



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand

Bekæmpelsesmiddelforskning nr. 155,
2014

Titel:

Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand

Forfattere:

Jes Jessen Rasmussen¹, Bjarne W. Strobel², Brian Kronvang¹, Ulrik Nørum^{1*} & Hans Christian Bruun Hansen²

¹Institut for Bioscience, Aarhus Universitet

²Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet

*Nu Nyborg Gymnasium

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2014

ISBN nr.

978-87-93178-10-6

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	7
Summary	9
1. Indledning	11
1.1 Baggrund og nuværende videngrundlag	11
1.2 Formål	13
2. Metoder	15
2.1 Projektets overordnede struktur	15
2.2 Kritisk evaluering af eksisterende viden	16
2.3 Analyse af internationale overvågningsdata.....	16
2.3.1 Rationale for valg af internationale samarbejdspartnere.....	16
2.3.2 Dataindsamling i Sverige, Norge og Tyskland	16
2.4 Analytisk kemi til bestemmelse af insekticider i komplekse økotoksikologiske opløsninger med suspenderede sorbenter	16
2.5 Økotoksikologi: tilstandsform og skadevirkning.....	18
2.5.1 Rationale for valg af forsøgsdesign	18
2.5.2 Bevægelsesadfærd og oplevelse hos <i>Gammarus pulex</i>	19
2.6 Statistik.....	21
3. Kritisk evaluering af eksisterende viden	22
3.1 Transport, skæbne og skadevirkning i vandløb	22
3.2 Sorptionens betydning for skadevirkninger hos vandløbsinvertebrater	23
3.2.1 Sedimentsorption og giftighed: laboratorie- og strømrendeforsøg	23
3.2.2 Sedimentsorption og giftighed: feltundersøgelser.....	26
3.2.3 Sorption til fødeemner	27
3.3 Adsorption af stærkt hydrofobe pesticider til sediment-partikler	27
4. Analyse af internationale overvågningsdata	33
4.1 Sammenligning af resultater fra monitoringsprogrammer af pesticider	33
4.1.1 Resultater fra overvågningsprogrammer i Sverige	33
4.1.2 Resultater fra overvågningsprogrammer i Norge.....	39
4.1.3 Resultater fra overvågningsprogrammer i Slesvig-Holsten	41
4.1.4 Sammenligning af resultater fra overvågningsprogrammer	42
4.1.5 Overvågning af pesticider i vandløbssediment	44
4.1.6 Betydning af flowproportional prøvetagning.....	44
5. Resultater	45
5.1 Bestemmelse af hydrofobe insekticider i komplekse opløsninger	45
5.1.1 Adsorption af lambda-cyhalothrin til montmorillonit og humussyre i økotoksikologiske videosporings-arenaer.....	45
5.1.2 Adsorptionsisothermer for lambda-cyhalothrin til montmorillonit og humussyre	47
5.1.3 Usikkerhedsmomenter ved sorptionsforsøg med lambda-cyhalothrin og model sorbenter	51

5.1.4	Sammenligning af målte og beregnede koncentrationer af lambda-cyhalothrin i fri opløsning i videosporingsforsøgene	53
5.2	Økotoksikologi: Tilstandsform og skadevirkning.....	53
5.2.1	Range-finding-studium med thiacloprid	53
5.2.2	Range-finding-studium med pirimicarb.....	55
5.2.3	Valideringsforsøg med lambda-cyhalothrin	57
5.3	Betydningen af lambda-cyhalothrins tilstandsform for dets skadevirkninger på <i>Gammarus pulex</i>	59
5.3.1	Humussyre som sorbent	59
5.3.2	Montmorillonit som sorbent	63
6.	Diskussion	69
6.1	Overvågningsdata	69
6.2	Sorption og fordelingskoefficienter.....	70
6.3	Økotoksikologi: tilstandsform og skadevirkning.....	71
7.	Konklusioner	75
7.1	Opsamling af international viden.....	75
7.2	Internationale overvågningsdata	75
7.3	Sorption og fordelingskoefficienter.....	75
7.4	Insekticid og sorbent-effekt-forsøg.....	76
7.5	Forsøgsmanualer	77
8.	Perspektivering.....	79
8.1	Feltundersøgelser relateret til forekomst og transport	79
8.2	Laboratorieundersøgelser af fysisk-kemiske forhold	79
8.3	Økotoksikologi	79
	Referencer	81
Bilag 1:	Interview form for the Danish EPA project – Monitoring data	85
Bilag 2:	Eksempel på data fra det svenske overvågningsprogram	101
Bilag 3:	Forsøgsmanualer for anvendelse af videosporingsudstyr	107

Forord

Denne rapport fremlægger resultatet af et pilotprojekt rettet mod skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand. I tidligere studier af skadevirkninger af insekticider har der hovedsageligt været fokus på at evaluere effekter af frit opløste insekticiders skadevirkninger gennem kontrollerede forsøg med kortvarige pulsdoseringer af insekticidet. Der er et stort behov for at øge vores viden omkring mere realistiske eksponeringsforsøg hvor der tages hensyn til at der kan være en meget stor forskel på insekticiders giftighed afhængig af det enkelte stofs fysiske-kemiske egenskaber og deres tilstandsform (bundet, opløst, fri fase) ved udledningen til overfladevand, samt deres skæbne i overfladevand. Særlig betydning har insekticiders sorption til organiske eller uorganiske forbindelser så som humusstoffer eller lersilikat-mineraler. Såvel bestemmelsen af forekomsten af insekticider i overfladevand ved målinger, samt insekticidets giftighed overfor organismer vil forventeligt afhænge stærkt af stoffets binding til forskellige sorbenter der er til stede i vandet. I pilotprojektet er der fokuseret på en gennemgang af den internationale litteratur omkring studier af sorption af insekticider og sorptionens betydning for skadevirkninger hos vandløbsinvertebrater. Desuden er der gennemført en opsamling af viden omkring forekomst af hydrofobe (=lipofile) insekticider og fungicider fra internationale overvågningsprogrammer. Endelig er der gennemført kontrollerede sorptionsforsøg med lambda-cyhalothrin til lermineralet montmorillonit og humussyre, samt gennemført kortvarige pulsdoserings-forsøg (90 minutter) med blandinger af lambda-cyhalothrin og de to sorbenter ved forskellige koncentrationer af både insekticid og sorbenter. Behovet for videre undersøgelser på baggrund af dette pilot projekt er perspektiveret, og der er hertil udarbejdet en forsøgs-protokol.

Nedennævnte deltagere i projektets følgegruppe takkes for gode kommentarer og diskussioner om projektets resultater:

- Hans Jørgen Henriksen, GEUS
- Carsten Tilbæk Petersen, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet
- Dean Jacobsen, Biologisk Institut, Københavns Universitet
- Jørn Kirkegaard, Miljøstyrelsen
- Anne Louise Gimsing, Miljøstyrelsen
- Merete Styczen, Adjungeret Professor, Københavns Universitet
- Rasmus Søgaard, Miljøstyrelsen
- Peter Jørgensen, PJ-Bluetech
- Hans Roust Thysen, Videncentret for Landbrug
- Niels Lindemark, Dansk Planteværn
- Peter Wiberg-Larsen, Institut for Bioscience, Aarhus Universitet
- Walter Brüsch, GEUS
- Poul Løgstrup Bjerg, Institut for Vand og Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet
- Vibeke Ernstsén, GEUS
- Jørgen Jakobsen (udtrådt pr 12. februar 2012)
- Hans-Jørgen Albrechtsen, Institut for Vand og Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet (udtrådt pr 28. oktober 2011)
- Philipp Mayer, Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet

Sammenfatning

I en nyere undersøgelse af 15 danske vandløbssedimenter blev pyrethroiderne cypermethrin og tau-fluvalinat fundet i henholdsvis 27% og 13% af prøverne i koncentrationer på henholdsvis 1,52-4,84 og 3,64-11,84 µg/kg sediment (tørvægt) (Bossi *et al.* 2009). Pyrethroidet lambda-cyhalothrin er endvidere tidligere blevet fundet i danske vandløbssedimenter, med en fundprocent på 6,7% og en maksimum-koncentration på 20 µg/kg sediment (tørvægt) (Kronvang *et al.* 2003; Friberg *et al.* 2003; McKnight *et al.* 2012). Endeligt dokumenterer nærværende rapport, at pyrethroiderne alpha-cypermethrin og esfenvalerat er fundet i Sverige, under meget sammenlignelig landbrugspraksis, i henholdsvis 5% og 43% af 42 analyserede sedimentprøver i koncentrationer på op til henholdsvis 5,5 og 7,5 µg/kg sediment (tørvægt).

I Sverige og Danmark er vandløbssediment udtaget fra bunden af vandløb. Der er konstateret rester af pesticider i en del af prøverne og især af de hydrofobe pesticider, som sjældent spores i vandfasen. I vandfasen er der således i mere end 700 vandprøver en fundprocent på 0,1% med en maksimumkoncentration på under 0,1 µg/l af alpha-cypermethrin i det svenske overvågningsprogram, hvilket er langt lavere end observeret for fund og koncentrationer i sedimenter som angivet ovenfor. For esfenvalerat er der en lige så udpræget forskel i fundprocent i vandprøver (2,4%) sammenlignet med sedimentprøver (43%). Prøvetagningsmetoden er uhyre vigtig for, om kortvarige pulser af pesticider måles under regn, da de mere hydrofobe pesticider er påvist især at forekomme som pulse i vandløb umiddelbart efter regnhændelser.

Tidligere undersøgelser af sedimentbundne insekticider har påvist, at insekticider bundet til partikler har en stærkt nedsat biotilgængelighed og dermed giftighed. Fortolkning af disse undersøgelser er imidlertid forbundet med en betydelig usikkerhed, ligesom forsøgsbetingelserne har stor betydning for resultaterne, og desuden er der nyere undersøgelser, der peger på en større giftighed af partikelbundne insekticider end hidtil antaget. Derfor er det muligt, at de ovennævnte rapporterede fund af sedimentbundne pyrethroider kan have betydelig økotoxikologisk interesse, da de sedimentbundne pyrethroider, samt pyrethroider bundet til dyrenes fødeemner, kan udgøre en risiko for invertebratfaunaen i danske vandløb.

Der er i tidligere forsøg vedr. partikelbundne hydrofobe insekticiders sorption og giftighed store usikkerheder forbundet med metoden, bl.a. vedr. insekticidernes sorption til udstyret, anvendelse af nominelle koncentrationer i stedet for målte koncentrationer, anvendelse af pyrethroider i koncentrationer der langt overstiger deres vandopløselighed, sediment:vand forholdet, dosering af insekticid, eksponeringsmetoden, separation af vand og sediment, og analysemetoden. Et nyere studium viser at den eksperimentelle metode har større betydning end forskellen mellem sedimenter. Desuden er der også betydelig usikkerhed forbundet med den analytiske metode der benyttes til monitorering af pyrethroiderne i vand og sediment, hvorfor monitoringsresultater også skal tages med et vist forbehold.

De høje fundprocenterne for sedimentbundne insekticider sammenholdt med de ovennævnte store usikkerheder omkring tolkning af sorption- og giftighedsdata for de samme stoffer kalder på en kritisk gennemgang af litteraturen samt øger behovet for forsøg vedr. kemisk analyse, sorption og giftighed af pyrethroider i vand-sediment systemer.

I nærværende projekt er sorption af lambda-cyhalothrin til de to almindelige sorbenter i sediment, humussyre og montmorillonit, blevet undersøgt i to typer systemer: i) sorbenter i centrifugeglas, og

ii) sorbenter i polystyren-arenaer der anvendes i de efterfølgende eksponeringsscenarier. I forsøg med kvantificering af sorption ved den direkte metode (dvs. med direkte bestemmelse af den sorberede mængde lambda-cyhalothrin ved ekstraktion af sorbenten) varierede K_d værdier fra 840 til 230×10^3 L/kg – fra høj til lav sorbentkoncentration; altså et enormt spænd. For sorptionsforsøg i arenaerne fandtes at når der var tilsat sorbent sorberedes der negligérbare mængder lambda-cyhalothrin til polystyren-arenaernes vægge. I disse forsøg fandtes K_d værdier i intervallet 680 to 76×10^3 L/kg, og dermed i store træk i samme niveauer som for sorptionsisotherm-forsøgene. Overraskende fandtes, at sorptionen til humussyre og montmorillonit var af samme størrelsesorden.

Humussyre reducerede generelt den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin hos testorganismen *Gammarus pulex* med adfærdsparametre såvel som dødelighed som målparametre. Der var ingen signifikant koncentrationseffekt af humussyre, men tilsætning af humussyre hæmmede og forsinkede generelt den akutte adfærdsrespons under eksponering, og både mortalitet og gennemsnitlig bevægelsesadfærd blev reduceret gennem restitutionperioden. Imod forventning fandtes, at den uorganiske sorbent montmorillonit ikke reducerede den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin på adfærdsparametre og mortalitet hos *G.pulex*. Der var ikke nogen signifikant koncentrationseffekt af montmorillonit, men tilsætning af montmorillonit forøgede fraktionen af immobiliserede individer sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin under eksponering. Ligeledes blev selve hyperaktivitetsperioden forkortet ved tilsætning af montmorillonit, hvilket fremskyndte immobiliseret tilstand sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin. Montmorillonits potentierende effekt på lambda-cyhalothrin blev yderligere dokumenteret i hele restitutionperioden, hvor både mortalitetsrate og fraktionen af immobiliserede individer var signifikant forøget sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin. LC_{50} værdierne blev reduceret med cirka 50% ved tilsætning af montmorillonit sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin, hvilket indikerer, at den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin var omtrent fordoblet ved tilsætning af montmorillonit.

Projektet har således for både den kemiske delundersøgelse som for den biologiske effektundersøgelse givet overraskende resultater. Vi vurderer, at den mest sandsynlige forklaring ligger i den kolloide fraktions betydning. Ved sorptionsundersøgelserne er lambda-cyhalothrin bundet til den kolloide fraktion blevet medbestemt som opløst. Dette tyder ligeledes på, at den kolloide fraktion har en meget høj affinitet for binding af lambda-cyhalothrin. På effektsiden kan kolloidfraktionen således medvirke til transport af pyrethroid til testorganismen, og dermed føre til en øget biotilgængelighed og giftighed – en effekt der er mest udpræget for montmorillonit, og som formentlig skyldes at lambda-cyhalothrin hurtigere desorberer fra montmorillonit end humussyre. Imidlertid gælder at såvel for humussyre som for montmorillonit er den forventede reduktion af giftighed som følge af sorption udeblevet. Projektet henleder således opmærksomheden på betydningen af de mindste (naturlige nano-) partikler for sorption, transport og giftighed af stærkt hydrofobe insekticider. Desuden peger projektet på en række metodiske, herunder analytisk-kemiske, forhold, der kræver yderligere studier for anvendelse i fremtidige sorptions-, eksponerings- og monitoringsprogrammer.

Summary

In recent investigations of 15 Danish stream sediments the pyrethroids cypermethrin and tau-fluvalinat were detected in 27% and 13% of all samples at concentration of 1.52 – 4.84 and 3.64 – 11.8 µg/kg sediment (DW), respectively (Bossi *et al.* 2009). Other investigations show that the pyrethroid lambda-cyhalothrin has been encountered in 6.7% of all samples with a maximum concentration of 20 µg/kg (DW) (Kronvang *et al.* 2003; Friberg *et al.* 2003; McKnight *et al.* 2012). Finally, this report contains a review of monitoring data from agricultural dominated catchments in Sweden similar to the investigated Danish catchments, showing that the pyrethroids alpha-cypermethrin and esfenvalerat was detected in 5% and 43% of 42 sediments analysed, and at maximum concentrations of 5.5 and 7.5 µg/kg (DW), respectively.

In Sweden and Denmark, stream sediments have been sampled from the streambeds. Pesticide residues have been found in part of the samples, and mainly those hydrophobic pesticides that are seldom encountered as dissolved in the water phase. Hence, for alpha-cypermethrin which as described above is common in sediment samples, the frequency in water samples is 0.1% and at concentrations far below 0.1 µg/L; for esfenvalerat which is even more common in sediment samples the frequency in water samples is 2.4%. Hence, hydrophobic pyrethroids seem highly concentrated in sediments. The sampling strategy is of extreme importance, as most of the hydrophobic pesticides show highest frequency in leaching and runoff immediately following precipitation events.

Previous investigations of sediment-bound insecticides have demonstrated that insecticides sorbed to particles have reduced bioavailability and toxicity. However, interpretation of the experimental results is not straightforward, and the results are also very sensitive to the exact methodology and experimental conditions used. Furthermore, new investigations indicate that particle-bound insecticides are more toxic than believed hitherto. Hence, it is possible that the recent monitoring data for sediment-bound pyrethroids has a significant ecotoxicological impact, in particular for the invertebrate fauna in streams.

Previous investigations of sorption and toxicity of hydrophobic insecticides are hampered by large uncertainties due to methodology, e.g. sorption of the insecticides to the equipment used, use of nominal added insecticide concentrations instead of measured concentrations, use of insecticides at concentrations far exceeding their aqueous solubility, sediment:water ratios (usually too high), dosing of insecticide to sediments, exposure to test organisms, separation of water and sediment, and the analytical method. A recent investigation demonstrates that the selection of methodology has stronger influence on the results than the difference between sediments investigated. Also the separation and analytical methods used for determination of insecticides in sediments is a source of substantial uncertainty and hence also monitoring data should be read with caution.

The observed high frequencies of sediment-bound insecticides together with the high uncertainties with respect to interpretation of sorption- and toxicity data call for a critical examination of the existing literature and also urge the need for experimental investigations of chemical analysis, sorption and toxicity of pyrethroids in water-sediment systems.

In the present project we have investigated sorption of lambda-cyhalothrin to two common stream sediment particle types, viz. humic acids and montmorillonite, for two experimental setups: *i*) sorbents shaken with lambda-cyhalothrin in centrifuge glasses, and *ii*) sorbents mixed with lambda-

cyhalothrin in polystyrene containers, containers which are also used in the subsequent toxicity assays. In experiments where sorption was determined by the direct method, i.e. the sorbed amount of lambda-cyhalothrin was determined by extraction of the sorbents, it was found that the K_d values ranged between 840 and 230×10^3 L/kg – from high to low sorbent concentrations (125 mg/kg to 5 mg/kg). For the sorption experiments in the polystyrene containers it was found that only negligible amounts of lambda-cyhalothrin sorbed to the container walls when particles were added to the systems. In these experiments K_d values ranged between 680 - 76×10^3 L/kg, and hence not very different from the K_d values observed in the centrifuge tube experiments. Contrary to expectations it was found that sorption to montmorillonite was as strong as sorption to humic acids.

In general, humic acid reduced the toxic effect of lambda-cyhalothrin to the test organism *Gammarus pulex* using behavioural (organism travel path) parameters as well as mortality as measured variables. No significant effect of humic acid concentrations were observed, but addition of humic acid reduced and delayed the acute behavioural response, and both the mortality and the average behavioural response were reduced during the restitution period – compared with experiments where no humic acid was added. Contrary to expectations, the inorganic clay silicate sorbent montmorillonite did not reduce the toxic effect of lambda-cyhalothrin to *G. pulex*. As for humic acid no significant concentration effect of montmorillonite could be detected, but addition of montmorillonite increased the fraction of immobilised organisms during exposure compared with no addition of montmorillonite. Furthermore, the addition of montmorillonite shortened the hyperactivity period leading to faster immobilization. The toxicity triggering effect of montmorillonite was observed during the full restitution period too, where both the mortality rate and the fraction of immobilized organisms were significantly increased compared with experiments with lambda-cyhalothrin alone. The LC₅₀-values were reduced by approximately 50% due to addition of montmorillonite, showing that the toxic effect of lambda-cyhalothrin was almost doubled when montmorillonite was added.

In conclusion, the project has shown new and expected results both with respect to sorption and with respect to ecotoxicological effects. Possibly, the colloidal fraction of the added particles may explain the results. Hence, in the sorption experiments lambda-cyhalothrin sorbed to the colloidal particle fraction has been included as part of the dissolved lambda-cyhalothrin fraction as the colloidal fraction remained in the solution phase even after centrifugation and/or sedimentation. This also indicates that the colloidal fraction has very high K_d values. Colloidal particles help to transport lambda-cyhalothrin to the test organism and hence increase bioavailability and toxicity. This effect is most pronounced for montmorillonite, and the likely reason is that lambda-cyhalothrin desorbs faster from montmorillonite than humic acid. The project points to the significance of the smallest (natural nano-) particles for sorption, transport, and toxicity of highly hydrophobic insecticides. In addition, the project points to a number of methodological problems including chemical analysis and partitioning of pyrethroids as important in future studies of sorption, exposure and monitoring programs.

1. Indledning

1.1 Baggrund og nuværende videngrundlag

Det er veldokumenteret, at anvendelsen af pesticider på dyrkede arealer fører til kontaminering af ferskvandsøkosystemer (Mathiessen *et al.* 1995; Felding *et al.* 1997; Schulz & Liess 1999a, b; Friberg *et al.* 2003; Kronvang *et al.* 2003a, b; Schäfer *et al.* 2007; Schriever & Liess 2007). De højeste koncentrationer findes typisk i forbindelse med kraftige nedbørshændelser og forekommer som korterevarende pulse, hvor pesticider transporteres til vandløb via dræn eller med overfladisk afstrømning (Kronvang *et al.* 2003a; Styczen *et al.* 2003; Kronvang *et al.* 2004), og i danske vandløb er der således gennem en årrække påvist 44 forskellige pesticider (Bøgestrand *et al.* 2003). Hovedparten af de fundne pesticider er enten herbicider eller fungicider, og for disse stofgrupper gælder generelt, at de observerede koncentrationer ikke kan forventes at være akut dødbringende for vandløbsorganismer. For visse insekticider, især pyrethroiderne, har tidligere udenlandske studier imidlertid vist, at pulstilførsler til vandløb i forbindelse med almindelig landbrugsdrift kan føre til effekter på populations- og økosystemniveau (Schulz & Liess 1999b).

Med udgangspunkt i de danske pesticidfund er en række studier af insekticiders skadevirkninger i løbet af de seneste ti år blevet gennemført under Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning. Disse undersøgelser har primært omhandlet effekter af enkeltstoffer på fri, opløst form, hvor man har søgt at udvide videngrundlaget om skadevirkninger på tværs af økologiske organisationsniveauer af stigende kompleksitet. Man har evalueret mulighederne for at ekstrapolere fra effekter på individniveau til effekter på populationer og videre til samfunds- og økosystemniveau, og en række pesticidforskningsprojekter har klart dokumenteret, at en sådan ekstrapolation fra simple, laboratoriebaserede metoder med enkeltarter over mere miljørealistiske strømmendeopstillinger med flerarts-minisamfund til naturlige vandløbsøkosystemer er mulig (Nørum & Bjerregaard 2003; Møhlenberg *et al.* 2004; Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

I disse projekter har fokus været på skadevirkningen af kortvarige pulse (typisk med en varighed af 90 min.) af pyrethroider, og effekter ved meget lave koncentrationer er blevet observeret. Eksempelvis blev overlevelsen reduceret hos ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* ved 0,5 µg lambda-cyhalothrin/L (Wiberg-Larsen & Nørum 2009), mens bevægelsesadfærden ændredes markant ved henholdsvis 0,001 og 0,01 µg lambda-cyhalothrin /L for slørvingen *Leuctra nigra* og *G. pulex* (Nørum *et al.* 2006), og forøget driftadfærd hos *G. pulex* blev observeret allerede ved 0,0002 µg esfenvalerat/L (Møhlenberg *et al.* 2004). Tilsvarende lave effektkoncentrationer er fundet for en række vandløbsinvertebrater af bl.a. Lauridsen & Friberg (2005), Heckmann & Friberg (2005) og Heckmann *et al.* (2005). Til sammenligning er der i vandløb i det tidligere Århus Amt fundet op til 0,66 µg/L og i fynske vandløb op til 0,2 µg/L af pyrethroidet esfenvalerat (Fyns Amt 1997; Wiggers 1999).

Mens man således er nået langt i udviklingen af eksperimentelle metoder til kvantificering af frit opløste insekticiders skadevirkninger, er der et behov for en forøget realisme på eksponeringssiden for bedre at kunne vurdere den relative betydning af insekticider i forhold til de øvrige påvirkninger af vandløbsøkosystemerne. Dette behov understøttes af aftalen om Grøn Vækst, hvor ønsket om at nedbringe brugen af de mest miljøbelastende pesticider er klart formuleret (Regeringen 2009). Det er vigtigt at understrege, at en udpegning af de insekticider, der giver anledning til størst bekymring

for akvatiske økosystemer, ikke alene kan foretages ud fra overvejelser omkring effektivitet på markerne og skadevirkning i marknære terrestriske habitater. Der kan være endog meget stor forskel på insekticiders terrestriske og akvatiske giftighed, afhængig af stoffernes iboende fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. vandopløselighed, og deres tilstandsform i miljøet, især hvorvidt de er bundet til organisk eller uorganisk materiale eller forekommer på fri, opløst form (Schulz & Liess 2001a; Yang *et al.* 2006a; Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Det er ligeledes vanskeligt at forudsige insekticidskadevirkninger i vandløb på baggrund af data fra standardgiftighedstest, hvor dødeligheden registreres hos, for vandløb ikke-repræsentative, akvatiske modelorganismer (f.eks. dafnier) udsat for insekticiderne i fri opløsning ved konstante, og ofte høje, eksponeringskoncentrationer. Svagheden ved disse studier er bl.a., at ikke-dødelige, men økologisk set vigtige, skadevirkninger på f.eks. bevægelsesadfærd og fødesøgning ikke registreres, og at eksponeringerne hverken afspejler den korte pulsvarighed eller insekticidernes binding til organisk og uorganisk materiale i vandløb.

I Danmark anvendes et begrænset antal aktivstoffer som insekticider. Arealmæssigt er pyrethroiderne (alpha-cypermethrin, cypermethrin, lambda-cyhalothrin og tau-fluvalinat) langt den mest betydende stofgruppe, idet deres andel af det i 2008 insekticidbehandlede landbrugsareal var på 89%. Endvidere anvendes thiacloprid, pirimicarb og ferrifosfat (Miljøstyrelsen 2009). Disse insekticider er imidlertid meget forskellige, både med hensyn til toksikologiske egenskaber (effekt-koncentrationer over for forskellige dyregrupper) og fysisk-kemiske karakteristika (f.eks. vandopløselighed og sorptionsegenskaber). Derfor må det forventes, at såvel tabsveje og skæbne som betydningen af sorptionsformer for skadevirkningen vil variere mellem insekticiderne. Pyrethroiderne er tidligere vist at have meget sammenlignelige effekt-koncentrationer over for *G. pulex* (Nørum *et al.* 2006). I nærværende projekt anvendes lambda-cyhalothrin som model-pyrethroid, da projektgruppen har erfaring med anvendelsen af dette pyrethroid til effektstudier (Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Endvidere undersøges carbamatet pirimicarb og neonicotinoidet thiacloprid, der tidligere er vist at være skadeligt for vandløbsorganismer (Beketov & Liess 2008; Beketov *et al.* 2008), mens det kun i begrænset omfang anvendte, ferrifosfat udelades.

De fleste insekticider er uladede og mere eller mindre hydrofobe forbindelser, der i jord og sediment binder til humusstoffer. Blandt de tre teststoffer, der skal anvendes i projektet, binder lambda-cyhalothrin meget stærkt, mens thiacloprid binder svagt. De tre insekticider nedbrydes relativt hurtigt, bl.a. ved hydro- og fotolyse, under dannelse af metabolitter, som er noget mere stabile, og hvis fysiske og kemiske egenskaber er mindre velkendte end udgangsstoffernes. Lambda-cyhalothrin består af to biologisk aktive, optiske isomerer, men det er ukendt, om disse to isomerer sorberes og nedbrydes i samme omfang (Oudou & Hansen 2002a). Insekticiderne kan også bindes til andre sorbenter end humusstofferne – og specielt for de meget hydrofobe pyrethroider er det velkendt, at såkaldt hydrofob sorption til lerminerale og metaloxider spiller en vigtig kvantitativ rolle (Oudou & Hansen 2002a,b). For thiacloprid og pirimicarb er der dog også rapporteret om sorption til mineral-sorbenter (Wei *et al.* 2001). Insekticidernes sorption har stor betydning for deres opløselighed og dermed for deres biotilgængelighed og nedbrydning i jord og overfladevand (Yang *et al.* 2006b). Stærkt sorberende stoffers nedbrydning er ofte stærkt nedsat. Endelig er det centralt for forståelsen af transporten af de tre insekticider i jord og overfladevand i hvor høj grad, opløselige humusstoffer bidrager til at holde stofferne i opløsning.

Mens man har en del viden om specifikke sorptionsmekanismer for de udvalgte insekticider, er betydningen af dette for skadevirkningerne i vandløbsøkosystemer utilstrækkeligt belyst. Pyrethroiderne cypermethrin og tau-fluvalinat blev for nyligt fundet i vandløbssedimenter fra 5 ud af 15 undersøgte danske vandløb i koncentrationer fra 1,52 til 11,8 µg/kg (Bossi *et al.* 2009). Selv om binding af pyrethroider til sediment fører til en reduktion af den akutte giftighed, øges nedbrydningstiderne, hvilket kan tænkes at føre til en mere kronisk eksponering af vandløbenes bunddyr. De nye danske fund er derfor af stor økotoxikologisk interesse, især da sammenlignelige

sedimentkoncentrationer i udenlandske studier har medført skadevirkninger hos en række vandløbsinvertebrater (Schulz & Liess 2001a, b; Maund *et al.* 2002). I disse studier har man imidlertid ikke bestemt de specifikke sorbenter, og det er således vanskeligt at ekstrapolere resultaterne til danske jordbunds- og sedimenttyper.

Problemstillingen omkring insekticidernes tilstandsafhængige giftighed er således kompleks, og en bedre forståelse af skadevirkningerne af insekticidanvendelsen i Danmark kræver, at sorptionsmekanismer, tabsveje og skæbne for insekticider fra mark til vandløb under danske forhold kortlægges, så miljørealistiske eksponeringsscenerier kan opstilles, samt at såvel analysekemiske metoder til karakterisering af insekticidernes tilstandsform som økotoksikologiske metoder til kvantificering af de forskellige tilstandsformers giftighed udvikles.

1.2 Formål

Formålet med dette projekt er at udvikle og validere metoder, der kan belyse betydningen af insekticidernes tilstandsform for deres transport til og skadevirkninger i vandløb. Især for de meget hydrofobe pyrethroider betinger deres fysisk-kemiske egenskaber, at stofferne normalt vil transporteres fra mark til overfladevand bundet til organisk eller uorganisk materiale og ikke i fri, opløst form. I bunden form ændres en række betydende faktorer såsom transportvej, nedbrydningstid og biotilgængelighed, og dermed giftigheden, af stofferne markant.

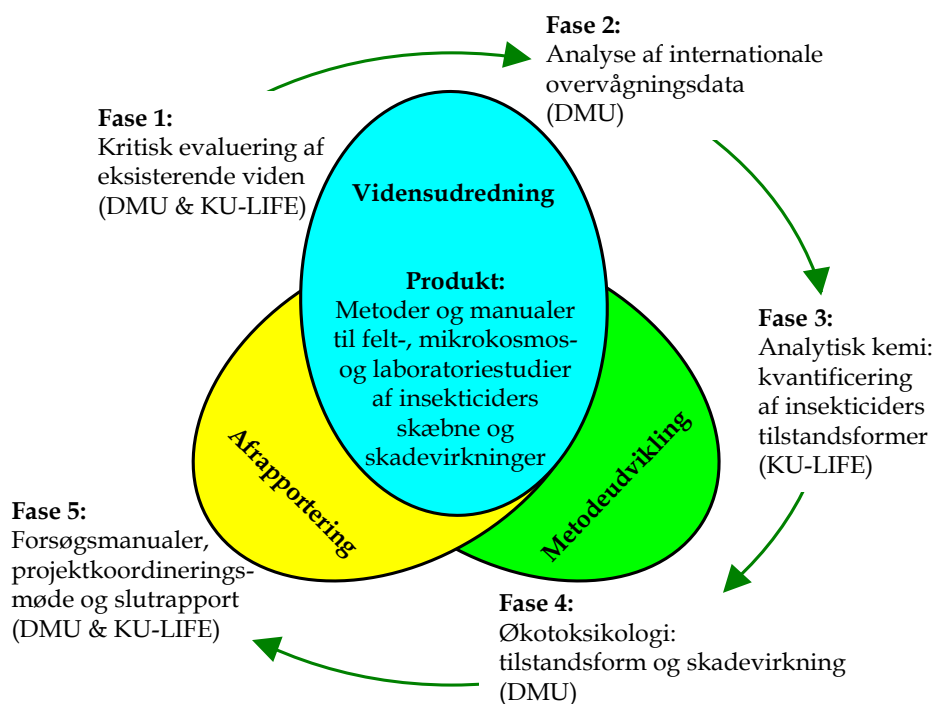
Vores overordnede hypoteser er:

- Insekticidernes iboende fysisk-kemiske egenskaber er af afgørende betydning for bindingen til organisk og uorganisk materiale, og dermed for tabsvejene fra mark til vandløb, samt nedbrydningen og transporten i ferskvand.
- Insekticidernes tilstandsform (opløst, kolloidalt bundet og partikelbundet uorganisk og organisk) er af afgørende betydning for deres skadevirkninger på vandløbsinvertebrater.

2. Metoder

2.1 Projektets overordnede struktur

Indledningsvist blev der gennemført en kritisk evaluering af den eksisterende, internationale viden om insekticiders transport til og skæbne og skadevirkninger i vandløb, idet der blev fokuseret på videnoverførsel til danske forhold. Dernæst blev internationale overvågningsdata analyseret, primært fra vores nabolande, hvor relevante samarbejdspartnere blev inddraget. Der blev fokuseret på datasæt indeholdende information om udbringningstidspunkter og fund af insekticider, samt evt. andre relevante, hydrofobe pesticider, som blev holdt op mod viden om klimatiske forhold og potentielle tabsveje, så viden herfra om transport og omsætningen af insekticider kan overføres til danske forhold. I de to efterfølgende faser af projektet blev analysekemiske og økotoxikologiske metoder til kvantificering af betydningen af de tre udvalgte insekticiders tilstandsform for deres effekt på den valgte modelorganisme, ferskvandstangloppen *G. pulex*. I projektets afsluttende fase blev en forsøgsmanual udarbejdet til beskrivelse af såvel fremtidige felt- som laboratorieforsøg. Projektets fem integrerede faser fremgår af nedenstående strukturdiagram og er beskrevet nedenfor (Figur 2.1).



FIGUR 2.1. PROJEKTETS STRUKTUR, MED ANGIVELSE AF DE FEM FASER.

2.2 Kritisk evaluering af eksisterende viden

I fase 1 er der gennemført et litteraturstudium, hvor den internationale viden om såvel insekticiders tabsveje og transport fra udbringningen på markerne til vandløbene, som sorptionforholdenes betydning for skadevirkninger på vandløbsinvertebrater evalueres kritisk. Fokus i fase 1 var på at overføre denne viden til danske forhold.

2.3 Analyse af internationale overvågningsdata

2.3.1 Rationale for valg af internationale samarbejdspartnere

I fase 2 har projektgruppen sammen med internationale samarbejdspartnere i Norge (Bioforsk, som er ansvarlig for den norske pesticidovervågning), Sverige (SLU, der har adgang til svenske monitoringsdata) og i Tyskland (LLUR, miljømyndighed i Slesvig-Holsten som her er ansvarlig for overvågningen) gennemgået deres monitoringsdata i vandløb med fokus på fund af insekticider, samt evt. andre relevante, hydrofobe pesticider, i såvel vand- som sedimentfasen.

2.3.2 Dataindsamling i Sverige, Norge og Tyskland

Der blev i efteråret 2010 gennemført 3 besøg ved udenlandske institutioner, som har ansvar for og gennemfører monitoringsprogrammer for pesticider i overfladevand og grundvand. Formålet med besøgene var at få afdækket deres fund og koncentrationer af de typer af pesticider, som er relevante i forhold til projektets formål. Til det brug blev der inden besøgene udarbejdet et spørgeskema til brug for institutionernes forberedelse af besøgene (se Bilag 1), idet de samtidig fik fremsendt spørgeskemaet udfyldt med danske oplysninger (Bilag 2).

De udvalgte pesticider i spørgeskemaet omfatter alle insekticiderne i de respektive overvågningsprogrammer med specielt fokus på de insekticider, som indgår i projektet (Tabel 2.1) og andre lignende insekticider:

- Pyrethroider (lambda-cyhalothrin, alpha-cypermethrin, cypermethrin, esfenvalerat, tau-fluvalinat og fenvalerat)
- Neonicotinoider (tilladt i DK i 2007) (thiacloprid og imidacloprid)
- Carbamater (f.eks. pirimicarb)
- Organophosphater (f.eks. dimethoat)

I gruppen af fungicider er der specielt interesse for dem, som har laveste effektkoncentrationer og som kan have synergistiske effekter med andre pesticider, f.eks. pyrethroiderne:

- Imidazoler (bl.a. prochloraz)
- Triazoler (bl.a. epoxiconazol, propiconazol og tebuconazol).

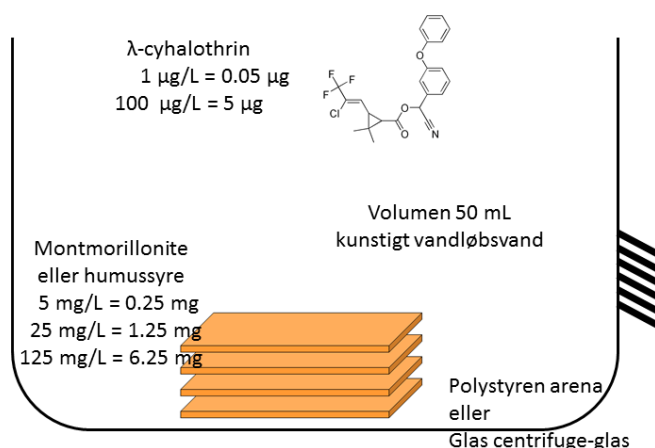
2.4 Analytisk kemi til bestemmelse af insekticider i komplekse økotoxikologiske opløsninger med suspenderede sorbenter

I fase 3 er analysekemiske metoder blevet udviklet til kvantificering af lambda-cyhalothrin som model-insekticid i testsystemerne til videosporing i fase 4, sorptionsprocesser er kvantificeret i testsystemerne. I eksponeringsforsøgene i fase 4 vil den reelle eksponering af den valgte vandløbsmodelorganisme, *G. pulex*, afhænge af insekticidernes binding til forskellige faser i et komplekst system med opløst organisk materiale eller suspenderede lerminerale. Eksponering forventes primært at foregå via den frie opløste form af pesticidet, men også pesticid sorberet til

nano-lerpartikler eller opløseligt organisk stof kan muligvis være biotilgængeligt. Desuden vil evt. metalkompleksering i opløsning kunne påvirke eksponeringen.

Indledningsvist blev eksisterende metoder afprøvet for til at kvantificere lambda-cyhalothrin fra de forskellige faser, og beskrive dynamikken af den frie koncentration af insekticid i vandfasen (Oudou & Hansen 2002a,b). Dette omfattede sorptionsforsøg med modelorbenterne montmorillonit (uorganisk sorbent) og humussyre (organisk sorbent), der begge er særdeles relevante for danske forhold. Reproducerbarheden af fordelingen af insekticid mellem faserne i, og sorptionen til, de anvendte forsøgsopstillinger blev kvantificeret, ligesom også kinetikken af processerne blev dokumenteret.

Sorptionsforsøgene omfattede sorption i det videosporingstestsystem (50 mL opløsning i 100 mL polystyrenbakker), som benyttes til giftighedstestene i fase 4. Her blev undersøgt: 1) Sorptionen til udstyret og 2) sorptionen til sorbenterne (Figur 2.2).



FIGUR 2.2. SKITSE AF FORSØGSP stilling MED LAMBDA-CYHALOTH RIN I TO KONCENTRATIONS NIVEAUER OG TRE KONCENTRATIONS-NIVEAUER AF SORBENT (MONTMORILLONIT OG HUMUSSYRE) I 50 mL KUNSTIGT VANDLØBSVAND.

Fremstilling af sorbent-suspension. Montmorillonit anvendt i dette pilotprojekt var Swy-2-Na-montmorillonite (Wyoming) fra Source Clay Minerals Repository (Columbia University, MO, USA), og den anvendte humussyre var Humic Acid fra Aldrich. Først fremstilledes stamsuspensioner i kunstig ferskvandsmatrice (OECD 2004) med hhv. 50, 250 og 1250 mg/L sorbent, dvs. 10 gange højere koncentration af opslemmet materiale end ønsket i sorptionsforsøgene. Stamsuspensionerne stod med omrøring mindst 24 timer inden første afpipettering til forsøg, og umiddelbart før afpipettering omrørtes stamsuspensionen med konstant hastighed mindst 2 timer for at opnå repetérbar opblanding. Udtag af suspension blev foretaget på et fast fix-punkt i flasken, f.eks. 1 cm fra glasvæggen og 1 cm under overfladen for at opnå bedst mulig repetérbarhed af mængden af suspenderet materiale der udtages. Suspensionskoncentrationen i forsøgene kontrolleredes ved afvejning af suspension til en taret vejebåd og blev inddampet til tørhed, hvorefter tørstofvægten blev bestemt.

Sorption til videosporingsarenaer uden sorbent: 50 mL kunstig ferskvandsmatrice (OECD 2004) i polystyrenarenaer blev tilsat lambda-cyhalothrin fra stamopløsning i methanol til en lav og høj koncentration, henholdsvis 1 og 100 µg/L med max methanol koncentration 0,1%. Sorptionen forløb i 90 min ved laborietemperatur. Efter 90 min overførtes væsken til SPE patron (200 mg HLB Oasis, konditioneret med 3 mL methanol og 3 mL vand) og blev elueret med 2 gange 1 mL methanol, og analyseret med GC-ECD (Gas Chromatography-Electron Capture Detector med VF-

5MS, 30 m, 0,25 µm kolonne). Arenavægge blev ekstraheret med 2 gange 1 mL hexan og blev analyseret med GC-ECD for bestemmelse af lambda-cyhalothrin sorberet til arenavægge.

Sorption til montmorillonit og humussyre i videospøringsarenaer: 45 mL kunstig ferskvandsmatrice (OECD 2004) i polystyrenarenaer blev tilsat 5 mL suspension af enten montmorillonit eller humussyre stamsuspensionen så slutkoncentrationen blev hhv. 5, 25 eller 125 mg/L, og blev tilsat lambda-cyhalothrin til den ønskede koncentration (hhv. 1 og 100 µg/L som ovenfor). Sorptionsreaktionen forløb i 90 min ved laboratorietemperatur, og herefter blev suspensionen overført kvantitativt til glas-centrifugeglas og centrifugeret ved 1600 g. Efter centrifugering overførtes supernatanten til SPE patron til opkoncentrering og analyse med GC-ECD som beskrevet ovenfor. Sorbenten i bunden af centrifugeglasset blev resuspenderet og ekstraheret med methanol til bestemmelse af den sorberede mængde lambda-cyhalothrin. Derudover blev polystyren arenavægge ekstraheret med hexan og analyseret med GC-ECD (se ovenfor).

Sorptionsisothermer for montmorillonit og humussyre: 45 mL kunstigt ferskvand i glas-centrifugeglas blev tilsat 5 mL stamsuspension så slutkoncentrationen blev hhv. 5, 25 eller 125 mg/L af enten montmorillonit eller humussyre, og tilsat lambda-cyhalothrin til begyndelseskoncentration i intervallet 1-100 µg/L. Det blev rystet i 90 min ved 20 °C, og herefter centrifugeret ved 1600 g i 15 min. Supernatanten overførtes til SPE patron til opkoncentrering og analyseret med GC-ECD, og sorbenten blev resuspenderet og ekstraheret med methanol til bestemmelse af den sorberede mængde. På grundlag af sorptionsforsøgene var det muligt at kvantificere fasefordelingen af lambda-cyhalothrin, altså koncentrationerne i henholdsvis vandfasen, udstyret og den tilsatte sorbent, som funktion af totalconcentrationen af teststoffet i systemet – og som funktion af tiden.

2.5 Økotoksikologi: tilstandsform og skadevirkning

2.5.1 Rationale for valg af forsøgsdesign

Effekten af især kortvarige pulse af pyrethroid-insekticider på en række arter af invertebrater, såvel krebsdyr som insekter og snegle, er tidligere blevet undersøgt (Nørum & Bjerregaard 2003; Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009), og i disse studier har ferskvandstangloppen *G. pulex* vist sig at være blandt de mest følsomme vandløbsinvertebrater, med en følsomhed, der for såvel organiske forbindelser som metaller er meget sammenlignelig med standardtestorganismen *Daphnia magna* (Wogram & Liess 2001; von der Ohe & Liess 2004). Da *G. pulex* samtidig er vidt udbredt i Danmark og indtager en central rolle i vandløbsøkosystemerne, er den blevet anvendt som modelorganisme i projektet.

I de tidligere projekter er dyrene typisk blevet eksponeret for rene opløsninger af insekticid-aktivstofferne i kunstigt ferskvand. Der har således ikke været udført studier af i hvilken grad, skadevirkningerne ændres ved insekticidernes binding til specifikke uorganiske og organiske sorbenter. En sådan sorbent-binding kunne tænkes at påvirke transport til og skæbne i vandløb, hvilket kunne have afgørende betydning for insekticidernes effekt på vandløbs-økosystemerne.

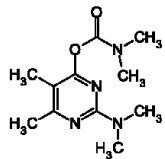
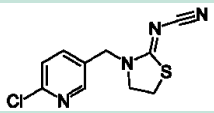
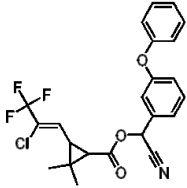
Fokus i dette projekt er på betydningen af sorptionen for eksponering fra vandfasen, og ikke via føden, da dette ville kræve yderligere metodeudvikling, og væsentligt flere ressourcer, både for den analysekemiske og den økotoksikologiske dels vedkommende. En evaluering af den sorptionsafhængige effekt af insekticidkontamineret føde/sediment på overlevelsen hos vandløbsinvertebrater ville f.eks. kræve meget længerevarende forsøg (med en varighed på flere uger/måneder), hvilket ligger uden for rammerne af dette projekt.

2.5.2 Bevægelsesadfærd og oplevelse hos *Gammarus pulex*

Metoder til registrering af adfærdsændringer under og efter en pulseksponering for insekticider er blevet udviklet og afprøvet i tidligere MST-finansierede pesticidforskningsprojekter (Nørum & Bjerregaard 2003; Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Ved hjælp af videosporingssystemet EthoVision Pro (Noldus Information Technology, Holland) kan vandløbsinvertebraters bevægelsesmønstre kvantificeres ved vektorregning og nedbrydes i en række adfærdsparametre, som f.eks. tilbagelagt afstand og hastighed i bevægelse. Bevægelsesadfærd er af fundamental betydning for dyrs fødesøgning og flugt fra prædatorer, for deres reproduktion og spredningsevne, men også for deres evne til at kunne rekolonisere tidligere pesticidpåvirkede levesteder (Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

I fase 4 blev videosporingsmetoden videreudviklet til at omfatte studier af insekticiders sorptionsafhængige skadevirkning og anvendt til at kortlægge dyrenes bevægelsesadfærd før, under, og i tiden efter, en kortvarig insekticidpuls. Effekten af hvert af de tre model-insekticider, lambda-cyhalothrin, thiacloprid og pirimicarb (Tabel 2.1), på bevægelsesadfærd og overlevelse hos *G. pulex* blev evalueret i tre miljørealistiske eksponeringsscenarier, hvor insekticiderne forekom på fri opløst form eller sorberet til enten montmorillonit eller humussyre (anvendt som modelforbindelser for henholdsvis uorganiske og organiske sorbenter). Disse to sorbenter er som nævnt meget relevante i Danmark og vil samtidig sikre en markant reduktion af andelen af frit opløst insekticid under eksponeringerne.

TABEL 2.1 OVERSIGT OVER DE TRE INSEKTICIDER DER ER BLEVET UNDERSØGT I PROJEKTET

Aktivt stof	Struktur	Formel	Log K _{ow}	DT ₅₀ (lab, jord) (dage)
Pirimicarb		C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	1,7	86
Thiacloprid		C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	1,3	Få
Lambda-cyhalothrin		C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	5,5	30 – 120

I eksponeringsforsøgene blev en pulsvarighed på 90 minutter anvendt, hvilket i tidligere projekter har vist sig at være tilstrækkelig til at medføre markante effekter på adfærd og overlevelse hos *G. pulex* (Nørum & Bjerregaard 2003; Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Samtidig er varigheden af de forhøjede koncentrationer i vandfasen, observeret i forbindelse med pesticidpuls i danske vandløb, typisk relativt kort (få timer) (Styczen *et al.* 2003).

2.5.2.1 Range-finding-studier med thiacloprid og pirimicarb

Mens effektkoncentrationerne hos *G. pulex* eksponeret for frit opløst lambda-cyhalothrin er velkendt fra de tidligere pesticidforskningsprojekter (Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum 2009), er dette ikke tilfældet for thiacloprid og pirimicarb i de anvendte videosporingssystemer. Derfor blev to såkaldte range-finding-studier gennemført i december 2010, hvor effekten af frit

opløst thiacloprid og pirimicarb på bevægelsesadfærden og overlevelsen hos *G. pulex* blev registreret.

Formålet var at optimere valget af eksponeringskoncentrationer i forbindelse med de efterfølgende eksponeringsforsøg, og dels, som input til metodeudviklingen i fase 3, at bestemme den nødvendige analysekemiske detektionsgrænse. Range-finding-studierne blev gennemført med en kontrolgruppe (n=22) og 7 forskellige nominelle insekticidkoncentrationer (n=11): 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 og 1000 µg/L.

Dagen inden eksponeringen blev dyrene overført til individuelle plastarenaer indeholdende 80 mL kunstigt ferskvand (OECD 2004), og akklimatiseret natten over. På eksponeringsdagen (dag 0) blev dyrenes baggrundsadfærd i ukontamineret vand indledningsvis registreret over 30 min. Herefter blev videosporingen midlertidigt afbrudt, og insekticidet, opløst først i ethanol og dernæst i kunstigt ferskvand til et samlet volumen på 0,8 mL, blev tilsat. Kontrolgruppen fik tilsat en tilsvarende mængde ethanol opløst i vand. Den anvendte koncentration af ethanol på 0,1 % overstiger ikke den vejledende grænse for opløsningsmidler i akvatiske giftighedstest (OECD 2000). Tilsætningen blev foretaget længst muligt fra dyrenes position i petriskålene, og videosporingen blev genoptaget 2 min efter afbrydelsen. Dyrenes bevægelsesadfærd blev herefter fulgt over 90 min, hvorefter videosporingen blev afbrudt. Dyrene blev forsigtigt hældt gennem en te-si og forsigtigt, men grundigt, skyllet tre på hinanden følgende gange i tre akvarier med kunstigt ferskvand, hvorefter dyrene blev overført til nye arenaer med ukontamineret, kunstigt ferskvand. Dyrene opholdt sig i disse arenaer under resten af forsøget, og vandet blev fornyet efter behov. På dag 1 og 6 i restitueringsperioden efter eksponeringen blev dyrenes bevægelsesadfærd i en 60 min periode registreret. Restitueringsperiodens varighed blev valgt på baggrund af tidligere studier af lambda-cyhalothrins effekt på *G. pulex* (Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

2.5.2.2 Valideringsforsøg med lambda-cyhalothrin

Da det under afviklingen af ovennævnte range-finding-studier med thiacloprid og pirimicarb blev vurderet, at effekterne var meget begrænsede, blev et supplerende forsøg med lambda-cyhalothrin gennemført med henblik på at validere det anvendte forsøgsdesign og kontrollere adfærdsresponsen hos den anvendte forsøgspopulation. Dette forsøg blev afviklet som beskrevet ovenfor (afsnit 2.5.2.1), idet der dog kun blev anvendt en kontrolgruppe (n=11) og 4 forskellige nominelle insekticidkoncentrationer (n=11): 0,001, 0,01, 0,1 og 1 µg /L. En yderligere ændring var, at dyrenes bevægelsesadfærd og overlevelse i restitueringsperioden blev registreret på dag 1, 2 og 7.

2.5.2.3 Insekticidernes sorptionsafhængige skadevirkninger

I alt var 9 eksponeringsforsøg planlagt med henblik på at evaluere insekticidernes sorptionsafhængige skadevirkninger (tre insekticid aktivstoffer i frit opløst form eller bundet til organisk eller uorganisk sorbent). På baggrund af den meget svage adfærdsrespons for *G. pulex* på eksponering af selv meget høje koncentrationer af frit opløst thiacloprid og pirimicarb både under og op til 6 dage efter eksponering blev det besluttet, at insekticidernes sorptionsafhængige skadevirkninger udelukkende skulle kvantificeres ved brug af pyrethroidet lambda-cyhalothrin.

Lambda-cyhalothrins sorptionsafhængige skadevirkninger på adfærd og mortalitet hos *G. pulex* blev gennemført med en kontrolgruppe (n = 19) og 5 forskellige insekticidkoncentrationer (n = 16). Effekten af hver pesticidkoncentration blev testet i kombination med montmorillonit (5, 25 eller 125 mg/L) og humussyre (5, 25 eller 125 mg/L). Ydermere blev effekten af frit opløst lambda-cyhalothrin testet ved de samme koncentrationer, og effekten af model-sorbenterne blev ligeledes undersøgt uden tilsætning yderligere tilsætning af lambda-cyhalothrin.

Som beskrevet ovenfor (afsnit 2.5.2.1) blev dyrenes baggrundsadfærd indledningsvist registreret i ukontamineret vand, dernæst under en kortvarig pulseksponering (90 min) og endeligt i løbet af en

6-dages restitutioneringsperiode, hvor også overlevelsen løbende blev bestemt, på dag 1, 2, 3 og 6. Metodebeskrivelsen til alle elementer af disse forsøg findes med fuldt detaljeniveau i Bilag 3. For at opnå realistiske koncentrations-respons-sammenhænge blev det forsøgt at bestemme såvel den frie som den bundne andel af insekticiderne (på mikropartikler samt plastikarenaernes indervæg) i disse eksponeringsforsøg.

2.6 Statistik

Bevægelsesadfærdsændring under eksponering hos Gammarus pulex blev evalueret ved brug af variationer af repeated measures ANOVA. I nærmere detaljer, blev repeated measures ANOVA anvendt til at teste potentielle forskelle i baggrundsadfærden imellem behandlingsgrupper samt forskel i bevægelsesadfærd under 90 minutters eksponering med lambda-cyhalothrin. Ved brug af to-vejs repeated measures ANOVA blev der testet for effekt af tid og eksponeringsscenario (koncentration af lambda-cyhalothrin og sorbent) under eksponering. Alle repeated measures ANOVA tests blev udført indenfor grupper med samme sorbent-type og koncentration samt indenfor gruppen uden sorbent. Dvs. at det blev undersøgt hvorvidt tilstedeværelsen af de enkelte sorbent typer og koncentrationer havde indflydelse på lambda-cyhalothrins toksiske effekt på bevægelsesadfærd hos *G. pulex*.

Adfærdsrespons hos G. pulex efter 1, 3 og 6 dages restitution i ukontamineret vand blev evalueret ved sammenligning af gennemsnitlig tilbagelagt afstand målt under en 30 minutters sporingsperiode ved en to-vejs ANOVA. I tilfælde af signifikant forskel imellem grupper blev ANOVA'en efterfulgt af en Bonferroni-korrigeret Fisher's LSD test. For at opnå varianshomogenitet blev data transformeret logaritmisk ($x' = \log(x + 1)$). Der blev i alle tilfælde anvendt et signifikansniveau på $\alpha = 0,05$. Døde dyr blev ekskluderet fra denne statistiske undersøgelse idet det blev vurderet som meningsløst at lade døde individer indgå i en analyse af bevægelsesadfærd. Der var en meget stor variation imellem individer og tidsintervaller, som det også tidligere er blevet observeret under videospøringsundersøgelser. Vi foretog derfor ved en konservativ vurdering at udelukke alle grupper med døde individer for at undgå store stigninger i signifikansniveau på baggrund af variansreduktion som følge af eksklusion af individer.

Generelt har vi valgt at fokusere på de overordnede tendenser for bevægelsesadfærdsanalyserne under eksponering såvel som i restitutionsperioden. Det er prioriteret for at fremme klarheden i resultaterne. Især for Repeated Measures ANOVA under eksponeringsscenerierne ville opprioritering af post hoc tests give en massiv mængde parvise sammenligninger, som vil kunne fortynde det overordnede indtryk. I restitutionsforsøgene har vi som beskrevet valgt at gennemføre post hoc tests i tilfælde af signifikante ANOVA tests, men kun de vigtigste elementer fra disse tests er medtaget. Igen vil en grundig beskrivelse af de mange parvise sammenligninger fortynde det overordnede billede, som er det vigtigste at få frem ved de gennemførte tests. Det vigtigste mål i dette projekt er at bidrage til vurderingen af, om der er en effekt af insekticidernes tilstandsform for deres effekt på ferskvandsdyr og ikke at give en grundig karakteristik af, hvornår præcist der sker forandringer i adfærdsrespons og hvor store disse forandringer er, når der tilsættes forskellige typer humus- og lerpartikler i insekticideksponeringen.

Effekter på overlevelse efter 90 minutters lambda-cyhalothrin eksponering (i kombination med forskellige koncentrationer af montmorillonit eller humussyre) for sorptionsforsøgene blev evalueret ved at fitte koncentrations-respons kurver til mortalitetsdata efter 6 dages restitution. Herved kan egentlige LC50 værdier (den koncentration hvorved 50% af populationen dør) estimeres. Vi sammenlignede LC50 værdierne ved brug af de beregnede 95% konfidensintervaller for koncentrations-respons regressionerne. Ved manglende overlap imellem 95% konfidensintervaller for to LC50 værdier blev disse vurderet til at være signifikant forskellige.

3. Kritisk evaluering af eksisterende viden

3.1 Transport, skæbne og skadevirkning i vandløb

Transporten fra mark til vandløb af hydrofobe pesticider er i tidligere projekter påvist at kunne ske igennem makroporer til dræn, hvorefter drænvandet fører dem videre til vandløb (Kronvang *et al.* 2003, 2004; Hansen *et al.* 2012). En anden vigtig transportvej er direkte fra marken med overfladisk afstrømning hvor rille- og fladeerosionen under kraftig nedbør og/eller i kombination med snesmeltning (Kronvang *et al.* 2005). Sorptionen af de hydrofobe pesticider må antages at ske allerede i overjorden efter udsprøjtning og translokationen til dræn sker så via en mobilisering af jordkolloider og -partikler med mere eller mindre 'gamle' sprøjterester i forbindelse med nedbør. Hvad der præcist sker under transporten af sorbenter og pesticider igennem jord og dræn og over mark og gennem randzone til vandløb og videre i vandløbet vides ikke. Herunder betydningen af 'sink' og efterfølgende optag i bakterier og alger, samt evt. efterfølgende frigivelser fra 'sorbenter' under senere regnhændelser, som ophvirvler og sætter det i videre transport. Effekterne af de fysiske processer set i sammenhæng med de tilstedeværende sorbenter i de forskellige miljøer, det biologiske optag, nedbrydningsprocessernes hastighed i de forskellige miljøer i dræn og vandløb og en eventuel desorption fra sorbenter ved opkoncentrering vil være af stor betydning for deres skæbne og økotoxikologiske effekter. Den stigende hyppighed af ekstreme nedbørshændelser i sommerperioden kan endvidere medvirke til at øge sandsynligheden for at netop de hydrofobe pesticider mobiliseres og transporteres fra mark til vandløb (Andersen *et al.* 2006).

TABEL 3.1. SAMHØRENDE MÅLINGER AF KONCENTRATIONEN AF ORGANISK STOF I VANDFASEN OG DEN AKKUMULEREDE MÆNGDE AF ORGANISK STOF I SEDIMENT PÅ BUNDEN AF VANDLØB (FRA THYSSEN *ET AL.* 1990).

	Koncentration af organisk stof i vandfasen (mg/L)	Akkumuleret organisk stof i vandløbssedimentet (g AFTV /m ²)
Rabis bæk, Birthesminde	1,9 (0,5-60)	200-3100
Gjern Å, Søbyvad	6,7 (3-21)	295-2160
Suså, Pindso	5,4 (1,9-12)	0-1300
Suså, Vетterslev	5,7 (1,9-11)	0-870

Akkumulationen af organisk stof på vandløbsbunden er i de fleste vandløb af stor betydning og kan om sommeren udgøre op til 80% af brutto transporten gennem et vandløb (Tabel 3.1) (Thyssen *et al.* 1990). Indholdet af andelen af ler i suspenderet stof i vandløb afhænger af mange forskellige faktorer som oplandets jordbundstyper, sæson, vandføringen og koncentrationen af suspenderet stof. I vandløb som afvander lerede oplande vil der generelt være en højere koncentration af suspenderet stof, end i vandløb i sandede opland. Indholdet af lerminerale vil tilsvarende være større i disse vandløb. En analyse af suspenderet stof og bundsediment fra et mindre østjysk

vandløb i et yngre moræneområde viser at indholdet af ler typisk er større end 50 i både suspenderet stof og i bundsediment.

Insekticidernes fysisk-kemiske egenskaber samt systemets indhold af faste faser (sorberer, organismer) har stor betydning for insekticidernes skæbne i et vandløb. Således vil hydrofobe stoffer have en stor affinitet for sorption – og typisk sorption til de mindst polære faser, som oftest humusmateriale men også f.eks. trækul. Frit opløst insekticid vil have en længere opholdstid i vandfasen, hvor stofferne i højere grad er udsat for bl.a. fotolyse og således kan have kortere halveringstid end i sedimentfasen. Ligeledes vil insekticidens samlede opholdstid i vandløbene være afhængig af deres potentiale for sorption til partikler. Partikelbundne molekyler vil afhængig af variationer i strømforhold sedimenteres og resuspenderes ligesom andre mikro-partikler i vandløb, imens frit opløste insekticider i højere grad vil gennemgå en ensrettet transport med vandstrømmen.

Insekticidens skadevirkning i vandløbet kan opdeles i påvirkninger af dyrelivet og den kontaminerede vandløbsstrækningens egnethed som levested. For dyrenes vedkommende kunne såvel optagelseskinetik (faciliteret, inhiberet), indgiftningsvej (eksponering via vand, føde, sedimentkontakt), indre giftvirkning (effektivitet i target site) og omsætning (metabolisme, ekskretion) tænkes at være påvirket af sorption. Endvidere vil den sorptionsafhængige skæbne have betydning for varigheden, og dermed effekten, af eksponeringen af dyrelivet. Som nævnt ovenfor vil sorberet og sedimenteret insekticid normalt have en meget længere halveringstid end frit opløst insekticid, og infauna (dyr der lever i sedimentet) og deposit feeders (sedimentædende dyr) vil dermed være eksponeret i længere tid efter en pulsudledning, ligesom den primære indgiftningsvej kan skifte fra vandeksponering til eksponering via føden. Tilsvarende overvejelser gør sig gældende for græssere (der lever af algebiofilm på f.eks. sten), iturivere (der omsætter dødt plantemateriale, som f.eks. nedfaldne blade) og filtratorer (der filtrerer vandet for partikler). Ved en pulskontaminering vil binding af insekticider til sediment og fødeemner (f.eks. bladmateriale og perifytiske alger) kunne påvirke den belastede vandløbsstrækningens egnethed som levested. Dette kunne mindske stofomsætningen, hvis føden bliver mindre attraktiv, og forsinke rekoloniseringen, hvis dyrene i en periode undgår den insekticidkontaminerede vandløbsbund. Såvel påvirkningen af visse dyrearter som af levestedets egnethed kan føre til indirekte effekter på ellers upåvirkede arter, der indgår i vandløbsøkosystemets fødenet.

3.2 Sorptionens betydning for skadevirkninger hos vandløbsinvertebrater

Mens man har en del viden om specifikke sorptionsmekanismer for de udvalgte insekticider, er betydningen af dette for skadevirkningerne i vandløbsøkosystemer utilstrækkeligt belyst. I nedenstående gennemgås de relativt få relevante studier, og overførbarheden af disse resultater til danske forhold evalueres. De fleste undersøgelser af giftigheden af sorberede insekticider har, naturligt nok, omhandlet meget hydrofobe stoffer, hvor betydningen af sorption i de fleste tilfælde må forventes at være størst, og studier af pyrethroider er således dominerende.

3.2.1 Sedimentsorption og giftighed: laboratorie- og strømrendeforsøg

Allerede i 1989 angav Hill (1989) i sit review af pyrethroiders akvatiske giftighed, at sorption til jordpartikler kunne reducere giftigheden betydeligt. Denne artikel indeholder ikke en fuldstændig metodebeskrivelse, men da Hill hér opsummerer de mulige konsekvenser af sorption, hvilket har inspireret til flere efterfølgende undersøgelser, er den alligevel medtaget, idet dog kun de overordnede resultater nævnes. I forsøgene blev forskellige pyrethroider (permethrin, cypermethrin, cyhalothrin og fluvalinate) blandet med jord, og efter 4 timer blev vand tilsat. Der blev udført statiske eksponeringsforsøg, hvor jordfasen forblev uforstyrret, og hvor jordpartiklerne blev opslemmet i vandfasen. Den akutte giftighed for såvel invertebrater (dafnier *Daphnia magna*

og *Daphnia pulex*, døgnfluen *Cloeon dipterum* og vandbænkebidderen *Asellus aquaticus*) som karpesfisk (*Cyprinus carpio*) blev sammenlignet med effekten af pyrethroider opløst frit i vand, og tilstedeværelsen af jordfasen resulterede typisk i 200-400 gange højere EC₅₀/LC₅₀-værdier og dermed en tilsvarende reduktion af den akutte giftighed. Hill (1989) konkluderede, at sorption kunne reducere potentielle effekter af pyrethroider i miljøet ved at fjerne stofferne fra vandfasen, enten ved sorption til suspenderende partikler, der efterfølgende ville synke til bunds, ved sorption til bundsediment, planteoverflader, etc., eller ved en reduceret biotilgængelighed, idet han, som det ofte gøres, antog, at kun det frit opløste pyrethroid er tilgængeligt for optagelse i akvatiske organismer. Andre laboratoriestudier af pyrethroiders tilgængelighed og giftighed ved eksponering af dafnier (*Daphnia magna* og *Ceriodaphnia dubia*) via vandfasen ved samtidig tilstedeværelse af suspenderet sediment og opløst organisk stof understøtter Hills oprindelige antagelse, så længe fokus alene er på korttidseksponering af fritsvømmende arter (Yang *et al.* 2006a,b).

Maul *et al.* (2008) undersøgte effekten af tre sediment-bundne pyrethroider, bifenthrin, lambda-cyhalothrin og permethrin, men også phenylpyrazol-insekticidet fipronil (stofgruppen anvendes ikke i DK) hos dansemyggen *Chironomus tentans*. Forsøgene blev gennemført med sigtet, hydreret jord fra en referencelokalitet 15 km syd for Carbondale, Illinois, USA, med et organisk kulstofindhold (OC) på 0,69-0,97% anvendt som sediment. Inden forsøgene blev insekticiderne tilført sedimenterne, der efterfølgende blev opbevaret i mørke ved 4 °C i 14 dage inden forsøgsstart. Standard 10-dages sediment giftighedstest, hvor den eksperimentelle enhed bestod af en 800 mL beholder med 50 g sediment (tørvægt) og 700 mL vand, blev gennemført, og såvel overlevelse som subletale giftighedsmål for vækstrate, kropsvægt, konditionsindeks og immobilisering blev bestemt. LC₅₀-værdierne for de tre pyrethroider, bifenthrin, lambda-cyhalothrin og permethrin, var henholdsvis 6,2, 2,8 og 24,5 µg/g OC, svarende til 60, 27 og 169 µg/kg sediment (tørvægt). De subletale giftighedsmål var ca. en faktor 2-10 gange mere følsomme, og især effekterne på vækst antyder, at forpupning, emergens (fremkomst) og efterfølgende reproduktion må forventes at være reduceret.

Et af de grundigste studier af fordeling, biotilgængelighed og giftighed af et sedimentbundet pyrethroid, cypermethrin, blev gennemført af Maund *et al.* (2002), der undersøgte effekten på dafnien *Daphnia magna*, dansemyggen *Chironomus tentans* og ferskvandstangloppen *Hyalella azteca*. Det er vigtigt at bemærke, at de i resuméet af den publicerede artikel angivne effektkoncentrationer fejlagtigt har enheden mg/kg sediment, og ikke den korrekte enhed µg/kg sediment. Til dette studium blev forskellige naturlige sedimenter udvalgt med henblik på at dække et spænd af organiske stofindhold, således at 1, 3 og 13% OC blev anvendt. Der blev gennemført to typer studier af henholdsvis biotilgængelighed og giftighed. Til undersøgelsen af biotilgængeligheden blev to forsøgsorganismer udvalgt for at evaluere eksponering primært fra vandsiden (*D. magna*) og fra såvel porevands- som sedimentfasen (*C. tentans*, kontakt med og indtagelse af sedimentet), mens giftighedsstudiet involverede *C. tentans* og ferskvandstangloppen *H. azteca*. Adsorptionen til de anvendte sedimenter blev undersøgt, og som forventet adsorberede cypermethrin hurtigt til sedimenterne, således at ligevægt blev opnået inden for 24 timer, med >99% af det tilførte cypermethrin absorberet til sedimentet. Faktisk var >98% af det adsorberede pyrethroid allerede bundet efter 2 timer. For biotilgængeligheden blev en biota-sediment-akkumuleringsfaktor (BSAF) udregnet, og værdier på 0,31, 0,14 og 0,08 for *D. magna* og 0,63, 0,19 og 0,08 for *C. tentans*, i sedimenterne med henholdsvis 1, 3 og 13% OC blev opnået, idet der var ligevægt allerede efter 24 timer. Giftighedsstudiet af effekten af sediment-sorberet cypermethrin gav 10-dages LC₅₀-værdier for sedimenter med 1, 3 og 13% OC på henholdsvis 3,6, 18 og 32 µg/kg sediment for *H. azteca* og 13, 67 og 62 µg/kg for *C. tentans*.

Schulz & Liess publicerede i 2001 to artikler, hvor effekten af et partikelbundet pyrethroid, fenvalerat, på vandløbsinvertebrater blev undersøgt i små strømrønder med recirkuleret vand, med mulighed for at udskifte vandet (Schulz & Liess 2001 a,b). Valgene af eksponeringskoncentrationer og varighed var i disse studier baseret på tidligere feltundersøgelser, hvor kortvarige (1 times) maksimumskoncentrationer af fenvalerat i suspenderede partikler var ca. 900 µg/kg i markvand

fra overfladisk afstrømning (edge-of-field runoff) (Schulz *et al.* 1998) og op til 302 µg/kg i vandløbsvand udtaget i forbindelse med forhøjet vandføring (Liess *et al.* 1999). I studierne blev naturligt sediment fra Ohebach, 35 km syd for Braunschweig, med et organisk indhold på 3,2% OC anvendt. Der blev i strømrrenderne under den én time lange eksponering observeret akutte effekter på drift hos flere arter ved 136 µg/kg i de suspenderede partikler, og hos ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og vårfluen *Hydropsyche angustipennis* allerede ved 13,6 µg/kg i de suspenderede partikler (Schulz & Liess 2001a). Efter eksponeringsperiodens ophør blev en række parametre fulgt gennem en 93-dages periode, og i evalueringen af effekterne blev det antaget, at den tilførte suspension blev fuldt opblandet med det øvrige sediment i renderne, således at fenvaleratkoncentrationerne i bulk-sedimentet blev henholdsvis 1, 10 og 100 µg/kg efter tilførslen af suspenderede partikler med koncentrationer på henholdsvis 13,6, 136,5 og 1365 µg/kg. Rimeligheden af denne antagelse blev verificeret ved analyse af udvalgte sedimentprøver. Effekter på emergens hos vårfluen *Limnephilus lunatus* blev observeret ved 136 µg/kg suspenderede partikler, svarende til ca. 10 µg/kg i strømrrendernes bulk-sediment, mens overlevelsen hos *G. pulex* og stankelbenet *Tipula maxima* var reduceret ved 1365 µg/kg suspenderede partikler, svarende til ca. 100 µg/kg i strømrrendernes bulk-sediment (Schulz & Liess 2001a). Endvidere blev de intraspecifikke interaktioner mellem juvenile og voksne *G. pulex* undersøgt. Den normale adfærd hos juvenile *G. pulex* er at undgå områder med voksne artsfæller, da der er en udpræget kannibalistisk adfærd hos denne art. En sådan undvigeadfærd blev observeret i kontrolgruppen og i gruppen eksponeret for 13,6 µg/kg suspenderede partikler, men ikke ved højere eksponeringskoncentrationer. Dermed kunne effektkoncentrationen for dette giftighedsmål hos *G. pulex* bestemmes til 136 µg/kg suspenderede partikler, svarende til ca. 10 µg/kg i strømrrendernes bulk-sediment, hvilket var en faktor 10 lavere end effektkoncentrationen for reduceret overlevelse (Schulz & Liess 2001 b).

I de fleste af ovennævnte studier har man søgt at karakterisere sedimenterne, idet man har beskrevet parametre såsom sand-silt-ler-fordelingen, forskellige kemiske parametre og indholdet af organisk materiale. Fælles for mange af studierne er da også, at især indholdet af organisk kulstof (OC) har betydning for biotilgængeligheden og giftigheden af sediment-bundne insekticider. De specifikke sorbenter er imidlertid ikke blevet kvantificeret i disse studier, og man har i de fleste tilfælde heller ikke søgt at kvantificere den mikrobielle nedbrydning af insekticiderne i sedimentet. At såvel kvalitative forskelle i det organiske materiale som den mikrobielle nedbrydning kan have betydning for, og komplicere fortolkningen af, sorberede pyrethroiders giftighed illustreres tydeligt af et nyere studium af Åkerblom *et al.* (2008), hvor deltamethrins effekt på dansemyggen *Chironomus riparius* blev undersøgt. Et af formålene med dette studium var at evaluere anvendeligheden af et standardiseret, tørvejordsbaseret sediment til at simulere naturlige sedimenters binding og omsætning af miljøfremmede stoffer. Giftighedstest blev gennemført med *C. riparius* udsat for deltamethrin, der inden forsøget var sorberet til enten kunstigt sediment (5% *Sphagnum* tørv, 75% sand, 20% kaolin-ler i deioniseret vand, inkl. CaCO₃ som buffer) med 4,1-4,8% OC eller naturligt sediment fra en dam på Gotland, Sverige, med 12,5% OC. I forsøget fandt Åkerblom *et al.* (2008) en 28-dages LC₅₀-værdi på 11 µg/kg sediment (tørvægt, nominal koncentration) i det kunstige sediment, mens koncentrationer helt op til 166 µg/kg sediment (tørvægt, nominal koncentration) i det naturlige sediment slet ikke forårsagede forhøjet dødelighed. Mens der ikke var nogen mikrobiel nedbrydning af pyrethroid i det kunstige sediment, blev ca. 50% af det tilsatte deltamethrin nedbrudt i det naturlige sediment i løbet af en 10-dages akklimatiseringsperiode inden tilsætningen af forsøgsdyrene. Forfatterne beregnede imidlertid, at den større nedbrydning af deltamethrin ikke alene kunne forklare fraværet af dødelighed i forsøget med det naturlige sediment, og at det således primært var det højere indhold samt kvalitative forskelle i det organiske materiale i det naturlige sediment, der reducerede biotilgængeligheden, og dermed dødeligheden forårsaget af deltamethrin.

Behovet for en bedre beskrivelse af specifikke bindingsmekanismer og dermed en større evne til at forklare kvalitative forskelle mellem sediment er nyligt blevet yderligere understreget af Cui *et al.*

(2010), der undersøgte biotilgængeligheden af pyrethroidet permethrin i naturligt sediment (0,4% OC) fra San Diego Creek, Orange County, Californien, USA, der blev inddelt i hurtigt, langsomt og meget langsomt desorberende fraktioner. Dette studium viste, at ikke blot den hurtigt, men også den langsomt, desorberende permethrin-fraktion var lettilgængelig for, og førte til akkumulering i *C. tentans*.

Det har kun været muligt at finde en relevant undersøgelse af Kusk (1996), der anvendte *Daphnia magna* som testorganisme, af betydningen af sediment for biotilgængelighed og giftighed af pirimicarb. Sedimentet til dette studium blev indsamlet i en lille, eutrof dam, Stokkerupkær, Jægersborg Dyrehave, og efter en forbehandling bestående af opslemning og delvis fraskillelse af sand-fraktionen var det organiske indhold i sedimentet 9,2%. Grupper af dafnier blev udsat for pirimicarb i vandfasen i op til 72 timer enten med eller uden sediment, og tilstedeværelsen af sediment resulterede i en reduceret immobilisering. Samtidig faldt biokoncentrationsfaktoren (BCF) fra 50 i rent vand til 31-37 i forsøgene med sediment, samtidig med at pirimicarb blev opkoncentreret 12-16 gange i sedimentet sammenlignet med vandfasen. Koncentrationen af pirimicarb i vandfasen var dog uændret på trods af sedimentsorptionen, hvilket skyldes at andelen af sediment var meget lille (0,44% på vægtbasis), og dette forhold skal tages i betragtning ved fortolkning af resultaterne. Forsøget viser dog, at sorption til sediment kan have en vis betydning for pirimicarb.

3.2.2 Sedimentsorption og giftighed: feltundersøgelser

Selv om kun meget få egentlige feltstudier har søgt at kvantificere sorptionens betydning for skadevirkninger af insekticider, findes der dog relevant evidens fra danske undersøgelser. Således søgte Friberg *et al.* (2003) i en større undersøgelse af 29 danske vandløb at korrelere fund af pesticider i vandløbssedimenter med forekomsten af invertebrater. Vandløbene kunne inddeles efter oplandstype, og i landbrugsoplande med lerjorde blev i gennemsnit $4,3 \pm 2,2$ pesticider fundet i sedimentprøverne, mens $2,6 \pm 1,0$ og $1,5 \pm 0,6$ pesticider blev fundet i henholdsvis landbrugsoplande med sandjord og i oplande uden landbrugsaktivitet. Invertebratsamfundene udviste tydelige ændringer langs denne pesticidgradient, idet antallet af *G. pulex* var negativt korreleret, mens antallet af børsteorme (Oligochaeta) og igler (Hirudinae) var positivt korreleret, med sediment pesticid-koncentrationen. I studiet var sum-koncentrationen af alle 19 undersøgte pesticider korreleret med sum-koncentrationen af de 10 undersøgte insekticider. Da insekticider må forventes at udøve en største indflydelse på invertebraterne end de undersøgte herbicider og fungicider, understøtter resultaterne således, at insekticider kan påvirke invertebratsamfundene i danske vandløb. Det er dog ikke muligt at drage helt entydige konklusioner på baggrund af dette studium, da landbrugsdrift også medfører andre påvirkninger af invertebraterne, bl.a. ændrede hydromorfologiske forhold og belastning med næringsstoffer og organisk stof. Pesticidfundene fra dette studium er nærmere beskrevet af Kronvang *et al.* (2003), og det er værd at bemærke, at det hyppigst forekommende, blandt de stadig anvendte, insekticider var lambda-cyhalothrin, der blev fundet i 6,7% af sedimentprøverne (Kronvang *et al.* 2003) med en maksimal koncentration på 20 µg/kg sediment (tørvægt) (Friberg *et al.* 2003). For insekticidernes vedkommende blev pyrethroiderne alpha-cypermethrin, deltamethrin og esfenvalerat, samt carbamatet pirimicarb, endvidere detekteret. Ligeledes dokumenterer to helt nye danske undersøgelser fra Sjællandske vandløb forekomsten af insekticider i bindingskomplekser med suspenderet stof i koncentrationer op til 14 µg/kg (McKnight *et al.* 2012; Rasmussen *et al.* 2012). Undersøgelserne beretter blandt andet om detektioner af pyrethroiderne lambda-cyhalothrin, permethrin og deltamethrin. I begge undersøgelser bliver de sedimentbundne insekticidfraktioner identificeret som den primære kilde til forarmelse af makroinvertebratsamfundene.

Yderligere evidens for sedimentbundne pyrethroiders giftighed kommer fra et omfattende studium i landbrugsområder i Central Valley, Californien, USA, hvor i alt 70 sedimentprøver blev indsamlet og analyseret for 26 pesticider, inkl. 5 pyrethroider. Sedimentprøverne blev endvidere anvendt til

10-dages mortalitetstests med ferskvandstangloppen *Hyalella azteca*, og i visse tilfælde med dansemyggen *Chironomus tentans* (Weston *et al.* 2004). Pyrethroiderne blev fundet i 75% af sedimentprøverne, idet fundhyppigheder og spandet af den højeste 10. percentil af koncentrationer var: permethrin (66%, 1,1-459 µg/kg), esfenvalerat (32%, 1,3-30,0 µg/kg), bifenthrin (18%, 1,1-28,8 µg/kg) og lambda-cyhalothrin (12%, 1,0-16,8 µg/kg). I studiet blev det sandsynliggjort, at pyrethroiderne bidrog til giftigheden i 40% af de prøver, der var toksiske for *C. tentans*, og næsten 70% af de prøver, der var toksiske for *H. azteca*. Disse beregninger blev understøttet af yderligere forsøg og genanalyser af ovenstående data udført af Amweg *et al.* (2005), der konkluderede, at i sedimenter med 1% OC ville de fleste pyrethroider, på nær permethrin, der er noget mindre potent, forårsage 50% dødelighed hos *H. azteca* efter 10 dages eksponering ved koncentrationer på 2-10 µg/kg sediment, mens betydeligt reduceret vækst ville forekomme ved ca. halvdelen af disse koncentrationer. Selv om det er vanskeligt at overføre dette studium til danske forhold, viser det dog tydeligt hvilke pyrethroid-koncentrationer, der var toksiske over for de nævnte arter.

3.2.3 Sorption til fødeemner

Tidligere studier har vist, at pyrethroider sorberet til fødeemner kan føre til skadevirkninger hos vandløbsinvertebrater. Således blev betydningen af en 1½-times pulskontaminering med pyrethroidet lambda-cyhalothrin af fire arter af invertebraters føde undersøgt i et omfattende studium af Wiberg-Larsen og Nørum (2009). I forsøgene blev de eksponerede fødeemner skyllet grundigt, inden de blev givet til dyrene. Resultaterne for de fire arter var meget konsistente, idet ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* og vårfluerne *Sericostoma personatum* og *Chaetopteryx villosa* fuldstændigt holdt op med at spise bølgeblade, mens *Heptagenia sulphurea* ophørte med at græsse algebiofilm, når blade og alger forud var blevet eksponeret for 5 µg/L. Desuden var omsætningen af blade hos *C. villosa* forbigående reduceret, når bladene var blevet eksponeret for 0,5 µg/L. Præeksponering af fødematerialet for 5 µg/L førte endvidere til et mindre fald i overlevelsen hos *H. sulphurea*, ligesom vårfluerne havde et reduceret aktivitetsniveau. Samlet set kunne dette dog ikke forklare det totale ophør af fødesøgning, og resultaterne viste således klart, at kontamineret føde aktivt blev fravalgt, i hvert fald for en tid (mindst 14 og 7 dage for hhv. ituriverne og græsseren), hvis pulsbelastningen var tilstrækkelig høj. Den adsorbereede koncentration på fødeemnerne blev ikke bestemt i ovennævnte forsøg, men må forventes at være af samme størrelsesorden som i et tidligere forsøg af Lauridsen *et al.* (2006), hvor en reduceret omsætning af præeksponerede elleblade hos *S. personatum* (effekt ved bladkoncentration på 3,3 µg/kg tørvægt) og *G. pulex* (effekt ved bladkoncentration på 5,5 µg/kg tørvægt) blev observeret. Lauridsen *et al.* (2006) fandt endvidere en forøget prædationsrate for iglen *Erpobdella octoculata*'s prædation på slørvingen *Leuctra nigra*, der forinden var blevet fodret med præeksponerede elleblade (effekt ved bladkoncentration på 5,5 µg/kg tørvægt). Ligeledes observerede Rasmussen *et al.* (2012b), at fødeindtagelsen af præeksponerede bølgeblade (effekt ved præeksponering af 0,1 µg/L alpha-cypermethrin i 3 timer) blev reduceret for *Gammarus pulex* i en efterfølgende periode på 28 dage.

3.3 Adsorption af stærkt hydrofobe pesticider til sediment-partikler

Det er velkendt at vandopløseligheden af ikke-ioniske forbindelser såsom mange pesticider er omvendt proportional med deres hydrophobicitet, f.eks. målt ved octanol-vand fordelingskoefficienten (K_{ow}). Der kan udledes en teoretisk sammenhæng, der demonstrerer en lineær sammenhæng mellem logaritmen til stoffernes octanol-vand fordelingskoefficient (K_{ow}) og logaritmen til deres opløselighed i vand (S_{vand}), dvs.:

$$\log K_{ow} = -a \times \log S_{vand} + b$$

hvor a og b er konstanter. Sammenhænge af denne art er publicerede for utallige kemiske klasser af organiske stoffer. I dette afsnit vil vi sætte fokus på de mest hydrofobe af de stoffer som projektet

omfatter, nemlig pyrethroiderne. Pyrethroider har log K_{ow} værdier i intervallet 4 – 7 (Albaseer *et al.* 2011), mens de to andre teststoffer, thiacloprid og pirimicarb, har log K_{ow} værdier der er meget lavere, omkring 2. De to sidstnævnte stoffer er derfor også meget mere opløselige i vand, og i det hele taget sorberer de langt svagere end pyrethroiderne. For ferskvandssystemer, hvor sedimentkoncentrationen er max. 100 mg/L, er sedimentfraktionen af thiacloprid og pirimicarb derfor forsvindende, og spiller i praksis ingen rolle for pesticid-transporten og næppe heller for giftigheden.

Stoffer, der har en høj K_{ow} har også en høj fordelingskoefficient for sorption til jordens organiske stof (K_{oc}). Igen er der normalt en pæn lineær sammenhæng mellem K_{ow} og K_{oc} , der også følger af teoretiske overvejelser (Karickhoff *et al.* 1979). Det betyder at jo mere hydrofobt et stof er, desto stærkere bindes det til humusforbindelser. Det gælder både for humusforbindelser, der er immobile i jorden, og humusforbindelser i opløsning. Da der er meget mere humus i de faste forbindelser end der er til stede i opløsning, så vil en høj K_{oc} føre til en stærk binding af de hydrofobe pesticider i jorden. De hydrofobe stoffer kan også bindes til andre sorbenter end humusstoffer, f.eks. til ler, metaloxider, quartz samt andre mineraler. Da overfladen på disse mineraler er polær så vil de hydrofobe stoffer dog først og fremmest binde til humusforbindelserne, og kun i tilfælde af lave koncentrationer af humus bindes de hydrofobe forbindelser til mineraloverflader.

Binding af stoffer i jord beskrives oftest ved adsorptionsisothermer, som angiver sammenhængen mellem et stofs (kaldet sorbatet) koncentration i vandig opløsning og dets binding (= adsorption) til jorden (her sorbenten). I et typisk eksperiment til fastlæggelse af adsorptionsisothermen, tilsættes til en række lige store mængder jordprøver stigende og kendte koncentrationer af sorbatet opløst i vand, hvorefter jordprøverne rystes med disse vandige opløsninger ind til opnået ligevægt mellem opløst og sorberet fase. Nu bestemmes den mængde sorbat, der er tilbage i opløsning og baseret på kendskab til start- og slutkoncentration af sorbat kan nu den sorberede mængde sorbat beregnes. Alternativt kan man direkte ekstrahere den mængde sorbat, der er bundet til jordpartiklerne, og således bestemme den sorberede mængde direkte, og ikke ved differens, som er det sædvanlige. Herefter plottes den sorberede mængde sorbat mod de korresponderende ligevægtskoncentrationer af sorbatet i vandig opløsning. Resultatet er en adsorptionsisotherm. For hydrofobe sorbater ses oftest at isothermen er næsten lineær, eller svagt krummende. Krummende isothermer beskrives oftest ved Freundlich isothermen:

$$Q = K \times c^n$$

hvor Q er den sorberede mængde sorbat pr. masseenhed sorbent, K den såkaldte Freundlich konstant, c er sorbatkoncentrationen i vand, og n er en konstant. Hvis $n = 1$ henfalder Freundlich isothermen til en lineær isotherm. For et hvilket som helst punkt på isothermen kan man bestemme fordelingskoefficienten for sorbatet mellem vandig opløsning og sorberet fase som:

$$K_d = \frac{Q_i}{c_i}$$

hvor Q_i er den sorberede mængde svarende til en sorbat koncentration c_i . Er isothermen lineær er K_d konstant og lig hældningen af isothermen. K_d -værdierne bruges i enhver beskrivelse og modellering af sorbatets transport og biotilgængelighed og repræsenterer derfor en meget central parameter til karakterisering af sorbatets fysisk-kemiske egenskaber.

Princippet i bestemmelse af sorptionsisothermer og dermed K_d værdier er således meget simpelt. Men for stærkt hydrofobe forbindelser opstår der en række problemer, der vanskeliggør bestemmelsen.

- (1) Grundet stærkt hydrofobe sorbaters ringe vandopløselighed (oftest nogle få $\mu\text{g/L}$) så kan der i princippet kun fremstilles meget tynde vandige opløsninger af sorbaterne. Når disse tilsættes til sorbenterne vil alt blive sorberet, og slutkoncentrationen af sorbatet i opløsning vil være

under detektionsgrænsen. Problemerne søges løst på forskellig vis: i) tilsætning af sorbatet opløst i organisk solvent direkte til jorden, afdampning af den organiske solvent og efterfølgende ekvibrering med vand, ii) tilførsel af sorbatet til vandig opløsning i koncentrationer over dets vandige opløselighed under antagelse af at sorbatet forbliver opløst i vandet, eller iii) tilførsel af sorbatet til vandig opløsning i tilstedeværelse af en vis del organisk solvent, der øger opløseligheden af sorbatet i væskefasen. De tre fremgangsmåder har dog alle deres ulemper.

- (2) Stofferne sorberes ikke alene til sorbenterne i systemet, men vil også sorberes til de forskellige flasker og beholdere der benyttes, sprøjter, pipetter, vials, filtre osv. Sorptionen hertil kan ikke undgås og der skal derfor kompenseres for denne ekstra sorption for at estimere nettosorptionen til sorbenten.

Albaser *et al.* (2011) har samlet erfaringer omkring håndtering og analyse af pyrethroid-holdige prøver. Det er veldokumenteret, at pyrethroider i vandprøver binder til prøveflaskers vægge – op til 60% af totalkoncentrationen af pyrethroid i prøven kan sidde bundet til flaskematerialet; mindst sorption ses normalt til glas, mens sorption til Teflon er højt. For at mindske denne effekt anbefales at bruge flasker af glas, at benytte stort volumen væske i forhold til flaskevægsarealet, samt at ryste prøven kraftigt (f.eks. med Vortex vibrator) før overførsel til anden beholder. Desuden kan tilførsel af organisk solvent fjerne stort set alt pyrethroid, der er sorberet til flaskevæggen. I toxicitetsforsøg kan imidlertid ikke anvendes organiske solventer i nævneværdige koncentrationer, da det organiske solvent vil påvirke testorganismen. Wheelock *et al.* (2005) har ligeledes vist at alle typer flasker/containers sorberer pyrethroider. I et forsøg med lambda-cyhalothrin fandt de at i alle tilfælde var der ved startkoncentrationer på 4 µg/L sorberet mere end 50% til flaskevæggen efter 24 timer, og i tilfælde hvor Teflon containere blev anvendt var 75% sorberet. Det havde ingen effekt at coate flasker med polyethylenglycol eller at silylere (overfladebehandle for at deaktivere glasset) flaskeoverfladerne. Derimod havde rystning ved brug af Vortex vibrator en enorm effekt og hele startkoncentrationen af pyrethroidet kunne genfindes – selv efter kontaktperioder på op til 96 timer. Samme forfattere viste, at grundet sorptionen så faldt den observerede toxicitet målt overfor *Ceriodaphnia dubia*, mens dette ikke var tilfældet overfor *Hyalella azteca*. Forfatterne konkluderer at det er umuligt at bruge nominelle koncentrationer af tilsat pyrethroid i toxicitetsforsøg grundet den stærke sorption til flasker/containere der bevirker at den reelle (og biotilgængelige) koncentration i opløsning er betydeligt lavere end den nominelle koncentration. Zhou *et al.* (1995) bestemte sorptionen af fire pyrethroider til glas og fandt fordelingskoefficienter af formen:

$$K_w = \frac{\text{sorberet pyrethroid} [\mu\text{g} / \text{cm}^2]}{\text{pyrethroid i opløsning} [\mu\text{g} / \text{cm}^3]}$$

der var stort set den samme ($K_w = 0.9 \text{ cm}$) for de fire pyrethroider – dvs. de sorberes til glas med samme styrke. I efterfølgende sorptionsforsøg med montmorillonit, kaolinit og aluminiumoxid blev der kompenseret for sorptionen til glasvægge, idet sorptionen blev bestemt efter ekstraktion af sorbenterne + glasvægge med dichlormethan og med efterfølgende subtraktion af mængden af pyrethroid der var sorberet til glasvæggene. I disse sorptionsforsøg blev der anvendt ^{14}C mærkede pyrethroider og alle opløsningskoncentrationer var lavere end maximum opløseligheden for pyrethroider i vand.

Oudou og Hansen (2002 a, b) udførte sorptionsforsøg med sorption af forskellige pyrethroider til rene mineraler (quartz, corundum, kaolinit, montmorillonit). De fandt ligeledes en betydelig sorption (30 – 50%) af pyrethroiderne til glasvægge. De kompenserede for sorptionen til glasvægge ved at udarbejde særskilte adsorptionsisothermer for glasvægge og subtrahere mængden sorberet til glasvægge fra den totalt observerede sorption:

$$M_{\text{Min}} = M_{\text{Init}} - (M_{\text{Sol}} + M_{\text{Tubes}})$$

hvor M_{Min} er massen af sorbat på mineralsorbenten, M_{Init} er den initiale masse af sorbat tilsat opløsningen, M_{Sol} er massen af sorbat i opløsning, når sorptionsforsøget stoppes, og M_{Tubes} er massen af sorbat på flaskens glasvægge. Oudou og Hansen (2002a, b) fandt stort set samme K_w værdier som Zhou *et al.* (1995) for lambda-cyhalothrin, deltamethrin, cypermethrin og fenvalerat, samt en række diastereoisomere af cypermethrin. Alle sorptionseksperimenter blev udført med startkoncentrationer på max. 10 µg/L og med slutkoncentrationer på max 3 µg/L, oftest lavere. I et sorptionsforsøg med sorption af lambda-cyhalothrin og befenthrin til flodsedimenter blev benyttet startkoncentrationer på op til 10 µg/L. Der blev kompenseret for sorption til glasvægge via særskilte eksperimenter med sorption til glasvægge i fravær af sorbenter – samme procedure som anvendt af Oudou & Hansen (2002a, b). Også disse forfattere fandt K_w værdier tilsvarende Zhou *et al.* (1995) og tab til glasvægge på mellem 25 og 60%.

Koskinen *et al.* (2006) har undersøgt effekten af eksperimentelle procedurer på sorption af cyfluthrin til en række jordmaterialer. Der blev anvendt 5 forskellige glastyper (glas, polytetrafluoroethylene, rustfrit stål samt to silyleringsagenter anvendt på glas vials). Cyfluthrin opløsning (i acetonitril) blev tilsat direkte til jorden, til jord/vand suspension, eller tilsat den vandige opløsning før tilsætning til jord. Der blev også bestemt sorption af cyfluthrin til de anvendte rysteflasker/centrifugerør. For startkoncentration af cyfluthrin på mellem 2 og 4 µg/L blev fundet at ca. 50% blev sorberet til rysteflasker/centrifugerør af glas, mens tallet var op til 70% hvis overfladerne var silyleret. Det blev også fundet at al cyfluthrin sorberet til væggene kunne ekstraheres med organiske solventer så som methanol, toluen eller acetonitril. Forfatterne fandt at sorptionen var betydeligt højere når cyfluthrin blev tilsat direkte til jorden før tilsætning af væske sammenlignet med cyfluthrin tilsætning til en jord:væske suspension. Konklusionen fra dette arbejde var, at de metodiske forhold har lige så stor indflydelse på de estimerede sorptionskonstanter, som den forskel der ses mellem sorption til forskellige jordtyper!

Ali & Baugh (2003) har også undersøgt sorption af pyrethroider til jord. Sorptionen blev bestemt ved differensmetoden, og der blev arbejdet med tilsatte koncentrationer på langt over pyrethroidernes opløselighed (op til 1500 µg/L, d.v.s. ca. en faktor 100 højere end opløseligheden) og med "ligevægtskoncentrationer" på op til 400 µg/L. Der blev ikke som sådan korrigeret for sorption til rysteflasker, men der blev estimeret at ca. 50% af pyrethroiderne var sorberet til glasvæge. Sorptionsisothermer fulgte Freundlich modellen med $n \cong 1$, så altså næsten lineære isothermer. I samme undersøgelse undersøgtes desorptionen efter sorptionen via desorption til vand. Op til 25% af adsorberet pyrethroid kunne desorberes i løbet af 5 desorptionstrin.

Fojut & Young (2011b) undersøgte i et meget omhyggeligt studium sorption af bifenthrin og lambda-cyhalothrin til flodsediment. De anvendte tilsatte koncentrationer på op til 10 µg/L, lange ekvibreringstider (28 dage) og korrektion for sorption til glasvægge jvf. Oudou & Hansen (2002a). Desuden anvendtes alpha-cypermethrin som intern standard. Data kunne fittes med Freundlich modellen, men med $n \neq 1$. Andelen af pyrethroid sorberet til glasvægge var i området 40 – 60%. Forfatterne sammenlignede sorption bestemt ved differensmetoden og sorption bestemt ved direkte ekstraktion (med dichloromethan) af pyrethroid fra sedimentet. De fandt at differensmetoden – selv efter korrektion for sorption til glasvægge – gav en omtrentlig dobbelt så høj sorption som bestemt ved direkte ekstraktion, og tilskrev dette til en ukomplet ekstraktion af sorberet pyrethroid! Undersøgelsen indikerede i øvrigt at mineraloverflader i flodsedimentet, og ikke alene humusforbindelser, er vigtige for sorption af pyrethroider.

I et efterfølgende studium undersøgte Fojut & Young (2011a) hastigheden af desorption af 4 pyrethroider (permethrin, bifenthrin, cyfluthrin og lambda-cyhalothrin) fra suspenderet jordmateriale; Tenax blev brugt som infinite sink og det undersøgtes hvorledes sorberet pyrethroid blev afgivet til Tenax over tid, og som funktion af ældning, sorbentegenskaber og felt/laboratorie spikede prøver. Desorptionsdata kunne beskrives med en to-kompartiment model som sum af to første-ordens reaktioner, dvs. en desorptionsreaktion der er hurtig, og en anden

desorptionsreaktion, der er langsom. Den hurtige desorption fandt sted indenfor 1 – 2 dage og androg max. 50% af den initielt sorberede mængde; typisk noget mindre (30%). Hastigheden i den langsomme desorption var typisk 2 – 3 størrelsesordner langsommere end den hurtige desorption. Jorde med de højeste indhold af organisk materiale viste langsomst og mindst desorption. Ældning – dvs. hvor lang tid pyrethroidet var på sorbenten før initiering af desorption – havde ingen effekt på andelen eller hastigheden af den hurtige desorption. Undersøgelsen viser, at typisk 30% af sorberet pyrethroid kan desorberes indenfor timer til få dage, og at modstanden mod desorption stiger for prøver med stigende indhold af organisk materiale. Og at ældning tilsyneladende har mindre betydning for den hurtige desorption. Resultaterne er af stor betydning i relation til stoffernes biotilgængelighed.

Grundet de mange eksperimentelle problemer med at opnå ”korrekte” mål for sorption af stærkt hydrofobe stoffer til forskellige sorbenter, findes der ikke i dag sorptionskonstanter for pyrethroider (så som fordelingskoefficienter eller Freundlich konstanter) som kan siges at være generelle eller frie for fejl. Ved gennemgang af litteraturen findes at de fleste sorptionskonstanter er bestemt i systemer hvor der er arbejdet med relativt meget sorbent i forhold til opløsning. Således anvendte Ali & Baugh (2003) et jord:væske forhold på 1:6, Oudou & Hansen (2002a) 1:100, Fojut & Young (2011) 1:1000, og Koskinen *et al.* (2006) 1:100 – 1:200. Med typiske sedimentkoncentrationer i vandløb på under 25 mg/L vil et naturligt partikler: væske forhold være 1:40000. Ingen af de ovennævnte undersøgelser har altså anvendt et partikler:væske forhold der er tæt på det naturlige. Fojut & Young (2011) kommer tættest på. Partikel koncentrationen har givetvis en ikke uvæsentlig betydning for bestemmelse af sorberet mængde. Dels er partiklernes aggregering og dermed overfladernes tilgængelighed for sorption forskellig i tynde og tykke suspensioner, dels vil betydningen af sorption til glasoverflader o.lign. få en større betydning, jo tyndere suspensionen er. Alt andet lige må det anbefales at sorptionsforsøg udføres ved sedimentkoncentrationer, der er lig de naturlige.

Sorptionskonstanter for pyrethroider er ganske variable. Det skyldes som det fremgår af ovennævnte mangedeartede metodiske forskelle, for eksempel hvorvidt der er korrigeret for sorption til det udstyr, der er brugt i sorptionsforsøg, og forskelle mellem de sorbentmaterialer, der er undersøgt. Eksempler på sorptionskonstanter fra undersøgelser, hvor de mangedeartede kritiske forhold omkring sorptionen har haft opmærksomhed, er givet i Tabel 3.2.

TABEL 3.2. EKSEMPLER PÅ SORPTIONSKONSTANTER I UNDERSØGELSER HVOR DER ER KOMPENSERET FOR SORPTION TIL Udstyret.

Pyrethroid	Sorbent	K_d^* (L/kg)	$\log K_{oc}^*$ (K_{oc} L/kg)	Reference
Cyfluthrin	Jorde	1000 - 3200	4,7 - 5,5	Koskinen <i>et al.</i> (2006)
λ -cyhalothrin	Flodsediment	8170-23170	6,2 - 6,7	Fojut and Young (2011)
λ -cyhalothrin	Aluminiumoxid	2030	-	Hansen og Oudou (2002a)
λ -cyhalothrin	Quartz	940	-	Hansen og Oudou (2002a)
λ -cyhalothrin	Kaolinit	8080	-	Hansen og Oudou (2002a)
λ -cyhalothrin	Montmorillonit	12200	-	Hansen og Oudou (2002a)
cypermethrin**	Quartz	197		Hansen og Oudou (2002b)
cypermethrin**	Aluminiumoxid	2960		Hansen og Oudou (2002b)
cypermethrin**	Jernoxid	54		Hansen og Oudou (2002b)
cypermethrin**	Montmorillonit	5070		Hansen og Oudou (2002b)
cypermethrin**	Kaolinit	470		Hansen og Oudou (2002b)

* Estimeret K_d -værdier ved en pyrethroid opløsningskoncentration på 0,1 $\mu\text{g/L}$

** Cis isomeren (1R-cis- α R; 1S-cis- α S)

Jord- og sedimentprøver har typisk højere K_d -værdier end rene uorganiske mineraler, hvilket skyldes at humusforbindelser i jord- og sedimentmaterialet binder stærkere end uorganiske sorbenter såsom lerminerale, quartz og metaloxider. Det ses dog, at lerminerale med store specifikke overfladearealer som f.eks. montmorillonit har høje K_d værdier, og derfor bidrager sådanne mineraler stærkt til sorptionen. Benytter man K_d og K_{oc} værdierne i ovennævnte tabel kan man for et sediment indeholdende 80% quartz, 19% montmorillonit og 1% organisk stof beregne sorptionen af lambda-cyhalothrin. Bruger vi en gennemsnitlig K_{oc} værdi på 106.5 L/kg vil man for en opløsningskoncentration af lambda-cyhalothrin på 0,1 $\mu\text{g/L}$ finde en total sorberet mængde på ca. 2360 $\mu\text{g/kg}$, hvoraf 10% er sorberet til montmorillonit, 3% til quartz og resten, dvs. 87% er sorberet til det organiske stof. Sorption til lerminerale kan altså ikke generelt ignoreres, mens sorption til quartz typisk er negligerbar.

4. Analyse af internationale overvågningsdata

4.1 Sammenligning af resultater fra monitoringsprogrammer af pesticider

Der er i efteråret 2010 gennemført 3 besøg ved udenlandske institutioner, som har ansvar for og gennemfører monitoringsprogrammer for pesticider i overfladevand og grundvand. Formålet med besøgene var at få afdækket deres fund og koncentrationer af de typer af pesticider, som er relevante i forhold til projektets formål. Til det brug blev der inden besøgene udarbejdet et spørgeskema til brug for institutionernes forberedelse af besøgene (se eksempel i Bilag 1 hvor skemaer er udfyldt med de danske fund).

4.1.1 Resultater fra overvågningsprogrammer i Sverige

Der blev gennemført et besøg ved Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, Sverige den 13. december 2010. SLU er ansvarlig for den nationale pesticidovervågning i Sverige i relation til landbrug og påvirkninger af overfladevand, grundvand og nedbør. De gennemfører en overvågning hvert år i overvågningsprogrammet, hvori indgår prøvetagning af 4 små vandløb, som afvander fortrinsvis dyrkede oplande, og 2 større vandløb. Desuden overvåges grundvand inden for 4 oplande til de små vandløb og opsamling nedbør ved en selvstændig målestation. Overvågningen i de 4 små vandløb gennemføres i Västergötland, Östergötland, Halland og Skåne. De to større vandløb (Skivarpsåen og Vege å) ligger begge i Skåne og det samme gør nedbørsstationen. Ud over den nationale overvågning er SLU ansvarlig for at indsamle viden fra kommunernes overvågning af pesticider i overfladevand og grundvand til en national database (regional overvågning).

Der er fortrinsvis indhentet og anvendt pesticid data fra 4 oplande som indgår i den rutinemæssige overvågning i Sverige. Herefter følger en kort karakteristik af oplandene.

Oplandet i Västergötland (O 18) omfatter 776 ha hvoraf 91% er landbrugsjord. Området domineres helt af lerjord og den gennemsnitlige årlige nedbør er på 558 mm (1961-90) med en afstrømning i vandløbet på 398 mm (2002-2008). Afgrøderne er for 40% korn som vintersæd, 32% korn som vårsæd og 10% olieafgrøder som raps.

Oplandet i Östergötland (E 21) er på 1.633 ha hvoraf 92% er landbrugsjord. Området er domineret af sandede jordarter med men større områder med ler ind imellem. Der er udlagt i gennemsnit 13 ha randzoner i oplandet. Den gennemsnitlige årlige nedbør er på 447 mm (1961-90) og den gennemsnitlige årlige afstrømning i vandløb er på 152 mm (2002-2008). Vinterafgrøder dominerer med 43%, mens vårsædsafgrøder optager 20% og olieafgrøder som raps 9% og kartofler 7%.

Oplandet i Halland (N 34) er på 1.460 ha og landbrug udgør 92% af arealet. Oplandet har mest sandede jorde. Årsnedbøren er på 796 mm (1961-90) og den årlige afstrømning i vandløb er på 375 mm (2002-2008). Afgrøderne udgøres af korn i vårsæd (40%), korn som vintersæd (15%), græs i omdrift (13%), kartofler (10%) og sukkerøer (7%).

Oplandet i Skåne (M 42) udgår 822 ha, hvoraf 94% er dyrket. Området er for størstedelens vedkommende let moræneler. Den gennemsnitlige årlige nedbør er på 662 mm (1961-90) og den årlige afstrømning i vandløbet udgør 230 mm (2002-2008). Afgrøderne udgøres af korn i vintersæd (35%), korn som vårsæd (30%), sukkerroer (19%), ærter (7%) og olieafgrøder (5%).

TABEL 4.1. FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER I DE 4 MINDRE VANDLØB, SOM INDGÅR I DET SVENSK OVERVÅGNINGSPROGRAM I PERIODEN 2002-2009. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST; IA: IKKE ANVENDT.

Pesticid	Middel dosis (kg/ha)	Detektionsgrænse (2009)	Antal vandprøver udtaget	Fundprocent (%)	Maks. koncentration (µg/L)
Alpha-cypermethrin (I)	0,01-0,02	0,00025	718	0,1	0,0024
Dimethoate(I)	ia	0,002	719	0,6	0,16
Epoxiconazol (F)	ia	0,01	87	ip	-
Esfenvalerat (I)	0,01	0,0002	718	2,4	0,06
Fenvalerat (I)	ia	im	im	im	-
Imidacloprid (I)	0,06	0,003	451	11,5	5
Lambda-cyhalothrin (I)	ia	0,0002	718	ip	-
Pirimicarb (I)	0,08-0,10	0,002	719	21,7	0,47
Prochloraz (F)	0,19-0,23	0,004	719	5,7	2,9
Propiconazol (F)	0,03-0,06	0,003	719	24,9	1,2
Tau-fluvalinat (I)	0,04-0,07	0,005	181	ip	-
Tebuconazol (F)	ia	im	im	im	-
Terbuthylazin (H)	ia	0,003	719	29,8	0,08
Thiacloprid (I)	0,04-0,08	0,003	87	40,2	0,51

Prøvetagning i de 4 mindre vandløb i det nationale program foretages af SLU og foregår tidsintegreret med anvendelse af automatiske prøvetagere, der udtager enkeltprøver hvert 80 minut, som puljes til en ugeprøve i sprøjtesæsonen. Vandprøver udtages henholdsvis i plastikflasker (glyphosatanalyse) og glasflasker (alle andre pesticider) i prøvetageren. Desuden udtages årligt i september sedimentprøver fra vandløbsbunden til pesticidanalyse. I de 2 store vandløb udtages kun punktprøver. Der udtages ca. 70-80 vandprøver før, under og efter sprøjtesæsonen (maj-oktober/november). I de 4 mindre vandløbs oplande er der i hvert installeret grundvandsstationer (2 steder) i et nedsivningsområde og et udstørningsområde (2-6 m's dybde). Der udtages i alt på årsbasis ca. 70 grundvandsprøver. En nedbørsstation er opsat i Skåne til måling af pesticider i nedbøren. Der indsamles prøver i perioden maj-september, dog i de seneste år også regnprøver fra vinterperioden. Der analyseres pt. for 84 pesticider og metabolitter på vandprøver og 47 på sedimentprøver. Analyserne laves alle på SLU's eget laboratorium. De enkelte fund af pesticider evalueres i de årlige rapporter mod en miljøfarlighedsgrænseværdi, som er fastsat for de enkelte pesticider. Giftighedsindekset er udviklet af Kemikalieinspektionen, og rigsværdierne angiver den højeste koncentration af pesticider i overfladevand, hvor der ikke kan forventes negative effekter på vandlevende organismer (Svenske Kemikalieinspektion 2008). I 2007 er man i Sverige startet med at anvende et giftighedsindex kaldet PTI, som en indikator for et 'giftfrit miljø':

$$PTI = \sum_{i=1}^n \frac{E_i}{R_i} \quad (\text{Asp \& Kreuger, 2005})$$

E_i = Koncentration af pesticid i.

R_i = Svensk rigsværdi for pesticid i (Svenske Kemikalieinspektion 2008).

n = antallet af pesticider analyseret i prøven.

En oversigt over fund og koncentrationer af de pesticider opdelt i små og store vandløb i perioden 2002-2008 fremgår af Bilag 1. Hovedresultaterne fra målinger af pesticider i de 4 små vandløb i perioden 2002-2008 er vist i Tabel 4.1. Af de udvalgte 9 insekticider, 4 fungicider og 1 herbicid er det ene insekticid (fenvalerat) og fungicid (tebuconazol) ikke analyseret for i det svenske program. Af de resterende 8 insekticider er de 6 fundet i overvågningsprogrammet i perioden 2002-2008. To af de tre overvågede fungicider er fundet, og det ene herbicid er også konstateret i de små vandløb. Fund af de udvalgte pesticider er større i Skåne end i de andre regioner af Sverige, hvilket følger forbruget af pesticider, som også er større i Skåne end i de tre andre regioner.

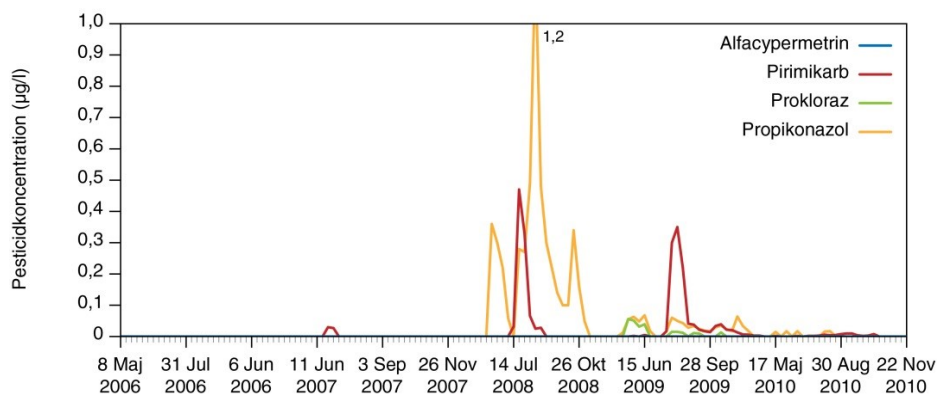
I Tabel 4.2 er vist fund og forbrug af de udvalgte pesticider i de 4 mindre vandløb og oplande i 2009. Generelt er der konstateret flere fund af de udvalgte pesticider i Skåne end i de andre 3 regioner af Sverige. Af insekticiderne er esfenvalerat, imidacloprid, pirimicarb og thiacloprid fundet i vandløb. De akvatiske rigsværdier er overskredet i flere tilfælde for esfenvalerat 2 gange, for imidacloprid 15 gange, for pirimicarb 3 gange og for thiacloprid 10 gange i 2009.

TABEL 4.2. FUND AF UDVALGTE PESTICIDER I 4 VANDLØB SAMMEN MED ANVENDTE MÆNGDER AKTIV STOF (AS) I 2009. O18: VÄSTERGÖTLAND; E21: ÖSTERGÖTLAND; N34: HALLAND; M42: SKÅNE. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST.

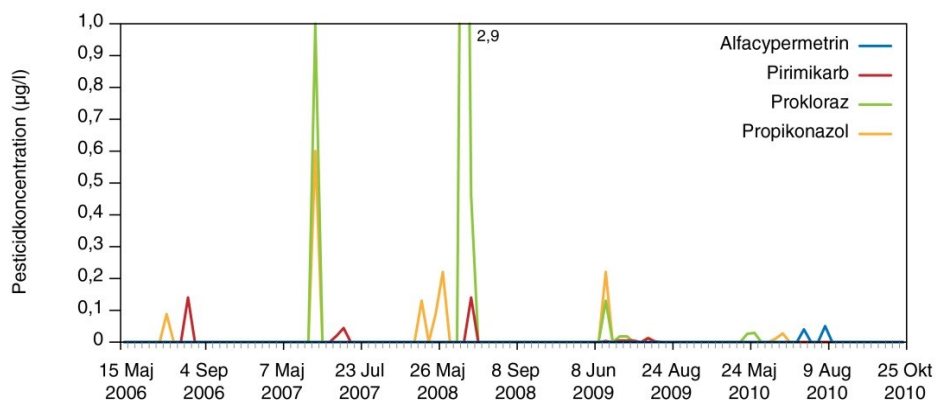
Pesticid	O18		E21		N34		M42	
	Fund pro-cent (%)	For-brug (kg as)	Fund pro-cent (%)	For-brug (kg as)	Fund pro-cent (%)	For-brug (kg as)	Fund pro-cent (%)	For-brug (kg as)
Alpha-cypermethrin	ip	0,7	ip	0,4	ip	0,2	ip	0
Dimethoat	ip	0	ip	0	ip	0	ip	0
Epoxiconazol	ip	0	ip	0	ip	0	ip	0
Esfenvalerat	ip	0	ip	4,9	ip	3,0	6,8	0
Fenvalerat	im	0	im	0	im	0	im	0
Imidacloprid	ip	0	45	0,6	88	0	21	0
Lambda-cyhalothrin	ip	0	ip	0	ip	0	ip	0
Pirimicarb	10	0	35	0	25	4,8	72	21,5
Prochloraz	ip	0	5	7,4	25	32,6	79	0
Propiconazol	15	14,4	65	3,0	29	14,5	93	12,5
Tau-fluvalinat	ip	4,8	ip	7,3	ip	1,3	ip	6,6
Tebuconazole	ip	0	ip	0	ip	0	ip	0
Terbutylazin	10	0	ip	0	63	0	90	0
Thiacloprid	45	0	85	6,8	ip	2,2	31	1,8

I Figur 4.1 og 4.2 er der vist eksempler på koncentrationen af 2 insekticider og 2 fungicider målt igennem en 5-årig periode (2006-2010) i to mindre vandløb i Sverige (M42: opland=8,2 km² og N34: opland=139 km²). Begge oplande er hovedsageligt domineret af landbrugsmæssig udnyttelse (M42=93%, N34=85%). Målingerne er foretaget som tidsintegrerede prøver udtaget med automatisk prøvetager (se afsnit 3.2.1.1). De intensive målinger afslører nogle vigtige faktorer i forhold til forekomsten af de 4 pesticider i vandløb. Den ene faktor er, at der er en meget stor forskel mellem forekomsterne af de målte pesticider i vandløb i de enkelte år, f.eks. er der nærmest ingen registreringer af de 4 pesticider i de to første år (2006-07) i M42, mens både propikonazol og pirimicarb registreres i forholdsvis høje koncentrationer i vandløbet i 2008 og 2009, med mindre fund i 2010 (Figur 4.1). Dette viser betydningen af sammenhængen mellem forbruget af pesticiderne i oplandet og forekomsten i vandløb.

Et andet meget vigtigt resultat af eksemplerne er, at forekomster af pesticiderne typisk sker som pulser over kortere tidsrum hvilket især er udpræget i vandløb N34 og for alle de 4 pesticider (Figur 4.2). Det samme er tilfældet for fundet af pirimicarb i vandløb M42 som i sommeren 2008 og 2009 kun findes over korte tidsrum (Figur 4.1). Sådanne pulsforekomster kan kun konstateres ved hjælp af en eller anden form for kontinuert prøvetagning. Afdækning af maksimale koncentrationer af pesticider i vandløb ved den her udførte tidsvægtede (uge) prøvetagning er dog ikke mulig. Hvis det er formålet, skal der anvendes andre prøvetagningsmetoder som direkte relaterer sig til



FIGUR 4.1. FOREKOMSTEN AF 4 PESTICIDER I ET MINDRE SVENSK VANDLØB I SKÅNE GJENNEM PERIODEN 2006-2010 UD FRA EN UGENTLIG TIDSVÆGTET PRØVETAGNING MED AUTOMATISK PRØVETAGER.



FIGUR 4.2. FOREKOMSTEN AF 4 PESTICIDER I ET MINDRE SVENSK VANDLØB I HALLAND GJENNEM PERIODEN 2006-2010 UD FRA EN UGENTLIG TIDSVÆGTET PRØVETAGNING MED AUTOMATISK PRØVETAGER.

pulsforekomster. I vandløb M42 findes propiconazol over længere tidsrum i både 2008, 2009 og 2010, men med en tydelig faldende koncentration fra år til år (Figur 4.1). Forskelle i hvordan de enkelte pesticider findes i de enkelte år og perioder af året i de enkelte vandløb skal formentlig både relateres til hvor stofferne anvendes i oplandet, stoffernes fysisk-kemiske egenskaber, fortyndingen og transportvejen og -måden fra mark til vandløb.

I efteråret 2008 udviklede analyselaboratoriet i Sverige (SLU) en lavere detektionsgrænse for prochloraz, idet den blev sænket fra 0,01 til 0,002 µg/L. Året efter blev prochloraz for første gang konstateret i M42 i koncentrationer som lå under den gamle detektionsgrænse (Figur 4.1). Dette eksempel viser tydeligt, hvor stor betydning detektionsgrænsen har i overvågningen af pesticider i forhold til at kunne påvise forekomster af pesticider i vandmiljøet.

I Tabel 4.3 ses fundet af pesticider i to større åer i Skåne for perioden 2002-2009. På trods af en hyppigere prøvetagning i de små end de store vandløb findes der generelt flere pesticider i de store vandløb end de små vandløb. Det skyldes formentlig, at der anvendes flere forskellige stoffer i de større oplande end i de mindre oplande.

TABEL 4.3. FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER I DE 2 STØRRE VANDLØB, SOM INDGÅR I DET SVENSKE OVERVÅGNINGSPROGRAM I PERIODEN 2002-2009. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST.

Pesticid	Antal vandprøver udtaget	Fundprocent (%)	Maks. koncentration (µg/L)
Alpha-cypermethrin (I)	142	ip	-
Dimethoat (I)	142	12,7	0,12
Epoxiconazol (F)	16	ip	-
Esfenvalerat (I)	142	2,1	0,013
Fenvalerat (I)	im	im	-
Imidacloprid (I)	92	9,8	0,21
Lambda-cyhalothrin (I)	142	ip	-
Pirimicarb (I)	142	35,2	0,083
Prochloraz (F)	142	0,70	0,002
Propiconazol (F)	142	51,4	0,27
Tau-fluvalinat (I)	36	ip	-
Tebuconazol (F)	im	im	-
Terbuthylazin (H)	142	62,0	0,14
Thiacloprid (I)	16	62,5	0,16

I Tabel 4.4 er påvisninger af de udvalgte pesticider i sedimentprøver fra vandløbsbunden vist. Der konstateres fund af både alpha-cypermethrin og esfenvalerat, begge i langt større grad end fund i vandprøver.

TABEL 4.4. FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER I SEDIMENTPRØVER FRA DE 4 MINDRE VANDLØB, SOM INDGÅR I DET SVENSKKE OVERVÅGNINGSPROGRAM I PERIODEN 2002-2008. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST.

Pesticid	Antal sediment prøver udtaget	Fundprocent (%)	Maks. koncentration (µg/kg DW)
Alpha-cypermethrin (I)	42	5	5,5
Dimethoate (I)	0	im	-
Epoxiconazol (F)	0	im	-
Esfenvalerat (I)	42	43	7,5
Fenvalerat (I)	0	im	-
Imidacloprid (I)	0	im	-
Lambda-cyhalothrin (I)	42	ip	-
Pirimicarb (I)	42	ip	-
Prochloraz (F)	12	ip	-
Propiconazole (F)	42	2	100
Tau-fluvalinate (I)	12	ip	-
Tebuconazole (F)	0	im	-
Terbuthylazine (H)	42	ip	-
Thiacloprid (I)	0	im	-

4.1.2 Resultater fra overvågningsprogrammer i Norge

Der blev gennemført et besøg ved Bioforsk, Ås, Norge den 28. november 2010. Bioforsk er ansvarlig for pesticidovervågningen i Norge i relation til landbrug og påvirkninger af overfladevand, grundvand og nedbør. De gennemfører en overvågning hvert år i JOVA-programmet, hvori indgår prøvetagning af små og store vandløb, grundvand og nedbør inden for i alt 9 områder i Norge.

TABEL 4.5. OVERSIGT OVER DE 9 OPLANDE, SOM INDGÅR I DET NORSKE OVERVÅGNINGSPROGRAM

Opland og beliggenhed	Oplands størrelse (km ²)	Andel landbrugsareal (%)	Jordbund	Hovedafgrøder
Skas-Heire Kanalen i Rogaland	29,3	85	Marint ler og sand	Husdyrproduktion med græs, kartofler og grøntsager
Timebekken i Rogaland	1	88	Marint ler og sand	Husdyrproduktion og græs
Vasshaglona i Aust-Agder	0,65	62	Sandjord over marint ler	Korn, grøntsager og kartofler
Heiabekken i Østfold	1,6	62	Sandjord og marint ler	Korn, grøntsager og kartofler
Høbølelva i Akershus	331	19	Ler med siltjorde	Kornafgrøder
Skuterudbekken i Akershus	4,5	61	Siltrig mellemler med sandindslag	Kornafgrøder
Mørdrebekken i Akershus	6,8	65	Silt og lerjorde	Kornafgrøder
Hotranvassdraget i Nord-Trøndelag	20	58	-	Husdyrproduktion med græs og kornafgrøder
Lierelva i Buskerud	303	14	Ler og let moræne	Kornafgrøder, græs og grøntsager

Der er indhentet data om pesticider fra 9 oplande, som indgår i den rutinemæssige overvågning af pesticider i Norge. De 9 oplande har en størrelse på mellem 0,65 til 331 km² og har vidt forskellig beliggenhed, dyrkningsgrad og afgrøder (Tabel 4.5).

Prøvetagning foregår med automatiske prøvetagere med en puljet prøve hver 14. dag, samt stikprøver (punktprøver udtaget med glasflasker). Der udtages ca. 130 vandprøver før, under og efter sprøjtesæsonen (marts-december) i vandløb hvert år. Desuden udtages ca. 70 grundvandsprøver og enkelte nedbørsprøver. Der analyseres pt. for 62 pesticider og metabolitter ud af i alt 108 godkendte bekæmpelsesmidler. Analyserne laves i de fleste tilfælde på Bioforsk's eget laboratorium. Enkelte specialanalyser købes på eksternt laboratorium (f.eks. ved SLU). De enkelte fund af pesticider evalueres i de årlige rapporter mod en miljøfarlighedsgrænse, som er fastsat for de enkelte pesticider.

I Tabel 4.6 er vist det samlede antal prøvetagninger, fundprocenter og maksimale koncentrationer af de udvalgte pesticider. Der er analyseret for 6 af de 9 insekticider på listen, 3 af de 4 fungicider og det

ene herbicid. Fundprocenten er generelt lav for alle pesticiderne, højest for insekticidet pirimicarb (1,0%) og fungicidet propiconazol (4,9%). Terbuthylazin og fenvalerat blev sidst solgt i 1996.

Detektionsgrænsen (2004), fund over miljøfarlighedsgrænsen og dosis af de udvalgte pesticider er vist i Tabel 4.6 i de norske felter. Der er generelt tale om få fund over miljøfarlighedsgrænsen for de undersøgte pesticider. Det skyldes dog for en stor dels vedkommende formentlig de relativt høje detektionsgrænser for pyrethroiderne, som ligger langt over (100-200 gange) de fastsatte miljøfarlighedsgrænser (Tabel 4.7). Overvågningen kan derfor ikke anvendes til at sige noget om den reelle fare for det pågældende pesticid i vandmiljøet.

TABEL 4.6. FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER I DE 7 MINDRE VANDLØB OG 2 STØRRE VANDLØB, SOM INDGÅR I DET NORSKE OVERVÅGNINGSPROGRAM I PERIODEN 1995-2008. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST.

Pesticid	Antal vandprøver udtaget	Fundprocent (%)	Maks. koncentration (µg/L)
Alpha-cypermethrin (I)	1818	0,1	0,01
Dimethoat (I)	1936	0,9	0,75
Epoconazol (F)	0	im	-
Esfenvalerat (I)	1394	0,07	0,06
Fenvalerat (I)	1818	ip	-
Imidacloprid (I)	0	im	-
Lambda-cyhalothrin (I)	1818	ip	-
Pirimicarb (I)	1938	1,0	0,47
Prochloraz (F)	1818	0,7	0,25
Propiconazol (F)	1938	4,9	7,7
Tau-fluvalinat (I)	0	im	-
Tebuconazol (F)	1818	ip	-
Terbuthylazin (H)	1938	0,05	0,09
Thiacloprid (I)	0	im	-

TABEL 4.7. MIDDELDOSIS AF UDVALGTE PESTICIDER, NUVÆRENDE DETEKTIONSGRÆNSE, ANTAL FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER OVER DEN NORSKE MILJØFARLIGHEDSGRÆNSE OG MILJØFARLIGHEDSGRÆNSEN I DE OVERVÅGEDE VANDLØB I PERIODEN 1995-2008. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST

Pesticid	Middel dosis (kg/ha)	Detektionsgrænse (µg/L) (2008)	Antal vandprøver (> MF)	Miljøfarlighedsgrænsen (MF) (µg/L)
Alpha-cypermethrin (I)	0,01-0,04	0,01	2	0,001
Dimethoat (I)	0,2-0,5	0,01	0	4,0
Epoxiconazol (F)		im	-	-
Esfenvalerat (I)	0,01-0,036	0,02	1	0,0001
Fenvalerat (I)		im	-	-
Imidacloprid (I)		im	-	-
Lambda-cyhalothrin (I)	0,002-0,021	0,01	0	0,0002
Pirimicarb (I)	0,05-0,13	0,01	4	0,09
Prochloraz (F)	0,09-0,45	0,02	0	0,32
Propiconazol (F)	0,03-0,16	0,01	7	0,13
Tau-fluvalinat (I)		im	-	-
Tebuconazol (F)	0,23	0,02	0	23,0
Terbuthylazin (H)		im	-	-
Thiacloprid (I)		im	-	-

4.1.3 Resultater fra overvågningsprogrammer i Slesvig-Holsten

Der blev gennemført et besøg ved den nationale institution Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume, Abt. Gewässer / Dez. Fließgewässerökologie, Kiel, Tyskland den 16. december 2010. LLULR er ansvarlig for pesticidovervågningen i Slesvig-Holsten i relation til påvirkninger af overfladevand. De gennemfører en overvågning hvert år i overvågningsprogrammet, hvori indgår prøvetagning i et større antal vandløb.

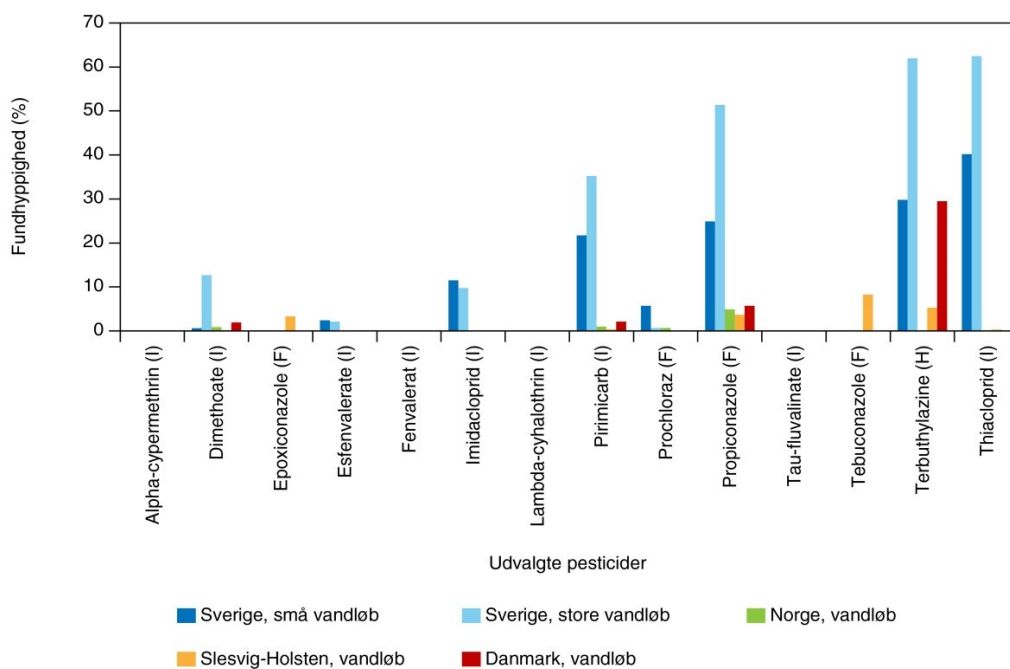
Prøvetagning foregår som stikprøvetagning med glasflasker (punktprøver) i sprøjtesæsonen. Analyserne foretages alle af eksterne laboratorier. Der indgår 113 pesticider i analyseprogrammet. Vandprøver udtages to gange i forårets sprøjtesæson og to gange i efterårets sprøjtesæson. I 2009 indgik der 96 vandløb i overvågningsprogrammet. En oversigt over fundene af de udvalgte pesticider i det overvågningsprogrammet i Slesvig-Holsten er vist i Tabel 4.8.

TABEL 4.8. FUND AF DE UDVALGTE PESTICIDER I DE 96 VANDLØB, SOM INDGÅR I OVERVÅGNINGSPROGRAMMET I SLESVIG-HOLSTEN I PERIODEN 2005-2009. IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST.

Pesticid	Detektions - grænse (µg/L) (2009)	Antal vandprøve r udtaget	Antal vandløb	Fund procent (%)	Maks. koncentration (µg/L)
Cypermethrin (I)	0,1	36	9	ip	-
Dimethoat (I)	0,03	1623	395	0,2	0,21
Epoxiconazol (F)	0,02	1946	451	3,3	1,418
Esfenvalerat (I)	im	0	0	im	-
Fenvalerat (I)	im	0	0	im	-
Imidacloprid (I)	0,005	12	12	ip	-
Lambda-cyhalothrin (I)	im	0	0	im	-
Pirimicarb (I)	0,02	1744	397	0,4	0,11
Prochloraz (F)	0,03	1116	350	0,1	0,224
Propiconazol (F)	0,03	1880	451	3,7	1,036
Tau-fluvalinat (I)	im	0	0	im	-
Tebuconazol (F)	0,005	12	12	8,3	-
Terbuthylazin (H)	0,025	2303	433	5,3	1,20
Thiacloprid (I)	0,02	1473	332	0,3	0,49

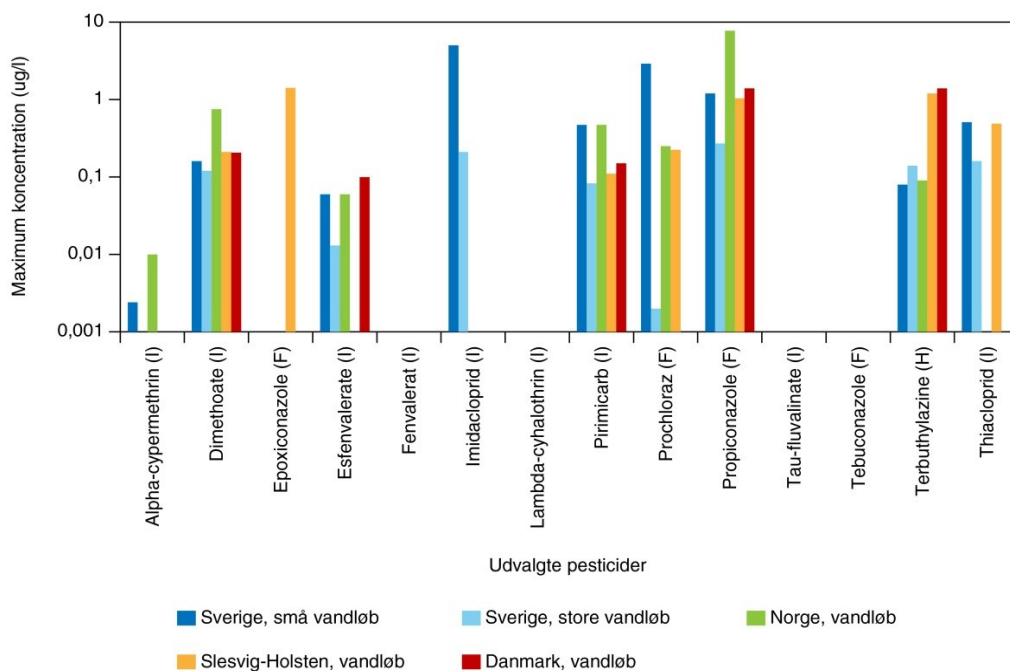
4.1.4 Sammenligning af resultater fra overvågningsprogrammer

En sammenligning af fundprocenter for de udvalgte pesticider i denne udredning er vist i Figur 4.3. Den største fundhyppighed, hvor pesticider er analyseret i alle fem programmer (f.eks. for dimethoat, pirimicarb, prochloraz, propiconazol og terbuthylazin), er tydeligt konstateret i de svenske overvågningsprogrammer, med flest fund i de to største vandløb og lidt færre fund i de 4 mindre vandløb. Da fundene i de svenske vandløb er hyppigere i Sydsverige (Skåne), hvor de to store vandløb og det ene mindre vandløb ligger, end i de tre mere nordlige svenske regioner, kan det fundne mønster ikke relateres til en eventuel temperatureffekt på nedbrydningen af pesticider. Skånes landskab og klima ligner meget det danske, og forbruget af pesticider er på samme eller lidt lavere niveau i Skåne end i Danmark. Den vigtigste forklaring på de forholdsvis høje fundprocenter i det svenske program er den lave detektionsgrænse, som er en faktor 10-100 lavere end i mange andre programmer. En anden forklaring, som i hvert fald gør sig gældende i de mindre vandløb, er den hyppige og intensive prøvetagning, som gennemføres i det svenske overvågningsprogram med ugevis prøvetagning i de små vandløb med automatisk prøvetager.



FIGUR 4.3. FUNDPROCENTER AF UDVALGTE PESTICIDER FUNDET I OVERVÅGNINGSPROGRAMMER I VANDLØB (VANDPRØVER) I DE FIRE LANDE NORGE, SVERIGE, DANMARK OG SLESVIG-HOLSTEN.

I Figur 4.4 er vist de maksimale koncentrationer målt af de udvalgte pesticider i de 4 programmer. De maksimale koncentrationer er meget sammenlignelige i de fem monitoringsprogrammer, med en tendens til, at der findes lidt højere koncentrationer i det norske program end i de øvrige. Det kan skyldes de generelt lavere temperaturer, som giver en længere nedbrydningstid for pesticiderne end i de fleste andre programmer. Hvorvidt der er større sandsynlighed for en direkte tilførsel af kolloid og partikelbundne pesticider i Norge end i de andre lande kan formentlig også spille ind.



FIGUR 4.4. MAKSIMALE KONCENTRATIONER AF UDVALGTE PESTICIDER FUNDET I OVERVÅGNINGSPROGRAMMER I VANDLØB (VANDPRØVER) I DE FIRE LANDE NORGE, SVERIGE, DANMARK OG SLESVIG-HOLSTEN.

4.1.5 Overvågning af pesticider i vandløbssediment

I Sverige er udtag af sedimentprøver fra vandløbsbunden blevet en del af overvågningsprogrammet og har indtil nu indgået med en prøvetagning i august. Forekomst af alfa-cypermethrin og esfenvalerat er fundet meget hyppigere i bundsedimentet (5% og 43%), end i vandprøverne (0,1% og 2,4%). I Danmark er cypermethrin i et udtag af sediment prøver fra vandløbsbunden i 15 vandløb i august fundet i 27% af prøverne og Tau-fluavinate blev fundet i 13% af prøverne (Bossi *et al.* 2009). Direkte målinger pesticider i suspenderet stof opsamlet i danske vandløb har vist indhold af flere forskellige pyrethroider og carbamater (Rasmussen *et al.* 2012a, b). På trods af det sparsomme antal prøvetagninger af vandløbssediment er der i de fleste tilfælde fundet pesticidrester og af stoffer, som meget sjældent konstateres i vandfasen.

4.1.6 Betydning af flowproportional prøvetagning

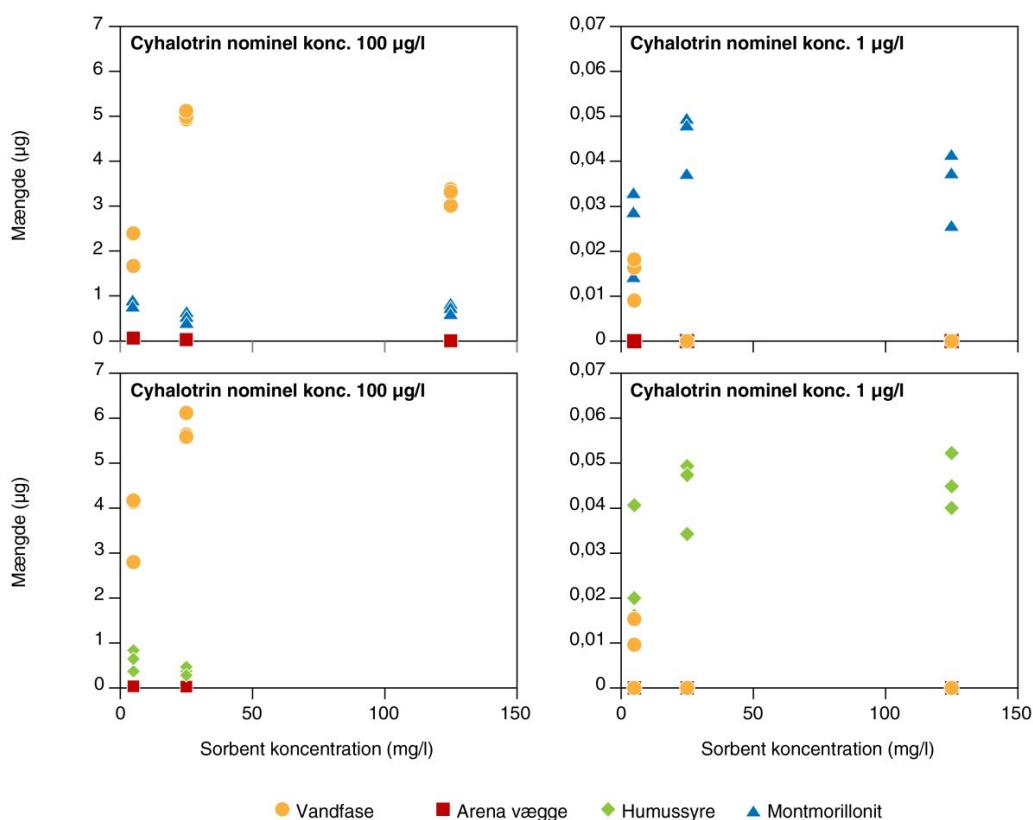
I Sverige har man gennemført en sammenlignende analyse af forskelle i tidsvægtet automatisk prøvetagning (ugeprøver som i det normale svenske overvågningsprogram) og flowvægtet automatisk prøvetagning. Undersøgelsen er foregået i efteråret 2006 og foråret 2007 i et vandløb, som afvander et opland på ca. 800 ha (Adielson og Kreuger, 2008). I perioder med regn og dermed stigende vandføring i vandløbet blev der analyseret døgnprøver fra prøvetageren, der kørte flowproportionalt. Generelt blev fundet flere stoffer over detektionsgrænserne (op til en faktor 10) ved den flowproportionale prøvetagning end ved den ugentlige tidsvægtede prøvetagning. I de fleste tilfælde blev de enkelte stoffer også fundet i noget højere maksimale pesticidkoncentrationer (metazoklor en faktor 10, MCPA en faktor 100).

5. Resultater

5.1 Bestemmelse af hydrofobe insekticider i komplekse opløsninger

5.1.1 Adsorption af lambda-cyhalothrin til montmorillonit og humussyre i økotoxikologiske videosporings-arenaer

Den kemiske sammensætning af de økotoxikologiske testopløsninger er simuleret vandløbsvand med tilstedeværelse af varierende mængder suspenderet ler eller humus. Ler er her undersøgt med montmorillonit som model for 2:1-lags lermineraller med stor specifik overflade, og humussyre som model for suspenderet organisk materiale. Lambda-cyhalothrin frit opløst i vandfasen vil adsorberes til overfladen af det suspenderede montmorillonit og humussyre og efter et vist stykke tid vil der indstille sig en ligevægt mellem lambda-cyhalothrin opløst i vandfasen og den mængde, der er adsorberet til overfladen af partikler i systemet. I denne undersøgelse er sorbenterne undersøgt hver for sig ved tre koncentrationsniveauer: 5, 25 og 125 mg/L sorbent for at dække variationen af suspenderet stof koncentrationer i naturlige vandløb. Den laveste sorbent koncentration er desuden tilstrækkeligt høj til, at der kan kvantificeres en forskel fra forsøgsarenaer uden sorbent. Alle seks scenarier er testet ved både en meget høj og en mellem-høj nominal koncentration af lambda-cyhalothrin (100 µg/L og 1 µg/L) i en matrix af simuleret vandløbsvand.



FIGUR 5.1. SORPTION AF LAMBDA-CYHALOTHRIN TIL TRE KONCENTRATIONER AF SUSPENDERET MONTMORILLONIT (ØVRE) OG HUMUSSYRE (NEDRE) VED TOTAL LAMBDA-CYHALOTHRIN MÆNGDE HHV. 5 µg (100 µg/L, VENSTRE) OG 0.05 µg (1 µg/L, HØJRE). VOLUMEN 50 mL SIMULERET VANDLØBSVAND.

Tilstedeværelsen af sorbent reducerer den frie opløsning af lambda-cyhalothrin i forsøg med 1 µg/L (Figur 5.1). Overordnet ses, at sorbent-koncentrationer på 25 og 125 mg/L giver omtrent ens mængder lambda-cyhalothrin sorberet til det suspenderede materiale og tilsvarende reduktion i frit opløst koncentration, og ved 5 mg/L suspension ses mindre sorberet og relativt mere (0,2-0,3 µg/L) frit opløst lambda-cyhalothrin (se paneler for nominel 1 µg/L i Figur 5.1). Ved 100 µg/L (venstre paneler i Figur 5.1) sorberes en mindre del af lambda-cyhalothrin, og den frit opløste koncentration måles til 30-85 µg/L lambda-cyhalothrin for 25 og 125 mg/L suspenderet sorbent, og for 25 µg/L sorbent ca. 100 µg/L delvist pga. højre summerede genfindingsprocenter på 110-120% i netop disse forsøg. Den summerede genfindning for 3-fase systemerne ligger på 70-85% for de øvrige forsøg (sum af genfindinger i de tre faser).

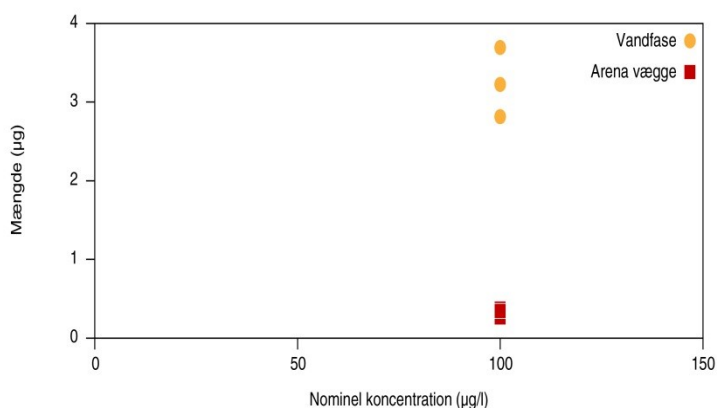
TABEL 5.1. FORDELINGSKOEFFICIENTER (K_d) FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN MED SUSPENDERET HUMUSSYRE OG MONTMORILLONIT I TEST ARENAER VED 20 °C.

Sorbent	Humussyre	Montmorillonit	Humussyre	Montmorillonit
	λ-cyhalothrin 1 µg/L		λ-cyhalothrin 100 µg/L	
	L/kg	L/kg	L/kg	L/kg
5 mg/L	312×10 ³	406×10 ³	36.1×10 ³	76.2×10 ³
25 mg/L	-*	-	2.59×10 ³	4.08×10 ³
125 mg/L	-	-	4.68×10 ³	1.75×10 ³

* væskefasekoncentration under detektionsgrænse, og derfor ingen ratio mellem væske og fast fase

De beregnede K_d for lambda-cyhalothrin sorption til suspenderet humussyre og montmorillonit viser meget høje værdier for den lave koncentration på 1 µg/L og 5 mg/L sorbent (Tabel 5.1). For 25 og 125 mg/L sorbentkoncentration var ligevægts-væskekoncentrationerne under detektionsgrænsen og derfor kan ratio mellem væskefase og sorbent ikke beregnes, men i praksis er alt sorberet ved disse forhold. Det ser lidt anderledes ud for den høje koncentration af lambda-cyhalothrin, hvor K_d for det første er lavere end for 1 µg/L forsøgene, og for det andet er der ikke en højere K_d ved de højere koncentrationer af sorbent.

Sorption til arena-vægge er negligerbar ved tilstedeværelse af sorbent ved de tre koncentrationsniveauer, der er undersøgt. For 1 µg/L lambda-cyhalothrin forsøg ligger alle målinger under detektionsgrænsen, og det samme for 125 mg/L sorbent ved 100 µg/L lambda-cyhalothrin, mens der sorberes 25 ng og 45 ng lambda-cyhalothrin til arena-væggen ved hhv. 25 og 5 mg/L suspension. Der er således et skifte fra et 2-fase system med sorption til suspenderet sorbent og frit opløst i vandfase ved sorbentkoncentrationer over 25 mg/L, og et 3-fase system med sorption til sorbent, til arena-vægge og frit opløst i vandfasen ved mindre end 25 mg/L sorbent. Med kun tre koncentrationsniveauer af sorbent undersøgt i dette pilotprojekt kan vi ikke beskrive fordelingen i 3-fase systemet når sorbentkoncentrationen bliver meget lille og det igen bliver et 2-faset system ved fravær af suspenderet sorbent.



FIGUR 5.2. FORDELING AF LAMBDA-CYHALOTHRIN MELLEM OPLØST VANDFASE OG ARENA VÆGGE. NOMINEL TOTAL MÆNGDE ER 5 µg.

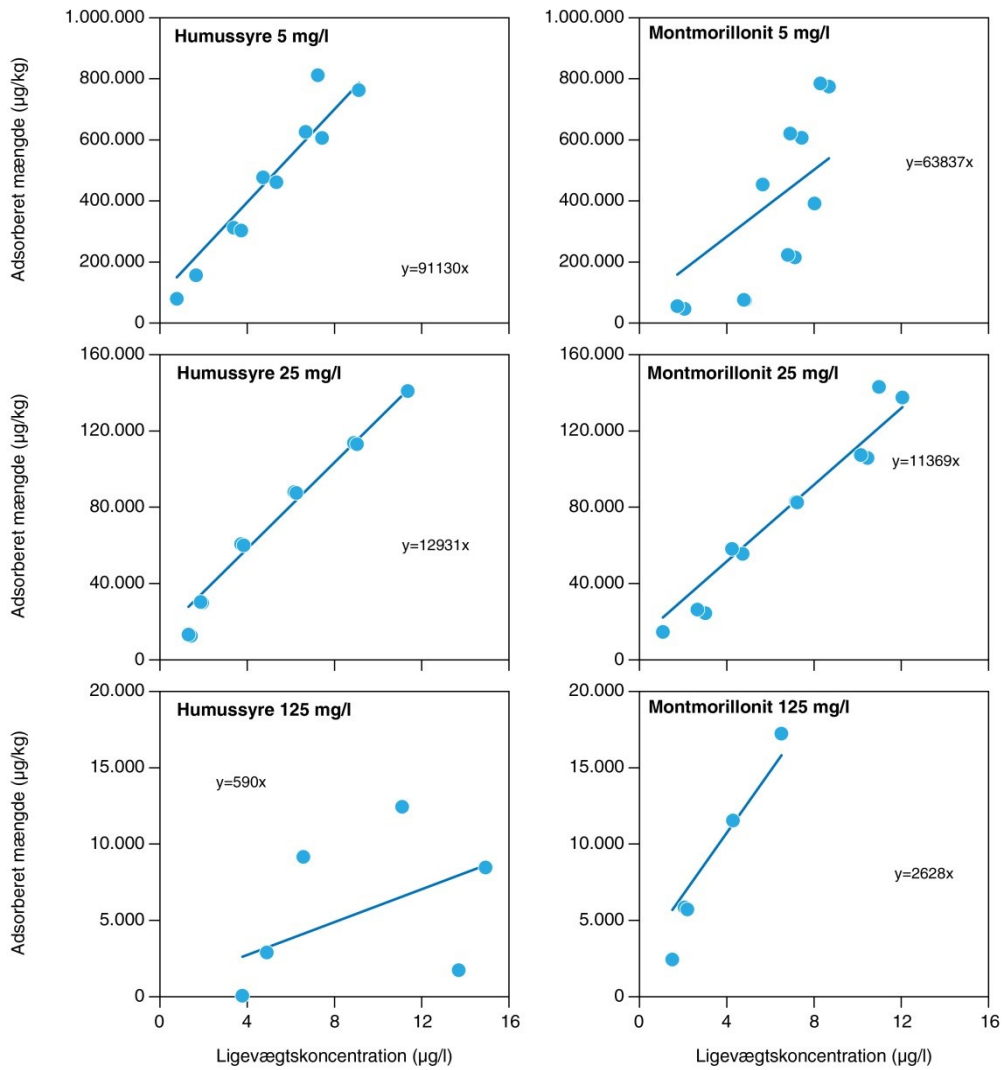
For 100 µg/L lambda-cyhalothrin er undersøgt sorption til arena vægge uden tilstedeværelse af sorbent, og det ses i Figur 5.2, at ca. 0,5 µg lambda-cyhalothrin sorberes til arena-vægge ud af total mængden af lambda-cyhalothrin på 5 µg i de økotoxikologiske testarenaer.

5.1.2 Adsorptionsisothermer for lambda-cyhalothrin til montmorillonit og humussyre

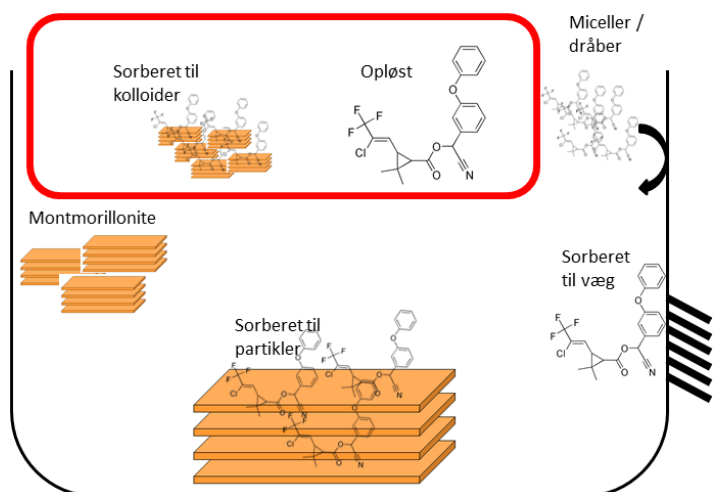
Adsorptionsisothermer for 1-100 µg/L start-koncentration af lambda-cyhalothrin er bestemt for koncentrationer på 5, 25 og 125 mg/L suspenderet montmorillonit og humussyre i simuleret vandløbsvand. I Figur 5.3 er den sorberede mængde lambda-cyhalothrin bestemt som differensen mellem startkoncentration og den målte ligevægtskoncentration (Differencemetoden).

Isothermerne er modelleret ved at fitte en lineær regression til datapunkterne, og ved de undersøgte koncentrationsintervaller er der ikke noget der tyder på, at f.eks. en Freundlich model vil beskrive data bedre end en ret linje (Figur 5.3).

For både montmorillonit og humussyre ses, at fordelingskoefficienten, K_d , falder med stigende koncentration af sorbent fra 10^5 L/kg for 5 mg/L til 10^3 L/kg for 125 mg/L montmorillonit eller humussyre. Adsorptionsisothermerne er parvis i samme størrelsesorden for samme koncentration af montmorillonit og humussyre, men der er en stor ændring i K_d mellem sorbent koncentrationer, hvilket der ikke er en dokumenteret forklaring på. Det er overraskende med de store skift i K_d værdier samtidig med at isothermerne skærer origo og er lineære uden afbøjning ved stigende koncentration selvom koncentrationen kommer over niveauet for opløselighed i rent vand. Suspenderet humussyre og montmorillonit er et kontinuum af større partikler der sedimenterer relativt hurtigt, mindre partikler der sedimenterer væsentligt langsommere og kolloider og opløste makromolekyler der kun meget langsomt eller slet ikke sedimenterer. Cyhalothrin vil sorbere til alle disse uanset størrelse, men ved centrifugeringen hvor vi antager at adskille fast fase fra væskefasen, vil kolloidfraktionen blive medbestemt som del af væskefasen når supernatanten overføres til SPE patronerne (Figur 5.4).



FIGUR 5.3. ADSORPTIONISOTHERMER (DIFFERENSMETODEN) FOR 1-100 µg/L START KONCENTRATION LAMBDA-CYHALOTHRIN TIL MONTMORILLONIT OG HUMUSSYRE I TRE KONCENTRATIONSNIVEAUER: 5, 25 OG 125 mg/L SUSPENDERET SORBENT I SIMULERET VANDLØBSVAND.



FIGUR 5.4. FORDELING AF LAMBDA-CYHALOTHRIN MELLEM VANDFASE, PARTIKELOVERFLADE, KOLLOIDOVERFLADE, ARENAVÆG OG MÅSKE BEGYNDENDE DRÅBEDANNELSE.

En mulig hypotese er således, at suspenderede kolloider udgør en stor del af overfladearealet for de undersøgte sorbentsystemer, og ved stigende sorbent mængde øges kolloidmængden i væskefasen og den tilsyneladende vandopløselighed øges kraftigt og derved ændres fordelingsforholdet mellem vandfase og sorberet på fastfasen. Det kan beskrives som et 3-fase system med 1) partikler (sorbent der kan spinnes ned ved centrifugering), 2) vandfasen, og 3) kolloider som øger vandopløseligheden (emulgeringseffekt) og dermed forskyder ligevægten mellem partikler og vandfase i retning af mindre sorption (lavere K_d) (Box 1). Sorbent koncentrationerne er meget lave i vores ferskvandslignende systemer sammenlignet med litteraturen om sorption, hvor der ofte arbejdes med koncentrationer på 10.000 mg/L sorbent til sammenligning med vores 5, 25 og 125 mg/L som er realistiske for vandløb.

Sedimentation af partikler i alm. tyngdefelt eller accelereret tyngdefelt i centrifuge

Stoke's lov

$$d = \frac{\sqrt{18\mu V_t}}{g(\rho_p - \rho_m)}$$

d diameter for ideal sfærisk partikel
 μ viskositet af medium (≈ 1 g/m·s for vand ved 20 °C)
 V_t sedimentationshastighed (e.g. 5 cm/10 min centrifugering)
 g tyngdekraft (10 m/s² ved 1 atm, eller 10.000 m/s² ved centrifugering)
 ρ_p densitet af partikel (montmorillonit 1,7-2,0 g/cm³)
 ρ_m densitet af medium (vand ≈ 1 g/cm³)

For projektets forsøg med centrifugering til adskillelse af suspenderede partikler fra vandfasen før SPE oprensning giver det cut-off grænse ved partikelstørrelse:
 ≈ 0.4 μm efter centrifugering ved 1.000 g
 ≈ 0.2 μm efter centrifugering ved 5.000 g
 Partikler op til denne størrelse medbestemmes som opløst lambda-cyhalothrin

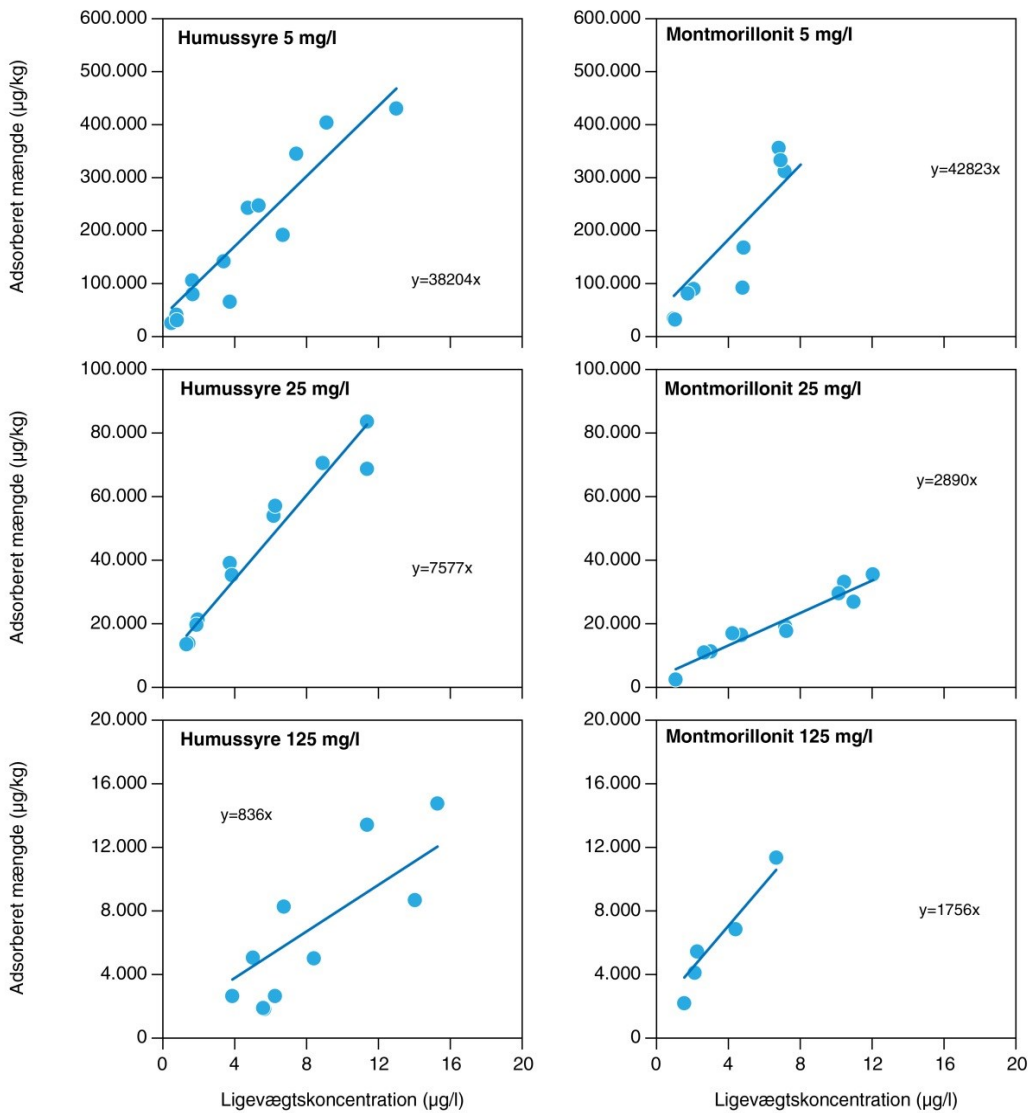
Til sammenligning fås cut-off partikelstørrelse ≈ 2.0 μm efter fri sedimentation i 24 timer i en flaske med 25 cm vandhøjde, dvs. hele lerfraktionen (< 2 μm partikler) er fortsat opløst.

BOX 1. PARTIKELSTØRRELSE I VANDFASE OG SORBENT FASE EFTER CENTRIFUGERING OG FRI SEDIMENTATION AF PRØVER FORUD FOR OPRENSNING OG BESTEMMELSE AF LAMBDA-CYHALOTHTRIN.

De næsten ens K_d værdier (L/kg) for de to modelsorbenter indikerer at lambda-cyhalothrin sorberes stort set ens til samme vægt-koncentration af begge sorbenter, og det kan i nogle tilfælde være nyttigt at omregne til sorption i forhold til den specifikke overflade af sorbenten for at sammenligne på molekylært niveau.

Med lineær model for adsorption i intervallet 1-100 $\mu\text{g/L}$ lambda-cyhalothrin er det muligt at ekstrapolere til lavere koncentrationer ved de enkelte sorbent-koncentrationer. Derimod er det ikke ud fra disse resultater muligt umiddelbart at interpolere for andre koncentrationer af sorbent.

I Figur 5.5 er vist adsorptionsisothermer hvor den sorberede mængde er bestemt ved ekstraktion af sorberet lambda-cyhalothrin for de samme eksperimenter som i Figur 3.7 med 1-100 $\mu\text{g/L}$ start koncentration af lambda-cyhalothrin i ligevægt med hhv. 5, 25 og 125 mg/L suspenderet montmorillonit og humussyre i simuleret vandløbsvand.



FIGUR 5.5. ADSORPTIONSISOTHERMER (EKSTRAKTION AF SORBENT) FOR 1-100 µg/L BEGYNDELSKONCENTRATION LAMBDA-CYHALOTHRIN TIL MONTMORILLONIT OG HUMUSSYRE I TRE KONCENTRATIONSNIVEAUER: 5, 25 OG 125 mg/L SUSPENDERET SORBENT I SIMULERET VANDLØBSVAND.

Ved sammenligning af Figur 5.3 og Figur 5.5 ses lavere mængde sorberet pyrethroid når den sorberede mængde bestemmes ved ekstraktion og analyse i forhold til bestemmelse ved difference metoden hvor den sorberede mængde beregnes ud fra difference mellem begyndelseskoncentration og ligevægtskoncentration i væskefasen. Forskellen skyldes at alle usikkerheder på ligevægtsbestemmelsen, genfindning under 100%, nedbrydning, sorption til udstyr, m.m. automatisk tilskrives puljen sorberet til sorbenten ved differencemetoden, men disse usikkerheder og afvigelser fra ideal situationen ikke indgår i isothermen ved ekstraktionsmetoden. Tab og genfindning lavere end 100% vil påvirke præcisionen af ligevægtskoncentration og sorberet mængde uafhængigt af hinanden, og måleusikkerheden kan være forskellig for de to procedurer til ekstraktion fra hhv. vandfasen og sorbenten for den del af prøvebehandlingen, der ligger forud for SPE oprensningen i dette projekt.

I Tabel 5.2 er de beregnede K_d -værdier opstillet til sammenligning dels for stigende mængde sorbent i 50 mL test-opløsninger, og dels mellem differensmetoden og ekstraktionsmetoden. De målte K_d værdier repræsenterer de aktuelle scenarier for økotoxikologiske test med de to valgte model-sorbenter i de undersøgte virkelighedsnære koncentrationer. K_d værdierne stiger med aftagende koncentrationen af suspenderet materiale for begge procedurer (Tabel 5.2).

Fordelingskoefficienterne bestemt ved differensmetoden vil i denne sammenhæng være maksimumværdier for K_d .

TABEL 5.2. FORDELINGSKOEFFICIENTER (K_d) FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN MED SUSPENDERET HUMUSSYRE OG MONTMORILLONIT I SIMULERET VANDLØBSVAND VED 20 °C. SORBERET MÆNGDE BESTEMT VED HHV DIFFERENSMETODE OG VED EKSTRAKTION FRA SORBENTEN.

Sorbert	Differencen		Ekstraheret	
	Humussyre L/kg	Montmorillonit L/kg	Humussyre L/kg	Montmorillonit L/kg
5 mg/L	$91,1 \times 10^3$	$63,8 \times 10^3$	$38,2 \times 10^3$	$42,8 \times 10^3$
25 mg/L	$12,9 \times 10^3$	$11,4 \times 10^3$	$7,58 \times 10^3$	$2,89 \times 10^3$
125 mg/L	$0,590 \times 10^3$	$2,62 \times 10^3$	$0,836 \times 10^3$	$1,76 \times 10^3$

De lineære adsorptionsisotermer tillader ekstrapolation til origo, og dermed kan selv meget lave koncentrationer estimeres, også selv om ligevægtskoncentrationen af frit opløseligt lambda-cyhalothrin i vandfasen i systemet ligger under detektionsgrænsen for kemisk analyse. Ved eksperimentel undersøgelse af organiske forureningsstoffer med meget høje K_{oc} og dermed også potentielt høje K_d værdier kan det være nyttigt med ligevægtskonstanter for systemerne som bedst mulige estimat for de aktuelle ligevægtskoncentrationer beregnet ud fra de nominelle start koncentrationer. Det vil naturligvis være at foretrække med direkte måledata for de miljørelevante koncentrationer, hvor det kan lade sig gøre at adskille kolloid og suspenderet materiale fra væskefasen uden at skulle bruge filtre som sorberer disse stærkt hydrofobe stoffer.

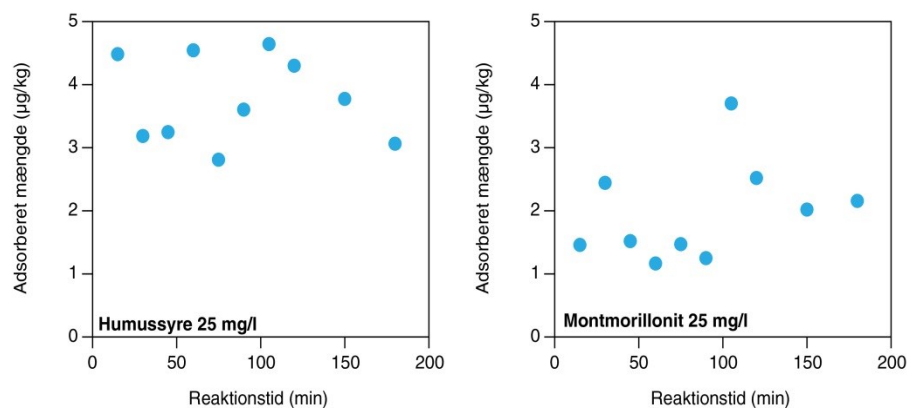
5.1.3 Usikkerhedsmomenter ved sorptionsforsøg med lambda-cyhalothrin og model sorbenter

Ved modelberegning af ligevægtskoncentrationer i eksperimentelle scenarier skal systemet være kendt for, at de rigtige ligevægtskoncentrationer kan beregnes. Præcision og/eller repeterbarhed ved afpipettering af suspension til de økotoxikologiske arenaer bliver her en meget kritisk operation for at opnå ensartede mængder af suspenderet materiale i hver af de økotoxikologiske testarenaer med henblik på at anvende den målte adsorptionsmodel for de aktuelle sorbenter til at ekstrapolere fordelingskoefficienten til miljørelevante koncentrationer af lambda-cyhalothrin, der ligger under detektionsgrænsen. Tabel 5.3 viser et sæt testresultater for slutkoncentration efter afpipettering af suspenderet sorbent fra stamsuspension for én person og repræsenterer altså repeterbarheden af enhedsoperationen foretaget umiddelbart efter hinanden, og der skal tages højde for, at dag til dag repeterbarheden højst sandsynligt vil være mindre, og tilsvarende vil variationen med stor sandsynlighed være højere, når enhedsoperationen foretages af forskellige personer i forskellige laboratorier (reproducerbarhed).

TABEL 5.3. SORBENTKONCENTRATIONER AF AFPIPETTERET SUSPENDERET HUMUSSYRE OG MONTMORILLONIT I SERIER BESTEMT EFTER INDTØRRING AF SUSPENSION. GENNEMSIT +/- STANDARDAFVIGELSE, N=5 FOR HVERT NIVEAU.

	Humussyre	Montmorillonit
Sorbent nominel koncentration	Gns +/- stdev	Gns +/- stdev
5 mg/L	8,6 +/- 5,4	6,9 +/- 5,0
25 mg/L	22,9 +/- 9,0	21,6 +/- 10,0
125 mg/L	105,7 +/- 29,0	100,2 +/- 19,8

Eksperimenterne med kortvarig puls af lambda-cyhalothrin til montmorillonit og humussyre omfattede også adsorptionskinetik for at undersøge følsomheden af denne parameter i forsøgsopsætningen. Figur 5.6 viser resultaterne for humussyre og montmorillonit ved sorbent koncentration 25 mg/L og med nominal start-koncentration af lambda-cyhalothrin på 100 µg/L. Der ses ikke forskel i kinetik for de to sorbenter, men der er relativt store forskelle mellem de enkelte prøver. Humussyre ser ud til meget hurtigt, dvs. allerede inden for 15 minutter, at have nået maksimumniveauet for adsorption, og montmorillonit har heller ingen udvikling over 90 minutter selvom den adsorberede mængde er lavere. Data afspejler ganske godt variationen mellem forsøgsled på mængden af sorbent og illustrerer behovet for præcision og gentagelser, jvf. den observerede variation i afpipettering af suspension vist i Tabel 5.3.



FIGUR 5.6. ADSORPTIONSKINETIK AF LAMBDA-CYHALOTHRIN TIL 25 mg/L NOMINEL KONCENTRATION AF SUSPENDERET MONTMORILLONIT OG HUMUSSYRE.

Eksperimentelle økotoxikologiske forsøg med kortvarige pulse af stærkt adsorberende stoffer skal designes med hensyn til sorptions-kinetik, så eksponeringen er konstant. For lambda-cyhalothrin og de to model-sorbenter i disse forsøg indstilles adsorptionsligevægten hurtigt, og den frit opløste koncentration af lambda-cyhalothrin må anses for at være nogenlunde konstant i hver enkelt arena gennem langt det meste af 90 minutters eksponeringen (Figur 5.6).

Sammenlignes fordelingen af lambda-cyhalothrin mellem frit opløst i vandfase og mængden ekstraheret fra sorbent efter reaktionstiden 90 min med fordelingen for 25 mg/L sorbent i Figur 5.6 for 100 µg/L lambda-cyhalothrin, så bør disse være relativt ens, hvis systemet er robust. For humussyre er der tydeligt forskel mellem resultaterne, hvor hovedparten af lambda-cyhalothrin er sorberet i forsøgene præsenteret i Figur 5.6 og relativt lidt sorberet i resultaterne præsenteret i Figur 5.2. For montmorillonit er der sorberet ca. dobbelt så meget i forsøgene vist i Figur 5.5 sammenlignet med resultaterne i Figur 5.2. Noget af forklaringen på denne forskel kan være fysiske ændringer i sorbent stam-suspensionen over tid, hvor de suspenderede humussyre og lerpartikler kan dispergere mere og mere med tiden eller omvendt flokkulere mere og mere med tiden, og derved ændres den specifikke overflade (m^2/g), og en afpipettering af samme vægt partikler giver en meget forskellig partikeloverflade, hvor adsorptionen foregår. Det er også kendt, at opfugtningen af humus-partikler ændrer den rumlige struktur af makromolekylerne, og derved ændres adsorptionskapaciteten pr. vægtenhed, når suspensionen ældes. I dette projekt har vi valgt at have én stam-suspension til hele adsorptionsforsøgsserien for at opnå bedst mulig reproducerbarhed af suspenderet sorbent på vægtbasis, og det giver så denne bias, når forsøgene løber over 2 måneder. I forsøget er det prioriteret, at resultater, der skal sammenlignes direkte, gennemføres samtidig, f.eks. alle forsøg bag data i Figur 5.1, og nødvendigheden af mere detaljerede fysisk-kemiske parametre er tydelig for økotoxikologiske eksponeringsforsøg med forsøg med suspenderede partikler.

I scenarier, hvor sorbentkoncentrationen og dermed sorptionen er forsvindende lille, og tilsvarende hvor sorbentkoncentrationen er meget stor ift. koncentrationen af lambda-cyhalothrin, vil variationen formentlig være negligerbar. I dette projekt er tilstræbt at undersøge forholdene, hvor sorbenten har en betydning og i koncentrationsinterval for lambda-cyhalothrin, som er kendt for at have en effekt på de økotoksikologiske testorganismer.

5.1.4 Sammenligning af målte og beregnede koncentrationer af lambda-cyhalothrin i fri opløsning i videospøringsforsøgene

TABEL 5.4. MÅLTE KONCENTRATIONER AF LAMBDA-CYHALOTHRIN ($\mu\text{g/L}$) I VIDEO-SPORINGSARENAER EFTER PULSEKSPONERENGEN. TR: TRACE (UNDER KVANTIFIKATIONSGRÆNSEN); IM: IKKE MÅLT; IP: IKKE PÅVIST. N=3

Pesticid	MONTMORILLONIT, mg/L			HUMUSSYRE, mg/L		
	5	25	125	5	25	125
Nominel start koncentration $\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$					
3,2	0,80	0,92	0,82	0,73	0,57	0,82
1,0	IP	IP	0,57	TR	IP	0,61
0,32	IM	IM	IM	TR	IM	IM
0,1	IM	IM	IM	IM	IM	IM
0,032	IM	IM	IM	IM	IM	IM

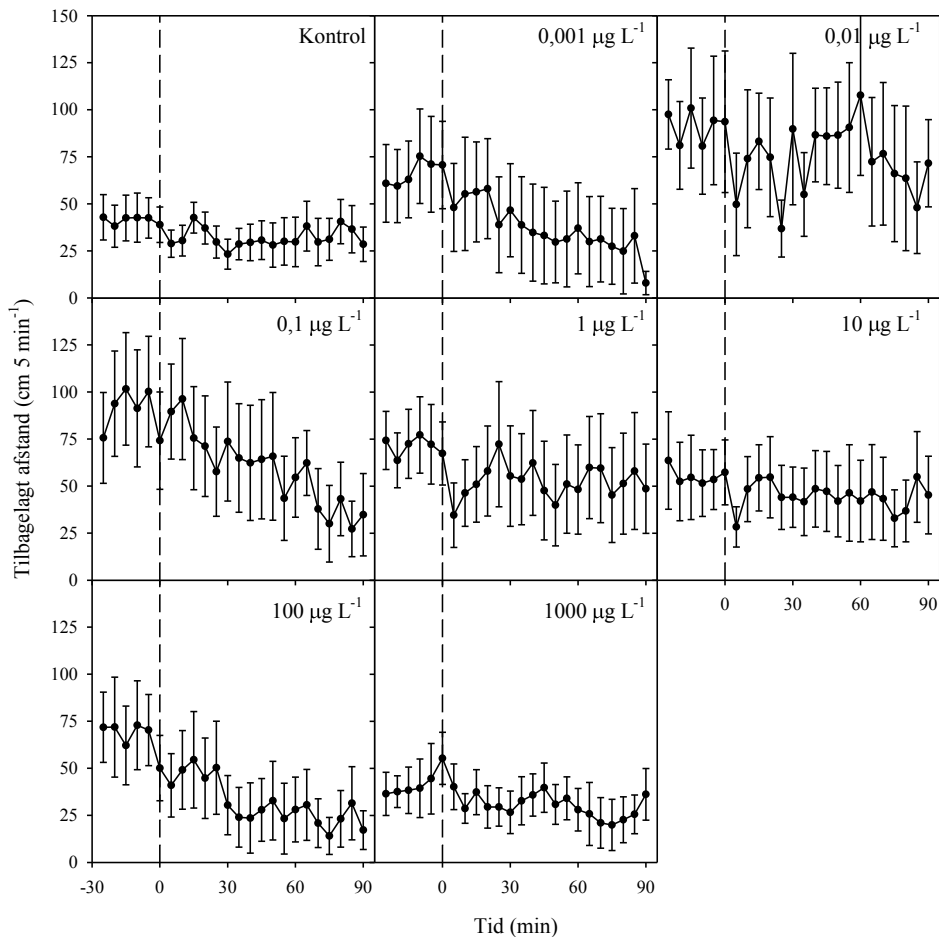
Det var ønsket at bestemme koncentrationen af frit opløst pyrethroid i test-arenaer med fokus på adsorption i København (Figur 5.3) og sammenligne med de målte koncentrationer fra videospøringsforsøgene i Silkeborg og på den måde teste mulighederne for at gennemføre forskningsprojektet trinvis. Sorptionsforsøgene (Figur 5.3) for 1 $\mu\text{g/L}$ nominel koncentration i test-arenaerne viste koncentrationer på 0,29 +/-0,10 $\mu\text{g/L}$ for 5 mg/L montmorillonit og 0,17 +/-0,15 $\mu\text{g/L}$ for 5 mg/L humussyre delforsøget, og koncentrationen både for 25 og 125 mg montmorillonit/L lå under detektionsgrænsen. Disse koncentrationer skal sammenlignes med de målte koncentrationer for 1 $\mu\text{g/L}$ i videospøringsforsøgene (Tabel 5.4), og den fri koncentration af lambda-cyhalothrin også under detektionsgrænsen (IP), under kvantifikationsgrænsen (TR) men identificeret i prøven eller en lav koncentration på ca. 0,6 $\mu\text{g/L}$ som er i det laveste område vi kan bestemme når totalvolumen er 50 mL prøve før opkoncentrering. Dvs. usikkerheden på bestemmelserne er for store til reelt at kunne afgøre om de to bestemmelser stemmer overens.

Derudover kan vi estimere ligevægtskoncentrationerne ud fra K_d fra adsorptionsisothermerne (Figur 5.3), men disse data har 1 $\mu\text{g/L}$ nominel koncentration som yderpunkt for regressionen og dermed relativt stor usikkerhed på værdien, og igen er problemet at kvantificeringsgrænsen kun ligger ca. en størrelsesorden under startkoncentrationen i de 50 mL prøve.

5.2 Økotoksikologi: Tilstandsform og skadevirkning

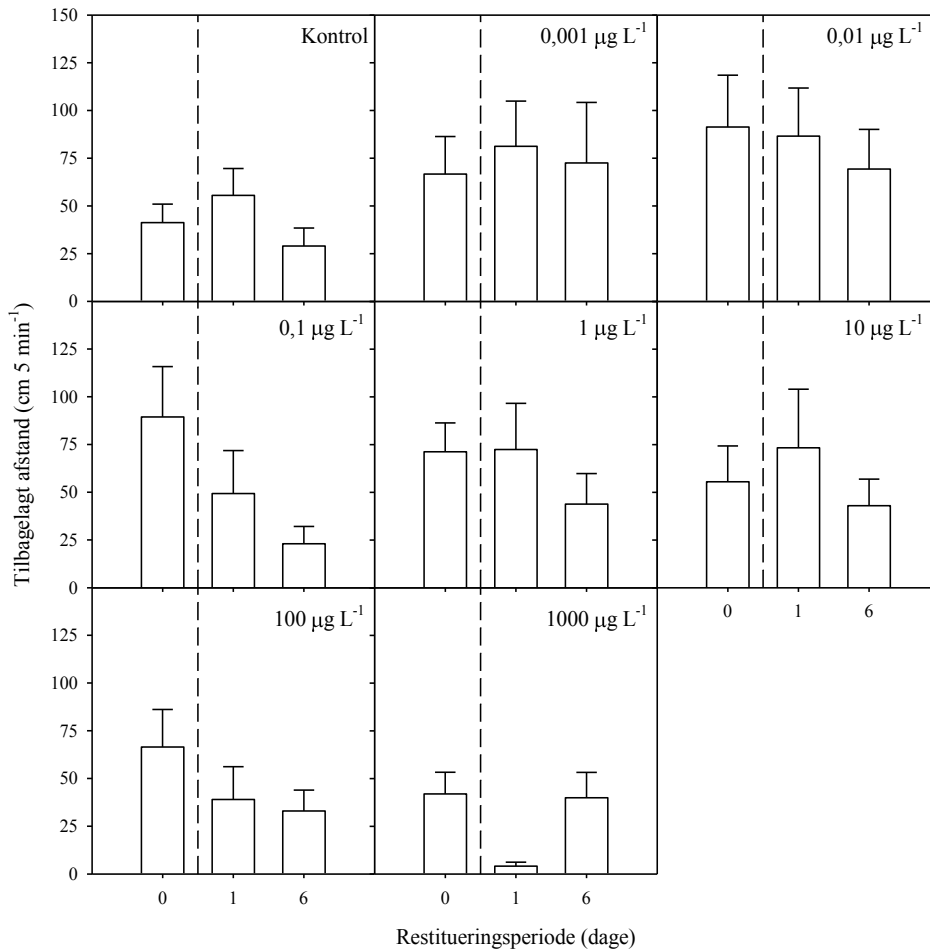
5.2.1 Range-finding-studium med thiacloprid

Figur 5.7 viser bevægelsesadfærden hos *G. pulex* før og under pulseksponering for thiacloprid på dag nul. Adfærden hos kontrolgruppen i baggrundssporingen var ikke signifikant forskellig fra adfærden gennem eksponeringsperioden. På trods af, at der for visse grupper, især grupperne eksponeret for 0,001, 0,1 og 100 $\mu\text{g/L}$, blev observeret en tendens til faldende aktivitetsniveau i løbet af eksponeringsperioden, kunne dette ikke tilskrives eksponeringen, da der ingen tydelig eller signifikant sammenhæng var mellem eksponeringskoncentration og adfærdsrespons.



FIGUR 5.7. EFFEKT AF THIACTOPRID PÅ TILBAGELAGT AFSTAND HOS *G. PULEX*. BAGGRUNDSADFÆRDEN FOR *G. PULEX* I UKONTAMINERET VAND BLEV REGISTRERET I 30 MIN OG ADFÆRDEN I THIACTOPRID-KONTAMINERET VAND DERNÆST FULGT I YDERLIGERE 90 MIN. (GENNEMSIT \pm SEM, KONTROLGRUPPE: N=19, EKSPONEREDE GRUPPER: N=7-10).

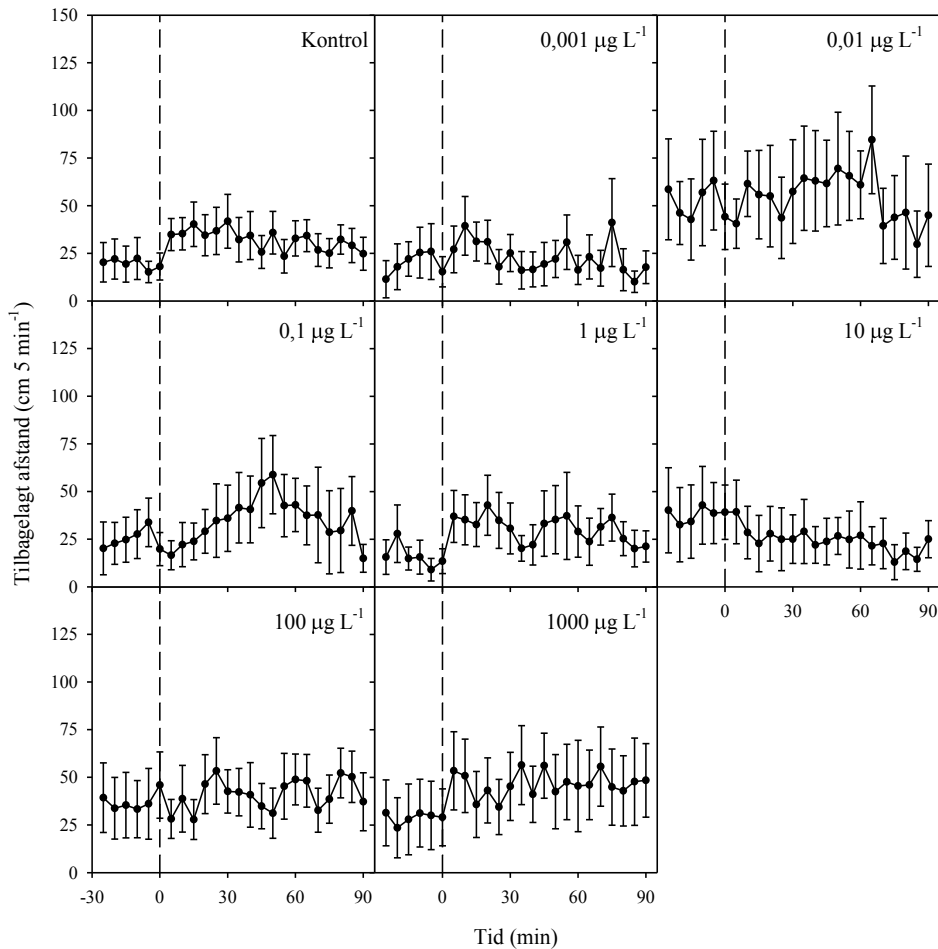
I løbet af den efterfølgende 6-dages restitueringsperiode var den eneste tydelige effekt af eksponering en forbigående reduktion i aktivitetsniveauet i den højest eksponerede gruppe (1000 $\mu\text{g/L}$) på dag 1, hvor 70% af individerne var immobile, mens resten havde et markant reduceret aktivitetsniveau (Figur 5.8). Denne påvirkning var kun midlertidig, og på dag 6 var der ingen koncentrationsafhængige forskelle i aktivitetsniveau, ligesom overlevelsen var 100% i alle grupper.



FIGUR 5.8. TILBAGELAGT AFSTAND HOS *G. PULEX* GENNEM EN 6-DAGES RESTITUERINGSPERIODE I UKONTAMINERET VAND EFTER ENDT EKSPONERING FOR THIACLOPRID. (GENNEMSNIT±SEM, KONTROLGRUPPE: N=19, EKSPONEREDE GRUPPER: N=7-10).

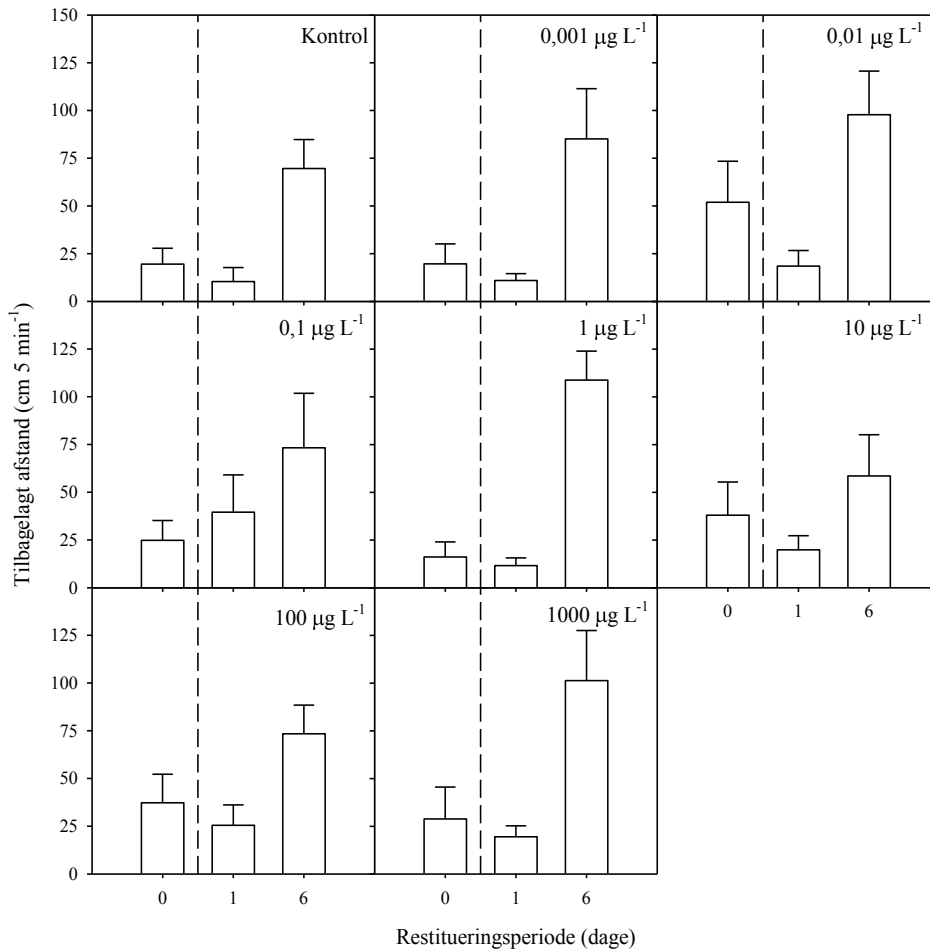
5.2.2 Range-finding-studium med pirimicarb

Figur 5.9 viser bevægelsesadfærden hos *G. pulex* før og under pulseksposering for pirimicarb på dag 0. Aktivitetsniveauet hos kontrolgruppen var konstant gennem kontrolperioden, men en smule forøget efter tilsætningen af ethanol, hvilket sandsynligvis skyldes den forstyrrelse af vandet, som tilsætningen forårsager. Samme tendens blev observeret i flere af de eksponerede grupper, men disse ændringer kunne ikke tilskrives eksponeringen, da der ingen signifikant sammenhæng var mellem eksponeringskoncentration og adfærdsrespons.



FIGUR 5.9. EFFEKT AF PIRIMICARB PÅ TILBAGELAGT AFSTAND HOS *G. PULEX*. BAGGRUNDSADFÆRDEN FOR *G. PULEX* I UKONTAMINERET VAND BLEV REGISTRERET I 30 MIN OG ADFÆRDEN I PIRIMICARB-KONTAMINERET VAND DERNÆST FULGT I YDERLIGERE 90 MIN. (GENNEMSNIIT±SEM, KONTROLGRUPPE: N=18, EKSPONEREDE GRUPPER: N=8-11).

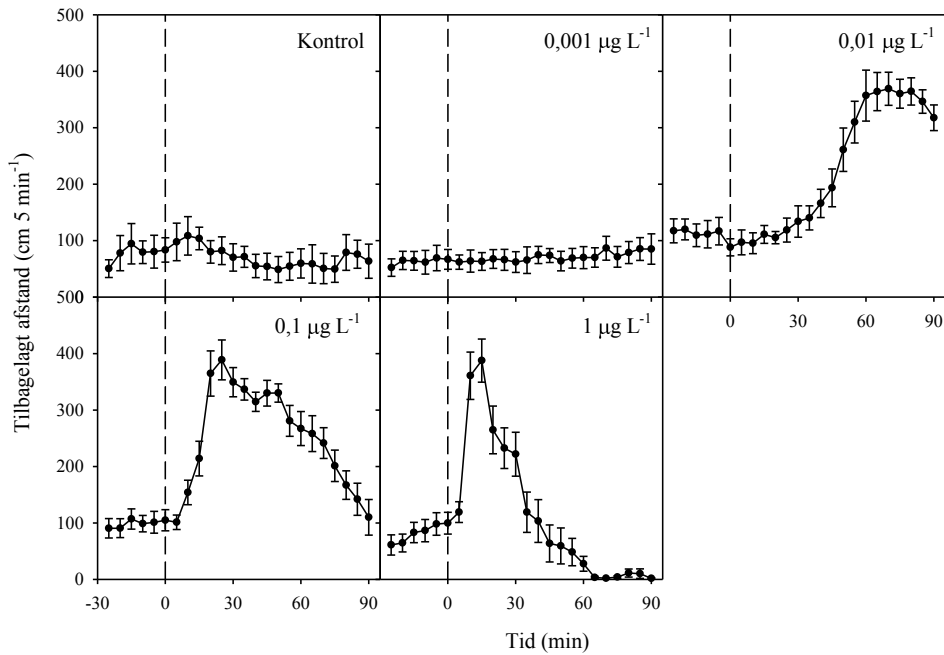
Der var i den efterfølgende 6-dages restitueringsperiode ingen tydelige effekter af eksponering (Figur 5.10). Aktivitetsniveauet på dag 6 var for alle grupperne markant højere end i kontrolperioden dag 0 og på dag 1. Sådanne forskelle forekommer naturligt, er tidligere observeret i videosporingssystemet (Wiberg-Larsen & Nørum 2009), og afhænger bl.a. af det præcise tidspunkt på dagen for adfærdsregistreringerne. Desuden var baggrundsadfærden hos *G. pulex* i dette delforsøg generelt meget lav, hvilket ligeledes må tilskrives naturlig variation i organismernes adfærd. Overlevelsen var i alle grupper 100%.



FIGUR 5.10. TILBAGELAGT AFSTAND HOS *G. PULEX* GENNEM EN 6-DAGES RESTITUERINGSPERIODE I UKONTAMINERET VAND EFTER ENDT EKSPONERING FOR PIRIMICARB. (GENNEMSNIT±SEM, KONTROLGRUPPE: N=18, EKSPONEREREDE GRUPPER: N=8-11).

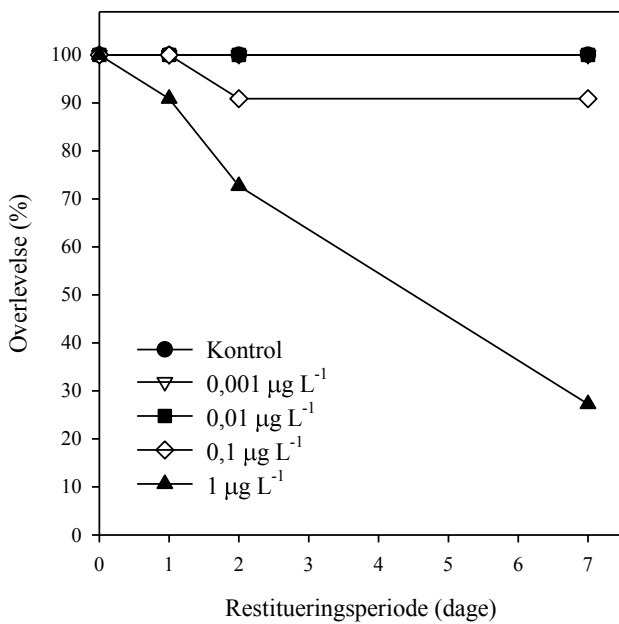
5.2.3 Valideringsforsøg med lambda-cyhalothrin

Figur 5.11 viser bevægelsesadfærden hos *G. pulex* før og under pulseksponering for lambda-cyhalothrin på dag 0. Mens adfærden hos kontrolgruppen var relativt konstant gennem kontrol- og eksponerings-perioden, var der en markant effekt af pulseksponering med lambda-cyhalothrin på den tilbagelagte afstand. Der blev således observeret en markant forøget aktivitet, såkaldt hyperaktivitet, allerede ved 0,01 µg/L. Ved 0,1 µg/L observeredes et bifasisk adfærdsrespons, hvor hyperaktiviteten ikke kunne opretholdes, men blev efterfulgt af en gradvis reduktion i den tilbagelagte afstand. Ved 1 µg/L blev immobilisering observeret efter ca. 65 minutters eksponering.



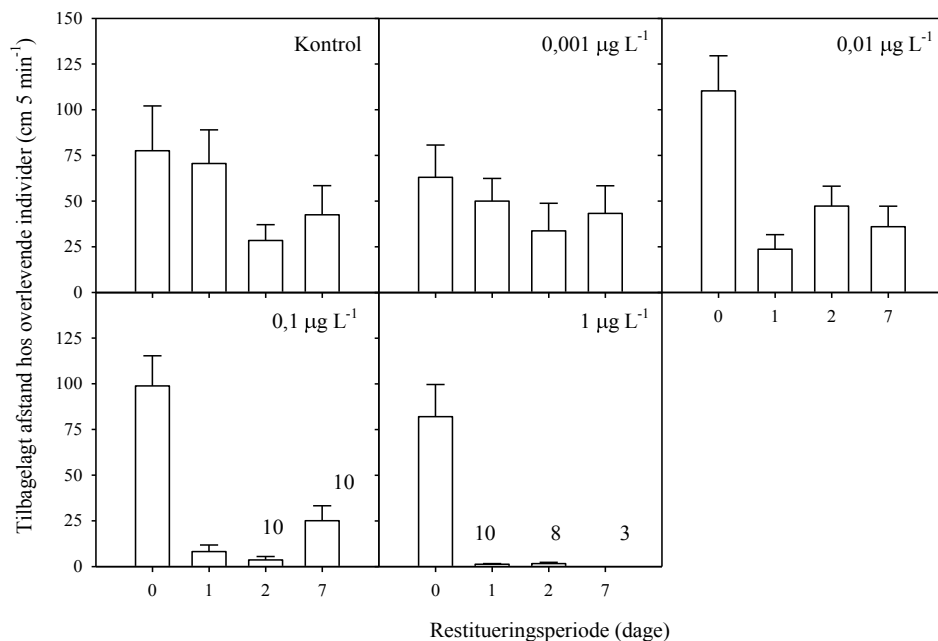
FIGUR 5.11. EFFEKT AF LAMBDA-CYHALOTHRIN PÅ TILBAGELAGT AFSTAND HOS *G. PULEX*. BAGGRUNDSADFÆRDEN FOR *G. PULEX* I UKONTAMINERET VAND BLEV REGISTRERET I 30 MIN OG ADFÆRDEN I LAMBDA-CYHALOTHRIN-KONTAMINERET VAND DERNÆST FULGT I YDERLIGERE 90 MIN. (GENNEMSNIT±SEM, N=11).

Overlevelsen i den efterfølgende 7-dages restitueringsperiode fremgår af Figur 5.12. I kontrolgruppen og grupperne eksponeret for 0,001 og 0,01 µg/L var overlevelsen 100%, mens én af 11 individer døde på dag 2 i gruppen eksponeret for 0,1 µg/L. Ved 1 µg/L var der en markant dødelighed, og på dag 7 var kun tre individer i live.



FIGUR 5.12. OVERLEVELSE HOS *G. PULEX* GENNEM EN 7-DAGES RESTITUERINGSPERIODE I UKONTAMINERET VAND EFTER ENDT EKSPONERING FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. (GENNEMSNIT±SEM, N(DAG 0)=11).

Bevægelsesadfærden hos overlevende individer fremgår af Figur 5.13. På dag 1 var aktivitetsniveauet i grupperne eksponeret for 0,1 og 1 µg/L signifikant reduceret i forhold til kontrolgruppen. Dette var tilsyneladende forbigående ved 0,1 µg/L, og der var på dag 7 ingen forskel i forhold til kontrolgruppen. Ved 1 µg/L var aktivitetsniveauet meget lavt på såvel dag 1, 2 som 7, og det var for denne gruppe karakteristisk, at individerne forblev immobile, indtil de døde.



FIGUR 5.13. TILBAGELAGT AFSTAND HOS OVERLEVENDE *G. PULEX* GENNEM EN 7-DAGES RESTITUERINGSPERIODE I UKONTAMINERET VAND EFTER ENDT EKSPONERING FOR LAMBDA-CYHALOTHRIN. (GENNEMSNIT±SEM, N(DAG 0)=11).

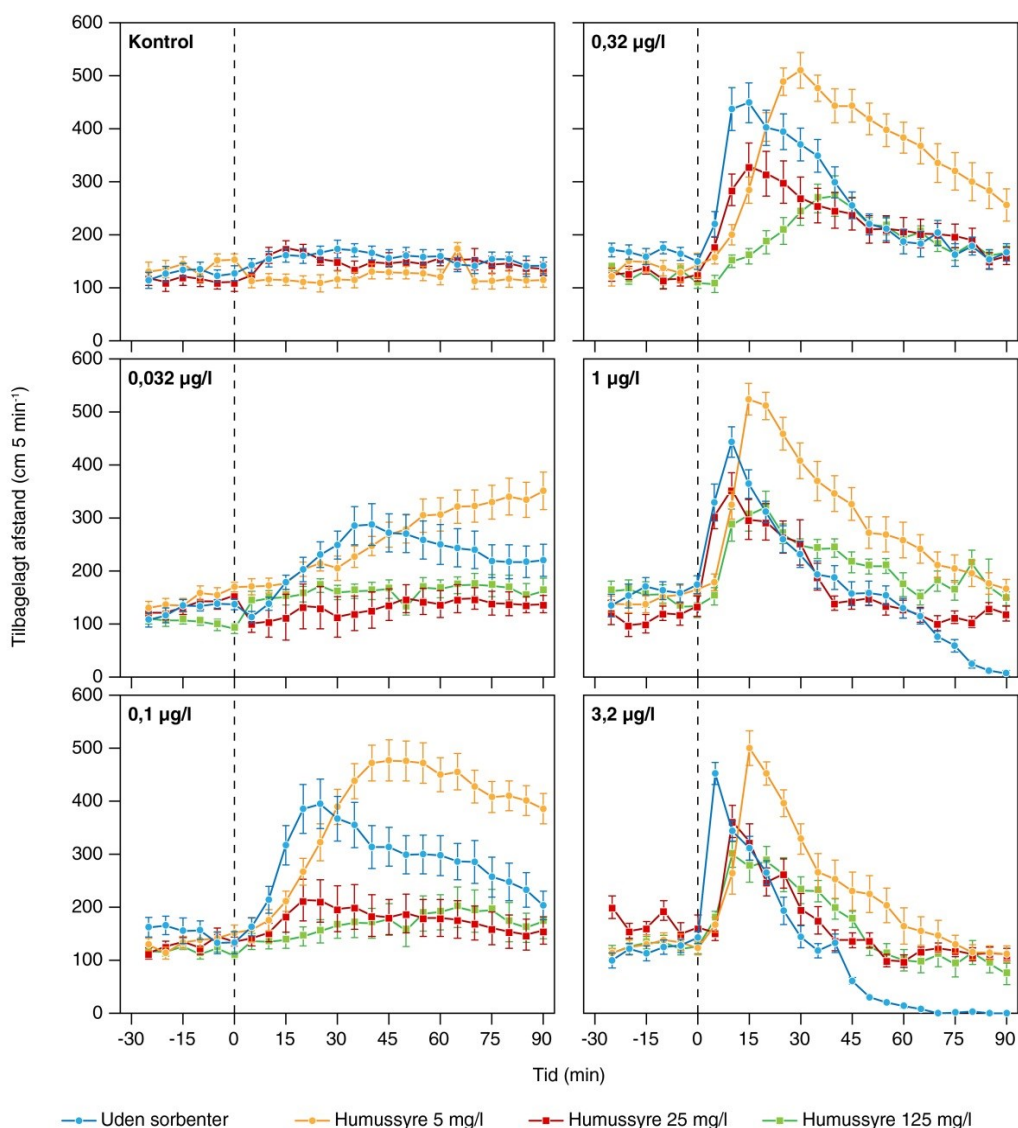
5.3 Betydningen af lambda-cyhalothrins tilstandsform for dets skadevirkninger på *Gammarus pulex*

Betydningen af lambda-cyhalothrins tilstandsform for dets skadevirkninger på *Gammarus pulex* blev evalueret med humussyre og lerminerale montmorillonit som mulige sorbenter da der ikke blev fundet effekter af thiacloprid og pirimicarb ved de gennemførte range finding studier. Nedenstående bliver effekterne af de to typer sorbent beskrevet i særskilte afsnit for at fremme klarheden i resultaterne.

5.3.1 Humussyre som sorbent

Figur 5.14 viser bevægelsesadfærden hos *G. pulex* umiddelbart før og under eksponering af tre forskellige koncentrationer af humussyre i kombination med 5 forskellige koncentrationer af lambda-cyhalothrin. Adfærden hos kontrolgruppen var relativt konstant igennem kontrol- og eksponeringsperioden. Ligeledes var der ingen signifikant effekt på *G. pulex* bevægelsesadfærd af humussyre ved nogen af de anvendte koncentrationer. Ved 0,032 og 0,1 µg/L uden tilsat humussyre blev der observeret en markant forøget aktivitet, der varede igennem hele eksponeringsperioden, og kurveforløbene var signifikant forskellige fra kontrolgruppen ($P < 0,05$). En lignende, men let forsinket respons blev observeret ved de samme lambda-cyhalothrinskoncentrationer i kombination med 5 mg/L humussyre, mens der ved højere koncentrationer af humussyre ikke var signifikant effekt af lambda-cyhalothrin på bevægelsesadfærden under eksponeringsperioden. Ved højere koncentrationer af lambda-cyhalothrin uden tilsat humussyre blev der observeret en bifasisk adfærdrespons, hvor hyperaktiviteten ikke kunne opretholdes igennem hele

eksponeringsperioden, og hyperaktivitetsperioden blev efterfulgt af en gradvis reduktion i tilbagelagt afstand.



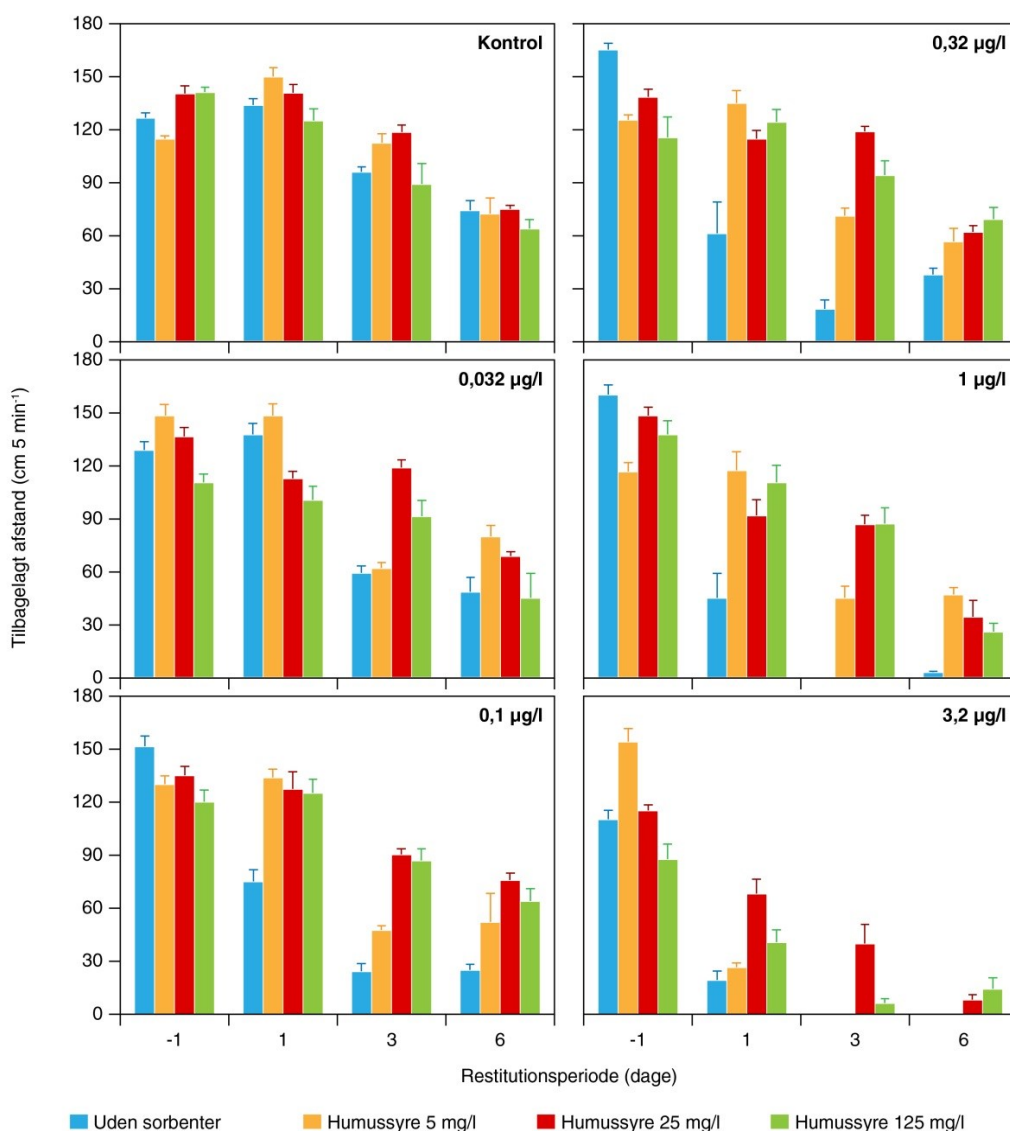
FIGUR 5.14. EFFEKT AF LAMBDA-CYHALOTHRIN PÅ TILBAGELAGT AFSTAND HOS OVERLEVENDE *G. PULEX*. BAGGRUNDSADFÆRDEN BLEV REGISTERET GJENNEM EN 30 MINUTTER LANG PERIODE, HVOREFTER LAMBDA-CYHALOTHRIN BLEV TILSAT I KOMBINATION MED TRE FORSKELLIGE KONCENTRationer AF HUMUSSYRE INKLUSIVE KONTROL. ADFÆRDEN BLEV LIGELEDNES MÅLT I EN REN KONTROLGRUPPE UDEN TILSÆTNING AF HUMUSSYRE ELLER LAMBDA-CYHALOTHRIN. (GENNEMSNIT±SEM, N(DAG 0)=16).

Ved eksponering af 1 µg/L blev der observeret decideret immobilitet efter 80-85 minutter, og denne immobilitet blev observeret endnu tidligere i 3,2 µg/L behandlingen. Ved 0,32 µg/L behandlingen blev adfærdsresponsen let forsinket i tid ved kombinationsbehandling med 5 mg/L humussyre. Ved højere koncentrationer af humussyre blev der ligeledes observeret en tidlig forsinkelse af adfærdsresponsen, imens hyperaktivitetsperioden også var kendetegnet ved et lavere mobilitetsniveau. Ved de to højeste lambda-cyhalothrinkoncentrationer blev der ligeledes observeret en let forsinket adfærdsrespons i kombinationsbehandling med 5 mg/L humussyre, og ved højere koncentrationer af humussyre blev der både observeret en tidlig forsinkelse af adfærdsresponsen samt et lavere hyperaktivitetsniveau. Der blev ikke observeret fuldstændig immobilisering ved nogen lambda-cyhalothrinkoncentrationer i kombination med humussyre igennem eksponeringsperioden.

Adfærdsresponsen var signifikant forskellig fra kontrolgruppen i alle kombinationsbehandling med lambda-cyhalothrinkoncentrationer > 0,1 µg/L ($P < 0,05$). For kombinationsbehandling med

humussyre og lambda-cyhalothrin-koncentrationer på 0,032 µg /L og 0,1 µg/L var kun kombinationer med 5 mg/L humussyre signifikant forskellig fra kontrolgruppen ($P < 0,05$).

Figur 5.15 viser gennemsnitlig tilbagelagt afstand for *G. pulex* efter 1, 3 og 6 dages restitution i ukontamineret kunstigt ferskvand efter endt eksponering for lambda-cyhalothrin i kombinerede eksponeringsscenarier med humussyre (5, 25 og 125 mg/L og kontrol). Der var ingen signifikant effekt af koncentrationen af humussyre i rene humussyrebehandlinger på restitutionen af *G. pulex* ($P > 0,05$), men der var en generel tendens til reduceret tilbagelagt afstand efter 6 dages restitution sammenlignet med baggrundsadfærden. Dette kan formentlig tilskrives den manglende fødeindtagelse igennem hele forsøgsperioden, hvilket naturligt reducerer den overskydende energimængde efter varetagelse af basale fysiologiske processer. Det er derfor også mest meningsfyldt kun at sammenligne restitueringsparametre imellem grupper indenfor samme observationsdag.



FIGUR 5.15. GENNEMSNITLIG TILBAGELAGT AFSTAND FOR *G. PULEX* EFTER ENDT EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHTRIN I KOMBINATION MED HUMUSSYRE. (GENNEMSNIT±SEM, N(DAG 0)=16).

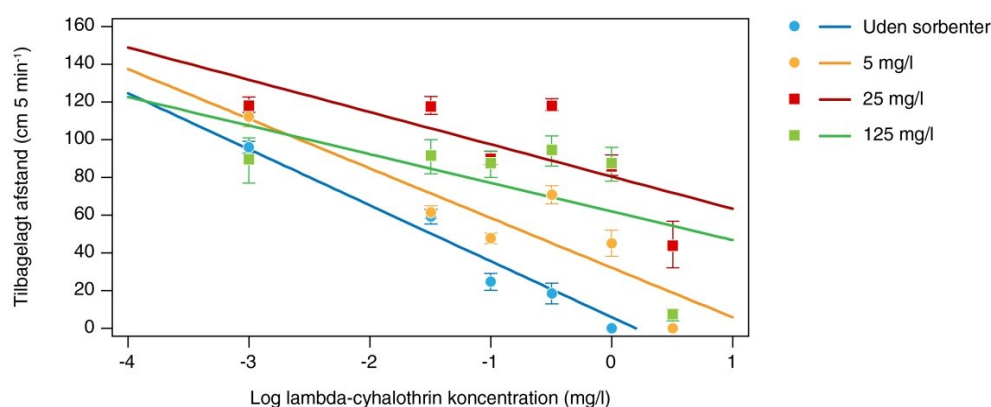
For rene lambda-cyhalothrin behandlinger var det gældende, at reduktionen i tilbagelagt afstand blev forøget med forøget eksponeringskoncentration af lambda-cyhalothrin, og individer

eksponeret for op til 0,32 µg /L havde efter 6 dages restitution ikke en bevægelsesadfærd der var signifikant forskellig fra kontrolgruppen ($P > 0,05$). Dog var der signifikant reduceret bevægelsesaktivitet i 0,1 µg /L og 0,32 µg /L behandlingerne på forsøgsdag 3 ($P < 0,05$). Denne restitution kan formentlig tilskrives, at *G. pulex* til en vis grad kan nedbryde pyrethroid aktivstoffer ved enzymatiske processer. Ligesom i valideringsforsøget med frit opløst lambda-cyhalothrin (Figur 5.11) var individer eksponeret for ≥ 1 µg/L efter 6 dages restitution stadig kendetegnet ved en bevægelsesaktivitet der var signifikant reduceret i forhold til kontrolgruppen ($P < 0,05$) og disse individer forblev generelt mere eller mindre immobile indtil de døde. Dette skyldes formentlig primært lambda-cyhalothrins neurotoksiske aktivitet som blokkerer lukning af natrium/kalium pumpen og dermed også øjeblikkeligt ophør af basale kropsfunktioner.

Ved to-vejs ANOVA analyse blev det konstateret, at der for alle kombinationsbehandlinger var en overordnet effekt af både lambda-cyhalothrin og humussyre samt en signifikant interaktion imellem lambda-cyhalothrin og humussyre ($P < 0,001$). Denne sammenhæng var gældende for forsøgsdagene 1, 3 og 6 ($P < 0,001$). Stigende lambda-cyhalothrinkoncentrationer reducerede bevægelsesaktiviteten ligesom det blev observeret i forsøgene med frit opløst lambda-cyhalothrin.

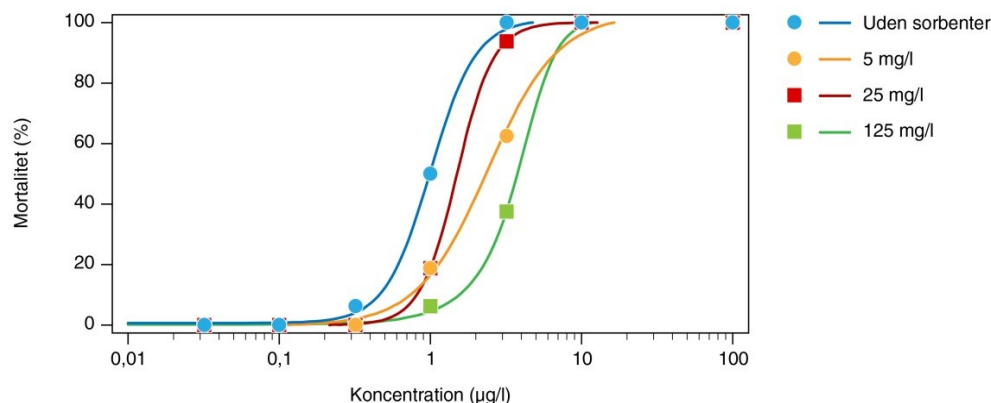
Af Figur 5.15 ses dette billede tydeligt ved især koncentrationerne 0,1 µg /L til 1 µg /L hvor bevægelsesadfærden igennem hele restitutionsperioden er tydeligt højere ved tilstedeværelse af humussyre under eksponering. For at øge klarheden for, hvorledes interaktionen imellem humussyre og lambda-cyhalothrin udmønter sig i forandrede adfærdsresponsen imellem de anvendte eksponeringsscenarier, har vi fremstillet en graf over tilbagelagt afstand som funktion af koncentration af lambda-cyhalothrin for de fire humussyrekoncentrationer (0, 5, 25 og 125 mg /L) (Figur 5.16). Sammenhængen er afbildet for forsøgsdag 3, fordi der på senere forsøgsdage var et for mange "huller" i datasættet pga. døde organismer.

En signifikant interaktion i ANOVA testen indikerer, at sammenhængen imellem lambda-cyhalothrin koncentration og tilbagelagt afstand varierer med varierende humussyrekoncentration. Af Figur 5.16 ses, at lineær regression kun gælder for serierne uden sorbent og med 5 mg/L humussyre, mens både 25 og 125 mg/L humussyre serierne giver meget lave regressionskoefficienter. Lambda-cyhalothrinkoncentration på 1 µg/L og mindre giver ingen effekt for de to høje sorbent koncentrationer, og kun ved den højeste koncentration på 3,2 µg/L lambda-cyhalothrin ses en reduktion i tilbagelagt afstand på næsten samme lave niveau som for serien uden sorbent.



FIGUR 5.16. TILBAGELAGT AFSTAND FOR *G. PULEX* 3 DØGN EFTER ENDT EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHTRIN I KOMBINATION MED TRE KONCENTRATIONER AF HUMUSSYRE SAMT KONTROL UDEN TILSAT HUMUSSYRE. (GENNEMSIT±SEM, N(DAG 0)=16). SAMMENHÆNG IMELLEM DATAPUNKTER ER INDIKERET VED LINEÆRE REGRESSIONER, OG REGRESSIONSKOEFFICIENTERNE ER 0,95, 0,79, 0,52 OG 0,31 FOR HHV. BEHANDLINGER UDEN HUMUSSYRE OG MED 5, 25 OG 125 MG/L HUMUSSYRE.

Figur 5.17 angiver koncentrations-respons sammenhængen for mortalitet målt på *G. pulex* 6 dage efter endt eksponering til lambda-cyhalothrin i 90 minutter. Estimerede LC50 værdier var $1,01 \pm 0,032$ µg/L for frit de rene lambda-cyhalothrin behandlinger, $2,4 \pm 0,18$ µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandling med 5 mg/L humussyre, $1,51 \pm 0,43$ µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandling med 25 mg/L humussyre og $3,84 \pm 0,23$ µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandlinger med 125 mg/L humussyre. Regressionskoefficienterne for de fire regressioner var alle $\geq 0,99$. Alle kurveforløb er derved signifikant forskellige fra hinanden, og generelt forskubber tilstedeværelsen af humussyre LC50 værdien mod højere koncentrationer. Dvs. at der skal en højere nominal koncentration til hvis der også er humussyre til stede for at opnå samme mortalitetseffekt som en given nominal koncentration af frit opløst lambda-cyhalothrin.

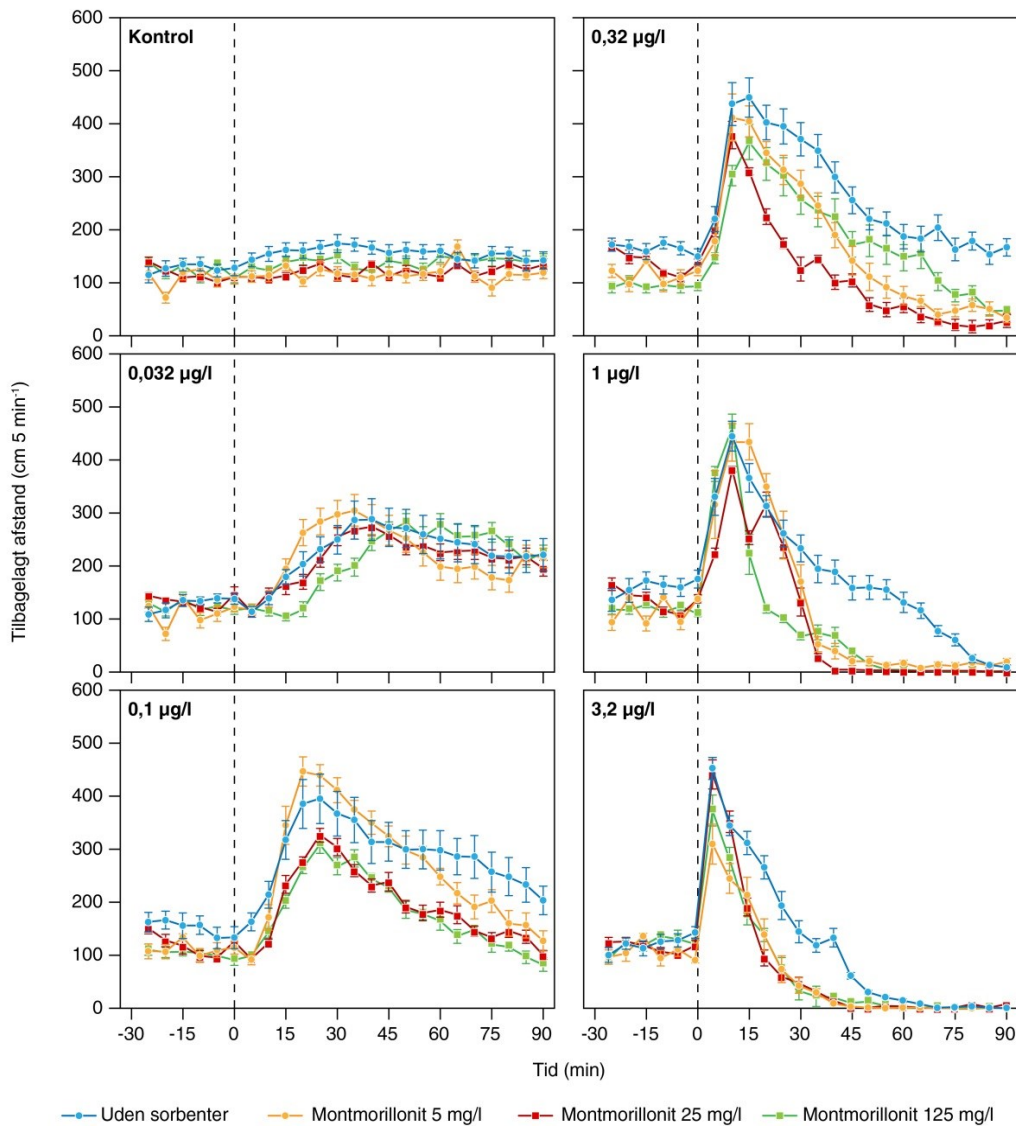


FIGUR 5.17. KONCENTRATIONS-RESPONS SAMMENHÆNG FOR MORTALITET PÅ *GAMMARUS PULEX* 6 DAGE EFTER ENDT EKSPONERING TIL LAMBDA-CYHALOTHRIN I 90 MINUTTER. LAMBDA-CYHALOTHRIN BLEV DOSERET SOM FRIT OPLØST STOF SAMT I BLANDINGER MED FORSKELLIGE KONCENTRATIONER AF HUMUSSYRE. (N(DAG 0)=16).

5.3.2 Montmorillonit som sorbent

Figur 5.18 viser bevægelsesadfærden hos *G. pulex* umiddelbart før og under eksponering af tre forskellige koncentrationer af lermineralet montmorillonit i kombination med 5 forskellige koncentrationer af lambda-cyhalothrin. Adfærden hos kontrolgruppen var relativt konstant igennem kontrol- og eksponeringsperioden. Ligeledes var der ingen signifikant effekt på *G. pulex* bevægelsesadfærd af montmorillonit (uden tilsætning af lambda-cyhalothrin) ved nogen af de anvendte koncentrationer ($P > 0,05$). Responskurverne for frit opløst lambda-cyhalothrin er identisk med de viste responskurver i Figur 5.14, og er ligeledes diskuteret herunder. Adfærdsresponsen under eksponering for kombinationsbehandlinger med lambda-cyhalothrin og montmorillonit var imod forventning kendetegnet ved at generere en adfærdsrespons, der var mindst af samme størrelsesorden som frit opløst lambda-cyhalothrin. Ydermere blev mobilitetsreduktion og immobilisering fremtvunget hurtigere i kombinationsbehandlinger med montmorillonit og lambda-cyhalothrin end sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin. Dette betyder med andre ord, at hyperaktivitetsperioden blev reduceret i tid (især tydeligt ved 1 og 3,2 µg /L lambda-cyhalothrin behandlinger).

Ved de to højeste lambda-cyhalothrindoseringer blev der observeret en forkortelse af hyperaktivitetsperioden i alle kombinationsbehandlinger, og decideret immobilisering blev observeret markant tidligere i kombinationsbehandlinger sammenlignet med rene lambda-cyhalothrin behandlinger. Således blev der observeret 100% immobilisering efter 40-50 minutter for alle kombinationsbehandlinger ved de to højeste lambda-cyhalothrindoseringer. For kurveforløbene ved kombinationsbehandlinger med 1 og 3,2 µg /L lambda-cyhalothrin og montmorillonit var det gældende at alle koncentrationer af montmorillonit genererede signifikant forskellige adfærdsresponses end for behandlingerne med frit opløst lambda-cyhalothrin ($P < 0,05$).

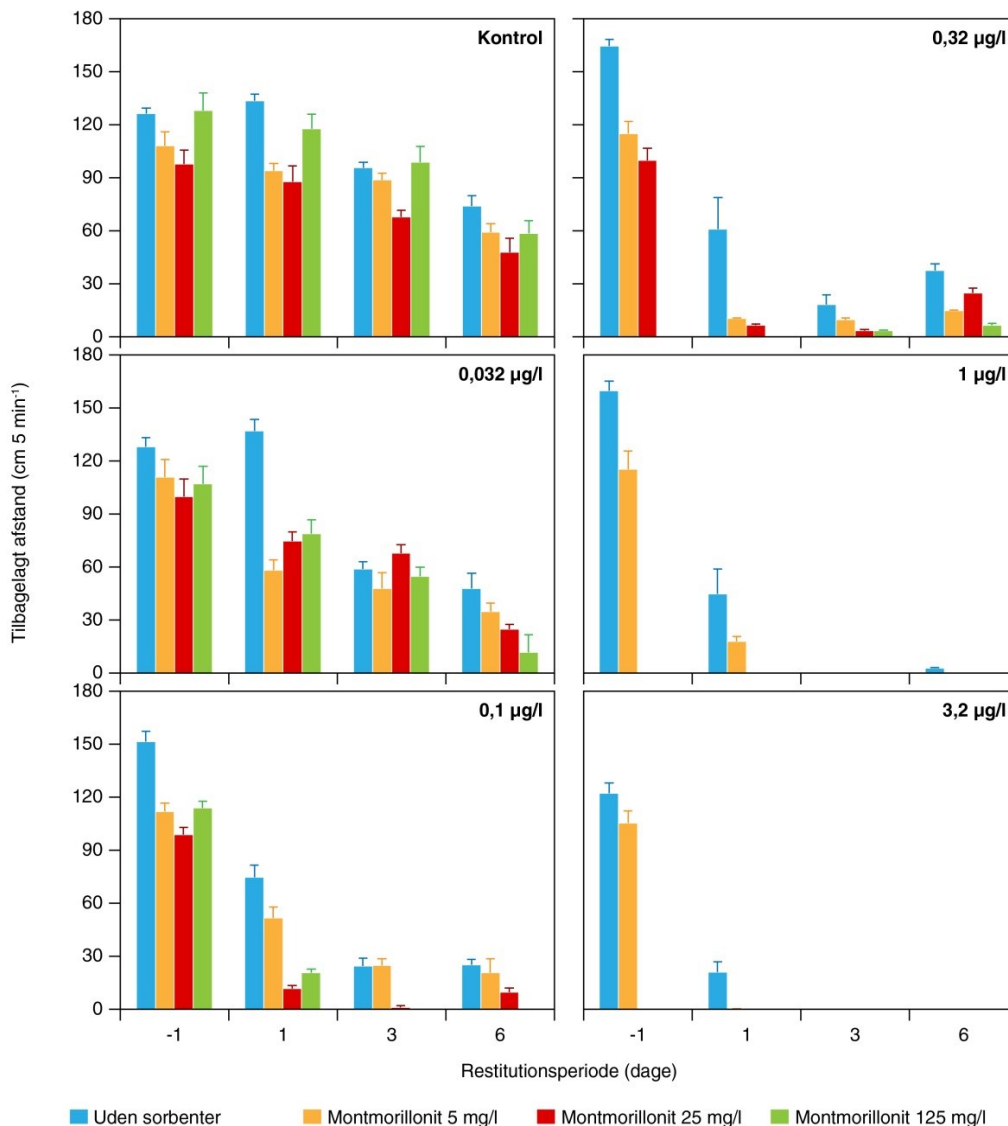


FIGUR 5.18. EFFEKT AF LAMBDA-CYHALOTHRIN PÅ TILBAGELAGT AFSTAND HOS OVERLEVENDE *G. PULEX*. BAGGRUNDSADFÆRDEN BLEV REGISTERET Gennem EN 30 MINUTTER LANG PERIODE, HVOREFTER LAMBDA-CYHALOTHRIN BLEV TILSAT I KOMBINATION MED TRE FORSKELLIGE KONCENTRATIONER AF LERMINERALET MONTMORILLONIT INKLUSIVE KONTROL. ADFÆRDEN BLEV LIGELEDDES MÅLT I EN REN KONTROLGRUPPE UDEN TILSÆTNING AF MONTMORILLONIT ELLER LAMBDA-CYHALOTHRIN. (GENNEMSNI \pm SEM, N(DAG 0)=16).

Figur 5.19. viser gennemsnitlig tilbagelagt afstand for *G. pulex* efter 1, 3 og 6 dages restitutionering i ukontamineret vand efter endt eksponering for lambda-cyhalothrin i kombinerede eksponeringsscenarier med montmorillonit (5, 25 og 125 mg/L og kontrol). Der var ingen signifikant effekt af koncentrationen af montmorillonit i rene montmorillonitbehandlinger på restitutioneringen af *G. pulex* ($P > 0,05$).

De præsenterede data for rene lambda-cyhalothrin behandlinger er ligeledes præsenteret i Figur 5.19 og diskuteret herunder. Ved to-vejs ANOVA blev det fundet, at der var signifikant effekt af lambda-cyhalothrin og montmorillonit ($P < 0,001$), og der var ligeledes en signifikant interaktion imellem montmorillonit og lambda-cyhalothrin ($P < 0,001$). Dette var gældende for alle post eksponeringsobservationer. Stigende lambda-cyhalothrkoncentrationer reducerede bevægelsesaktiviteten ligesom det blev observeret i forsøgene med frit opløst lambda-cyhalothrin og for kombinationsbehandlinger med humussyre. Dette indikerer tydeligt tilstedeværelsen af en klar toksisk effekt af lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandlingerne.

Stigende koncentrationer af montmorillonit medførte overordnet set reduceret bevægelsesaktivitet på alle forsøgsdage ($P < 0,01$). Fra de rene montmorillonit behandlinger blev det imidlertid påvist, at lermineralet ikke forårsagede ændringer i adfærd hos *G. pulex*, og det er derfor en mulighed, at observationen om reduceret aktivitetsniveau ved stigende koncentrationer af montmorillonit i kombinationsbehandlinger er en type I fejl (en sand nul-hypotese bliver forkastet), der primært opstår grundet mange nuller i datasættet (et stort antal individer var immobiliseret i restitutionfasen). I kontrolforsøget med rene montmorillonitbehandlinger var der aktiv bevægelsesadfærd hos alle individer igennem hele restitutionperioden, og dette datasæt er derfor langt stærkere og mere pålideligt rent statistisk.



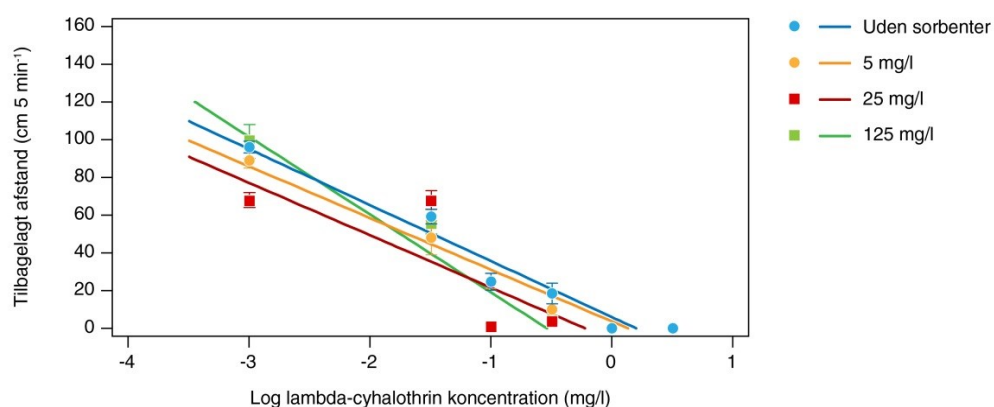
FIGUR 5.19. GENNEMSITLIG TILBAGELAGT AFSTAND FOR *G. PULEX* EFTER ENDT EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHRIN I KOMBINATION MED MONTMORILLONIT. (GENNEMSNIIT±SEM, N(DAG 0)=16).

Det må dog konstateres, at montmorillonit i modsætning til humussyre ikke virker til at mitigere noget af effekten af lambda-cyhalothrin. Tværtimod var der umiddelbart en tendens til, at der var en større reduktion i tilbagelagt afstand i kombinationsbehandlinger med lambda-cyhalothrin og montmorillonit end ved behandlingerne med frit opløst lambda-cyhalothrin. For at tydeliggøre interaktionen imellem de montmorillonit og lambda-cyhalothrin er den tilbagelagte afstand plottet som funktion af nominelle lambda-cyhalothrinkoncentrationer i de forskellige

eksponeringsscenerier med eller uden montmorillonit (Figur 5.20). Sammenhængen er afbildet for forsøgsdag 3, fordi der på senere forsøgsdage var et for stort tab af data grundet døde organismer.

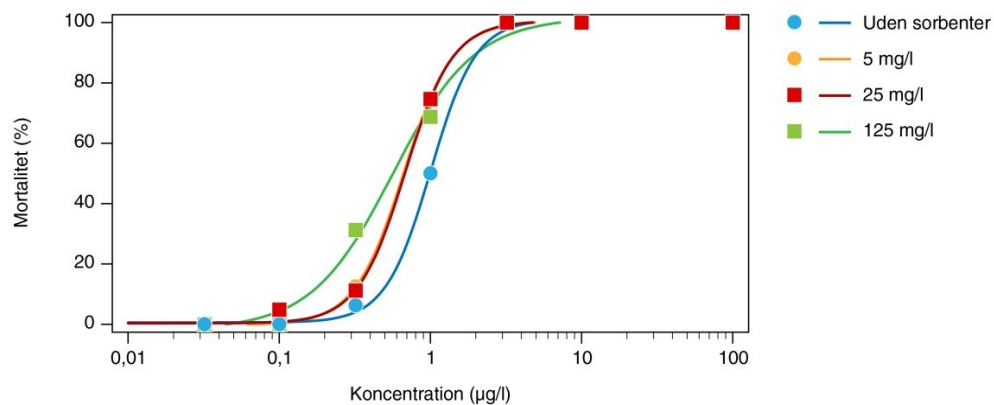
Dog var der for kombinationsbehandlinger med montmorillonit et generelt større antal af immobile og døde organismer end for kombinationsbehandlinger med humussyre. Selv på restitutionsdag 1 var der udpræget immobilitet i kombinationsbehandlingerne helt ned til 0,32 µg/L lambda-cyhalothrin. Dette betyder også, at datagrundlaget hvorpå interaktionsleddet testes er baseret på færre punkter og dermed er svagere for denne kombinationsbehandling end for kombinationsbehandlingen med humussyre.

Af Figur 5.20 ses, at sammenhængen imellem tilbagelagt afstand og lambda-cyhalothrin koncentration er relativt ens for frit opløst lambda-cyhalothrin og kombinationsbehandlinger med 5 og 25 mg/L montmorillonit. Derimod er hældningen af regressionslinjen for sammenhæng mellem tilbagelagt afstand og lambda-cyhalothrin koncentration markant anderledes for kombinationsbehandlinger med 125 mg/L montmorillonit. Datagrundlaget for identifikation af interaktionsmekanismer er her, som det også var tilfældet for kombinationsbehandlinger med humussyre, relativt lille når der tages hensyn til de store standardvarianser i datasættet.



FIGUR 5.20. TILBAGELAGT AFSTAND FOR *G. PULEX* 3 DØGN EFTER ENDT EKSPONERING MED LAMBDA-CYHALOTHTRIN I KOMBINATION MED TRE KONCENTRATIONER AF MONTMORILLONIT SAMT KONTROL UDEN TILSAT MONTMORILLONIT. (GENNEMSNI \pm SEM, N(DAG 0)=16). SAMMENHÆNG IMELLEM DATAPUNKTER ER INDIKERET VED LINEÆRE REGRESSIONER, OG REGRESSIONSKOEFFICIENTERNE ER 0,95, 0,96, 0,63 OG 0,91 FOR HHV. BEHANDLINGER UDEN MONTMORILLONIT OG MED 5, 25 OG 125 MG/L MONTMORILLONIT.

Figur 5.21 angiver koncentrations-respons sammenhængen for mortalitet målt på *G. pulex* 6 dage efter endt eksponering til lambda-cyhalothrin i 90 minutter. Estimerede LC₅₀ værdier var 1,01 ± 0,032 µg/L for de rene lambda-cyhalothrin behandlinger, 0,66 ± 0,01 µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandling med 5 mg/L montmorillonit, 0,68 ± 0,04 µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandling med 25 mg/L montmorillonit og 0,58 ± 0,08 µg/L for lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandlinger med 125 mg/L montmorillonit. Regressionskoefficienterne for de fire regressioner var alle \geq 0,99. Altså er de afledte LC₅₀ værdier for de tre kombinationsbehandlinger alle signifikant lavere end LC₅₀ værdien for behandlinger med frit opløst lambda-cyhalothrin, men ingen af kombinationsbehandlingerne genererede indbyrdes signifikante forskelle i LC₅₀ værdier. Den observerede potentiering af lambda-cyhalothrin ved tilsætning af lermineralet montmorillonit er altså ikke umiddelbart koncentrationsafhængig. Disse resultater stemmer overens med observationerne for adfærdsforsøgene, hvor det også blev dokumenteret, at montmorillonit potentierede effekten af lambda-cyhalothrin.



FIGUR 5.21. KONCENTRATIONS-RESPONS SAMMENHÆNG FOR MORTALITET PÅ *GAMMARUS PULEX* 6 DAGE EFTER ENDT EKSPONERING TIL LAMBDA-CYHALOTHRIN I 90 MINUTTER. LAMBDA-CYHALOTHRIN BLEV DOSERET SOM FRIT OPLØST STOF SAMT I BLANDINGER MED FORSKELLIGE KONCENTRATIONER AF MONTMORILLONIT. (N(DAG 0)=16).

6. Diskussion

6.1 Overvågningsdata

Den største fundhyppighed, hvor pesticider er analyseret i alle de undersøgte overvågningsprogrammer (f.eks. for dimethoat, pirimicarb, prochloraz, propiconazol og terbuthylazin), er tydeligt konstateret i det svenske overvågningsprogram. Da fundene i de svenske vandløb er hyppigere i Sydsverige (Skåne), hvor de to store vandløb og det ene mindre vandløb ligger, end i de tre mere nordlige svenske regioner, kan det fundne mønster ikke relateres til en eventuel temperatureffekt på nedbrydningen af pesticider. Skånes landskab og klima ligner meget det danske, og forbruget af pesticider er på samme eller lidt lavere niveau i Skåne end i Danmark. Den vigtigste forklaring på de forholdsvis høje fundprocenter i det svenske program er den lave detektionsgrænse, som er en faktor 10-100 lavere end i mange andre programmer. En anden forklaring, som i hvert fald gør sig gældende i de mindre vandløb, er den hyppige og intensive prøvetagning, som gennemføres i det svenske overvågningsprogram med ugevis prøvetagning i de små vandløb med automatisk prøvetager. De maksimale koncentrationer er meget sammenlignelige i de fem undersøgte overvågningsprogrammer, med en tendens til, at der findes lidt højere koncentrationer i det norske program end i de øvrige. Det kan skyldes, at der i Norge er en større sandsynlighed for en direkte tilførsel af kolloid- og partikelbundne pesticider fra mark til overfladevand pga. stor erosions- og overfladeafstrømnings risiko i flere af de oplande som indgår i det norske program (Bioforsk, 2012).

Nyere undersøgelser har vist at vinddrift momentant kan være en stor kilde til herbicider i naturarealer (Ejrnæs *et al.* 2013). Derimod forventes vinddrift ikke at være en betydende kilde for fund af pesticider, herunder, insekticider i vandløb, da der er skrappe afstandskrav til åbne vandløb under udførelse af sprøjtning og de fleste vandløb har en stor fortyndingsevne. I Lillebæk blev der i en undersøgelse af forekomsten af pesticider i vandløb da også fundet langt højere koncentrationer og tabrater i den rørslatte del af vandløbet end i den åbne del (Kronvang *et al.* 2003a).

På trods af det sparsomme antal prøvetagninger af vandløbssediment i de undersøgte overvågningsprogrammer er der i de fleste tilfælde fundet pesticidrester og af stoffer, som meget sjældent konstateres i vandfasen. Det drejer sig om forekomst af alfa-cypermethrin og esfenvalerat som i det svenske program er fundet meget hyppigere i bundsedimentet (5% og 43%), end i vandprøverne (0,1% og 2,4%). I Danmark er der ligeledes fundet cypermethrin ved prøvetagning af vandløbssediment i 27% af prøverne og tau-fluavinate blev fundet i 13% af prøverne i 15 vandløb (Bossi *et al.* 2009). Direkte målinger pesticider i suspenderet stof opsamlet i danske vandløb har også vist et indhold af flere forskellige pyrethroider og carbamater (Rasmussen *et al.* 2012a, b).

I Sverige har en undersøgelse af betydning af tidsvægtet mod flowvægtet automatisk prøvetagning i et mindre vandløb vist, at der blev fundet flere stoffer over detektionsgrænserne (op til en faktor 10) ved den flowproportionale prøvetagning end ved den ugentlige tidsvægtede prøvetagning (Adielson & Kreuger, 2008). I de fleste tilfælde blev de enkelte stoffer også fundet i noget højere maksimale pesticidkoncentrationer (metazoklor en faktor 10, MCPA en faktor 100).

Prøvetagningsmetoden er uhyre vigtig for, om kortvarige pulser af pesticider måles under regn, da de mere hydrofobe pesticider er påvist især at forekomme som pulse i vandløb efter regn. Eksempelvis giver anvendelse af flowproportionale døgnprøver under regn- og afstrømningshændelser i et mindre svensk vandløb markant flere fund af pesticider over

detektionsgrænsen, og i mange tilfælde med meget højere koncentrationer, end de normalt udtagne tidsvægtede, automatiske prøver. Fundene ved flowproportional prøvetagning finder især sted efter nedbør og stigninger i vandføring i vandløbet.

6.2 Sorption og fordelingskoefficienter

Det er velkendt at håndtering og analyse af stærkt sorberende stoffer i vandige opløsninger er behæftet med mange fejlkilder, hvilket skyldes stoffernes meget lave vandopløselighed, og at de sorberes til samtlige de overflader, som de eksponeres til (se afsnit 3.3). Sorption af lambda-cyhalothrin til humussyre og til montmorillonit blev undersøgt i to typer systemer: *i*) sorbenter i centrifugeglas, og *ii*) sorbenter i polystyren-arenaer der anvendes i de efterfølgende eksponeringsscenerier. I det førstnævnte system blev sorptionen kvantificeret såvel ved differensmetoden som ved direkte måling af sorberet stof, mens sorptionen i det sidstnævnte system blev bestemt ved direkte måling af sorberet stof. Ved differensmetoden er der taget højde for den mængde stof, der er sorberet til centrifugeglas. Det førstnævnte system gav to overraskende resultater: *i*) Sorptionen til montmorillonit var af samme størrelsesorden som sorption til humussyre (pr. masseenhed), og *ii*) sorptionens affinitet (bestemt ved K_d værdien) faldt stærkt med øget koncentration af sorbent. I forsøg med kvantificering af sorption ved den direkte metode varierede K_d værdier fra 840 til 230×10^3 L/kg – fra høj til lav sorbent-koncentration; altså et enormt spænd. Forskelle mellem sorption bestemt ved direkte måling og ved differensmetoden viste ikke systematiske forskelle; dog var afvigelserne mellem de to metoder (op til faktor 4) størst ved de laveste sorbent-koncentrationer, hvilket tilskrives større fejl ved differensmetoden end for den direkte måling. For sorptionsforsøg i arenaerne fandtes, at når der var tilsat sorbent sorberedes der negligérbare mængder lambda-cyhalothrin til polystyren-arenaernes vægge. I disse forsøg fandtes K_d værdier i intervallet 680 to 76×10^3 L/kg, og dermed i store træk i samme niveauer som for sorptionsisotherm-forsøgene.

K_d værdier bestemt i eksponeringsforsøg med initialkoncentrationer på lambda-cyhalothrin på 3,2 µg/L lå i intervallet fra 23×10^3 til 600×10^3 L/kg for montmorillonit, mens værdierne for humussyre lå i intervallet fra 23×10^3 til 670×10^3 L/kg. Dette var noget højere end bestemt ved de egentlige sorptionsundersøgelser i glas, hvilket til dels kan tilskrives metodiske forhold (sorptionstid, sorption til og optagelse i organismer, sorbenters aggregering). Igen blev det noteret, at sorptionen til partikler faldt drastisk med stigende sorbentkoncentration.

Det er sandsynligt, at den observerede effekt af sorbentkoncentrationen på K_d værdier skyldes sorbent-kolloiders tilsyneladende øgning af lambda-cyhalothrins vandopløselighed. Humussyre og montmorillonit har fraktioner, der består af meget små partikler i kolloidstørrelse ("naturlige nanopartikler"). Ved separation af væske og sorbent ved centrifugering (ved relativ lav g -værdi som anvendt i nærværende projekt) forbliver kolloiderne suspenderet i vandig opløsning, og mængden af lambda-cyhalothrin, der sidder på kolloiderne medbestemmes nu som en del af det vandopløselige stof i den efterfølgende SPE oprensning og bestemmelse af lambda-cyhalothrin. Jo større mængde sorbent, der tilsættes, desto større mængde kolloid materiale findes, og desto større bliver den del af lambda-cyhalothrin, der sorberes til den kolloide fraktion – i overensstemmelse med observationerne. Dette er foreløbig en hypotese, der skal afprøves nærmere. Er der tale om en kolloid fraktion, er denne meget vigtig at inkludere i fremtidige studier, da den kolloide fraktion forventes at være mere eller mindre biotilgængelig. Dvs. at selv om stoffet rent faktisk er bundet til partikler – så er stoffernes giftighed ikke nedsat som følge af sorptionen til partiklerne, da den kolloidbårne fraktion kan være toksisk. Dette spørgsmål ligger naturligvis centralt i forhold til nanopartikel-medieret giftighed.

Kender man koncentrationen af sorbent samt K_d værdien for sorption af lambda-cyhalothrin til sorbenten kan man estimere den mængde cyhalothrin der befinder sig på sorbenten og i vandfasen. Andelen der er sorberet til sorbenten er givet ved:

$$f_{\text{sorbent}} = \frac{m_{\text{sorbent}} \times K_d}{1 + m_{\text{sorbent}} \times K_d}$$

hvor f_{sorbent} er fraktionen af total lambda-cyhalothrin bundet til sorbent, K_d er fordelingskoefficienten for binding af lambda-cyhalothrin til sorbenten og m_{sorbent} , er massen af sorbent pr. L væske. Benytter vi nu data fra Tabel 5.2 så finder vi at for en sedimentkoncentration på 5 mg/L og en K_d for humussyre på $91,1 \times 10^3$ L/kg så er $f_{\text{sorbent}} = 0,31$, svarende til at 31 % af lambda-cyhalothrin er bundet til humussyre. For en humussyrekonzentration på 125 mg/L og en K_d på $0,59 \times 10^3$ L/kg så findes $f_{\text{sorbent}} = 0,069$, d.v.s. at kun ca. 7 % af lambda-cyhalothrin er sorberet til humussyren. Tilsvarende findes for montmorillonit. D.v.s. at langt størstedelen af lambda-cyhalothrin estimeres at skulle være til stede i vandfasen, selv for systemer med de højest målte K_d værdier (Tabel 5.2). Grundet de metodiske problemer i at bestemme "ægte" K_d værdier for sorbenterne er det imidlertid problematisk at benytte de fundne K_d værdier til estimering af den bundne og den "frie" koncentration af lambda-cyhalothrin i opløsning, og det er sikkert at de estimerede opløsningskoncentrationer bliver for lave, da de "ægte" K_d værdier vil være højere end de reelt fundne værdier. Hvis fortolkningen af de økotoxikologiske forsøg er korrekt må man formode at langt hovedparten af cyhalothrin er bundet til partikler. Hvis vi antager at $f_{\text{sorbent}} > 0,95$, så skal K_d værdien ved en partikelkoncentration på 125 mg/L være mindst 150×10^6 L/kg, hvilket kun er omkring det dobbelte af hvad der er målt i de ovennævnte forsøg – der som nævnt vurderes at give for lave K_d værdier grundet inklusion af kolloidfraktionen i den opløste fraktion.

Litteraturgennemgangen viste, at alle tidligere sorptionsforsøg er gennemført i systemer med betydeligt højere sorbentkoncentrationer end anvendt i nærværende forsøg. Det kan være årsagen til at der i de fleste tidligere forsøg er fundet lavere K_d værdier end i det aktuelle studium. Desuden viste litteraturgennemgangen, at sorptionsforsøg med pyrethroider generelt giver vidt forskellige resultater afhængigt af anvendte metoder, og de metodiske problemer giver anledning til større variation i sorptionsestimater end forskelle mellem sedimentprøvers sammensætning. Meget få studier har set på sorptions- og desorptionskinetik, og det er forventeligt at "hårde" sorbenter som f.eks. montmorillonit har en hurtigere desorption end "bløde" sorbenter som humussyre (eller naturligt organisk stof generelt), idet sidstnævnte optager de hydrofobe stoffer i en 3D-matrice hvorfra der giver anledning til langsom transport i selve partiklen.

Sorptionsundersøgelserne peger således på to vigtige forhold for videre studium: Hvor stor er den kolloide fraktion af sedimentpartikler i vandet og hvor stor er sorptionen af hydrofobe stoffer til denne fraktion, og hvad er det for sedimentpartikler, der findes i vandløbsvand, dvs. hvilke kategorier skal der skelnes mellem for at få en retvisende kvantifikation af den samlede sorption. Endelig kan også sorptions-/desorptionskinetik være af betydning, specielt sidstnævnte, da kinetikken er af betydning for indstilling af ligevægte mellem sediment og vandfase. Desuden viser pilotprojektet, at separationen af partikler er kritisk og her med særlig fokus på centrifugeringsmetoden, idet filtrering ikke er anvendelig for stærkt hydrofobe stoffer.

6.3 Økotoxikologi: tilstandsform og skadevirkning

Da effektkoncentrationerne for thiacloprid og pirimicarb i det anvendte testsystem ved projektets start ikke var kendte, blev der udført et pilotforsøg med henblik på at fastlægge valget af eksponeringskoncentrationer til efterfølgende eksponeringsforsøg. Pilotforsøgene viste samstemmende, at der ikke kan forventes nogen skadevirkninger hos *G. pulex* af de frit opløste aktivstoffer i miljørealistiske koncentrationer (<ca. 10 µg/L) efter en så kortvarig eksponering (90

min). Hverken thiacloprid eller pirimicarb havde i koncentrationer på helt op til 1000 µg/L nogen effekt på overlevelsen gennem en 6-dages restitueringsperiode, hvilket for pyrethroiderne tidligere er vist at være en tilstrækkelig periode til at påvise forøget dødelighed. Der var heller ingen akut effekt på bevægelsesadfærden af de to stoffer. Kun for thiacloprid kunne forbigående adfærdsændringer registreres på dag 1 i restitueringsperiode, og da kun ved 1000 µg/L. Denne påvirkning var ikke at spore længere på dag 6.

Et forbehold for fortolkningen af resultaterne er selvfølgelig, at der kun blev anvendt nominelle koncentrationer, og dette var en af grundene til at gentage forsøget med lambda-cyhalothrin, hvor stamopløsninger og efterfølgende fortyndinger blev lavet efter nøjagtig samme protokol som for thiacloprid og pirimicarb. Resultaterne for lambda-cyhalothrin stemmer fuldt overens med tidligere undersøgelser af stoffet (Nørum *et al.* 2006; Wiberg-Larsen & Nørum, 2009), hvilket sandsynliggør, at såvel eksponeringer for de to andre stoffer som følsomheden af den anvendte forsøgspopulation er acceptable og kan anvendes som beslutningsgrundlag for forsøg med sorbenter.

Rationalet bag kun at gennemføre videre forsøg med sorbenter og lambda-cyhalothrin er, at insekticiders giftighed reduceres, når de er sorberet til faste partiklers overflader (Hill 1989). Siden pirimicarb og thiacloprid blev fundet at have effektkoncentrationer på mortalitet og bevægelsesadfærd for *G. pulex*, der ligger langt over miljørealistiske koncentrationer, vil forsøg med disse to insekticiders sortionsafhængige skadevirkninger ikke kunne forventes at give yderligere viden, da tilstedeværelsen af partikler yderligere vil reducere de to insekticiders giftighed.

Ved to- vejs ANOVA-analysen i afsnit 5.3.1. blev det konstateret, at der for alle kombinationsbehandlinger var en overordnet effekt af både lambda-cyhalothrin og humussyre samt en signifikant interaktion imellem lambda-cyhalothrin og humussyre ($P < 0,001$). Dette indikerer tydeligt, at der stadig er en klar toksisk effekt af lambda-cyhalothrin i kombinationsbehandlingerne. Stigende humussyre-koncentrationer medførte overordnet stigende bevægelsesaktivitet på alle forsøgsdage. Dette viser, at tilstedeværelse af humussyre mitigerer noget af effekten af lambda-cyhalothrin og at effekten er dosis-afhængig, hvilket formentlig kan tilskrives en reduceret biotilgængelighed af lambda-cyhalothrin, når aktivstoffet er sorberet til humussyre (Hill, 1989).

Den reducerede biotilgængelighed må først og fremmest tilskrives en reduktion af passiv diffusion ind i dyrene, fordi humussyre ikke forventes at indgå som fødekilde for *G. pulex* (Dall & Lindegaard, 1995) – især ikke under eksponering for insekticid, som er blevet påvist at få dyrene til at stoppe deres fødesøgningsadfærd øjeblikkeligt (Christensen *et al.* 2006).

Datagrundlaget for identifikation af interaktionsmekanismer mellem lambda-cyhalothrin og humussyre er relativt lille med de store standard-varianser, der er i datasættet, og det ville derfor være en klar fordel med bedre gentagelser i fremtidige studier. Umiddelbart vurderer vi, at det kunne se ud som om, at sammenhængen imellem lambda-cyhalothrinkoncentration og adfærdsrespons udelukkende bliver parallelforskudt ved forskellige humussyrekoncentrationer, og at den manglende statistiske støtte til et sådant udsagn ville blive kompenseret ved bedre gentagelser i undersøgelsen. Flere forsøg er påkrævet for at dokumentere sammenhænge og interaktions-mekanismer imellem pyrethroider og humussyre og disses effekt på bevægelsesadfærd hos *G. pulex*.

Den højeste humussyrekoncentration giver i forsøgene den største reduktion i giftighed af lambda-cyhalothrin, hvilket også støtter observationerne fra adfærdsstudierne. Den forventeligt lavere biotilgængelighed af lambda-cyhalothrin ved tilstedeværelse af humussyre kommer derved til udtryk ved reducerede effekter på adfærdsstudier såvel som ved mortalitetsstudier. Dog er den samlede forøgelse af LC50-koncentrationen ved tilsætning af humussyre relativt lille i forhold til tidligere rapporteret i litteraturen (fx Hill, 1989; Maul *et al.* 2008; Maund *et al.* 2002). Noget af

forklaringen på dette kan ligge i laboratorieprocedurer, hvor små forskelle (omrøringshastighed i stamopløsninger, relativ overflade i suspensionsbeholdere, materialevalg ved pipettering, suspensionsbeholdere og forsøgsopstilling mm). Det vil være helt centralt, at laboratorieprocedurer for giftighedsforsøg med så hydrofobe stoffer som pyrethroiderne i fremtiden bliver ensrettet mest muligt for at optimere sammenlignelighed af resultater.

De konstaterede sammenhænge imellem tilbagelagt afstand og lambda-cyhalothrin koncentration er relativt ens for frit opløst lambda-cyhalothrin og kombinationsbehandlinger med 5 og 25 mg/L montmorillonit, hvorimod den ændres markant for kombinationsbehandlinger med 125 mg/L montmorillonit. Datagrundlaget for identifikation af interaktionsmekanismer er her, som det også var tilfældet for kombinationsbehandlinger med humussyre, relativt lille når der tages hensyn til de store standardvarianser i datasættet. Vi kan ikke umiddelbart identificere nogen plausibel årsag til, at de toksikologiske virkningsmekanismer skulle forandre sig mærkbart imellem kombinationsbehandlinger med 25 og 125 mg/L montmorillonit, og vi vurderer derfor, at sammenhængen imellem lambda-cyhalothrin koncentration og adfærdsrespons udelukkende bliver parallelforskudt ved forskellige montmorillonit-koncentrationer og at den manglende statistiske støtte til et sådant udsagn ville blive kompenseret ved bedre gentagelse i undersøgelsen. Med andre ord altså, at tilstedeværelsen af montmorillonit potentiører effekten af lambda-cyhalothrin. Flere forsøg er påkrævet for at dokumentere sammenhænge og interaktionsmekanismer imellem pyrethroider og montmorillonit og dennes effekt på bevægelsesadfærd hos *G. pulex*.

De afledte LC₅₀-værdier for de tre kombinationsbehandlinger med montmorillonit er alle signifikant lavere end LC₅₀-værdien for behandlinger med frit opløst lambda-cyhalothrin uden tilstedeværelse af montmorillonit. Den observerede potentiering af lambda-cyhalothrin ved tilsætning af lermineralet montmorillonit er desuden fundet ikke at være koncentrationsafhængig. Disse resultater stemmer overens med observationerne for adfærdsforsøgene, hvor det også blev dokumenteret, at montmorillonit potentiørede effekten af lambda-cyhalothrin.

En mulig forklaring på dette uventede resultat kan være, at lerminerale hurtig desorberer allerede sorberet pyrethroid (Fojut & Young, 2011a). Den omrørte suspensionsopløsning, hvorfra der pipetteres til forsøgsarenaerne, rummer en lambda-cyhalothrin-koncentration (hvoraf størstedelen er på sorberet form), der er seks gange højere end målkoncentrationen, fordi der overføres 10 ml suspension til 60 ml vandvolumen i forsøgsarenaen. Ligevægtskoncentrationen i suspensionsstamopløsningen vil derfor være forskubbet mod mere lambda-cyhalothrin sorberet på lerpartiklerne – en ligevægt der forflyttes i det øjeblik at suspensionsopløsningen overføres til forsøgsarenaen. Her vil der ske en fortynding, der fordrer desorption fra lerpartiklerne, og denne desorption foregår hurtigt, som det er beskrevet i litteraturgennemgangen (afsnit 3.2). Desuden vil en optagelse af lambda-cyhalothrin i *G. pulex* fungere som en sink, der yderligere forårsager desorption. Lerpartiklerne kan derfor agere som vektor for lambda-cyhalothrin og potentielt flytte en større samlet masse aktivt stof end den beregnede nominelle koncentration over i forsøgsarenaerne, hvor det herefter desorberes pga. ligevægtsforskydning. Dermed opnås en indirekte potentiering ved en simpel forskydning af en større masse af aktivt stof end beregnet. Som også beskrevet for humussyre, så er aktiv fødeindtagelse næppe en realistisk eksponeringsrute, fordi uorganiske partikler ikke indgår som en del af føden for *G. pulex*, og tillige har tidligere forsøg under Miljøstyrelsens pesticidforskningsprogram vist, at pyrethroid-stressede *G. pulex* fraveg naturlig fødesøgningsadfærd under pyrethroideksponering (Nørum *et al.* 2006). Et naturligt næste skridt vil være at arbejde med at plote nye koncentrations-respons kurver mod målte eller beregnede opløste koncentrationer i nye forsøg.

7. Konklusioner

7.1 Opsamling af international viden

I projektet er den eksisterende viden om sorptionsaffinitet og -kinetik for stærkt hydrofobe pesticiders binding til sedimentpartikler og sorptionens betydning for forekomst og potentiel toksisk effekt af insekticider (især pyrethroider) gennemgået. Gennemgangen giver et relativt klart billede af, at især de stærkt hydrofobe insekticider hyppigt forefindes i sedimenter og ligeledes, at disse stoffer primært transporteres til de akvatiske recipienter i en sorberet fase til jordkolloider og -partikler. Desuden, at sorption til partikler normalt er fundet at nedsætte giftighed. Imidlertid er de metodiske problemer store og for en stor dels vedkommende uløste.

7.2 Internationale overvågningsdata

I nyere undersøgelser af danske vandløbssedimenter er pyrethroider fundet i sediment med fundprocenter på op til 25% og i max koncentrationer på op til 20 µg/kg (tørvægt). Endeligt dokumenterer nærværende rapport, at pyrethroiderne alpha-cypermethrin og esfenvalerat er fundet i Sverige, under meget sammenlignelig landbrugspraksis, i henholdsvis 5% og 43% af 42 analyserede sedimentprøver i koncentrationer på op til henholdsvis 5,5 og 7,5 µg/kg sediment (tørvægt). I undersøgelserne er fundprocenterne for sedimentprøver langt højere end for vandprøverne.

Sammenholdes disse fundne koncentrationer og hyppigheder med nyere viden vedr. giftighed af partikelbårne pesticider samt resultaterne af nærværende undersøgelse, peger dette på, at de danske og svenske fund af pyrethroid er af betydelig økotoksikologisk interesse, f.eks. for invertebratfaunaen. Det fremgår imidlertid også klart af disse undersøgelser, at man ikke har bestemt de specifikke sorbenter, og at der således mangler viden på dette område for at kunne ekstrapolere forsøgsresultaterne til forskellige danske jordbunds- og sedimenttyper.

Analyserne af pesticider, specielt i relation til, om der er en sammenhæng mellem den stofspecifikt anvendte detektionsgrænse og de økotoksikologiske effektkoncentrationer er af afgørende betydning i overvågningen af overfladevand. Andre vigtige faktorer er den anvendte prøvetagningsmetode og -frekvens, separationsmetoden sediment/vand, analysemetoden, samt hvilken matrice, der udtages prøver fra (vand, sediment eller biota). Flowproportionale målinger giver typisk langt flere fund end tidsvægtede automatiske prøver hvilket viser at pyrethroiderne typisk udvaskes som pulse.

7.3 Sorption og fordelingskoefficienter

Ved sorptionsforsøg fandtes, at *i*) sorptionen af lambda-cyhalothrin til montmorillonit var af samme størrelsesorden som sorption til humussyre, og at *ii*) sorptionens affinitet faldt stærkt med øget koncentration af sorbent. I forsøg med kvantificering af sorption ved den direkte metode varierede K_d værdier fra 840 til 230×10^3 L/kg – fra høj til lav sorbent koncentration. Forskelle mellem sorption bestemt ved direkte måling og ved differensmetoden viste ikke systematiske forskelle; dog var afvigelserne mellem de to metoder (op til faktor 4) størst ved de laveste sorbent

koncentrationer. For sorptionsforsøg i arenaerne fandtes, at når der var tilsat sorbent, sorberedes der negligerbare mængder lambda-cyhalothrin til polystyren-arenaernes vægge. I disse forsøg fandtes K_a -værdier i intervallet 680 to $76 \cdot 10^3$ L/kg, og dermed i store træk i samme niveauer som for sorptionsisothermforsøgene. K_a -værdier bestemt i eksponeringsforsøg med initialkoncentrationer på lambda-cyhalothrin på 3.2 µg/l gav værdier i intervallet fra 23×10^3 til 600×10^3 L/kg for montmorillonit, mens værdierne for humussyre var i intervallet fra 23×10^3 til 670×10^3 L/kg. Det er noget højere end bestemt ved de egentlige sorptionsundersøgelser i glas. Undersøgelsen viser således, at der er en ”metodisk” fejl. Det betyder også, at de estimerede K_a -værdier ikke kan bruges til at beregne koncentrationen af frit opløst lambda-cyhalothrin i vandfasen. Den metodiske fejl ligger formentlig også indbygget i de forsøg der er gennemgået i litteraturanalysen.

Den observerede effekt af sorbentkoncentrationen på K_a -værdier tilskrives sorbent-kolloiders tilsyneladende øgning af lambda-cyhalothrins vandopløselighed. Dette er foreløbig en hypotese, der skal afprøves nærmere. Kan hypotesen bekræftes, er det meget vigtigt at inkludere kolloidfraktionen i fremtidige studier, herunder sorptionen til den kolloide fraktion. Dvs. at selv om stoffet rent faktisk er bundet til partikler – så er stoffernes giftighed ikke nedsat som følge af sorptionen til partiklerne, da den kolloidbårne fraktion kan være toksisk. Ud over fremtidige studier af sorptionsaffinitet til kolloidfraktionen kan også sorptions-/desorptionskinetik være af betydning, specielt sidstnævnte, da kinetikken er af betydning for indstilling af ligevægte mellem sediment og vandfase.

7.4 Insekticid og sorbent-effekt-forsøg

Det blev fundet, at humussyre generelt reducerede den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin hos *G. pulex* med adfærdsparametre såvel som dødelighed som målparametre. Dog er det bemærkelsesværdigt, at den maksimale reduktion i mortalitet (øget LC_{50} -værdi), som forekom ved højeste koncentration af humussyre (125 mg/ L), blot var en faktor 3,8 i forhold til forsøget uden tilsat humussyre. Dette er markant mindre end tidligere rapporteret for organiske sorbenter i litteraturen, hvilket måske kan tilskrives forskelle i den praktiske udførelse af laboratoriestudierne (se diskussion i afsnit 5.1.5), eller kolloideffekten ved de meget lave sorbent koncentrationer.

Imod forventning fandt vi, at den uorganiske sorbent montmorillonit ikke reducerede den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin på adfærdsparametre og mortalitet hos *G.pulex*. Tilsætning af montmorillonit forøgede fraktionen af immobiliserede individer sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin under eksponering. Ligeledes blev selve hyperaktivitetsperioden forkortet ved tilsætning af montmorillonit, hvilket fremskyndte immobiliseret tilstand sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin. Montmorillonits potentierende effekt på lambda-cyhalothrin blev yderligere dokumenteret i hele restitutionperioden, hvor både mortalitetsrate og fraktionen af immobiliserede individer var signifikant forøget sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin. LC_{50} værdierne blev reduceret med cirka 50% ved tilsætning af montmorillonit sammenlignet med frit opløst lambda-cyhalothrin, hvilket indikerer, at den toksiske effekt af lambda-cyhalothrin var omtrent fordoblet ved tilsætning af montmorillonit.

Forklaringen på den vidt forskellige giftighed i tilstedeværelse af humussyre og montmorillonit skal formentlig findes i forskellig biotilgængelighed af lambda-cyhalothrin sorberet til den kolloide fraktion af henholdsvis humussyre og montmorillonit. Det er sandsynligt at lambda-cyhalothrin desorberes hurtigere fra montmorillonit end humussyre og derfor vil kolloidbåret lambda-cyhalothrin hurtigt kunne desorberes ved kontakt med *G. pulex*.

7.5 Forsøgsmanualer

For at optimere forståelsen af biologiske responsparametre på miljørealistiske eksponeringsscenarier med insekticider i vandløb er det en forudsætning, at faktiske eksponeringsscenarier i laboratorie- og feltundersøgelser er gennemført efter nedskrevne standarder og resultaterne er beskrevet med tilstrækkelig detaljeringsgrad til at kunne udnyttes til optimerede forsøgsdesigns mht. vurdering af detaljerede mekanistiske sammenhænge mellem eksponering og biologisk respons. Derfor er det af afgørende vigtighed, at eksperimenter kan gentages ud fra en række standard procedurer. I projektet er der derfor som afslutning udarbejdet en forsøgsprotokol (bilag 3), som i de forskellige trin i kontrollerede videospøringsforsøg beskriver fremgangsmåderne fra fremstilling af kunstigt vandløbsvand, indsamling af dyr, fremstilling af sorbenter, bestemmelse af sorption, fremstilling af pesticidopløsningen til videosporingen og kemisk analyse.

8. Perspektivering

8.1 Feltundersøgelser relateret til forekomst og transport

Indsamlingen af viden fra overvågningen i 4 lande har vist, at der i de rutinemæssigt gennemførte stikprøver af vandløbsvand ikke er store chancer for at afdække de maksimalt forekommende koncentrationer af pesticider. Specielt overvågning af de hydrofobe pesticider som er påvist at følge suspenderet og kolloidalt uorganisk og organisk stof i vandløb kan kun måles ved hyppig prøvetagning under f.eks. kraftig regn som medvirker til at mobilisere og transportere stofferne til overfladevand. Også metoderne, der anvendes til bestemmelse af såvel frit opløst pyrethroid og partikel-bundet pyrethroid, mangler et eftersyn. Udestående forskningsspørgsmål som mangler at blive besvarede er: 1) Hvordan fordeler de hydrofobe pesticider sig mellem ægte opløsning, kolloid-fraktion og sorberet fase fra kilden via drænvand eller overfladisk afstrømning til vandløbet? 2) Hvordan ændrer bindingsformen og fasefordelingen sig undervejs fra kilde til recipient? 3) Hvad sker der med de sedimentbundne og kolloid-bundne stoffer ved sedimentering på bunden af vandløb (nedbrydning og frigivelse)? 4) Hvad sker der når sedimentet ophvirvles (resuspension) ved stigning i strømhastighed og ved bioturbation (ligevægte sediment, kolloid og vandfase)? og 5) Hvorvidt kan de eksisterende prøveforberedelses- og analysemetoder skelne mellem frit opløst, kolloid-bundet og sediment-bundet pyrethroid?

8.2 Laboratorieundersøgelser af fysisk-kemiske forhold

Gennem dette pilotprojekt har vi opnået nogle resultater, der helt eller delvist er i strid med eksisterende litteratur. Laboratorieundersøgelserne af sorptionsforhold for de hydrofobe pesticider har frembragt en række spørgsmål og hypoteser: 1) Hvor stor er andelen af stabilt kolloid materiale (naturlige nanopartikler) i vandfasen for forskellige naturligt forekommende materialer i vandløb, og hvad er sammensætningen af disse partikler (uorganiske eller organiske)?; 2) Er opløst organisk humusmateriale (DOC) en del af det såkaldte kolloide materiale og hvilken betydning har det for sorptionsforholdene?; 3) Hvor stærkt bindes pyrethroider til den kolloide fraktion – og hvordan bestemmes dette rent eksperimentelt; 4) Hvor hurtigt desorberes allerede sorberet sorbat fra uorganiske og organiske partikler og nanopartikler?

8.3 Økotoxikologi

Også med hensyn til økotoxikologi har vi opnået resultater, der helt eller delvist er i strid med eksisterende litteratur. Vi har vist, at organiske sorbenter ikke nødvendigvis sorberer pyrethroider så stærkt, at deres effekt bliver mitigeret med en faktor 10-100 som tidligere foreslået. Dette understreger et akut behov for ensretning af laboratorieprocedurer for at minimere variationen i faktiske eksponeringskoncentrationer i sådanne undersøgelser. Den relativt lave mitigerings-effekt af humussyre på økotoxikologiske effekter af lambda-cyhalothrin på *G. pulex* indikerer, at passiv diffusion i et relativt kort tidsvindue samt anvendelsen af miljørealistiske koncentrationer af både sorbent og pesticid skal indgå som mere centralt fokusområde i kommende undersøgelser, så de toksikologiske mekanismer under akutte og realistiske eksponeringsscenerier kan blive undersøgt yderligere. Dette er et vigtigt aspekt som er stort set uberørt i den internationale litteratur.

Vores undersøgelser af montmorillonit som sorbent understreger, at der skal skabes en bedre og bredere forståelse af forskellige sorbenttypers rolle som transportvektorer for hydrofobe pesticider

fra mark til vandløb. Vores resultater indikerer, at lermineralet montmorillonit muligvis kan binde forholdsvis meget aktiv stof, hvis initialkoncentrationen er høj og senere frigive dele af dette ved desorptionsprocesser, så aktivstofferne bliver fuldt biotilgængelige for residente organismer med en forøget effekt til følge. Desuden indikerer undersøgelserne, at den kolloide fraktion (nano-størrelse partikler) fra montmorillonit kan øge giftigheden af lambda-cyhalothrin – en mekanisme, der må undersøges mere dybtgående. Disse resultater påpeger også nødvendigheden af en bedre forståelse for hydrofobe pesticiders skæbne i de vandige miljøer, hvor opholdstider, desorptionsmekanismer og biotilgængelighed er nærmest ukendte parametre i forskningen til dato. Det skal fremhæves, at nærværende projekt ikke har kunnet underbygge at sorption af stærkt hydrofobe pesticider i tilstedeværelse af relevante sedimentkoncentrationer i vandløb væsentligt nedsætter giftigheden – tværtimod er giftigheden i tilstedeværelse af montmorillonit øget.

En høj opholdstid grundet reduceret nedbrydningsrate ved sorption til faste partikeloverflader samt sedimentering på vandløbsstrækninger med lav vandføring eller i søer vil ligeledes betyde, at visse habitattyper vil være pesticidholdige i kortere eller længere perioder. Vi ved endnu ikke, hvilken rolle dette potentielt spiller for herboende organismer eller for rekoloniseringsprocesser, men en sådan viden vil være åbenlyst relevant for den overordnede forståelse for ferskvandsorganismers evne til at modstå pesticidstress. Denne type pesticidstress er af en mere kronisk art, der kan strække sig i månedsvis fra introduktionen af pesticiderne i vandmiljøet. Et andet mere kronisk eksponeringsscenario, der endnu kun er yderst sparsomt belyst i den internationale litteratur, er indgiftningsveje via fødekilder for små og større dyr i vandmiljøet. Organisk stof som CPOM og FPOM samt bakterie- og alge-biofilm er klart potentielle sinks for hydrofobe stoffer som pyrethroiderne og udgør samtidig vigtige fødekilder for ferskvandsdyr. Mens mikro- og nanopartikler i nærværende forsøg næppe er attraktive fødeemner for den anvendte test-organisme *Gammarus pulex*, så udgør lignende organiske partikler habitat- såvel som fødegrundlag for andre makroinvertebrater. Dette kan naturligvis have stærke implikationer for, hvordan og hvor meget forskellige taxa-grupperinger eksponeres for pyrethroid insektgifte. Kun få studier har undersøgt sådanne mekanismer i laboratorieforsøg, mens en egentlig kortlægning af hydrofobe pesticiders tilstedeværelse på sådanne fødeemner og habitater i søer og vandløb endnu ikke er foretaget.

Referencer

- Albaser, S.S.; Rao, R.N.; Swamy, Y.V., Mukkanti, K. (2011) Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids. *Trends Anal. Chem.* 30, 1771 – 1780.
- Ali, M.A.; Baugh, P.J. (2003) Sorption-desorption studies of six pyrethroids and Mirex on soils using GC/MS-NICI. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 83, 923 – 933.
- Beketov, M.A. & Liess, M. (2008) Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 461-470.
- Beketov, M.A., Schäfer, R.B., Marwitz, A., Paschke, A. & Liess, M. (2008) Long-term stream invertebrate community alterations induced by the insecticide thiacloprid: Effect concentrations and recovery dynamics. *Science of the Total Environment* 405: 96-108.
- Bossi, R, Sortkjær, O. & Juhler, R.K. (2009) Screening for udvalgte pesticider i vandløb og grundvand. Arbejdsrapport fra DMU, nr. 252.
- Bøgestrand, J. (red.) (2003) Vandløb 2002, NOVA 2003. Danmarks Miljøundersøgelser. Faglig rapport fra DMU, nr. 470.
- Cui X, Hunter W, Yang Y, Chen Y, Gan J (2010) Bioavailability of sorbed phenanthrene and permethrin in sediments to *Chironomus tentans*. *Aquatic Toxicology* 98: 83-90
- Ejrnæs, R., Baattrup-Pedersen, A., Riis, T., Pedersen, M.L., Hoffmann, C.C., Kronvang, B. (2013) Herbicider i terrestriske vådområder, Herbiciders forekomst, mængde, spredningsveje og effekter i moser i udvalgte jyske ådale. Danish Environmental Protection Agency. Pesticide Research (in press).
- Felding, G., B. B. Mogensen, J. B. Sørensen, A. C. Hansen (1997) Surface run-off of pesticides from farm-land to streams and lakes. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen*, nr. 29. 76 s.
- Fojut, T. L.; Young, T.M. (2011a) Desorption of pyrethroids from suspended solids. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1760 – 1766
- Fojut, T.L.; Young, T.M. (2011b) Pyrethroid sorption to Sacramento river suspended solids and bed sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 787 – 792.
- Friberg, N., Lindstrøm, M., Kronvang, B. & Larsen, S.E. (2003) Macroinvertebrate/sediment relationships along a pesticide gradient in Danish streams. *Hydrobiologia* 494: 103-110.
- Fyns Amt (1997) De fynske vandløb. VANDMILJØovervågning. Tema: Ferskvand. Fyns Amt, Natur- og Vandmiljøafdelingen, 210 s.
- Heckmann, L.H. & Friberg, N. (2005) Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 582-590.
- Heckmann, L.H., Friberg, N. & Ravn H.W. (2005) Relationship between biochemical biomarkers and pre-copulatory behaviour and mortality in *Gammarus pulex* following pulse-exposure to lambda-cyhalothrin. *Pest. Manag. Sci.* 61: 627–635.
- Hill IR (1989). *Aquatic organisms and pyrethroids. Pesticide Science* 27: 429-457
- Koskinen, W.C.; Rice, P.J.; Seebinger, J. (2006) Experimental variability in characterization of cyfluthrin sorption to soil. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 41, 323 – 331.
- Kronvang, B., Strøm, H.L., Hoffmann, C.C., Laubel, A. & Friberg, N. (2004) Subsurface tile drainage loss of modern pesticides: field experiment results. *Water Science and Technology* 49: 139-148.
- Kronvang, B., Iversen, H.L., Vejrup, K., Mogensen, B.B., Hansen, A.-M. & Hansen, L.B. (2003a) Pesticides in Streams and Subsurface Drainage Water within Two Arable Catchments in Denmark. Pesticide Application, Concentration, Transport and Fate Facilitated Transport and Pesticides. Danish Environmental Protection Agency. Pesticide Research 69: 141 pp.

- Kronvang, B., Laubel, A., Larsen, S.E. & Friberg, N. (2003b) Pesticides and heavy metals in Danish streambed sediment. *Hydrobiologia* 494: 93-101.
- Kusk KO (1996). Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater/sediment system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 252-255
- 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: Focus* 6: 423-432
- Lauridsen, R.B. & Friberg, N. (2005) Stream macroinvertebrate drift response to pulse exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environmental Toxicology* 20: 513-521.
- Liess M, Schulz R, Liess MH-D, Rother B, Kreuzig R (1999). Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Water Research* 33: 239-247
- Matthiessen, P., D. Sheahan, R. Harrison, M. Kirby, R. Rycroft, A. Turnbull, C. Volkner, R. Williams (1995) Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 30, 111-119.
- 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* 27: 2582-2590
- 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* 21: 9-15
- 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* 427-428: 319-331.
- Miljøstyrelsen (2009) Bekæmpelsesmiddelstatistik 2008. Orientering fra Miljøstyrelsen, nr. 4, 2009, 51 s.
- Møhlenberg, F., Kaas, H., Schlüter, L., Gustavson, K., Andersen, T.T., Forbes, V., Cold, A., Friberg, N., Larsen, S.E. & Lauridsen, R.B. (2004) Effekter af bekæmpelsesmidler på flora og fauna i vandløb. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 82.
- Nørum U., Bjerregaard P., Friberg N. & Larsen S.E. (2006) Effekter af pulseksponering med pyrethroider på vandløbsinvertebrater - med særlig fokus på lambda-cyhalothrin. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 102, 100 s.
- Nørum, U., P. Bjerregaard (2003) Ferskvandsinvertebraters bevægelsesadfærd som biomarkør for pesticid-eksponering og -effekt. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 75. 66 s.
- OECD (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Environment Health and Safety Publications – Series on Testing and Assessment No. 23.
- OECD (2004) OECD guideline for testing of chemicals 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test, 12 pp.
- Oudou, H.C. & Hansen, H.C.B. (2002a) Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere* 49: 1285-1294.
- Oudou, H.C. & Hansen, H.C.B. (2002b) Sorption of cypermethrin diastereoisomers to quartz, corundum, goethite, kaolinite and montmorillonite. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 82: 529-544.
- Rasmussen JJ, McKnight US, Loinaz M, Thomsen NI, Olsson ME, Bjerg PL, Binning PJ, Kronvang B (2012a). A catchment scale evaluation of multiple stressor effects in headwater streams. *Science of the Total Environment* (indsendt).
- Rasmussen JJ, Monberg RJ, Baattrup-Pedersen A, Cedergreen N, Wiberg-Larsen P, Strobel BW, Kronvang B. (2012b) Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of an assemblage of macroinvertebrate shredders. *Aquatic Toxicology* 118-119: 54-61.

- Regeringen (2009) Aftale om Grøn Vækst af 16. juni 2009, se www.mst.dk/NR/rdonlyres/CF23236F-3FBC-4E99-8AC8-42E39F9F8ACD/111049/1AftaleomGrnVkst.pdf <online marts 2013>
- Schäfer, R.B., 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* 382: 272-285.
- Schriever, C.A. & Liess, M. (2007) Mapping ecological risk of agricultural pesticide runoff. *Science of the Total Environment* 384: 264-279.
- Schulz, R. & Liess, M. (1999a) Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2243-2250.
- Schulz, R. & Liess, M. (1999b) A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aqua. Toxicol.* 46, 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.* 20: 185-190.
- Schulz, R. & Liess, M. (2001b). Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms: Importance of biological interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 757-762.
- Schulz R, Hauschild M, Ebeling M, Nanko-Drees J, Wogram J, Liess M (1998). A qualitative field method for monitoring pesticides in the edge-of-field runoff. *Chemosphere* 36: 3071-3082
- Styczen, M., Wiberg-Larsen, P. & Aagaard, A. (2003) Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. *Vand & Jord* 10: 84-87.
- Svenske Kemikalieinspektion (2008) Sammanställning av protokoll om riktvärden för växtskyddsmedel i ytvatten, Version 2008-04-29.
- Thyssen, N., Erlandsen, M., Kronvang, B., Svendsen L.M. (1990) Vandløbsmodeller – biologisk struktur og funktion. NPO-Research C10. National Agency of Environmental Protection, Copenhagen, 104 pp.
- von der Ohe, P.C. & Liess, M. (2004) Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 150-156.
- Wei, J., Furrer, G., Kaufmann, S. & Schulin, R. (2001) Influence of clay minerals on the hydrolysis of carbamate pesticides. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2226-2232.
- Weston DP, You J, Lydy MJ (2004). Distribution and toxicity of sediment-associated pesticides in agriculture-dominated water bodies of California's Central Valley. *Environmental Science and Technology* 38: 2752-2759
- 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, Nørum U (2009). Effekter af pyrethroidet lambda-cyhalothrin på biologisk struktur, funktion og rekolonisering i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 126, 165 s.
- Wiggers, L. (1999) Pesticider i vandløb, kilder og søer i Århus Amt. Teknisk rapport fra Natur og Miljøkontoret.
- Wheelock, C.E.; Miller, J.L.; Miller, M.J.; Phillips, B.M.; Gee, S.J.; Tjeerdema, R.S.; Hammock, B.D. (2005) Influence of container adsorption upon observed pyrethroid toxicity to *Ceriodaphia dubia* and *Hyalella azteca*. *Aq. Toxicol.* 74, 47 – 52.
- Wogram, J. & Liess, M. (2001) Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 360-367.
- Yang, W., Spurlock, F., Liu, W. & Gan, J. (2006a) Inhibition of aquatic toxicity of pyrethroid insecticides by suspended sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 1913-1919.
- Yang, W., Gan, J., Hunter, W. & Spurlock, F. (2006b) Effect of suspended solids on bioavailability of pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 1585-1591.

- Zhou, J.L.; Rowland, S.; Mantoura, R.F.C. (1995) Partition of synthetic pyrethroid insecticides between dissolved and particulate phases. *Water. Res.* 29, 1023 – 1031.
- Åkerblom N, Arbjörk C, Hedlund M, Goedkoop W (2008). Deltamethrin toxicity to the midge *Chironomus riparius* Meigen - Effects of exposure scenario and sediment quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 53-60

Bilag 1: Interview form for the Danish EPA project – Monitoring data

Interview form regarding the Danish EPA pilot project – data from Denmark

As you know, the Danish EPA has initiated a pilot project with the aims to study the biogeochemistry of especially insecticides. In this pilot study, we are focusing on looking in the existing international literature on binding forms and ecological effects of certain insecticides and achieving knowledge from existing monitoring programmes in the North western region of Europe on what has been detected. This interview form is meant to be a starting point for investigation what you have detected in your regional/national monitoring programme on insecticides and other pesticides having binding and effect properties alike.

You should fill in best possible the Tables applied and a visit will be organised where I will visit you to discuss further on the results. The results will be used in a final report from the project to the Danish EPA. If you have, any restrictions for use then please indicate this in the Tables (insert a comment) and you should of course just inform at the visit.

List of pesticides of specific interest:

Insecticides

- All insecticides detected in your monitoring programme has an interest but of primary interest is:
 - Pyrethroids (e.g. **lambda-cyhalothrin**, alpha-cypermethrin, cypermethrin, esfenvalerat, tau-fluvalinate og fenvalerat)
 - Neonicotinoider (allowed in DK in 2007) (e.g. **thiacloprid** og imidacloprid)
 - Carbamates (e.g. **pirimicarb**)
 - organophosphates (e.g. dimethoate)

Fungicides

- The active ingredients having lowest effect concentrations, and those having synergistic effects with among others the group of pyrethroids:
 - Imidazoles (e.g prochloraz)
 - Triazoles (e.g. epoxiconazol, propiconazol og tebuconazol)

Other pesticides

- Terbutylazine.

We would like information about the following points to be filed in the Tables:

TABEL B1.1. USE OF THE PESTICIDES AS ACTIVE INGREDIENTS IN TWO RECENT YEARS (E.G. 2005 AND 2009 STATISTICS).

Pesticides	Annual amount kg a.i.		Crop types sprayed		Standard dose		Total areas being sprayed (ha)	
	2005	2009	2005	2009	2005	2009	2005	2009
Lambda-cyhalothrin	475	551				6.3-15	62549	72842
Alpha-cypermethrin	1281	9229				12.5	101295	732749
Cypermethrin	2554	9764				12.5-40	172623	358342
Esfenvalerate	58	0			-	-	-	0
Tau-fluvalinate	8836	7476				48-72	174879	119408
Fenvalerate	0	0			-	-	0	0
Thiacloprid	0	4392				72	0	61000
Imidacloprid	1862	2572				-	-	-
Pirimicarb	2090	6227				125-250	15323	45665
Dimethoate	20464	0			300	-	68213	0
Prochloraz	351	0			450-675	-	780	0
Epoxiconazole	46625	27816				125	372992	222528
Propiconazole	20745	9188				125	165960	73504
Tebuconazole	22085	37761				250-375	86868	145188
Therbythylazine	43817	0					38102	0

Annual amount in kg a.i.

The crop types where the pesticide is applied.

Each standard dosing.

The total area being sprayed with the pesticide.

TABEL B1.2. RESTRICTIONS FOR USE OF THE DIFFERENT PESTICIDES.

Pesticides	Allowed for use (only fill in if not allowed)		What months can or is the pesticide applied (M,A,M,J,J,A,S,O)		Restrictions for use – distance to surface waters, etc.
	2005	2009	Spring	Autumn	
Lambda-cyhalothrin					20 m (agri) and 50 m (fruit, forest) from surface waters
Alpha-cypermethrin			Not allowed between 03-21 in biers flyvetid		20 m (agri) and 30 m (horticulture) from surface waters
Cypermethrin					20 m (agri), 30 m (horticulture) and 50 m (fruti, forest)
Esfenvalerate	Not allowed since 2001 (agri)				Nåletræsnudebiller (<i>Hylobius abietis</i>) in conifers -20 m from surface waters
Tau-fluvalinate					20 m from surface waters
Fenvalerate	Not used since 1994				
Thiacloprid			Only once a year		10 m from surface waters
Imidacloprid					Only indoor or on grass lanes –stables, etc.
Pirimicarb					20 m cereals other 30 m from surface waters
Dimethoate		Not used since 2006			10 m from surface waters
Prochloraz		Not used since 2006			10 m from surface waters
Epoxiconazole					10 m from surface waters
Propiconazole					2 m from surface waters
Tebuconazole					20 m from surface waters
Therbythylazine		Not allowed since 2009			10 m from surface waters

Are the pesticides allowed or has they been abandoned and then what year?

In what months are the pesticides not allowed to be used?

Are there any restrictions for distance to surface water when used?

TABEL B1.3. DETECTION OF PESTICIDES IN SURFACE WATERS (NATIONAL MONITORING PROGRAMME)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./L)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./L)	Median Concentrations (ng a.i./L)
Lambda-cyhalothrin		n.a.				
Alpha-cypermethrin		n.a.				
Cypermethrin		n.a.				
Esfenvalerate		0,15 (N=668)			100	-
Tau-fluvalinate		n.a.				
Fenvalerate		n.a.				
Thiacloprid		n.a.				
Imidacloprid		n.a.				
Pirimicarb	10	2,1 (N=945)			150	23
Dimethoate	10	1,9 (n=945)			206	52
Prochloraz		n.a.				
Epoxiconazole		n.a.				
Propiconazole	10	5,7 (N=945)			1400	22
Tebuconazole						
Therbythylazine	10	29,5 (1082)			1400	25

General information on detection limits for the pesticides - laboratory.

Detection frequency (2005 or earlier and onward overall and number of analysed samples in surface waters and groundwater, respectively).

Detection frequencies per season (spring/Autumn ½ year) in surface waters and groundwater, respectively. Maximum and median concentrations detected in surface water and groundwater – annually and seasonally/monthly.

Detection frequencies and concentrations for monitoring of pesticides in sediments – please give details on what kind of sediment sampled and when.

If you have had special monitoring programmes studying pulses of pesticides please indicate and give information during the visit.

TABEL B1.4. DETECTIONS IN SURFACE WATERS LOAMY SOILS (LILLEBÆK) (RESEARCH PROJECT EPA FROM 2 STREAMS – KRONVANG 2003).

Pesticides	Detection limit (ng a.i./L)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./L)	Median Concentrations (ng a.i./L)
Lambda-cyhalothrin		<u>n.a.</u>				
Alpha-cypermethrin		n.a.				
Cypermethrin		n.a.				
Esfenvalerate		n.a.				
Tau-fluvalinate		n.a.				
Fenvalerate		n.a.				
Thiacloprid		n.a.				
Imidacloprid		n.a.				
Pirimicarb	4	12 & 9.4 (N=223)			39	6
Dimethoate	4-11	12 & 3.1 (n=223)			36	14
Prochloraz	3-6	3.5 & 3.1 (n=223)			1	1
Epoxiconazole		n.a.				
Propiconazole	3-7	55 & 18 (N=223)			251	13
Tebuconazole		n.a.				
Therbythylazine	3-5	97 & 87 (N=223)			4318	76

TABEL B1.5. DETECTIONS IN SURFACE WATERS SANDY SOILS (ODDERBÆK) (RESEARCH PROJECT EPA FROM 2 STREAMS, KRONVANG 2003).

Pesticides	Detection limit (ng a.i./L)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./L)	Median Concentrations (ng a.i./L)
Lambda-cyhalothrin		<u>n.a.</u>				
Alpha-cypermethrin		n.a.				
Cypermethrin		n.a.				
Esfenvalerate		n.a.				
Tau-fluvalinate		n.a.				
Fenvalerate		n.a.				
Thiacloprid		n.a.				
Imidacloprid		n.a.				
Pirimicarb	4	2.9 (N=72)			14	8
Dimethoate	4-11	1.5 (n=72)			2	2
Prochloraz	3-6	1.5 (n=72)			19	1
Epoxiconazole		n.a.				
Propiconazole	3-7	5.9 (N=72)			44	7
Tebuconazole		n.a.				
Therbythylazine	3-5	32 (N=72)			136	4

TABEL B1.6. DETECTIONS IN GROUNDWATERS (NATIONAL MONITORING PROGRAMME)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./L)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./L)	Median Concentrations (ng a.i./L)
Lambda-cyhalothrin		n.a.				
Alpha-cypermethrin		n.a.				
Cypermethrin		n.a.				
Esfenvalerate		0 (n=49)				
Tau-fluvalinate		n.a.				
Fenvalerate		0 (n=49)				
Thiacloprid		n.a.				
Imidacloprid		n.a.				
Pirimicarb		0 (n=4547)				
Dimethoate		0,2 (n=5608)			60	40
Prochloraz		0 (n=275)				
Epoxiconazole		n.a.				
Propiconazole		0,4 (n=4624)			34	17
Tebuconazole		n.a.				
Therbythylazine	10	1,3 (n=8302)			70	20

TABEL B1.7. DETECTIONS IN GROUNDWATER (DRINKING WATER CONTROLS)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./L)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./L)	Median Concentrations (ng a.i./L)
Lambda-cyhalothrin		n.a.				
Alpha-cypermethrin		n.a.				
Cypermethrin		n.a.				
Esfenvalerate		0 (n=87)				
Tau-fluvalinate		n.a.				
Fenvalerate		0 (n=19)				
Thiacloprid		n.a.				
Imidacloprid		n.a.				
Pirimicarb		0 (n=940)				
Dimethoate		0,1 (n=15880)			29	12
Prochloraz		0 (n=378)				
Epoxiconazole		n.a.				
Propiconazole		0 (n=1051)				
Tebuconazole		n.a.				
Therbythylazine	10	0,3 (n=15440)			72	13

TABEL B1.8. DETECTIONS IN SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN JULY 2007 AFTER SPRING SPRAYING SEASON; ROSSANA *ET AL.* 2009, ARBEJDSRAPPORT FRA DMU 252)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin						
Alpha-cypermethrin						
Cypermethrin	1000	27 (n=15)			4840	2545
Esfenvalerate						
Tau-fluvalinate	2000	13 (n=15)			11840	7740
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb						
Dimethoate						
Prochloraz						
Epoxiconazole						
Propiconazole						
Tebuconazole						
Therbythylazine						

TABEL B1.9. DETECTIONS IN SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN LILLEBÆK DOWNSTREAM STATION, SUSPENDED SEDIMENT WITH IN SITU SAMPLER KRONVANG *ET AL.* 2003, MST 69)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=8)				
Alpha-cypermethrin	10000	12 (n=8)			8000	
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	n.d. (n=8)				
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	12 (n=8)			20000	
Dimethoate	10000	n.d. (n=8)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=8)				
Epoxiconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=8)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	12 (n=8)			10000	

TABEL B1.10. DETECTIONS IN BED SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN LILLEBÆK DOWNSTREAM STATION; KRONVANG *ET AL.* 2003, MST RAPPORT 69)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=6)				
Alpha-cypermethrin	10000	16 (n=6)			6000	
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	16 (n=6)				
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	n.d. (n=6)				
Dimethoate	10000	n.d. (n=6)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=6)				
Epoconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=6)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	n.d. (n=6)				

TABEL B1.11. DETECTIONS IN SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN ODDERBÆK, SUSPENDED SEDIMENT WITH IN SITU SAMPLER KRONVANG *ET AL.* 2003, MST 69.

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=10)				
Alpha-cypermethrin	10000	n.d. (n=10)				
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	n.d. (n=10)				
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	n.d. (n=10)				
Dimethoate	10000	n.d. (n=10)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=10)				
Epoconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=10)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	10 (n=10)			10000	

TABEL B1.12. DETECTIONS IN BED SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN ODDERBÆK; KRONVANG *ET AL.* 2003, MST RAPPORT 69)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=5)				
Alpha-cypermethrin	10000	n.d. (n=5)				
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	n.d. (n=5)				
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	n.d. (n=5)				
Dimethoate	10000	n.d. (n=5)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=5)				
Epoxiconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=5)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	n.d. (n=5)				

TABEL B1.13. DETECTIONS IN SEDIMENT (SUSPENDED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN LILLEBÆK UPSTREAM STATION, SUSPENDED SEDIMENT WITH IN SITU SAMPLER KRONVANG *ET AL.* 2003, MST 69)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=8)				
Alpha-cypermethrin	10000	n.d. (n=8)				
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	12 (n=8)			20000	
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	n.d. (n=8)				
Dimethoate	10000	n.d. (n=8)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=8)				
Epoconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=8)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	n.d. (n=8)			100000	

TABEL B1.14. DETECTIONS IN BED SEDIMENT (FINE BED SEDIMENT TAKEN IN 1999-2001 IN LILLEBÆK UPSTREAM STATION; KRONVANG *ET AL.* 2003, MST RAPPORT 69)

Pesticides	Detection limit (ng a.i./kg DW)	Detection frequency (overall) (%)	Detection frequency (spring) (%)	Detection frequency (autumn) (%)	Maximum concentrations (ng a.i./kg DW)	Median Concentrations (ng a.i./kg DW)
Lambda-cyhalothrin	5000	n.d. (n=6)				
Alpha-cypermethrin	10000	n.d. (n=6)				
Cypermethrin						
Esfenvalerate	10000	16 (n=6)			10000	
Tau-fluvalinate						
Fenvalerate						
Thiacloprid						
Imidacloprid						
Pirimicarb	10000	16 (n=6)			20000	
Dimethoate	10000	n.d. (n=6)				
Prochloraz	50000	n.d. (n=6)				
Epoconazole						
Propiconazole	20000	n.d. (n=6)				
Tebuconazole						
Therbythylazine	10000	n.d. (n=6)				

General information on detections:

- Can detections in your opinion be related to certain soil types? IF yes, please indicate soil type.

More detection in streams draining loamy catchments than in streams draining sandy catchments

- Can detections in your opinion be related to certain specific climate conditions? If yes, please indicate under which conditions and maybe give an example.

Most detections were done I late spring and summer months

Links to relevant home pages and reports:

Bilag 2: Eksempel på data fra det svenske overvågningsprogram

Data fra SLU, Sverige

TABEL B2.1. Pesticides FOUND IN STREAM WATER – SWEDISH NATIONAL MONITORING PROGRAMME

Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOD	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)		Detection frequency %	Maximum concentration (µg/L)	Median concentrations (µg/L)	
			2002	2009	2002	2009			2002-2009	Above LOQ
Alpha-cypermethrin	718	1	0,02	0,00025			0,1%	<i>0,0024</i>		0,002
Dimethoate	719	4	0,02	0,002		0,005	0,6%	0,16	0,16	0,02
Epoxiconazole	87	0	not analyzed	0,01		0,05	not found			0,01
Esfenvalerate	718	17	0,02	0,0002	0,1		2,4%	<i>0,06</i>		0,002
Fenvalerat	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			
Imidacloprid	451	52	not analyzed	0,003		0,01	11,5%	5	0,0295	0,09
Lambda-cyhalothrin	718	0	0,03	0,0002			not found			0,001
Primicarb	719	156	0,005	0,002	0,03	0,002	21,7%	0,47	0,0255	0,005
Prochloraz	719	41	0,05	0,004	0,2	0,01	5,7%	2,9	0,032	0,02
Propiconazole	719	179	0,02	0,003	0,1	0,01	24,9%	1,2	0,071	0,01
Tau-fluvalinate	181	0	not analyzed	0,005			not found			0,005
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			
Terbuthylazine	719	214	0,005	0,003	0,02	0,01	29,8%	0,08	0,0275	0,004
Thiacloprid	87	35	not analyzed	0,003		0,01	40,2%	0,51	0,0295	0,003

Text in italics represent traces (LOD < concentration > LOQ)

Detection frequency:

No. of occurrences above LOD for each substance *100

No. of analyzes for each substance

Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand

TABEL B2.2. PESTICIDES FOUND IN GROUNDWATER – SWEDISH NATIONAL MONITORING PROGRAMME

Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOD	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)		Detection frequency %	Maximum concentration (µg/L)	Median concentration (µg/L)	
			2004	2009	2004	2009	2002-2009		Above LOQ	Above LOD
Alpha-cypermethrin	360	not found	0,01	0,0002			not found		not found	not found
Dimethoate	360	not found	0,01	0,002		0,002	not found		not found	not found
Epoxiconazole	30	not found	not analyzed	0,01		0,05	not found		not found	not found
Esfenvalerate	360	not found	0,005	0,0002			not found		not found	not found
Fenvalerat	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		not analyzed	not analyzed		not found	not found
Imidacloprid	278	not found	not analyzed	0,01		0,01	not found		not found	not found
Lambda-cyhalothrin	360	not found	0,008	0,0002			not found		not found	not found
Pirimicarb	360	not found	0,004	0,002		0,002	not found		not found	not found
Prochloraz	360	not found	0,02	0,002		0,01	not found		not found	not found
Propiconazole	360	not found	0,01	0,003		0,01	not found		not found	not found
Tau-fluvalinate	91	not found	not analyzed	0,005			not found		not found	not found
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		not analyzed	not analyzed		not found	not found
Terbuthylazine	360	not found	0,004	0,002		0,002	not found		not found	not found
Thiacloprid	30	not found	not analyzed	0,003		0,01	not found		not found	not found

Groundwater samples from the 4 stream catchments

TABEL B2.3. PESTICIDES FOUND IN LARGER RIVERS – SWEDISH NATIONAL MONITORING PROGRAMME

Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOD	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)		Detection frequency% 2002-2009	Maximum concentration (µg/L)	Median concentration (µg/L)	
			2002	2009	2002	2009			Above LOQ	Above LOD
Alpha-cypermethrin	142	0	0,03	0,0002			not found			0,002
Dimethoate	142	18	0,02	0,002		0,005	12,7%	0,12	0,0125	0,02
Epoxiconazole	16	0	not analyzed	0,01		0,05	not found			0,01
Esfenvalerate	142	3	0,02	0,0002			2,1%	0,013	0,0115	0,002
Fenvalerat	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			
Imidacloprid	92	9	not analyzed	0,003		0,01	9,8%	0,21	0,016	0,08
Lambda-cyhalothrin	142	0	0,02	0,0002			not found			0,001
Pirimicarb	142	50	0,005	0,002	0,02	0,002	35,2%	0,083	0,0135	0,005
Prochloraz	142	1	0,05	0,004		0,01	0,70%	0,002		0,02
Propiconazole	142	73	0,02	0,003	0,1	0,01	51,4%	0,27	0,06	0,01
Tau-fluvalinate	36	0	not analyzed	0,005			not found			0,005
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			
Terbutylazine	142	88	0,004	0,003	0,02	0,01	62,0%	0,14	0,027	0,005
Thiacloprid	16	10	not analyzed	0,003		0,01	62,5%	0,16	0,11	0,003

Detection frequency:

No. of occurrences above LOD for each substance *100

No. of analyzes for each substance

TABEL B2.4. PESTICIDES FOUND IN STREAM SEDIMENTS – SWEDISH NATIONAL MONITORING PROGRAMME

Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOD	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)		LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)		Detection frequency%	Maximum concentration ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)	Median concentration ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)	
			2003	2009	2003	2009			Above LOQ	Above LOD
Alpha-cypermethrin	42	2	5	0,5			5%	5,5		5,375
Dimethoate	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			
Epoxiconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			
Esfenvalerate	42	18	5	0,3	10	10	43%	7,5		5,15
Fenvalerat	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			
Imidacloprid	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			
Lambda-cyhalothrin	42	0	8	0,3			not found			
Pirimicarb	42	0	5	4			not found			
Prochloraz	12	0	30	not analyzed			not found			
Propiconazole	42	1	20	15			2%	100	100	100
Tau-fluvalinate	12	0	not analyzed	5			not found			
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			
Terbuthylazine	42	0	8	3			not found			
Thiacloprid	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed			not analyzed			

Sediment samples from the 4 stream catchments and the 2 rivers included in this table. Units are in micrograms per kilo dry matter (DM)

Text in italics represent traces (LOD < concentration > LOQ)

Detection frequency:

$\frac{\text{No. of occurrences above LOD for each substance}}{\text{No. of analyzes for each substance}} * 100$

TABEL B2.5. PESTICIDES FOUND IN STREAM WATER – SWEDISH REGIONAL MONITORING PROGRAMME

2002-2009 Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOQ	LOQ (µg/L)		Detection frequency%	Maximum concentration (µg/L)	Median concentration (µg/L)
			2002	2009			
Alpha-cypermethrin	184	not found	0,03	0,0003	not found		
Dimethoate	2084	7	0,03	0,01	0,34%	3,1	0,19
Epoxiconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Esfenvalerate	210	not found	0,02	0,00025	not found		
Fenvalerat	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Imidacloprid	120	not found	not analyzed	0,05	not found		
Lambda-cyhalothrin	184	not found	0,02	0,00025	not found		
Pirimicarb	283	20	0,006	0,002	7,07%	0,061	0,02
Prochloraz	193	not found	0,05	0,01	not found		
Propiconazole	266	23	0,02	0,003	8,65%	0,03	0,02
Tau-fluvalinate	11	not found	not analyzed	0,005	not found		
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Terbutylazine	2120	62	0,01	0,01	2,92%	3	0,03
Thiacloprid	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		

Detection frequency:

$\frac{\text{No. of occurrences above LOD for each substance}}{\text{No. of analyzes for each substance}} * 100$

TABEL B2.6. PESTICIDES FOUND IN GROUNDWATER – SWEDISH REGIONAL MONITORING PROGRAMME

2002-2009 Pesticides	Number of times analyzed	Number of times found above LOQ	LOQ (µg/L)		Detection frequency% 2002-2009	Maximum concentration (µg/L)	Median concentration (µg/L)
			2002	2009			
Alpha-cypermethrin	44	not found	0,04	not analyzed	not found		
Dimethoate	9957	not found	0,05	0,05	not found		
Epoxiconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Esfenvalerate	9	not found	0,01	not analyzed	not found		
Fenvalerat	37	not found	0,05	not analyzed	not found		
Imidacloprid	3	not found	not analyzed	0,05	not found		
Lambda-cyhalothrin	8	not found	0,01	not analyzed	not found		
Pirimicarb	91	not found	0,01	0,01	not found		
Prochloraz	10	not found	0,05	0,05	not found		
Propiconazole	75	not found	0,03	0,01	not found		
Tau-fluvalinate	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Tebuconazole	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		
Terbuthylazine	10027	19	0,05	0,05	0,19%	0,45	0,03
Thiacloprid	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed	not analyzed		

Bilag 3: Forsøgsmanualer for anvendelse af videosporingsudstyr

1. Kunstigt ferskvand

Kunstigt ferskvand produceres for at opnå standardiserede vilkår for test-organismerne før og under selve forsøget. De fleste vandløbsorganismer kræver tilstedeværelse af en række makro- og mikronæringsstoffer, som er naturligt forekommende i vandløb. Af denne grund skal disse standardiserede vilkår være relativt sammenlignelige med naturligt forekommende ferskvand, og de stoffer, der er påkrævet for vandløbsorganismernes overlevelse under laboratorieforsøg, tilsættes.

Det kunstige ferskvand fremstilles til to uger ad gangen = 2 delforsøg. I hver uge skal der bruges vand til 99 forsøgsarenaer (af 80 ml) til akklimatisering/eksponering samt genopfyldning af de 99 forsøgsarenaer til efterfølgende videosporing. Derudover skal der bruges kunstigt ferskvand til fremstilling af eksponeringsopløsningerne. I alt skal der altså fremstilles ca. 40 L kunstigt ferskvand til to ugers laboratorieforsøg.

TABEL B3.1. KUNSTIGT FERSKVAND FREMSTILLES EFTER OECD RTNINGSLINIER (OECD 2004). ANVENDTE NÆRINGSSALTE OG KONCENTRATIONER.

Salt	Koncentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123,25
NaHCO_3	64,75
KCl	5,75

Stamopløsningen fremstilles i omvendt osmosevand, og selve fremstillingen skal udføres i tre trin.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ opløses i en separat stamopløsning (1), som laves under magnetomrøring og evt. opvarmning til 40 °C for at optimere opblandingen.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 og KCl opløses i endnu en stamopløsning (2) under magnetomrøring. Stamopløsning 1 og 2 opblandes nu med omvendt osmosevand for at opnå de tilstræbte koncentrationer.

Det kunstige ferskvand opbevares mørkt ved eksponeringstemperatur (10 °C).

2. Opblanding af lambda-cyhalothrin samt sorbenter

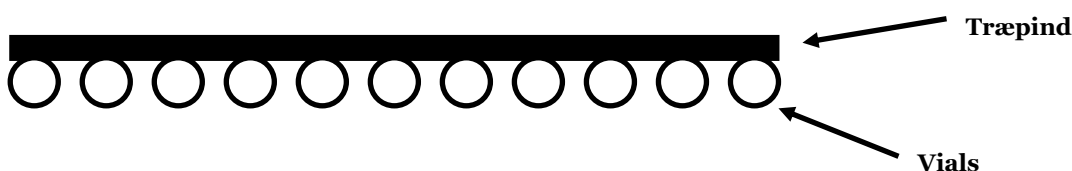
Pesticiderne opbevares i køleskab. Der skal anvendes syrebehandlede glasvarer til at lave fortyndingsserier i samt til opbevaring af stamopløsning. Afvejning af pesticid til stamopløsning udføres i stinkskab, og selve stamopløsningen opblandes i 96% ethanol. Stamopløsning af lambda-cyhalothrin kan holde sig 3-4 uger på køl (4 °C). Montmorillonit og humussyre opbevares som tørstof i en lufttæt flaske/beholder ved stuetemperatur.

På eksponeringsdagen fremstilles en stamopløsning i kunstigt ferskvand, som placeres på magnetomrører ved eksponeringstemperatur (10 °C). Lad opløsningen stå på magnetomrøreren i mindst 2 timer, så partiklerne bliver ensformigt opslemmet. Pipettering fra stamopløsningen skal foregå standardiseret for at minimere variation imellem udtagne volumener til fremstilling af eksponeringsblandinger.

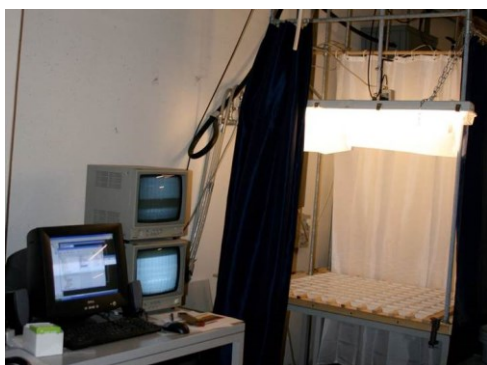
Eksponeringsblandingerne fremstilles på selve eksponeringsdagen mindst 2 timer før eksponering af dyr. Alle eksponeringsblandinger fremstilles i kunstigt ferskvand. Hvert videosporingsforsøg udføres med samme koncentration og type af sorbent, således at kun koncentrationerne af lambda-cyhalothrin varierer. Der fremstilles 6 eksponeringsblandinger (1 L) indeholdende sorbent, og eksponeringsblandingerne skal stå på magnetomrører ved eksponeringstemperatur (10 °C).

En fortyndingsserie fremstilles af lambda-cyhalothrin (i 96% ethanol), således at målkoncentrationen i eksponeringsblandingen kan opnås ved tilsætning af 100 µL af en lambda-cyhalothrin opløsning. Der tilsættes 100 µL af en lambda-cyhalothrin opløsning til hver af de 6 eksponeringsblandinger 2 timer inden den egentlige eksponering for at sikre, at der opstår ligevægt imellem frit opløst og bundet lambda-cyhalothrin. I løbet af disse to timer skal eksponeringsblandingen til stadighed omrøres.

Umiddelbart inden eksponering pipetteres 10 ml eksponeringsblanding over i vials, der er monteret på en træpind (se Figur B3.1). Ved brug af denne anretning udføres selve eksponeringen ved på samme tid at tømme indholdet af alle vials ud i forsøgsarenaerne. Afstanden imellem vials justeres, så indholdet af den enkelte vial kun tømmes ud i én arena.



FIGUR B3.1. TRÆPIND MED 11 VIALS TIL SAMTIDIG DOSERING AF EKSPONERINGSOPLØSNINGER TIL EN RÆKKE ARENAER I VIDEOSPORINGSOPSTILLINGEN.



FIGUR B3.2. VIDEOSPORINGSOPSTILLINGEN (VENSTRE) MED ARENAER MED *G. PULEX* (HØJRE).

3. Indsamling af forsøgsdyr

Forsøgsdyr indsamles fra ukontaminerede lokaliteter 4 dage før eksponering. Kravet til valg af indsamlingslokalitet er primært, at der forefindes et tilstrækkeligt antal individer, som kan bestemmes i felten og indsamles. Derudover er der naturligvis et krav til forsøgsdyret om, at det skal kunne overleve mindst én uge under laboratorieforhold.

Forsøgsdyrene indsamles så forsigtigt som muligt, og de transporteres derefter til laboratoriet i en beholder med indsamlet vandløbsvand fra indsamlingslokaliteten, og vandet gennemluftes med en batteridrevet akvariepumpe. Hvis transporttiden er særlig lang, placeres beholderne i køletasker for at undgå store temperaturudsving, der vil stresses forsøgsorganismene.

Til hvert videosporingsscenarium skal der minimum bruges 99 individer – svarende til antallet af forsøgsarenaer. Dog skal der forventeligt bruges omkring 150 individer for at kunne tage højde for naturlig dødelighed og massive størrelsesvariationer imellem individer. De udvalgte dyr til forsøget skal være mest muligt sammenlignelige ift. størrelse. Den naturlige størrelsesvariation imellem udvalgte individer skal repræsentere hvert enkelt eksponeringsscenarium, og store og små dyr fordeles derfor jævnt imellem eksponeringsscenarierne.

Der skal indsamles 25 L vandløbsvand til brug ved akklimatisering af forsøgsdyr fra vandløbet.

4. Videosporing og forsøgskronologi

Alle forsøg vil blive udført efter samme koncept, og den tidlige fordeling af opgaver er som følger:

Fredag (Dag -4):

Forsøgsdyrene indsamles og akklimatiseres til laboratorieforhold (10 °C og 12/12 timers lys/mørke regime). Akklimatisering foregår i indsamlet vandløbsvand fra indsamlingslokaliteten, og beholderen gennemluftes.

Mandag (Dag -1):

Videosporingsarenaerne sættes op på videosporingsbordet (se nedenstående for skematisk oversigt), og hver arena fyldes med 60 mL kunstigt ferskvand.

Et forsøgsdyr flyttes nænsomt til hver arena. Sørg for, at den naturlige størrelsesfordeling er repræsenteret i alle eksponeringsscenerier. Dyr med en synligt anderledes fremtoning eller adfærd udskiftes med repræsentative individer. Dyrene akklimatiseres herved til de nye forhold indtil videosporing af baggrundsniveauet for bevægelsesaktivitet samt eksponering den efterfølgende dag.

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

Kontrol
0,032 µg/L
0,1 µg/L
0,32 µg/L
1 µg/L
3,2 µg/L

FIGUR B3.3. PLAN FOR EKSPONERINGSPLØSNINGER I VIDEOSPORINGSFORSØG.

Tirsdag (Dag 0):

- a. Videosporingssoftware aktiveres, og de nødvendige informationer angives (jf. videosporingsvejledning).
- b. Baggrundsadfærden spores i 30 minutter.
- c. Eksponeringsblandingerne tilsættes de enkelte arenaer (jf. kapitel 2 om eksponeringsblandinger og tilsætning), og den samlede vandvolumen er derfor 70 mL i hver arena under eksponering.

Videosporing aktiveres umiddelbart efter tilsætning af eksponeringsblandinger, og dyrenes bevægelsesadfærd spores under hele eksponeringsperioden. I dette tilfælde er eksponeringsperioden 90 minutter.

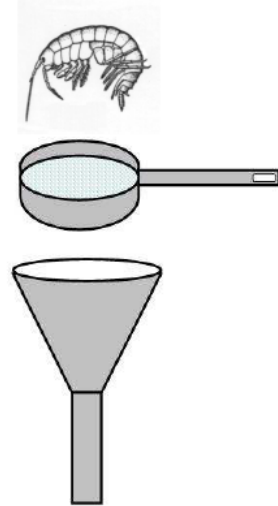
Under eksponeringsperioden klargøres et bord med 99 nye arenaer med hver 60 mL kunstigt ferskvand

- d. Efter 90 minutters eksponering stoppes videosporingen, og hvert dyr skylles med rent kunstigt ferskvand og overføres til den nye arena med rent kunstigt ferskvand (restitutionsfasen). Det kontaminerede vand fra arenaen, hvori dyret blev eksponeret, opsamles. Pesticidholdigt vand fra alle arenaer med ens nominelle eksponeringskoncentrationer puljes i samme beholder til senere analyse for pesticidindhold. Nedenstående skematiske oversigt summerer skyllemetodik, overførsel af forsøgsorganismer fra eksponeringsscenarioet til restitutionsscenarioet og opsamling af pesticidholdigt vand.

EKSPONERINGSARENAER

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

Pesticidholdigt vand
hældes i beholder, og
dyret tilbageholdes i
en lille sigte

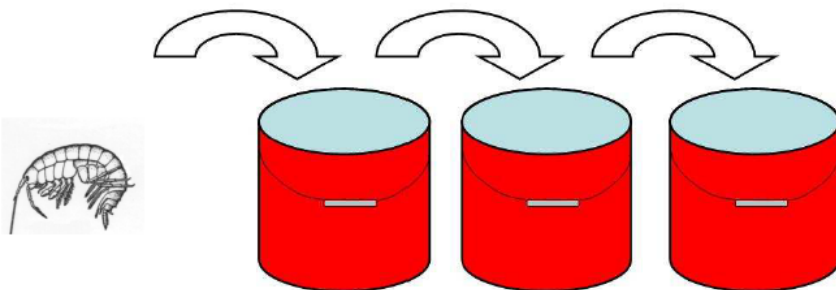


RESTITUTIONSARENAER

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



Opsamling
af pesticid-
holdigt
vand



Dyret skylles
x 3 i rent kunstigt
ferskvand og
overføres herefter til
den nye arena

FIGUR B3.4. EKSPONERINGS- OG RESTITUTIONSPROCEDURE I VIDEOSPORINGSFORSØG MED MELLEMLIGGENDE SKYLNING AF *GAMMARUS PULEX*.

- e. Efter overførslen af dyr til arenaer med rent kunstigt ferskvand placeres de nye arenaer på videosporingsbordet. Placeringen af det enkelte dyr skal være tilsvarende dets placering under eksponering.
- f. Alle forsøgsdyrenes tilstand observeres og registreres. Dvs. som minimum registreres potentielt døde individer, og hvis muligt klassificeres dyrene i tre kategorier (upåvirket, påvirket og død). Døde dyr fjernes og konserveres i 70% ethanol.
- g. De opsamlede vandprøver tilhørende hver eksponeringskoncentration transporteres så hurtigt som muligt til analyselaboratoriet. Transport foregår i køletaske med fryseelementer, og alle prøveflasker skal skånes imod lyspåvirkning.

Onsdag (Dag 1):

Dyrenes bevægelsesadfærd spores i 30 minutter. Herefter registreres dyrenes tilstand så vidt muligt i tre kategorier; upåvirket, påvirket og død. Døde dyr fjernes og konserveres i 70% ethanol.

Torsdag (Dag 2):

Dyrenes bevægelsesadfærd spores i 30 minutter. Herefter registreres dyrenes tilstand så vidt muligt i tre kategorier; upåvirket, påvirket og død. Døde dyr fjernes og konserveres i 70% ethanol.

Fredag (Dag 3):

Dyrenes bevægelsesadfærd spores i 30 minutter. Herefter registreres dyrenes tilstand så vidt muligt i tre kategorier; upåvirket, påvirket og død. Døde dyr fjernes og konserveres i 70% ethanol.

Derudover hentes nye dyr til forsøg i den følgende uge, og de akklimatiseres efter de foreskrevne retningslinjer.

Mandag (Dag 6):

Dyrenes bevægelsesadfærd spores i 30 minutter. Herefter registreres dyrenes tilstand så vidt muligt i tre kategorier; upåvirket, påvirket og død. Døde dyr fjernes og konserveres i 70% ethanol.

Overlevende dyr konserveres ligeledes i fælles glas for samme eksponeringsbehandling.

Gør klar til næste forsøg ved at klargøre nye arenaer og overføre de akklimatiserede dyr til arenaerne.

Nedenstående skema kan anvendes til at fordele arbejdsopgaver imellem involverede parter samt at skabe overblik over forsøgets faser.

TABEL B3.2. SKEMA TIL REGISTRERING AF FORSØGETS FASER.

Opgave	Fredag	Lørdag	Søndag	Mandag	Tirsdag	Onsdag	Torsdag
Indsamle dyr							
Kunst. ferskvand - fremstilling							
Akklimatisering af dyr i akvarier							
Akklimatisering i forsøgsarenaer							
Opblanding af sorbenter							
Opblanding af lambda-cyhalothrin							
Mix sorbent og pesticid → vials							
Videosporing (Baggrundsobs.)							
Eksponer dyr							
Videosporing under eksponering							
Omskift arenaer til rent kunst. fers.							
Videosporing (restitution)							

5. Bestemmelse af hydrofobe pesticiders sorption til montmorillonit og humussyre

FREMSTILLING AF SORBENT SUSPENSION

Montmorillonit anvendt i dette pilotprojekt var Swy-2-Na-montmorillonite (Wyoming) fra Source Clay Minerals Repository (Columbia University, MO, USA), og den anvendte humussyre var Humic acid fra Aldrich.

Fremstil tre stamsuspensioner i kunstig ferskvandsmatrice (se ovenfor) med hhv. 50, 250 og 1250 mg/L sorbent ved at afveje montmorillonit og humussyre til 1000 mL Shott (BlueCap) flaske og tilsætte kunstigt ferskvand, og lad dem omrøre mindst 24 timer inden brug. Stamsuspensionerne kan gemmes på køl uden omrøring, og skal inden brug opnå laborietemperatur og omrøres mindst 2 timer ved konstant omrøring for at opnå reproducerbar opblanding. Udtag fra stamsuspension skal foretages på et fix-punkt i flasken, f.eks. 1 cm fra glasvæggen og 1 cm under overfladen for at opnå bedst mulig repeterbarhed af mængden af suspenderet materiale der udtages med pipette. Stamsuspensionen må ikke ændre total volumen nævneværdigt ved afpipetteringerne (derfor laves fx 1 L selvom der kun skal anvendes 100 mL i alt i forsøgsserien). Suspensionens faktiske koncentration i udtagningsfixpunktet kontrolleres ved at udtage et kendt volumen fra stamsuspensionen med pipette til en tareret vejebåd, herefter inddampes til tørhed, hvorefter tørstofvægten bestemmes ved vejning. Kontrollen laves i triplikat.

LAMBDA-CYHALOTHRIN STAMOPLØSNING OG KALIBRERING

Stamopløsning af lambda-cyhalothrin: En 1000 mg/L lambda-cyhalothrin stamopløsning fremstilles ud fra rent stof og fortyndes i methanol (p.a. grade). Denne stamopløsning er udgangspunkt for fortyndinger til standardopløsninger til GC kalibrering og forsøgsopløsninger, og der laves mellemfortyndinger til de laveste koncentrationer. Vigtigt er at forsøgsopløsningerne indeholder max 0,1% methanol.

NB: Methanol kan erstattes af 96% ethanol til forsøgsopløsninger, men ikke til standardopløsninger til kalibrering af GC pga. vandindholdet.

Intern standard til volumenkorrektio n efter SPE procedure: Der fremstilles en stamopløsning af epoxiconazol 1000 mg/L i methanol ud fra rent stof. Denne stamopløsning fortyndes i methanol til 1000 µg/L og der tilsættes 100 µL som intern standard (svarende til slutkoncentration ca. 50 µg/L) til eluat fra SPE (en kendt mængde) umiddelbart inden analyse på GC-ECD. Denne interne standard anvendes til at bestemme det præcise volumen eluat fra SPE, og dermed korrigeret mængde af lambda-cyhalothrin. Epoxiconazol var bekvemt at anvende i dette projekt med ECD detektor, men det vigtige er at den interne standard er et stof som bestemmes fint med den valgte gaskromatograf og detektor.

LAMBDA-CYHALOTHRIN I KOMPARTMENTS I VIDEOSPORINGSARENAER

Sorption til arenaer uden sorbent: Polystyren videospøringsarenaer (polystyren vejebåde) mærkes og herefter tilsættes 50 mL kunstigt ferskvand ved den ønskede forsøgstemperatur. Fra stamopløsninger tilsættes lambda-cyhalothrin til slutkoncentration på hhv. 1 og 100 µg/L og tiden startes. Reaktionen foregår i 90 min ved laborietemperatur, 20 °C. Efter 90 min overføres væsken straks til et 50 mL glas prøveglas som reservoir for at tiden kan blive præcist 90 min for alle forsøg. Fra reservoiret overføres opløsningen (i alt 4 mL for 100 µg/L og 50 mL for 1 µg/L forsøgene) med glaspipette til SPE patron (200 mg HLB Oasis, konditioneret med 3 mL methanol og 3 mL vand) og elueres med 2 gange 1 mL methanol. Eluatet tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD (Gas Chromatography-Electron Capture Detector) med VF-5MS, 30 m, 0,25 µm kolonne, 1 µL prøve injiceres. Injektortemperatur 270 °C. Koncentration af intern standard bestemmes og det præcise volumen af eluat beregnes, og volumen anvendes til beregning af total mængde lambda-cyhalothrin i de hhv. 4

eller 50 mL prøve oprenset på SPE patronen. Total mængde lambda-cyhalothrin i vandfasen i videosporingsarenaen beregnes.

Arenavægte ekstraheres med 2 gange 1 mL hexan, der tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD.

Fordelingen af lambda-cyhalothrin mellem vandfasen og videosporingsarenaerne beregnes som hhv. µg/L og µg/kg sorberet til vægge.

Sorption til arenaer med sorbent: Polystyren videosporingsarenaer (polystyren vejebåde) mærkes og vejes for start vægt, og herefter tilsættes 45 mL kunstigt ferskvand ved den ønskede forsøgstemperatur. Arenaerne tilsættes 5 mL suspension af enten montmorillonit eller humussyre stamsuspension med den ønskede koncentration beskrevet ovenfor, så der fortyndes 10 gange og forsøgs-koncentrationen bliver hhv. 5, 25 eller 125 mg/L, og tilsættes lambda-cyhalothrin til slutkoncentration på hhv. 1 og 100 µg/L og tiden startes. Reaktionen foregår i 90 min ved laborietemperatur, 20 °C, og suspensionen overføres kvantitativt til glas centrifugeglas og centrifugeres straks ved 1600 g for at holde reaktionstiden så ensartet som muligt for alle forsøgene. Efter 15 min centrifugering overføres supernatanten straks til et 50 mL glas prøveglas som reservoir for at kontakttiden med sorbenten kan blive den samme for alle forsøg. Fra reservoiret overføres opløsningen (i alt overføres 4 mL for 100 µg/L forsøgene og 50 mL for 1 µg/L forsøgene) med glaspipette til SPE patron (200 mg HLB Oasis, konditioneret med 3 mL methanol og 3 mL vand) og elueres med 2 gange 1 mL methanol. Eluatet tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD. Koncentration af intern standard bestemmes og det præcise volumen af eluat beregnes, og volumen anvendes til beregning af total mængde lambda-cyhalothrin i de hhv. 4 eller 50 mL prøve oprenset på SPE patronen. Total mængde lambda-cyhalothrin i vandfasen i videosporingsarenaen beregnes.

Sorbenten i centrifugeglasset resuspenderes med 2 mL methanol og det sorberede lambda-cyhalothrin ekstraheres ved rystning i 1 time, herefter centrifugeres 15 min ved 1600 g og ca. 1 mL af supernatanten overføres til GC-glas med glas pipette. Prøven tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD. Koncentration af intern standard bestemmes og lambda-cyhalothrin bestemmes og anvendes til beregning af total mængde lambda-cyhalothrin sorberet til sorbent fasen i videosporingsarenaen.

Arenaerne vejes og kontrolleres med start vægt at der ikke er efterladt sorbent i arenaerne.

Arenavægte ekstraheres med 2 gange 1 mL hexan, der tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD.

Fordelingen af lambda-cyhalothrin mellem vandfasen, sorbenten og vægge i videosporingsarenaerne beregnes som hhv. µg/L i vandfasen, og µg/kg sorberet til sorbent og vægge.

ADSORPTIONSISOTHERMER

Adsorptionsisothermer: 45 mL kunstigt ferskvand ved den ønskede forsøgstemperatur, 20 °C, tilsættes glas centrifugeglas og der tilsættes 5 mL suspension af enten montmorillonit eller humussyre stamsuspension med den ønskede koncentration som beskrevet ovenfor, så der fortyndes 10 gange og forsøgs-koncentrationen bliver hhv. 5, 25 eller 125 mg/L. Der tilsættes lambda-cyhalothrin til slutkoncentration på hhv. 1, 10, 20, 40, 60, 80 og 100 µg/L og tiden startes. Glassene rystes i 90 minutter ved laborietemperatur, 20 °C, og straks herefter centrifugeres ved 1600 g i 15 min. Efter centrifugering overføres supernatanten straks til et 50 mL glas prøveglas som reservoir for at kontakttiden med sorbenten kan blive den samme for alle forsøg. Fra reservoiret overføres opløsningen (i alt overføres hhv. 4, 5, 7, 10, 20, 30 og 50 mL for hhv. 100, 80, 60, 40, 20, 10, og 1 µg/L forsøgene) med glaspipette til SPE patron (200 mg HLB Oasis, konditioneret med 3 mL methanol og 3 mL vand) og elueres med 2 gange 1 mL methanol. Eluatet tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD. Koncentration af intern standard bestemmes og det præcise volumen af eluat beregnes, og volumen

anvendes til beregning af total mængde lambda-cyhalothrin i prøver oprenset på SPE patron. Total mængde lambda-cyhalothrin i vandfasen i centrifugeglassene beregnes.

Sorbenten i centrifugeglasset resuspenderes med 2 mL methanol og det sorberede lambda-cyhalothrin ekstraheres ved rystning i 1 time, herefter centrifugeres 15 min ved 1600 g og ca. 1 mL af supernatanten overføres til GC-glas med glas pipette. Prøven tilsættes 100 µL epoxiconazol intern standard (1000 µg/L i methanol), og prøven analyseres med GC-ECD. Koncentration af intern standard bestemmes og lambda-cyhalothrin bestemmes og anvendes til beregning af total mængde lambda-cyhalothrin sorberet til sorbent fasen i centrifugeglassene.

I dette forsøg kan ikke skelnes mellem sorberet lambda-cyhalothrin til sorbent og glasvægge, og derfor korrigeres mængden af insekticid sorberet til sorbent ved subtraktion af mængden sorberet til centrifugeglas uden sorbent til stede.

Sorptionisothermer beregnes for lambda-cyhalothrin reaktion med montmorillonit og humussyre beregnes for de tre koncentrationer af sorbent: hhv. 5, 25 eller 125 mg/L og lambda-cyhalothrin til start koncentration 1-100 µg/L.

Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand

Projektet har haft til formål at undersøge binding af insekticider til sedimentpartikler og den deraf følgende forventede reduktion af toksicitet. Helt mod forventning fandtes, at det lipofile insecticid lambda-cyhalothrin var mere toksisk overfor vandløbs-tangloppen *Gammarus pulex* i tilstedeværelse af uorganiske partikler (ler), mens tilstedeværelsen af organiske partikler (humussyre) ikke øgede toksiciteten, men dog heller ikke mindskede toksiciteten. Den øgede toksicitet tilskrives transport af lambda-cyhalothrin via kolloide partikler til tangloppen. Projektet demonstrerer at kolloidbårne lipofile insekticider kan have væsentlige implikationer for invertebrat-faunaen i danske vandløb.



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

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

www.mst.dk