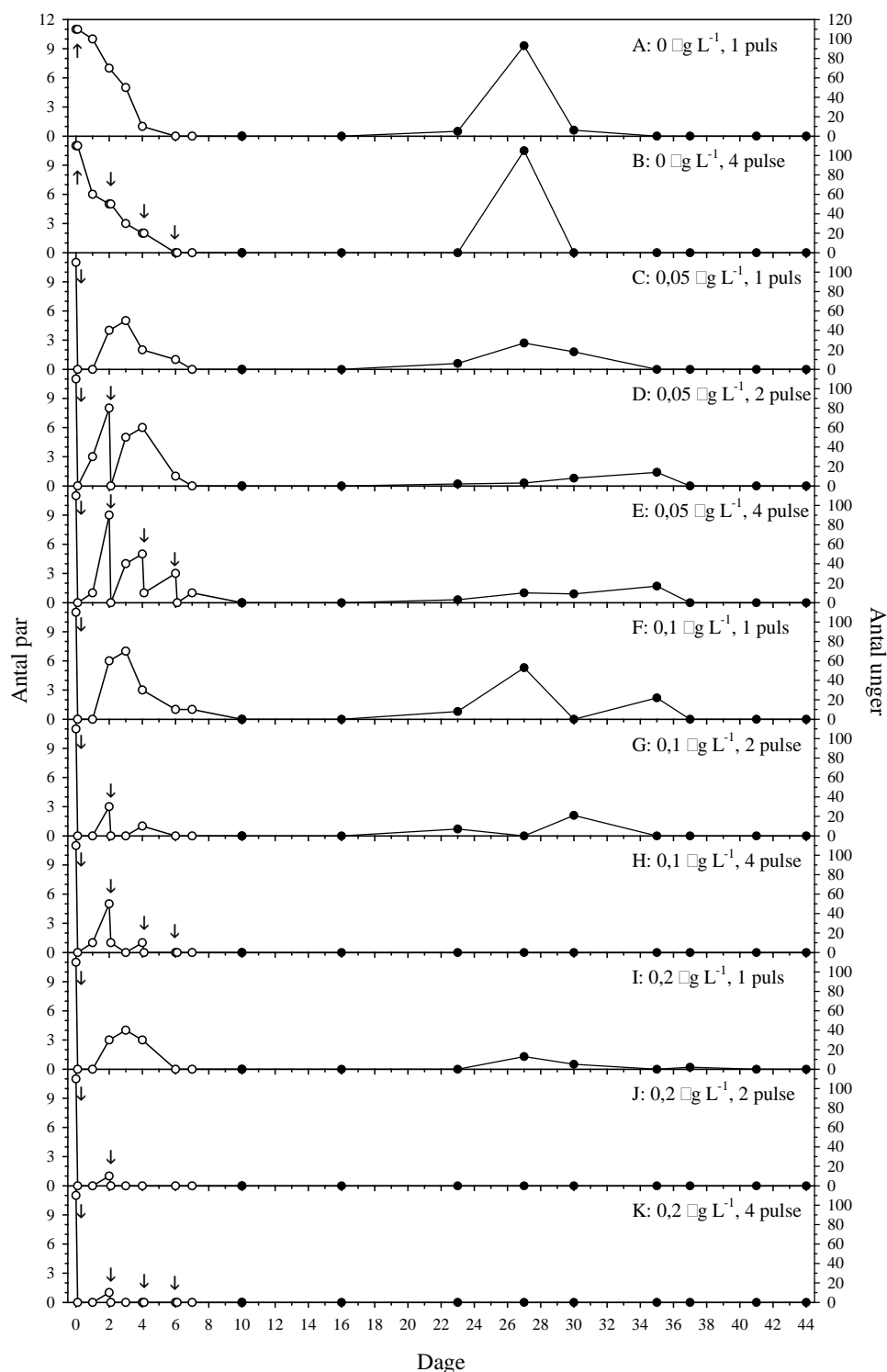


FIG. 3.22. ANTAL PAR OG UNGER PRODUCERET Gennem EKSPONERINGSPERIODEN (EKSPONERINGER DAG 0, 2, 4 OG 6, ANGIVET MED PILE) OG DEN EFTERFØLGENDE REPRODUKTIONSPERIODE INDTIL DAG 44. ÅBNE CIRKLER ANGIVER ANTAL PAR, MENS LUKKEDE CIRKLER ANGIVER ANTAL UNGER. N=11 PAR I HVER GRUPPE.

### 3.3.3 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af *Gammarus pulex*

Som tidligere nævnt var det primære formål med dette forsøg at få bedre kvantitative data for produktionen af juvenile. Imidlertid var dødeligheden i kontrolgrupperne A og B på henholdsvis 90 og 89%, uden at en god forklaring

på dette er fundet. Dette betyder, at det er meget begrænset, hvilke yderligere konklusioner, der kan drages i forhold til ovennævnte mere succesfulde forsøg. Derfor vurderes effekten af gentagne pyrethroidpulse på reproduktionen hos *Gammarus pulex* primært baseres på forsøget med par (afsnit 3.3.2).

### 3.3.3.1 Overlevelse og reproduktion

Kønsratioen (forholdet hanner/hunner) i de fire udvalgte forsøgspopulationer à 50 voksne dyr var  $1,16 \pm 0,07$  (gennemsnit  $\pm$  SEM). Overlevelsen og antallet af unger produceret er angivet i Tabel 3.9. Der blev ikke fundet forskelle mellem antallet af overlevende voksne, og blot mellem 2,8 og 8,2% overlevede. I forsøget blev kun fundet ganske få unger, og antallene sandsynliggør, at blot én reproducerende hun pr. population kan have frigivet ungerne. Antallet af unger var reduceret for grupperne E, H, I, J og K.

TABEL 3.9. OVERLEVELSE OG REPRODUKTION HOS POPULATIONER AF VOKSNE *GAMMARUS PULEX* PULSEKSPONERET FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. DER BLEV ANVENDT 5 POPULATIONER À 50 VOKSNE I HVER AF 11 GRUPPER. DER BLEV ANVENDT TO KONTROLGRUPPER, A OG B, DER GENNEMGIK EKSPONERINGSPROCEDUREN HENHOLDSVIS 1 OG 4 GANGE FOR AT UNDERSØGE EFFEKTEN AF HÅNDBETINGEN ALENE. EN ASTERISK (\*) ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL I FORHOLD TIL KONTROLGRUPPE A.

Gruppe	Konc. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Antal pulse	Antal populationer	Overlevelse af voksne		Antal unger pr. population
				Antal pr. population	%	
A	0	1	5	5,0	10	13,4
B	0	4	4	4,4	11	9,0
C	0,05	1	5	7,4	15	14,8
D	0,05	2	5	5,6	11	11,6
E	0,05	4	5	6,6	13	7,2*
F	0,1	1	5	8,2	16	14,4
G	0,1	2	5	6,8	14	11,2
H	0,1	4	5	4,0	8	6,6*
I	0,2	1	5	4,6	9	6,0*
J	0,2	2	5	4,2	8	5,0*
K	0,2	4	5	2,8	6	2,8*

### 3.3.3.2 Omsætningen af elleblade

Omsætningen af elleblade i forsøget er vist i tabel 3.10. Der blev ikke fundet forskelle mellem grupperne.

TABEL 3.10. OMSÆTNINGEN AF KONDITIONEREDE ELLEBLADE HOS POPULATIONER AF VOKSNE *GAMMARUS PULEX* PULSEKSPONERET FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. DER BLEV ANVENDT 5 POPULATIONER À 50 VOKSNE I HVER AF 11 GRUPPER. DER BLEV ANVENDT TO KONTROLGRUPPER, A OG B, DER GENNEMGIK EKSPONERINGSPROCEDUREN HENHOLDSVIS 1 OG 4 GANGE FOR AT UNDERSØGE EFFEKTEN AF HÅNDBETINGEN ALENE. EN ASTERISK (\*) ANGIVER EN SIGNIFIKANT FORSKEL I FORHOLD TIL KONTROLGRUPPE A.

Gruppe	Koncentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Antal pulse	Vægttab under forsøget (g)
A	0	1	$0,869 \pm 0,033$
B	0	4	$1,156 \pm 0,118$
C	0,05	1	$1,030 \pm 0,162$
D	0,05	2	$0,938 \pm 0,091$
E	0,05	4	$0,689 \pm 0,281$
F	0,1	1	$1,322 \pm 0,212$
G	0,1	2	$1,157 \pm 0,164$
H	0,1	4	$0,908 \pm 0,067$
I	0,2	1	$1,229 \pm 0,141$
J	0,2	2	$1,140 \pm 0,122$
K	0,2	4	$0,839 \pm 0,128$

## 4 Diskussion

### 4.1 EFFEKTER AF GENTAGNE PULSEKSPONERINGER MED PYRETHROID PÅ SMÅDYR I ET NATURLIGT VANDLØB

Forsøg med direkte pulseksponering af vandløb med insekticider under naturlige forhold er få, formodentlig bl.a. på grund af forsøgenes etiske aspekter. Det kan således være vanskeligt at forsvare at forgifte rigtige vandløb som led i forsøg, hvis det samtidig er ulovligt i forbindelse med landbrugs- og skovdrift. Typisk har der været tale om undersøgelser i forbindelse med sprøjtning af skov eller plantager og de deri beliggende vandløb (fx Langer & Taylor 1974, Peterson & Zitko 1974, Eidt 1975, Davies & Cook 1993). Ved vores forsøg var der til sammenligning kun tale om påvirkning af en meget begrænset del af vandløbet og med en relativt lav koncentration over kort tid. Der kunne således ikke påvises umiddelbare effekter blot 100 m nedstrøms for forsøgsområdet.

Vores forsøg blev afviklet under relativt usædvanlige klimatiske forhold. Således var maj måned væsentlige koldere end normalt, hvilket også medførte lavere temperaturer i vandløbet. Det skyldes, at vandløbet primært modtager sit vand fra meget overfladenære grundvandsmagasiner og direkte overfladisk afstrømning. I sådanne tilfælde vil der være en tæt sammenhæng mellem vand- og lufttemperaturen. Også nedbørsforholdene var usædvanlige, hvilket resulterede i en for årstiden ekstrem stor afstrømning omkring 2 uger efter første pulseksponering. Denne afstrømning må formodes at have medført en øget drift af makroinvertebrater ud af samtlige forsøgsrender, ligesom den formodentlig bidrog til forøget rekolonisering af renderne med makroinvertebrater opstrøms fra. Det er således velkendt, at drift af smådyr kan øges dramatisk i forbindelse med voldsomme afstrømninger (se fx Brittain & Eikeland 1988). Desuden blev skillevæggene mellem renderne overskyldet, således at en utilsigtet udveksling af smådyr mellem naborender ikke kan udelukkes.

Selve forsøgsbetingelserne var teknisk set ikke optimale. Skillevæggene sluttede således ikke perfekt til bunden, hvilket forstærkedes over tid og ikke mindst som følge af den kortvarigt stærkt forøgede afstrømning. Under den første behandling med pyrethroid driftede der således store mængder dyr ud af den ueksponerede rende, selvom der ikke blev påvist indhold af pyrethroid i denne. Det er således sandsynligt, at fx *Gammarus pulex* flygtede ind i denne fra den tilstødende eksponerede rende og derefter lod sig transportere nedstrøms via drift. Det er således ved laboratorie- og mesokosmosforsøg vist, at *Gammarus pulex* bliver hyperaktiv (bevæger sig markant mere end normalt) selv ved en 10-100 gange lavere koncentration af pyrethroid end renderne blev behandlet med, hvilket modsvarer et øget driftrespons under naturlige forhold i et vandløb (Lauridsen & Friberg 2005, Nørum et al. 2006).

Til gengæld lykkedes det ret godt at ramme den ønskede nominelle koncentration af lambda-cyhalothrin i de eksponerede forsøgsrender. Tages der højde for, at der pga. stoffets hydrofobe egenskaber uvilkaarligt vil forekomme adsorption af pyrethroidet til bund og skillevægge under passagen af renderne, er en ”genfinding” på 84 % af den nominelle koncentration meget tilfredsstillende.

lende. Rrenderne er derfor blevet eksponeret med stort set den forudsatte nominelle koncentration.

De potentielle ændringer i rendernes artssammensætning gennem forsøgsperioden som følge af eksponeringen med 0, 1, 2 eller 4 pyrethroidpulse må forventes at afhænge af faktorer som (i) akut eller forsinket dødelighed, (ii) adfærdsbetinget drift ud af renderne, samt (iii) efterfølgende rekolonisering, bl.a. via drift af individer opstrøms fra. Resultater fra et igangværende projekt under Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram indikerer, at akut/forsinket dødelighed forekommer hos flere af de arter, som forekom i Stavis Å (Wiberg-Larsen et al., in præp.). Ligeledes fandt vi under nærværende laboratorieforsøg forøget dødelighed hos *Gammarus pulex* ved eksponering ved samme koncentration, se afsnit 4.3.1. Hvad angår adfærdsbetinget drift bekræftede vores undersøgelse i øvrigt tidligere studiers påvisning af en forhøjet drift i natte timerne (se fx Brittain & Eikeland 1988). Forklaringen på den højere natdrift er en øget aktivitet om natten, hvor prædationen fra fisk er nedsat, men hvor den øgede aktivitet også medfører et større tab til strømmen. Ud over tabet af individer via drift kommer ændringer, som skyldes, at (iv) larver/nymfer af flere insekter naturligt forvandlede til voksne inden for perioden. Modsat formodes der næppe at være sket nogen væsentlig rekolonisering (v) som følge af fx voksne insekters æglægning på forsøgstrækningen, idet evt. lagte æg – alene pga. de lave vandtemperaturer – formodentlig ikke ville kunne have nået at udvikle sig til individer, som ville kunne findes i prøverne. Endelig (vi) er der ”ændringer”, som skyldes at visse taxa voksede til gennem perioden, og derved i stigende omfang kunne registreres sidst i perioden (der blev anvendt relativt stor maskevidde i Surbersamplern).

Mens det med det valgte forsøgsdesign generelt ikke var muligt at måle dødelighed, blev der påvist væsentlige forskelle i driftrespons mellem de enkelte taxa som følge af pyrethroidpulserne. Forøget drift blev således fundet hos *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Heptagenia sulphurea*, *Leuctra fusca*, *Elmis aenea*, *Agapetus ochripes* og Tanypodinae, mens dette ikke var tilfældet hos Hydracnida, *Limnius volckmari*, Orthocladinae, Tanytarsini, Chironomini og Chironomidae-popper. Specielt for *Agapetus ochripes* blev det direkte observeret, at adskillige larver forlod deres huse og firede sig nedstrøms fastgjort til en spunden ”livline”. Nogle af disse indgik derved i den målte drift, mens andre blev i renderne og sandsynligvis er døde efterfølgende. Forsinket dødelighed efter pyrethroidpulse er således dokumenteret under laboratorieforhold hos *Gammarus pulex* (Møhlenberg et al. 2004) og visse insekter (Wiberg-Larsen et al., in præp.). Forøget drift ved pulse med pyrethroidkoncentrationer i intervallet 0,01-0,1  $\mu\text{gL}^{-1}$ , dvs. som i nærværende forsøg, er tidligere påvist hos *Gammarus pulex*, *Asellus aquaticus*, *Baetis rhodani*, *Leuctra nigra* og *Simulium latigonium* (Møhlenberg et al. 2004, Lauridsen & Friberg 2005, Beketov & Liess 2008b, Rasmussen et al. 2008, Nørum et al. 2010), en effekt som endda for visse af arterne var til stede i op til 22-96 timer efter eksponeringen (Beketov & Liess 2008b, Rasmussen et al. 2008). Ligeledes er forøget drift blevet påvist hos *Heptagenia sulphurea* ved en 90 minutters puls med 0,1  $\mu\text{gL}^{-1}$  pyrethroid (Nørum et al. 2006). Hos *Gammarus pulex*, *Leuctra nigra* (en nær slægtning til *L. fusca*) og Simuliidae er der ligeledes fundet forøget drift ved 30 minutters pyrethroidpulse med koncentrationer i intervallet 0,1-10  $\mu\text{gL}^{-1}$  (Heckmann & Friberg 2005). Ved en 90 minutters puls med 5  $\mu\text{gL}^{-1}$  lambda-cyhalothrin fandt Wiberg-Larsen & Nørum (2009) endvidere et tydeligt driftrespons hos Tanypodinae, men et væsentligt mindre respons hos Orthocladinae og Tanytarsini, hvilket understøtter den ved nærværende undersøgelse fundne større følsomhed hos Tanypodinae sammenlignet med de øvrige chi-



ronomidere. Til gengæld fandt Wiberg-Larsen & Nørum (2009) markant forhøjet drift hos *Hydrachnidia* ved  $5 \mu\text{gL}^{-1}$ , mens dette ikke var tilfældet ved denne undersøgelses væsentligere lavere koncentration.

Som nævnt er studier, hvor hele vandløb er blevet eksponeret for insekticid-pulse sjældne. Et interessant eksempel er sprøjtning med pyrethroidet permethrin af et tasmansk vandløb fra luften, hvor der blev beregnet en effekt-koncentration under pulsen på  $0,1-0,5 \mu\text{gL}^{-1}$  (Davies & Cook 1993). Dette medførte en 200 gange forøgelse af driften og denne var signifikant forøget over hele 8 dage. Specielt slørvinger og døgnfluer blev påvirket. Andre forsøg med direkte tilsætning til forsøgsvandløbet er udført med væsentlig højere koncentrationer af pyrethroid og har derfor ikke overraskende medført meget markante effekter (fx Kreutzweiser & Sibley 1991).

Forøget drift er for flere arter udtryk for hyperaktivitet, en adfærdsændring som betyder at dyrene derved bliver mere udsatte for transport med strømmen (Nørum et al. 2006, Nørum et al. 2010, Nørum et al. 2011). For *Gammarus pulex* er det foreslået, at dyrene sanser pyrethroidet og søger at flygte til et "refugium" (Liess 1994, Schulz & Liess 1999a, Nørum & Bjerregaard 2003). For andre arter er den forøgede drift snarere et udtryk for, at de via den fysiologiske påvirkning bliver mindre gode til at holde sig fast og derfor går i drift (se Lauridsen 2002). Hyperaktivitet hos *Gammarus pulex* er fundet ved koncentrationer ned til  $0,01 \mu\text{gL}^{-1}$ , men ved koncentrationer over  $1 \mu\text{gL}^{-1}$  er tilstanden hurtigt forbigående og afløses af immobilisering og efterfølgende død (Nørum et al. 2010). Hyperaktivitet er også påvist hos *Heptagenia sulphurea* ved koncentrationer på  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ , mens immobilisering indtraf ved  $1-10 \mu\text{gL}^{-1}$  (Nørum et al. 2010). Til gengæld er reduceret aktivitet fundet hos *Leuctra nigra* ved helt ned til  $0,001 \mu\text{gL}^{-1}$  (Nørum et al. 2010), hvilket også kan resultere i øget drift, fordi dyrene har sværere ved at modstå strømmen.

Drift i forbindelse med pulse betyder et ekstra fødeudbud for andre organismer, fx fisk som ørred, der netop tager en væsentlig del af deres føde via drift. Ved at spise de pesticidkontaminerede døde eller svækkede invertebrater er ørrederne imidlertid i risiko for at blive negativt fysiologisk påvirket – i det mindste forbigående. Dette er sandsynliggjort i en tasmansk undersøgelse (Davies & Cook 1993).

Drift hos makroinvertebrater vides at kunne påvirkes af tilstedeværelsen af prædatorer, fx fisk. Alene tilstedeværelsen af duftstoffer fra prædatorerne kan enten nedsætte eller forøge driften (Friberg et al. 1994, Wooster & Sih 1995, McIntosh & Townsend 1996). I mindre danske vandløb, hvor ørred indtager en central rolle i økosystemet, og hvor ørredprædation er vist at kunne have markant indflydelse på populationer af *Gammarus pulex* (Andersen et al. 1993), kan driften af denne art være undertrykt. Stavis Å huser en relativt stor ørredbestand, hvor forsøgsstrækningen var placeret. Det er derfor relevant at vide, hvilket samspil der er mellem faktorer som prædator- og insekticid-eksponering. Et enkelt studie (Schulz & Dabrowski (2001) har således vist større drift hos en døgnflue ved eksponering for en sublethal koncentration af fenvalerat ( $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ ) uden tilstedeværelse af en fiskeprædator, end hvis denne var til stede. Nørum et al. (2006) fandt dog ingen sådan sammenhæng hos *Gammarus pulex*, hvor effekten af lambda-cyhalothrin tilsyneladende helt overskyggede et evt. respons som følge af tilstedeværelse af ørred. Det er derfor sandsynligt, at tilstedeværelsen af ørred ikke har haft indflydelse på de udførte forsøg i Stavis Å.

Til trods for de ikke optimale forsøgsbetingelser (se ovenfor) kunne der påvises effekt af gentagne pulse med pyrethroid på den samlede fauna og for enkelte taxa (fx *Heptagenia sulphurea*) på den naturlige vandløbsbund ved forsøgets afslutning, hvorimod blot en enkelt puls ikke medførte sådanne ændringer. Signifikante nedgange i bestandstætheden som følge af pulseksponeringerne kunne dog ikke påvises for dominerende taxa som *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani* og *Limnius volckmari*, når disse blev testet hver for sig. Dette tilsyneladende paradoks skyldes formodentlig, at testen på hele samfundet af smådyr så at sige opsummerede ændringer, som ikke statistisk lod sig påvise, når taxa håndteredes enkeltvis.

Den påviste effekt af gentagne pulse på bestanden af *Heptagenia sulphurea* var at forvente, fordi denne art vides at være følsom over for relativt lave koncentrationer af lambda-cyhalothrin (Nørum et al 2006) og havde desuden markant forhøjet drift i de pyrethroidbehandlede render (se ovenfor). Samtidig påvirkes den formodentlig kun lidt af store afstrømninger (via sin form og adfærd), hvilke ellers kunne have betydet en forøget rekolonisering af de eksponerede render. Dette kan forklare, hvorfor der sås en tydelig nedgang i bestandstætheden for netop denne art og fx ikke for *Gammarus pulex* og *Baetis rhodani*, som i langt højere grad drifter under store afstrømninger (fx Brittain & Eikeland 1988).

Også *Limnius volckmari*, som primært forekom som larver, indgår relativt sjældent i drift, fordi larverne lever nedgravet i grus (Elliott 2008). Dette bekræftedes ved denne undersøgelse. Manglen på effekt ved forsøgets afslutning hos denne skyldes derfor formodentlig, at den anvendte pyrethroidkoncentration ikke medførte nogen væsentlig overdødelighed. Wiberg-Larsen et al. (in præp.) fandt således en LC50 værdi på  $>1\mu\text{gL}^{-1}$  efter en eksponering over 90 min.

Der blev påvist en effekt på overlevelsen af en enkelt art, nemlig vårfluen *Agapetus ochripes*. Dødeligheden hos denne under forpupningen var således dobbelt så stor ved 4 pulse sammenlignet med de øvrige behandlinger. Dette er ikke overraskende, fordi netop puppestadiet må anses for at være et kritisk tidspunkt i disse insekters livscyklus. Dette understøttes af studier af forpupningssuccesen hos en anden vårflue *Limnephilus lunatus* (Schulz 1997, Schulz & Liess 1999a).

I de udlagte bladpakker blev der ikke påvist ændringer i artssammensætningen, som kunne relateres til forskelle i pulsbehandling. Til gengæld forekom der en signifikant generel forøgelse af individantallet i bladpakkerne for de dominerende taxa. Det sidste tyder på, at koloniseringen af bladpakkerne var relativt ufuldstændig ved forsøgets start, således at den efterfølgende kolonisering helt overskyggede mulige effekter i forbindelse med eksponeringerne. Dette stemmer udmærket overens med målingerne af vægttabet i bladpakkerne, som ved forsøgets slutning var ganske betydeligt (i gennemsnit var kun 20% af biomassen tilbage). En væsentlig del af dette vægttab skyldes formodentlig omsætning via "iturivere", og blandt disse endvidere primært *Gammarus pulex*, som dels forekom med en gennemsnitlig tæthed på 54 individer/bladpakke, dels via sin størrelse vurderes langt mere effektiv end andre potentielle iturivere som fx *Leuctra fusca* (og muligvis enkelte Orthoclaadiinae). Forudsættes det således, at en "gennemsnitlig" *Gammarus pulex* omsætter 2 mg elleblade dag<sup>-1</sup> (beregninger baseret på data fra Nilsson 1974, Maltby & Crane 1994, Aßmann et al. 2010), kræves der en tæthed på minimum 32 individer for at modsvare det fundne vægttab. Det må endvidere antages, at

vandtemperaturen var tilstrækkelig høj til at sikre en betydelig fødeomsætning hos denne art. Det kan dog ikke udelukkes, at der også har været et væsentligt vægttab som følge af simpel fysisk nedbrydning, ikke mindst pga. den før omtalte store afstrømning midtvejs i forsøgsperioden.

Den høje algebiomasse på stenene umiddelbart før første eksponering er et helt naturligt fænomen. Det er således veldokumenteret, at specielt kiselalger (som udgjorde hovedbestanddelen af algebiomassen) har et veldefineret maksimum i det tidlige forår, hvor tilgængeligheden af silicium, der benyttes til opbygning af algernes skaller, er stor, og hvor lysindstrålingen er betydelig umiddelbart før løvspring (se fx Kjeldsen 1996, Kjeldsen et al. 1999). Det må desuden antages, at de algeædende makroinvertebrater på dette tidspunkt ikke via deres græsning var i stand til at følge med algernes vækst (algerne dannede således millimeter tykke belægninger på stenene ved forsøgets start). Det skyldes ikke mindst, at en af de mest betydende græssere i det pågældende vandløb, vårfluen *Agapetus ochripes*, stod umiddelbart over for at skulle forpuppe sig og dermed havde afsluttet sin vækst. En måned senere var algebiomassen reduceret betydeligt. Forklaringen er primært, at lysindstrålingen på dette tidspunkt var væsentlig nedsat pga. beskygning fra de omgivende skovtræer, selvom lysindstrålingen generelt var stigende pga. af længere dage og solens øgede højde over horisonten. Dertil kommer ikke mindst, at der må formodes at have været en betydelig afslidning af alger i forbindelse med den store afstrømning midtvejs i perioden. På grund af disse to faktorerers afgørende betydning – muligvis kombineret med en vis ”mangel” på effektive græssere – var det ikke realistisk muligt at påvise effekter på græsningen som følge af de forskellige behandlinger med pyrethroid.

#### 4.2 EFFEKTER PÅ BIODIVERSITET OG FUNKTION HOS SMÅDYRSSAMFUND I KUNSTIGE VANDLØB

Den tekniske gennemførelse af forsøgene i kunstige vandløb (strømrender) vurderes at have været vellykket. Der forekom ikke – som ved et tidligere projekt (Wiberg-Larsen & Nørum 2009) – nedbrud af pumperne eller andre uheld. Ligeledes vurderes forskellene i vandføring mellem de enkelte render at være uden væsentlig betydning. Endvidere lykkedes det ret godt at ramme den ønskede nominelle koncentration af lambda-cyhalothrin i de eksponerede forsøgsrender. Tages der højde for, at der pga. stoffets hydrofobe egenskaber uvilkårligt vil forekomme adsorption af pyrethroidet til bund og skillevægge under passagen af renderne, er en ”genfindning” på 67 % af den nominelle koncentration meget tilfredsstillende.

Der blev derudover foretaget en vellykket kolonisering af forsøgsrenderne med makroinvertebrater fra Lemming Å. Sammensætningen af taxa i renderne vurderes således at repræsentere et realistisk billede af den taxon sammensætning, som forekommer i Lemming Å. Ligeledes var tætheden af makroinvertebraterne i renderne sammenlignelig med, hvad der gennemsnitlig er fundet i ca. 800 danske vandløbsstationer under NOVANA (baseret på omregning af individantal i sparkeprøver under NOVANA programmet: Wiberg-Larsen, upubliceret) og i forsøgsrenderne i Stavis Å. I forhold til tidligere og lignende forsøg med kolonisering af renderne i Lemming (Wiberg-Larsen & Nørum 2009) var faunasammensætning i nærværende forsøg mere realistisk, idet der ved de tidligere forsøg, som i øvrigt blev udført om efteråret, forekom en efterfølgende opformering af Tubificidae og Tanytarsini, som karakteriserer slammede habitater. Der var således langt mere udbredt slamaflejring i renderne ved de tidligere forsøg. Ligesom ved de tidligere forsøg forekom der ret

betydelige bevoxsninger af trådalger i samtlige render, men disse dannede ikke som tidligere måtter og eller bidrog til dannelse af slamflader. Desuden var der for flere arters vedkommende forsøget igennem en ganske væsentlig indvandring til renderne via det indpumpede vand. Dette skyldtes i forhold til de nævnte tidligere forsøg, at der denne gang var en mere direkte indstrømning af vand fra Lemming Bæk til pumpen, og at den del af invertebrater, som mest udpræget indgår i driften, derved relativt let kunne kolonisere renderne.

Renderne fungerede derfor alt i alt bedre end tidligere og repræsenterede i højere grad forholdene i naturlige vandløb.

Tæthederne af de enkelte arter har betydning, ikke mindst i forsøg af nærværende type, fordi der til stadighed foregår konkurrence mellem arterne og inden for disse. Denne konkurrence påvirkes potentielt ved pesticideksponering. Eksempelvis er det sandsynliggjort, at reduceret individtæthed hos den enkelte art kan mindske den interne konkurrence, og derved også mindske effekten af pesticidet (Liess 2002).

De potentielle ændringer i rendernes artssammensætning gennem forsøgsperioden som følge af eksponeringen med 0, 1, 2 eller 4 pyrethroidpulse afhang – ligesom forsøget i Stavis Å – af faktorer som akut eller forsinket dødelighed, adfærdsbetinget drift ud af renderne, samt efterfølgende rekolonisering, bl.a. via drift af individer opstrøms fra. For sidst nævntes vedkommende bekræftede vores undersøgelse i øvrigt tidligere studiers påvisning af en forhøjet drift i nattetimerne (se fx Brittain & Eikeland 1988). Dertil kommer ændringer, som skyldes at visse taxa vokser gennem perioden, og derved i større omfang blev registreret sidst i perioden (fordi der blev anvendt relativt stor maskevidde i Surbersamplern), samt at larver/nymfer af flere insekter forvandlede til voksne inden for perioden. Derimod er der næppe foregået nogen væsentlig rekolonisering som følge af fx voksne insekters æglægning på forsøgstrækningen, alene fordi evt. lagte æg kun har haft kort tid til at udvikle sig til individer, som ville kunne findes i prøverne. Eneste undtagelse kunne være hurtigt voksende dansemyg som fx *Tanytarsini*.

På rendernes sten-/grusbund blev der som følge af eksponeringerne med pyrethroid fundet en tydelig effekt på dels taxon sammensætningen, dels antallet af de dominerende arter *Gammarus pulex* og *Amphinemura standfussi*, idet effekten (undtagen for sidst nævnte) øgedes når der blev eksponeret med mere end én puls. For *A. standfussi*'s vedkommende klækkedes desuden færre voksne fra de render, der blev eksponeret med mere end én puls. Der var dog ikke forskel på, om faunaen og de nævnte arter påvirkedes med 2 eller 4 pulse. Til gengæld var der ingen effekt på dominerende taxa som *Baetis rhodani*, *Leuctra fusca/digitata* og Chironomidae. Tætheden af *L. fusca/digitata* øgedes endda gennem perioden, formodentlig fordi de små nymfer (som enten ”overlevede” eksponeringerne eller rekoloniserede, se nedenfor) voksede til og dermed i højere grad blev tilbageholdt i den anvendte Surbersampler, som havde relativt stor maskevidde. Der blev også flere Tanypodinae og Tanytarsini igennem forsøgsperioden, hvilket kan have samme årsag. Til gengæld var der et generelt fald i individtætheden af Chironomini, hvilket formodentlig primært skyldes klækning af voksne individer. Der forekom således et ret stort antal pupper i prøverne, ligesom gruppen synes at være relativt upåvirkelig af eksponeringerne (ingen forøget drift, se nedenfor).

Bestandsændringerne blev generelt understøttet af de enkelte taxa's driftrespons under og umiddelbart efter pulseksponeringerne. Således øgedes driften

af *G. pulex* og *A. standfussi* voldsomt, når de blev udsat for pyrethroidpulse. Dette var også tilfældet for en række andre taxa, fx Hydrachnidia, *B. rhodani*, *L. fusca/digitata* og Tanypodinae, uden at dette respons som nævnt ovenfor medførte bestandsmæssige ændringer. For *B. rhodani*'s vedkommende skyldes det formodentlig, at der var en betydelig rekolonisering via det indpumpede vand. Der blev dog ikke kun fundet væsentlig rekolonisering hos denne art, men også hos de andre taxa, som påvirkedes af pulseksponeringerne i form af markant forhøjet drift ud af renderne, og som af denne årsag udviste en markant nedgang i individantal.

For nogle taxa blev effekten af pulseksponeringen tydeligst dokumenteret via driften ud af renderne. Det gjaldt eksempelvis vandkalven *Oreodytes sanmarkii*, som stort set blev elimineret ved først eksponering, men som (formodentlig fordi den pga. sin hurtige svømning var i stand til at undslippe prøvetagningen) kun i ringe grad blev fundet i Surberprøverne før eksponeringen. Der blev ligeledes fundet et signifikant driftrespons hos Simuliidae (kvægmyg).

Modsat udviste grupper af dansemyg som Orthocladiinae og Chironomini intet forhøjet driftrespons ved eksponeringerne, tydeligvis en indikation på at de generelt er relativt tolerante over for pyrethroider (Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

De fundne taxonspecifikke driftrespons var generelt de samme, som blev fundet ved forsøget i Stavis Å, og ved en række andre undersøgelser (se referencer og diskussion under afsnit 4.1).

Også i bladpakkerne blev der fundet en klar effekt på artssammensætningen af gentagne eksponeringer, sammenlignet med kun en enkelt puls. Til gengæld blev der kun fundet lignende effekter på antallet af *A. standfussi* og *Asellus aquaticus*, mens der fx ingen effekt var for *Gammarus pulex*. Det var dog et generelt fænomen, at individantallet i bladpakkerne var meget lille ved starten af forsøget, og at antallet af individer generelt øgedes markant gennem perioden. Det tyder på, at 1 måned var for kort tid til at sikre en effektiv kolonisering forud for eksponeringerne, fx for *Gammarus pulex*. Denne forsinkede kolonisering kan delvis være årsag til, at der kun kunne påvises relativt beskedne effekter af behandlingerne. Den stigende individtæthed kan dog for enkelte taxa (*L. fusca/digitata* og visse Chironomidae) også forklares ved vækst og deraf følgende bedre tilbageholdelse på den anvendte sigte (relativt stor maskevidde) under prøvebearbejdningen.

Vægttabet hos de udlagte blade var ganske betydeligt gennem forsøget. Således var der i gennemsnit kun 40 % af biomassen tilbage ved forsøgets afslutning. En væsentlig del af dette vægttab skyldes formodentlig omsætning via "iturivere". Der blev således i gennemsnit fundet ca. 25 iturivere pr. bladpakke. Af disse var *Gammarus pulex* formodentlig den mest betydende alene pga. dens størrelse sammenlignet med de langt mindre slørvinger. Forudsættes det (se under afsnit 4.1), at en *Gammarus pulex* omsætter 2 mg bladmateriale dag<sup>-1</sup>, svarer tabet af bladmateriale til tilstedeværelsen af ca. 17 individer pr. bladpakke, hvilket stort set var tilfældet i kontrolrenderne. Det er imidlertid tvivlsomt, om den fundne effekt (reduktion) af gentagne eksponeringer på omsætningen af blade kan forklares ved en reduceret tæthed af *Gammarus pulex*. Ganske vist var individtætheden signifikant mindst i render, der var behandlet med 2 eller 4 pulse, men det var også tilfældet før behandlingerne. Der kan derimod muligvis være tale om reduceret ædeadfærd hos de tilstedeværende

individer. Til gengæld var der en klar effekt af gentagne pulse på tætheden af *A. standfussi*, som er en potentielt betydende ituriver.

Algebiomassen på sten blev forøget i samtlige forsøgsrender gennem forsøgsperioden. Dette var forventeligt, fordi renderne først blev sat i funktion knapt 2 måneder før første eksponering, og algerne derfor stadig var i en etableringsfase. Denne fase fortsatte derfor formodentlig gennem resten af forsøgsperioden, hvor algerne samtidig blev udsat for mere lysindstråling, ligesom vandtemperaturen øgedes. Gennem perioden har der formodentlig været en vis græsning på algerne. Således var tætheden af potentielle græssere (primært *Baetis rhodani*, *Amphinemura standfussi* og Orthocladiinae) i gennemsnit 3400 individer  $m^{-2}$  på strygene, hvor algebiomassen blev målt (gennemsnit for samtlige render uanset behandling). Der blev imidlertid kun fundet signifikant nedsat tæthed af *A. standfussi*, hvorfor det ikke er overraskende, at der ikke blev påvist forskel i algebiomasse mellem kontrolrender og de pythroidbehandlede render. Pulse med lambda-cyhalothrin har imidlertid potentielt effekt på makroinvertebrater græsning på bundlevende alger. Således påviste Rasmussen et al. (2008) ved  $0,1 \mu g L^{-1}$  og over en periode på 10 dage reduceret græsning i fler-arts-studier med naturrealistiske tætheder af *Gammarus pulex*, *Baetis rhodani*, *Heptagenia sulphurea* og *Ancylus fluviatilis*, og hvor rekolonisering ikke var mulig. Ligeledes fandt Wiberg-Larsen & Nørum (2009) under laboratorieforhold reduceret græsning over 14 dage hos *H. sulphurea* som var blevet eksponeret for 90 min.'s pulse med hhv.  $0,5$  og  $5 \mu g L^{-1}$  lambda-cyhalothrin. Studier med andre insekticider har ligeledes vist en forventet forøgelse af biomassen af bundlevende alger, når græsningstrykket fra makroinvertebraterne reduceredes (Hose et al. 2003).

#### 4.3 EFFEKTER PÅ OVERLEVELSE, VÆKST, REPRODUKTION OG STOFOMSÆTNING HOS *GAMMARUS PULEX* UNDER LABORATORIEFORHOLD

##### 4.3.1 Betydningen af pulsvarighed og interpulsvarighed for overlevelse og stofomsætning hos *Gammarus pulex*

Undersøgelsen af betydningen for overlevelse og stofomsætning hos *Gammarus pulex* af en række eksponeringsscenarier, med forskellige pulsvarigheder, interpulsvarigheder, antal pulse og eksponeringskoncentrationer, men ved fastholdt ækvivalenteksponering, bidrog generelt til at perspektivere og understøtte generaliserbarheden af projektets øvrige forsøg. Udbyttet af forsøgene var dog ikke optimalt. Dødeligheden blandt kontroldyrene var således stærkt forhøjet, hvilket muligvis skyldes uhensigtsmæssig håndtering af forsøgsdyrene efter indsamling og frem til udtagning af individer til forsøgene. Desuden blev dyrene indsamlet på en lokalitet med meget konstante miljøforhold (stor kilde), bl.a. en vandtemperatur, som er konstant lavere ( $8-9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) end den, som blev anvendt i laboratorieforsøgene ( $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), hvilket kan have medført et øget stress og vantrivsel hos forsøgsdyrene. Det betyder, at der må forventes at have været en behandlingsuafhængig overdødelighed i forbindelse med pyrethroideksponeringerne, hvilket utvivlsomt vanskeliggjorde påvisning af statistisk signifikante effekter mellem behandlingerne.

Til trods herfor viste forsøget entydigt, at der forekom en overdødelighed ved eksponering for 1-flere pulse med koncentrationer af lambda-cyhalothrin på  $0,05$ ,  $0,1$ ,  $0,2$  og  $0,4 \mu g L^{-1}$ . Dette er delvist i overensstemmelse med egne tidligere undersøgelser (Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Her reduceredes bevægelsesadfærden ganske vist hos individer af *G. pulex*, som blev eksponeret for

en enkelt 90 minutters puls af pyrethroidet i en koncentration på  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ , mod slutningen af eksponeringen, men dyrene kom sig efterfølgende (dvs. uden overdødelighed), hvorimod 93% af individer eksponeret over for  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$  døde inden for 10 dage efter endt eksponering. Olsen (2009) fandt øget dødelighed hos voksne individer, som ligeledes blev pulseksponeret i 90 min, ved koncentrationer i intervallet  $0,1-0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ; ved den højeste koncentration overlevede stort set ingen individer. Derimod fandt Olsen ingen overdødelighed ved  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Denne mindre forskel i respons ved laveste koncentration sammenlignet med nærværende forsøg kan muligvis skyldes den generelt større "følsomhed" hos vores forsøgsdyr (se ovenfor). For et andet pyrethroid, esfenvalerat, er der påvist øget dødelighed ved 1-times pulse i intervallet  $0,1-0,6 \mu\text{L}^{-1}$  (Cold & Forbes 2004).

Samlet set indikerer de foreliggende resultater, at overlevelsen ved fastholdt ækvivalenteksponering stiger med faldende eksponeringskoncentration, stigende pulsvarighed og stigende interpulsvarighed, mens antallet af pulse ikke i sig selv synes at være afgørende. Overlevelsen var dermed højere, når dyrene udsattes for længerevarende pulse med relativt lave koncentrationer, end hvis de blev udsat for kortvarige pulse med relativt høje koncentrationer. Samtidig var overlevelsen større, hvis dyrene fik mere tid til at restituere mellem gentagne pulse. Forøgede effekter, hvis samme dosis blev givet over kort tid snarere end over længere tid, er ligeledes fundet af Schulz & Liess (2000), der undersøgte effekten af relativt lave eksponeringer med fenvalerat på vårfluen *Limnephilus lunatus*.

Den generelt høje dødelighed under forsøgene havde ikke overraskende indflydelse på omsætningen af elleblade, hvor der ikke kunne påvises statistiske forskelle mellem behandlingerne. Der var dog tendenser som fulgte forskellene i overlevelse, således at de hårdest ramte grupper også havde den laveste omsætning. Af andre forhold, der kan have bidraget til mangel på statistisk signifikante forskelle mellem stofomsætningen hos ueksponerede og pyrethroideksponerede individer, kan nævnes, at tabet af bladmasse under konditioneringen og den efterfølgende uge i forsøgsakvarierne tilsyneladende var meget variabelt, at variation i spiseligheden af de enkelte elleblade efter konditioneringen kan have været af betydning, når dyrene i hvert akvarium kun blev tilbudt to blade ad gangen, og at en forskel i individstørrelse mellem grupperne kan have haft betydning.

Forsøget viste i øvrigt, at der naturligt forekom et meget betydeligt vægttab hos ellebladene under konditioneringen (ca. 25%). Vægttabet skyldes lækning af let opløselige organiske forbindelser til vandfasen, hvilket er et velkendt fænomen for Rød-El. Således fandt Pozo (1993), Taylor & Barlöcher (1996) og Braioni et al. (2001) lækning af samme størrelse, i sidstnævnte studie inden for de første 48 timer efter at ellebladene blev placeret i vand.

#### **4.3.2 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos par af *Gamma-rus pulex***

Overlevelsen hos forsøgsdyrene (kontrolgrupperne) var som udgangspunkt bedre end i ovenstående forsøg (se 4.3.1). Dyrene blev således indsamlet i et andet vandløb og håndteret mere optimalt. Der blev trods dette kun fundet få statistisk signifikante forskelle mellem behandlingerne. Tendensen var dog samlet set entydig, nemlig at der – inden for hver testet koncentration ( $0,05$ ,  $0,1$  og  $0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ ) – var positiv sammenhæng mellem dødelighed hos hunner og antallet af pulse. Lignende tendens forekom hos hannerne ved de to højeste koncentrationer. For hannerne var tendensen desuden som i forsøget med

overlevelse og stofomsætning, nemlig at dobbelt så mange eksponeringer med halv koncentration medførte samme effekt som én eksponering med ”fuld” koncentration.

Pardannelse hos *Gammarus pulex* og andre gammarider er styret af hunnernes kønscyklus, og parring kan kun finde sted lige efter et hudskifte (Sutcliffe 1992). Kønscyklus afhænger af vandtemperatur og årstid. Pardannelsen varierer fra 1 uge til ca. 1 måned og er negativt korreleret med temperaturen (Nilsson 1977). I vores forsøg medførte alle eksponeringer med pyrethroid uanset koncentration, at parrene slap hinanden, hvorimod ueksponerede par forblev sammen, og stort set kun ved 0,05 og 0,1  $\mu\text{gL}^{-1}$  gendannedes parrene efterfølgende. Tilsvarende effekt blev fundet af Olsen (2009). Den reducerede overlevelse – primært hos hunnerne – påvirkede produktionen af unger, som var markant mindre hos de pyrethroideksponerede par. Ved 0,2  $\mu\text{gL}^{-1}$  var der stort set ingen ungeproduktion. Og kun ved 0,1  $\mu\text{gL}^{-1}$  var der tendens til, at ungeproduktionen reduceredes med stigende antal pulse. Pyrethroid eksponeringerne medførte således ingen reduktion i antallet af unger pr. hun. Dette er i god overensstemmelse med Olsen (2009), som også fandt at reduktionen i ungeproduktion primært var en funktion af en øget dødelighed hos hunnerne. De overlevende eksponerede hunner producerede således ligeså mange unger, som de der ikke blev eksponeret, og der var ingen forskel på overlevelsen af de producerede unger.

Der var en tendens til, at hunner udviste større følsomhed over for pyrethroidet end hanner. Noget tilsvarende blev fundet af Olsen (2009). Forklaringen er formodentlig som foreslået af denne, at hunnerne er mindre end hannerne, samt at hunner anvender en væsentlig mængde energi på ægproduktion. Mindre individer er teoretisk mere følsomme end større, fordi de har større overflade/volumen forhold, hvilket begunstiger diffusionen af toksiske stoffer ind i dyrene. Og øget energiforbrug til ægproduktion mindsker mængden af energi, som kan anvendes til afgiftning.

Andre pyrethroiders effekt på reproduktionen hos *Gammarus pulex* er undersøgt (Cold & Forbes 2004). Således medførte 1 times eksponering med pyrethroidet esfenvalerat i en koncentration på 0,05  $\mu\text{gL}^{-1}$  en øjeblikkelig adskillelse af parrene (som i nærværende forsøg), frigørelse af æg/unger fra hunnernes ”rugepose”, samt efterfølgende forsinkelse af gendannelse af parrene og reduceret reproduktion. Den nedsatte reproduktion beroede ligesom i nærværende forsøg, primært på øget dødelighed, ikke på en reduktion i antallet af unger produceret pr. hun (Cold & Forbes 2004, Møhlenberg et al. 2004).

Møhlenberg et al. (2004) udførte også forsøg med gentagne (1, 2, eller 3) 1 times pulse med 0,1  $\mu\text{gL}^{-1}$  esfenvalerat – og 1 uge mellem pulsene – på parringsadfærd og dødelighed hos *Gammarus pulex*. Der blev herved kun fundet forøget dødelighed ved 3 pulse, hvilket harmonerer udmærket med vores resultater.

De fundne effekter af enkeltstående og gentagne pyrethroidpulse på *Gammarus pulex*'s reproduktion under laboratorieforhold, må overført til forholdene i naturlige vandløb formodes at have væsentlig indflydelse på artens populationsdynamik. Der må således forventes, at reproduktionen i forbindelse med gentagne pulse er nedsat sammenlignet med enkeltstående pulse.



### 4.3.3 Effekter af gentagne pyrethroidpulse på reproduktion hos populationer af *Gammarus pulex*

Dette forsøg mislykkedes reelt, fordi dødeligheden i kontrolgrupperne var uforholdsmæssig stor. Det medførte, at der ikke kunne påvises forskelle i dødelighed mellem disse og de eksponerede grupper, ligesom stofomsætningen ikke viste forskelle mellem grupperne overhovedet. Til gengæld var ungeproduktionen signifikant reduceret ved 0,2 µgL<sup>-1</sup> og ved 4 pulse med 0,1 µgL<sup>-1</sup>.

## 4.4 SAMMENFATTENDE DISKUSSION

### 4.4.1 Scenarier for forekomst af 1-flere pyrethroidpulse i vandløb

Pesticider – herunder pyrethroider som det i vores forsøg anvendte lambda-cyhalothrin – tilføres vandløb fra forskellige kilder. I forbindelse med sprøjtning af marker kan der ske vinddrift, hvorved stofferne afsættes på vandoverfladen, overfladisk afstrømning og tilførsel via dræn i forbindelse med kraftige nedbørshændelser, samt teoretisk en tilførsel via dybere liggende grundvand. Dertil kommer afløb fra vaske- og spulepladser, hvis tanke og sprøjter tømmes for rester og rengøres her. Sådanne handlinger er ikke lovlige, men udledninger vil i givet fald også kunne være knyttet til kraftige nedbørshændelser.

Blandt disse kilder vurderes tilførsel som følge af udvaskning fra de sprøjtede marker i forbindelse med efterfølgende regnhændelser at have størst betydning (fx Solomon et al. 1996, Styczen et al. 2003, Rasmussen et al. 2011a). Dette giver anledning til de højeste koncentrationer af pesticider i vandløbene i form af relativt kortvarige pulse. I danske vandløb (især på lerjord) er dræn kombineret med makroporer utvivlsomt den mest betydende transportvej (Kronvang et al. 2003, Styczen et al. 2003). Direkte overfladisk afstrømning er derimod generelt af mindre betydning, idet markerne langs vandløbene normalt er lavtliggende, med ringe hældning, således at kun ca. 3% af det dyrkede areal er i risiko for erosion (Kronvang et al. 2003).

Dette gælder formodentlig også den i Danmark mest anvendte gruppe af insekticider, pyrethroiderne, der i 2009 udgjorde 71 % af den samlede mængde solgte insekticider og hele 91 % af arealer behandlet med insekticider (Miljøstyrelsen 2011). Disse stoffer er tungt opløselige i vand, men til gengæld meget fedtopløselige, og bindes derfor hurtigt og stærkt til overflader af organisk og mineralsk stof. De har således en stor bindingsevne i forhold til mineraler som kvarts, corundum (aluminiumoxid), kaolinit og montmorillonit (Hand et al. 2001, Oudou & Hansen 2002). Derfor forsvinder stofferne hurtigt fra vandfasen, og de er således vanskelige at måle ved traditionelle vandkemiske undersøgelser (Hill 1989, Hand et al. 2001). Blandt pyrethroiderne har lambda-cyhalothrin ( $\log K_{ow} = 7$ ) den stærkeste bindingsevne (Oudou & Hansen 2002). Den stærke evne til at bindes til organisk og mineralsk materiale betyder, at stofferne i stort omfang vil tilføres vandløbene bundet til partikler (Ghadiri & Rose 1991). De vil dog kortvarigt kunne forekomme på opløst form i vandløb, hvis et kraftigt regnskyl indtræffer straks efter udsprøjtning.

Der foretages desværre ikke monitoring af pyrethroider i vandløbsvand i forbindelse med det nationale overvågningsprogram. Der foreligger derimod resultater fra regionale undersøgelser foretaget af de tidligere amter af et enkelt pyrethroid, esfenvalerat. Dette stof blev herved fundet i over 30% af prøverne ved en undersøgelse af tre små østjyske vandløb, som afvander landbrugsoplande (Wiggers 1999). I ca. 20% af prøverne var koncentrationerne endda >

0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Disse relativt høje værdier blev alle målt i forbindelse med større afstrømningshændelser i maj-juni, hvor stofferne primært udsprøjtes. Det er derfor overvejende sandsynligt, at der har været tale om afstrømning fra sprøjtede marker via drænen. Det kan dog ikke udelukkes, at der i nogle tilfælde har været tale om ulovlige udledninger fra vaskepladser, hvilket i givet fald også vil give sig udtryk i forhøjede koncentrationer i forbindelse med regnskyl. Lambda-cyhalothrin og andre nu anvendte pyrethroider har ikke væsensforskellige egenskaber og anvendelse sammenlignet med det nu forbudte esfenvalerat. Det er derfor nærliggende at konkludere, at de koncentrationer af opløst lambda-cyhalothrin, som vi har benyttet i vores forsøg, er miljømæssigt realistiske for pyrethroider generelt.

I opløst form er pyrethroiderne – som allerede omtalt i indledningen – meget giftige – med beregnede NOEC værdier i model-ferskvandsøkosystemer i intervallet 0,002-0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  (review i Van Wijngarden et al. 2005). De har derudover en række markante sublethale effekter, hvilket vi klart har dokumenteret i nærværende undersøgelse, og som understøttes af andre studier (se afsnit 4.1-4.3). Imidlertid har de også en betydelig giftighed, selvom de er bundet til partikler opslemmet i vandfasen (fx Hill 1989, Schulz & Liess 2001a, Schulz & Liess 2001b, Maul et al. 2008), ligesom der er påvist negative effekter af pyrethroider bundet til naturligt sediment på vandløbsinvertebrater (Maund et al. 2002, Friberg et al. 2003, Weston et al. 2004). Det har imidlertid ligget uden for nærværende projekts rammer at undersøge effekten af pulse med partikelbundet pyrethroid.

Men hvordan er sandsynligheden for at et vandløb inden for et givet år eller kortere periode tilføres 1-flere pulse af pyrethroid? Betragtes behovet for at sprøjte med insekticider, herunder pyrethroider, afhænger dette af risikoen for væsentlige angreb på afgrøderne. Pyrethroider anvendes til bekæmpelse af skadedyr på et bredt udvalg af afgrøder, men i praksis vil der oftest være tale om at bekæmpe angreb af bladlus, som er vigtige skadedyr i korn (Nielsen 2009-2011). Således udgør arealer med korn ca. 75 % af de samlede arealer behandlet med pyrethroider (beregnet ud fra data fra Miljøstyrelsen 2010). Bladlusene indfinder sig typisk på kornplanterne fra slutningen af maj til slutningen af juni, mens opformering og dermed skader optræder juni-juli (Planteværn Online). Aarhus Universitets varslingstjeneste gør det muligt for den enkelte landmand at vide, hvornår der er risiko for angreb, men det er derudover godt landmandskab selv at følge udviklingen på egne marker. Det gælder kort sagt om at sprøjte rettidigt i opstarten af et angreb. Ikke for tidligt så bladlusene kan nå at opformere sig igen og ikke for sent, fordi angrebene så kan være svære at bekæmpe (Planteværn Online). Væsentlige angreb af bladlus (og andre skadedyr), som kræver bekæmpelse, forekommer ikke nødvendigvis hvert år, hvilket afspejles i forbruget af insekticider (se Miljøstyrelsen 2011). Imidlertid viser ny undersøgelse, at kun 3% af danske landbrugere anvender Planteværn Online (Axelsen et al. 2012). Der er altså stor risiko for, at der reelt sprøjtes mere end nødvendigt.

Men lad os fokusere på det ideelle scenarie, hvor den enkelte mark i år med bladluseangreb kun sprøjtes én gang. Forestiller man sig endvidere, at der er angreb på samtlige kornmarker inden for oplandet til et givet vandløb, og antages det, at samtlige landmænd sprøjter deres marker ”synkront”, vil det højest kunne resultere i én markant puls, hvis det regner intenst umiddelbart herefter over hele oplandet. Flere markante pulse kan derimod forekomme, hvis de enkelte sprøjtninger ikke foretages synkront, hvis der indtræffer flere kraftige regnskyl i perioden med asynkrone sprøjtninger, og hvis regnen end-

videre falder meget ujævnt inden for oplandet. Der kan selvfølgelig også forekomme flere regnskyl efter bare én sprøjtning, men kun det første vil formodentlig tilføre målbart, opløst pyrethroid, fordi det bindes til jorden og desuden undergår nedbrydning. Både kraftige og ujævnt forekommende regnskyl er i øvrigt hændelser, som må forventes i stigende grad under fremtidens ændrede klima (Christensen et al. 2006). Det skal i den forbindelse nævnes, at Kattwinkel et al. (2011) forudsiger en væsentlig forøgelse af såvel forbruget som tabet af insekticider til vandområder i et fremtidigt ændret klima, specielt i Central- og Nordeuropa, dvs. altså også i Danmark. Kattwinkel et al. (2011) vurderer endvidere, at det vil øge den økologiske risiko i vandløb op til dyrket land, samt øge andelen af vandløb som ikke vil opfylde god økologisk status (fra 6 til 19% i Skandinavien og baltiske lande). Modsat konkluderer Henriksen et al. (2012) - baseret på et fremtidigt klimascenarie og bestemte modelforudsætninger for transport via dræn - at der ikke er risiko for øget tilførsel af lambda-cyhalothrin (og lignende insekticider) til vandløb, primært fordi pyrethroidet antages at bindes så hårdt til jordpartikler, at det ikke udvaskes. Holder denne forudsætning imidlertid ikke, kan der ske tab til vandløbene, ligesom partikelbundet pyrethroid under alle omstændigheder kan transporteres til vandløbene, hvor det også på denne form har en væsentlig giftvirkning (Maund et al. 2002).

Det opstillede scenarie af gentagne pulse med pyrethroid er ganske vist teoretisk, men efter vores vurdering ikke usandsynligt. Det er således påvist, at der i forbindelse med sprøjtesæsonen kan forekomme gentagne pulse med forhøjede koncentrationer af adskillige pesticider med bare et par ugers mellemrum (Rasmussen et al. 2011a).

Spørgsmålet er imidlertid, om der er en ligefrem sammenhæng mellem behandlingshyppighed og hyppigheden af (gentagne) pyrethroidpulse i vandløbene. Her er det vigtigt at erkende, at der alene pga. det varierende behov for bekæmpelse af skadedyr vil være betydelig variation i behandlingshyppigheden fra år til år. Behandlingshyppigheden defineres som det antal gange årligt, som de konventionelt dyrkede landbrugsarealer (A) i gennemsnit sprøjtes med den solgte mængde stof (F), forudsat at der anvendes en fastsat standarddosis (D). Behandlingshyppigheden (BH) beregnes således ud fra formlen  $BH = F/(A \cdot D)$ . Behandlingshyppigheden beregnes for hele landet, men differentieres for hvert anvendt middel (fx kan den for lambda-cyhalothrin beregnes til 0,83 i 2009). Den kan derfor ikke umiddelbart anvendes ved vurdering af risikoen for påvirkning af en gruppe af vandløb inden for et givet område, et enkelt vandløb, eller en given strækning af et vandløb. Dertil kommer andre forhold, som gør behandlingshyppigheden uegnet som miljøindikator (Kjær et al. 2007).

Uanset dette kan der så forventes en vis positiv sammenhæng mellem behandlingshyppighed på konventionelt dyrkede arealer inden for oplandet til et givet vandløb og antallet af pulse af fx pyrethroider som forekommer i vandløbet? Vi vil hævde, at det teoretisk set er muligt. Lykkes det nemlig ikke første gang at få bugt med skadedyrene (fx fordi der er sprøjtet for tidligt), kan der være behov for mindst én ekstra sprøjtning. Og så er der potentielt også risiko for 1-flere ekstra pulse i vandløbet. Sammenhængen er naturligvis mere ugenomskuelig, når det drejer sig om behandlingshyppighed, beregnet som det udelukkende er tilfældet for hele landet, og et gennemsnitligt antal pulse i et givet vandløb eller vandløbsstrækning.

Vi vil på baggrund af ovenstående konkludere, at forekomsten af gentagne pulse inden for et givet vandløb eller strækning af dette ikke er urealistisk. Pulse-sene må desuden forventes at forekomme med forskellig hyppighed, koncentration, pulsvarighed og intervaller. Er de udførte forsøg set i det lys og i forhold til de valgte koncentrationer realistiske? Vi mener afgjort ja.

#### 4.4.2 Betydning af enkelte og gentagne pyrethroidpulse

Laboratorieforsøgene blev overvejende udført inden for et ret snævert interval af pyrethroidkoncentrationer ( $0,05-0,4 \mu\text{gL}^{-1}$ ), som vurderes realistiske i danske vandløb (se indledningen og afsnit 4.2.1). Disse forsøg viste, at dødeligheden hos *Gammarus pulex* ved fastholdt ækvivalenteksponering ("dosis") øgedes ved stigende koncentrationer, og dermed aftagende pulsvarighed, samt ved faldende tid mellem de enkelte pulse. Antallet af pulse var under sådanne omstændigheder ikke i sig selv afgørende. Det var altså værre for dyrene, at de blev udsat for kortvarige pulse med relativt høje koncentrationer, end hvis de udsattes for længerevarende pulse med relativt lave koncentrationer. Dette er interessant, fordi man umiddelbart kunne forvente, at den samme ækvivalenteksponering – med varierende antal pulse, koncentrationer og varighed – ville medføre samme effekt (Giesy et al. 1999). Samtidig øgedes dødeligheden, hvis dyrene ikke fik tilstrækkelig tid til at restituere mellem gentagne pulse. Det er netop sådanne scenarier, som må formodes at forekomme og have betydning i danske vandløb.

Vi valgte i vores øvrige forsøg i laboratoriet, kunstige vandløb og et naturligt vandløb ligeledes at fokusere på at undersøge effekten af relativt lave koncentrationer af pyrethroid. For det naturlige og de kunstige vandløb var det nødvendigt at fastholde pulseksponeringer med kun én koncentration,  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ . En udvidelse af undersøgelserne til at omfatte de kombinationer af koncentrationer, antal pulse, pulsvarighed og tid mellem de enkelte pulse, som vi testede i laboratoriet på én art (og primært med ét simpelt endpoint: dødelighed), ville have været økonomisk og praktisk uoverkommeligt for fler-arts-studier, herunder forsøg med hele samfund af arter. I stedet undersøgte vi i disse miljøer effekten af en form for "worst case scenarie", nemlig op til 4 gentagne pulse med 2 dage mellem de enkelte pulse. Rationalet var, at hvis der ikke under sådanne omstændigheder kunne påvises en øget effekt sammenlignet med enkeltstående pulse, ja så vil det næppe i fremtiden være umagen værd at fokusere på betydningen af gentagne pulse, og på betydningen af behandlingshyppighed overhovedet.

Pulse med den anvendte relativt lave, men miljørealistiske, pyrethroidkoncentration medførte effekter på en væsentlig del af vandløbenes invertebrater i form af øget drift ud af de påvirkede strækninger. Effekterne af vores forsøg i Stavis Å og de kunstige vandløb er sammenstillet i tabel 4.1 og viser, at mindst 11 ud af i alt 15 dominerende eller relativt talrige arter/grupper udviste et markant driftrespons ved den første puls.

Tabet af individer var så betydeligt, at det har betydet en øjeblikkelig og væsentlig kvantitativ ændring af artssammensætningen. Der har dog næppe været tale om, at enkelte arter helt er forsvundet. Var noget tilsvarende sket under "naturlige" forhold, i forbindelse med afstrømning af pyrethroid fra nysprøjtede marker, ville der imidlertid sandsynligvis have været registreret en ændring (nedgang) i den såkaldte faunaklasse, som måles med Dansk Vandløbs Fauna Indeks (og som indtil videre er det eneste vandrammedirektivmål for økologisk kvalitet i danske vandløb). Påvirkningen ville imidlertid være forbigående. Under "naturlige" forhold vil tiden indtil den oprindelige arts-

sammensætning retableres – og der fx ikke længere kan spores en effekt på faunaklassen – afhænge af flere faktorer som den berørte strækningens længde, mulighederne for indvandring fra opstrøms upåvirkede strækninger, herunder egnede tilløb, mulighederne for spredning via voksne ægbærende hunner over land, vejrforhold under ”over-land” spredningen, og årstiden (se Wiberg-Larsen & Nørum 2009). I vores forsøg var de berørte forsøgsstrækninger korte og mulighederne for rekolonisering via drift af individer opstrøms fra – selv i de kunstige render – relativt gode og rekoloniseringen derfor relativt hurtig.

TABEL 4.1. DRIFTRESPONS HOS FORSKELLIGE INVERTEBRAT-TAXA UNDER (1 90 MIN) OG UMIDDELBART EFTER (2 TIMER) EKSPONERING MED 0,1 µg LAMBDA-CYHALOTHRIN L-1 I HHV. ET NATURLIGT VANDLØB (STAVIS Å) OG KUNSTIGE VANDLØB (STRØMRENDER I LEMMING). SIGNATURFORKLARING: + SIGNIFIKANT RESPONS; - IKKE SIGNIFIKANT RESPONS; # IKKE TIL STEDE ELLER FOREKOMMENDE I MEGET RINGE ANTAL SÅLEDES AT EFFEKTVURDERING IKKE ER MULIG.

Taxon	Stavis Å	Kunstige vandløb (Lemming)
<i>Gammarus pulex</i>	+	+
Hydrachnidia	-	+
<i>Baetis rhodani</i>	+	+
<i>Heptagenia sulphurea</i>	+	#
<i>Leuctra fusca/digitata</i>	+	+
<i>Amphinemura standfussi</i>	#	+
<i>Elmis aenea</i>	+	#
<i>Limnius volckmari</i>	-	#
<i>Oreodytes sanmarkii</i>	#	+
<i>Agapetus ochripes</i>	+	#
Simuliidae	#	+
Tanypodinae	+	+
Orthocladiinae	-	-
Chironomini	-	-
Tanytarsini	-	-

De efterfølgende pulse betød tilsvarende tab af individer via drift og deraf følgende ændringer af artssammensætningen. Tabene af individer blev ligesom ved første eksponering til en vis grad kompenseret via drift fra opstrøms strækninger. Det er dog sandsynligt, at de gentagne pulse så at sige har akkumuleret effekterne, ligesom der efterfølgende er sket en kompensation for den samlede effekt via rekolonisering af forsøgsstrækningerne frem til afslutningen af forsøgene. Effekterne af en enkelt puls i forhold til gentagne pulse er sammenlignet i tabel 4.2.

Inden for en tidshorisont på 30 dage blev der fundet langt flere og betydende effekter som følge af gentagne pulse, end hvis samfundene i det naturlige vandløb og de kunstige vandløb kun blev udsat for en enkelt puls. Effekterne som følge af gentagne pulse omfattede markante ændringer i samfundene som helhed i både det naturlige og de kunstige vandløb, reduktion i tætheden af bestemte arter på selve vandløbsbunden, og reduktion i klækningen af larver/nymfer til voksne hos to arter af vandinsekter. Desuden blev der i de kunstige vandløb fundet effekter af gentagne pulse på artssammensætningen og enkelte arter i de udlagte bladopaker, men ingen tilsvarende effekter af en enkeltstående puls. Ligeledes blev der fundet nedsat omsætning af bladene i de kunstige render ved gentagne pulse, men ikke ved en enkelt puls. Sådanne

effekter af gentagne pulse kunne dog ikke påvises for bladpakkerne i det naturlige vandløb.

De fundne effekter er overordnet set konsistente med effekter fundet ved andre vandløbs-mesokosmos studier eller studier af effekter i naturlige vandløb og for forskellige insekticider (fx Flannagan et al. 1979, Yasuno et al. 1982, Wallace et al. 1989, Lauridsen & Friberg 2005, Beketov & Liess 2008a, Rasmussen et al. 2008, Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Andre studier har påvist yderligere effekter som reduceret græsning på bundlevende alger (fx Yasuno et al. 1982). Derudover er der påvist effekter i form af reduceret kropsstørrelse hos døgnfluenymfer, primært fordi disse forvandlede til voksne tidligere pga. stress-påvirkningen (Alexander et al. 2008). Dette vil potentielt bidrage til en reduktion i arternes formeringssucces.

Forskellen i påviste effekter mellem det naturlige og de kunstige vandløb skyldes helt givet forhold knyttet til forsøgsomstændighederne. Således varierede vandføringen markant i det naturlige vandløb, mens den var stort set konstant i hvert af de kunstige vandløb (og variationen i vandføring mellem de enkelte render relativt lille). Desuden indebar de replikerede render en større chance for at eftervise effekterne statistisk. På den anden side medførte de relativt gode muligheder for rekolonisering i de kunstige vandløb, at effekterne her formodentlig blev mindre tydelige, end hvis rekoloniseringen havde været beskeden.

Samlet set viste forsøgene med hele invertebratsamfund derfor udpræget konsistens, nemlig at omfanget af negative effekter på disses sammensætning og funktion øges ved gentagne pulse sammenlignet med enkeltstående pulse. Dette resultat understøttes desuden af laboratoriestudierne på *Gammarus pulex*, hvor der var tendenser til øget dødelighed hos voksne, reproducerende individer, og nedsat ungeproduktion hos sidstnævnte ved gentagne pulse.

Generelt er det vanskeligt fuldstændig realistisk at efterligne de forhold, som organismene er udsat for i vandløb, som måtte blive påvirket af pyrethroider én eller flere gange i løbet af en givet periode. Det er imidlertid vores vurdering, at de fundne effekter formodentlig vil være større i "virkeligheden", fordi der her vil være tale om påvirkning af større områder, som det derfor vil tage længere tid at rekolonisere. Effekter vil derfor kunne forventes at blive mere tydelige og ses længere end den måned, som var tidshorisonten ved vores søg.

Få udenlandske studier har fokuseret på effekter af gentagne pulse. Fx medførte 3 pulse med 7 dages mellemrum og i miljørealistiske koncentrationer af insekticidet imidacloprid markante negative effekter på makroinvertebrat populationstæthed og diversitet, omsætning af blade og fødeoptagelse hos enkelte arter i kunstige vandløb (mesokosmos) (Pestana et al. 2009). Et andet studie med gentagne (i alt 12) insekticidpulse afviger fra vores ved at intervallet mellem pulsene var langt større (3 måneder), samtidig med at hele det pågældende vandløb blev besprøjtet manuelt med en meget høj koncentration, således at kun få (arter/individer) makroinvertebrater overlevede de enkelte sprøjtninger (Wallace et al. 1989, Wallace et al. 1991). Effekten af sidstnævnte forsøg var derfor ikke overraskende meget omfattende og forsøgsbetingelserne langt fra så realistiske som ved nærværende forsøg.

TABEL 4.2. SAMMENFATNING AF UNDERSØGTE EFFEKTER I DE FORSKELLIGE FORSØG: SAMMENLIGNING MELLEMLIKSPONERINGER MED HHV.1, 2 ELLER 4 PULSE AF LAMBDA-CYHALOTHRIN (0,1 µGL <sup>-1</sup> ) OG KONTROLLER (INGEN EKSPONERING). EFFEKTER AF GENTAGNE PULSE: (A) - INGEN FORSKEL MELLEMLIK 2 OG 4 PULSE; (B) - KUN EFFEKT VED 4 PULSE; (C) STØRRE EFFEKT VED 4 END VED 2 PULSE. (+) ANGIVER TENDENS TIL SIGNIFIKANS.			
Forsøgstype	Endpoints/parametre	Effekt af én puls	Effekt af gentagne pulse
Naturligt vandløb (Stavis Å)	Samlet bunddyrsfauna: ændring i sammensætning af arter over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
	<i>Heptagenia sulphurea</i> på bunden: reduktion i tæthed over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
	Andre arter på bunden: reduktion i tæthed over 30 dage	-	-
	Bunddyr i bladpakker: ændring i sammensætning af arter over 30 dage	-	-
	Voksne <i>Agapetus ochripes</i> : reduktion i klækkesucces	-	+ <sup>(b)</sup>
	Udlagte elleblade: reduktion i nedbrydning over 30 dage	-	-
	Alger på sten: øget biomasse (dvs. nedsat græsning) over 30 dage	-	-
Kunstige vandløb (Lemming)	Samlet bunddyrsfauna: ændring i sammensætning af arter over 30 dage	+	+ <sup>(a)</sup>
	<i>Gammarus pulex</i> (bund): reduktion i tæthed over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
	<i>Amphinemura standfussi</i> (bund): stigning i antal over 30 dage	+	-
	Andre arter på bunden: reduktion i tæthed over 30 dage	-	-
	Voksne <i>Amphinemura standfussi</i> : reduktion i klækkesucces	-	+ <sup>(a)</sup>
	Bunddyr i bladpakker: ændring i sammensætning af arter over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
	<i>Amphinemura standfussi</i> i bladpakker: Manglende stigning i antal over 30 dage	-	+ <sup>(b)</sup>
	<i>Asellus aquaticus</i> i bladpakker: reduktion i antal over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
	Andre bunddyr i bladpakker: ændring i antal over 30 dage	-	-
	Udlagte elleblade: reduktion i nedbrydning over 30 dage	-	+ <sup>(a)</sup>
Alger på sten: øget biomasse (dvs. nedsat græsning) over 30 dage	-	-	
Laboratorieforsøg med <i>Gammarus pulex</i>	Voksne individer: øget dødelighed over 38 dage	+*	#
	Voksne individer: omsætning af blade	(+)	#
	Voksne par: dannelsen af par forstyrret	+*	-
	Voksne par: øget dødelighed (10/44 dage)**	- ♀(+) <sup>♀</sup>	(+) <sup>♂</sup> (♀(+)) <sup>♀(c)</sup>
Voksne par: nedsat ungeproduktion (44 dg.)	+*	(+)	

\* Også effekt ved 0,05 og 0,2 µGL<sup>-1</sup>

\*\* Signifikant overdødelighed ved 0,2 µGL<sup>-1</sup>; tendens til overdødelighed ved 0,05 og 0,1 µGL<sup>-1</sup>.

Gentagne pulse kan dog føre til overraskende effekter i akvatiske økosystemer. Således påviste Relyea & Diecks (2008), at gentagne pulse med insekticidet malathion i mesokosmos-forsøg (damme) medførte dødelighed hos leopardfrøen *Rana pipiens*. Dødeligheden skyldtes imidlertid ikke en direkte toksisk effekt, men derimod at insekticidet effektivt reducerede zooplankton biomassen i de undersøgte forsøgsdamme, hvorved haletudsernes vækst reduceredes og deres metamorfose til rigtige frøer blev forlænget med øget dødelighed til følge. Der blev ikke studeret lignende forhold – fx i forhold til øget dødelighed hos ørred - i vores undersøgelse.

Der er kun foretaget få studier af betydningen af gentagne pulse med insekticider på enkeltorganismer under laboratoriebetingelser. Et centralt studie udført på standard-testorganismen *Daphnia magna* (Andersen et al. 2006) viste, at voksne individer var mindre i stand til at genvinde deres bevægelighed efter to end bare én puls af dimethoat eller pirimicarb. Dette understøtter de resultater, som blev fundet i vores undersøgelse.

Ikke kun insekticider forekommer i pulse i vandløb. Det gælder også for herbicider og fungicider. Det betyder, at også alger og svampe i vandløbene udsættes for gentagne eksponeringer med forhøjede pesticidkoncentrationer, som bl.a. potentielt kan indvirke på deres vækst. Der er imidlertid kun få studier, som belyser effekten heraf. Og disse er desuden ikke nødvendigvis miljørealistiske. Et eksempel er et studie på algekulturer, som udsattes for gentagne pulse med herbicidet isoproturon i koncentrationer på 400 og 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$ , og hvor pulsenes varighed og tiden imellem dem blev varieret (Vallotton et al. 2009). Hver puls medførte en reduktion i algernes fotosyntese, men virkningen var reversibel, dvs. forsvandt sammen med pulsen. Der blev desuden fundet en vis forøgelse af algernes tolerance, hvis tiden mellem pulsene var relativt kort. Imidlertid er det undersøgte scenarie ikke miljørealistisk for danske vandløbs vedkommende, idet de anvendte koncentrationer er 100-300 gange højere, end hvad der målt i sidstnævnte (Styczen et al. 2003).

Vores undersøgelser blev udført i relativt uforstyrrede vandløbsmiljøer. Således var det naturlige og de kunstige vandløb stort set upåvirkede af fx spildevandsudledninger, ligesom de fysiske forhold var egnede for forekomsten af artsrige og varierede invertebratsamfund. Både Stavis Å og Lemming Å (der blev brugt til kolonisering m.v. af de kunstige vandløb) havde således meget artsrige samfund svarende til ”høj økologisk” tilstand. Dette var et bevidst valg med henblik på bedst muligt at afdække effekten af det tilførte pyrethroid. Det var således muligt – og også ønskeligt - at se bort fra andre potentielle stressfaktorer, som kunne tilsløre effekten af pesticidet. Rasmussen et al. (2011c, 2012b) fandt således, at forarmede fysiske forhold i høj grad tilslørede potentielle effekter af pesticider på ”naturlige” invertebratsamfund. Sådanne invertebratsamfund er relativt artsfattige og består af arter, som må betragtes som generelt tilpassede til forstyrrede forhold. Dette er en relevant problemstilling, idet en meget stor del af danske vandløb er væsentlig fysisk forarmede som følge af reguleringer og efterfølgende vedligeholdelsespraksis. Det er samtidig vandløb, som er beliggende i landbrugsområder, og som derfor også må formodes at være udsat for hyppige tilførsler af pesticider. Resultaterne fra vore undersøgelser kan derfor ikke umiddelbart overføres til fysisk forarmede vandløb og deres relativt artsfattige fauna. Til gengæld viser vores undersøgelser betydningen af pesticider for vandløb, hvor andre væsentlige menneskeskabte miljøpåvirkninger er søgt elimineret, hvilket bl.a. er hensigten med EU’s vandrammedirektiv.



## 5 Konklusioner

De udførte forsøg med pulseksponering (over 90 minutter) med insekticidet lambda-cyhalothrin af makroinvertebratsamfund i et naturligt vandløb (Stavis Å), makroinvertebratsamfund i kunstige vandløb (mesokosmos strømrender), og ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* i laboratorietanke bidrog til følgende konklusioner:

- Ved en miljørealistisk koncentration ( $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ ) af opløst pyrethroid medførte enkelte såvel som gentagne pulse markante effekter i de eksponerede samfund af makroinvertebrater i form af øget drift (dvs. transport med strømmen) hos flertallet af organismerne.
- Desuden medførte de enkeltstående pulse ændringer i samfundene (primært i den samlede artssammensætning) i de kunstige vandløb inden for den undersøgte i måned lange periode.
- Ligeledes udviste *Gammarus pulex* i laboratorieforsøg forøget dødelighed og forstyrret reproduktion, herunder reduktion i antal af producerede unger efter (op til  $1\frac{1}{2}$  måned) enkeltstående pulse med koncentrationer i intervallet  $0,05\text{-}0,2 \mu\text{gL}^{-1}$ .
- Effekterne på samfundene i det naturlige og de kunstige vandløb – inden for den undersøgte periode på 1 måned – var væsentlig større ved gentagne (2 eller 4 pulse - med 2 dage imellem pulsene) end ved enkeltstående pulse. Effekterne omfattede mere end halvdelen af en række undersøgte parametre ("endpoints"): ændret artssammensætning på selve vandløbsbunden, ændret artssammensætning i udlagte bladpakker (i de kunstige render), reduktion i antallet af visse arter på bund og i bladpakker (primært i de kunstige render), reduceret forvandling fra nymfer/larver til voksne insekter hos to undersøgte arter, samt reduceret omsætning af udlagte bladpakker (i de kunstige render).
- Ændringerne i artssammensætning og stofomsætning skyldtes primært tabet af individer som følge af drift under og umiddelbart efter eksponeringerne - samt manglende kompensering via efterfølgende rekolonisering. Også dødelighed formodes at have spillet en ikke uvæsentlig rolle.
- Selvom gentagne pulse med kort interval imellem således havde større negativ effekt end bare én puls, sandsynliggjorde laboratorieforsøgene med *Gammarus pulex*, at én puls med relativt høj koncentration over kort tid har større negativ effekt i form af dødelighed, end hvis den samme såkaldte "ækvivalenteksponering" fordeltes over flere pulse, lavere koncentrationer og længere pulsvarighed. Desuden blev forsøgsdyrene tilsyneladende ramt hårdest, når der kun var kort tid mellem de enkelte pulse, således at dyrene ikke kunne nå at restituere sig.
- Samlet set understøtter resultaterne den opstillede hypotese om, at "en forøget hyppighed af pulse med overvejende sublethale (ikke-

dødelige) pyrethroidkoncentrationer medfører en reduktion i biodiversitet, stofomsætning, overlevelse og reproduktion hos makroinvertebrater i danske vandløb”.

- Det kan endelig sandsynliggøres, at gentagne pulse med pyrethroider i koncentrationer, høje nok til at fremkalde de påviste effekter, under bestemte omstændigheder kan/vil forekomme i danske vandløb, samt at der – under visse uheldige omstændigheder - kan være en sammenhæng mellem behandlingshyppigheden inden for et givet vandløbs opland og antallet af pulse som måtte optræde i vandløbet.

## 6 Perspektivering

Vi har vist, at pulse af pyrethroider på opløst form – i hvad vi anser for miljørealistiske koncentrationer – har en række markante effekter på makroinvertebratsamfund i vandløb. Effekterne omfatter ændringer i artssammensætningen som helhed, reduceret individtæthed hos en række særligt følsomme arter, samt reduceret omsætning af organisk stof. Ændringerne i samfundenes sammensætning skyldes dels øget drift af individer ud af de berørte strækninger under og umiddelbart efter de pågældende pulse, dels øget dødelighed og nedsat reproduktion.

Vi har ligeledes vist, at gentagne pulse markant øger graden af disse effekter. Gentagne pulse med kort interval imellem har således større negativ effekt end bare én puls. Det kunne dog også sandsynliggøres, at én puls med relativt høj koncentration over kort tid er værre, end hvis den samme ækvivalenteksposering fordeltes over flere pulse, lavere koncentrationer og længere pulsvarighed. Desuden rammes makroinvertebraterne tilsyneladende hårdest, hvis der kun er kort tid mellem de enkelte pulse, således at de ikke når at restituere sig.

Det kan samtidig sandsynliggøres, at pyrethroider vil forekomme i forhøjede koncentrationer i forbindelse med netop pulse, typisk i forbindelse med forudgående marksprøjtning og efterfølgende udvaskning via fx dræn i forbindelse med kraftige regnskyl. Det er derfor nærliggende at vurdere risikoen for påvirkning af samfund af vandløbsmakroinvertebrater i forhold til sådanne scenarier, snarere end på baggrund af en kontinuerlig påvirkning, således som det er tilfældet med standardtests med enkeltorganismer over flere dage (Reinert et al. 2002).

Generelt vanskeliggøres risikoanalyser på baggrund af laboratorietests på enkeltorganismer af faktorer, som kan variere fra art til art. Flere pulse kan således have forskellige konsekvenser. Den første puls kan fx efterlade de mest hårdføre individer, som efterfølgende viser ringe følsomhed over for efterfølgende pulse. Omvendt kan den første puls svække individerne, således at de bliver mere udsatte ved efterfølgende pulse. Der kan også optræde effekter relativt længe efter en puls, effekter som ikke erkendes i forbindelse med korttidsstudier. Og det er langt fra givet (jf. nærværende undersøgelse), at der som vist af Giesy et al. (1999) kan forventes samme effekt ved en given ækvivalenteksposering, men hvor koncentration, pulsantal og pulsvarighed varierer. Det er heller ikke givet, som fundet af Naddy & Klaine (2001), at kortvarige, men hyppige, pulse medfører mindre toksicitet, end hvis der blev eksponeret med længerevarende pulse.

Det er også afgørende, om de eksponerede organismer viser den samlede effekt inden for varigheden af et givet forsøg, eller om der forekommer en forsinket effekt, som ikke erkendes. Dertil kommer, at nogle arter kommer sig efter at have været udsat for en pulspåvirkning, mens andre ikke gør det. I det tilfælde, hvor en art er i stand til at komme sig inden for et vist tidsrum, vil tiden til en ny puls kunne have betydning.

Vores studier, der kombinerer studier i naturlige og kunstige vandløb med laboratoriestudier, kan principielt benyttes til perspektivering af risikovurde-

ringer. Med forholdsvis velbeskrevne effekter på hele makroinvertebratsamfund kan disse effekter kobles med modeller for pyrethroidsprøjtning af arealer med bestemte afgrøder og efterfølgende udvaskning af stofferne. Det imidlertid uden for dette projekts rammer at forsøge at opstille sådanne modeller. Vi skal dog pege på en gennemgang af sådanne modeller i Reinert et al. (2002), der også inkluderer afledte effekter baseret på toksikologiske studier under laboratorieforhold. Vi skal også henlede opmærksomheden på en nyere procesbaseret model, som sammenkæder eksponering i form af varierende, gentagne pulse med overlevelsen hos *Gammarus pulex* (Ashauer et al. 2007). Modellen synes ret lovende og er særlig interessant for danske vandløb, hvor arten er så udbredt og dominerende, og ligeledes blandt de absolut mest sensitive arter i forhold til pyrethroider. Imidlertid er det en svaghed, at modellen ikke inddrager subletale effekter, der som allerede vist kan have ganske betydelig økologisk betydning, og som forekommer ved koncentrationer der er 10-100 gange lavere end de som medfører markant dødelighed. Desuden tager modellen ikke højde for, at *G. pulex* via sit store reproduktionspotentiale og høje mobilitet er en relativt hurtig rekolonisator.

Inddragelse af effekter fra studier i naturlige og kunstige vandløb er således vigtige i forhold til at evaluere risikovurderinger. Sådanne studier er imidlertid tidskrævende og dermed relativt dyre at udføre. Af samme grund – og fordi projekter som de under Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram skal være af relativt kortvarig karakter – er der sjældent mulighed for at foretage helt miljørealistiske undersøgelser. Således er det ikke muligt fx at anlægge kunstige vandløb med optimale, naturligt fungerende samfund af organismer, fordi det ideelt set kræver minimum 2 års forberedelse inden der eksponeres, ligesom effekterne af eksponeringerne skal kunne følges i adskillige måneder – ja måske 1-2 år - herefter. Dertil kommer, at efterfølgende bearbejdning af indsamlede prøver også tager lang tid. Samlet set vil forsøgene derfor let kunne få en tidshorisont på 3-4 år eller mere. Men netop længerevarende studier i kunstige vandløb er ønskelige, bl.a. fordi de giver muligheder for kontrolleret og med replikater at studere betydende effekter på organismernes biologiske karakteristika (reproduktion, livscyklus, fødevalg, spredningsevne, o.lign.) (Beketov & Liess 2012). Til at illustrere betydningen af undersøgelser over en lang tidshorisont kan nævnes, at bare én puls af et insekticid medførte en markant påvirkning af et samfund af vandløbsinvertebrater inden for 7 måneder (Beketov et al. 2008). Påvisningen af de fundne effekter, som var væsentlige, afhang primært af arternes livscyklus, som ikke troværdigt kunne beskrives i korttidsstudier. Til sammenligning har tidligere danske studier af ”recovery” primært strakt sig over et tidsrum af 1 måned, inden for hvilket de påvirkede samfund endnu ikke var genoprettede (Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Reelle langtidstudier burde derfor muliggøres inden for Miljøstyrelsens pesticidforskningsprogram.

Medens de oven for nævnte modeller opererer med pesticider på opløst form, vil modeller som beskriver påvirkninger af partikelbundne fraktioner være særlig relevante for pyrethroiderne. Som allerede nævnt forekommer der (eller kan der forventes) effekter af partikelbundet pyrethroid på vandløbenes makroinvertebratsamfund (Maund et al. 2002, Maul et al. 2008). Studier der kan danne grundlag for sådanne modeller er allerede iværksat i forbindelse med Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram (projektet PESTFATE).

Modellerne bør muligvis også inddrage det aspekt, at biologiske forhold i vandløbene, såsom forekomsten af vegetation, kan indvirke på effekten af de tilførte stoffer. Koncentrationerne i pulse af det meget vandopløselige insekti-

cid thiacloprid var således i mesokosmos-forsøg lavere i plantedækkede end plantefrie områder (Beketov & Liess 2008a). Dette vil have betydning for vurdering af realistiske eksponeringer og effekter. Og problemstillingen er yderst relevant, fordi mange danske vandløb – især i landbrugsområder - har rige bevoksninger af neddykkede eller emergente (over vandoverfladen opstigende) planter.

Fordi pyrethroider er tungt opløselige i vand og hurtigt bindes til partikler tilsættes handelsprodukterne overfladeaktive stoffer for at øge stoffernes optagelse i og effekt på skadedyrene. Det betyder formodentlig en forøgelse af den periode, hvor stofferne kan udvaskes på opløst form. Det betyder også, at formuleret pyrethroid udløser effekter – fx drift – i væsentlig lavere koncentrationer end de rene stoffer (Møhlenberg et al. 2004). Der kan derfor peges på et behov for at belyse dette forhold – fx i forbindelse med ovennævnte projekt med partikelbundet pyrethroid.

Udvikling af modellerne vil have behov for flere og bedre målinger af koncentrationen af pyrethroider i vandløbsvand i forbindelse med kraftige regnhændelser efter nysprøjtning af marker. Sådanne målinger har som allerede nævnt ikke været medtaget i hidtidige og nuværende nationale overvågningsprogrammer som NOVA og NOVANA (se fx Naturstyrelsen et al. 2011)). De må derfor nødvendigvis medtages i forbindelse med næstkommende revision af NOVANA. Målingerne bør desuden ikke alene fokusere på den opløste fraktion, men også på den væsentlige partikelbundne fraktion. I givet fald skal prøverne udtages i forbindelse med de oven for nævnte større nedbørshændelser og afstrømninger, hvilket er relativt enkelt og billigt (se fx Rasmussen et al. 2011a). I det reviderede NOVANA program for perioden 2011-2015 er pyrethroider dog ikke fuldstændig fraværende, idet de er medtaget i form af målinger på ”frisk” afsat organisk vandløbssediment (Naturstyrelsen et. al. 2011).



# Referencer

- Alexander, A.C., Heard, K.S. & Culp, J.M. (2008) Emergent body size of mayfly survivors. *Freshwater Biology* 53: 171-180.
- Andersen, T.H., Friberg, N., Hansen, H.O., Iversen, T.M., Jacobsen, D. & Krøjgaard, L. (1993) The effects of introduction of brown trout (*Salmo trutta* L.) on *Gammarus pulex* L. drift and density in two fishless Danish streams. *Archiv für Hydrobiologie* 126: 361-371.
- Andersen, T.H., Tjørnhøj, R., Wollenberger, L., Slothuus, T. & Baun, A. (2006) Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and pirimicarb. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1187-1195.
- Ashauer, R., Boxall, A.B. & Brown, C.D. (2007) New ecotoxicological model to simulate survival of aquatic invertebrates after exposure to fluctuating and sequential pulses of pesticides. *Environmental Science & Technology* 41: 1480-1486.
- Aßmann, C., Rinke, K., Nechwatal, J. & Von Elert, R. (2010) Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. *Freshwater Biology* 56: 839-852.
- Axelsen, J., Munk, L., Sigsgaard, L., Ørum, J.E., Streibig, J.C., Navntoft, S., Christensen, T., Branth, A., Elkjær, K., Korsgaard, K., Sørensen, P.B. & Bonfeld-Jørgensen (2012) Udredning om monitorings, varslings- og beslutningsstøtte-systemer for skadevoldere i planteproduktionen i landbrug, gartneri og frugtavl. *Miljøprojekt nr. 1407*. Miljøstyrelsen, 1980 pp.
- Beketov, M. & Liess, M. (2008a) Variability of pesticide exposure in a stream mesocosm system: Macrophyte-dominated vs. non-vegetated sections. *Environmental Pollution* 156: 1364-1367.
- Beketov, M. & Liess, M. (2008b) Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55: 247-253.
- Beketov, M. & Liess, M. (2012) Ecotoxicology and macroecology – Time for integration. *Environmental Pollution* 162: 247-254.
- Beketov, M., Schäfer, R.B., Marwitz, A., Paschke, A. & Liess, M. (2008) Long-term stream invertebrate community alterations induced by the insecticide thiacloprid: Effect concentrations and recovery dynamics. *Science of the Total Environment* 405: 96-108.
- Braioni, M.G., Gumiero, B. & Salmoiraghi, G. (2001) Leaf bags and natural leaf packs: two approaches to evaluate river functional characteristics. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 86: 439-451.

- Brittain, J.E. & Eikeland, T.J. (1988) Invertebrate drift – A review. *Hydrobiologia* 166: 77-93.
- Bøgestrand, J. (red.) (2003) Vandløb 2002, NOVA 2003. Danmarks Miljøundersøgelser. *Faglig rapport fra DMU*, nr. 470.
- Bøgestrand, J. (red.) (2007) Vandløb 2006, NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. *Faglig rapport fra DMU*, nr. 642, 96 s. <http://www.dmu.dk/Pub/FR642.pdf>.
- Christensen, J.H., Christensen, O.B., Guldborg, A. & Stendel, M. (2006) Modeller for klimaets udvikling. Kapitel 4 (pp. 40-54) i: Søndergaard, M., Kronvang, B., Pejrup, M. & Sand-Jensen, K. (eds.) Vand og vejr om 100 år. Klimaforandringer og det danske vandmiljø. Hovedland.
- Clarke, K.R. & Warwick, R.M. (1994) Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory, 144 pp.
- Cold, A. & Forbes, V.E. (2004) Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology* 67: 287-299.
- Dall, P.C. (1979) A sampling technique for littoral stone-dwelling organisms. *Oikos* 33: 106-112.
- Dansk Standard (1986) Vandundersøgelse – klorofyl a – spektrometrisk måling I ethanolekstrakt. DS 2201, 6 pp.
- Davies, P.E. & Cook, L.S.J. (1993) Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. *Aquatic Toxicology* 27: 201-224.
- Eidt, D.C. (1975) The effect of fenitrothion from large-scale forest spraying on benthos in New Brunswick headwater streams. *The Canadian Entomologist* 107: 743-760.
- Elliott, J.M. (2008) The ecology of riffle beetles (Coleoptera: Elmidae). *Freshwater Reviews* 1: 189-203.
- Felding, G., B. B. Mogensen, J. B. Sørensen, A. C. Hansen (1997) Surface run-off of pesticides from farmland to streams and lakes. *Bekæmpelsesmiddel-forskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 29. 76 s.
- Flannagan, J.F.H., Townsend, B.E., DeMarch, B.G.E., Friesen, M.K. & Leonhard, S.L. (1979) The effects of an experimental injection of methoxychlor on aquatic invertebrates: accumulation, standing crop, and drift. *Canadian Entomologist* 111: 73-89.
- Friberg, N. (1996) Biological structure of forest streams and effects of afforestation. PhD thesis, National Environmental Research Institute & University of Copenhagen, Freshwater Biological Laboratory. Ministry of Environment and Energy, National Environmental Research Institute, 115 pp.



Friberg, N., Andersen, T.H., Hansen, H.O., Iversen, T.M., Jacobsen, D., Krøjgaard, L. & Larsen, S.E. (1994) The effects of brown trout (*Salmo trutta* L.) on stream invertebrate drift, with special reference to *Gammarus pulex* L. *Hydrobiologia* 294: 105-110.

Friberg, N., Lindstrøm, M., Kronvang, B. & Larsen, S.E. (2003). Macroinvertebrate/sediment relationships along a pesticide gradient in Danish streams. *Hydrobiologia* 494: 103-110.

Fyns Amt (1997) De fynske vandløb. VANDMILJØovervågning. Tema: Ferskvand. Fyns Amt, Natur- og Vandmiljøafdelingen, 210 s.

Ghadiri, H. & Rose, C.W. (1991) Sorbed chemical transport in overland flow: 1. A nutrient and pesticide enrichment mechanism. *Journal of Environmental Quality* 20: 628-634.

Giesy, J.P., Solomon, K.R., Coates, J.R., Dixon, K.R., Giddings, J.M. & Kenega, E.W. (1999) Chlorpyrifos ecological risk assessment in North American environments. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 160: 1-129.

Hand, L.H., Kuet, S.F., Lane, M.C.G., Maund, S.J., Warinton, J.S. & Hill, J.R. (2001) Influences of aquatic plants on the fate of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1740-1745.

Heckmann, L.H. & Friberg, N. (2005) Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 582-590.

Heckmann, L.H., Friberg, N. & Ravn, H.W. (2005) Relationship between biochemical biomarkers and pre-copulatory behaviour and mortality in *Gammarus pulex* following pulse-exposure to lambda-cyhalothrin. *Pest Management Science* 61: 627-635.

Henriksen, H.J., Rosenbom, A., Keur, P. van der, Olesen, J.E., Jørgensen, L.J., Kjær, J., Sonnenborg, T & Christensen, O.B. (2012) Prediction of climatic impacts on pesticide leaching to the aquatic environments. Pesticide Research from the Danish Environmental Protection Agency no. 143 (i trykken).

Hill, I.R. (1989) Aquatic organisms and pyrethroids. *Pesticide Science* 27: 429-465

Hose, G.C., Lim, R.P., Hyne, R.V. & Pablo, F. (2003) Short-term exposure to aqueous endosulfan affects macroinvertebrate assemblages. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 282-294.

Kattwinkel, M., Kühne, J.-V., Foit, K. & Liess, M. (2011) Climate change, agricultural insecticide exposure, and risk for freshwater communities. *Ecological Applications* 21: 2068-2081.

Kjeldsen, K. (1996) Regulation of algal biomass in a small lowland stream: field experiments on the role of invertebrate grazing, phosphorus and irradiance. *Freshwater Biology* 36: 535-546.

- Kjeldsen, K., Iversen, T.M., Thorup, J. & Lund-Thomsen, P. (1999) Three-year study of benthic algal spring bloom development in a small, Danish lowland stream. *Hydrobiologia* 335: 183-192.
- Kjær, C., Sørensen, P.B., Kudsk, P. & Jørgensen, L.N. (2007) Indikatoren behandlingshyppighed (BH) som mål for pesticidbehandlingens miljøbelastning. Rapport fra Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet & Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet. Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 47 pp.
- Kreutzweiser, D.P. & Sibley, P.K. (1991) Invertebrate drift in a headwater stream treated with permethrin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 330-336.
- Kronvang, B., Iversen, H.L., Vejrup, K., Mogensen, B.B, Hansen, A.-M. & Hansen, L.B. (2003) Pesticides in streams and subsurface drainage water within two arable catchments in Denmark: Pesticide application, concentration, transport and fate. *Pesticide Research* 69, Danish Environmental Protection Agency, 141 pp.
- Langer, O.E. & Taylor, R. (1974) Effects on the aquatic ecosystem. I: Carrow, J.W. (ed.) Aerial spraying operation against the blackheaded budworm on Vancouver Island – 1973. *Can. For. Serv., Inf. Rep.* BC-X-101, 56 pp.
- Lauridsen, R.B. (2002) Pesticideeffekter på makroinvertebrater i vandløb - med særlig fokus på pyrethroidet lambda-cyhalothrin. Specialrapport Århus Universitet.
- Lauridsen, R.B. & Friberg, N. (2005) Stream macroinvertebrate drift response to pulse exposure of the synthetic pyrethroid Lambda-Cyhalothrin. *Environmental Toxicology* 20(5): 513-521.
- Liess, M. (1994) Pesticide impact on macroinvertebrate communities of running waters in agricultural ecosystems. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 2060-2062.
- Liess, M. (2002) Population response to toxicants is altered by intraspecific interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 138-142.
- Liess, M. & Schulz, R. (1999) Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1948-1955.
- Liess, M., Schulz, R., H.-D. Liess, B. Rother & R. Kreuzig (1999) Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Water Research* 33: 239-247.
- Lewis, S.E., Dick, J.T.A, Lagerstrom, E.K., Clarke, H.C. (2010) Avoidance of filial cannibalism in the amphipod *Gammarus pulex*. *Ethology* 116: 138-146.
- Malaise, R. (1937) A new insect-trap. *Entomologisk Tidskrift (Stockholm)* 58: 148-160.

- Maltby, L. & Crane M. (1994) Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, Crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and their importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84: 45-52.
- Matthiessen, P., Sheanan, D., Harrisson, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C. & Williams, R. (1995) Uses of *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 30: 111-119.
- Maul, J.D., Brennan, A.A., Harwood, A.D. & Lydy, M.J. (2008) Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil, and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization, and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2582-2590.
- Maund, S.J., Hamer, M.J., Lane, M.C.G., Farrelly, E., Rapley, J.H., Goggin, U.M. & Gentle, W.E. (2002). Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 9-15
- McIntosh, A.R. & Townsend, C.R. (1996) Interactions between fish, grazing invertebrates and algae in New Zealand streams: A trophic cascade mediated by fish-induced changes to grazer behaviour? *Oecologia* 108: 174-181.
- Møhlenberg, F., Kaas, H., Schlüter, L., Gustavson, K., Andersen, T.T., Forbes, V., Cold, A., Friberg, N., Larsen, S.E. & Lauridsen, R.B. (2004) Effekter af bekæmpelsesmidler på flora og fauna i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 82.
- Miljøstyrelsen (2010) Bekæmpelsesmiddelstatistik 2009. *Orientering fra Miljøstyrelsen*, nr. 2, 2010, 51 s.
- Miljøstyrelsen (2011) Bekæmpelsesmiddelstatistik 2010. *Orientering fra Miljøstyrelsen*, nr. 5, 2011, 48 s.
- Naddy, R.B. & Klaine, S.J. (2001) Effect of pulse frequency and interval on the toxicity of chlorpyrifos to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 45: 497-506.
- Naturstyrelsen, Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet & De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (2011) Det Nationale Overvågningsprogram for Vand og Natur. NOVANA 2011-2015. Programbeskrivelse, del 2. Miljøministeriet, 177 sider.
- Nielsen, G.C. (2009-2011) Skadedyr. Den Store Danske. Gyldendals åbne encyklopædi.  
([http://www.denstoredanske.dk/index.php?title=Natur\\_og\\_milj%C3%B8/Landbrug\\_og\\_havebrug/Skadedyr\\_og\\_skadedyrsbek%C3%A6mpelse/skadedyr](http://www.denstoredanske.dk/index.php?title=Natur_og_milj%C3%B8/Landbrug_og_havebrug/Skadedyr_og_skadedyrsbek%C3%A6mpelse/skadedyr))
- Nilsson, L.M. (1974) Energy budget of a laboratory population of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Oikos* 25: 35-42.
- Nilsson, L.M. (1977) Incubation time, growth and mortality of the amphipod under laboratory conditions. *Oikos* 29: 93-98.

Nørum, U. & Bjerregaard, P. (2003) Ferskvandsinvertebraters bevægelsesadfærd som biomarkører for pesticideksponering og – effekt. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 75, 66 s.

Nørum U., Bjerregaard P., Friberg N. & Larsen S.E. (2006) Effekter af pulsexponering med pyrethroider på vandløbsinvertebrater - med særlig fokus på lambda-cyhalothrin. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 102, 100 s.

Nørum, U., Friberg, N., Jensen, M.R., Pedersen, J.M. & Bjerregaard, P. (2010) Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroid lambda-cyhalothrin: Laboratory and stream microcosm studies. *Aquatic Toxicology* 98: 328-335.

Nørum, U., Frederiksen, M.A.T. & Bjerregaard, P. (2011) Locomotory behaviour in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to the pyrethroid cypermethrin. *Chemistry and Ecology* 27: 569-577.

OECD (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. *OECD Environment Health and Safety Publications – Series on Testing and Assessment* No. 23.

OECD (2004) OECD guideline for testing of chemicals 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test, 12 pp.

Olsen, B. (2009) Lambda-cyhalothrins påvirkning af populationsdynamikken hos *Gammarus pulex*. Specialrapport, Biologisk Institut, Syddansk Universitet, 65 pp.

Oudou, H.C. & Hansen, H.C.B. (2002) Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere* 49: 1285-1294.

Parsons, J.T. & Surgeoner, G.A. (1991) Acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbufuran to mosquito larvae during single- or multiple-pulse exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 1229-1233.

Pestana, J.L.T., Alexander, A.C., Culp, J.M., Baird, D.J., Cessna, A.J. & Soares, A.M.V.M (2009) Structural and functional responses of invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution* 157: 2328-2334.

Peterson, R.H. & Zitko, V. (1974) Variations in insect drift associated with operational and experimental contamination with fenotrothion in New Brunswick. *Fish. Res. Bd Can., Tech. Rep.* 439, 23 pp.

Planteværn Online. Bladlus. Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet. <http://pvo.planteinfo.dk/cp/graphics/Name.asp?TaskID=7&NameID=228>

Pozo, J. (1993) Leaf litter processing of alder and eucalyptus in the Aguerra stream system. Chemical changes. *Archiv für Hydrobiologie* 127: 299-317.

Rasmussen, J.J., Friberg, N. & Larsen, S.E. (2008) Impact of lambda-cyhalothrin on a macroinvertebrate assemblage in outdoor experimental

channels: Implications for ecosystem functioning. *Aquatic Toxicology* 90: 228-234.

Rasmussen, J.J., Baattrup-Pedersen, A., Wiberg-Larsen, P., McKnight, U.S. & Kronvang, B. (2011a) Buffer strip width and agricultural pesticide contamination in Danish lowland streams: Implications for stream and riparian management. *Ecological Engineering* 37: 1990-1997.

Rasmussen, J. J., Baattrup-Pedersen, A., Larsen, S. E., & Kronvang, B. (2011b) Local physical habitat quality cloud the effect of predicted pesticide runoff from agricultural land in Danish streams. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 943-950.

Rasmussen, J. J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Monberg, R. J., McKnight, U. S., & Kronvang, B. (2011c) Ny viden om effekter af pesticider i vandløb. *Vand & Jord*, 18, 143-147.

Rasmussen, J.J., Baattrup-Pedersen, A., Wiberg-Larsen, P., Monberg, R.J. & Kronvang, B. (2012a) Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Science of the Total Environment* 416: 148-155.

Rasmussen, J.J., Monberg, R.J., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., Wiberg-Larsen, P., Strobel, B. & Kronvang, B. (2012b) Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquatic Toxicology* 118-119: 54-61.

Reinert, K.H., Giddings, J.M. & Judd, L. (2002) Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1977-1992.

Relyea, R.A. & Diecks, N. (2008) An unforeseen chain of events: Lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological Applications* 18: 1728-1742.

Schulz, R. (1997) Aquatische Ökotoxikologie von Insektiziden. *Ecomed, Angewandter Umweltschutz*, 167 s.

Schulz, R. & Dabrowski, J.M. (2001) Combined effects of predatory fish and sublethal pesticide contamination on the behaviour and mortality of mayfly nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2537-2543.

Schulz, R., M. Liess (1999a) Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2243-2250.

Schulz, R. & M. Liess (1999b) A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology* 46, 155-176.

Schulz, R. & Liess, M. (2000) Toxicity of fenvalerate to caddisfly larvae: chronic effects of 1- vs 10-h pulse exposure with constant doses. *Chemosphere* 41: 1511-1517.

- Schulz, R. & Liess, M. (2001a). Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates: a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 481-488.
- Schulz, R. & Liess, M. (2001b). Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms: importance of biological interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 757-762.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Hall, L.W. & Williams, W.M. (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 31-76.
- Styczen M., Wiberg-Larsen, P. & Aagaard, A. (2003) Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. *Vand & Jord* 10, 84-87.
- Sutcliffe, D.W. (1992) Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): Basic processes. *Freshwater Forum* 2: 102-128.
- Taylor, B.R. & Bärlöcher, F. (1996) Variable effects of air-drying on leaching losses from tree leaf litters. *Hydrobiologia* 325: 173-182.
- Vallotton, N., Eggen, R.I.L. & Chèvre, N. (2009) Effects of sequential isoproturon pulses exposure on *Scenedesmus vacuolatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 442-449.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Brock, T.C.M. & Van den Brink, P.J. (2005) Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems: A review. *Ecotoxicology* 14: 355-380.
- Wallace, J.B., Lughart, G.J., Cuffney, T.F. & Schurr, G.A. (1989) The impact of repeated insecticidal treatments on drift and benthos of a headwater stream. *Hydrobiologia* 179: 135-147.
- Wallace, J.B., Huryn, A.D. & Lughart, G.J. (1991) Colonization of a headwater stream during three years of seasonal insecticidal applications. *Hydrobiologia* 211: 65-76.
- Welton, J.S. (1979) Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biology* 9: 263-275.
- Weston, D.P., You, J., Lydy, M.J. (2004) Distribution and toxicity of sediment-associated pesticides in agriculture-dominated water bodies of California's Central Valley. *Environmental Science and Technology* 38: 2752-2759
- Whiles, M.R. & Wallace, J.B. (1992) First-year benthic recovery of a headwater stream following a 3-year insecticide-induced disturbance. *Freshwater Biology* 28: 81-91.
- Wiberg-Larsen, P. & Nørum, U. (2009). Effekter af pyrethroidet lambda-cyhalothrin på biologisk struktur, funktion og rekolonisering i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 126, 165 s.

Wiberg-Larsen, P., Kristensen, E.A., Rasmussen, J.J., Friberg, N. & Bjerregaard, P. (in præp.). Rangordning af vandløbsinvertebraters tolerance over for miljørealistiske koncentrationer af pyrethoider. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. xxx.

Wiggers, L. (1999) Pesticider i vandløb, kilder og søer i Århus Amt. Teknisk rapport fra Natur og Miljøkontoret.

Wooster, D. & Sih, A. (1995) A review of the drift and activity responses of stream prey to predator presence. *Oikos* 73: 3-8.

Yasuno, M., Fukushima, S., Hasegawa, J., Shioyama, F. & Hatakeyama, S. (1982) Changes in benthic fauna and flora after application of temephos to a stream on Mt. Tsukuba. *Hydrobiologia* 89: 205-214.

## Resumé

Insektgifte påvirker vandløbenes smådyr mere, når stofferne gentagne gange optræder i forhøjede koncentrationer, end hvis det kun sker en enkelt gang. Det viser et netop afsluttet forskningsprojekt. Resultatet er måske ikke overraskende, men ikke tidligere påvist under miljørealistiske forhold. De negative effekter hos smådyrene bestod i øget dødelighed, øget transport med strømmen, ligesom de åd mindre af udlagte elleblade. Ferskvandstangloppen, der er vandløbenes mest udbredte, talrige, og måske mest betydende dyr, fik desuden færre unger. Effekterne betyder i praksis, at arts- og individrigdommen samt vigtige biologiske processer nedsættes i en periode på mindst en måned på de vandløbsstrækninger, som påvirkes af giftpulsene.



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

Strandgade 29  
DK - 1401 København K  
Tlf.: (+45) 72 54 40 00

[www.mst.dk](http://www.mst.dk)