



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Rangordning af vandløbssmådyrs tolerance over for miljørealistiske koncentrationer af pyrethroider

Bekæmpelsesmiddelforskning fra
Miljøstyrelsen nr. 151, 2013

Titel:

Rangordning af vandløbssmådyrs tolerance over for miljørealistiske koncentrationer af pyrethroider

Forfattere:

Peter Wiberg-Larsen, Esben Astrup Kristensen, Nikolai Friberg, Jes Jessen Rasmussen (Institut for Bioscience, Aarhus Universitet) & Poul Bjerregaard (Biologisk Institut, Syddanske Universitet)

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2013

ISBN nr.

978-87-93026-67-4

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

Forord	5
Sammenfatning	6
Summary	11
1. Indledning	15
2. Baggrund og formål	17
2.1 Baggrund og "state of the art"	17
2.2 Formål	19
2.3 Projektets overordnede struktur	19
3. Metode	21
3.1 Udvælgelse af arter til test for følsomhed over for pyrethroider	21
3.2 Indsamling og behandling af forsøgsdyr.....	22
3.3 Undersøgelse af dødelighed og bevægelsesadfærd i små arenaer	24
3.3.1 Overordnet princip i forsøgene	24
3.3.2 Design af testsystemer	24
3.3.3 Forsøgsprocedure.....	26
3.3.4 Biologiske karakteristika	27
3.4 Kvantificering af lambda-cyhalothrin.....	29
3.5 Statistiske metoder m.v.	30
4. Resultater	33
4.1 Eksponeringsscenarierne: nominelle vs. målte koncentrationer af lambda-cyhalothrin	33
4.2 Forsøgsbetingelser, de enkelte arters egnethed som forsøgsdyr, samt registrering af end points.....	33
4.3 Bevægelsesadfærd, almentilstand og dødelighed.....	34
4.4 Sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og følsomhed i Dansk Vandløbsfaunaindeks	42
4.5 Sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og biologiske karakteristika	43
5. Diskussion	48
5.1 De anvendte forsøgsbetingelser	48
5.1.1 End-points.....	48
5.1.2 Akuelle og nominelle pyrethroidkoncentrationer	49
5.2 Rangordning af arternes følsomhed/tolerance	50
5.2.1 Andre undersøgelser til sammenligning?	50
5.2.2 Pyrethroiders generelle virkemåde og toksicitet	50
5.2.3 Forskel i følsomhed mellem arter af arthropoder	50
5.2.4 Særligt pesticidfølsomme/-tolerante arter	53
5.2.5 Betydning af valgte end-points.....	54
5.2.6 Er lambda-cyhalothrin repræsentativt for pyrethroider anvendt på de danske marker?	54
5.2.7 Opløste eller partikelbundne pyrethroider?	55
5.3 Kan Dansk Vandløbsfaunaindeks anvendes som pesticidindikator?	56

5.4	Anvendelighed af biologiske karakteristika til vurdering af pesticideffekter.....	57
5.4.1	Biologiske karakteristika og miljøpåvirkninger.....	57
5.4.2	Biologiske egenskaber og pesticider.....	57
5.4.3	Biologiske karakteristika i et SPEAR perspektiv.....	58
6.	Konklusion.....	59
7.	Perspektivering.....	61
7.1	Faglig perspektivering.....	61
7.2	Administrativ perspektivering.....	62
	Referencer.....	63
Bilag 1:	Oversigt over indsamlingslokaliteter for de testede makroinvertebrater.....	69
Bilag 2:	Beregning af faunaklasse efter Dansk vandløbsfaunaindeks.....	70

Forord

Denne rapport er resultatet af laboratorieundersøgelser, som i perioden 1. august 2011 – december 2012 er blevet gennemført af medarbejdere ved Institut for Bioscience, Aarhus Universitet, og Biologisk Institut, Syddansk Universitet. Projektet er blevet finansieret via midler fra Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning (MST j. nr. 667-00101).

Projektledelsen er gennem hele projektet blev varetaget af Peter Wiberg-Larsen. Projektet blev oprindeligt søgt i samarbejde med seniorforsker Ulrik Nørum, der imidlertid opsagde sin stilling ved Bioscience pr. 1. august 2011. I stedet blev efter aftale med Miljøstyrelsen tilknyttet Esben Astrup Kristensen. Ulrik Nørum har dog efter sin fratreden ydet faglig støtte og rådgivning til projektet, hvilket der hermed takkes for. Desuden er Jes Jessen Rasmussen undervejs blevet tilknyttet projektet.

Projektet har – ud over de videnskabelige medarbejdere (se liste over forfattere) haft deltagelse af følgende tekniske medarbejdere:

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

Johnny Nielsen (Bioscience): indsamling af forsøgsdyr (makroinvertebrater), laboratorieforsøg, måling af forsøgsdyr

Henrik Stenholt (Bioscience): Måling af forsøgsdyr

Marlene Venø Skjærbæk (Bioscience): fremstilling af pyrethroid blandinger til forsøg med makroinvertebrater

Karina Jensen (Bioscience): Fremstilling af pyrethroid blandinger til forsøg med makroinvertebrater samt planlægning

Charlotte Elisabeth Kler (Bioscience): Opsætning af rapport.

Projektet er under sit forløb blevet understøttet af en følgegruppe med følgende deltagere (ud over Peter Wiberg-Larsen og Nikolai Friberg): Jørn Kirkegaard (Miljøstyrelsen, fmd.), Anne Louise Gimsing (Miljøstyrelsen), Poul Løgstrup Bjerg (Institut for Vand og Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet), Walter Brüsich (GEUS), Vibeke Ernstsens (GEUS), Hans Christian Bruun Hansen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Dean Jacobsen (Biologisk Institut, Københavns Universitet), Peter R. Jørgensen (PJ-Bluetech), Niels Lindemark (Dansk Planteværn), Carsten Tilbæk Petersen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Merete Styczen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), og Hans Roust Thysen (Videncenter for Landbrug).

Rapporten er blevet underkastet et fagligt peer-review af Vibeke Ernstsens, Anne Louise Gimsing, Hans Christian Bruun Hansen og Dean Jacobsen.

Sammenfatning

Baggrund & formål

Insekticider anvendes til bekæmpelse af skadevoldende insekter i afgrøder på friland, men havner også i vandmiljøet, ikke mindst i vandløbene. Det sker typisk som kortvarige tilførsler i forbindelse med kraftige regnhændelser umiddelbart efter sprøjtning, eller i form af vinddrift under sprøjtning. Ikke overraskende har insekticiderne også giftvirkning på de makroinvertebrater (smådyr), som lever i vandløbene, og som udgør en vigtig del af disses biologiske struktur. Makroinvertebraterne omsætter organisk stof og er selv føde for fisk, fugle og pattedyr. Der findes mange forskellige makroinvertebrater i vore vandløb, med forskellige krav til levesteder, føde og følsomhed over for menneskeskabte miljøpåvirkninger. Af samme grund har de længe været anvendt som miljøindikatorer. Dansk Vandløbsfauna Indeks (DVFI) bygger på forekomst og fravær af en række arter og anvendes til at vurdere, om fastsatte mål for miljøets tilstand er opfyldt eller ikke. Indekset er oprindeligt udviklet til at beskrive effekter af tilført let-nedbrydeligt organisk stof (fx fra husholdninger, dambrug o. lign.), men har også vist sig at afspejle fysiske ændringer af vandløbene. Spørgsmålet er om DVFI også kan beskrive insekticidtilførsel.

Besvarelsen af dette spørgsmål er et af formålene med dette projekt. Hvis DVFI ikke er egnet til at afspejle insekticidpåvirkning, er et andet formål at identificere arter, som er særligt følsomme/tolerante over for insekticider, og som derfor vil kunne anvendes ved udvikling af et egentligt insekticidindeks baseret på makroinvertebrater. Det forudsætter, at i det mindste nogle af arterne i indekset har forskellig følsomhed/tolerance, afhængigt af om de udsættes for insekticider eller let-omsætteligt organisk stof. Et insekticidindeks behøver ikke kun at bygge på arterne selv, men også på deres biologiske egenskaber. Der kan fx være tale om, at de formerer sig langsomt eller har svært ved at spredes, således at deres genindvandring efter en insekticidpuls tager lang tid. Projektet sigter derfor også mod at identificere mulige sammenhænge mellem insekticidfølsomhed og biologiske egenskaber.

Projektet fokuserer udelukkende på insekticider og endnu snævrere på pyrethroidet lambda-cyhalothrin. Det skyldes, at insekticider – og især pyrethroiderne - er langt de mest giftige over for vandløbenes makroinvertebrater, samt at pyrethroider er langt de mest anvendte insekticider i jordbruget, både i mængde og behandlet areal.

Undersøgelsen

Vi testede følsomheden af "modelpyrethroidet" hos en bred suite af makroinvertebrater, i alt 34 arter (28 leddyr og 6 ikke-leddyr), hvoraf de fleste er vidt udbredt i mindre danske vandløb. Flertallet af arterne indgår i DVFI og vi udvalgte dem, således at de repræsenterede hele spektret af kvalitet i dette indeks. Desuden blev der sikret repræsentation af arter med forskelligt behov for føde og fysiske levesteder. I enkelte tilfælde valgte vi af forsøgstekniske årsager arter fra søer/damme i stedet for nære slætninge fra vandløb.

De udvalgte arter blev som udgangspunkt testet på samme måde. Samtlige blev akklimatiseret mindst 1 døgn inden forsøgsstart, eksponeret for en puls med lambda-cyhalothrin i 90 min (nominelle koncentrationer: 0, 10, 100, 1000 og 10 000 ngL⁻¹), overført til rent vand, og deres adfærd (bedømt visuelt i forhold til kontrolgruppen) og dødelighed derefter registreret over 6 døgn. Under selve eksponeringen og dag 1, 2, 3 og 6 efter denne blev adfærden (tilbagelagt afstand over tid) for flertallet af arter desuden undersøgt ved videosporing. Dyrene blev som udgangspunkt – og i alle tilfælde under eksponeringen - holdt i små arenaer (af polystyren), uden omrøring/beluftning

af vandet, og uden tilsat bundmateriale eller føde. Enkelte strømkrævende arter blev uden for eksponeringsperioden holdt i beluftede petriskåle for at sikre tilstrækkelig overlevelse.

Antallet af individer for hver testet art var 23 (kontrol: uden pyrethroid) eller 19 (med pyrethroid). For arter, der generelt blev holdt i beluftede petriskåle, anvendtes dog 25 individer for alle behandlinger. De faktiske koncentrationer af lambda-cyhalothrin i arenaerne blev målt efter de 90 minutters eksponering.

Vi målte størrelsen af de undersøgte leddyr (volumen, vægt), ligesom vi karakteriserede en række af deres øvrige egenskaber (levested, fødetype, formeringspotentiale, spredningsevne) ud fra litteraturværdier og egne data/erfaringer.

Data blev anvendt til beregning af statistiske værdier. Først og fremmest beregnede vi for hver art – og gennem hele forsøgsperioden - den koncentration ved hvilken de testede individer enten var adfærdsmæssigt påvirkede (EC_{50}) eller døde (LC_{50}). Desuden testede vi, ved hvilken koncentration der under selve eksponeringen og efterfølgende var ændringer i bevægelsesadfærden. Ud fra disse resultater rangordnede vi de enkelte arters følsomhed på en skala fra 1 til 7, hvor 1 var de mest følsomme, 7 de mest tolerante. Herved identificerede vi den laveste koncentration, ved hvilken der forekom en biologisk betydende effekt. Typisk var der tale om hyperaktivitet (under selve eksponeringen): herved var dyrene "over-aktive", hvilket hvis de havde været udsat for samme påvirkning i et vandløb (og ikke i en arena) ville have betydet, at de med strømmen ville være transporteret bort fra den påvirkede strækning. Andre kritiske situationer var, hvis dyrene blev sløve og dermed potentielt mere udsatte for at blive spist af andre dyr, eller var i live men så påvirkede, at de aldrig ville komme sig. Endelig analyserede vi mulige sammenhænge mellem arternes følsomhed over for lambda-cyhalothrin og deres biologiske egenskaber.

Hovedkonklusioner

Følsomheden hos vandløbssmådyr kan rangordnes inden for et interval af lambda-cyhalothrin på 0-10 000 ngL^{-1} . Mens ikke-leddyr (orme, igle, snegle, muslinger) var helt upåvirkede ved selv den højeste koncentration, var leddyr som krebsdyr og insekter generelt følsomme. Der var dog stor variation i følsomhed blandt de enkelte arter af sidstnævnte, selv inden for samme familie. Til gengæld var der ikke markante systematiske forskelle i følsomhed mellem grupper af fx insekter. Følsomheden var generelt 10-100 gange større for adfærdsændringer end dødelighed, og for flere arter størst under selve eksponeringen typisk med udtalt hyperaktivitet. På en pyrethroid-påvirket vandløbsstrækning vil denne unormalt høje aktivitet medføre at individantallet reduceres eller arten helt forsvinder.

Der var ingen entydig sammenhæng mellem de testede arters indikatorværdi i DVFI og deres følsomhed/tolerance over for lambda-cyhalothrin. DVFI er altså ikke egnet som pesticidindikator.

Sammen med en stor variation i arternes pyrethroidfølsomhed betyder det, at det principielt vil være muligt at designe et indeks, som vil være specielt egnet til at udskille netop effekter af pyrethroider frem for andre påvirkninger (især let-omsætteligt organisk stof fra fx spildevand). Det er til gengæld ikke muligt at opbygge indekset alene ud fra arternes biologiske egenskaber, fordi disse ikke kan relateres til følsomhed. Biologiske egenskaber er dog vigtige at inddrage sammen med følsomhed i et fremtidigt pyrethroidindeks, ligesom i det tyske SPEAR indeks (SPECies At Risk).

Selvom vi kun undersøgte effekten af ét pyrethroid, tyder data fra litteraturen på, at giftigheden af dette stof er stort set den samme som for de øvrige i dansk landbrug anvendte pyrethroider. Vores resultater kan derfor formodentlig overføres til samtlige disse stoffer.

Projekresultater

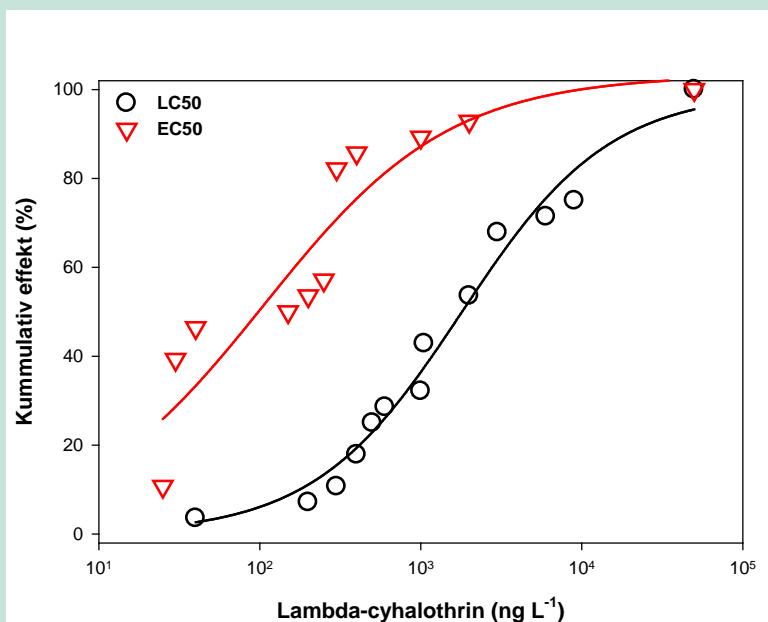
Vi udførte meget simple laboratorieforsøg under forhold, som er langt fra hvad de udvalgte arter oplever i naturen. Alligevel lykkedes det sikre en passende stor overlevelse for kontroldyrene (der ikke blev udsat for pyrethroid), ligesom disses adfærd ikke synes stærkt afvigende i forhold til naturlige forhold. Kun enkelte arter trivedes dårligt, overraskende nok sådanne som lever på slammede steder i vandløbene, hvor strømhastigheden er lille. Det lykkedes generelt at opnå gode bestemmelser af adfærdsændringer og dødelighed. Dog var det kun muligt at videospore halvdelen af arterne, hvilket betød, at økologisk vigtige adfærdsændringer under selve eksponeringen kun kunne dokumenteres for disse. For enkelte arter var det muligt at supplere med sammenlignelige data fra tidligere projekter under Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram. Den samlede rangordning af arternes følsomhed kunne dog trods dette ikke foretages på et helt ensartet grundlag, og må derfor tages med et vist forbehold.

Efter pulseksponeringerne i arenaerne blev der generelt målt koncentrationer af lambda-cyhalothrin, som var ca. 1/3 af de nominelle koncentrationer. Der var stor variation i målte koncentrationer fra forsøg til forsøg, men generelt var der den forudsatte relative forskel mellem koncentrationerne. Tabet skyldes pyrethroidernes specielle kemiske egenskaber: lav opløselighed i vand, store fedtopløselighed og dermed lette binding til diverse faste overflader. Vi har valgt at anvende de nominelle koncentrationer i tolkningen af resultaterne, fordi de faktiske koncentrationer vurderes at have været væsentlig højere ved start af eksponeringerne.

Helt overordnet var der kun påviselige effekter af de valgte koncentrationer af lambda-cyhalothrin på arter af leddyr (krebssdyr og insekter). Hos ikke-leddyr (fimreorme, børsteorme, snegle og muslinger) forekom der ingen effekter (adfærdsændringer eller forøget dødelighed), hverken under eller efter eksponeringen. Det er helt i overensstemmelse med, hvad der tidligere er fundet i andre studier. Forklaringen ligger i virkemåden for pyrethroider, der hos leddyr binder sig til de kanaler, igennem hvilke nervecellerne kommunikerer med hinanden. Herved holder stofferne kanalerne permanent åbne, hvilket fører til hyperaktivitet, lammelse og ultimativt død. Hos leddyrene var der stor forskel i følsomhed fra art til art, men ingen oplagt systematik fra gruppe til gruppe. Slørvinger var dog generelt følsomme og havde sammen med døgnfluer lettere ved at komme sig efter en påvirkning end andre insektgrupper og krebssdyr. Afhængigt af om der var tale om adfærdsændringer eller dødelighed varierede følsomheden for alle leddyr under et fra 10 til $> 10\,000\text{ ngL}^{-1}$, ligesom der blev fundet samme variation inden for gruppen af tovinger, endda inden for samme familie (dansemyg).

Generelt var følsomheden markant større for adfærdsændringer end dødelighed. Dette illustreres af nedenstående figur, der viser de kumulerede fordelinger (effekter) af hhv. værdier af EC_{50} (adfærd, visuelt bedømt) og LC_{50} (dødelighed) for de undersøgte arter af leddyr. Det kan her direkte aflæses hvor stor en del af arterne, der vil være i risiko for at være påvirket ved en given koncentration. Antages det modsat, at de valgte arter afspejler artssammensætningen i et vandløb, og at det er kritisk hvis 40% af arterne er påvirket adfærdsmæssigt, svarer det til en koncentration på ca. 70 ngL^{-1} .

En ret stor del (38%) af leddyrarterne var i løbet af 6 dage i stand til at komme sig helt efter eksponeringen, mens 15% fik det værre. Resten viste ingen forskel i hvor påvirkede de var igennem perioden. Især døgnfluer og slørvinger (primitive insekter) var i stand til at komme sig, hvorimod det i mindre grad var tilfældet blandt dovenfluer, biller, vårfluer og tovinger (mere avancerede insekter).



FIGUR A

Vi rangordnede arternes følsomhed under selve eksponeringen (tilbagelagt afstand - for de videosporede arter), adfærsændringer (inkl. dødelighed) og dødelighed i perioden 1-6 dage efter eksponering, og en såkaldt "kritisk følsomhed" estimeret på baggrund af samtlige disse "end-points" (inklusive drift respons for visse arter ved tidligere forsøg under Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram). Denne rangordning viste væsentlig større følsomhed (mindst en faktor 10) for adfærsændringer (under såvel som efter eksponering) end for dødelighed. Derimod var der ingen statistisk signifikant forskel i følsomhed for adfærd/dødelighed hhv. under og efter eksponering.

Der var ingen entydig sammenhæng mellem arternes status som indikatorer i Dansk Vandløbsfaunaindeks og deres følsomhed over for pyrethroidet. Således var der ingen statistisk signifikant sammenhæng mellem rangordnet "kritisk følsomhed" og arternes såkaldte nøglegruppe-status (indekset opererer med 6 nøglegrupper, hvor gruppe 1 er mest følsomme arter, gruppe 6 den mest tolerante arter). Til gengæld var der signifikant forskel i pyrethroidfølsomhed mellem positive (indikatorer for god miljøkvalitet) og negative diversitetsgrupper (indikatorer for dårlig miljøkvalitet) i indekset: De første var mest følsomme over for pyrethroidet. DVFI er dog samlet set uegnet som pesticidindikator, med mindre der er tale om meget høje koncentrationer. Er det tilfældet, vil samfund alene bestående af fimreorme, børsteorme, snegle, muslinger og visse dansemyg antyde, at vandløbet har været udsat for en meget omfattende forurening med pyrethroid.

Umiddelbart vil man forvente, at jo mindre et dyr er, des mere følsomt vil det være over for pyrethroid. Det skyldes, at overfladen hos små dyr – sammenlignet med store dyr - er relativt større i forhold deres volumen og de er dermed mere udsat for transport af stoffet gennem huden. Der blev generelt ikke fundet en sådan sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og størrelsen (vægt eller overfladeareal) af de testede leddyr, hverken for dødelighed eller "kritisk følsomhed". Der var dog en tendens til positiv sammenhæng for dødelighed, ligesom der blev fundet en signifikant negativ sammenhæng mellem dødelighed og forholdet overfladeareal/vægt. En forklaring på den manglende sammenhæng kan være, at forskelle i arternes fedtsammensætning i nervecellerne er af langt større betydning end størrelsen.

Samlet set kunne der for de testede arter ikke påvises signifikante sammenhænge mellem pyrethroid-følsomheden ("kritisk følsomhed") og hvor udsatte arterne må formodes at være over for en given eksponering (puls) med pyrethroid i vandløbsmiljøet, eller hvilket potentiale for rekolonisering de må formodes at have efter en sådan påvirkning. Der var således ingen signifikante relationer (eller tendens til sådanne) til arternes frugtbarhed og spredningsevne, eller til det samlede resultat heraf, nemlig deres potentiale for rekolonisering. Der var heller ingen systematiske forskelle i følsomhed ("kritisk følsomhed" og dødelighed) over for pyrethroidet, i forhold til arternes foretrukne fødesøgning og fødeemner (fødeemner: dødt groft organisk stof, dødt finpartikulært organisk stof, mikroalger, andre invertebrater). Som nævnt under hovedkonklusionerne betyder det ikke, at biologiske egenskaber er uden værdi i forhold til udvikling af et fremtidigt dansk pyrethroidindeks, snarere tværtimod. Egenskaber som hvor udsat en art er i vandløbet, hvis det udsættes for en puls med pyrethroid, eller hvad den lever af, dens formeringspotentiale, og endelig evne til spredning (og rekolonisering), skønnes nemlig alle at være vigtige faktorer, som på passende vis bør kobles sammen med arternes aktuelle følsomhed.

Summary

Background & aim

Insecticides used to prevent problematic attacks from pest insects in crops may end up in the aquatic environment including streams. Here insecticides occur as pulses, most often with run-off after heavy rainfall following spraying, but also due to wind drift during spraying. Insecticides are toxic to stream macroinvertebrates. These are an important part of the biological structure of the streams, processing particular organic matter, and themselves being food for fish, birds and mammals. Streams are generally rich in macroinvertebrate species, each adapted to specific microhabitats and food, and also with varying sensitivity to human impact. Consequently, they have been used as environmental indicators for a century. Danish Stream Fauna Index (DSFI) using presence/absence of specific indicator taxa is the official Danish method to assess the quality of streams. Although originally being designed to assess the effect of organic impact, the index also reflects the physical quality of streams. The question is, however, if DSFI also reflects insecticide impact.

Answering this basic question is essential in the present project. If the answer is no, the project aim at identifying taxa that are especially sensitive and tolerant to insecticides and that therefore may be used developing a new macroinvertebrate-based insecticide index. If so, the sensitivity to insecticides in at least some of the taxa must differ significantly from their sensitivity to organic pollution. An insecticide index does not, however, need to be based exclusively on the taxa themselves, but may alternatively include biological traits (i.e. fecundity, dispersal capacity, and ability for recolonization). Therefore the project also aims at identifying possible relations between sensitivity to insecticides and biological traits.

The project has focussed on insecticides, more specifically on the pyrethroid lambda-cyhalothrin. The reason for this choice is that pyrethroids are the most harmful insecticides (or pesticides) to stream macroinvertebrates, at the same time being the most widely used insecticides in Danish agriculture.

The study

We tested the sensitivity to the "model pyrethroid" among a suite of totally 34 macroinvertebrates, 28 arthropods and 6 non-arthropods, with a predominantly wide distribution in small Danish streams. Most taxa were included in DSFI and covering indicators for the whole quality spectrum of this index. Also, taxa from all habitats and functional feeding groups were included. To overcome experimental difficulties, taxa from ponds were in a few cases used as proxies for especially current demanding closely related taxa.

Basically, the taxa were tested using the same experimental procedure. After acclimatization for at least one day, all individuals were exposed to different concentrations of lambda-cyhalothrin for a period of 90 minutes, where after they were transferred to unpolluted water and their behaviour (visually assessed) and mortality recorded over a period of 6 days. We exposed at nominal concentrations of 0, 10, 100, 1000 and 10 000 ngL⁻¹. Using video-tracking device, we also recorded the distance travelled by individuals for most of the taxa during exposure as well as 1-6 days hereafter. Test animals were generally kept in small (85 x 85 x 25 mm) polystyrene arenas without stirring or aeration of the water, and no substrate or food added. Only exception was four current demanding taxa that were kept in aerated plastic petri boxes before and after the exposure. Number of tested individuals for each taxa was 23 (control) or 19 (pyrethroid added), except for the four taxa

kept in petriboxes (25 individuals in each treatment). The concentration of the pyrethroid in the arenas after exposure was measured.

We measured size of each arthropod taxa and characterized other biological traits (microhabitat, food, fecundity, dispersal capacity) using literature values and own data from previous studies.

We calculated EC₅₀ (for visually assessed behavioural effects) and LC₅₀ (mortality) values for each taxon and day. We also made statistical test in order to identify the lowest concentration at which distance travelled was affected during and after exposure. All these data were used to rank the tolerance of each taxa on a scale from 1 (most sensitive) to 7 (least sensitive). Using all end-points we identified the lowest concentration with a biological significant effect ("critical sensitivity"). This effect was typically hyperactivity during exposure, being equivalent to catastrophic drift if individuals would have been exposed in a stream. Other critical situations included significantly reduced activity (in a stream increasing the risk of predation), from which they never recovered, ultimately leading to death. Finally, we analysed for relations between "critical sensitivity" and selected biological traits.

Main conclusions

The sensitivity of stream macroinvertebrates to lambda-cyhalothrin could be ranked within an interval of 0 to >10 000 ngL⁻¹. While non-arthropods (oligochaetes, leeches, snails and mussels) were totally unaffected, arthropods were generally sensitive, but with extremely large variation, even within the same family. We found no consistent differences at higher taxonomic levels. Generally, sensitivity was 10-100 times higher for behavioural than mortality, being most pronounced as hyperactivity during pulse exposure.

The multi-stressor index, DSFI, was not suitable as a pesticide indicator, as there was no clear relation between indicator values of the taxa in the index and their corresponding pyrethroid sensitivity. However, this and the high variation in pyrethroid sensitivity may potentially make it possible to develop a specific pyrethroid index. Taxa can, however, not be substituted by their traits in such an index, but must be combined with taxon sensitivity (as in the German SPEAR index).

Although we only studied effects of one specific pyrethroid, a review of literature data makes it probable that our findings are representative for other pyrethroids used in Danish agriculture.

Selected results

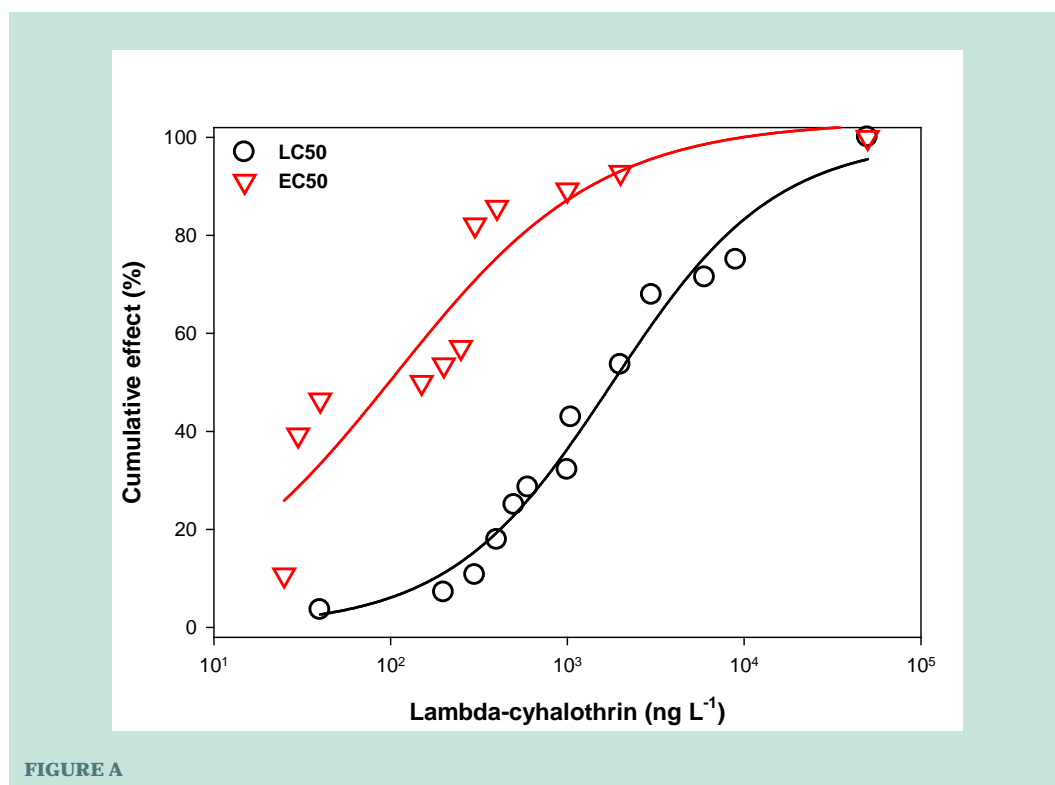
We performed the relatively simple experiments under conditions far from what the tested macroinvertebrates face in nature. Despite of this the survival and behaviour of pyrethroid untreated individuals (controls) was generally satisfactory, and it was therefore possible to obtain reliable EC₅₀ and LC₅₀ values. However, it was only possible to video-track half of the taxa, meaning that ecologically important behavioural end-points during and after exposure were only provided for these taxa. And although supplementary data was provided from previous studies, the ranking of species sensitivity was not carried out on exactly the same basis.

Following pulse exposure, measured concentrations of lambda-cyhalothrin were only about 1/3 of the nominal concentrations due to the lipophilic/adhesive nature of the substance. But although there were large variation between experiments, the relative differences between treatments was as expected. As the actual concentrations are expected to be significantly higher at start of exposure, we decided to use nominal concentrations in our data analyses.

Overall, we only found effects in the selected interval of concentrations among arthropods (crustaceans and insects), whereas non-arthropods (worm, snails and mussels) were totally unaffected for all end-points. This is consistent with previous studies and probably explained by the mode of action of pyrethroids, adhering to the cell membrane channels through which the nerve

cells communicate. Overall, there was large variation in sensitivity among species, but no consistent differences at higher taxonomic level. Depending on end-points, the overall sensitivity (effect concentration) among arthropods – and even Diptera and Chironomidae - varied between 10 and 10 000 ngL⁻¹. Generally, sensitivity was markedly higher for behavioural endpoints than mortality.

This is reflected in the figure showing the cumulative distribution of EC50 (visually assessed) and LC50 values (effects) for the studied arthropods (a so-called Species Sensitivity Distribution). From the graph it is possible to read the proportion of the taxa that are in risk of being significantly impacted at a specific pulse concentration of pyrethroid. Reversely, supposing that the suite of taxa reflects the species composition in a stream and if one decides that it is unacceptable that 40% or more of the taxa is affected by pyrethroid impact, it is evident that pyrethroid pulses of ≥ 70 ngL⁻¹ must be avoided.



A significant part of the arthropods (38%) showed recovery, whereas 15% of the taxa showed increasing negative effects during the experimental period. The rest showed neither recovery nor increasing negative effects. Especially hemimetabolic Plecoptera and Ephemeroptera recovered, whereas this was far less common among holometabolic insect orders.

We ranked taxon sensitivity for each endpoint, i.e. behaviour during and after exposure (reflecting either travelled distance recorded by video tracked taxa or visually assessed) and mortality during the 6 days period after exposure, and estimated a so-called "critical sensitivity" taken all end-points including comparable data from our own previous - and comparable - studies into account. This ranking showed significant higher sensitivity (at least 10 times) for behavioural changes than for mortality. However, we found no overall significant difference in sensitivity for behaviour during and after exposure.

Statistical analyses revealed no significant relation between indicator status in DSFI (so-called key groups ranging from 1 to 6, where KG 1 are very organic pollution sensitive species, KG 6 being very pollution tolerant) and sensitivity to lambda-cyhalothrin. However, so-called positive diversity groups in the index (pollution sensitive taxa) were significantly more sensitive to the pyrethroid

than negative diversity groups (pollution tolerant taxa). DSFI is, nevertheless, unsuitable as an insecticide indicator, unless the impact from pyrethroids is not very high.

Biological traits in macroinvertebrates may be used to reflect effects of environmental impact including insecticides. Thus, it is expected that small macroinvertebrates are more sensitive than larger ones because their surface to volume ratio is higher and, thus, more exposed to transport of the substance through their skin. However, no such relation was found, presumably because lipid composition of the nerve cells that influence the binding of pyrethroids is of higher significance. Further, we found no statistical relation between sensitivity to the pyrethroid and traits like how exposed the taxa are in their natural environment, how they feed and from what, fecundity, and dispersal. This does not, however, mean that such traits are without importance in relation to pyrethroids. Thus, it may be important and useful to include traits reflecting recolonization potential in a future insecticide index combined with taxon sensitivity.

1. Indledning

I Danmark findes der ca. 60 000 km vandløb. En stor del af disse er skabt af naturens egne kræfter. Især i forbindelse med istiderne er der således skabt lavninger i landskabet, hvori vandløbene strømmer. Vandet stammer dels fra grundvandet, dels fra overfladisk afstrømning i forbindelse med nedbør. Derudover er der skabt mange kilometer kunstige vandløb (åbne som rørlagte) ved gravning, typisk i forbindelse med afvanding af vådbundsområder, således at disse er blevet forsøgt gjort egnede til landbrugsdrift. Også mange naturlige vandløb er blevet ændret, således at de hurtigere kan transportere overskudsvand bort fra de dyrkede marker. Vandløbenes slyngninger er blevet rettet ud, de er gravet bredere og navnlig dybere. Og endelig udføres der en stadig vedligeholdelse af dem, idet der fjernes plantevækst (grøde) og aflejringer af finkornet materiale, alt for at opretholde afvandingsevnen. Landbruget som tegner sig for omkring 65 % af arealudnyttelsen i Danmark har således sat et markant fodaftryk på vore vandløb.

Derudover tilføres vandet i vore vandløb store mængder stoffer af forskellig art. Udledninger af spildevand fra byer, fabrikker, mere spredt liggende ejendomme, landbrug med dyrehold, samt dambrug har været særlig betydende, ligesom der udvaskes overskud af kvælstof og fosfor fra de dyrkede marker. Også andre kemiske forbindelser tilføres i større mængder end naturligt (fx salt, jernforbindelser og tungmetaller), ligesom der udledes en række såkaldt miljøfremmede stoffer. Til sidst nævnte gruppe hører pesticiderne, også kaldet plantebeskyttelsesmidler, stoffer der anvendes til at bekæmpe organismer, der volder skade på afgrøderne og nedsætter høstudbyttet.

Sideløbende med miljøpåvirkningerne af vandløbene har der været et varierende fokus på at imødegå, at vandløbene blev forvandlet til uegnede levesteder for planter og dyr. Siden 1973 har der været en egentlig national miljølovgivning. Denne er senest blevet væsentlig ændret som et led i en samlet europæisk miljøindsats til beskyttelse af vandnatur og vandressurser. Dette er udmøntet i Vandrammedirektivet (VRD) fra 2000. Direktivet forudsætter, at EU-medlemslandenes vandområder, herunder vandløbene, skal opnå god økologisk kvalitet eller – idet mindste - godt økologisk potentiale i 2015. Det er dog muligt at udskyde målopfyldelsen til 2021 og ultimativt 2027.

Både økologisk kvalitet og potentiale defineres på et biologisk grundlag. Man taler om forskellige biologiske kvalitetselementer. Disse omfatter planteplankton (som dog ikke er fagligt relevant i danske vandløb), bundlevende alger og vandplanter, makroinvertebrater (smådyr) og fisk. Inden for hvert kvalitetselement opereres der med 1-flere indikatorer (eller miljømålesystemer), som skal dække en 5 trins skala af økologisk kvalitet (tilstandsklasser): høj, god, moderat, ringe og dårlig. Indikatorerne forudsættes at omfatte parametre som artsrigdom, hyppighed, samt forholdet mellem følsomme og tolerante arter. I nogle tilfælde samles flere elementer til et såkaldt multimetrisk indeks, hvor de enkelte dele vægter ens eller forskelligt. Et indeks skal ideelt set kunne beskrive effekten af én specifik påvirkningsfaktor, men i mange tilfælde afspejler mange anvendte indices flere påvirkningsfaktorer samtidig. Hvis flere biologiske kvalitetselementer afspejler en bestemt påvirkningsfaktor anbefales det at vælge det element (fx makroinvertebrater), som er mest følsom over for den pågældende påvirkningsfaktor.

I Danmark anvendes indtil videre alene makroinvertebrater som biologisk kvalitetselement og Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI) som eneste kvalitetsmål. Indekset er i sit valg af specifikke indikatororganismer oprindeligt udviklet til at afspejle effekten af let-omsætteligt organisk stof (fra spildevand), men er følsom også for andre menneskeskabte påvirkninger. Spørgsmålet er i hvor høj grad det også afspejler andre faktorer, ikke mindst miljøfremmede stoffer og helt specifikt pesticider.

2. Baggrund og formål

2.1 Baggrund og "state of the art"

Brug af pesticider på dyrkede arealer fører til utilsigtet tilførsel af disse stoffer til ferskvandsøkosystemer som vandløb og søer, også i Danmark (se fx Mathiessen et al. 1995, Felding et al. 1997, Schulz & Liess 1999a, b, Bøgestrand et al. 2003, 2007). De højeste koncentrationer i vandløb optræder typisk i forbindelse med større nedbørshændelser og forekommer som kortvarige pulse (Solomon et al. 1996, Styczen et al. 2003, Rasmussen et al. 2011a), selvom disse også kan forekomme i forbindelse med afstrømning fra vaskepladser med direkte forbindelse til vandløb eller vinddrift under sprøjtning af tilgrænsende marker. Flertallet af de pesticider, som optræder i de højeste koncentrationer i danske vandløb, har næppe væsentlige negative effekter på organismerne. Således skal herbicidkoncentrationer være væsentlig højere end de fundne for at nedsætte væksten hos alger og vandplanter (Cedergreen et al. 2004), ligesom deres påvirkning af makroinvertebraterne synes usandsynlig (Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Derimod kan visse fungicider have kortvarige virkninger på væksten af visse bundlevende alger (Møhlenberg et al. 2004), ligesom stofferne, ved at hæmme væksten hos de vandlevende mikrosvampe, kan nedsætte omsætningen af dødt organisk stof i form af nedfaldne blade fra træer langs vandløbene (Rasmussen et al. 2011b).

Størst effekt har visse insekticider, de såkaldte pyrethroider, der er de mest anvendte insekticider i dansk landbrug, både hvad angår forbrugte mængder (63%) og behandlet areal (91%) (Kjølholt et al. 2012). De kan ved almindelig landbrugsdrift og efterfølgende tab fra de behandlede arealer føre til effekter hos makroinvertebrater på populations- og økosystemniveau i vandløb (se fx Schulz & Liess 1999b, Wiberg-Larsen et al. 2013). Dette er ikke overraskende pga. stoffernes høje giftighed ved selv relativt lave koncentrationer (på opløst form). Således er der ved pulskoncentrationer over 100 ngL⁻¹ påvist overdødelighed i laboratorieforsøg med enkelte arter, vandløbs mesokosmos forsøg med 1-flere arter, og endda in-situ forsøg i naturlige vandløb (Møhlenberg et al. 2004, Beketov & Liess 2008, Nørum et al. 2010). Derudover er der i mesokosmosforsøg og in-situ forsøg i naturlige vandløb fundet subletale effekter, primært i form af hyperaktivitet/reduceret bevægelsesadfærd og forøget transport med strømmen, helt ned i intervallet 1-100 ngL⁻¹ (Møhlenberg et al. 2004, Lauridsen & Friberg 2005, Beketov & Liess 2008, Rasmussen et al. 2008, Nørum et al. 2010, Wiberg-Larsen et al. 2013). Adfærdsbetinget transport, også kaldet drift, er naturligt forekommende hos mange arter (Brittain & Eikeland 1988), men kan ved pesticidpåvirkning øges i en sådan grad (katastrofedrift), at bestanden af disse arter reduceres markant – og i nogle tilfælde forsvinder arterne endda helt fra den berørte strækning (Schulz & Liess 1999b). Derudover har flere danske undersøgelser dokumenteret længerevarende effekter på makroinvertebrater (bl.a. hele samfund) af sådanne pulse af pyrethroider (fx Møhlenberg et al. 2004, Heckmann & Friberg 2005, Nørum et al. 2006, Wiberg-Larsen & Nørum 2009, Wiberg-Larsen et al. 2013). Sådanne effekter omfatter fx nedsat fødeoptagelse (græsning på bundlevende alger, findeling af bladmateriale) og reduceret succes under forvandlingen fra nymfer/larver til voksent insekt (fx Schulz 1997, Wiberg-Larsen & Nørum 2009, Wiberg-Larsen et al. 2013).

Spørgsmålet er imidlertid, om makroinvertebraterne reelt udsættes for skadelige koncentrationer på opløst form i vore vandløb. Det er nemlig således, at pyrethroider er meget lidt vandopløselige, men til gengæld let bindes til organisk stof og mineralske partikler (Hand et al. 2001, Oudou & Hansen 2002). Det betyder, at de kun kortvarigt kan forventes at optræde på opløst form. De vil derfor typisk tilføres vandløbene bundet til partikler (Ghadiri & Rose 1991) og en sådan transport

via drænsystemer og jordens makroporer (bioporer) kan være meget hurtigt efter et regnskyl (Petersen et al. 2012). Ny undersøgelse tyder dog på, at partikelbundet pyrethroid også har en betydelig giftighed (Rasmussen et al. 2013), se nedenfor.

Selvom der kun er foretaget få målinger af pyrethroider i danske vandløb, er der imidlertid gentagne gange målt koncentrationer i intervallet 100-500 ngL⁻¹ (Fyns Amt 1997, Wiggers 1999). Således blev pyrethroidet esfenvalerat fundet i over 30 % af prøverne ved en undersøgelse af tre små østjyske vandløb, som afvander landbrugsoplande, og i ca. 20 % af prøverne var koncentrationerne endda højere end 100 ngL⁻¹ (Wiggers 1999). Dertil kommer, at disse værdier alle blev målt i forbindelse med større afstrømningshændelser i maj-juni. Det er derfor overvejende sandsynligt (se ovenfor), at der har været tale om afstrømning fra sprøjtede marker via dræn eller, i visse tilfælde, overfladisk afstrømning i forbindelse med kraftige regnskyl, snarere end afløb fra vaskepladser. Meget tyder altså på, at vore vandløb periodevis indeholder koncentrationer af pyrethroid, som har væsentlig effekt på makroinvertebratsamfundene. Og det er i den forbindelse ikke nødvendigvis afgørende, om pyrethroiderne forekommer på opløst eller partikelbunden form i vandfasen (Maund et al. 2002, Rasmussen et al. 2013). Dertil kommer, at pyrethroiderne tilbageholdes i vandløbenes sediment og der indvirker på sammensætningen af makroinvertebratsamfundene (Friberg et al. 2003). Der er således grund til at forvente effekter på vandløbenes makroinvertebratfauna i forbindelse med "normal" marksprøjtning.

Så samlet set er der altså grund til at betragte pesticider, og ikke mindst insekticider og visse fungicider, som en betydende faktor for miljøkvaliteten i vandløb, også i forbindelse med regelret brug af stofferne. Det betyder, at der er behov for metoder til at beskrive denne påvirkning, herunder om den øges eller mindskes som følge af en regulering af forbruget og anvendelsen af stofferne. Pesticider er generelt uønskede uden for det dyrkningsmiljø, hvor de skal virke ved at forbygge angreb af skadevoldere. Der er derfor fra politisk side interesse for at mindske dette problem, eksempelvis udmøntet i aftalen om "Grøn Vækst" (Regeringen & Dansk Folkeparti 2010). Dertil kommer, at de vandplaner, som udarbejdes som et led i implementeringen af Vandrammedirektivet, har identificeret områder, hvor det er vurderet, at de fastsatte kvalitetsmål ikke er opfyldt på grund af pesticidpåvirkning, og hvor der derfor skal foretages en indsats for at forbedre forholdene.

Der er i udlandet udviklet indices til brug i vandløb, og som er målrettet påvirkninger fra pesticider. Mest kendt er det tyske SPEAR (SPECies At Risk), som bygger dels på de enkelte organismers følsomhed overfor pesticider, dels deres biologiske karakteristika som reproduktionsperiode og mobilitet (Liess & von der Ohe 2005). Rationalet er, at arter, som er følsomme selv ved lave koncentrationer af pesticider, og som samtidig fx formerer sig relativt langsomt klassificeres som værende "i risiko". Arter med stor tolerance, stor produktionsevne, og relativt stor evne til hurtigt at kolonisere er derimod "ikke i risiko". Indekset angiver (mængdemæssigt) andelen af arter i en udtagen faunaprøve, som er i risiko. Ved at fokusere på de nævnte biologiske karakteristika er det forsøgt at gøre indekset uafhængigt af andre betydende miljøfaktorer som fx let-omsætteligt organisk stof og fysiske forhold. Indekset har især vist sig velegnet til at afspejle effekter forbundet med sprøjtninger mod markskadedyr i maj-juni (Liess & von der Ohe 2005, Schäfer et al. 2007, Liess et al. 2008), ligesom det synes at have potentiale som et fælles europæisk indeks i forbindelse med implementering af VRD (Von der Ohe et al. 2007). Der kan dog rejses berettiget tvivl om indeksets reelle værdi, bl.a. i forhold til grundlaget for vurderingen af disse organismers følsomhed over for pesticider og deres spredningsevne. Ligeledes er indekset ikke nødvendigvis uafhængigt af de fysiske forhold (Rasmussen et al. 2011c).

Som nævnt i indledningen anvendes i Danmark et makroinvertebrat-baseret indeks, Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI). Dette indeks afspejler en række miljøpåvirkninger og det er derfor relevant at vide, i hvilken grad det også er følsomt for pesticidpåvirkninger. Foreløbige undersøgelser indikerer at DVFI ikke er specielt velegnet som indikator for pesticidpåvirkning (Rasmussen et al. 2012). Nærværende projekt sigter på at uddybe denne problemstilling.

2.2 Formål

Projektets formål har overordnet været at klarlægge forskelle i tolerance over for miljørealistiske pulse af pyrethroider hos et bredt udsnit af danske makroinvertebrater fra vandløb. Projektet har haft to specifikke delmål. Det første har været at undersøge i hvor høj grad Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI) er i stand til at afspejle påvirkning fra pyrethroider og dermed kan anvendes som en brugbar pesticidindikator. Dette er særlig relevant, fordi DVFI, i den hidtidige forvaltning af Vandrammedirektivet, har været det eneste anvendte mål for økologisk tilstand i danske vandløb. Projektet vil derfor klarlægge, i hvor høj grad dette kvalitetsmål vil blive påvirket alene som følge af tilførslen af pyrethroider. Det andet delmål har været at tilvejebringe viden om en række makroinvertebrat-arters følsomhed over for pyrethroider, således at denne viden kan indgå som "byggesten" i udviklingen af et nyt indeks til brug i forvaltningen af det danske vandløbsmiljø. Uden grundlæggende viden om den potentielle indflydelse af insekticider på den økologiske kvalitet i vandløbene, vil det reelt være vanskeligt at evaluere effekten af de iværksatte foranstaltninger til nedbringelse af en utilsigtet pesticidpåvirkning af vore vandløb.

Projektet er derved nært koblet til et andet projekt under Miljøstyrelsens program for pesticidforskning: "Udvikling af en biologisk pesticidskadesindikator til danske vandløb" (MST j.nr. 667-00116). Det betyder, at projektet ikke kun sigter mod at identificere pyrethroid følsomme og tolerante arter/grupper af makroinvertebrater, som indgår i DVFI, men også andre makroinvertebrater som forekommer i danske vandløb.

Vores overordnede hypoteser er at:

- spektret af arter/slægter/familier, som indgår i DVFI, vil udvise betydelig variation i, og vil således kunne rangordnes med hensyn til, følsomhed over for en given påvirkning med pyrethroider
- såfremt visse af de undersøgte arter/slægter/familier udviser en særlig følsomhed eller tolerance over for pyrethroider, der overstiger deres følsomhed i DVFI, vil disse organismers tilstedeværelse eller fravær i indsamlede faunaprøver kunne anvendes til specifikt at signalere om et makroinvertebratsamfund har været udsat for væsentlig påvirkning fra pyrethroider.
- biologiske egenskaber tilknyttet de enkelte arter/slægter/familier kan relateres til sidst nævntes følsomhed/tolerance over for pyrethroider.

Projektets vil, ud over at tilvejebringe ny konkret viden, også inddrage og perspektivere resultater fra en række tidligere gennemførte projekter under Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning om pesticiders effekter på makroinvertebrater i vandløb (Nørum & Bjerregaard 2003, Møhlenberg *et al.* 2004, Nørum *et al.* 2006, Wiberg-Larsen & Nørum 2009, Wiberg-Larsen *et al.* 2013). Disse undersøgelser har været koncentreret om de effekter, som udvalgte pesticider har hos en række organismer i form af dødelighed, ændret bevægelsesmønster (herunder drift), samt nedsat vækst, omsætning af organisk stof, reproduktion, eller ændrede relationer mellem rovdyr og byttedyr. Dertil kommer studier af mere overordnede (på samfundsniveau) effekter på biologisk struktur, stofomsætning og fødetilgængelighed, samt rekolonisering hos makroinvertebrater (Wiberg-Larsen & Nørum 2009), ligesom der har været udført undersøgelser af betydningen af gentagne pulse (Wiberg-Larsen *et al.* 2013).

Projektet er gennemført som en undersøgelse af effekten på et bredt udsnit af arter, der undersøges enkeltvis under sammenlignelige og velkontrollerede laboratorieforhold. Baggrunden for dette koncept er, at tidligere studier, hvor hele samfund er undersøgt i enten naturlignende mesokosmos (større strømrender) eller rigtige vandløb, har vist sig meget resursekrævende at gennemføre i en tilstrækkeligt stor skala, således at betydningen af naturlige variationer og andre miljøfaktorer kan minimeres tilstrækkeligt til at opnå statistisk robuste resultater.

2.3 Projektets overordnede struktur

Projektet består kun af én eksperimentel del, nemlig undersøgelse af følsomheden hos en række af de arter/slægter/familier mv. (kaldet taxa), hvoraf flertallet indgår som elementer i DVFI. Forud for

disse undersøgelser, som er gennemført under laboratorieforhold, er foretaget en udvælgelse af relevante taxa.

Som udgangspunkt er samtlige forsøgsorganismer testet på en ensartet og sammenlignelig måde. Vi har i projektet valgt at undersøge dødelighed og ændringer i bevægelsesadfærd under og i tiden efter en kortvarig pulseksponering. Bevægelsesadfærd er af fundamental betydning for organismernes fødesøgning, flugt fra prædatorer (rovdyr), reproduktion og spredningsevne, men også for evnen til at kunne rekolonisere tidligere pesticidpåvirkede levesteder. Dertil kommer, at tidligere forsøg har vist, at pyrethroidpulse – inden for bestemte intervaller af koncentrationer - inducerer hyperaktivitet hos visse arter, hvilket under naturlige forhold vil føre til øget transport med strømmen (katastrofedrift) bort fra dyrenes oprindelige levesteder (Nørum *et al.* 2006, Nørum *et al.* 2010). Hos andre arter indtræffer i stedet en nedsat mobilitet og formodentlig evne til at holde sig på plads under de herskende strømforhold, hvilket ligeledes kan føre til øget drift. Den øgede drift vil sammen med en øget dødelighed/sårbarhed over for rovdyr bidrage til at ændre sammensætningen af arter på en berørt vandløbsstrækning. Forsøgene i laboratoriet vil derfor i høj grad fungere som et realistisk mål (proxy) for ændringer i artssammensætning og samfundsstruktur under miljørealistiske forhold i vandløbene.

I projektet er som udgangspunkt anvendt videosporing til at kortlægge dyrenes: (i) baggrundsadfærd i "rent" vand før eksponering med pesticid, (ii) adfærd under 90 minutters pesticideksponering og (iii) adfærd efter at dyrene igen er overført til rent (ukontamineret) vand.

Eksponeringen er foretaget på ensartet vis for samtlige testede arter. Der er kun anvendt ét stof, pyrethroidet lambda-cyhalothrin, som har været anvendt som "model" pyrethroid i en række tidligere studier (Nørum *et al.* 2006, Wiberg-Larsen & Nørum 2009, Wiberg-Larsen *et al.* 2013). Ligeledes eksponeres udvalgte kontrolgrupper af hver art for 4 nominelle koncentrationer af stoffet: 10, 100, 1000 og 10 000 ngL⁻¹. Derudover eksponeres en kontrolgruppe for rent vand. Lambda-cyhalothrin er meget tungt opløseligt i vand (5000 ngL⁻¹) og har en høj oktanol:vand fordelingskoefficient (log K_{ow} = 7,0), hvilket betyder at stoffet er stærkt fedtopløseligt (Laskowski 2002). Det er dog muligt at holde i stoffet i opløsning uden over vandopløseligheden ved tilsætning af ethanol.

Intervaller af valgte koncentrationer af lambda-cyhalothrin dækker de niveauer, som kan forventes at forekomme i danske vandløb, idet koncentrationer af størrelsesordenen 10 000 ngL⁻¹ dog kun kan forventes at forekomme i forbindelse med uheld eller uagtsom omgang med sprøjtemidler.

Mens det er muligt at etablere koncentration – respons sammenhænge for dødelighed og visuel vurdering af adfærdsændringer, er det ikke muligt for videosporingsforsøgene, hvor et respons kan være kompliceret (fx først hyperaktivitet, dernæst nedsat aktivitet, til sidst evt. immobilisering). Til gengæld kan der identificeres et koncentrationsniveau, over hvilket der registreres ændringer i bevægelsesadfærd.

3. Metode

3.1 Udvalgelse af arter til test for følsomhed over for pyrethroider

Der kendes mere end 730 forskellige arter af makroinvertebrater fra danske vandløb. Det store antal arter er fordelt på ca. 400 slægter og ca. 60 familier eller ordener. Det er naturligvis en uoverkommelig opgave inden for en begrænset økonomiske ramme at undersøge følsomheden over for pyrethroider hos samtlige disse arter. Dertil kommer tekniske og biologiske udfordringer, som gør det vanskeligt at teste visse arter. Disse vanskeligheder består fx i, at arterne kræver miljøforhold, som er vanskelige at opfylde under laboratorieforhold, eller at det i praksis kan vise sig umuligt at fremskaffe et tilstrækkeligt antal forsøgsdyr.

Det har derfor været nødvendigt at foretage et valg af forsøgsorganismer blandt de mange arter. En væsentlig del af arterne indgår i Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI). Opbygningen af dette indeks, det tilhørende identifikationsniveau og beregningen af indeksets output, faunaklasserne, er detaljeret beskrevet af Miljøstyrelsen (1998). I indekset indgår 58 forskellige taxa (dvs. taksonomiske grupper) af makroinvertebrater. Disse taxa omfatter slægter (i nogle tilfælde kun repræsenteret ved én art), familier og ordener. Beregningen af faunaklassen (indekxsværdien) bygger på forekomst af bestemte nøglegrupper (i alt 6 forskellige), samt på antallet af bestemte positive og negative diversitetsgrupper. Taxa tilhørende nøglegruppe 1 er de mest følsomme over for let-omsætteligt organisk stof (fx fra spildevand), og karakteriserer den højeste miljøkvalitet, mens taxa under nøglegruppe 6 er de mest tolerante og karakteriserer den dårligste miljøkvalitet. Positive diversitetsgrupper kendetegner gode miljøforhold, negative diversitetsgrupper dårlige miljøforhold. Funktionen af DVFI er beskrevet i bilag 2.

Vi har derfor dels udvalgt arter inden for hver af 6 nøglegrupper, dels udvalgt ikke-nøglegruppe arter, som tilhører enten de positive eller negative diversitetsgrupper (Tabel 3.1). Derudover har vi inkluderet arter, som ikke indgår i DVFI, men som er almindeligt udbredt, ligesom der generelt er udvalgt arter/grupper som primært er knyttet til mindre vandløb. Rationalet bag dette valg er, at mindre vandløb i særlig grad vil være udsat for skadelige koncentrationer af pyrethroider. Endelig er det ved valget af testorganismer søgt at dække et bredt spektrum af:

- levesteder i vandløbene
- føde-funktionelle grupper (dvs. taxa der lever som "græssere" på bundlevende alger, "iturivere" af dødt groft plantemateriale, "filtratorer", rovdyr m.v.)
- bevægelsestyper ("kravlere", "svømmere", "glidere")
- spredningspotentiale (evne til at rekolonisere vandløbsstrækninger efter at disse har været påvirket af pyrethroider)
- reproduktionspotentiale
- adfærd.

Disse biologiske karakteristika anvendt, fordi de har væsentlig betydning for, i hvilket omfang dyrene rammes af en pyrethroidpuls, reagerer på denne, og er i stand til at genindvandre.

Der blev desuden lagt vægt på at udvælge arter, som forekommer i vandløbene på de tidspunkter, hvor der primært forventes at blive sprøjtet med pyrethroider. Der er herved primært fokuseret på sprøjtninger udført fra slutningen af maj til slutningen af juni mod bladlus i korn (Nielsen 2009-

2011), idet disse sprøjtninger er de arealmæssigt og mængdemæssigt mest betydende (Kjølholt et al. 2012).

Endelig er der fravalgt arter, som erfaringsmæssigt ville være meget vanskelige at holde gennem forsøgsperioden i de valgte testsystemer. I stedet er udvalgt arter, som vurderes at være sammenlignelige taksonomisk og adfærdsmæssigt. Helt konkret blev *Baetis spp.* (familien Baetidae) fravalgt, fordi de dels er yderst skrøbelige, dels kræver stadig strømbevægelse; mangler sidst nævnte bliver dyrene hyperaktive og foretager "desperate" svømmebevægelser for at kompensere for den manglende vandbevægelse, der er nødvendig for deres iltoptagelse, og i løbet af kort tid dør de simpelthen. *Baetis spp.* ville derfor være uegnede til de planlagte standardforsøg. I stedet blev udvalgt en anden repræsentant for familien, *Cloeon inscriptum*, som lever i stillestående vand.

Enkelte af forsøgsdyrene kunne ikke identificeres nærmere end til slægt (*Dicranota*, *Tvetenia*, *Micropsectra*, *Eristalis*). Desuden blev familien Tubificidae ikke søgt identificeret til slægt/art. Det er dog vurderet overvejende sandsynligt, at de hver især kun omfattede én enkelt art.

Der er i alt testet 34 forskellige arter (se tabel 3.1).

3.2 Indsamling og behandling af forsøgsdyr

Tidspunktet for indsamling og efterfølgende test af de enkelte forsøgsdyr blev fastlagt ud fra flere hensyn. Først og fremmest skulle arterne være til stede under den periode, hvor lambda-cyhalothrin og andre pyrethroider primært anvendes i landbruget. Dernæst skulle det – henset til forsøgsdyrenes størrelse - være muligt at indsamle dem i en tilstrækkeligt stor størrelse for derved at sikre optimale betingelser for håndtering og videosporing. Med første prioritet til disse faktorer, er der endelig taget hensyn til, at det arbejdsmæssigt var nødvendigt at fordele forsøgene over månederne februar – september (se tabel 3.1).

Egnede lokaliteter for indsamling af de enkelte arter blev udvalgt ved dels søgning i databasen WinBio, som indeholder oplysninger om prøver af makroinvertebrater fra hele landet, dels projektdeltagernes eget lokalkendskab.

De anvendte indsamlingslokaliteter fremgår af bilag 1.

Forsøgsdyrene blev indsamlet ved brug af egnet ketsjer (sigteketsjer eller DVFI-ketsjer) og "sparketeknik" (sparkes i bundmaterialet opstrøms for ketsjeren, som placeres mod bunden, hvorefter dyr og let bundmateriale skylles ind i ketsjeren). Dyrene (samt bundmateriale) blev overført til et passende antal spande og placeret køligt i termokasse. Spandene blev herefter hurtigst muligt transporteret til det kølerum, hvor forsøgene fandt sted, og her gennemboblet med atmosfærisk luft for at sikre optimale ilt- og strømforhold. Hvor der var tale om, at dyrene først kunne transporteres til kølerummet 1-2 dage efter indsamlingen, eller hvor transporttiden i øvrigt ville være lang, blev der tilført luft ved hjælp af en batteridreven membranpumpe (akvariepumpe) anbragt i selve kølekassen. Der blev anvendt fryseelementer til at holde en passende lav temperatur i kølekassen.

Forsøgsdyrene blev i kølerummet akklimatiseret i 1-3 døgn, afhængigt af indsamlingsomstændighederne (se ovenfor).

Forsøgsdyrene blev forud for forsøgene håndteret med størst mulig varsomhed. Dyr og materiale blev først overført fra spandene til hvide fotobakker med vand, og herfra manuelt frasorteret og overført til de respektive arenaer (se afsnit 3.3). Overførslen foregik enten ved brug af pincet, når der var tale om relativt robuste dyr (men uden at klemme dyrene), eller pipette, når der var tale om små og sarte dyr (fx fimreorme).

TABEL 3-1
 OVERSIGT OVER DE MAKROINVERTEBRATER, FOR HVILKE DER ER UDFØRT TEST AF PYRETHROIDFØLSOMHED.
 ANGIVET HVILKE ENDPOINTS DER ER MÅLT (ELLER FORSØGT MÅLT), HVILKEN FØLSOMHED ARTERNE HAR I
 DANSK VANDLØBSFAUNAINDEKS (MILJØSTYRELSEN 1998), OG HVORNÅR TESTENE ER UDFØRT.

Gruppe	Art	Nøglegruppe Taxon/diversi- tetsgruppe i DVFI	Mortalitet & visuelt vurderet adfærd	Video- sporing	Tidspunkt for video-sporing (år – uge)
Fimreorme	<i>Dugesia gonocephala</i>	-/positiv	X	X	2011-44
Børsteorme	<i>Tubificidae</i>	-/negativ*	X		2012-12
Igler	<i>Erpobdella octoculata</i>	-/negativ	X	X ⁵	2011-40
	<i>Helobdella stagnalis</i>	-/negativ	X		2012-35
Krebsdyr	<i>Asellus aquaticus</i>	4/negativ	X	X	2011-39
	<i>Gammarus pulex</i>	3,4,5/positiv	X	X	***
Slørvinger	<i>Protonemura meyeri</i>	1/positiv	X	X	2012-11
	<i>Nemoura cinerea</i>	-/positiv	X	X	2013-13
	<i>Leuctra fusca</i>	1/positiv	X	X ⁵	2012-25
	<i>Isoperla grammatica</i>	1/positiv	X	X	2012-17
Døgnfluer	<i>Caenis horaria</i>	3,4 positiv	X	X	2012-16
	<i>Cloeon inscriptum</i>	5/positive	X	X	2012-16
	<i>Heptagenia sulphurea</i>	2/positiv	X	X	2012-15
	<i>Ephemera danica</i>	1/positiv	X	X	2011-44
Dovenfluer	<i>Sialis lutaria</i>	4/negativ	X	X	2011-46
Biller	<i>Oreodytes sanmarkii</i> (voksne)	-/-	X	X ⁵	2012-25
	<i>Elodes minuta</i>	2/positiv	X	X ⁵	2011-47
	<i>Elmis aenea</i> (voksne)	2/positiv	X(P)		2012-19
	<i>Limnius volckmari</i> (larver)	1/positiv	X(P)		2012-19
	Vårfluer	<i>Agapetus fuscipes</i>	1/positiv	X(P)	
	<i>Hydropsyche</i> <i>angustipennis</i>	-/-	X	X	2012-15
	<i>Silo pallipes</i>	2/positiv	X	X	2012-17
	<i>Chaetopteryx villosa</i>	3,4/positiv	X	X	2012-18
	<i>Beraeodes minutus</i>	3,4/positiv	X	X ⁵	2011-47
Stankelben	<i>Dicranota¹</i>	-/-	X	X	2012-11
Kvægmyg	<i>Odagmia ornata</i>	5**/-	X(P)		2012-12
Glansmyg	<i>Ptychoptera paludosa</i>	-/-	X	X ⁵	2011-46
Dansemyg	<i>Conchapelopia menalops</i>	6/-	X		2012-20
	<i>Prodiamesa olivacea</i>	6/-	X	X ⁵	2012-18
	<i>Tvetenia²</i>	6/-	X		2012-34
	<i>Chironomus luridus</i> agg.	6/negativ	X		2012-36

	<i>Micropsectra</i> ³	6/-	X		2012-34
Svirrefluer	<i>Eristalis</i> ⁴	6/negativ	X		2012-37
Snegle	<i>Radix balthica</i>	-/negativ	X	X	2011-40
Muslinger	<i>Sphaerium corneum</i>	-/negativ	X		2012-35

*HVIS INDIVIDANTAL > 100; ** HVIS INDIVIDANTAL ≥ 25; ***DATA FRA TIDLIGERE UDFØRT FORSØG (NØRUM, UPUBLICERET); (P) FORSØG UDFØRT I BELUFTEDE PLASTIC PETRISKÅLE, ALLE ØVRIGE FORSØG UDFØRT I PLASTIKVEJEBÅDE (SE TEKSTEN FOR NÆRMERE FORKLARING)

¹ OMFATTER 6 DANSKE ARTER; ² 3 DANSKE ARTER; ³ 10 DANSKE ARTER; ⁴ 14 DANSKE ARTER.

⁵ VIDEOSPORING UDFØRT, MEN RESULTATERNE VAR IKKE BRUGBARE FORDI DYRENE ENTEN IKKE BEVÆGEDE SIG TILSTRÆKKELIGT ELLER IKKE KUNNE SPORES TILFREDSSTILLENDE.

3.3 Undersøgelse af dødelighed og bevægelsesadfærd i små arenaer

3.3.1 Overordnet princip i forsøgene

Samtlige forsøg blev gennemført efter samme overordnede princip og efter en detaljeret forsøgsprotokol. Forsøgsdyrene blev placeret i vandfyldte arenaer, eksponeret i 90 minutter ved nominelle koncentrationer af pyrethroid (lambda-cyhalothrin) på hhv. 0, 10, 100, 1000 eller 10 000 ngL⁻¹, overført til ny (og uforurenede) arenaer med kunstigt rent vand (se 3.3.2), og fulgt gennem 6 dage. Under forsøgsperioden blev der ikke tilført føde, ligesom der ikke blev tilført kunstigt eller naturligt substrat til arenaerne, fordi begge dele i givet fald ville umuliggøre videosporing. Der blev af samme grund ikke anvendt omrøring eller beluftning af vandet i arenaerne i forbindelse med videosporing.

3.3.2 Design af testsystemer

Der blev anvendt to forskellige slags vandfyldte arenaer: (1) 100 mL antistatiske polystyren vejebåde (78 x 78 x 25 mm, ALMECO A/S, varenr. D250-2) uden nogen form for omrøring eller beluftning og (2) polystyren petriskåle (Ø_i 85 mm, Ø_y 90 mm, ALMECO A/S) med lufttilførsel via én neddykket tynd plastslange forsynet med metalstuds i spidsen (indre diameter 0,75 mm). Arena type 1 blev gennem et helt forsøgsforløb anvendt til de arter, som var i stand til at overleve og opføre sig adfærdsmæssigt tilfredsstillende i stillestående vand igennem undersøgelsesperioden på i alt 7-9 dage. Om dette var muligt blev testet i pilotforsøg, som viste at selv arter, som normalt regnes for "strømkrævende", kunne holdes i stillestående vand. Kun 4 ud af de i alt testede 34 arter (*Elmis aenea*, *Limnius volckmari*, *Agapetus fuscipes* og *Odagmia ornata*) krævede omrøring af vandet og blev derfor testet i arena type 2. Type 1 arenaer blev dog også anvendt for sidst nævnte arter under selve eksponeringen med pyrethroid.

Arenaerne (type 1) blev opstillet på 2 borde, ét til hver art, således at der ved hvert delforsøg blev testet to arter ad gangen. De enkelte eksponeringsgruppers placering på et bord fremgår af figur 3.1. Der blev som hovedregel anvendt 23 replikater for kontrolgruppen og 19 replikater for hver af de 4 koncentrationer af lambda-cyhalothrin. Der blev således anvendt 99 individer og arenaer pr. forsøg.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99

	Antal forsøgsdyr (replikater)*	Bord A eller B
		Pyrethroid koncentration (ngL ⁻¹) under eksponering
	23	0
	19	10
	19	100
	19	1000
	19	10 000

FIGUR 3.1

PLACERING AF DE I ALT 99 ARENAER (TYPE 1: 100 ML ANTISTATISKE POLYSTYREN VEJEBÅDE, MED DIMENSIONERNE 78 X 78 X 25 MM), SOM INDGIK I SAMTLIGE FORSØG. ARENAERNE VAR PLACERET PÅ ET BORD, HVOROVER DER VAR MONTERET ET VIDEOKAMERA. DER BLEV ANVENDT TO BORDE (A OG B) MED SAMME OPSTILLING (SE TEKSTEN). FOR FLERTALLET AF ARTER/TAXA (I ALT 30) BLEV OPSTILLINGEN ANVENDT FØR, UNDER OG 1-6 DAGE EFTER EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHRIN. DER BLEV HERVED PLACERET ET FORSØGSDYR I HVER ARENA (HHV. 23 OG 19 REPLIKATER PR. KONCENTRATION). *FOR DE RESTERENDE ARTER (I ALT 4) BLEV DER ANVENDT 25 INDIVIDER PR. KONCENTRATION, OG OPSTILLINGEN BLEV KUN ANVENDT UNDER SELVE EKSPONERINGEN. HERUNDER VAR DET NØDVENDIGT AT PLACERE 2 INDIVIDER I EN DEL AF ARENAERNE FOR AT FÅ PLADS TIL DE "OVERSKYDENDE" DYR. FØR OG EFTER EKSPONERINGEN BLEV DE PÅGÆLDENDE DYR HOLDT I BELUFTEDE PETRISKÅLE (5 INDIVIDER I HVER PETRISKÅL).

For de allerede nævnte 4 strømkrævende arter blev der anvendt alternative arenaer (type 2), dvs. plastikpetriskåle, før og efter eksponeringen. Der blev anvendt 5 af disse arenaer for hver testkoncentration (5 arenaer hver indeholdende 5 forsøgsdyr), stakket oven på hinanden 5 og 5, og placeret på rullebord i kølerummet. Samtlige i alt 25 arenaer blev beluftet kontinuerligt igennem hele forsøgsperioden for at sikre passende omrøring af vandmassen.

Oven over hvert bord med arenaer (type 1) var placeret et videokamera, som muliggjorde registrering af aktiviteten i samtlige 99 arenaer. Videokameraet var forbundet til PC. Selve registreringen af bevægelsesadfærden hos forsøgsdyrene blev udført via videosporingssystemet EthoVision Pro (Noldus Information Technology, Holland). Systemet er udviklet og valideret i tre tidligere MST-finansierede pesticidforskningsprojekter (Nørum & Bjerregaard 2003, Nørum et al. 2006, Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Systemet muliggør en kvantificering af dyrenes bevægelsesmønstre ved vektorregning og nedbrydning i en række adfærdsparametre, så som tilbagelagt afstand, gennemsnitshastighed i bevægelse, andel af henholdsvis svømmeadfærd-kravleadfærd-inaktivitet, etc. Vi anvendte alene tilbagelagt afstand som adfærdsparameter, idet denne ved tidligere forsøg har vist sig enklest at håndtere.

Arenaerne blev belyst ved hjælp af lysstofrør, overtrukket med mat plastikfolie for at gøre lyset mere diffust og for at undgå reflekser fra vandoverfladen i arenaerne. Desuden anvendtes reflektorer for at fordele lyset så jævnt som muligt over arenaerne.

For at undgå forstyrrelse af forsøgsdyrene før, under og efter eksponeringerne blev bordene med arenaer afskærmet i forhold til resten af kølerummet ved gardiner. Evt. fækalier i arenaerne blev desuden fjernet inden videosporing fandt sted for ikke at forstyrre denne.

De 4 strømkrævende arter blev ikke forsøgt videosporet under eksponeringen.

Der blev ved samtlige forsøg anvendt kunstigt ferskvand (OECD 2004) i arenaerne: CaCl₂·2H₂O (294 mgL⁻¹), MgSO₄·7H₂O (123,25 mgL⁻¹), NaHCO₃ (mgL⁻¹), KCL (mgL⁻¹), opløst i 1 L omvendt-osmose vand.

3.3.3 Forsøgsprocedure

Forsøgsdyrene blev som nævnt akklimatiseret i forsøgsrummet 1-3 dage før det enkelte forsøg (dag -2 til -4). På dag -1 blev arenaerne (type 1) placeret på forsøgsbordene (A og B) og fyldt med 60 mL ukontamineret (uden pyrethroid) kunstigt vand i hver arena. For 30 af de 34 testede arter blev der herefter placeret ét forsøgsdyr i hver arena. For de resterende 4 strømkrævende arter, blev der supplerende opstillet 5 x 5 type 2 arenaer (petriskåle) og hver af disse tilsat 60 mL ukontamineret (uden pyrethroid) kunstigt vand. Dernæst overførtes 5 individer til hver arena, det øvre låg påsat, og tilsluttet luft.

Dyr som virkede markant sløve i arenaerne blev udskiftet umiddelbart.

Dag 0, hvor forsøgsdyrene skulle eksponeres for pyrethroid, blev bemærkelsesværdigt inaktive individer indledningsvis udskiftet, med mindre dette var tilfældet for stort set samtlige individer, og vurderet at være udtryk for deres normale adfærd. Herefter blev videosystemet indstillet med hensyn til tidlig opløsning, optimering af registreringen af emnet m.v. Derefter blev der – for de 30 arter som permanent kunne holdes i type 1 arenaerne – søgt udført videosporing af baggrundsadfærden over 30 minutter. Registrering af baggrundsadfærd blev først udført 24 timer efter at dyrene var placeret i arenaerne, fordi adfærden typisk vil være unormalt stor som følge af stress hos forsøgsdyrene umiddelbart efter at de var introduceret i arenaerne. For omkring af halvdelen af arterne var det ikke muligt at opnå meningsfulde registreringer af bevægelsesadfærd, enten fordi dyrene slet ikke bevægede sig, eller fordi de var for små og/eller lyse til at kunne registreres tilfredsstillende af kameraet (se tabel 3.1). Disse blev derfor ikke efterfølgende søgt videosporet.

Individer fra type 2 arenaerne blev inden eksponering overført til de opsatte type 1 arenaer. Eftersom der var i alt 125 individer til fordeling på kun 99 arenaer, var det nødvendigt at anbringe 2 individer i nogle af arenaerne (i de to første af de i alt 23 kontrolarenaer, og i de 6 første af hver af øvrige grupper af arenaer). Dyrene blev dog som nævnte ikke videosporet, fordi dette ikke vurderedes adfærdsmæssigt meningsfuldt (fordi de blev overført til "ugæstfrit" miljø).

Proceduren for eksponeringen var som følger: Mindre end 14 dage før eksponeringen blev der fremstillet en stamopløsning (stock A) af lambda-cyhalothrin ((SIGMA-ALDRICH, produkt nr. 31058)). Denne stamopløsning (36 mg lambda-cyhalothrin opløst i 50 mL 96% ethanol: 72000 ng mL⁻¹) blev opbevaret mørkt (indpakket i stanniol) og ved 4°C indtil brug. Senest 2 timer inden eksponeringen blev der fremstillet fortyndede stamopløsninger af stock A, hhv. en stock B (10 mL = 1,389 mL Stock A + 8,611 mL 96% ethanol) og en stock C (10 mL = 0,100 mL stock B + 9,900 mL 96% ethanol). Ud fra stock B og C blev der fremstillet voluminer af 10 mL med koncentrationer af lambda-cyhalothrin, således at når disse voluminer blev tilsat arenaerne opnåedes de ønskede nominelle koncentrationer af pyrethroidet. Desuden blev der tilsat ethanol til en slutkoncentration i arenaerne på 0,01%. Formålet med tilsætningen af ethanol under hele fortyndingsproceduren var at holde pyrethroidet i opløsning. De fremstillede 10 mL fortyndinger blev overført til 20 mL polyethylen vials (Perkin Elmer, Low Diffusion PE vials), således at der ved tilsætning til vandvoluminerne i arenaerne opnåedes de ønskede nominelle koncentrationer. Der blev til kontrollerne tilsat (også 10 mL) kunstigt vand med samme mængde ethanol, som blev brugt ved fremstillingen af pyrethroid opløsningerne. Efter tilsætningen opnåedes således et samlet volumen i hver arena på 70 mL. Selve eksponeringerne blev i praksis udført ved at tømme vials med 10 mL opløsningerne ned i 11 arenaer ad gangen (altså rækkevis); dette blev gjort via "vipning" af de 11 plastik vials med de respektive koncentrationer fastgjort med elastikker til en passende lang træstok, og med indbyrdes "arenaafstand". Tømningen sikrede ensartet opblanding af opløsningerne i arenavæskan. Tilsætningen af pyrethroid (og vand + ethanol i kontrollerne) tog højst 3-4 minutter. Forsøgsdyrene blev herefter eksponeret i 90 minutter, hvorunder de blev

videosporet. Efter denne eksponeringsperiode blev hver arena fjernet fra bordet, arenaens indhold (væske og forsøgsdyr) hældt igennem en lille sigte og tragt, og væsken opsamlet i forskyllet (rengjort) brun 1 L glasflaske. Væsken fra arenaer med samme behandling og art af forsøgsdyr blev opsamlet i samme flaske til efterfølgende kemisk analyse. Forsøgsdyret blev herefter skyllet i tre successive bade med rent vand (ved at dyppe sigten med dyret i badene), inden det endelig (efter fjernelse af overskydende væske fra sigten på sugende papir) blev overført til en ny arena med 70 mL rent kunstigt vand (placeret på et rullebord). Skylningsproceduren startede for dyr eksponeret over for den højeste koncentration og afsluttedes med dyr fra kontrolgruppen. Herved blev der sikret den bedst muligt balance mellem koncentration og faktisk eksponeringstid (hvor sidst nævnte altså ikke var ens for de enkelte koncentrationer). Hele skylningsproceduren blev gennemført inden for højst 45 minutter. De ny arenaer blev herefter placeret på videosporsbordet, således de enkelte forsøgsdyr var anbragt i præcis samme position som før og under eksponeringen. For de 4 strømkrævende arter blev individerne dog placeret i samme arena (type 2 = petriskåle), hvor de oprindeligt havde opholdt sig.

På dag 1, 2, 3 og 6 efter eksponeringen blev forsøgsdyrene (omkring ½ delen af arterne) videosporet i 30 minutter. Desuden blev det noteret om forsøgsdyrene var døde, immobiliserede eller udviste afvigende adfærd i forhold til kontrolindividerne. Disse såkaldte "end-points" kunne for visse arter være vanskelige at bestemme, fx hvor der var tale om værluer med bærbare hus, i hvilke larverne trak sig tilbage og forholdt sig inaktive over længere perioder, eller for muslinger som holdt deres skaller permanent lukkede. Problemet blev delvist løst ved at placere individerne i et bestemt hjørne af arenaen og så ved næste "aflæsning" se, om de havde flyttet sig fra udgangspunktet. Desuden var det nødvendigt at "pirke" forsigtigt til tilsyneladende døde individer for at se, om der stadig var liv i dem. Døde dyr blev opsamlet og konserveret i glas med 80 % ethanol. Fjernelse af et dødt dyr fra en arena blev registreret ved ilægning af farvet plastikperle (én farve for den givne dag).

Efter hvert afsluttet forsøg blev samtlige overlevende individer konserveret i 80% ethanol (i polyethylen vials: hver art/taxon for sig, hver anvendt koncentration for sig).

3.3.4 Biologiske karakteristika

De enkelte arters følsomhed over for den anvendte pyrethroid blev ikke blot vurderet i forhold til deres "generelle miljøfølsomhed" i Dansk Vandløbsfaunaindeks. Pyrethroid følsomheden blev også undersøgt i forhold til en række af arternes biologiske egenskaber (på engelsk "biological traits"). Der blev her fokuseret på egenskaber, som enten direkte kunne forklare forskelle i følsomhed mellem de undersøgte arter (som dyrenes taksonomiske/fysiologiske placering i dyreriget, eller deres aktuelle størrelse), eller som beskriver i hvilken grad arterne skønnedes at være i risiko for at blive påvirket af tilførsel af pyrethroid i vandløbene, og hvilket potentiale arterne har for at rekolonisere efter overstået påvirkning.

Efter at forsøgene var afsluttet, blev forsøgsdyrenes størrelse målt/estimeret mht. dels vægt, dels overfladeareal. Målingerne blev altså foretaget på ethanol-fikserede individer. Der blev kun foretaget målinger af krebsdyr og insekter, fordi der ikke blev fundet effekt på andre grupper ved selv den højest anvendte pyrethroid koncentration. Indledningsvis blev der - under stereolup forsynet med måleokular - målt længde, bredde og højde af hvert individ inden for gruppen af kontrol dyr (23-25 individer afhængigt af typen af arena). Længden blev målt fra pandespids til spids af dyrenes bagende (dvs. at antenner og cerci ikke indgik i målingerne). Bredde og højde blev målt på dyrenes bredeste/højeste sted. Længder, bredder og højder blev omsat til overfladearealer ud fra egnede geometriske formler (cylindre, ellipsoider, sfæroider osv.). Disse overfladearealer blev herefter justeret med en variabel faktor for at tage højde for supplerende overflader i form af antenner, cerci, gælleblade o. lign. (anvendt korrektionsfaktor: 1,1-1,25). Vægten af hvert forsøgsdyr blev bestemt som tørvægt (efter tørring ved 103°C i 4 timer). Indledningsvist blev vægten af en mini-aluminium vejebåd bestemt, forsøgsdyret placeret i vejebåden, som herefter blev sat til

tørring, hvorefter der på ny blev foretaget vejning efter afkøling i en eksikator med aktiv silakagel. Til vejningen blev anvendt elektrobalancevægt (Sartorius, model Genius) med en nøjagtighed på 0,01 mg. For de mindste arter blev der foretages vejning af 5 individer ad gangen.

De øvrige biologiske "traits" af potentiel betydning for tolkningen af de opnåede toksicitetsresultater blev primært indhentet fra følgende tilgængelige databaser:

- "French Invertebrate Traits Database" (Tachet H., Bournaud M., Richoux P. & Usseglio-Polatera P. (2010) - Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie. CNRS Editions, Paris, 600 pp.)
- "The Taxa and Autecological Database for Freshwater Organisms" som er EU-projekt støttet (<http://www.freshwaterecology.info/>).

Trait data omfattede: varighed af livscyklus, antal livscyklus/år, forekomst af akvatiske stadier, formeringsmåde, spredningsmåde, respirationsmåde, bevægelsesmåde, føde, fødesøgningsmetode, substrat præference, strømhastigheds præference, tilstedeværelse i vandløbet under sprøjtesæsonen, spredningsevne over land, antal unger/æg. Der blev foretaget en kritisk evaluering af de enkelte trait-værdier, ligesom der blev suppleret med data fra andre kilder (fx originalartikler), specielt mht. antal æg/unger.

Trait data blev anvendt til udvikling af et antal parametre til beskrivelse af dels den grad af eksponering for pyrethroider, som arterne vurderes at være udsat for i vandløbene, dels deres potentiale for at rekolonisere pyrethroid påvirkede vandløbsstrækninger, efter at påvirkningen er ophørt. Parametrene omfattede følgende:

- Tilstedeværelse i vandløbene under sprøjtesæsonen (slutningen af maj til slutningen af juni) – som nymfer, larver, pupper eller voksne. Der er anvendt en 3-trins skala: (1) lille del af bestanden til stede, (2) væsentlig del af bestanden tilstede, (3) næsten hele bestanden til stede.
- Habitatfølsomhed - ud fra det rationale at dyr som fx lever på strømekspunerede flader vil være mere sårbare over for pyrethroidpåvirkning end de som lever nedgravet i bunden. Der blev anvendt en 4-trins skala: (1) i mudderbund, (2) i sandbund/mellem groft detritus (organisk stof), (3) i grus/på makrofyter (vandplanter), (4) på sten/dødt ved.
- Strømfølsomhed – dyr som udsættes for høj strømhastighed vil lettere transporteres bort med strømmen end dyr, som lever på steder hvor strømhastigheden er lille. Der blev anvendt en 4-trins skala: (1) ingen strøm, (2) langsom strøm, (3) moderat strøm, (4) hurtig strøm.
- Habitatsponering = habitatfølsomhed + strømfølsomhed. Scorerne for hver af de to variable er adderet. Der vil ofte være en nær sammenhæng mellem de to variable, betinget af den direkte positive sammenhæng mellem kornstørrelse og strømhastighed, men selvom en del arter lever på sten, vil de typisk opholde sig steder, hvor strømmen ikke er for voldsom (fx på undersiden af stenene eller i strækker imellem disse).
- Potentiel eksponering = Tilstedeværelse i sprøjtesæsonen * Habitatsponering
- Antal æg/unger pr. kuld – anvendt skala: (1) < 50, (2) 50-500, (3) > 500.
- Antal kuld pr. år – anvendt skala: (1) 1, (2) 2, (3) > 2.
- Yngelpleje (føder levende unger) – anvendt skala: (0) ingen, (3) til stede.
- Samlet formeringspotentiale = (antal æg/unger pr. kuld * antal kuld pr. år) + yngelpleje. Rationalet bag addition af score for yngelpleje er, at denne kompenserer for et mindre antal afkom (levende fødende arter får relativt mindre antal afkom end æglæggende arter).
- Spredningsevne over land. Anvendt 4-trins skala: (0) ingen spredning ved egen hjælp (ikke-insekter), (1) ringe spredningsevne, (2) moderat spredningsevne, (3) stor spredningsevne. Ved vurderingen af de enkelte arters potentielle spredningsevne er bl.a. anvendt resultater fra Wiberg-Larsen & Nørum 2009.

- Spredningsevne i vandløbet – delvist ved kravlen/svømning, delvist ved transport med strømmen. Anvendt 3-trins skala: (1) meget lidt mobile, (2) ret mobile, (3) meget mobile (svømmende arter).
- Samlet spredningsevne = (Spredningsevne over land * 2) + spredningsevne i vandløbet. Luftbåren spredning er vægtet højere end spredning inden for vandløbet, fordi denne muliggør spredning over større afstande og mellem vandsystemer, også selvom spredningen vil være stokastisk i tid og rum.
- Potentiel rekoloniseringsevne = Samlet formeringspotentiale + samlet spredningsevne.

3.4 Kvantificering af lambda-cyhalothrin

De aktuelle koncentrationer af lambda-cyhalothrin blev efter endt eksponering bestemt ved 25 af de i alt 34 enkeltforsøg. Årsagen til at der ikke blev udført analyser ved samtlige forsøg var, at økonomien i projektet ikke rakte hertil. Som beskrevet ovenfor blev vandet fra arenaer med samme behandling opsamlet i brune 1 L glasflasker (fyldt helt op). Disse blev placeret i kølekasser med frostelementer og inden for højst 2½ time transporteret til Biologisk Institut, Syddansk Universitet, hvor de blev anbragt mørkt i kølerum. Dagen efter blev der foretaget ekstraktion (se nedenfor) af pyrethroidet med henblik på efterfølgende analyse.

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

Før ekstraktion blev der til en afmålt vandprøve indeholdende lambda-cyhalothrin tilsat en kendt mængde esfenvalerat som intern pyrethroidstandard.

Ekstraktion af lambda-cyhalothrin fra vandprøven blev foretaget på en C18-søjle (Sep Pak Vac, 6 cc, 1 g, C18 cartridges, fra Waters). Søjlen blev konditioneret med 5 mL methanol og vasket med 5 mL Milli-Q vand. Prøven påsattes søjlen ved 20 kPa vakuum, svarende til ca. 3 mL min⁻¹. Dernæst blev søjlen vasket med 5 mL Milli-Q vand og tørret i 1-2 minutter ved 30-40 kPa vakuum. Pesticidet elueredes med 4 mL methanol. Eluatet blev inddampet efterfølgende til tørhed under luftstrøm og genopløses i 0,300 mL 75% methanol.

Analyse for pyrethroider blev udført ved anvendelse af et Hewlett Packard LC-MSD-system, bestående 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 anvendtes en HPLC-kolonne (C18, 150×2,1 mm, Phenomenex fra Subware) med forkolonne af samme materiale. Der anvendtes et væskeflow på 0,4 mL min⁻¹, en injektion af 50 µL prøve, og en kolonnetemperatur på 25 °C. Følgende LC solventer blev brugt: Eluent A: 10 mM ammoniumacetat:methanol, 990:10 (v:v). Eluent B: 10 mM ammoniumacetat:methanol, 10:90 (v:v). Der elueredes med følgende gradient (Tid, % B): (0 min, 75%); (3 min, 100%); (14 min, 100%); (14,1 min, 75%); postrun-tid: 6 min, 25% B. Massespektrometer-opsætning: Mode: ESI positiv (SIM: m/z 467 for lambda-cyhalothrin). Der blev benyttet intern standardisering med esfenvalerat (SIM: m/z 437). Drying gas temperature: 350 °C. Drying gas flow: 10 L min⁻¹. Nebulizer pressure: 30 psig. Capillary voltage: 3500 V. Fragmentor: 50 V. Standardkurven beregnes ud fra standarderne: 0,7; 3,5; 35,0; 70,0 og 350 ng mL⁻¹ injiceret standard. Lambda-cyhalothrin og esfenvalerat elueredes efter henholdsvis 7,4 min og 8,0 min.

Samtlige måleresultater blev efterfølgende korrigeret for genfinding. Det var muligt at analysere med en detektionsgrænse på 5 ngL⁻¹.

3.5 Statistiske metoder m.v.

Data for hhv. dødelighed og immobilitet/adfærdsændring (visuelt vurderet og evt. dødelighed indregnet) blev afbildet grafisk (i %) som funktion af koncentrationen af lambda-cyhalothrin (på logaritmisk skala) for hhv. dag 1, 2, 3 og 6 dage efter eksponeringen. Ud fra disse kurver, som generelt havde det forventede sigmoid-lignende forløb (Weibull funktioner), blev koncentrationen ved hvilken 50 % af individerne var hhv. døde og påvirkede/døde aflæst grafisk, frem for at udføre en egentlig regression på data og matematisk beregning af LC_{50} eller EC_{50} . Rationalet bag denne fremgangsmåde er, at nøjagtigheden ved en grafisk aflæsning vurderedes tilstrækkelig som grundlag for en rangordning af de enkelte arters følsomhed. Beslutningen skal også ses i sammenhæng med, at det under alle omstændigheder ikke er muligt at opstille en grafisk afbildning af sammenhængen mellem koncentration og respons for videosporingsforsøgene til beregning af en EC_{50} -værdi.

Data fra videosporingen blev testet for forskelle i adfærd mellem de enkelte koncentrationer hhv. før, under og efter eksponeringen. Adfærden i de enkelte perioder (før eksponering, under eksponering, dag 1, dag 2, dag 3 og dag 6) blev herved analyseret separat. Der blev anvendt tovejs "repeated measures" ANOVA efterfulgt af multiple parvise sammenligninger, herunder parrede t -test, til analyse af forskelle i bevægelsesadfærd. Om nødvendigt blev data transformeret ($\log x+1$) før analyserne for at opnå normalfordeling og varianshomogenitet. Analyserne blev udført i SigmaPlot og SAS Enterprise Guide 4.3.

Ud fra de målte "end points" (mortalitet, visuelt bedømt adfærdsændring, tilbagelagt afstand ved videosporing) blev der foretaget en fastlæggelse af den laveste koncentration, ved hvilken der blev konstateret en effekt i forhold til kontrolgruppen. Denne parameter er benævnt "laveste kritiske effektkoncentration" ($LEC_{kritisk}$). Effekten omfattede således - ud over dødelighed - hyperaktivitet, nedsat aktivitet og anden markant ændret adfærd. Det blev i den forbindelse vurderet principielt uden betydning, på hvilken dag i forsøgsforløbet (alle forsøg kørt over 6 dage) denne effekt blev påvist, idet der dog også blev lagt vægt på, om dyrene var i stand til at komme sig - og i givet fald hvor meget - efter at de var blevet eksponeret for pyrethroid. Generelt blev der lagt mere vægt på forekomst af hyperaktivitet over kort tid end nedsat aktivitet over længere tid. Rationalet er, at hyperaktivitet under naturlige forhold i et vandløb vil resultere i en øget drift, hvorved dyrene transporteres bort med strømmen fra en pyrethroidpåvirket strækning, og derved bl.a. er i stor risiko for at blive spist af fisk eller gå til grunde på anden vis. Nedsat aktivitet over fx 1-3 dage, men hvor dyrene efterfølgende kommer sig, kan naturligvis betyde en øget risiko for at blive spist af rovdyr (fx makroinvertebrater som måtte være intolerante over for pyrethroidet), men er altså vægtet lavere end en akut effekt under selve eksponeringen.

For statistisk at kunne sammenligne effekter i form af dødelighed, visuelt bedømte adfærdsændringer og adfærdsændringer målt som tilbagelagt afstand blev de fundne effektkoncentrationer rangordnet. Rangordningen blev foretaget på baggrund af tabel 3.2. $LEC_{kritisk}$ er herved anvendt ved en endelig, samlet rangordning af de testede arters/taxas følsomhed. Denne rangordnede følsomhed er benævnt "kritisk følsomhed", og det er denne som er benyttet ved test af DVFI's egnethed som pyrethroidindikator eller af forholdet mellem pyrethroidfølsomhed og biologiske karakteristika (se nedenfor).

Sammenhænge mellem effektkoncentrationer (rangordnede værdier) og arternes biologiske karakteristika, herunder de opstillede parametre (metrics) til beskrivelse grad af potentiel eksponering eller rekoloniseringspotentialer, blev generelt testet ved brug af Spearman Rank korrelation. Samme test blev udført for sammenhæng mellem følsomhed i DVFI (nøglegruppe indgang) og følsomhed over for pyrethroidet. Forskel i følsomhed over for pyrethroid mellem positive og negative grupper i DVFI blev testet ved brug af Mann-Whitney U-test, og forskel i følsomhed i forhold til fødetype testet ved brug af Kruskal-Wallis test. Forskelle i

pyrethroidfølsomhed mellem forskellige end points blev testet ved brug af Wilcoxon Signed Ranks test.

Der blev i alle tests anvendt en acceptgrænse på 5% ($\alpha = 0,05$).

Forskelle i følsomhed/tolerance over for lambda-cyhalothrin blandt de testede arter (i praksis kun leddyrene) blev undersøgt ved beregning af såkaldt "Species Sensitivity Distribution" (SSD). Herved blev arternes hhv. EC50 og LC50 værdier plottet i rangordnet rækkefølge langs både x- (de aktuelle koncentrationer) og y-aksen (den akkumulerede %). Der henvises til fx Posthuma et al. (2001) og van Straalen (2002).

Skala:	Effektconcentration af lambda-cyhalothrin (ngL ⁻¹):
1	< 50
2	50-150
3	150-500
4	500-2000
5	2000-5000
6	5000-10 000
7	>10 000

FIGUR 3.2
KONCENTRATIONSINTERVALLER AF LAMBDA-CYALOTHRIN ANVENDT VED RANGORDNING AF FØLSOMHEDEN/TOLERANCEN HOS DE TESTEDE MAKROINVERTEBRATER. DER BLEV ANVENDT SAMME RANGORDNING FOR DØDELIGHED, VISUELT VURDEREDE ADFÆRDSÆNDRINGER OG ÆNDRINGER I TILBAGELAGT AFSTAND M.V.

4. Resultater

4.1 Eksponeringsscenarierne: nominelle vs. målte koncentrationer af lambda-cyhalothrin

Efter pulseksponeringerne i arenaerne med forsøgsdyr blev der generelt målt koncentrationer af lambda-cyhalothrin, som var væsentlig mindre end de nominelle (Tabel 4.1). I gennemsnit blev der for de nominelle koncentrationer 100, 1000 og 10 000 ngL⁻¹ målt 30% af disse. For 10 ngL⁻¹ var der tilsyneladende intet tab. Der var dog betydelig variation fra forsøg til forsøg, ligesom der i omkring halvdelen af forsøgene blev målt indhold af pyrethroidet i kontrolprøverne. For analyserne som helhed var der - på trods denne variation – stort set den forventede faktor 10 i forskel mellem de nominelle koncentrationer.

Der blev foretaget kontrol af koncentrationen af de anvendte stamopløsninger (stock A). Der blev dog ikke fundet betydende afvigelser fra de nominelle værdier.

TABEL 4-1

MÅLTE KONCENTRATIONER AF LAMBDA-CYHALOTHRIN I VANDET FRA TEST-ARENAERNE EFTER ENDT EKSPONERING OVER 90 MINUTTER. MIDDELVÆRDI I KONTROLPRØVERNE ER SAT TIL 0 TRODS (FEJLAGTIGE) FUND AF STOFFET I CA. ½ DELEN AF PRØVERNE (RANGE (1-55 NG L-1)).

Nominelle/målte koncentrationer (ngL ⁻¹)					
Nominelle koncentrationer	0	10	100	1000	10 000
Middelværdi	"0"	11,5	31,9	216	3540
Standard afvigelse (S.D.)	-	14,6	45,5	207	3130
Standard Error (S.E.)	-	2,9	9,1	41	627
Median	1,7	9,3	22,5	158	2430

4.2 Forsøgsbetingelser, de enkelte arters egnethed som forsøgsdyr, samt registrering af end points

De testede arter (i alt 34) var generelt i stand til at overleve i de to valgte typer af arenaer uden uacceptabel stor dødelighed eller tegn på mistrivsel hos kontrolgruppen. Således varierede dødeligheden ved forsøgenes afslutning for 31 af de undersøgte arter mellem 0 og 16%. Hos hele 21 arter forekom der ingen dødelighed overhovedet. Der blev kun fundet markant overdødelighed (30-48%) hos Tubificidae, *Odagmia ornata*, *Chironomus luridus* agg. og *Micropsectra*. Hos *Odagmia ornata* var årsagen, at lufttilførslen til netop kontrolgruppen svigtede mellem dag 3 og 6. Indtil dag 3 var dødeligheden kun 4%. For *Micropsectra* var dødeligheden i kontrolgruppen så betydelig (40% på dagen efter eksponeringen stigende til 70% ved forsøgets afslutning), at data for denne art helt blev udeladt i de udførte dataanalyser.

Det var muligt at foretage succesfuld videosporing af tilbagelagt afstand for 16 af de i alt 34 arter. Resten af de arter, som potentielt kunne videospores (dvs. blev holdt permanent i plastikvejebådene = arena type 1), var enten for små og/eller lyse i forhold til arenaerne (*Leuctra fusca*, *Oreodytes sanmarkii*, *Conchapelopia menalops*, *Tvetenia sp.*, *Prodiamesa olivacea*), eller bevægede sig ikke tilstrækkeligt til, at de rent teknisk kunne spores (*Tubificidae*, *Helobdella stagnalis*, *Erpobdella*

octoculata, *Elodes minuta*, *Ptychoptera paludosa*, *Chironomus luridus* agg., *Eristalis* sp. og *Sphaerium corneum*). Endelig kunne kontrolgruppen i forsøget med *Beraeodes minutus* ikke videospores, selvom de bevægede sig tilfredsstillende, fordi belsningen af denne del af arenaerne ikke var optimal samtidig med at individerne var små.

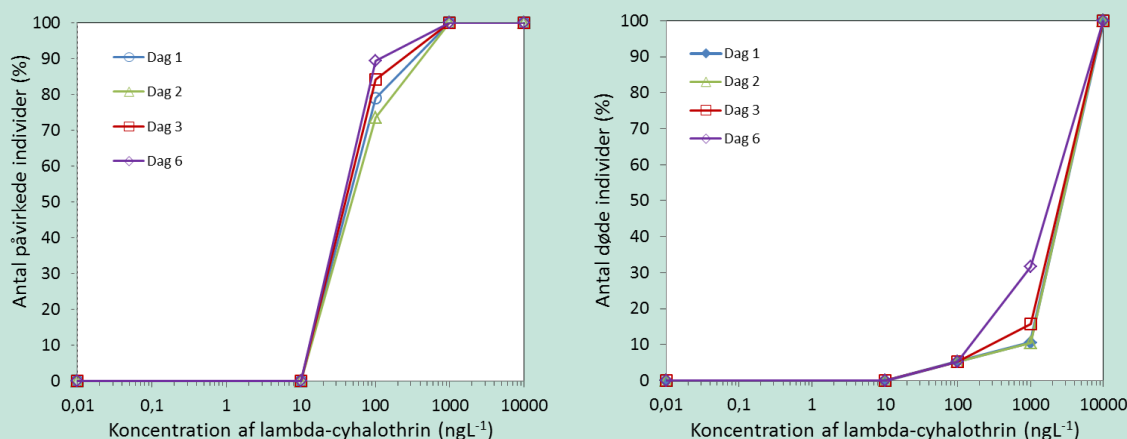
Det viste sig relativt enkelt at registrere dødeligheden hos samtlige arter, ligesom det var muligt meningsfuldt at beskrive deres almene tilstand (adfærd). Enkelte arter var dog generelt ret "dvaske" eller passive, således at det var nødvendigt nøje at se efter "tegn på liv" (*Erpobdella octoculata*, *Elodes minuta*, *Ptychoptera paludosa*). Det krævede fx en relativt grundig undersøgelse at afgøre, om individer af *Sialis lutaria* var døde eller bare stærkt påvirkede og immobile.

Hos enkelte arter (*Radix balthica* og *Elodes minuta*) undveg (eller søgte at undvige) en del af individerne fra arenaerne. Hos *Radix balthica* blev dette imødegået ved at placere en glasplade over arenaerne før og efter eksponeringen, samt mellem de enkelte videosporinger på dag 1, 2, 3 og 6. Der var ingen indikationer på, at undvigelse var relateret til de aktuelle eksponeringer med pyrethroid. Hos *Elodes minuta*, som naturligt søger regelmæssigt til vandoverfladen for at ånde (via spirakelåbninger i dyrets bagende) og derfor typisk opholder sig tæt på denne, havde ca. 20 af individerne forladt arenaerne ved forsøgets afslutning. Der var imidlertid ingen væsentlig (signifikant) forskel i andelen af undvegne individer mellem behandlingerne, bortset fra den med 10 000 ngL⁻¹, hvor ingen individer var bortløbet og de alle var stærkt påvirkede og døde ved forsøgets afslutning.

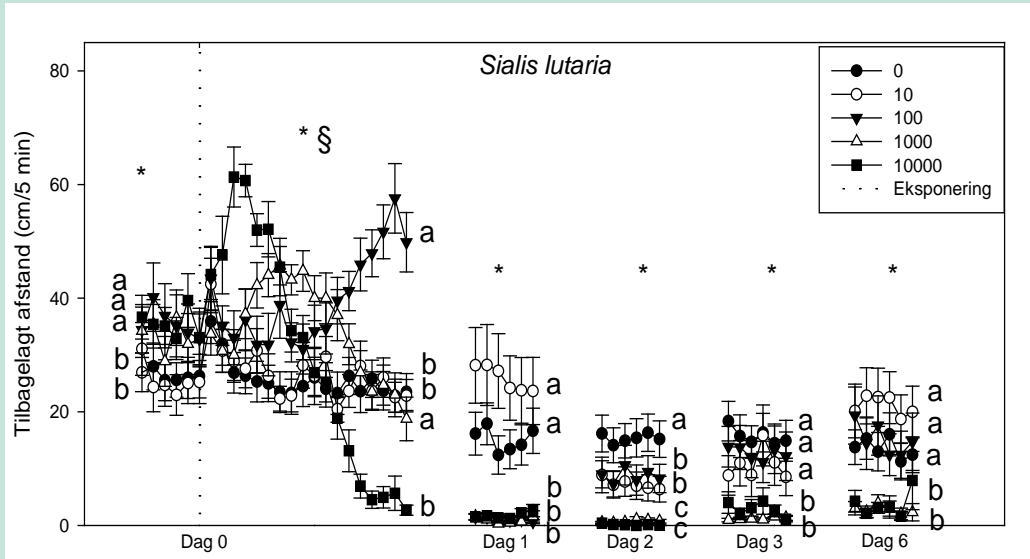
4.3 Bevægelsesadfærd, almentilstand og dødelighed

Der blev for samtlige arter beregnet LC₅₀ (koncentrationer, ved hvilke 50% af individerne var døde) og EC₅₀ (koncentrationer, ved hvilke 50% af individerne visuelt vurderet var markant adfærdsmæssigt påvirkede - eller døde). Disse værdier blev beregnet separat for dag 1, 2, 3 og 6. Ligeledes blev der, for 16 arter, bestemt de koncentrationer, ved hvilke dyrenes bevægelsesadfærd (tilbagelagt afstand over tid) var signifikant forskellig fra kontroldyrenes. Også denne parameter blev bestemt på dag 1, 2, 3 og 6, og derudover under selve eksponeringen med lambda-cyhalothrin.

Den bestemte værdier er resumeret i tabel 4.2. Eksempler på de resultater, som ligger til grund for tabel 4.1 er vist i figur 4.1 -4.2.



FIGUR 4.1
 KONCENTRATION – RESPONS KURVER FOR HHV. GRAD AF PÅVIRKNING, DVS. VISUELT BEDØMT ADFÆRDSÆNDRINGER & DØDELIGHED (TV) OG DØDELIGHED (TH) HOS PTYCHOPTERA PALUDOSA (DIPTERA) – UDSAT FOR STIGENDE KONCENTRATIONER AF LAMBDA-CYHALOTHRIN. FOR KONTROLGRUPPEN ER 0 VÆRDIEN SAT TIL 0,01.



FIGUR 4.2
 EFFEKT AF LAMBDA-CYHALOTHRIN PÅ TILBAGELAGT AFSTAND (GENNEMSNIT ± SEM) HOS SIALIS LUTARIA. BAGGRUNDSADFÆRDEN I UKONTAMINERET VAND BLEV OBSERVERET I 30 MIN, ADFÆRDEN I KONTAMINERET VAND BLEV REGISTERET I 90 MIN OG ADFÆRDEN UNDER RESTITUTIONSPERIODEN BLEV REGISTERET I 30 MIN PER DAG. * INDIKERER SIGNIFIKANTE FORSKELLE BEHANDLINGERNE IMELLEM OG A, B, C, D ANGIVER HVILKE BEHANDLINGER DER VAR SIGNIFIKANT FORSKELLIGE. § INDIKERER EN SIGNIFIKANT INTERAKTION UD FRA DE UDFØRTE TO-VEJS REPEATED ANOVA TESTS OG HENTYDER TIL SIGNIFIKANT FORSKELLIGE KURVEFORLØB AF GRUPPERNE I LØBET AF EKSPONERINGSPERIODEN.

Helt overordnet var der ingen påviselige effekter af de valgte koncentrationer af lambda-cyhalothrin på arter/familier tilhørende grupper af ikke-leddyr (fimreorme, børsteorme, snegle og muslinger), hverken under eller efter eksponeringen, og hverken med hensyn til adfærdsændringer eller dødelighed (Tabel 4.2).



MOSE SNEGLEN RADIX BALTHICA ER FULDSTÆNDIG UPÅVIRKET AF SELV MEGET HØJE KONCENTRATIONER AF LAMBDA-CYHALOTHRIN. SNEGLEN LEVER AF AT GRÆSSE ALGER, SOM SIDDER PÅ BUND OG VANDPLANTER (FOTO: BIOPIX/J.CHR. SCHOU).

TABEL 4-2

EFFEKT-KONCENTRATIONER SOM FØLGE AF PULSEKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHRIN FOR 34 ARTER AF MAKROINVERTEBRATER. EFFEKTERNE OMFATTER (1) TILBAGELAGT AFSTAND MÅLT I FORBINDELSE MED VIDEOSPORING, (2) VISUELT BEDØMTE ADFÆRDSÆNDRINGER/DØDELIGHED OG (3) DØDELIGHED. H – HYPERAKTIVITET; N – NEDSAT AKTIVITET; INGEN- INGEN ÆNDRING I TILBAGELAGT AFSTAND; I – INGEN UDVIKLING I ADFÆRD/DØDELIGHED IGennem FORSØGSPERIODEN; F – FORVÆRRING I DYRENES TILSTAND IGennem FORSØGSPERIODEN; R – FORBEDRING (RECOVERY) I DYRENES TILSTAND IGennem FORSØGSPERIODEN. SIGNATUREN # ANGIVER, AT DET IKKE VAR MULIGT AT OPNÅ RESULTATER (ELLER I ET PAR TILFÆLDE AT MÅLINGER IKKE BLEV GENNEMFØRT). KONCENTRATIONER MÆRKET MED RØD SKRIFT ANGIVER DEN LAVESTE EFFEKT-KONCENTRATION. DISSE VÆRDIER ER ANVENDT TIL RANGORDNING AF DE ENKELTE ORGANISMERES KRITISKE FØLSOMHED.

	Effekt-koncentration for tilbagelagt afstand (ngL-1)					Effekt-koncentration for adfærd / dødelighed (ngL-1)				Effekt-koncentration for dødelighed (ngL-1)				Udvikling i effekt-koncentration
	Under eksponering	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 6	EC50 dag 1	EC50 dag 2	EC50 dag 3	EC50 dag 6	LC50 dag 1	LC50 dag 2	LC50 dag 3	LC50 dag 6	
<i>Dugesia gonocephala</i>	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
Tubificidae	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Helobdella stagnalis</i>	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Erpobdella octoculata</i>	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Gammarus pulex</i>	10 H	?	?	?	?	200	300	300	400	2000	800	600	400	I
<i>Asellus aquaticus</i>	100 H	10000 N	10000 N	10000 N	100 N	2000	1000	1000	2000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Protonemura meyeri</i>	10 H	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Nemoura cinerea</i>	100 H	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	9000	9000	9000	400	9000	9000	9000	400	F

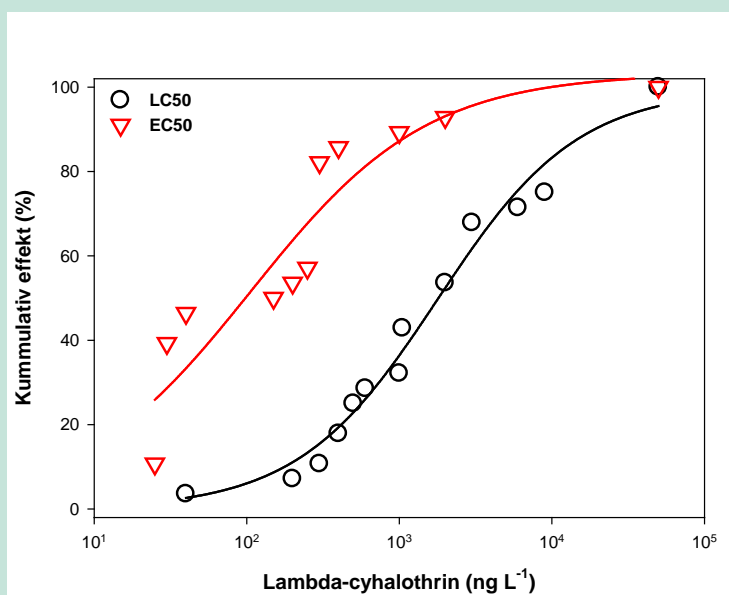
	Effekt-koncentration for tilbagelagt afstand (ngL-1)					Effekt-koncentration for adfærd / dødelighed (ngL-1)				Effekt-koncentration for dødelighed (ngL-1)				Udvikling i effekt-koncentration
	Under eksponering	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 6	EC50	EC50	EC50	EC50	LC50	LC50	LC50	LC50	

	nering					dag 1	dag 2	dag 3	dag 6	dag 1	dag2	dag 3	dag 6	
<i>Isoperla grammatica</i>	100 H	10000 N	10000 N	10000 N	1000 N	30	60	15	200	>10000	>1000	>10000	500	R
<i>Leuctra fusca</i>	#	#	#	#	#	300	300	3000	4000	>10000	9000	9000	9000	R
<i>Caenis horaria</i>	100H	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	30	30	200	200	300	300	200	200	R
<i>Cloeon inscriptum</i>	10 H	100	100	100	100	300	300	2000	3000	2000	2000	2000	2000	R
<i>Heptagenia sulphurea</i>	10 H	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	250	150	200	200	>10000	3000	3000	1000	I
<i>Ephemera danica</i>	1000 H	100 N	100 N	100 N	1000 N	30	40	150	800	2000	2000	2000	2000	R
<i>Sialis lutaria</i>	100 H	1000 N	1000 N	1000 M	1000 N	30	30	70	300	>10000	>10000	>10000	>10000	R
<i>Oreodytes sanmarkii</i>	#	#	#	#	#	30	30	300	300	8000	8000	8000	6000	R
<i>Elodes minuta</i>	#	#	#	#	#	300	300	300	400	>10000	>10000	9000	1050	I
<i>Elmis aenea</i>	#	#	#	#	#	400	#	400	300	3000	#	400	300	I
<i>Limnius volckmari</i>	#	#	#	#	#	300	300	300	3000	3000	3000	3000	3000	R
<i>Agapetus fuscipes</i>	#	#	#	#	#	9000	2000	2000	40	9000	2000	2000	40	F
<i>Hydropsyche</i>	10000 N	10000 N	10000 N	10000 N	10000 N	300	300	300	300	>10000	>10000	>10000	>10000	I
	Effektconcentration for tilbagelagt afstand (ngL-1)					Effektconcentration for adfærd/dødelighed (ngL-1)				Effektconcentration for dødelighed (ngL-1)				Udvikling i effektconcentration
	Under eksponering	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 6	EC50 dag 1	EC50 dag 2	EC50 dag 3	EC50 dag 6	LC50 dag 1	LC50 dag2	LC50 dag 3	LC50 dag 6	
<i>Chaetoperyx villosa</i>	1000 H	1000 N	1000 N	1000 N	1000 N	>10000	300	300	250	>10000	>10000	>10000	500	F

<i>Silo pallipes</i>	1000 H	100 N	100 N	100 N	100 N	300	300	50	40	>10000	>10000	3000	1050	F
<i>Beraeodes minutus</i>	#	#	#	#	#	2000	3000	3000	3000	4000	3000	3000	3000	I
<i>Ptychoptera paludosa</i>	#	#	#	#	#	40	40	40	30	2050	2050	2050	2000	I
<i>Dicranota</i>	100 H	Ingen	Ingen	Ingen	Ingen	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Odagmia ornata</i>	#	#	#	#	#	300	400	800	#	4000	1050	1050	#	I
<i>Conchapelopia</i>	#	#	#	#	#	25	#	25	1050	>10000	#	5000	3000	R
<i>Prodiamesa olivacea</i>	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Tvetenis</i>	#	#	#	#	#	30	30	30	40	1050	1000	1000	600	I
<i>Chironomus luridus</i>	#	#	#	#	#	25	25	25	1050	>10000	>10000	5000	3000	R
<i>Eristalis</i>	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Radix balthica</i>	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I
<i>Sphaerium corneum</i>	#	#	#	#	#	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	I

Derimod blev der fundet markante effekter blandt leddyrerne (krebsdyr og insekter). Blandt disse var der dog stor variation i følsomheden fra art til art, hvorimod der tilsyneladende ikke var forskel i følsomhed over for lambda-cyhalothrin fra gruppe til gruppe (Kruskal-Wallis test, $P=0,64$). Afhængigt af valget af end-point varierede følsomheden for alle leddyr under et fra 10 til $> 10\ 000\ \text{ngL}^{-1}$, altså over hele skalaen af testede nominelle koncentrationer. En lige så stor variation blev fundet inden for gruppen af tovinger, endda inden for samme familie (dansemyg).

Variationen i følsomhed/tolerance mellem de testede arter i form af SSD plots var markant forskellig for de to end-points, hhv. visuelt bedømte adfærdsmæssige ændringer og dødelighed, hvor kurveforløbene bedst kunne beskrives ud fra Weibull funktioner (Figur 4.3). Således var følsomheden generelt 10-15 gange større for adfærd sammenlignet med dødelighed.



FIGUR 4.3

SSD PLOT (SPECIES SENSITIVITY DISTRIBUTION) FOR DE TESTEDE ARTER AF LEDDYR (N=28) FOR HHV. VISUELT VURDEREDE ADFÆRDSÆNDRINGER (EC₅₀) OG DØDELIGHED (LC₅₀). PUNKTERNE VISER (FOR Y-AKSENS VEDKOMMENDE) EN KUMULERET PROCENTVIS FORDELING AF EFFEKTVÆRDIERNE FOR DE UNDERSØGTE ARTER MV. SIDSTNÆVNTE EFFEKTVÆRDIER ER DE KONCENTRATIONER, VED HVILKE HALVDELEN AF FØRSGSDYRENE ER PÅVIRKEDE. BEMÆRK AT X-AKSEN ER LOGARITMISK.

Der var stor forskel på i hvilket omfang de enkelte arter var i stand til at komme sig efter eksponeringen med pyrethroid (Figur 4.4). Således viste 38% af arterne "recovery" efter 6 dage, mens 15% fik det værre gennem perioden. Resten viste ingen udvikling i hvor påvirkede de var. Recovery var især udpræget hos døgnfluer og slørvinger, der alle tilhører de såkaldt hemimetabole insekter (dvs. de med ufuldstændig forvandling), mindst blandt tovingerne der ligesom dovenfluer, biller og vårflyer er holometabole (dvs. har fuldstændig forvandling fra ungdoms- til det voksne stadium).

Med en så stor variation i følsomhed i forhold til de valgte testkoncentrationer var det oplagt at rangordne arternes følsomhed ud fra den valgte 7 trins skala. Denne rangordning fremgår af tabel 4.3. Rangordningen omfatter følsomhed under selve eksponeringen (tilbagelagt afstand - for de videosporede arter), adfærd ændringer/dødelighed og dødelighed i perioden 1-6 dage efter eksponering, og en såkaldt "kritisk følsomhed" estimeret på baggrund af samtlige end-points (inklusive drift respons fra tidligere forsøg under Miljøstyrelsens pesticidforskningsprogram). Denne rangordning viste ikke overraskende samme mønster som data i tabel 4.2. For leddyrerne var der systematiske forskelle i følsomhed afhængigt af, om der er tale om adfærd ændringer eller

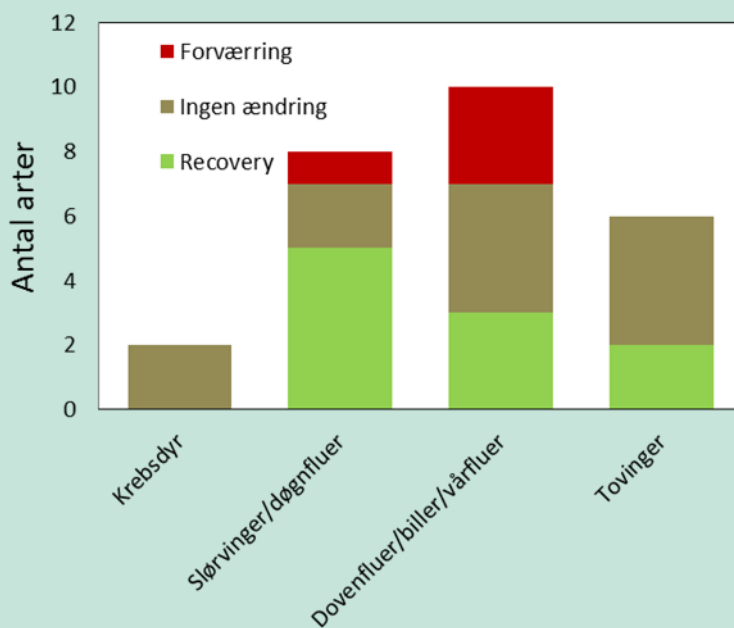
TABEL 4-3

RANGORDNING AF FØLSOMHED OVER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN HOS 34 ARTER AF MAKROINVERTEBRATER UNDER OG EFTER EKSPONERING, HVOR 1 ER MEST FØLSOM OG 7 MEST TOLERANT (SE TABEL 3.2). DESUDEN ANGIVET RANGORDNING AF FØLSOMHEDEN I FORHOLD HVAD DER FORVENTES AT VÆRE MEST KRITISK FOR ARTEN ("KRITISK FØLSOMHED"). FOR SIDSTNÆVNTE ANGIVES BEGRUNDELSEN FOR DEN FORETAGNE VURDERING: AEP – ALLE END POINTS ENS; H – HYPERAKTIVITET UNDER EKSPONERING SVARENDE AT DYRENE VIL GÅ I DRIFT UNDER NATURLIGE FORHOLD; D – FORØGET DRIFT VED 100 NGL-1 (DATA FRA WIBERG-LARSEN ET AL. 2013); NA/RE – NEDSAT AKTIVITET MEN DYRENE KOMMER SIG (RECOVERY); NA/NR – NEDSAT AKTIVITET, MEN DYRENE KOMMER SIG IKKE (INTET RECOVERY). # ANGIVER AT DER IKKE FORELIGGER DATA, FORDI VIDEOSPORING ENTEN IKKE VAR MULIG ELLER GAV MENINGSFULDE RESULTATER.

Art	Gruppe	Mortalitet	Visuel adfærd/mortalitet	Hyperaktivitet under eksponering	"Kritisk følsomhed"
<i>Agapetus fuscipes</i>	Vårflue	1	1	#	1 ^{NA/NR}
<i>Gammarus pulex</i>	Krebsdyr	3	3	1	1 ^H
<i>Cloeon inscriptum</i>	Døgnflue	4	3	1	1 ^H
<i>Heptagenia sulphurea</i>	Døgnflue	4	2	1	1 ^H
<i>Protonemura meyeri</i>	Slørvinge	7	7	1	1 ^H
<i>Silo pallipes</i>	Vårflue	4	1	4	1 ^{NA/NR}
<i>Ptychoptera paludosa</i>	Tovinge	4	1	#	1 ^{NA/NR}
<i>Tvetenia</i>	Tovinge	4	1	#	1 ^{NA/NR}
<i>Asellus aquaticus</i>	Krebsdyr	7	4	2	2 ^H
<i>Nemoura cinerea</i>	Slørvinge	3	3	2	2 ^H
<i>Isoperla grammatica</i>	Slørvinge	3	1	2	2 ^H
<i>Leuctra fusca</i>	Slørvinge	6	3	#	2 ^D
<i>Caenis horaria</i>	Døgnflue	3	1	2	2 ^H
<i>Sialis lutaria</i>	Dovenflue	7	1	2	2 ^H
<i>Oreodytes sanmarkii</i>	Bille	6	1	#	2 ^D
<i>Elmis aenea</i>	Bille	3	3	#	2 ^D
<i>Dicranota</i>	Tovinge	7	1	2	2 ^H
<i>Odagmia ornata</i>	Tovinge	4	3	#	2 ^D
<i>Conchapelopia menalops</i>	Tovinge	5	1	#	2 ^D
<i>Elodes minuta</i>	Bille	4	3	#	3 ^{NA/NR}
<i>Hydropsyche</i>	Vårflue	7	3	6	3 ^{NA/NR}

angustipennis

<i>Chaetoperyx villosa</i>	Vårflue	3	3	4	3 ^{NA/NR}
<i>Ephemera danica</i>	Døgnflue	4	1	4	4 ^H
<i>Beraeodes minutus</i>	Vårflue	5	4	#	4 ^{NA/NR}
<i>Chironomus luridus</i> agg.	Tovinge	5	1	#	4 ^{NA/RE}
<i>Limnius volckmari</i>	Bille	5	3	#	5 ^{NA/RE}
<i>Dugesia gonocephala</i>	Fimreorm	7	7	7	7 ^{AEP}
Tubificidae	Børsteorm	7	7	#	7 ^{AEP}
<i>Helobdella stagnalis</i>	Igle	7	7	#	7 ^{AEP}
<i>Erpobdella octoculata</i>	Igle	7	7	#	7 ^{AEP}
<i>Prodiamesa olivacea</i>	Tovinge	7	7	#	7 ^{AEP}
<i>Eristalis</i>	Tovinge	7	7	#	7 ^{AEP}
<i>Radix balthica</i>	Snegl	7	7	7	7 ^{AEP}
<i>Sphaerium corneum</i>	Musling	7	7	#	7 ^{AEP}



FIGUR 4.4

ANTAL ARTER BLANDT DE UNDERSØGTE, SOM INDEN FOR 6 DAGE EFTER EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHRIN VISTE TEGN PÅ AT (I) FÅ DET BEDRE (RECOVERY), (II) FÅ DET VÆRRE, ELLER (III) IKKE FÅ DET HVERKEN VÆRRE ELLER BEDRE.

dødelighed. For leddyrene var følsomheden for pyrethroidet således væsentlig større (mindst en faktor 10) hvad angår adfærdsændringer (under såvel som efter eksponering) end for dødelighed (Wilcoxon Signed Rank Test, $P < 0,01$). Tilsvarende forskel blev fundet mellem "kritisk følsomhed" og dødelighed ($P < 0,001$). Derimod var der ingen statistisk signifikant forskel i følsomhed med hensyn til adfærd/dødelighed hhv. under og efter eksponering (Wilcoxon Signed Rank Test, $P = 0,86$).

4.4 Sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og følsomhed i Dansk Vandløbsfaunaindeks

Der var ingen entydig sammenhæng mellem arternes status som indikatorer i Dansk Vandløbsfaunaindeks og deres følsomhed over for pyrethroidet (Figur 4.5). Således var der ingen statistisk signifikant sammenhæng mellem rangordnet "kritisk følsomhed" og nøglegruppestatus (Spearman Rank korrelation, $r_s = 0,30$, $P = 0,15$), om end der var tendens til positiv sammenhæng mellem rangordnet pyrethroid-dødelighed og nøglegruppe-status ($r_s = 0,39$, $P = 0,06$). Taxa som er følsomme i DVFI (lav nøglegruppe værdi) er således ikke nødvendigvis følsomme over for pyrethroider.

Til gengæld var der signifikant forskel i pyrethroidfølsomhed mellem positive og negative diversitetsgrupper, hvor først nævnte var mere følsomme (Mann-Whitney U-test, $P < 0,01$). Forskellen var mest markant hvad angår "kritisk følsomhed", svarende til mindst en faktor 100 større for de positive diversitetsgrupper end for de negative (Tabel 4.4).

TABEL 4-4

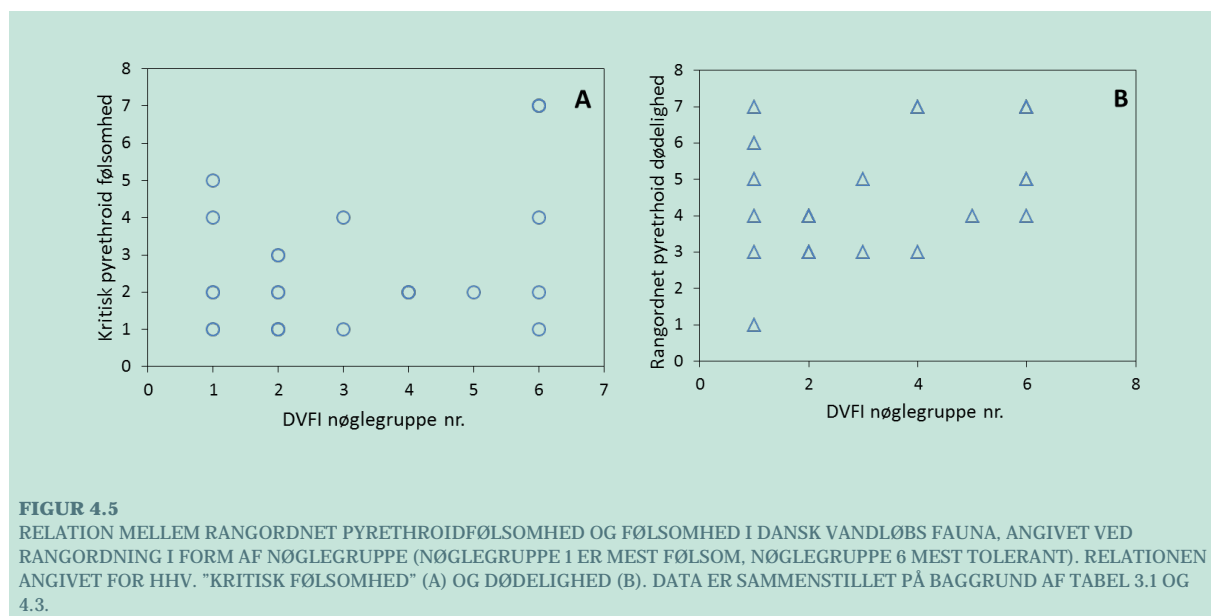
SAMMENLIGNING AF PYRETHROIDFØLSOMHED (RANGORDNET PÅ SKALA FRA 1 TIL 7) MELLEM HHV. POSITIVE OG NEGATIVE DIVERSITETSGRUPPER I DANSK VANDLØBSFAUNAINDEKS. POSITIVE GRUPPER INDIKERER GOD ØKOLOGISK TILSTAND, NEGATIVE GRUPPER DÅRLIG TILSTAND.

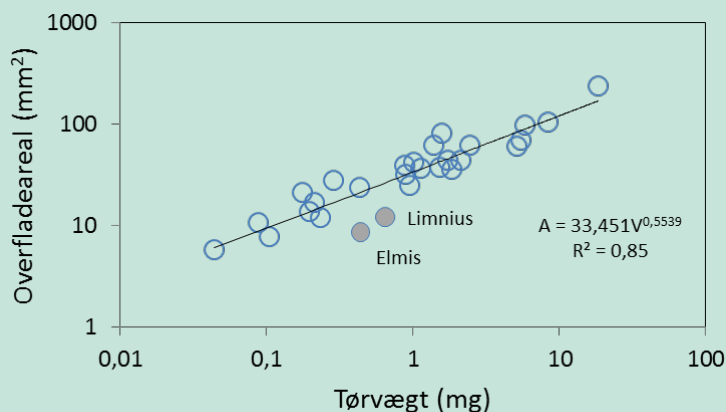
	Mann Whitney U-test	Positive Diversitets grupper		Negative Diversitets grupper	
	P-værdi	Median	N	Median	N
“Kritisk følsomhed”	0,007	2	17	7	8
Dødelighed	<0,001	4	17	7	8

4.5 Sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og biologiske karakteristika

Eftersom der ikke blev fundet nogen påvirkning af de anvendte koncentrationer af lambda-cyhalothrin på ikke-leddyr, blev disse helt udelukket fra analyserne af sammenhænge mellem pyrethroidfølsomhed og biologiske karakteristika.

Det er indledningsvist undersøgt, om størrelsen af de testede arter havde sammenhæng med deres følsomhed overfor pyrethroid. Størrelsen kan beskrives ud fra vægt, volumen eller overfladeareal, hvor små individer teoretisk set har et relativt større areal i forhold til deres volumen (eller vægt) end større individer. Denne sammenhæng blev bekræftet, idet der blev fundet en god – potensfunktion baseret – positiv signifikant sammenhæng mellem vægt og overfladeareal (Figur 4.6, $r^2 = 0,85$, $P < 0,001$). To arter, klobillerne *Elmis aenea* (voksne) og *Limnius volckmari* (larver),



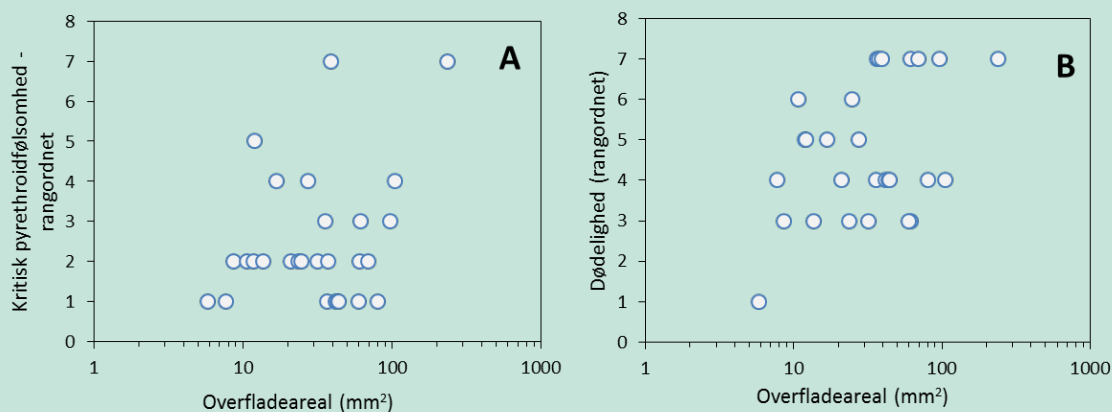


FIGUR 4.6
RELATION MELLEM TØRVÆGT OG OVERFLADEAREAL FOR SAMTLIGE DE LEDDYR, SOM INDGIK I FORSØGENE. TILSTEDEVÆRELSE AF GÆLLER, BEN OG ANTENNER ER SØGT INDREGNET I OVERFLADEAREALET.

faldt dog noget uden for kurven, idet de var relativt tungere end de øvrige leddyrarter. Dette passer godt med, at de har et relativt tykt og tungt ydre skelet (kutikula).

Der blev imidlertid ikke fundet den forventede sammenhæng mellem pyrethroidfølsomhed og størrelsen (vægt eller overfladeareal) af de testede leddyr, hverken hvad angår dødelighed eller "kritisk følsomhed" (Figur 4.7, Spearman Rank Korrelation, $P > 0,05$). Der var dog en tendens til positiv sammenhæng for dødelighed, ligesom der blev fundet en signifikant negativ sammenhæng mellem dødelighed og forholdet overfladeareal/vægt ($r_s = -0,39$, $P = 0,039$, $N = 28$).

Der blev herefter set på mulige relationer mellem pyrethroid følsomhed og en række biologiske/økologiske karakterer eller parametre, som beskriver dels grad af eksponering over for pyrethroid, dels mulighederne for at etablere sig efter eksponering, for de 28 undersøgte arter af leddyr. De pågældende karakterer og parametre er vist i tabel 4.5.



FIGUR 4.7
SAMMENHÆNG MELLEM OVERFLADEAREAL OG HHV. "KRITISK FØLSOMHED" (A) OG DØDELIGHED (B) FOR 28 ARTER AF LEDDYR. VÆRDIERNE FOR SÅVEL DØDELIGHED SOM "KRITISK FØLSOMHED" ER RANGORDNEDE PÅ EN SKALA FRA 1 TIL 7 (SE METODER)

TABEL 4-5

BIOLOGISKE KARAKTERISTIKA OG PARAMETRE TIL BESKRIVELSE AF DE UNDERSØGTE ARTERS POTENTIELLE RISIKO FOR AT BLIVE PÅVIRKET AF PYRETHROIDER I VANDLØBENE, SAMT DERES POTENTIALE FOR AT REKOLONISERE BERØRTE VANDLØBSSTRÆKNINGER EFTER EN GIVEN PÅVIRKNING. DER ER ANVENDT FØLGENDE SKALAVÆRDIER (VIST I PARENTES) FOR DE BIOLOGISKE KARAKTERISTIKA:

A: < 50 (1), 50-500 (2), > 500 (3). B: 1 (1), 2 (2), >2 (3). C: INGEN (0), TIL STEDE (3). D: IKKE TIL STEDE I VANDLØBENE (0).

I MINDRE GRAD TIL STEDE (1), STOR DEL AF BESTANDEN TIL STEDE (2), NÆSTEN HELE BESTANDEN TIL STEDE (3).

E: INGEN SPREDNING

VED EGEN HJÆLP (0), RINGE SPREDNINGSEVNE (1), MODERAT SPREDNINGSEVNE (2), STOR SPREDNINGSEVNE (3).

F: MEGET LIDT MOBILE (1), RET MOBILE (2), MEGET MOBILE (3). G: I MUDDERBUND (1), I SANDBUND/MELLEM GROFT DETRITUS (2),

I GRUS/PÅ MAKROFYTTER (3), PÅ STEN/DØDT TRÆ (4). H: INGEN STRØM (1), LANGSOM STRØM (2), MODERAT STRØM (3), HURTIG STRØM (4).

DE SAMMENSATTE PARAMETRE ER BEREGNET PÅ FØLGENDE MÅDE UD FRA DE ENKELTE SCORER:

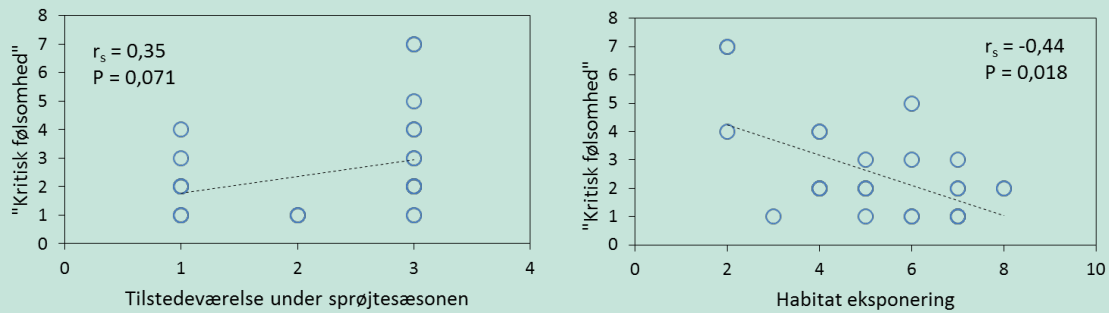
I: (ANTAL ÆG/UNGER PR. KULD * ANTAL KULD PR. ÅR) + YNGELPLEJE. J: (SPREDNINGSEVNE OVER LAND * 2) + SPREDNINGSEVNE I VANDLØB.

K: HABITATFØLSOMHED + STRØMEKSPONERING. L: TIL STEDE I SPRØJTESÆSON * HABITATEKSPONERING. M: SAMLET FORMERINGS-POTENTIALE + SAMLET SPREDNINGSEVNE.

Art/gruppe	Antal æg/unger pr. kuld ^A	Antal kuld æg/unger pr. år ^B	Yngelpleje ^C	Til stede i sprøjtesæson ^D	Spredningsevne over land ^E	Spredningsevne i vandløb ^F	Habitatfølsomhed ^G	Strømeksponeering ^H	Samlet formeringspotentiale ^I	Samlet spredningsevne ^J	Habitat eksponeering ^K	Potentiel eksponeering ^L	Potentiel rekoloniseringssevne ^M
<i>Gammarus pulex</i>	1	3	3	3	0	3	3	3	6	9	6	18	15
<i>Asellus aquaticus</i>	2	2	3	3	0	2	2	2	7	6	4	12	13
<i>Protonemura meyeri</i>	3	1	0	1	1	2	4	3	3	8	7	7	11
<i>Nemoura cinerea</i>	3	1	0	1	2	1	2	3	3	7	5	5	10
<i>Isoperla grammatica</i>	2	1	0	1	1	2	4	3	2	8	7	7	10
<i>Leuctra fusca</i>	2	1	0	3	3	2	4	3	2	12	7	21	14
<i>Caenis horaria</i>	3	1	0	1	1	1	2	2	3	5	4	4	8
<i>Cloëon inscriptum</i>	3	2	3	2	3	2	3	2	9	12	5	10	21
<i>Heptagenia sulphurea</i>	2	1	0	2	2	1	4	3	2	7	7	14	9
<i>Ephemera danica</i>	3	1	0	3	2	1	2	2	3	7	4	12	10
<i>Sialis lutaria</i>	3	1	0	3	1	1	2	2	3	5	4	12	8
<i>Oreodytes sanmarki</i>	1	2	0	3	2	3	3	2	2	13	5	15	15
<i>Elodes minuta</i>	1	1	0	3	3	1	3	3	1	9	6	18	10

<i>Elmis aenea</i>	1	1	0	3	2	1	4	4	1	7	8	24	8
<i>Limnius volckmari</i>	1	1	0	3	2	1	3	3	1	7	6	18	8
<i>Agapetus fuscipes</i>	2	1	0	1	1	1	4	3	2	5	7	7	7
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	3	1	0	1	3	2	4	3	3	12	7	7	15
<i>Chaetopteryx villosa</i>	2	1	0	3	1	2	2	3	2	8	5	15	10
<i>Silo pallipes</i>	2	1	0	2	1	1	4	3	2	5	7	14	7
<i>Beraeodes minutus</i>	1	1	0	1	1	1	2	2	1	5	4	4	6
<i>Ptychoptera paludosa</i>	2	1	0	1	2	1	2	1	2	7	3	3	9
<i>Dicranota</i>	2	1	0	1	2	1	2	2	2	7	4	4	9
<i>Odagmia ornata</i>	2	3	0	3	3	2	4	4	6	12	8	24	18
<i>Conchapelopia menalops</i>	2	1	0	3	3	2	2	3	2	12	5	15	14
<i>Prodiamesa olivacea</i>	2	3	0	3	3	1	1	1	6	9	2	6	15
<i>Tvetenia</i>	2	3	0	3	3	2	3	3	6	12	6	18	18
<i>Chironomus lugubris</i> agg.	3	2	0	3	3	1	1	1	6	9	2	6	15
<i>Eristalis</i>	2	2	0	3	3	1	1	1	4	9	2	6	13

Samlet set kunne der for de testede arter ikke påvises signifikante sammenhænge mellem pyrethroid følsomheden ("kritisk følsomhed") og hvor udsatte arterne må formodes at være over for en given eksponering (puls) med pyrethroid i vandløbsmiljøet, eller hvilket potentiale for rekolonisering som de må formodes at have efter en sådan påvirkning. Der var således ingen signifikante relationer (eller tendens til sådanne) til arternes frugtbarhed (fekunditet) og spredningsevne, eller til det samlede resultat heraf, nemlig deres potentiale for rekolonisering ($r_s \approx 0$; $P > 0,6$). Der var dog tendens til positiv sammenhæng mellem laveste "kritisk" følsomhed og tilstedeværelse i sprøjtesæsonen ($r_s = 0,35$; $P = 0,07$), samt signifikant negativ sammenhæng mellem "kritisk følsomhed" og arternes habitat eksponering ($r_s = -0,44$; $P < 0,05$) (se figur 4.8). Tolkningen af disse relationer er, at arter som i særlig grad er til stede under sprøjtesæsonen samtidig er relativt pyrethroid tolerante, mens arter som i særlig grad er udsatte for eksponering med pyrethroid også er relativt følsomme overfor dette. Når de to parametre imidlertid blev koblet sammen til en "potentiell eksponering" var der absolut ingen statistik signifikant relation til pyrethroid følsomheden.



FIGUR 4.8

SAMMENHÆNG MELLEM PYRETHROIDFØLSOMHEDEN HOS LEDDYR (ANGIVET SOM "KRITISK FØLSOMHED") OG HHV. TILSTEDEVÆRELSE UNDER SPRØJTESÆSONEN (JO HØJERE SCORE, DES LÆNGERE TILSTEDEVÆRELSE) (TV) OG HABITAT EKSPONERING (DVS. HVOR UDSAT EN ART ER I DET FYSISKE RUM DEFINERET AF DETS SUBSTRAT- OG STRØMPRÆFERENCE: JO HØJERE SCORE, DES STØRRE EKSPONERING) (TH).

Det blev desuden undersøgt, om der var systematiske forskelle i følsomhed ("kritisk følsomhed" og dødelighed) over for pyrethroidet, i forhold til arternes foretrukne fødesøgning og fødeemner (fødeemner: dødt groft organisk stof, dødt finpartikulært organisk stof, mikroalger, andre invertebrater). Dette viste sig ikke at være tilfældet, hverken for "kritisk følsomhed" eller dødelighed (Kruskal-Wallis test, $P > 0,30$).

5. Diskussion

5.1 De anvendte forsøgsbetingelser

I dette projekt har vi ved brug af simple laboratorieforsøg forsøgt at afdække forskelle i følsomhed/tolerance hos en række vandløbsdyr over for én repræsentant for en gruppe af insekticider, de såkaldte pyrethroider, som har en udbredt anvendelse til skadedyrsbekæmpelse i dansk landbrug. Vi har desuden ud fra disse forsøg prøvet at forudsige, hvordan det valgte pyrethroid lambda-cyhalothrin (der er mht. egenskaber og formodentlig også virkning er repræsentativt for andre stoffer i gruppen) kan tænkes at påvirke de pågældende arter i deres naturlige miljø. En sådan fremgangsmåde har naturligvis en række begrænsninger. Først og fremmest har vi taget dyrene ud af deres naturlige miljø og udsat dem for meget simplificerede og ensartede forhold i laboratoriet. De har således ikke haft adgang til deres naturlige mikrohabitater, karakteriseret ved særlige strømhastigheder og substrater, ligesom de ikke fik tilbudt føde overhovedet. Langt de fleste arter blev holdt i arenaer uden vandbevægelse, hvilket alene må have repræsenteret en væsentlig stress faktor, ligesom de ikke har haft adgang til skjul eller (for visse af dem) haft lejlighed til at bygge sand- eller slamrør.

5.1.1 End-points

Til trods for de unaturlige forsøgsbetingelser blev der kun fundet en beskedent dødelighed hos kontrolgrupperne, selv for arter som vurderes som umiddelbart strømkrævende: *Dugesia gonocephala* (fimreorm), *Protonemura meyeri*, *Leuctra fusca*, *Isoperla grammatica* (slørvinger), *Heptagenia sulphurea* (døgnflue), *Hydropsyche angustipennis*, *Silo pallipes* (vårfluer). Samtidig udviste de pågældende kontrol dyr generelt ingen udpræget afvigende adfærd under forsøget. Forklaringen er formodentlig, at vandet i arenaerne havde et tilstrækkelig højt iltindhold pga. (1) den relativt lave temperatur (10°C), ved hvilken samtlige forsøg blev kørt (hvor opløseligheden af ilt er relativt stor og hvor metabolismen hos dyrene er relativt lille), (2) et forsvindende lille indhold af iltforbrugende stoffer i vandet/arenaerne, og (3) den lille vanddybde i arenaerne og dermed lette adgang til ilttilførsel via vandoverfladen. Dertil kommer, at forsøgene forløb over så tilpas kort tid, at manglen på føde generelt ikke kan forventes at have medført nogen overdødelighed. Kun for enkelte arter/grupper - Tubificidae (børsteorme), *Chironomus lugubris* agg., *Micropsectra* (dansemyg) - blev der fundet en markant høj dødelighed hos kontrol dyrene. Fælles for de pågældende arter er, at de lever i finkornet sediment, i hvilket de bygger beboelsesrør af finkornede partikler. Desuden er de alle tilpasset (via indhold af hæmoglobin) til at kunne tolerere de lave iltindhold, som forekommer i det pågældende miljø. Det er derfor tænkeligt, at netop disse arter har været udsat for et særligt stress i det for dem helt fremmede miljø, ligesom det kan have haft betydning at de ikke har haft adgang til føde. En anden slambeboer, dansemyggen *Prodiamesa olivacea* (der ikke bygger slamrør), havde dog til sammenligning ingen overdødelighed (eller dødelighed i det hele taget).

En række arter blev ikke holdt i arenaer med stillestående vand (bortset fra under eksponeringen med pyrethroid), men derimod i beluftede petriskåle, fordi det på forhånd blev vurderet at de ellers ikke ville kunne overleve igennem forsøgsperioden. Også for disse var der generelt ingen markant dødelighed hos kontrolgrupperne. Eneste undtagelse var *Odagmia ornata* (kvægmyg), hvor svigt i lufttilførslen til kontrolgruppen under sidste halvdel af forsøgsperioden medførte stor dødelighed, hvilket bekræfter at forsøget med denne art ikke kunne have været gennemført i arenaer med stillestående vand.

Det lykkedes i vidt omfang at måle de valgte end-points. Mens det generelt var relativt let at fastslå, om et individ var dødt, var det imidlertid væsentlig vanskeligere at undersøge ændringer i bevægelsesadfærd med mindre der var tale om immobilisering. Først og fremmest var det for tilbagelagt afstand naturligvis ikke muligt at opnå brugbare data for arter, som kun bevægede sig meget lidt eller slet ikke. Dertil havde det anvendte videospøringsudstyr nogle begrænsninger. Nogle dyr var helt enkelt for små eller for lyse til at kunne detekteres af videospøringsudstyret, ligesom det trods betydelige anstrengelser ikke lykkedes i alle tilfælde at gøre belysningen jævn i forhold til samtlige arenaer, sådan at alle dyr i opstillingerne kunne detekteres. Samlet set lykkedes det dog at måle ændringer i bevægelsesadfærd hos halvdelen af samtlige arter/leddyr. For stort set samtlige arter, også de som ikke kunne videospores, var det dog muligt at foretage kvalitative visuelle observationer af forskelle i bevægelsesadfærd. Disse blev dog kun foretaget i perioden efter eksponeringen, således at der for halvdelen af arterne ikke foreligger data for adfærden under selve eksponeringen. Specielt adfærden under selve eksponeringen er interessant og miljømæssigt relevant, fordi denne adfærd – omsat til forholdene i et vandløb - i høj grad beskriver i hvilken grad individer er i særlig risiko for at gå i drift. Dette betyder, at der ikke på et helt ensartet grundlag kunne foretages en rangordning af arternes følsomhed/tolerance over for pyrethroidet. For delvist at kompensere herfor ved rangordningen blev der inddraget data (for mindst 5 arter) fra tidligere undersøgelser (Wiberg-Larsen et al. 2013), hvorunder netop drift i forbindelse med eksponering blev undersøgt. Hvor det for normalt driftaktive arter er påvist, at pyrethroidprovokeret katastrofedrift fuldstændig svarer til målt hyperaktivitet i videospøringsarenaer (Nørum et al. 2006), så er det for andre og mindre drift-aktive arter ikke muligt at relatere de ændringer i adfærd, som blev observeret i arenaerne, til adfærdsmønstre som ville forekomme i et vandløb (fx søgen efter skjul).

5.1.2 Aktuelle og nominelle pyrethroidkoncentrationer

Lambda-cyhalothrin er ligesom de øvrige pyrethroider stærkt hydrofob, hvilket betyder at det let bindes til overflader, herunder partikler. Det betyder, at koncentrationen af opløst pyrethroid vil forventes at falde i arenaerne igennem perioden, hvor forsøgsdyrene eksponeres. Dette var også tilfældet i forbindelse med vores forsøg, hvor der i gennemsnit kun blev genfundet ca. 30% af den nominelle koncentration efter endt eksponering, formodentlig fordi arenaerne (pga. deres kemiske sammensætning) i særlig grad adsorberer pyrethroidet, sammenlignet med fx glas. En undtagelse var den laveste koncentration, hvor der ikke sås noget tab. En mulig forklaring herpå er, at koncentrationen var tæt på detektionsgrænsen og usikkerheden på målingerne derfor særlig stor. Overordnet set varierede de målte koncentrationer betydeligt – men usystematisk - fra forsøg til forsøg. Dette er ikke overraskende, idet netop måling af pyrethroider med deres specielle egenskaber byder på særlige udfordringer. Eksempelvis blev der i en del tilfælde målt tilstedeværelse af stoffet i kontrolprøverne. Vi mener at kunne udelukke, at disse fund skyldes kontaminering eller fejl under procedurene, og opfatter derfor de ”målte” værdier som tilfældig støj. Samlet set tyder intet på, at de enkelte arter skulle være eksponeret forskelligt med hensyn til de forudsatte koncentrationer (i intervallet 10 til 10 000 ngL⁻¹) og forsøgene dermed ikke skulle være sammenlignelige. Endvidere må de aktuelle koncentrationer antages at have været væsentlig højere ved start af eksponeringen end ved dennes afslutning. Dertil kommer, at der blev foretaget en robust rangordning af koncentrationerne (på en skala fra 1 til 7), og at det er denne som primært er anvendt i de udførte analyser. Der vurderes således ikke at være anledning til at anvende andre (og lavere) koncentrationer end de nominelle som grundlag for analyserne.

5.2 Rangordning af arternes følsomhed/tolerance

5.2.1 Andre undersøgelser til sammenligning?

Den foretagne rangordning af følsomheden/tolerancen over for kortvarige pulseksponeringer med lambda-cyhalothrin – eller for pyrethroider i det hele taget - hos et bredt udvalg af makroinvertebrater fra vandløb er i forhold til national og international litteratur bemærkelsesværdig. Der findes således tilsyneladende kun enkelte laboratorie- eller mesokosmosstudier, og kun omfattende et fåtal af arter, som kan benyttes til sammenligning med nærværende resultater (Lauridsen & Friberg 2005, Nørum et al. 2010, Wiberg-Larsen et al. 2013).

Til gengæld er der foretaget et stort antal undersøgelser af lambda-cyhalothrins og andre pyrethroiders virkning på et relativt bredt spektrum af ferskvandsinvertebrater alle udført med eksponering over 24, 48 eller 96 timer. End-points er for flertallet af disse undersøgelser enten dødelighed (og resultatet en række LC₅₀ værdier) eller immobilitet (EC₅₀ værdier). På baggrund af disse klassiske toksicitetsundersøgelser er der foretaget rangordninger af en lang række arters følsomhed/tolerance både for lambda-cyhalothrin og andre pyrethroider (fx Maund 2009). Disse rangordninger kan naturligvis anvendes til en overordnet sammenligning med vores.

5.2.2 Pyrethroiders generelle virkemåde og toksicitet

Hos både hvirvelløse dyr og hvirveldyr foregår overførsler af elektriske signaler ved at der transporteres Na⁺ ioner gennem nervecellernes membraner. Det sker via såkaldte natriumkanaler, som kan være enten lukkede eller åbne. Det er denne mekanisme, som insekticider som pyrethroider virker på. Pyrethroiderne, som er stærkt fedtopløselige (lipofile), binder sig således – især hos leddyr - til særlige lipidholdige områder i natriumkanalerne og holder derved sidstnævnte permanent åbne. Det medfører en forlænget overførsel af Na⁺ ioner og dermed en ukontrolleret overførsel af elektriske signaler, hvorved dyrene får kramper, hvilket i sidste ende kan føre til deres død (se fx Soderlund & Bloomquist 1989, Narahashi 1992, O´Reilly et al. 2006). Det er den kemiske opbygning af natriumkanalerne hos leddyr som insekter og krebsdyr, som gør at pyrethroider i særlig grad virker toksisk på disse (O´Reilly et al. 2006). Det er på denne baggrund ikke overraskende, at vi kun fandt effekter (adfærdsændringer og/eller dødelighed) hos krebsdyr og insekter ved eksponering med lambda-cyhalothrin i koncentrationer på 10 til 10 000 ngL⁻¹. Således var der ingen påviselige effekter hos fimreorme, børsteorme, muslinger og snegle. Dette er i fuld overensstemmelse med, hvad der tidligere er rapporteret for vandlevende invertebrater (fx Mian & Mulla 1992, Maund 2009).

5.2.3 Forskel i følsomhed mellem arter af arthropoder

Inden for leddyrene, krebsdyr og insekter, var der meget stor variation i arternes følsomhed/tolerance for såvel adfærd som dødelighed. Denne variation gav sig imidlertid ikke udtryk i form af systematiske forskelle mellem de enkelte grupper (klasser og ordener). Krebsdyr og insekter med ufuldstændig forvandling (døgnfluer og slørvinger) var eksempelvis hverken mere eller mindre følsomme/tolerante end insekter med fuldstændig forvandling (dovenfluer, biller, vårfluer og tovinger). En analyse af EC₅₀ værdier fra international litteratur (for end-pointet ”immobilitet”) for i alt 27 arter af ferskvandsinvertebrater, der over 48 timer blev eksponeret for lambda-cyhalothrin (Hamer et al. 1998, Maund et al. 1998, Schroer et al. 2004, Maund 2009), viste ligeledes en manglende sammenhæng mellem følsomhed/tolerance og overordnet gruppe, herunder forskel mellem krebsdyr (N=9) og insekter hhv. uden (N=12) og med fuldstændig forvandling (N=6) (Kruskal-Wallis test, P = 0,37). Selvom intet således tyder på systematiske forskelle i følsomhed/tolerance mellem overordnede grupper, viste vores forsøg dog at døgnfluer/slørvinger samlet set kom sig i højere grad efter pulseksponeringen end grupper med fuldstændig forvandling

(dovenfluer, biller, vårfluer og tovinger). Det er uvist hvilke fysiologiske mekanismer som ligger bag denne forskel.

Andre økotoxikologiske undersøgelser omfattende andre insekticider og varierende fra korttids studier med enkelte arter til mesokosmos studier af længere varighed har afsløret lignende betydelig variation i arters følsomhed (fx Maltby et al. 2005, Baird & Van den Brink 2007, Rubach et al. 2010). Det er til gengæld ikke afklaret, hvad denne variation i følsomhed skyldes (Baird & Van den Brink 2007, Van den Brink 2008). En stor del af variationen kan naturligvis henføres til stoffernes egenskaber og virkemåde, men den resterende variation skyldes utvivlsomt egenskaber hos arterne selv. Ifølge Ashauer et al. (2006) og Rubach et al. (2010) kan en stofs toksiske virkning opdeles i to processer: Toksikokinetik (TK), der omfatter optagelse af stoffet i organismen, biotransformering og fjernelse af stoffet selv og dets nedbrydningsprodukter, samt toksikodynamik (TD), der udgøres af dels de skader stoffet forvolder, dels organismens evne til at komme sig via udbedringsmekanismer. Rubach et al. (2010), der undersøgte forskellige aspekter af TK for insekticidet klorpyrifos hos 15 forskellige makroinvertebrater (tilknyttet søer og damme), fandt en meget langsom eliminering af stoffet hos visse arter, ligesom der generelt var stor variation i optagelse (op til en faktor 50), eliminering (op til en faktor 30) og biokoncentrationsfaktorer. Variationen i følsomhed (EC_{50} i form af end-pointet immobilitet) hos de undersøgte arter, der tilhørte grupperne krebsdyr, guldsmede, døgnfluer, tæger, vårfluer, sommerfugle og tovinger, var således samlet set ca. en faktor 1000. Der er således tale om en variation, som er stort set lige så bred som ved nærværende undersøgelse. Hvad angår optagelsen af et toksisk stof kan denne afhænge af de pågældende organismers størrelse (Buchwalter et al. 2002), måden de respirerer på (Hendriks et al. 2001) eller deres indhold af fedtstoffer (Verhaar et al. 1999). Elimineringen af et stof og dets nedbrydningsprodukter kan også afhænge af organismernes størrelse samt af disses lipidindhold, ligesom der kan være tale om forskel i måden, som stofferne biotransformeres på, primært via typen af tilgængelige enzymer og disses kinetik (Rubach et al. 2010). Særlig betydningen af lipidindholdet må formodes at være relevant for pyrethroider, der netop er stærkt fedtopløselige. Dette kan meget vel være et kernepunkt i den variation, som vi fandt.

Den manglende sammenhæng i nærværende undersøgelse mellem overordnet taksonomisk niveau og pyrethroid følsomhed/tolerance illustreres ved den meget betydelige forskel, som blev fundet inden for samme taksonomisk gruppe som fx orden og familie. Således blev der hos døgnfluer, biller, vårfluer og tovinger henholdsvis fundet en rangordnet "kritisk følsomhed" i intervallerne 1-4, 1-4, 2-5, og 1-7, mens den rangordnede følsomhed var mindre (1-2) hos de undersøgte slørvinger, som således muligvis er særligt følsomme. Alene inden for familien Chironomidae varierede følsomheden (rangordnet) mellem 1 og 7, svarende til en effektkoncentration på fra 25 til > 10 000 ngL^{-1} . Tilsvarende stor variation var der for EC_{50} i form af visuelt vurderede adfærdsændringer og LC_{50} (dødelighed), hvilket tydeligt fremgår af den udførte SSD analyse. Sammenstillede data fra en række andre studier af følsomhed/tolerance i form af EC_{50} (for eksponering over 24 timer) har vist en tilsvarende betydelig variation inden for de enkelte taksonomiske grupper (Maund 2009). Et review af data fra Hamer et al. (1998), Maund et al. (1998), Schroer et al. (2004) og Maund (2009) viser således en stor variation i EC_{50} (48 timer) for end-pointet immobilitet: 2,3-3300 ngL^{-1} (krebsdyr, N=10), 17,9-60 ngL^{-1} (døgnfluer, N=4) og 2,8-2400 ngL^{-1} (tovinger, N=4). Selv inden for samme slægt kan der være store forskelle i følsomhed. Således er EC_{50} (48 timer, immobilitet) for *Chironomus riparius* bestemt til 2400 ngL^{-1} (Maund et al. 1998), mens vi fandt en EC_{50} (pulseksponering 1½ time, adfærdsændring) på 25 ngL^{-1} for *C. lugubris* agg. over 1-3 dage efter endt eksponering (dog 1050 ngL^{-1} efter 6 dage). Forskellen er især slående, fordi EC_{50} værdien typisk vil aftage – og giftigheden dermed stige - jo længere der eksponeres. Således fandt Maund et al. (1998), at giftigheden af lambda-cyhalothrin over for *G. pulex* forøgedes 18 gange, når eksponeringstiden øgedes fra 1 til 96 timer. Selvom der således kan være stor forskel i følsomhed/tolerance mellem arter inden for en given slægt, kan andre arter inden for samme slægt være betydelig mere ens, fx *Leuctra fusca* og *L. nigra*, som udviser et væsentligt adfærdsmæssigt

respons ved koncentrationer i intervallet 10-100 ngL⁻¹ (Lauridsen & Friberg 2005; Wiberg-Larsen et al. 2013).

I det lys er det relevant at diskutere, hvilken betydning det kan have haft, at vi for enkelte familier af insekter (Baetidae, Caenidae) valgte arter fra stillestående vand som erstatning (proxies) for arter tilknyttet strømmende vand, med det formål at sikre en tilstrækkelig høj overlevelse igennem forsøget (altså at der ikke opstod overdødelighed hos kontroldyrene). Som repræsentant for familien Baetidae valgte vi således *Cloeon inscriptum* i stedet for det helt oplagte valg, *Baetis rhodani*, som er vidt udbredt og hyppig i mindre danske vandløb. En sammenligning af vores resultater for *C. inscriptum* med data fra litteraturen for *B. rhodani* (Lauridsen & Friberg 2005) viser imidlertid, at arterne kan rangordnes ens hvad angår "kritisk følsomhed". Således var der et markant adfærdsmæssigt respons (hyperaktivitet) hos *C. inscriptum* under selve eksponeringen ved 10 ngL⁻¹, ved hvilken koncentration der tilsvarende er fundet en markant forøget drift hos *B. rhodani*. Det er på denne baggrund muligt, at også den valgte repræsentant for Caenidae, *Caenis horaria*, som langt overvejende forekommer i søer, kan anvendes som proxy for arter, som forekommer i strømmende vand (*C. rivulorum*, *C. pseudorivulorum*). Arterne har under alle omstændigheder samme mikrohabitat og levevis.

Vores undersøgelser bekræfter derved hypotesen om, at spektret af arter/slægter/familier, som indgår i DVFI, udviser betydelig variation i følsomhed/tolerance over for det anvendte pyrethroid, og derfor vil kunne rangordnes med hensyn til denne følsomhed/tolerance. Resultaterne peger dog også på, at det ikke kan tages som givet, at ikke-testede arter inden for en given taksonomisk gruppe (slægt, familie) vil kunne rangordnes på samme måde som testede arter inden for gruppen. For familien Chironomidae, som har en meget amplitude med hensyn til morfologi, habitatvalg og føde, var dette helt åbenlyst ikke tilfældet.



DØGNFLUEN HEPTAGENIA SULPHUREA LEVER PÅ OVERFLADEN AF VANDLØBETS STEN, HVOR DEN GRÆSSER PÅ DE FASTSIDDENDE MIKROALGER. DEN ER MEGET FØLSOM OVER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN, OG VIL FØRSØGE AT UNDSLIPPE SELV SMÅ KONCENTRATIONER VED AT LADE SIG DRIVE MED STRØMMEN. (FOTO: BIOPIX/J. CHR. SCHOU)

5.2.4 Særligt pesticidfølsomme/-tolerante arter

Vores undersøgelser kan benyttes til at udpege særligt følsomme arter eller indikatorer for manglende påvirkning med lambda-cyhalothrin og lignende pyrethroider (se 5.1.6). Sådanne indikatorer er listet i tabel 5.1.

Listen omfatter i alt 19 taxa, hvoraf langt de fleste er udbredte over hele landet. Omkring halvdelen er desuden normalt talrige, hvor de forekommer. De pågældende taxa dækker et bredt spektrum af fødefunktionelle grupper: græssere (6 taxa), iturivere (5 taxa), filtratorer (1 taxon), sedimentædere (2 taxa) og rovdyr (5 taxa). Listen rummer samtlige testede slørvinger og 3 ud af 4 testede døgnfluer, hvilket antyder at disse grupper generelt er særlig følsomme. Langt de fleste arter i tabellen indgår på en eller anden måde i DVFI, men udvalget viser, at også ikke-DVFI taxa kan have et potentiale

TABEL 5-1

POTENTIELLE INDIKATORER FOR PÅVIRKNING MED PYRETHROIDER, UDVALGT I FORHOLD TIL DERES FØLSOMHED: MF – MEGET FØLSOMME (< 50 NGL⁻¹); F – FØLSOMME (50-150 NGL⁻¹). DESUDEN ANGIVET OM INDIKATORERNE ER UDBREDTE OG/ELLER TALRIGT FOREKOMMENDE.

Taksonomisk gruppe	Art/slægt	Indikator værdi	Relevans
Krebsdyr	<i>Gammarus pulex</i>	MF	Udbredt/talrig
	<i>Asellus aquaticus</i>	F	Udbredt
Døgnfluer	<i>Cloeon inscriptum</i>	MF	<i>Baetis rhodani</i> -”proxy” (udbredt/talrig)
	<i>Heptagenia sulphurea</i>	MF	Udbredt
	<i>Caenis horaria</i>	F	Udbredt
Slørvinger	<i>Protonemura meyeri</i>	MF	Jylland, ret udbredt
	<i>Nemoura cinerea</i>	F	Udbredt/talrig
	<i>Isoperla grammical</i>	F	Udbredt
	<i>Leuctra fusca</i>	F	Udbredt/talrig
Dovenfluer	<i>Sialis lutaria</i>	F	Udbredt
Biller	<i>Oreodytes sanmarkii</i>	F	Jylland, udbredt
	<i>Elmis aenea</i>	F	Udbredt/talrig
Vårfluer	<i>Agapetus fuscipes</i>	MF	Udbredt/talrig
	<i>Silo pallipes</i>	MF	Udbredt
Stankelben	<i>Dicranota</i>	F	Udbredt
Glansmyg	<i>Ptychoptera paludosa</i>	MF	Udbredt
Kvægmyg	<i>Odagmia ornata</i>	F	Udbredt/talrig
Dansemyg	<i>Conchapelopia menalops</i>	F	Udbredt
	<i>Tvetenia</i>	MF	Udbredt/talrig

som pyrethroidindikatorer. Samlet set antyder listen over følsomme taxa, at de danske vandløb potentielt rummer et bredt spektrum af arter/grupper som synes egnede som indikatorer, således at

deres fravær – alt andet lige – kan skyldes påvirkning med pyrethroider. Dertil kommer, at der på lignende vis kan udpeges taxa, som er meget tolerante over for pyrethroider. Her er der først og fremmest tale om samtlige ikke-leddyr, hvoraf mange er vidt udbredte og undertiden talrige. Dertil kommer tovinger som *Prodiames olivacea* og *Eristalis*. Af disse er den første vidt udbredt, sjældnere talrig, mens sidst nævnte i vore dage er yderst sjælden i vandløbene.

5.2.5 Betydning af valgte end-points

Vi undersøgte såvel adfærdsmæssige end-points som dødelighed for suiten af arter. Resultatet var helt konsistent, nemlig at $LEC_{kritisk}$ værdierne var signifikant lavere (i gennemsnit ca. 50 gange, range 1-400 gange) end LC_{50} værdierne. Data fra Hamer et al. (1998), Maund et al. (1998) og Schroer et al. (2004) for en række ferskvandsinvertebrater (N=6) viser tilsvarende, at EC_{50} i form af immobilitet var 2-14 gange lavere end LC_{50} ved eksponering med lambda-cyhalothrin over 48 timer. Den større forskel mellem $LEC_{kritisk}$ og LC_{50} værdier i vores forsøg skyldes, at $LEC_{kritisk}$ typisk repræsenterede hyperaktivitet, som må forventes at optræde ved lavere værdier end tilfældet er for immobilitet. Dette er eksempelvis tydeligt dokumenteret for fx *Gammarus pulex*, *Leuctra nigra* og *Heptagenia sulphurea* (Nørum et al. 2010). Vores SSD plot viser i øvrigt, at EC_{50} værdierne baseret på visuel vurdering af adfærd ændringer generelt var 10-15 gange lavere end LC_{50} værdierne, hvilket er i god i overensstemmelse med hvad der er fundet for eksponeringer over 48 timer (se ovenfor).

Vores resultater bekræfter ikke overraskende, at det er meningsfuldt ikke blot at fokusere på dødelighed i studier af effekten af pesticider, men i særlig grad på adfærd ændringer. Her er adfærd ændringer (primært hyperaktivitet), som fører til tab af individer via drift, af særlig interesse, fordi de ligesom dødelighed under naturlige forhold kan føre til markante ændringer i sammensætningen af et givet samfund af makroinvertebrater og det ved selv kortvarige pulse med relativt lave koncentrationer (se fx Heckmann & Friberg 2005; Lauridsen & Friberg 2005; Beketov & Liess 2008; Nørum et al. 2010, Wiberg-Larsen et al. 2013). Markant forhøjet drift forekommer imidlertid langt fra hos alle de arter/grupper, som påvirkes af pyrethroider (fx visse klobiller og værflyer). Til gengæld kan der forekomme andre adfærd ændringer, som nedsætter de ramte individers funktionsevne, fx relationerne mellem rovdyr og deres byttedyr (Nørum et al. 2006). Vor viden herom er dog sparsom og implikationerne af ændringer i samfundene er stort set ukendte.

Vores resultater peger dog på, baseret på ikke mindst SSD kurverne, at markante ændringer i naturlige samfund af makroinvertebrater kan forventes ved koncentrationer af lambda-cyhalothrin i intervallet 10-100 ngL^{-1} (ca. 70 ngL^{-1}), hvor op til ca. 50% af de testede leddyr vil være væsentlig påvirkede. Dette er i overensstemmelse med fuldskalaforsøg, hvor hele samfund af makroinvertebrater i strømrønder og et naturligt vandløb blev eksponeret for 90 minutters pulse med samme pyrethroid i en koncentration på 100 ngL^{-1} , ikke mindst hvis samfundene blev udsat for gentagne sådanne pulse (Wiberg-Larsen et al. 2013). De udførte undersøgelser understøtter således, at SSD kurver baseret på simple laboratorieforsøg med et bredt spektrum af arter kan være egnede til at forudsige, ved hvilke koncentrationer der kan forventes betydende effekter under naturlige forhold.

5.2.6 Er lambda-cyhalothrin repræsentativt for pyrethroider anvendt på de danske marker?

Vi har i dette og tidligere projekter alene anvendt lambda-cyhalothrin som model-pyrethroid. Imidlertid anvendes der i Danmark adskillige andre pyrethroider. I landbruget, der er langt den største forbruger af pesticider og pyrethroider, blev der således i 2011 benyttet 5 forskellige pyrethroider (Tabel 5.2). Blandt disse udgjorde anvendelsen af lambda-cyhalothrin kun en relativt beskednen del, både hvad angår mængde (3,6%) og behandlet areal (6,6%). Et relevant spørgsmål er

derfor, om lambda-cyhalothrin rent faktisk er et "model"-pyrethroid med samme egenskaber og toksicitet som de øvrige anvendte pyrethroider, og om vores resultater således kan betragtes som repræsentative i forhold til den øvrige påvirkning med pyrethroider. Hvad angår giftighed har vi i tabel 5.2 - for samtlige 5 pyrethroider - sammenstillet tilgængelige EC₅₀ og LC₅₀ værdier for standard testorganismen *Daphnia magna*. Resultaterne viser samlet set en relativt lille variation i stoffernes giftighed, ikke mindst sammenlignet med den langt større variationen der er mellem forskellige arter eksponeret over for lambda-cyhalothrin (se 5.1.3). Derudover fandt Nørum et al. (2006) at 90 minutters pulseksponering med esfenvalerat, tau-fluvalinat, lambda-cyhalothrin og cypermethrin i koncentrationer ned til 1-10 ngL⁻¹ medførte hyperaktivitet hos *Gammarus pulex*, mens der først blev fundet effekt for alpha-cypermethrin ved 100 ngL⁻¹. Det tyder på, at vores resultater sandsynligvis kan betragtes som repræsentative for de i Danmark anvendte pyrethroider på friland.

TABEL 5-2

OVERSIGT OVER ANVENDTE PYRETHROIDER I DANSK JORDBRUG 2011, OPGJORT SOM HHV. FORBRUGT (KØBT) MÆNGDE OG BEHANDLET AREAL (DATA FRA KJØLHOLT ET AL. 2012). DESUDEN ANGIVET STOFFERNES TOKSICITET OVER FOR STANDARD TESTORGANISMEN, DAPHNIA MAGNA.

Pyrethroid:	Forbrugt mængde (kg)	Behandlet areal (ha)	<i>Daphnia magna</i> : LC ₅₀ (48hr) (µgL ⁻¹)	<i>Daphnia magna</i> : EC ₅₀ (48hr) (µgL ⁻¹)
Alpha-cypermethrin	2903	103 127	0,8 ¹	0,3 ⁴
Cypermethrin	3938	429 711	1,31 ²	0,3 ⁵
Gamma-cyhalothrin	18	169 789	Ingen data	0,05-0,1 ⁶
Lambda-cyhalothrin	685	60 018	1,04 ²	0,05-0,36 ⁶
Tau-fluvalinat	11 284	153 637	1,0 ³	Ingen data

¹YORDANOVA ET AL. (2009); ²PAN PESTICIDES DATABASE ([HTTP://WWW.PESTICIDEINFO.ORG/LIST_CHEMICALS.JSP?](http://www.pesticideinfo.org/list_chemicals.jsp?)); ³YATES (2012); ⁴NØRGAARD & CEDERGREEN (2010); ⁵EUROPEAN COMMISSION (2005); ⁶GIDDINGS ET AL. (2009), TABLE 2.

Det betyder dog ikke, at alle kendte pyrethroider nødvendigvis har stort set samme toksicitet over for ferskvandsinvertebrater. Reviews udført af Mian & Mulla (1992) og Hamer et al. (1998) viser således, at stofferne kan rangordnes efter giftighed, og at der kan være 10-15 ganges forskel i giftighed fra stof til stof (Hamer et al. 1998). Således synes permethrin at være mindst giftigt, mens deltamethrin, bifenthrin og cyfluthrin hører til de mest giftige. Også esfenvalerat hører formodentlig til gruppen af særlige toksisk virkende stoffer. Ingen af disse stoffer anvendes – så vidt vides - til plantebeskyttelse i dansk landbrug, men er derimod godkendt (som biocid) til brug i andre sammenhænge (fx indendørs insektbekæmpelse) og for enkelte af stofferne (deltamethrin, esfenvalerat og permethrin) endda i betydelige mængder (Kjølholt et al. 2012).

5.2.7 Opløste eller partikelbundne pyrethroider?

Vi udførte udelukkende forsøg med opløst lambda-cyhalothrin. Som tidligere nævnt i denne rapport er stoffet ligesom andre pyrethroider kun lidt opløseligt i vand, men derimod stærkt fedtopløseligt. Det betyder, at pyrethroider let og hurtigt bindes til organiske partikler og overflader. Derudover bindes stofferne også let til visse mineralske partikler, fx lerpartikler. Derfor vil tilførslen af stofferne til vandløb primært foregå partikelbundet og kendskabet til stoffernes giftighed på denne

form er som følge heraf vigtig at kende. Spørgsmålet er derfor, om den rangordning af følsomheden/tolerancen, som vi har foretaget for en række arter, også er realistisk, når disse eksponeres over for pulse af partikelbundet lambda-cyhalothrin – eller for den sags skyld andre partikelbundne pyrethroider. Med de nævnte egenskaber er det ikke overraskende, at pyrethroiderne findes vidt udbredt i sedimentet i såvel danske som sydsvenske vandløb, der afvander landbrugsprægede oplande (Kronvang et al. 2003, Friberg et al., 2003, Bossi et al. 2009, McKnight et al., 2012, Rasmussen et al. 2013). Mere overraskende er måske, at de fundne koncentrationer må formodes at kunne have toksisk effekt på de tilknyttede makroinvertebrater (Maund et al. 2002). Der hersker imidlertid nogen usikkerhed om giftigheden af partikelbundne pyrethroider, hvor det hidtil har været opfattelsen, at partikelbundne pyrethroider i vandfasen har en stærkt nedsat biotilgængelighed og dermed mindre toksicitet end hvis de var på opløst form (Hill 1989, Yang et al. 2006a,b). Fortolkning af disse undersøgelser er imidlertid forbundet med en betydelig usikkerhed, ligesom forsøgsbetingelserne har stor betydning for resultaterne. Desuden er der nyere undersøgelser, der peger på en større toksicitet af partikelbundne insekticider end hidtil antaget (Rasmussen et al. 2013). Den mest sandsynlige forklaring på dette er, at pyrethroider i særlig høj grad bindes til kolloide partikelfraktioner, som kan medvirke til transport af stofferne ind i organismene, og dermed føre til en øget biotilgængelighed og toksicitet (Rasmussen et al. 2013). En række undersøgelser viser derudover, at sedimentbundet pyrethroid har såvel akut toksisk virkning på makroinvertebrater, ligesom de sedimentbundne stoffer kan medføre væsentlige adfærdændringer, forringet overlevelse, samt påvirkning af udviklingen via puppe til voksenstadium (Schulz & Liess 2001a,b, Maund et al. 2002, Maul et al. 2008). Set i det lys kan vores rangordning af de testede makroinvertebraters følsomhed/tolerance meget vel have gyldighed også for partikelbundne pyrethroider.

5.3 Kan Dansk Vandløbsfaunaindeks anvendes som pesticidindikator?

Dansk Vandløbsfaunaindeks er oprindelig udviklet til at afspejle effekten af tilført let-omsætteligt organisk stof, alene af den grund at det blev interkalibreret i forhold til en dansk udgave af det europæiske "saprobiesystem" (Andersen et al. 1984). Det har imidlertid vist sig, at det også i meget høj grad er følsomt over forskelle i for fysiske forhold (herunder graden af regulering af vandløb). DVFI er derfor i realiteten et generelt påvirkningsindeks (Olsen & Friberg 1999; Wiberg-Larsen et al. 2010). Spørgsmålet er så, om det også afspejler miljøfremmede stoffer som fx pesticider, og helt konkret lambda-cyhalothrin (og pyrethroider) således som det er temaet i denne rapport.

Spørgsmålet kan ikke besvares simpelt med enten ja eller nej. Når faunaklassen efter DVFI skal beregnes er det i første omgang afgørende, hvilken nøglegruppeindgang ud af i alt 6 mulige der skal benyttes (Miljøstyrelsen 1998). Er nøglegruppe indgangen 1 vil det i alle tilfælde resultere i en faunaklasse i den øvre halvdel af skalaen (4-7), dvs. en moderat til høj tilstand. Hvilken faunaklasse der konkret bliver resultatet, bestemmes af antallet af positive og negative diversitetsgrupper (for beregning af faunaklassen, se bilag 2). Er nøglegruppe indgangen derimod 6, vil faunaklassen i alle tilfælde blive 1, dvs. absolut dårligste tilstand, uanset antallet af positive og negative diversitetsgrupper. Vi fandt for slægter/familier med nøglegruppe status ingen entydig sammenhæng mellem nøglegruppe nummer (indgang) og følsomhed/tolerance over for lambda-cyhalothrin. Slægter/familier der er defineret som følsomme over for let-omsætteligt organisk stof (og dermed indikerer god-høj miljøkvalitet) i DVFI er således ikke nødvendigvis også blandt de mest følsomme over for lambda-cyhalothrin. Og selvom vi fandt, at positive diversitetsgrupper, som i DVFI er defineret som indikatorer for god miljøtilstand, var mere følsomme over for pyrethroidet end tilsvarende negative diversitetsgrupper, som i DVFI er karakteristiske for dårlig miljøtilstand, bidrager det ikke tilstrækkeligt til, at DVFI generelt kan betragtes som egnet til at afspejle effekter af pyrethroid. På den anden side – hvis et samfund af makroinvertebrater udsættes for en puls med meget højt indhold af lambda-cyhalothrin ($>2000-5000 \text{ ngL}^{-1}$), fx i forbindelse med vask af sprøjteudstyr på befæstet plads med direkte afløb til vandløbet, kan der tabes så mange nøglegruppeenheder (alle leddyr), at faunaklassen bestemmes til 1, hvilket indiskutabelt vil vise at der er noget "helt galt" med miljøtilstanden.

På denne baggrund bekræftes anden hypotese, nemlig at visse af de undersøgte organismer udviser en særlig følsomhed eller tolerance over for pyrethroider, der afviger fra deres følsomhed/tolerance i DVFI. Således kan tilstedeværelse eller fravær af disse organismer i indsamlede faunaprøver potentielt anvendes til specifikt at signalere om et samfund af makroinvertebrater har været udsat for væsentlig påvirkning fra pyrethroider. Der er altså som udgangspunkt basis (og gode argumenter) for at udvikle et indeks, som er særligt egnet til at afspejle effekten af tilførte pyrethroider. Spørgsmålet er så, om et sådant indeks alene skal baseres på arternes følsomhed/tolerance over for pyrethroider, eller om der også med fordel kan inddrages biologiske karakteristika ved arterne. Dette vil blive diskuteret i det følgende afsnit.

5.4 Anvendelighed af biologiske karakteristika til vurdering af pesticideffekter

Betydningen af biologiske karakteristika eller egenskaber (biological traits) ved arterne har siden midten af 1990'erne påkaldt sig stor opmærksomhed i den økologiske vandløbsforskning. Den grundlæggende præmis er, at de enkelte habitater – skabt af grundlæggende fysiske og kemiske forhold – er den platform, på hvilken evolutionen udformer en række for de enkelte arter karakteristiske egenskaber (se fx Townsend & Hildrew 1994). Disse egenskaber omfatter fx størrelse, kropsform, mobilitet, udnyttelse af føderesurser, formeringsstrategi, generationstid og spredningsevne, alle egenskaber som kan forudsiges i tid og rum ud fra tilstedeværende habitater.

5.4.1 Biologiske karakteristika og miljøpåvirkninger

Menneskeskabte påvirkninger af vandløbsøkosystemer indvirker naturligvis på arterne via disses egenskaber, og det er derfor nærliggende at anvende denne erkendelse i forbindelse med biomonitoring. Brug af biologiske egenskaber i monitorering er ikke ny, men har i realiteten været anvendt igennem et århundrede. Således bygger saprobiesystemet – og således også DVFI – på den forudsætning, at forskellige arter har forskellige krav til iltforholdene, og at de som følge heraf har forskellig følsomhed/tolerance over for tilførsel af spildevand rigt på let nedbrydeligt organisk stof. Denne sammenhæng er ret entydigt påvist for arter/slægter/familier, der indgår i DVFI (Friberg et al. 2010). Fordelen ved at bruge biologiske karakteristika ved vurdering af økologisk tilstand eller status er, at det er muligt at vurdere effekter på hele samfund af organismer på et generelt, robust og økologisk funderet teoretisk grundlag (fx Charvet et al. 1998, Gayraud et al. 2003, Archaimbault et al. 2010). Således giver de biologiske egenskaber almen gyldighed mulighed for ikke blot at vurdere effekten af miljøpåvirkninger inden for et givet vandløbssystem, eller vandløbssystemer inden for en afgrænset bioregion, men også på tværs af bioregioner uafhængigt af forskelle i artssammensætning. Særlig egenskaber som maksimum størrelse, antal afkom pr. generationscyklus, antal generationscyklusser pr. individ, livslængde hos voksne individer, formeringsmåde, yngelpleje, kropsform og fødesøgningsmetode har vist sig at have det største potentiale for at beskrive menneskeskabte påvirkninger (Gayraud et al. 2003). Dertil kommer at biologiske egenskaber har potentialet til at adskille betydningen af enkelte påvirkninger i situationer præget af multi-stressorer, altså hvor flere faktorer virker samtidig (Statzner & Bêche 2010). Det gælder tilsyneladende også i tilfælde, hvor en vigtig stressfaktor er tilførsel af pesticider (fx Liess & van der Ohe 2005; Liess et al. 2008).

5.4.2 Biologiske egenskaber og pesticider

Vi fandt generelt ingen tydelige sammenhænge mellem en række undersøgte biologiske karakteristika (primært reproduktion og spredningsevne) og følsomhed/tolerance over for lambda-cyhalothrin. Dette kan først og fremmest forklares ved, at der reelt ikke kan forventes nogen årsagssammenhænge mellem de fleste karakteristika og følsomhed/tolerance. Således er det usandsynligt, at der har foregået en udvikling (evolution) i såvel følsomhed som karakteristika, dels fordi tidshorisonten hvor pyrethroider har været i brug er alt for kort, dels fordi selektionspresset

må formodes at være relativt lille. Anderledes forholder det sig med de skadevoldende landlevende insekter, hvor der for flere arter, der bekæmpes massivt og ofte, og som har meget korte generationstider, er påvist udvikling af resistens (Williamson et al. 1996, O'Reilly et al. 2006).

Selvom der således ikke kan forventes en udvikling af biologiske karakteristika i forhold til pesticider, kan nogle karakteristika – fx sådanne som er relateret til føde - udmærket medvirke til at forstærke eller svække effekter af pesticider. Vi fandt imidlertid ingen sammenhæng mellem fødetype og følsomhed. Det betyder dog ikke, at det er ligegyldigt for arterne, hvor og hvordan de lever i deres naturlige miljø. Således kan arterne blive påvirket alene via deres fødeemner, hvis sidst nævnte er kontamineret med pyrethroid. Dette er påvist for en algegræsser som *Heptagenia sulphurea* (Nørum et al. 2011) og iturivere som *G. pulex* og *Chaetopteryx villosa*, der finder løvfældede blade fra træer langs vandløbene (Rasmussen et al. 2008, Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Dertil kommer at arter, som lever i (og måske af) fint organisk sediment, kan være særlig udsatte for påvirkning via de dertil bundne pyrethroider (Maund et al. 2003, Friberg et al. 2003).

For én egenskab, kropsstørrelse, kunne der umiddelbart forventes en sammenhæng (fx Buchwalter et al. 2002), hvis det forudsættes at de testede leddyr primært optager pyrethroidet direkte gennem huden (inkl. den del af denne som udgøres af gæller og som var forsøgt indregnet i overfladearealet ved vores undersøgelse). Ikke mindst må det forventes, at leddyrarter med relativt lille kropsstørrelse, og dermed et relativt stort overflade/volumen forhold, er mere følsomme end relativt større arter, hvor forholdet er relativt lille. Således fandt Cold & Forbes (2004) at nyklækkede unger af *G. pulex* var mere følsomme over for pyrethroidet end juvenile individer, som igen var mere følsomme end de voksne. Vores undersøgelse påviste tilsvarende en signifikant negativ sammenhæng mellem forholdet overfladeareal/vægt og dødelighed, altså at små arter er mere følsomme end større arter. Sammenhængen var dog ikke stærk, og vi fandt ingen sammenhæng for den adfærdsbetingede følsomhed. Der kan være flere forklaringer på dette. Dels var gradienten i størrelse relativt lille, dels kan der være forskel i overfladepermeabilitet fra art til art. Og frem for alt kan forskelle i kemisk sammensætning i nervecellernes natriumkanaler evt. sammen med enzymsystemer, der kan nedbryde pyrethroidet, være af mere afgørende betydning. Således afhænger såvel optagelse som eliminering af pyrethroidet formodentlig af arternes indhold af fedtstoffer (Rubach et al. 2010). Det vil derfor være nødvendigt at undersøge flere af disse af variable, før de morfofysiologiske mekanismer bag forskellen i følsomhed kan afklares.

5.4.3 Biologiske karakteristika i et SPEAR perspektiv

Biologiske egenskaber har specifikt været anvendt i en vurdering af effekter af pesticider i form af det såkaldte SPEAR (SPECies At Risk) indeks (fx Liess & van der Ohe 2005; Liess et al. 2008). Ud over følsomhed/tolerance over for stoffernes toksiske egenskaber indgår således endvidere til at rekolonisere påvirkede strækninger, når en given pesticidpåvirkning ophører. Indekset anvender herved arter af makroinvertebrater der hhv. er i risiko eller ikke i risiko for at blive elimineret, hvis vandløb udsættes for betydende pesticidpåvirkninger.

Den umiddelbare mangel på entydige sammenhænge mellem følsomhed/tolerance over for pyrethroid og biologiske karakteristika hos de arter, som vi testede, betyder ikke, at biologiske karakteristika ikke med fordel vil kunne anvendes som et element i et makroinvertebrat baseret pesticidindeks. De vil bare ikke kunne stå alene, men vil skulle kombineres med artsspecifik følsomhed/tolerance, ganske som det er tilfældet med SPEAR. I den forbindelse er det vores vurdering, at kombinationer af biologiske karakteristika, således som vi har foreslået for "grad af eksponering i vandløbsmiljøet", reproduktionspotentiale, og spredningsevne, kan bidrage til en videreudvikling af pesticidindikatorer som fx SPEAR. Dette er målet ved et igangværende projekt under Miljøstyrelsens Pesticidforskningsprogram.

6. Konklusion

Resultaterne af de simple laboratorieforsøg bekræftede projektets hovedhypotese, nemlig at følsomheden/tolerancen over for insekticidet lambda-cyhalothrin hos 34 undersøgte makroinvertebrater fra vandløb kunne rangordnes inden for et interval af nominelle koncentrationer fra ca. 10 til over 10 000 ngL⁻¹. Noget lignende er vist i udenlandske undersøgelser med eksponering af forsøgsdyr over 48-96 timer. Det nye er, at det også gælder for en eksponering over kun 1½ time, hvilket er mere miljørealistisk i vandløb, og som vi derfor anvendte i samtlige forsøg.

Det er desuden et spørgsmål om overordnet slægtskab, hvorvidt en art overhovedet bliver påvirket eller ej. Leddyr som krebsdyr og insekter udviste således effekter i form af øget dødelighed og afvigende adfærd, mens ikke-leddyr som orme, muslinger og snegle var helt upåvirkede.

Inden for leddyrene er der tilsyneladende ingen markante forskelle i følsomhed fra gruppe til gruppe. Insekter med ufuldstændig forvandling (døgnfluer og slørvinger) har dog lettere ved at komme sig efter endt påvirkning end mere avancerede insekter (fx biller, vårfluer, myg og fluer). Der kan til gengæld være meget stor forskel i følsomhed inden for den enkelte gruppe af leddyre.

Hos leddyrene er følsomheden over for lambda-cyhalothrin generelt 10-100 gange større for adfærdsmæssige effekter sammenlignet med dødelighed. Generelt er følsomheden størst under selve eksponeringen, hvor flere arter udviser unormalt forøget aktivitet. Sådan en øget aktivitet vil, overført til forholdene i et vandløb, medføre at et stærkt forøget antal individer transporteres bort med strømmen. Det betyder, at en puls af insekticid, sammen med øget dødelighed og forringet "fitness" hos de tilbageblevne dyr, vil resultere i markante ændringer i artssammensætningen.

Rangordningen af krebsdyr og insekters følsomhed viser desuden, at adfærden hos 20-50% af de undersøgte arter påvirkes i intervallet 10-100 ngL⁻¹, hvilket vurderes at være koncentrationer, som kan forekomme i danske vandløb.

Vi undersøgte kun effekten af ét pyrethroid, men en sammenstilling af data fra litteraturen tyder på, at den toksiske effekt af de i dansk landbrug øvrige anvendte pyrethroider er den samme som for lambda-cyhalothrin, og at resultaterne af denne undersøgelse derfor gælder disse pyrethroider.

Også projektets anden hypotese blev understøttet. Den fundne rangordning viser således, at det vil være muligt at designe et makroinvertebrat-baseret indeks, som er særligt egnet til at påvise tilførsler og effekter af pyrethroider. Denne konklusion er baseret på, at der ikke blev fundet nogen entydig sammenhæng mellem de testede arters indikatorværdi i Dansk Vandløbsfaunaindeks (DVFI), der er et indeks egnet til at afspejle påvirkninger i form af spildevand og fysiske forringelser af vandløbene, og deres følsomhed/tolerance over for lambda-cyhalothrin. Arter, der er indikatorer for et rent, naturligt vandløb, er således ikke nødvendigvis også indikatorer for et vandløb, som ikke er påvirket af pyrethroider. Det betyder samtidig, at DVFI ikke er egnet til at påvise tilførsel af pyrethroider.

Det lykkedes ikke at bekræfte projektets tredje hypotese, nemlig at der er en entydig sammenhæng mellem arternes følsomhed over for lambda-cyhalothrin og visse af deres biologiske egenskaber, og at forekomst/fravær af arter med bestemte egenskaber kan indikere, om et vandløb har været



DOVENFLUEN *SILALIS LUTARIA* ER RELATIVT FØLSOM OVER FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. DEN LEVER I OVERFLADEN AF FINT SEDIMENT, HVOR DEN FANGER OG SPISER ANDRE SMÅDYR. (FOTO: BIOPIX/J. CHR. SCHOU)

påvirket af pyrethroider. Relevante egenskaber er kropsstørrelse, tilknytning til særligt udsatte levesteder i vandløbene, formeringspotentiale og spredningsevne, alle egenskaber som formodes at have særlig betydning i forbindelse med pyrethroidpåvirkning. Manglen på sammenhæng mellem følsomhed og egenskaber betyder, at der ikke kan designes et pyrethroidindeks alene baseret på biologiske egenskaber.

Et kommende dansk makroinvertebrat-baseret pyrethroidindeks vil imidlertid med fordel kunne kombinere arters pyrethroidfølsomhed og arternes biologiske egenskaber. Dette princip er allerede taget i anvendelse i det i Tyskland udviklede indeks, SPEAR (SPECies At Risk), der også er baseret på makroinvertebrater. Data fra nærværende projekt vil på afgørende vis bidrage til en tiltrængt videreudvikling af dette indeks.

7. Perspektivering

7.1 Faglig perspektivering

Den foreliggende undersøgelse er såvel nationalt som internationalt af stor værdi og interesse, fordi der på et ensartet grundlag er undersøgt såvel adfærdsmæssige end-points som dødelighed for en bred suite af arter af makroinvertebrater fra danske vandløb. Med den store variation i følsomhed, som undersøgelserne har afsløret, er der således skabt et vidensgrundlag, som er velegnet til udvælgelse af specifikke arter, som vil kunne underkastes forskellige typer af undersøgelser af pesticideffekter. Helt konkret vil resultaterne fra projektet direkte finde anvendelse ved udvikling af en fremtidig pesticidskadesindikator til brug ved vurderingen af pesticidpåvirkning af danske vandløb.

Det betyder imidlertid ikke, at vi nu ved alt om, hvordan de mange arter af makroinvertebrater i danske vandløb påvirkes af pyrethroider – eksemplificeret ved lambda-cyhalothrin. Først og fremmest har vi ikke nødvendigvis for alle de undersøgte arter fundet den reelle nedre grænse for, hvornår der kan forventes betydende effekter. Dette skyldes primært forsøgstekniske årsager, hvor det kun for omkring halvdelen af arterne lykkedes kvantitativt at beskrive ændringer i dyrenes bevægelsesadfærd under og efter pulseksponeringen, ligesom det ikke kan udelukkes at mere miljørealistiske forsøg vil kunne afsløre effekter ved lavere koncentrationer end fundet ved vores relativt simple forsøg. Dertil kommer, at vores undersøgelse trods alt kun omfattede en mindre del af den betydelige biodiversitet, som findes i danske vandløb, ligesom vi kun har undersøgt effekter af ét af flere anvendte pyrethroider. Endelig har vi alene undersøgt effekter af opløst lambda-cyhalothrin. Som allerede omtalt er pyrethroider tungt opløselige i vand, ligesom de bindes let til såvel mineralske som organiske partikler og flader. Det er således ikke givet, at toksiciteten af partikelbundet pyrethroid er den samme, som når stofferne er på opløst form, om end nylige undersøgelser tyder på, at der ikke er væsentlig forskel i toksicitet hos *G. pulex* for visse adsorbenter, dvs. stoffer til hvilke pyrethroiderne bindes (Rasmussen et al. 2013).

Hvad specielt angår dækningen af biodiversiteten i danske vandløb viste vores resultater, at man generelt – hvad leddyrene angår – ikke ud fra arternes overordnede taksonomiske placering kan forudsige deres følsomhed over for pyrethroider (om end slørvinger generelt synes at være følsomme). Der kan således være væsentlig forskel mellem selv nærtstående arter. Det alene betyder, at der umiddelbart kan være behov for lignende undersøgelser af flere repræsentanter for samme slægt og familie, eller af andre familier.

De fundne resultater er umiddelbart egnede til at indgå i tests og videreudvikling af allerede eksisterende pesticidindices som fx det tysk udviklede SPEAR. I dette indgår også mål for en række arters biologiske egenskaber, primært de som er relateret til formering og spredning, fordi disse egenskaber er vigtige for arternes mulighed for at rekolonisere pesticidpåvirkede vandløbsstrækninger, når pesticidpåvirkningen er forsvundet eller mindsket. Men netop på dette område er der relativt lille viden om de enkelte arters spredningsevne, i særlig grad hvad angår de voksne insekters spredning over land mellem vandsystemerne. Der er således lille viden om spredningen i tid og rum. Kort sagt: der er et udtalt behov for indsamling af basal biologisk-økologisk viden om organismerne i danske vandløb.

7.2 Administrativ perspektivering

De opnåede resultater vurderes i sig selv ikke umiddelbart at få betydning for den danske godkendelsesordning for pesticider i form af helt ny initiativer. Resultaterne bekræfter således den allerede eksisterende erkendelse af, at pyrethroiderne i selv meget små koncentrationer har markante negative effekter på en betydelig del af makroinvertebraterne i vore vandløb, således at samfundene af disse organismer i betydelig grad kan forventes at blive påvirket af selv kortvarige pulse. Sådanne pulse forekommer typisk i forbindelse med kraftig regn umiddelbart efter sprøjtning af markerne. Det betyder, at det er afgørende at tilførslen af stofferne til vandløbene kan minimeres mest muligt, hvis det skal være forsvarligt at anvende dem. Pulse kan også forekomme i forbindelse med vinddrift, men for denne kilde foreligger der allerede en regulering i form af påbudte sikkerhedsafstande ved sprøjtning.

Resultaterne er dertil yderst relevante for vurderinger af, hvorfor fastsatte miljømål for danske vandløb ikke er opfyldt. Fravær af særlig pyrethroidfølsomme arter, som har betydning for hvordan Dansk Vandløbsfaunaindeks scorer, kan således forklare hvorfor et fastsat miljømål ikke er opfyldt i et givet vandløb, hvis andre potentielle negativt virkende miljøfaktorer som spildevandsbelastning og fysisk stress (dårlige fysisk forhold) samtidig vurderes som uvæsentlige. DVFI er dog som vist i denne undersøgelse ikke specielt egnet til at vise betydningen af påvirkning fra lambda-cyhalothrin (og sandsynligvis heller ikke andre pyrethroider eller pesticider i det hele taget). Der er derfor et stort behov for udvikling af en specifik pesticidskadesindikator baseret på makroinvertebrater. En sådan indikator vil ikke bare have betydning ved vurdering af, om specifikke miljømål er opfyldt, men også for hvor vidt virkemidler til minimering af pesticidpåvirkning af vandmiljøet har haft den ønskede virkning. Her vil resultaterne have betydning på både kort og længere sigt, på kort sigt i forhold til udvikling af en pesticidskadesindikator (se afsnit 7.1), og på længere sigt i forhold til vurderingen af effekten af relevante virkemidler.

Referencer

- Andersen MM, Riget FF & Sparholt H (1984): A modification of the Trent Index for use in Denmark. *Water Research*, vol. 18, s. 145-151.
- Archaimbault V, Usseglio-Polatera P, Garric J, Wasson J-G & Babut M (2010): Assessing pollution of toxic sediment in streams using bio-ecological traits of benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, vol. 55, s. 1430–1446.
- Ashauer R, Boxall A, Brown C. (2006): Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 25, s. 1899–1912.
- Baird DJ & Van den Brink PJ. (2007): Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 67, s. 296–301.
- Beketov M & Liess M (2008): Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 55, s. 247-253.
- Bossi, R, Sortkjær, O. & Juhler, R.K. (2009): Screening for udvalgte pesticider i vandløb og grundvand. *Arbejdsrapport fra DMU, nr. 252*.
- Brittain JE & Eikeland TJ (1988): Invertebrate drift – A review. *Hydrobiologia*, vol. 166, s. 77-93.
- Buchwalter DB, Jenkins JJ, Curtis LR (2002): Respiratory strategy is a major determinant of [3H]-water and [14C]-chlorpyrifos uptake in aquatic insects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 59, s. 1315–1322.
- 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>.
- Cedergreen N, Streibig JC & Spliid NH (2004): Pesticiders påvirkning af planter og alger i vandmiljøet. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen, nr. 89*, 84 s.
- Charvet S, Kosmala A & Statzner N (1998): Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: perspectives for a general tool in stream management. *Archiv für Hydrobiologie*, vol 142, s. 415-432.
- Cold A & Forbes VF (2004): Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology*, vol. 67, s. 287–299a
- European Commission (2005): Review report for the active substance cypermethrin finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 15 February 2005 in view of the inclusion of cypermethrin in Annex I of Directive 91/414/EEC. SANCO/4333/2000

final. Health & Consumer Protection Directorate-General, D3 - Chemicals, Contaminants and Pesticides.

Felding G, Mogensen BB, Sørensen JB, Hansen AC (1997): Surface run-off of pesticides from farmland to streams and lakes. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 29, 76 s.

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

Friberg N, Skriver J, Larsen SE, Pedersen ML & Buffagni A (2010): Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology*, vol 55, s. 1405–1419.

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

Gayraud S, Statzner B, Bady P, Haybachp A, Schöll F, Usseglio-Polatera P & Bacchi M (2003): Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an initial assessment of alternative metrics. *Freshwater Biology*, vol. 48, s. 2045-2064.

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

Giddings JM, Barber I & Warren-Hicks W (2009): Comparative aquatic toxicity of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its resolved isomer gamma-cyhalothrin. *Ecotoxicology*, vol 18, s. 239-249.

Hamer MJ, Ashwell JA, Gentle WE (1998): Lambda-cyhalothrin acute toxicity to aquatic arthropods. ZENECA Agrochemicals, Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, UK. Submitted to California Department of Pesticide Regulation. CDPR ID, s. 509-093.

Hand LH, Kuet SF, Lane MCG, Maund SJ, Warinton JS & Hill JR (2001): Influences of aquatic plants on the fate of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, s. 1740-1745.

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

Hendriks AJ, Van der Linde A, Cornelissen G, Sijm DTHM (2001): The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Enviro. Toxicol. Chem.*, vol. 20, s. 1399–1420.

Hill IR (1989): Aquatic organisms and pyrethroids. *Pesticide Science*, vol. 27, s. 429-457.

Kjølholt J, Ørum JE, Bøje C & Samsøe-Petersen L (2012): Bekæmpelsesmiddelstatistik 2011. Behandlingshyppighed og belastning. *Orientering fra Miljøstyrelsen*, nr. 5/2012, 66 ss.

Kronvang, B., Laubel, A., Larsen, S.E. & Friberg, N. (2003) Pesticides and heavy metals in Danish streambed sediment. *Hydrobiologia*, vol. 494, s. 93-101.

Laskowski DA (2002): Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 174, s. 49-170.

- Lauridsen RB Kronvang B & Friberg N (2006): Occurrence of sediment-bound pyrethroids in Danish streams and their impact on ecosystem function. *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 6, s. 423-432.
- Lauridsen RB & Friberg N (2005) Stream macroinvertebrate drift response to pulse exposure of the synthetic pyrethroid Lambda-cyhalothrin. *Environmental Toxicology*, vol. 20, s. 513-521.
- Liess M & Von der Ohe PC (2005): Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 24, s. 954-965.
- Liess M, Schäfer RB & Schriever CA (2008): The footprint of pesticide stress in communities – Species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment*, vol. 406, s. 484-490.
- Maltby L, Blake N, Brock TCM, Van den Brink PJ. (2005): Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 24, s. 379–388.
- Maul JD, Brennan AA, Harwood AD, Lydy MJ (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*, vol. 27, s. 2582-2590.
- Maund SJ, Hamer MJ, Warinton JS, Kedwards TJ (1998): Aquatic ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: considerations for higher-tier aquatic risk assessment. *Pesticide Science*, vol. 54, s. 408-417.
- Maund SJ, Hamer MJ, Lane MCG, Farrelly E, Rapley JH, Goggin UM & Gentle WE (2002): Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, s. 9-15
- Maund SJ (2009): The Aquatic Ecotoxicology of the Synthetic Pyrethroids: From Laboratory to Landscape. PhD thesis, Wageningen University, 188 s.
- McKnight US, Rasmussen JJ, Kronvang B, Bjerg PL, Binning PJ (2012): Integrated assessment of the impact of chemical stressors on surface water ecosystems. *Science of the Total Environment*, vol. 427-428, s. 319-331.
- Mian LS & Mulla MS (1992): Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.*, vol. 9, s. 73-98.
- Miljøstyrelsen (1998): Vejledning i bedømmelse af biologisk vandløbskvalitet. *Vejledning fra Miljøstyrelsen*, nr. 5/1998.
- Møhlenberg F, Kaas H, Schlüter L, Gustavson K, Andersen TT, Forbes V, Cold A, Friberg N, Larsen SE & Lauridsen RB (2004): Effekter af bekæmpelsesmidler på flora og fauna i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 82.
- Narahashi, T (1992): Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacological Science*, vol. 13, s. 236-241.
- Nielsen GC (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)

Nørgaard KB & Cedergreen N (2010): Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 17, s. 957–967.

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 SE (2006) Effekter af pulseksponering med pyrethroider på vandløbsinvertebrater - med særlig fokus på lambda-cyhalothrin. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 102, 100 s.

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

Olsen H-M & Friberg N (1999): De fysiske forhold og dansk vandløbsfaunaindeks. *Vand & Jord*, vol. 6, s. 113-116.

O'Reilly AO, Khambay BPS, Williamson MS, Field LM, Wallace BA & Davies TGE (2006): Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal*, vol. 396, s. 255–263.

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

Petersen CT, Nielsen MH, Hansen S, Abrahamsen P & Koch CB (2013): Undersøgelse af makroporekontinuitet ved markdræn og effekter af direkte forbundne makroporer på jords filterfunktioner. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 144, 142 s.

Posthuma L, Suter II G.W. & Traas TP (2001) (Eds.): Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton, FL (2001)

Rasmussen JJ, Friberg N & Larsen SE (2008): Impact of lambda-cyhalothrin on a macroinvertebrate assemblage in outdoor experimental channels: Implications for ecosystem functioning. *Aquatic Toxicology*, vol. 90, s. 228-234.

Rasmussen JJ, Baattrup-Pedersen A, Wiberg-Larsen P, McKnight US & Kronvang B (2011a): Buffer strip width and agricultural pesticide contamination in Danish lowland streams: Implications for stream and riparian management. *Ecological Engineering*, vol. 37, s 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*, vol. 13, s. 943-950.

Rasmussen JJ, Wiberg-Larsen P, Baattrup-Pedersen A, Monberg RJ, McKnight US & Kronvang B (2011c): Ny viden om effekter af pesticider i vandløb. *Vand & Jord*, vol. 18, s. 143-147.

Rasmussen, JJ (2012): Pesticide effects on the structure and function of stream ecosystems. PhD thesis, Aarhus University, Department of Bioscience. 197 s.

- Rasmussen JJ, Strobel BW, Kronvang B, Hansen HC (2013): Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, vol. xxx, 117 s.
- Rubach MN, Ashauer R, Maund SJ, Baird DJ & Van den Brink PJ (2010): Toxicokinetic variation in 15 freshwater arthropod species exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, s. 2225–2234.
- Schroer AFW, Belgers D, Brock TCM, Matser AM, Maund SJ, van den Brink PJ (2004): Comparison of laboratory single species and field population-level effects of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on freshwater invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 46, s. 324-335.
- Schulz R (1997): Aquatische Ökotoxikologie von Insektiziden. *Ecomed, Angewandter Umweltschutz*, 167 s.
- Schulz R & Liess M (1999a): Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, s. 2243-2250.
- Schulz R & Liess M (1999b): A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology*, vol. 46, s. 155-176.
- Schulz R & Liess M (2001a): Toxicity of aqueous-phase and suspended particle-associated fenvalerate: chronic effects after pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (Trichoptera). *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, s. 185–190.
- Schulz R & Liess M (2001b): Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms: Importance of biological interactions. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, s. 757-762.
- Schäfer RB, Caquet T, Siimes K, Mueller R, Lagadic L & Liess M (2007): Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, vol. 382, s. 272-285.
- Soderlund DM & Bloomquist, JR (1989): Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review Entomology*, vol. 34, s. 77-96.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Hall LW & Williams WM (1996): Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, s. 31-76.
- Statzner B & Bêche LA (2010): Can biological invertebrate traits resolve effects of multiple stressors on running water ecosystems? *Freshwater Biology*, vol. 55, s. 80-119.
- Styczen M, Wiberg-Larsen P & Aagaard A (2003): Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. *Vand & Jord*, vol. 10, s. 84-87.
- Townsend CR & Hildrew AG (1994): Species traits in relation to a habitat templet for river systems. *Freshwater Biology*, vol. 31, s. 265-275.
- Van Straalen NM (2002): Threshold models for species sensitivity distributions applied to aquatic risk assessment for zinc. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 11, s. 167–172.

- Van den Brink PJ. (2008): Ecological risk assessment: From book-keeping to chemical stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, s. 8999–9004.
- Verhaar HJM, De Jongh J, Hermens JLM (1999): Modeling the bioconcentration of organic compounds by fish: A novel approach. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, s. 4069–4072.
- Von der Ohe PC, Prüss A, Schäfer RB, Liess M, de Deckere E & Brack W (2007): Water quality indices across Europe – a comparison of the good ecological status of five river basins. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 9, s. 970-978.
- 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, Windolf J, Baattrup-Pedersen A, Bøgestrand J, Ovesen NB, Larsen SE, Thodsen H, Sode A, Kristensen E & Kjeldgaard A (2010): Vandløb 2009. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. *Faglig rapport fra DMU*, nr. 804, 98 s. <http://www.dmu.dk/Pub/FR804.pdf>
- Wiberg-Larsen P, Nørum U & Friberg N (2013): Betydningen af gentagne pulse af lambda-cyhalothrin for makroinvertebratfaunaen i vandløb (PESTPULS). *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 145, xx s.
- Wiggers L (1999): Pesticider i vandløb, kilder og søer i Århus Amt. *Teknisk rapport fra Natur og Miljøkontoret, Aarhus Amt*.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA & Devonshire AL (1996): Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.*, vol. 252, s. 51-60.
- Yang W, Spurlock F, Liu W & Gan J (2006a): Inhibition of aquatic toxicity of pyrethroid insecticides by suspended sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 25, s. 1913-1919.
- Yang W, Gan J, Hunter W & Spurlock F (2006b): Effect of suspended solids on bioavailability of pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 25, s. 1585-1591.
- Yates (2012): Yates Super Shield Nursery, Safety Data Sheet (vers. 3). <http://msds.duluxgroup.com/pdf/shess-en-cds-020-000000021235.pdf>
- Yordanova V, Stoyanova T, Traykov I & Boyanovsky B (2009): Toxicological effects of fastac insecticide (alpha-cypermethrin) to *Daphnia magna* and *Gammarus pulex*. *Biotechnol. & Biotechnol. EQ*, vol. 23, s. 393-395.

Bilag 1: Oversigt over indsamlingslokaliteter for de testede makroinvertebrater

Art	Vandløb/sø	Lokalitet	Dato for indsamling
<i>Dugesia gonocephala</i>	Højbjerg vandløbet (F)	OS Skovmarken	30.10.2011
Tubificidae	Holmebæk (F)	NS afløbet fra Søndersø Renseanlæg	16.3.2012
<i>Erpobdella octoculata</i>	Højris Å (MJ)	NS Ikast Renseanlæg	29.9.2011
<i>Helobdella stagnalis</i>	Assenbølle Bæk (F)	NS Vissenbjerg Renseanlæg	30.8.2012
<i>Asellus aquaticus</i>	Traunskov (F)	Vandhul langs Traunskovvej	22.9.2011
<i>Gammarus pulex</i>	Lindved Å (F)	Over Holluf	Oktober 2005
<i>Protonemura meyeri</i>	Jeksen Bæk (ØJ)	Kollens Mølle	9.3.2012
<i>Nemoura cinerea</i>	Vrads Kildebæk (ØJ)	NS Vrads Dambrug	23.3.2012
<i>Leuctra fusca</i>	Stavis Å (F)	Morud	17.6.2012
<i>Isoperla grammatica</i>	Jeksen Bæk (ØJ)	Kollens Mølle	20.4.2012
<i>Caenis horaria</i>	Vestermose (F)	Hasmark	13.4.2012
<i>Cloeon inscriptum</i>	Elverod (F)	Morud (vandhul v. Elverodvej)	13.4.2012
<i>Heptagenia sulphurea</i>	Brende Å (F)	Kerte Bro	8.4.2012
<i>Ephemera danica</i>	Gudenå (ØJ)	Opstrøms Klostermølle	28.10.2011
<i>Sialis lutaria</i>	Brorenden (F)	Freltoftevej	13.11.2011
<i>Oreodytes sanmarkii</i>	Skærup Å (F)	NS Skærup Renseanlæg	18.6.2012
<i>Elodes minuta</i>	Afløbet fra Freltofte Mose (F)	Freltofte Mose	20.11.2011
<i>Elmis aenea (larve)</i>	Kragelund Møllebæk (F)	NS Tolsvad Bro	6.5.2012
<i>Limnius volckmari</i>	Stavis Å (F)	Morud	7.5.2012
<i>Agapetus fuscipes</i>	Limkilde (Fyn)	Limkilde, Morud	23.3.2012
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	Milling Bæk (ØJ)	Afløb fra Slåen Sø	9.4.2012
<i>Chaetopteryx villosa</i>	Jeksen Bæk (ØJ)	Kollens Mølle	26-29.4.2012
<i>Silo pallipes</i>	Jeksen Bæk (ØJ)	Kollens Mølle	21-22.4.2012
<i>Beraeodes minutus</i>	Brorenden (F)	Freltoftevej	20.11.2011
<i>Ptychoptera paludosa</i>	Gudenå (ØJ)	Opstrøms Klostermølle	11.11.2011
<i>Dicranota</i>	Hadsten Lilleå (ØJ)	NS Hadsten Renseanlæg	9.3.2012
<i>Ordagmia ornata</i>	Vrads Kildebæk (ØJ)	NS Vrads Dambrug	16.3.2012
<i>Conchapelopia menalops</i>	Lystrup Å (ØJ)	NS Kulsø, Bryrup	10.5.2012
<i>Prodiamesa olivacea</i>	Salten Å (ØJ)	Øst for Fløjlsøj	26.4.2012
<i>Tvetenia sp.</i>	Afløb fra Raving Skov (ØJ)	NS Raving Dambrug, Vingsted	14.8.2012
<i>Micropsectra sp.</i>	Salten Å (ØJ)	Øst for Fløjlsøj	17.8.2012
<i>Chironomus luridus agg.</i>	Kohave (F)	Vej S.f. Gyldensten, før udløb i Ålebæk	23.8.2012
<i>Eristalis tenax</i>	Hedemose Grøft (EJ)	Ø.f. Nygård (Djursland)	23.8.2012
<i>Radix baltica</i>	Højris Å (MJ)	Afløb fra Ikast Renseanlæg	29.9.2011
<i>Sphaerium corneum</i>	Stavis Å (F)	Rugaard	30.8.2012

I parentes angivet region: F – Fyn, ØJ (Østjylland), MJ - Midtjylland

Bilag 2: Beregning af faunaklasse efter Dansk vandløbsfaunaindeks

Nøglegruppe indgang (NG)	Antal nøglegruppe taxa	Antal diversitetsgrupper			
		≤2	÷1-3	4-9	≥10
Nøglegruppe 1: Brachyptera, Capnia, Leuctra, Isogenus, Isoperla, Isoptena, Perlodes, Protonemura, Siphonoperla	≥ 2		5	6	7
Ephemera Limnius Glossosomatidae, Sericostomatidae	1		4	5	6
Nøglegruppe 2: Amphinemura, Taeniopteryx Ametropodidae, Ephemerellidae, Hepatageniidae, Leptophlebiidae, Siphonuridae Elmis, Elodes (Odeles) Rhyacophilidae, Goeridae Ancylus Hvis <i>Asellus</i> ≥5 prøves nøglegruppe 3 Hvis <i>Chironomus</i> ≥5 prøves nøglegruppe 4		4	4	5	5
Nøglegruppe 3: Gammarus ≥10 Caenidae Andre Trichoptera* end nævnt under NG 1 & NG 2 ≥5 Hvis <i>Chironomus</i> ≥5 prøves nøglegruppe 4		3	4	4	4
Nøglegruppe 4: Gammarus ≥10, <i>Asellus</i> Caenidae Sialis Andre Trichoptera end under NG 1 & 2	≥ 2	3	3	4	
	1	2	3	3	
Nøglegruppe 5: Gammarus Baetidae Simuliidae ≥25 Hvis <i>Oligochaeta</i> ≥100 benyttes NG 5 (1 gruppe) Hvis <i>Eristalis</i> ≥2 benyttes nøglegruppe 6	≥2	2	3	3	
	1 eller <i>Oligochaeta</i> ≥100	2	2	3	
Nøglegruppe 6: Tubificidae, Psychodidae, Chironomidae, <i>Eristalis</i> Hvis ingen af de nævnte taxa er til stede gås til nøglegruppe 7		1	1		
Nøglegruppe 7:		1			

* Andre Trichoptera omfatter familier såvel med som uden transportable huse

Manuelt beregnes faunaklassen ved brug af tabellen ovenfor således:

- Der vælges én af de i alt 7 nøglegruppe indgange (rækkerne i skemaet). Først undersøges, om der er én eller flere af de nævnte taxa (slægter/familier) fra nøglegruppe 1 til stede i prøven: Et taxon regnes for at være til stede, hvis antallet i sparkeprøven er mindst 2 eller hvis det er fundet i pilleprøven. Er der nøglegruppe 1 taxa til stede, anvendes den vandrette indgang under denne nøglegruppe. I modsat fald gås til nøglegruppe indgang 2. Er der repræsentanter for denne til stede, anvendes den vandrette indgang under denne nøglegruppe. Tilstedeværelse vurderes som angivet ovenfor. Kan nøglegruppe 2 ikke benyttes, gås videre til nøglegruppe 3 for at undersøge, om betingelserne for at anvende denne indgang er til stede. Proceduren fortsættes indtil der findes en indgang, som opfylder betingelserne. Bemærk at der for nogle taxa skal anvendes andre kriterier for tilstedeværelse end under nøglegrupperne 1 og 2: Fx ≥ 5, 10, 25 eller 100 (under nøglegruppe indgang 3, 4 og 5).

- Nøglegruppe indgangene er underopdelt i to efter antallet af repræsentanter for nøglegruppen (1 eller ≥ 2). Der vælges den relevante indgang (række).
- Under nøglegruppe indgangene 2, 3, 4 og 5 er der nogle undtagelsesbestemmelser, som betyder at selvom betingelserne egentlig er opfyldt, må indgangen ikke benyttes, hvis der forekommer fx ≥ 5 *Asellus* eller *Chironomus*. I stedet går til næste nøglegruppe indgang.
- Når der er fundet en egnet nøglegruppeindgang, vælges kolonnen med det antal diversitetsgrupper, som forekommer i prøven. Tallet i "skæringspunktet" (cellen) er faunaklassen for den pågældende prøve. Antallet af diversitetsgrupper beregnes som: antallet af positive diversitetsgrupper \div antallet af negative diversitetsgrupper. Definitionen på hhv. positive og negative diversitetsgrupper fremgår af følgende tabel. En given diversitetsgruppe er til stede, hvis der blot forekommer ét individ i sparkeprøven, eller den er fundet i pilleprøven.

Positive diversitetsgrupper	Negative diversitetsgrupper
<i>Tricladida</i> (fimreorme)	<i>Oligochaeta</i> (børsteorme) ≥ 100
<i>Gammarus</i> (ferskvandstangloppe)	<i>Helobdella</i> (bruskigle)
Hver slægt af Plecoptera (slørvinger)	<i>Erpobdella</i> (hundegle)
Hver familie af Ephemeroptera (døgnfluer)	<i>Asellus</i> (vadbænkebidere)
<i>Elmis</i> (klobille)	<i>Sialis</i> (dovenflue)
<i>Limnius</i> (klobille)	Psychodidae (sommerfuglemyg)
<i>Elodes</i> (eller <i>Odeles</i>) (bille)	<i>Chironomus</i> (dansemyg)
Rhyacophilidae (vårflue)	<i>Eristalis</i> (rottehale)
Hver familie af Trichoptera (vårfluer) med "bærbare" huse	<i>Lymnea</i> , <i>Glabra</i> , <i>Stagnicola</i> , <i>Radix</i> (mosesnegle)
<i>Ancylus</i> (huesnegl)	<i>Sphaerium</i> (bønnemusling)

Rangordning af vandløbssmådyrs tolerance over for miljørealistiske koncentrationer af pyrethroider

Ved marksprøjtning havner insekticider undertiden i vandløb. Især pyrethroider er giftige for vandløbenes smådyr. Følsomheden af pyrethroidet lambda-cyhalothrin blev ved simple laboratorieforsøg undersøgt hos 34 arter af sådanne smådyr. Hos krebsdyr og insekter kunne følsomheden rangordnes inden for intervallet 10-10 000 nanogram pr. liter, mens orme, igler, snegle og muslinger var helt upåvirkede. Der var ingen klar forskel mellem insektgrupper/krebsdyr, men typisk stor forskel inden for den enkelte gruppe. Arternes følsomhed var større hvad angik ændringer i adfærd end dødelighed. Ændret adfærd kan i naturen betyde, at en art forsvinder fra en pyrethroidpåvirket strækning. Resultaterne viser også, at Dansk vandløbsfauna Indeks er uegnet som pesticidindikator. Til gengæld kan resultaterne bruges ved udviklingen af en dansk pesticidindeks for vandløb.



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

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

www.mst.dk