



Pilotprojekt: Insekticiders effekt på de terrestriske stadier af vandinsekter – en overset faktor af betydning for makroinvertebrat- samfundene i danske vandløb?

Udgiver: Miljøstyrelsen

Forfattere:

Morten Strandberg,
Peter Wiberg-Larsen,
Marianne Bruus,
Beate Strandberg,
Peter Borgen Sørensen,
Søren Erik Larsen,
Jes Rasmussen.

Institut for Bioscience, Aarhus Universitet

ISBN: 978-87-7038-117-8

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. 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	6
1. Sammenfatning	7
1.1 Hovedkonklusioner	8
2. Summary	10
2.1 Main conclusions	11
3. Baggrund og formål	13
3.1 Akvatisk risikovurdering af pesticider	13
3.2 Dokumenteret effekt af pesticider på voksne vand(løbs)insekter	14
3.3 Eksponeringsscenerier af insekticider for voksne vandløbsinsekter	14
3.4 Formål	17
3.5 Valg af insekticider	17
4. Følsomheden for insekticider hos voksne vandløbsinsekter – akutte test	18
4.1 Materiale og metode	18
4.2 Statistiske analyser	26
4.3 Resultater - akut test	26
5. Sammenligning af voksen- og juvenilstadiers følsomhed over for de to insekticider	30
5.1 Vurdering af om voksenstadier bør indgå i fremtidige test	32
6. Effekter af ikke dødelige insekticid-doser på voksne vandinsekters parringsadfærd og reproduktion	33
6.1 Eksponering af adulte <i>Agapetus ochripes</i> over for Karate og Confidor	34
6.2 Erfaringer med eksponering af adulte <i>Leuctra fusca</i> over for Confidor	35
6.3 Statistik	36
6.4 Resultater - Eksponering af adulte <i>Agapetus ochripes</i> over for Karate og Confidor	36
7. Flyvetider, fødesøgning, spredning hos repræsentative akvatiske insekter	39
7.1 Makroinvertebrat diversitet i danske vandløb	39
7.2 Forekomst af voksenstadiet i forhold til insekticidanvendelse	40
8. Risikomodel baseret på viden om flyvetider, spredning og akut toksicitet	44
9. Erfaringer fra pilotprojektet	49
9.1 Tilvejebringelse af voksne forsøgsdyr	49
9.2 Håndtering og eksponering	49
9.3 Forsøgsperiodens længde	50
9.4 Vurdering af de undersøgte arters anvendelighed som testorganismer	50

9.5	Potentielle arter til brug for fremtidige toksikologiske test med voksne	51
10.	Samlet diskussion	53
11.	Konklusioner	57
12.	Perspektivering	58
12.1	Administrative perspektiver	58
12.2	Forskningsmæssige perspektiver	58
	Referencer	59
	Ordforklaring	64
	Bilag 1.Data dispersal	66
	Bilag 2.References flight periods	67
	Bilag 3.Overview flight periods	68
	Bilag 4.Spraying periods	69

Forord

Pilotprojektet "Insekticiders effekt på de terrestriske stadier af vandinsekter – en overset faktor af betydning for makroinvertebratsamfundene i danske vandløb?" er finansieret af Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning (J. nr. MST-667-00200). Projektet er udført ved Aarhus Universitet (AU), Institut for Bioscience.

Projektet har modtaget kommentarer fra:

Bjarne W. Strobel, KU

Niels Lindemark, Dansk Planteværn

Poul Løgstrup Bjerg, DTU

Tanja Hansen, MST

Vi vil gerne takke for kommentarer og konstruktive input til projektet.

Vi vil også gerne takke laboranterne Lise Lauridsen, Tanja Quottrup, Johnny Nielsen, for hjælp med indsamling af dyr, dyrehold og forsøgsgennemførelse og Charlotte Kler for hjælp med opsætning af rapporten. Endelig en stor tak til de biologistuderende Emma Louise Laursen, Claus Hindberg, Lisa Bjerregaard Jørgensen, Laura Balslev, som bidrog til adfærdsforsøgene med *Agapetus ochripes* ikke mindst observation af effekter på adfærd og reproduktion.

Silkeborg Maj, 2018, på vegne af forfattergruppen: Morten Strandberg

1. Sammenfatning

Mange slægter af insekter, der lever i ferskvand, lever deres voksenliv på land. Det gælder kendte insektgrupper som guldsmede, vandnymfer, døgnfluer, vårfluer og myg, samt andre mere eller mindre velkendte grupper som netvinger og dovenfluer. Nogle af grupperne har en stor følsomhed for insekticider i de tidlige akvatiske livsstadier. Til gengæld er der stort set ingen viden om deres følsomhed, når de er blevet voksne og landlevende, dvs. i den vigtige kønsmodne fase, hvor de skal sikre næste generation. Der er heller ingen viden om, hvilke konsekvenser det på længere sigt kan have for bestandene af vandinsekter, at en del af populationen bliver påvirket af insekticider, når de er voksne. Ligeledes er der heller ingen viden om, hvilken betydning eksponering af voksne vandinsekter kan have for de dyr, fugle og fisk, som spiser voksne vandinsekter - en effekt, der enten kan være forårsaget af, at de pågældende arter spiser forgiftede insekter, eller ved at mængden af voksne insekter bliver mindre.

Risikovurderingen af insekticider i forhold til vandlevende insekter har alene fokus på, hvad der sker, hvis insekticiderne ender i vandmiljøet, og test omfatter kun effekter på larvestadier.

Formålet med dette pilotprojekt har været at undersøge, om voksne, landlevende vandinsekter er følsomme for insekticider, og at vurdere om, og i givet fald under hvilke forhold, eksponering potentielt kan udgøre en risiko for vandinsekter på populationsniveau. Det er altså alene potentialet i form af følsomhed og sandsynlighed for eksponering af de voksne insekter, der er vurderet. Der indgår således ikke målinger på bestande i felten. Effekter på dyr, der spiser voksne vandinsekter, har heller ikke været en del af projektets formål og bliver derfor alene berørt i perspektiveringen.

Vi valgte at teste to insektmidler tilhørende forskellige grupper - Karate, som indeholder pyrethroidet lambda-cyhalothrin, og Confidor, som indeholder neonicotinoidet imidacloprid - på seks arter af vandinsekter fra tre forskellige grupper. Der er i alle forsøg anvendt de to ovennævnte formulerede produkter. Listen over de insektarter, der indgik i forsøgene, og udførelsen af forsøgene gennemgik ændringer undervejs, dels fordi de dyr, vi havde planlagt at bruge, ikke var til at finde i tilstrækkeligt antal, dels fordi observationerne af dyrene var vanskeligere end forudset, hvorfor vi var nødt til at bruge mindre arenaer og færre dyr per arena end planlagt. De arter, der blev gennemført forsøg med, fremgår af Tabel 1.

TABEL 1. Oversigt over testdyr og insekticider, der indgik i de gennemførte forsøg. Test med oral eksponering af *Leuctra fusca* kunne gennemføres pga. insektets komplicerede fødesøgningsadfærd; dette markeret med (x).

Art	Gruppe	Akutte effekter Karate	Akutte effekter Confidor	Adfærds og reproduktionseffekter Karate og Confidor
<i>Agapetus ochripes</i>	vårflue	x	x	x
<i>Ephemera danica</i>	døgnflue	x	x	
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	Vårflue	x	x	
<i>Leuctra fusca</i>	Slørvinge	x	x	(x)
<i>Nemoura cinerea</i>	Slørvinge	x	x	
<i>Anabolia nervosa</i>	Vårflue	x	x	

1.1 Hovedkonklusioner

Akut test

Pilotprojektet har vist, at LD₅₀ for de terrestriske voksenstadier varierer mellem arter af vandinsekter, og følsomheden hos voksendyr over for de to insekticider fulgte ikke samme rækkefølge (Tabel 2). Hvis man tager højde for forskellene i dyrenes vægt, skal der mere end 50 gange så meget lambda-cyhalothrin og 200 gange så meget imidacloprid til at slå den mindst følsomme art ihjel sammenlignet med den mest følsomme.

TABEL 2. Sammenfattet oversigt over LD₅₀-værdier hos de testede voksenstadier af vandlevende insekter målt som indhold af aktivstoffet i de to sprøjtemidler Confidor (imidacloprid) og Karate (lambda-cyhalothrin).

Art	LD ₅₀ – Confidor (imidacloprid)		LD ₅₀ – Karate (lambda-cyhalothrin)	
	µg a.s./individ	µg a.s./g tørvægt	µg a.s./individ	µg a.s./g tørvægt
<i>E. danica</i>	0,1	10	0,006	0,5
<i>L. fusca</i>	0,01	18	0,0001	0,2
<i>N. cinerea</i>	0,001	1	0,00003	0,02
<i>A. ochripes</i>	0,006	12	0,000008	0,02
<i>H. angustipennis</i>	0,007	1,5	0,0004	0,1
<i>A. nervosa</i>	0,002	0,09	0,0002	0,009

Rangordning

Det er endvidere vist, at følsomheden for Karate (lambda-cyhalothrin) hos voksendyr ikke følger samme rækkefølge som hos juvenile (Tabel 3). For Confidor (imidacloprid) har vi ikke fundet data på følsomhed af juvenile stadier for de arter, vi har arbejdet med. Resultaterne peger på, at det på baggrund af standard toksicitetstest på juvenile dyr ikke er muligt at forudsige følsomheden hos voksendyr.

TABEL 3. . Rangordning af følsomheden målt som akut dødelighed for adulte og juvenile stadier af de seks arter af vandløbsinsekter for insekticiderne Karate (lambda-cyhalothrin) og Confidor (imidacloprid). Rang 1: mest følsom.

Art	Karate			Confidor	
	Rang, adulte		Rang, juvenile ¹	Rang, adulte	
	Dosis	Dosis pr. tørvægt	Koncentration i vand	Dosis	Dosis pr. tørvægt
<i>E. danica</i>	6	6	4	6	4
<i>L. fusca</i>	3	5	3	5	6
<i>N. cinerea</i>	2	3	2	1	2
<i>A. ochripes</i>	1	2	(1) <i>A. fuscipes</i>	3	5
<i>H. angustipennis</i>	5	4	6	4	3
<i>A. nervosa</i>	4	1	- (ikke testet)	2	1

¹ Wiberg-Larsen et al 2016

Adfærdsforsøg

Undersøgelserne af påvirkning af vårfluen *Agapetus ochripes*, der ikke indtager føde som voksen og derfor udelukkende blev eksponeret topikalt, viste, at der var signifikante effekter af subletale doser af både Confidor og Karate på parringsadfærd og reproduktiv succes målt som æglægning. I øvrigt viste undersøgelsen også, at doser, der på baggrund af den korte eksponeringstid ved akut test antages at være subletale, medførte signifikant højere dødelighed hos eksponerede dyr sammenlignet med kontroldyr.

Forsøgene med eksponering via fødeindtag af slørvingen *Leuctra fusca* gav særlige udfordringer, idet dyrene kun indtager føde (alger), såfremt de er fasthæftet til underlaget (grene), og dermed var det vanskeligt at kende fødemængden og doseringen. Eksponerede dyr døde meget kort efter fødeindtagelsen. Da klækning af dyrene var meget uregelmæssig, var det ikke muligt at gennemføre yderligere test. Vi har derfor ikke mulighed for at drage anden konklusion, end at eksponering via fødeindtag også bør tages i betragtning ved yderligere undersøgelser. Der udestår desuden fortsat metodemæssige udfordringer i forbindelse med denne eksponeringsvej.

Flyvetider og sprøjtetidspunkt

Data for flyvetider for 76 arter af vandinsekter med landlevende voksenstadier og sprøjtetidspunkter viser, at der er en høj grad af sammenfald mellem det tidsrum, hvor mange voksne dyr har deres maksimale forekomst, og det tidsrum, hvor der anvendes flest insekticider. Dette sammenfald peger på, at eksponeringen af voksenstadiet er relevant og en problemstilling, som ikke er dækket af den nuværende risikohåndtering af akvatiske insekter, som udelukkende sigter mod at reducere kritiske koncentrationer af pesticider i vandmiljøet.

Risikomodel

Der er udarbejdet en model, der samler risikofaktorer omkring voksenstadiernes flyvetid, spredning og fødesøgning, dets følsomhed over for et aktivstof og sprøjtetidspunkt. Risikomodellen estimerer forholdet mellem en mulig eksponering og artens følsomhed for denne eksponering. Dette bygger på samme grundlæggende princip, som det der anvendes i risikovurderingen af kemikalier. Værdier omkring 1 og derover indikerer en risiko for påvirkning, mens en værdi under 1 indikerer en mindre risiko. Meget lave værdier indikerer lille eller slet ingen risiko for påvirkning. Påvirkningen beregnes ud fra: (1) Følsomhed for det pågældende sprøjtemiddel; (2) Den fysiske størrelse af dyret; (3) Sandsynligheden for at dyret opholder sig, hvor det kan eksponeres fra sprøjtning; (4) Sandsynligheden for at dyret flyver på det tidspunkt, der sprøjtes.

2. Summary

Many taxonomic groups of freshwater insects, such as caddisflies, stoneflies, mayflies, dragonflies and damselflies, have a reproductive terrestrial life stage. Some of these are known to be extremely sensitive to insecticides in the aquatic environment. However, their sensitivity during the terrestrial adult stage, when they also reproduce, is literally unknown. Consequently, it is also unknown to which extent they are exposed to pesticides during the adult stage and what effects this may have on population size and structure, both in the short and long term. So far, risk assessment and management have only focused on avoiding risks to insect macroinvertebrates in the aquatic environment, and exposure during the terrestrial stage has been completely neglected. Possible cascading effects on food webs, including effects on fish and birds, also lack in the risk assessment, regardless of whether these result from pesticide remnants in exposed food or from reduced food sources.

The main objective of the present pilot project has been to investigate whether adult stages of aquatic insects are sensitive to two insecticides tested in the lab and, if so, to calculate to what extent realistic exposure may lead to population level effects. The project does not include any field measurements or investigations of cascade effects on food webs.

For the purpose of investigations, we chose to study the effects of two insecticides on the terrestrial stage of six aquatic insects. The two insecticides were Karate and Confidor, with the active ingredients lambda-cyhalothrin and imidacloprid, respectively. Listed in Table 4 are the species we succeeded doing experiments with. Table 4 also gives a summary of experiments carried out.

TABLE 4. Overview of test animals and experiments carried out. A test of effects on the behavior of *Leuctra fusca* was abandoned because of difficulties with exposure through feed; this is indicated by (x).

Species	Group	Acute effects lambda-cyhalo- thrin (Karate)	Acute effects Imidacloprid (Confidor)	Effects on behav- iour and repro- duction Karate & Confidor
Agapetus ochripes	Caddisflies	x	x	x
Ephemera danica	Mayflies	x	x	
Hydropsyche angu- stipennis	Caddisflies	x	x	
Leuctra fusca	Stoneflies	x	x	(x)
Nemoura cinerea	Stoneflies	x	x	
Anabolia nervosa	Caddisflies	x	x	

2.1 Main conclusions

Acute toxicity test

The pilot project has shown that LD₅₀ for the adult terrestrial stages varies between species of aquatic insects (Table 5). Taking into account the differences in the weight of the animals, it takes more than 50 times as much lambda cyhalothrin and 200 times as much imidacloprid to kill the least sensitive species as compared to the most sensitive.

TABLE 5. Overview of LD₅₀-for the adult stages of species tested measured per animal and on dry weight basis for the active ingredients of Confidor (imidacloprid) and Karate (lambda-cyhalothrin).

Art	LD ₅₀ - Imidacloprid		LD ₅₀ - Lambda-cyhalothrin	
	µg a.i./animal	µg a.i./g dry weight	µg a.i./animal	µg a.i./g dry weight
<i>E. danica</i>	0.1	10	0.006	0.5
<i>L. fusca</i>	0.01	18	0.0001	0.2
<i>N. cinerea</i>	0.001	1	0.00003	0.02
<i>A. ochripes</i>	0.006	12	0.000008	0.02
<i>H. angustipennis</i>	0.007	1.5	0.0004	0.1
<i>A. nervosa</i>	0.002	0.09	0.0002	0.009

Ranking

Ranking of the sensitivity of adults to lambda-cyhalothrin was different from the ranking of juveniles (Table 6). The ranking of the sensitivity of the adults was also different between the two insecticides (Table 6). These observations indicate that the sensitivity of the adults cannot be predicted from the sensitivity of the juveniles, and that the sensitivity of a species to a specific insecticide cannot be predicted from its sensitivity to another insecticide (Table 6)

TABLE 6. Ranking of the sensitivity of the test animals to Karate (lambda-cyhalothrin) and Confidor (imidacloprid). For lambda-cyhalothrin, juvenile sensitivity is included based on a literature search. Rank 1 = most sensitive.

Species	Karate			Confidor	
	Rank, adults		Rank, juveniles	Rank, adults	
	Dose/ind	Dose per dw	Concentration H ₂ O	Dose/ind	Dose per dw
<i>E. danica</i>	6	6	4	6	4
<i>L. fusca</i>	3	5	3	5	6
<i>N. cinerea</i>	2	3	2	1	2
<i>A. ochripes</i>	1	2	(1) <i>A. fuscipes</i>	3	5
<i>H. angustipennis</i>	5	4	6	4	3
<i>A. nervosa</i>	4	1	- (not tested)	2	1

Effects on behaviour and reproduction

Sublethal tests applying topical exposure with the caddisfly *Agapetus ochripes*, a species with a short-lived adult stage (1 week) that does not feed as adult, showed significant effects of both insecticides on behavior and reproduction. The sublethal doses applied were shown to be lethal compared to non-exposed control animals when the testing time was longer than the 24 hours used in the acute test.

Feeding experiments with the stone fly *Leuctra fusca* failed because the insects would not feed on the algae scraped off the branches. They would only feed on algae directly from the

branches, but this meant that we could not control the dose received. Before we solved this problem, we ran out of animals. Therefore, the conclusion is that problems remain to be solved before it is possible to perform tests including exposure through food.

Flight period and time of spraying

Combining flight periods of 76 aquatic species with the time of insecticide spraying showed a high degree of coincidence between flight period and spraying. This indicates that there may be a risk to aquatic insects in the adult stage, a risk that is not covered by current guidelines for risk assessment of aquatic insects.

Risk model

A model that predicts the risk of insecticide exposure in terrestrial stages of aquatic insects was developed. The model combines information on flight period, timing of insecticide application and sensitivity to insecticides into a risk factor. If this risk factor is 1 or above, then the species is at risk. Higher values mean higher risk, lower values lower risk.

3. Baggrund og formål

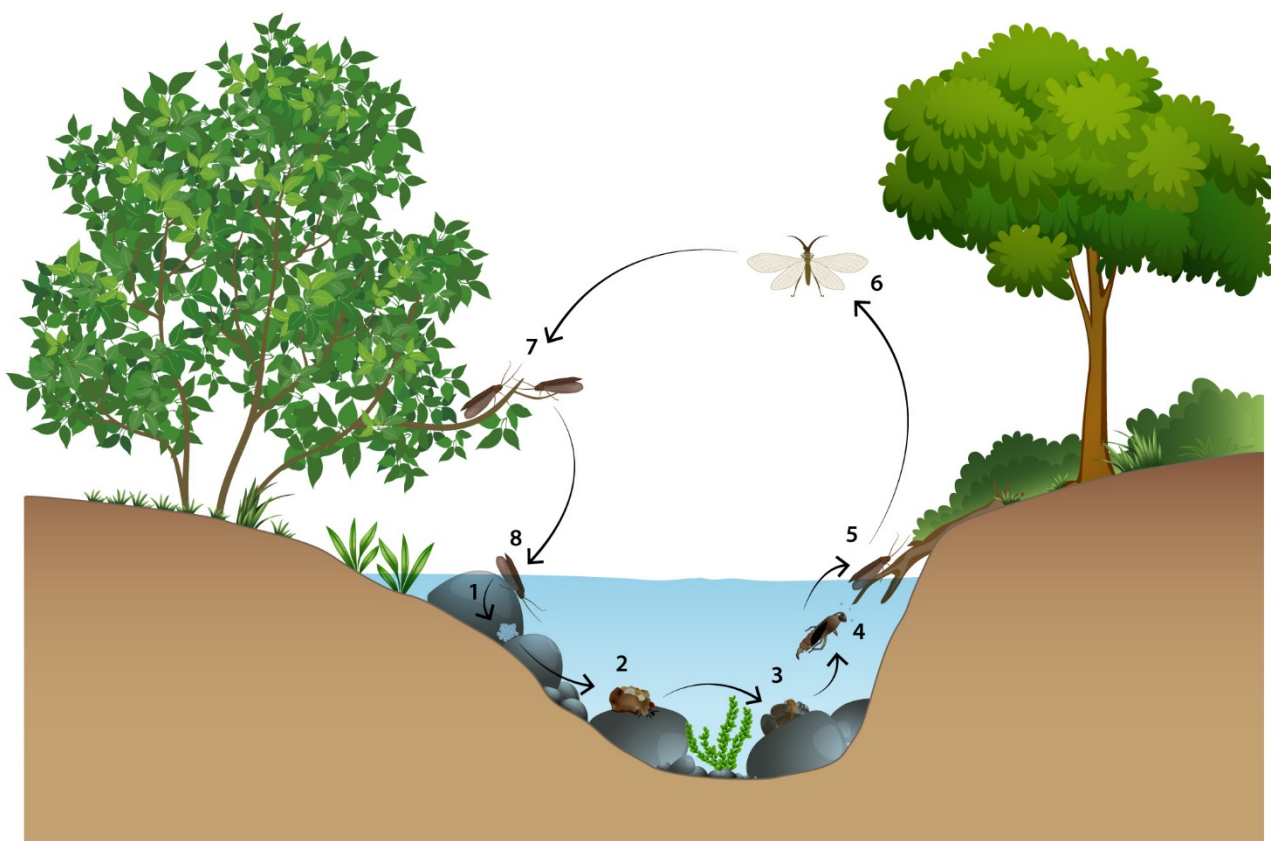
Vandløb spiller en central rolle i naturen, dels som levested for en stor del af den samlede biologiske mangfoldighed, dels som transportør af vand og uorganiske/organiske stoffer til søer, havet og tilstødende arealer. De er som økosystemer energimæssigt drevet af egen produktion via alger, mosser og højere vandplanter, men modtager også et væsentligt tilskud af dødt organisk stof fra omgivelserne (bl.a. døde blade og dødt ved). Omsætningen af dette stof sker via såkaldte græssere og nedbrydere, hvoriblandt invertebrater indtager en central rolle, samtidig med at de er den vigtigste fødekilde for fisk. Blandt invertebraterne er insekterne mht. artsantal den helt dominerende gruppe, med vårflyer og tovinger som særligt artsrige ordener. Med en stor artsrigdom samt økologisk/funktionel diversitet er invertebraterne og ikke mindst insekterne egnede som indikatorer for menneskeskabte påvirkninger, såsom forurening med husholdningsspildevand (Skriver et al. 2000, Friberg et al. 2010), ødelæggelse af de naturlige hydromorfologiske forhold (Extence et al. 1999, Wiberg-Larsen et al. 2010) samt tilførsel af giftige stoffer som pesticider (Liess & von der Ohe 2005, Schäfer et al. 2007, Liess et al. 2008).

Globalt set bliver pesticider og andre giftstoffer betragtet som én af de tre mest betydende årsager (sammen med klimaforandringer og habitatødelæggelse) til den globale biodiversitetskrise (Schwarzenbach et al., 2006, Köhler & Triebkorn, 2013). Dette afspejles også i en eksponentiel stigning i antallet af forskningsartikler, der omhandler økologiske effekter af de forventeligt mest toksiske stoffer for eksempelvis pollinatorer og akvatiske insekter (Köhler & Triebkorn, 2013).

Nyere internationale undersøgelser har desuden dokumenteret, at samfundsstruktur og biodiversitet af makroinvertebrater i vandløb påvirkes signifikant ved pesticidkoncentrationer, der er flere størrelsesordener under de koncentrationer, der giver effekter i meso- og mikrokosmosforsøg (Schäfer et al. 2012, Beketov et al. 2013). Denne store følsomhed i naturlige vandløb afspejler formentlig, at vandløb ud over pesticider ofte er påvirket af andre samtidigt virkende stressorer i form af mange årtiers kontinuerlige menneskeskabte påvirkninger og sparsomme muligheder for rekolonisering.

3.1 Akvatisk risikovurdering af pesticider

Risikovurdering af pesticider for det akvatiske miljø er baseret på korttidsforsøg med enkeltstoffer på dafnier, alger og fisk. For de mest toksiske stoffer suppleres disse med længerevarende forsøg, der integrerer subletale parametre (fx vækst og reproduktion) og evt. yderligere forsøgsorganismer. Fælles for alle forsøg, der indgår i den akvatiske risikovurdering, er, at eksponeringen med pesticider foregår i vand eller bundsediment og udelukkende på organismernes vandlevende stadier. Akvatiske organismer, der i løbet af deres livscyklus skifter miljø, og som risikerer eksponering af pesticider i begge miljøer (fx akvatiske insekter med terrestriske voksenstadier, Figur 1), er derfor ufuldstændigt dækket af de test, der danner grundlaget for den nuværende risikovurdering. Der eksisterer kun ganske få internationale undersøgelser, der indeholder effektparametre målt på voksenstadier af vandløbsinsekter (fx Schulz & Liess 2001), og disse følger hovedsageligt det traditionelle scenarium med eksponering af dyrenes vandlevende larve- eller nymfestadier. Der er imidlertid begyndende fokus på at integrere en livscyklusmæssig holistisk tilgang i økotoksikologisk forskning og risikovurdering (Nienstedt et al. 2012). Denne tilgang er netop det centrale fokus for nærværende projekt.



FIGUR 1. Akvatiske insekters livscyklus (skematisk og generaliseret)

3.2 Dokumenteret effekt af pesticider på voksne vand(løbs)insekter

Der eksisterer kun få undersøgelser af voksne vandinsekters følsomhed over for insekticider, og disse omfatter udelukkende arter fra damme: sygdomsbærende stikmyg (Ludvik 1953, Jeffery 1956, Georgiou & Metcalf 1961) og "non-target"-arter som vandnymfen *Ischnura verticalis* (Estenik & Federle 1974) og vandkæren *Hydrophilus sp.* (Siegfried 1993). Dertil kommer undersøgelser udført med henblik på effektiv bekæmpelse af eksempelvis *Hydropsyche*-arter (vårfluer), som historisk har optrådt i direkte generende mængder langs store floder, som gennemstrømmer storbyer (Peterson 1952, Fremling 1960). Disse undersøgelser beror på for Europa uaktuelle insekticider (fx DDT) og belyser kun arternes følsomhed under forhold, som ikke er sammenlignelige med, hvad voksne vandløbsinsekter udsættes for i forbindelse med marksprøjtning. Den aktuelle viden før dette projekt om voksne vandløbsinsekters følsomhed over for insekticider er derfor stort set ikke-eksisterende.

3.3 Eksponeringsscenarier af insekticider for voksne vandløbsinsekter

Det er en rimelig antagelse, at voksne vandløbsinsekter, som optræder på land i de perioder, hvor der sprøjtes med insekticider på marker langs vandløb, er i risiko for at blive påvirket. Når de bevæger sig bort fra vandløbene i forbindelse med fødesøgning og/eller parring, kan de blive eksponeret for insekticider. Selvom de voksne vandinsekter ikke dør som følge af denne kontakt, kan negative effekter på deres fødesøgning, sværmning, parring, spredning og æglægning, og dermed på populationer, ikke udelukkes, da sådanne effekter er set for andre insekter (fx Blacquiere et al. 2012, Whitehorn et al. 2012). Påvirkningen af de voksne vil i givet

fald – afhængigt af hvor langt de fjerner sig fra vandløbene - finde sted inden for den "sprøjte-frie" zone (som fremgår af sikkerhedsforskrifterne for det enkelte middel) og/eller på selve de sprøjtede marker. Risikoen for påvirkning afhænger af en lang række faktorer:

- timing af voksenstadiet (dvs. deres flyveperiode),
- levetid i det terrestriske miljø,
- hvorvidt der indtages føde og i så fald hvilken,
- hvor langt de voksne spredes bort fra vandløbene (og hvordan vegetationen ser ud her),
- adfærd i forhold til fx fødesøgning,
- parringsadfærd, spredning og æglægning,
- insekticidfølsomheden hos de voksne vandinsekter.

Voksenstadiet er for vandinsekter helt afgørende for formering og grundlæggelse af næste generation. Desuden er voksenstadiet vigtigt for arternes mulighed for at kunne kolonisere nye levesteder eller opretholde betydende metapopulationer, hvilket ligeledes kan være afgørende for en arts fortsatte overlevelse (Sand-Jensen 2013). Viden om de ovennævnte forhold af betydning for den potentielle eksponering for insekticider er gennemgået i det følgende.

Voksne vandinsekter forekommer fra januar til december, men tidspunkt og længde af den såkaldte flyveperiode – dvs. den periode, hvor de voksne af en given art optræder - varierer betydeligt fra art til art. Nogle arter af døgnfluer og vårflyer har korte synkroniserede flyveperioder (få dage eller uger), mens flyveperioden hos andre arter af vårflyer kan strække sig over flere måneder (Wiberg-Larsen 2004).

Varigheden af det terrestriske livsstadie, som er væsentlig kortere end flyveperioden, varierer ligeledes meget imellem de enkelte arter fra få timer (visse døgnfluer) til 4-6 måneder (visse vårflyer) (se Bilag 1).

Varigheden af det terrestriske voksenstadie er afhængig af, om dyrene indtager føde. For eksempel har voksenstadiet af de meget kort-levende døgnfluer intet tarmsystem og indtager derfor hverken vand eller føde, mens slørvinger, guldsmede, vårflyer og tovinger (fx kvægmyg) med længere levende terrestriske voksenstadier indtager føde, hvilket har betydning for opnåelse af maksimal frugtbarhed (Crichton 1957, Beer-Stiller & Zwick 1995, Armitage 1995).

Langt hovedparten af voksne slørvinger og vårflyer vil befinde sig inden for en snæver vandløbsnær zone (Figur 2) på 20-30 m (Collier & Smith 1998, Petersen et al. 2004), der endog kan være endnu smallere (Sode & Wiberg-Larsen 1993, Petersen et al. 2004, Winterbourn 2005, Wiberg-Larsen 2006), og generelt aftager individtætheden hos en art eksponentielt med stigende afstand til vandløbet (Mendl & Müller 1974, Kovats et al. 1996, Stettmer 1996, Conrad et al. 1999, Briers et al. 2004). Arter blandt ægte guldsmede og tovinger (fx kvægmyg) hører til blandt de mest mobile vandløbsinsekter og følger ikke nødvendigvis samme mønster som slørvinger og vårflyer. Strukturen af den vandløbsnære zone har derudover en væsentlig økologisk betydning for de voksne insekter som spredningsvej (Petersen et al. 2004), skjul og egnet mikroklima (Jackson 1986, Chen et al. 1993, Smith & Collier 2000), sværmesteder og fødemuligheder (Sweeny 1993, Smith & Collier 2000). Det må således antages at være af væsentlig betydning, i hvilket omfang komponenter som træer, buske, høje urter, græsset vegetation og afgrøder indgår i den sprøjtefri zone. Der er dog meget lidt konkret viden om disse forhold.



FIGUR 2. Den ripariske zone, eller den vandløbsnære zone, som udgør overgangen mellem vandløbet og omgivelserne, som ofte er opdyrkede mark.

Indtagelse af føde har ud over indflydelsen på livslængde også betydning for reproduktionen. Fødeindtagelse bidrager derved til en ekstra "eksponeringsvej" for insekticider, fx via pesticider i blomsters nektar, honningdug eller alge og lichenvækst på overfladen af træer. Der foreligger imidlertid ingen undersøgelser, der belyser betydningen af dette for voksne vandinsekter, men for terrestriske insekter kan eksponering via føden have betydelige effekter (fx Gill et al 2012) og endog være den vigtigste eksponeringsvej (Mommaerts & Smagghe 2011). Således adresserer guidelines for test af pesticiders giftighed for bier eksempelvis både oral (optagelse gennem munden) og topikal (direkte kontakt) eksponering (OECD 1998a,b).

Det må formodes, at forskellige arter af voksne vandløbsinsekter har forskellig følsomhed over for insekticider, ligesom det er tilfældet for deres akvatiske stadier (Wiberg-Larsen et al. 2013a), men der er ingen viden herom. De akvatiske stadier søges beskyttet af de differentierede afstandskrav, sprøjtefrie zoner langs vandløb og søer, som baserer sig på viden om stoffernes giftighed samt deres spredning til vandløbene ved afdrift (Rautmann et al. 2001). Afdriften til de habitater langs vandløbene, hvor de voksne stadier af vandløbsinsekterne færdes, vil bl.a. afhænge af vegetationens højde og struktur, fx om der er en bræmme træer eller høje urter af varierende bredde nærmest vandløbet og en bræmme af usprøjtede afgrøder fjernest dette (fx Bruus et al 2008, de Snoo & de Wit 1998).

Under alle omstændigheder må insekter, der færdes i randzonerne mellem marker og vandløb, forventes at være i risiko for at blive eksponeret med lave, men formentlig ikke ubetydelige pesticidkoncentrationer. Til illustration af dette har Schmitz et al. (2013, 2014) rapporteret eksponeringer for markkanter med kornafgrøder som 30% af markdosis umiddelbart uden for marken, 76 cm væk fra markkanten er eksponeringen 15% af markdosis, 1 m fra markkanten er eksponeringen 2,8% af markdosis. Anbefalede doser for lambda-cyhalothrin varierer mellem 7 og 15 g/ha. Dette svarer med en antagelse om en eksponering på 2,5% af markdosis til en afsætning på 0.002 – 0.004 µg a.s./cm². Overfladearealet af majflue *Ephemera danica* er cirka 1,3 cm², og dens tørvægt er cirka 12 mg. Under antagelse af at afdrift af sprøjtemiddel rammer kropsoverfladen ensartet, betyder det, at én voksen majflue modtager en dosis på 0,005 µg a.s. Dette svarer igen til 0,4 µg a.s./g. Der er her set bort fra eksponering via vinger og ben. Derudover kan nogle arter af voksne vandløbsinsekter forventes at bevæge sig ind i markerne, hvor pesticideksponeringen selvsagt vil være væsentligt højere.

3.4 Formål

Baseret på ovenstående er det formålet at undersøge følgende hypoteser:

1. Følsomheden over for insekticider hos voksne vandløbsinsekter varierer (kan rangordnes), og variationen er den samme som for arternes akvatiske stadier.
2. Ikke-dødelige doser kan via direkte (topikal) eksponering medføre væsentlige effekter på de voksne vandinsekters reproduktion.
3. Indtagelse af pesticideksponeret føde medfører væsentlige effekter på voksne vandinsekter, og arter med fødesøgning i det voksne stadium har derfor ekstra høj risiko for pesticidpåvirkning.
4. En væsentlig del af vandløbsinsekterne er – set i forhold til biodiversitet eller funktionel betydning i vandløbsøkosystemerne – potentielt i risiko for at blive alvorligt påvirket af insekticider i forbindelse med marksprøjtning og efterfølgende vinddrift.

3.5 Valg af insekticider

De valgte insekticider til forsøgene er Confidor, som indeholder aktivstoffet imidacloprid, og Karate, som indeholder aktivstoffet lambda-cyhalothrin.

Imidacloprid er et neonikotinoid, som igen er en videreudvikling af nikotin, der er et naturligt stof, som blandt andet dannes i tobaksplanten *Nicotiana virginiana*. Begrundelsen for valget af et middel, der indeholder neonikotinoidet imidacloprid, er dels, at neonikotinoider er blandt de mest brugte insekticider på verdensplan, dels den debat der er om brugen af dem, hvor nogle mener, at de er medvirkende årsag til den globale tilbagegang for insekter.

Lambda-cyhalothrin er et pyrethroid, som igen er en videreudvikling af pyrethrin, der er et naturligt stof, som kan udvindes fra to arter af krysantemum - rosenkrave og ægte pyrethrum. Begrundelsen for valget af et middel, der indeholder et pyrethroid, i det her tilfælde lambda-cyhalothrin, er dels, at der er et stort kendskab til stoffets virkning på de juvenile vandinsekter, dels at pyrethroiderne er blandt de mest anvendte pesticider globalt set.

4. Følsomheden for insekticider hos voksne vandløbsinsekter – akutte test

4.1 Materiale og metode

Det overordnede princip for alle arter var at eksponere nyklækkede voksne dyr topikalt ved at applikere en 1 µl dråbe på thorax, hvorefter dødeligheden blev opgjort. Der blev først kørt range-findingtest med 5 dyr i hver beholder (petriskål eller lakglas, alt efter størrelse), bortset fra *Ephemera danica*, som pga. af sin betydelige størrelse og skrøbelighed blev undersøgt med 1 dyr i hvert glas. Derefter blev de egentlige test udført, med 1 dyr pr. glas/petriskål. Ideelt set ville vi teste lige mange hunner og hanner, men i de fleste tilfælde var der ikke nok dyr til at gennemføre dette. Alle forsøgsdyr, der skulle klækkes, blev opbevaret i klimarum ved 15 °C og 16 t lys/8 t mørke i testperioden (dog justeret til 12 t lys/12 t for de arter som først klækkede omkring september). Disse dyr placeredes i 25 liters plastikkasser med rigelig be-luftning. Dyr indsamlet som voksne blev placeret i køleskab (4 °C og mørkt), indtil de blev an-vendt i testene.

For at kunne sammenligne følsomheden på vægtbasis blev udvalgte individer tørret ved 60 °C og vejjet. Hvor det var muligt, blev tørvægt for hhv. hanner og hunner bestemt, idet der for nogle af arterne er store størrelsesforskelle.

Det var nødvendigt at foretage en del ændringer i artsvalg mv. i forhold til den oprindelige plan pga. problemer med indfangning eller klækning.

Alle pesticiddoser blev beregnet ud fra indholdet af aktivstofferne i hhv. Karate 2,5 WG (Syn-genta Nordics A/S, 25 g lambda-cyhalothrin pr. kg) og Confidor WG 50 (Bayer CropScience, 700 g imidacloprid pr. kg). De anvendte pesticiddoseringer i de egentlige test blev baseret på resultaterne af range-findingtestene. Alle Karate-opløsninger indeholdt 10 % for at optimere opløseligheden, mens Confidor-opløsningerne blev lavet i rent vand. De anvendte doser er vist i Tabel 8.

TABEL 7. Liste over planlagte forsøgsarter og endeligt valg af arter.

Art	Akut toksicitet	Adfærdsforsøg	Fødeoptagelse	Kommentar
Ephemera danica (DØGNFLUE)	Gennemført	Ikke mulig at undersøge realistisk under laboratorieforhold	Nej	Alternativ til Prodiamesa olivacea, som ikke kunne fremskaffes til forsøg
Leuctra fusca (SLØRVINGE)	Delvist gennemført: Reduceret test med Karate og Confidor	Kun delvist gennemført pga. for få dyr mv.	Ja	Supplement til forsøg med Nemoura cinerea
Nemoura cinerea (SLØRVINGE)	Delvist gennemført: Akut test med Karate	Ikke mulig pga. for få forsøgsdyr	Ja	Der blev ikke fået dyr nok til at gennemføre test med Confidor
Isoperla grammatica (SLØRVINGE)	Delvist gennemført: Range-finding med Confidor	Ikke mulig pga. for få forsøgsdyr	Muligvis	For langstrakt klækning til at få dyr nok til alle forsøg
Agapetus fuscipes (VÅRFLUE)	Ikke gennemført		Nej	Opgivet pga. manglende lokaliteter med stor bestandstæthed
Agapetus ochripes (VÅRFLUE)	Gennemført	Gennemført	Nej	Erstatning for Agapetus fuscipes
Hydropsyche angustipennis (VÅRFLUE)	Gennemført	Ikke planlagt	Ja	Indsamling af formodet nyklækkede voksne (ikke som planlagt klækning af pupper)
Tinodes waeneri (VÅRFLUE)	Fravalgt		Ja	Opgivet af logistiske årsager; erstatet med A. nervosa
Anabolia nervosa (VÅRFLUE)	Gennemført	Ikke mulig pga. for få forsøgsdyr	Ja	Indsamling af larver til klækning suppleret med indsamling af voksne
Prodiamesa olivacea (DANSEMYG)	Opgivet		Nej	Der var ikke muligt at fremskaffe det nødvendige antal dyr. Arten blev erstatet med Ephemera danica

Ephemera danica (majflue), døgnflue



Foto: Fugle og Natur, Ulf Bjerre

Sammen med *E. vulgata*, vores største døgnflue (kropslængde 18-22 mm). Nymfen lever i mellemstore-store vandløb nedgravet i sandet-siltet bund. Væksten tager 2-3 år indtil klækning som voksen. Har to voksenstadier: subimago og imago. De voksnes samlede levetid er kun 2-3 dage. Som andre døgnfluer mangler arten helt tarmsystem. Voksne hanner sværmer i 10-15m's højde i nærheden af vandløbet for at tiltrække hunnerne, som gribes og fastholdes under den efterfølgende parring med de lange forben (se foto). Efter parring lægger hunnerne straks æg (op til 8000) på vandoverfladen.

Store nymfer (med tydelige mørke vingedækker som tegn på at de var klar til klækning) blev indsamlet 24/5 2016 i Gudenåen v. Klostermøllevej. Der blev anvendt standard-sparkeketsjer, og egnede nymfer blev forsigtigt overført til kølekasser med egnet sediment, vand fra vandløbet og beluftning. De indsamlede dyr (ca. 730 individer) blev inden for ½ time transporteret nedkølet og placeret i klimarum i standard plastkasser med beluftning og overdækning med "insektnet". Klækkede voksne individer blev opsamlet kontinuert og overført til beholdere i klimarummet med henblik på de efterfølgende toksicitetsforsøg. Kun individer i det afsluttende imago-stadium blev anvendt til forsøgene.

Testene med Karate og Confidor blev udført i to omgange for at udnytte antallet af dyr bedst muligt (Tabel 8). Efter eksponering blev dyrene placeret i lakglas og ikke i petriskåle pga. deres størrelse (og fordi de holder de store vinger i lodret position). Dødeligheden blev opgjort 2, 4, og 24 timer efter eksponering. På grund af denne arts korte liv som voksen, blev dødeligheden ikke opgjort efter 48 timer.

TABEL 8. . Anvendte doser, antal replikater pr. dosis og antal dyr pr. replikat i testene af den akut dødelige virkning af insekticiderne Karate og Confidor.

Pesticid	Art	Forsøg	Nominelle doser, µg a.s./individ	Replikater pr. dosis
Karate	<i>E. danica</i>	1	0 - 0,00001 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1	5
		2	0 - 0,00001 - 0,0001 - 0,001 - 0,01 - 0,1	5
	<i>L. fusca</i>	1	0 - 0,00001 - 0,0001 - 0,001 - 0,01	2
	<i>N. cinerea</i>	1	0 - 0,00001 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01	10

Confidor	<i>A. ochripes</i>	1	0 - 0,000005 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,005 - 0,01	10
		2	0 - 0,000001 - 0,00001 - 0,001	10
	<i>H. angustipennis</i>	1	0 - 0,00001 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1	10
	<i>A. nervosa</i>	1	0 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1	5
	<i>E. danica</i>	1	0 - 0,00001 - 0,00005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1 - 2	5
		2	0-0,0001-0,0005- 0,001-0,005-0,01- 0,05-0,1-1-2	5
	<i>L. fusca</i>	1	0 - 0,001 - 0,01 - 0,1 - 1,0	1 (2 kontroller)
		2	0 - 0,0001 - 0,001 - 0,01 - 0,1	1 (2 kontroller)
		3	0 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1	1
	<i>N. cinerea</i>	1	0 - 0,00001 - 0,001 - 1	1
	<i>I. grammacus</i>	1	0 - 0,0001 - 0,001 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1	1
	<i>A. ochripes</i>	1	0 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1 - 2	10
	<i>H. angustipennis</i>	1	0 - 0,00001 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1	10
	<i>A. nervosa</i>	1	0 - 0,00001 - 0,00005 - 0,0001 - 0,0005 - 0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1	5

Leuctra fusca, slørvinge

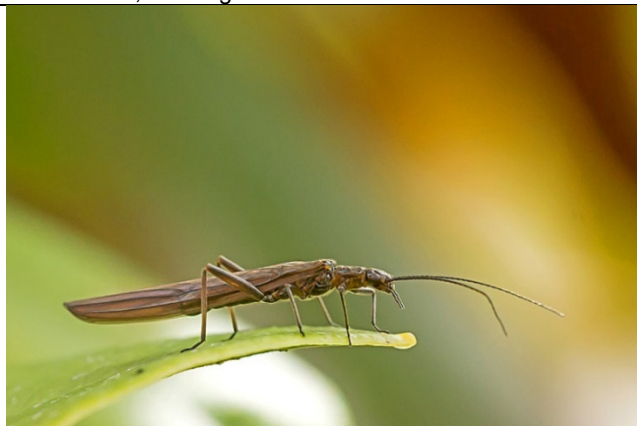


Foto: Fugle og Natur

Kropslængde 5-8 mm. Nymfen findes i større og mindre vandløb, typisk på stenet-gruset bund. Én-årig livscyklus. Voksne lever formodentlig 2-3 uger. Indtager føde i form af alger på grene, samt formodentlig fint detritus/svampehyfer. Hanner og hunner kommunikerer via bankesignaler ifm. parring. Æggene (ca. 600) lægges på vandoverfladen.

Nymfer blev indsamlet fra Kongshøj Å, Lundebro, 1/9 2016. Der blev anvendt standard-sparkeketsjer, og egnede nymfer blev forsigtigt overført til kølekasser med egnet sediment, ganske lidt vand fra vandløbet og diverse groft detritus og vandplantedele beregnet som gemmesteder. Der blev ikke beluftet, men dyrene blot holdt fugtige. De indsamlede dyr (ca. 1200 individer) blev inden for 2 timer transporteret nedkølet og placeret i klimarum i standard plastkasser med beluftning og overdækning med "insektnet". Klækkede voksne individer blev opsamlet kontinuert og overført til beholdere i klimarummet med henblik på de efterfølgende toksicitetsforsøg. Det lykkedes kun at opnå klækning af få voksne individer, hvorfor der kun blev gennemført begrænsede forsøg.

Idet det ikke lykkedes at indsamle dyr nok til at gennemføre både range-finding og de fulde test, blev der udført en range-finding test med Karate (lambda-cyhalothrin) (Tabel 8). De eksponerede dyr blev placeret i en petriskål med fugtigt filterpapir. Dødeligheden blev opgjort efter 1, 24 og 48 timer. Med Confidor (imidacloprid) blev der udført tre runder range-finding med forskellige koncentrations-ranges i et forsøg på at ramme LD₅₀ bedst muligt.

Nemoura cinerea, slørvinge



Foto: Peter Wiberg-Larsen (tv) & Fugle og Natur, Mogens Holmen (th)



Kropslængde 5-11 mm. Nymfen findes i større og mindre vandløb, søer og damme. Én-årig livscyklus. Voksne lever formodentlig 2-3 uger, hvorunder de søger føde i vegetation eller på jordbunden (alger, fint detritus). Hanner og hunner kommunikerer via bankesignaler ifm. parring. Æggene (ca. 1400) lægges på vandoverfladen.

Voksne individer blev indsamlet gennem ca. 2 uger fra i alt 8 Malaise-fælder opstillet ved Sig Grøft (nedstrøms vejen Tørring-Brædstrup) – se foto. Nyklækkede voksne individer blev indsamlet (typisk dagligt) fra fælderne i perioden 17/5-8/6 2016. De blev overført til og opbevaret i frostoposer (og nedkølet) under transport til klimarummet. Der blev generelt ikke opsamlet så mange individer som forventet, ligesom indsamlingen af arten blev vanskeliggjort ved, at der samtidig forekom voksne *Amphinemura standfussi* og *Brachyptera risi*.

Karate (lambda-cyhalothrin) blev testet i 8 doser i 10 replikater med et dyr i hvert (Tabel 8). Mod forventning kunne det ikke lade sig gøre at fange dyr nok til en fuld test med Confidor (imidacloprid), som derfor kun blev testet til range-finding. Efter eksponering blev dyrene placeret i petriskåle med fugtigt filterpapir.

Isoperla grammatica, slørvinge

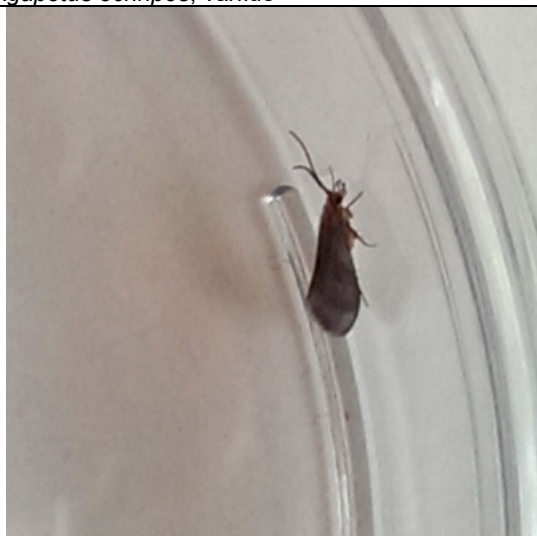


Kropslængde 8-12 mm. Nymfen findes i større og mindre vandløb, typisk på stenet-gruset bund. Én-årig livscyklus. Voksne lever formodentlig 2-3 uger. Levetid kan forlænges ved indtagelse af nektar. Hanner og hunner kommunikerer blandt andet via bankesignaler i forbindelse med parring. Æggene (ca. 150) lægges på vandoverfladen.
Foto: Biopix (med tilladelse)

Nymfer blev indsamlet fra Villestrup Å den 17/5 2016. Der blev anvendt standard-sparkeket-sjer, og egnede nymfer blev forsigtigt overført til kølekasser med egnet sediment, ganske lidt vand fra vandløbet og diverse groft detritus og vandplantedele beregnet som gemmesteder. Der blev ikke beluftet, men dyrene blot holdt fugtige. De indsamlede dyr (ca. 1000 stk.) blev inden for 2 timer transporteret nedkølet og placeret i klimarum i standard plastkasser med beluftning og overdækning med "insektnet". Der blev forsøgt fodret med chironomider (larverne af *Isoperla* er rovdyr). Klækkede voksne individer blev opsamlet kontinuert og overført til beholdere i klimarummet med henblik på de efterfølgende toksicitetsforsøg. Det lykkedes kun at opnå klækning af få voksne individer, hvorfor der kun blev gennemført range-finding med ét insekticid.

Imidacloprid, som Confidor, blev således testet i et replikat per koncentration, med 5 dyr i hvert replikat (Tabel 8). Efter eksponering blev dyrene placeret i petriskåle med fugtigt filterpapir.

Agapetus ochripes, vårflue



Kropslængde 4 mm. Larven findes i større og mindre vandløb, typisk på stenet-gruset bund. Én-årig livscyklus. Voksne lever i mindre end 1 uge og tager ikke føde til sig. Hanner og hunner kommunikerer via bankesignaler ifm. parring. Æggene (ca. 150) lægges på sten under vandoverfladen, idet hunnen kryber/svømmer frem til foretrukne position.
Foto: Claus Hindberg

Forpuppede individer blev indsamlet i Stavis Å (opstrøms for Rugaardsvej) 10/5 2016 (Figur 3). Der blev indsamlet et stort antal sten, hvorpå pupperne var placeret. Sten med pupper placeredes lagvis (på trådhylder) i kølekasser, uden at stenene skurede imod hinanden. Desuden placeredes våde stykker køkkenrulle imellem stenene for at holde sten og pupper fugtige.



FIGUR 3. Indsamling af *Agapetus ochripes* i Stavis Å 10. maj 2016. Foto Beate Strandberg.

Indholdet i kasserne blev holdt afkølet under transport, der tog ca. 2 timer. Sten med pupper blev overført til plastkasser med vand fra Stavis Å (vanddybde 5-10 cm således at flere sten ikke var vanddækket) med beluftning og endelig overdækket med "insektnet" (pyramide-formet overdel, forsynet i toppen med fangstbeholder til opsamling af klækkede voksne, se Figur 4). Kasserne blev stillet i klimarum (15 °C) og iagttaget for klækkede voksne. Klækningen startede omkring 3 uger efter indsamling. Klækkede voksne overførtes til beholdere i klimarummet med henblik på de efterfølgende toksicitetsforsøg (Figur 4)



FIGUR 4. Klækning af *Agapetus ochripes* fra pupper på sten indsamlet i Stavis Å. De nyklækkede vårfluer søger opad mod lyset og kan således "høstes" i de monterede plasticbeholdere vha. sugeflasker (t.h.). Foto: Claus Hindberg.

Confidor, der indeholder aktivstoffet imidacloprid, blev testet i doserne præsenteret i Tabel 8. Karate, der indeholder aktivstoffet lambda-cyhalothrin, blev testet to gange. Efter eksponering blev dyrene placeret i petriskåle med fugtigt filterpapir.

Hydropsyche angustipennis, vårflue



Kropslængde 10 mm. Larven findes i større og mindre vandløb, især sådanne som er afløb fra søer, og typisk på stenet bund. Én-årig livscyklus. Voksne lever i 2-3 uger og tager formodentlig føde til sig i form af nektar. Hannerne sværmer over "markører" i landskabet og tiltrækker derved hunnerne til parring. Æggene (ca. 700) lægges på sten under vandoverfladen, idet hunnen svømmer frem til foretrukne position.

Foto: Henrik Stenholt

Voksne individer blev indsamlet 17-18/5 2016 ved Mattrup Å (Vingum Bro). Der blev dels indsamlet ved brug af batteridrevet lysfælde, dels anvendt ketsjer. De voksne blev forsigtigt anbragt i store frostposer, der placeredes i kølekasser under transport. Poserne blev anbragt i køleskab (4 grader), inden dyrene blev anvendt til forsøg.

Karate (lambda-cyhalothrin) og Confidor (imidacloprid) blev testet i 10 doser hver (Tabel 8). Testene blev udført i 10 replikater med et dyr i hvert; dog blev der kørt ekstra replikater af ueksponerede dyr (kontroller). Efter eksponering blev dyrene placeret i petriskåle med fugtigt filterpapir.

Anabolia nervosa, vårflue



Kropslængde 11-12 mm. Larven findes i større og mindre vandløb samt større søer og damme. Forekommer typisk på sandet bund, og hvor der er ansamlinger af groft detritus. Én-årig livscyklus. Voksne lever i ca. 1 uge og tager gerne føde til sig i form af nektar/honningdug. Hunnerne udsender feromomer, som tiltrækker hannerne. Hannerne ses ofte sværme i forbindelse med træer/buske, formodentlig for at lokalisere hunnerne. Æggene (ca. 100) placeres på planter umiddelbart over vandoverfladen.

Foto: Henrik Stenholt

Der blev indsamlet larver (ca. 1000) fra bredzonen af Rørbæk Sø (sydsiden) den 22/6 2016. Larverne blev placeret i kølekasser med plantemateriale og holdt fugtige og afkølede under transport til klimarummet. Her blev larverne fordelt i standard plastkasser med beluftning, tilførsel af detritus, og overdækning med "insektnet". I september klækkedes de første voksne (som forventet), men alt for få til at dække behovet i de planlagte test. Der blev derfor hhv. 4/10 og 12/10 2016 foretaget supplerende indsamling af voksne individer ved Rørbæk Søes sydside. De voksne individer blev ketsjet fra luften (flyvende) eller nedbanket fra urtevegetation eller træer/buske. De fangne dyr placeredes i frostposer, der blev anbragt i kølekasser med henblik på hjemtransport. Ved hjemkomsten blev individerne anbragt i køleskab indtil anvendelse i testene.

De akutte test blev gennemført med fem replikater af hver koncentration med ét dyr i hver, fordi det ikke lykkedes at fange dyr nok til 10 replikater (Tabel 8). Efter eksponering blev dyrene placeret i petriskåle med fugtigt filterpapir.

4.2 Statistiske analyser

For hver art blev andelen af overlevende dyr efter 24 eller 48 timer analyseret vha. en generaliseret lineær model ud fra en binomialfordeling og logit-linkfunktionen. Effekten af dosis på andelen overlevende blev testet, og de forskellige doser blev sammenlignet med kontrollen vha. parvise test programmeret som kontraster. Dosis-respons-sammenhænge blev beregnet med dosis som regressionsvariabel under antagelse af en sigmoid sammenhæng,

$$P = \frac{e^{(\alpha + \beta \times \text{dosis})}}{1 + e^{(\alpha + \beta \times \text{dosis})}}$$

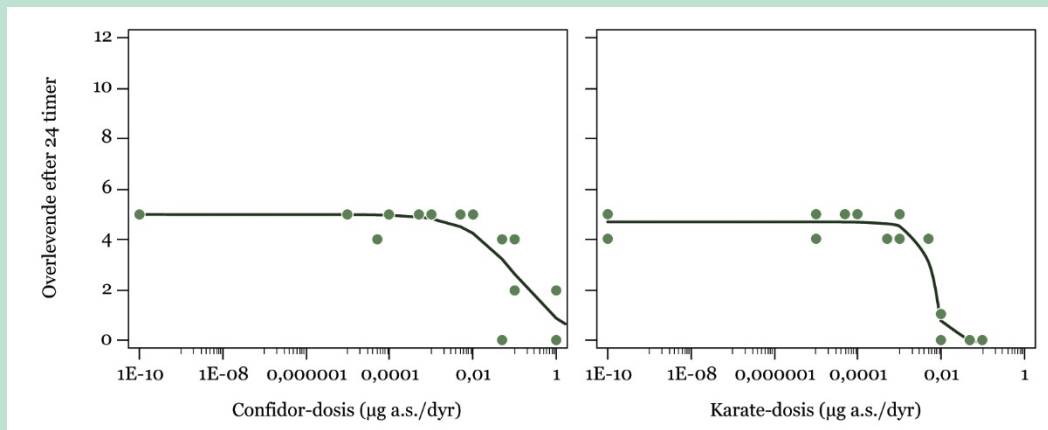
hvor P er sandsynligheden for respons (overlevelse), α er den estimerede skæring med y-aksen, og β er den estimerede hældning fra den tilsvarende generaliserede model, hvor dosis indgår som en regressionsvariabel. I nogle tilfælde beskrev en model baseret på $\log_{10}$ af dosis data bedst.

4.3 Resultater - akut test

I det følgende beskrives effekten af de to insekticider på overlevelsen af de enkelte arter, arternes relative følsomhed rankes. I kapitel 5 sammenlignes de estimerede LD₅₀-værdier med de tilsvarende for de vandlevende ungdomsstadier.

Ephemera danica (majflue)

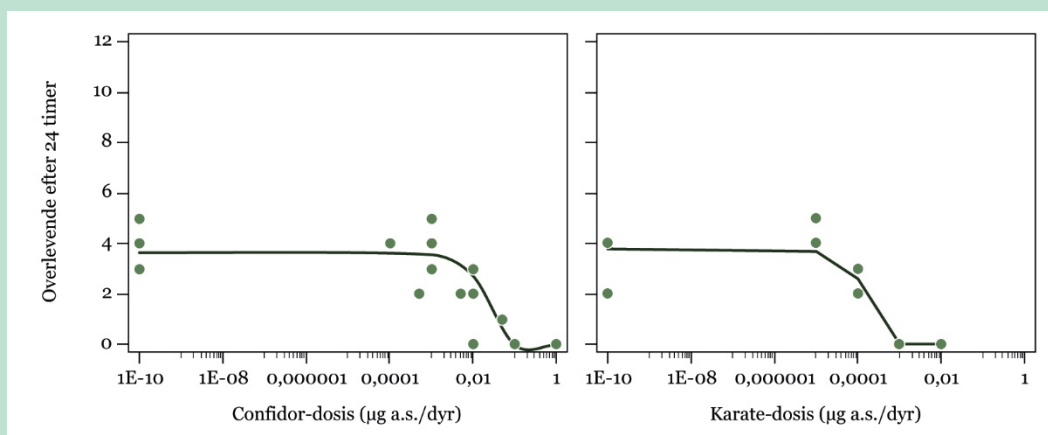
I Figur 5 er vist overlevelsen af de oprindeligt fem dyr pr. dosis 24 h efter eksponering. Der er en tydelig sammenhæng mellem dosis og overlevelse. Overlevelsen er påvirket ved doser over 0,01 µg a.s./dyr for Confidor og over 0,0001 µg a.s./dyr for Karate.



FIGUR 5. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *E. danica* 24 timer efter eksponering af 5 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ svarer til den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responssammenhæng.

Leuctra fusca

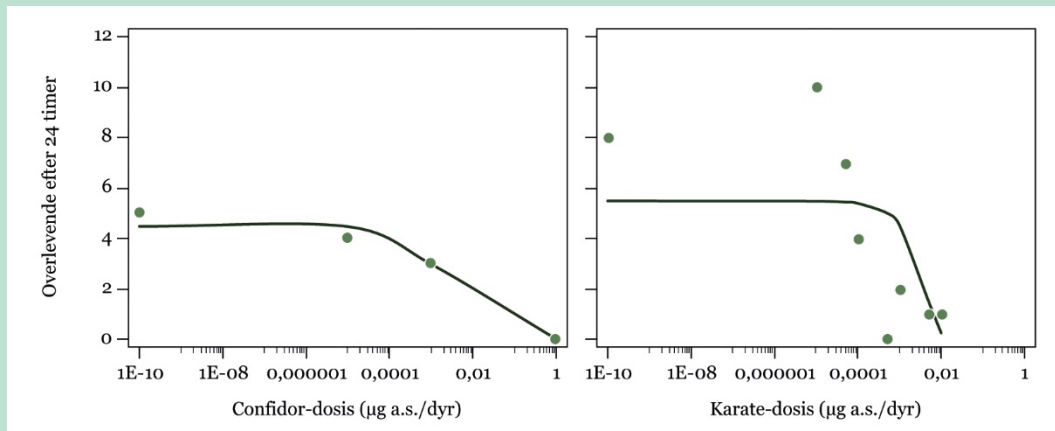
Dødeligheden 24 timer efter eksponering for de to insekticider er vist i Figur 6. Der er en tydelig dosis-responssammenhæng for begge stoffer, selv om kontroldødeligheden er større end ønskeligt.



FIGUR 6. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *L. fusca* 24 timer efter eksponering af 5 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ svarer til den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responssammenhæng.

Nemoura cinerea

Dødeligheden 24 timer efter eksponering for de to insekticider fremgår af Figur 7. Der er tydelig effekt af begge stoffer, selv om der er meget få datapunkter for Confidor (imidacloprid) og høj kontroldødelighed for Karate (lambda-cyhalothrin).



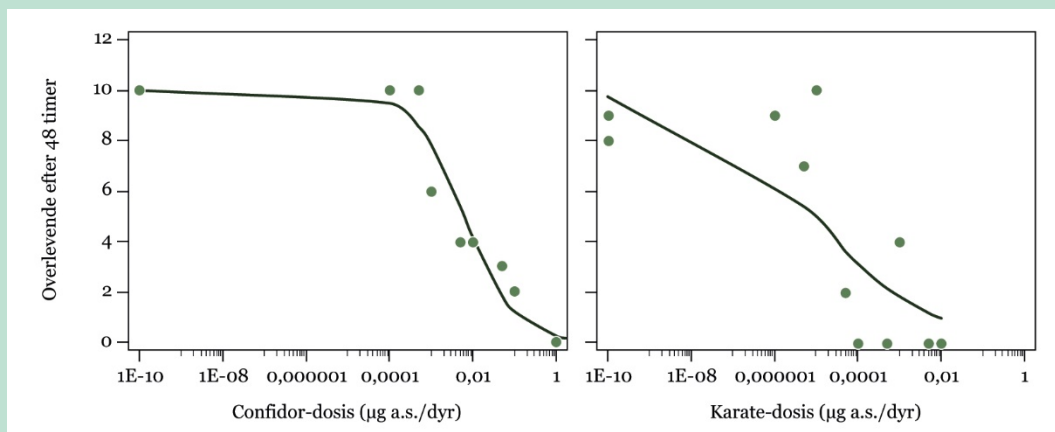
FIGUR 7. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *N. cinerea* 24 timer efter eksponering af hhv. 5 og 10 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ svarer til den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responsssammenhæng.

Isoperla grammatica

Efter 48 timer var der ingen effekt af de testede doser, idet hhv. 5, 4, 4, 5, 4, 4, og 5 af de eksponerede 5 dyr fortsat var i live.

Agapetus ochripes

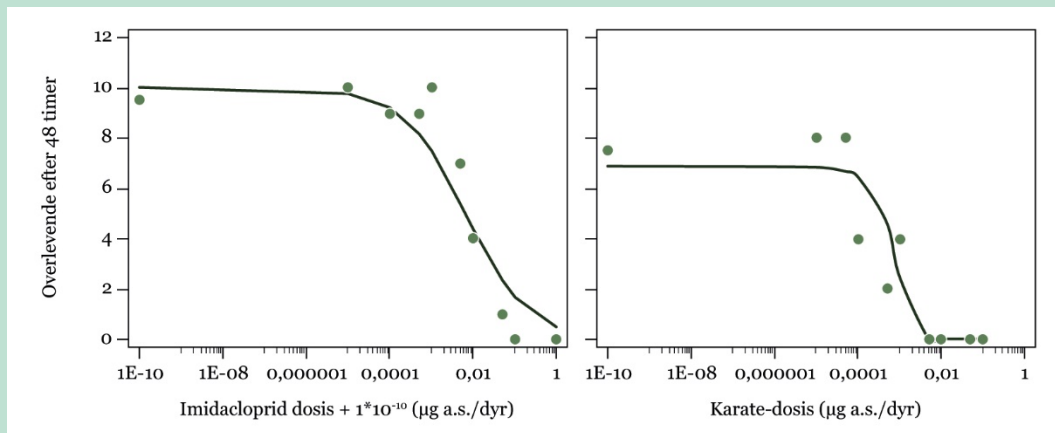
Overlevelsen efter 48 timer er vist i Figur 8. For begge insekticider er der en tydelig dosis-responsssammenhæng, selvom kontroldødeligheden er ret høj i testen med lambda-cyhalothrin.



FIGUR 8. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *A. ochripes* 48 timer efter eksponering af 10 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ er den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responsssammenhæng.

Hydropsyche angustipennis

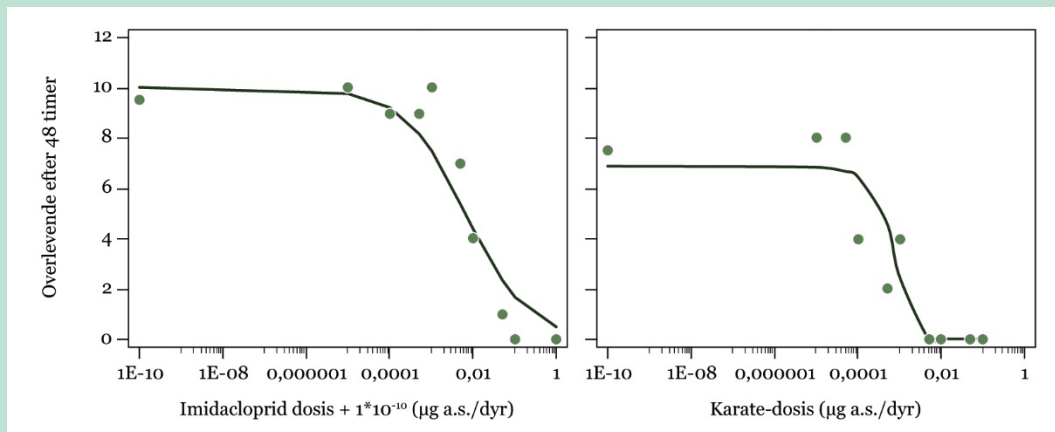
Dødeligheden 48 h efter eksponering er vist i Figur 9. Der er en tydelig effekt af de to insekticider, men kontroldødeligheden er høj i forsøget med lambda-cyhalothrin.



FIGUR 9. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *H. angustipennis* 48 timer efter eksponering af 10 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ er den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responssammenhæng.

Anabolia nervosa

Opgørelsen af overlevelsen 48 h efter eksponering er præsenteret i Figur 10. For lambda-cyhalothrin er der en klar dosis-responssammenhæng, mens effekten af imidacloprid på overlevelsen er mere uklar.



FIGUR 10. Effekt af Confidor (imidacloprid) (t.v.) og Karate (lambda-cyhalothrin) på overlevelsen af *A. nervosa* 48 timer efter eksponering af 5 dyr pr. koncentration. Dosis $1 \cdot 10^{-10}$ er den ubehandlede kontrol. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og linjen viser den estimerede dosis-responssammenhæng.

5. Sammenligning af voksen- og juvenilstadiers følsomhed over for de to insekticider

For at kunne sammenligne den relative følsomhed af de seks arters voksenstadier med tidligere opnåede resultater for de samme arters ungdomsstadier blev LD50-værdierne for de to insekticider beregnet for hver af forsøgsarterne ud fra den fittede sigmoide dosis-responsmodel. De beregnede LD50-værdier er vist i Tabel 9. Da de testede arter varierer meget i størrelse, blev tørvægten bestemt (se Tabel 10) for også at kunne udregne den tørvægtsbaserede LD50 for hver art.

TABEL 9. Beregnede LD₅₀-værdier med 95 % konfidensintervaller (k.i.) for de terrestriske voksenstadier af seks arter af vandløbsinsekter eksponeret topikalt for hhv. Confidor (imidacloprid) og Karate (). LD₅₀ pr. g tørvægt er udregnet vha. værdierne for begge køn i Tabel 10. Negative værdier indikerer, at tallet ikke har kunnet bestemmes. Værdier for honningbi, *Apis mellifera*, indsat til sammenligning.

Art	Pesticid	Timer efter eksponering	LD ₅₀ , µg a.s. pr. individ	95 % k.i., µg a.s. pr. individ
E. danica	Confidor	24	0,1	0,08-0,3
	Karate	24	0,006	0,002-0,02
L. fusca	Confidor	24	0,01	0,003-0,1
	Karate	24	0,0001	0,000002-(-0,0004)
N. cinerea	Confidor	24	0,001	0,00003-(-0,004570)
	Karate	24	0,00003	0,000003-0,00004
A. ochripes	Confidor	48	0,0062	0,0057-0,0078
	Karate	48	0,000008	0,000004-0,000010
H. angustipennis	Confidor	48	0,007	0,006-0,01
	Karate	48	0,0004	0,00006-0,003
A. nervosa	Confidor	48	0,002	0,0002-0,03
	Karate	48	0,0002	-0,00002-0,01
Apis mellifera	Confidor	48	0,081	
	Karate	48	0,038	

TABEL 10. Tørvægt af de seks arter af vandløbsinsekter gennemsnit af hanner og hunner.

Art	Antal dyr vejlet	Vægt mg tørvægt/indi- vid
<i>E. danica</i>	9	11,7
<i>L. fusca</i>	10	0,65
<i>N. cinerea</i>	9	1,24
<i>A. ochripes</i>	13	0,51
<i>H. angustipennis</i>	22	4,20
<i>A. nervosa</i>	8	17,3

De tilsvarende LC₅₀-værdier for ungdomsstadierne af de seks arter over for lambda-cyhalothrin-eksponering i vandfasen blev bestemt af Wiberg-Larsen et al. (2016) og er præsenteret i Tabel 5.3, idet det dog var en anden art af *Agapetus* (*A. fuscipes*), der blev undersøgt.

TABEL 11. Beregnede LC₅₀-værdier for Karate (lambda-cyhalothrin) for de juvenile stadier af de testede arter (dog en anden art af *Agapetus*). Data findes ikke for *Anabolia nervosa*. Kilde: Wiberg-Larsen et al. (2016).

Art	LC ₅₀ (µg a.s./l), gen-
<i>E. danica</i>	9,35 ± 1,68
<i>L. fusca</i>	1,43 ± 32,3
<i>N. cinerea</i>	0,48 ± 0,12
<i>I. grammatica</i>	14,49 ± 44,44
(<i>A. fuscipes</i>)	0,028 ± 0,001
<i>H. angustipennis</i>	1000

For at kunne sammenligne den relative følsomhed af hhv. adulte og juvenile er LD₅₀- og LC₅₀-værdierne for de enkelte arter blevet rangordnet for hhv. den totale dosis for adulte, dosis pr. tørvægt for adulte og (for Karate) koncentrationen i testvandet for de juvenile (Tabel 12). Som det ses af tabellen, betød hensyntagen til tørvægten noget for rangordningen af de adulte insekter, især for *E. danica*, *L. fusca* og *A. nervosa*. Der var ikke overensstemmelse mellem rangordningen for adulte og juvenile stadier.

TABEL 12. Rangordning af følsomheden målt som akut dødelighed for adulte og juvenile stadier af de seks arter af vandløbsinsekter for insekticiderne lambda-cyhalothrin og imidacloprid. Rank 1: mest følsom.

Art	Lambda-cyhalothrin		Imidacloprid	
	Rang, adulte		Rang, juvenile ¹	
	Dosis	Dosis pr. tørvægt	Koncentration i vand	Rang, adulte
				Dosis Dosis pr. tørvægt
<i>E. danica</i>	6	6	4	6 4
<i>L. fusca</i>	3	5	3	5 6
<i>N. cinerea</i>	2	3	2	1 2
<i>A. ochripes</i>	1	2	(1) <i>A. fuscipes</i>	3 5
<i>H. angustipennis</i>	5	4	6	4 3
<i>A. nervosa</i>	4	1	- (ikke testet)	2 1

¹ Wiberg-Larsen et al. 2016

5.1 Vurdering af om voksenstadier bør indgå i fremtidige test

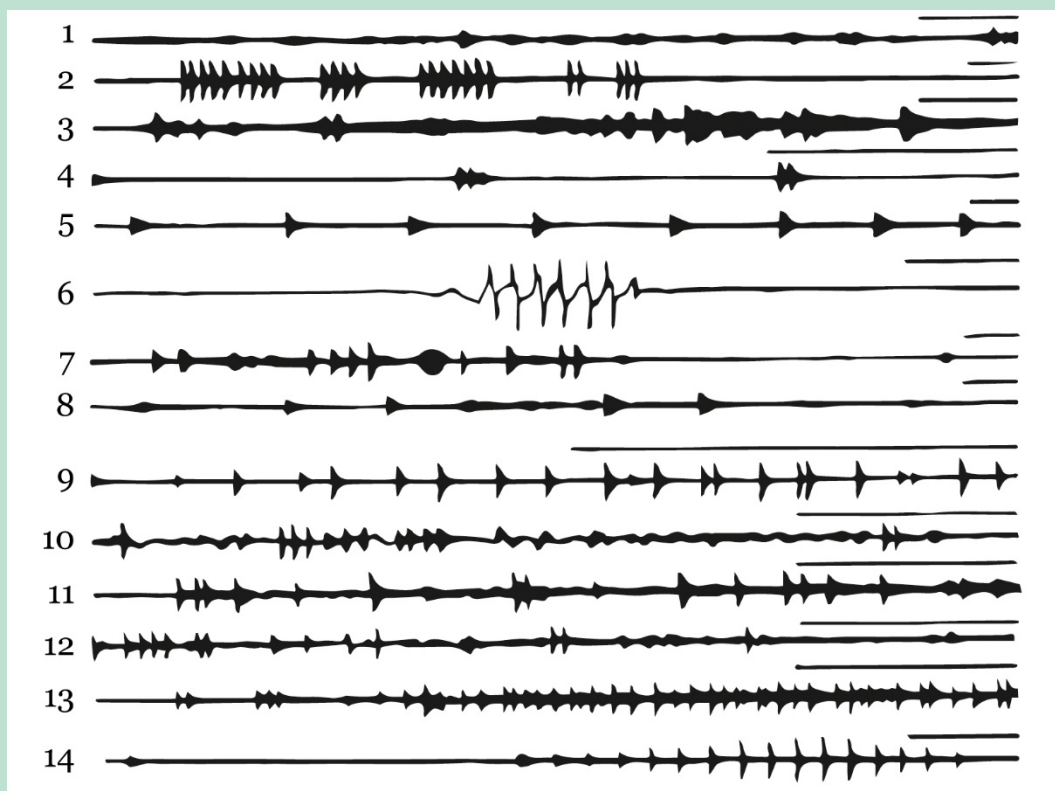
Sammenligningen af de rangordnede LD₅₀-værdier for juvenile og adulte individer af de undersøgte arter tyder på, at der ikke er en klar sammenhæng mellem følsomheden af de to livsstadier. Da LD₅₀ for de adulte er opgjort som dosis per individ, mens data for juvenile er baseret på koncentrationen af aktivstof i testmediet (vand), kan man dog ikke umiddelbart sammenligne følsomheden af de to livsstadier, og dermed kan man ikke afgøre, om det ene stadium er mere følsomt end det andet. Dermed synes det oplagt at foreslå, at der i den fremtidig risikovurdering ikke kun tages hensyn til eksponering i vandfasen af de juvenile stadier, men også foretages en undersøgelse af, om de adulte stadier kan forventes at blive eksponeret i en grad, der påvirker deres overlevelse eller reproduktion.

6. Effekter af ikke dødelige insekticid-doser på voksne vandinsekters parringsadfærd og reproduktion

Formålet med undersøgelsen er at undersøge effekten af Karate (lambda-cyhalothrin) og Confidor (imidacloprid) på formeringsadfærd og reproduktion hos udvalgte vandløbsinsekter med henblik på at teste hypotese 2 (Ikke-dødelige doser kan via direkte (topikal) eksponering medføre væsentlige effekter på de voksne vandinsekters adfærd og reproduktion) og hypotese 3 (Indtagelse af pesticideksponeret føde medfører væsentlige effekter på voksne vandinsekter, og arter med fødesøgning i det voksne stadium har derfor ekstra høj risiko for pesticidpåvirkning).

I projektet var planlagt at gennemføre adfærds- og reproduktionsundersøgelser ved eksponering over for insekticid med 4 vandløbsinsekter, men da vi som omtalt i kapitel 9 havde store vanskeligheder ved at have tilstrækkeligt med dyr udklækket samtidigt, blev undersøgelsen reduceret til to dyr: vårfluen *Agapetus ochripes*, der er kortlivet og ikke indtager føde som voksen, og slørvingen *Leuctra fusca*, der spiser alger, som vokser på grene og stammer. Med *L. fusca* blev kun gennemført indledende undersøgelser med to koncentrationer af Confidor (imidacloprid) (se nedenfor), da klækning ophørte, og vi aldrig fik tilstrækkeligt med dyr til at gennemføre en fuld adfærdstest.

Parringsadfærd og æglægning er ikke beskrevet for disse arter tidligere, men for andre vårfluearter, bl.a. den nærtbeslægtede *Agapetus fuscipes*, er udskillelse af feromoner, visuelle signaler som vingeflaps (hurtig blafren med vingerne) og vibrationer i form af trommen (Figur 11) beskrevet (Ivanov & Rupprecht 1992, Ivanov 1997).



FIGUR 11. Eksempler på frekvensen af rytmiske adfærdsmønstre (trommen, skraben, vinge-løft) fremkaldt af vårfluer (Trichoptera). Nummer 1-5 er forskellige signaler fremkaldt af *Agapetus fuscipes*, nr. 6-8 signaler hos *Goera pilosa*, nr. 9 hos *Lype phaeopa*, nr. 10 og 12 hos *Rhyacophila nubila*, nr. 11 hos *Hydropsyche contubernalis*, nr. 13 hos *Philopotamus ludificatus* og nr. 14 hos *Brachycentrus subnubilis*. Nummer 5 er hannens rytmiske trommen forud for par-ring. (Efter Ivanov 1997).

Udskillelsen af feromoner hos hanner kan iagttages som antennebevægelser hos hunner. Vingeløft kan forekomme både hos hanner, hvor den er tegn på intra-seksuel konkurrence, og hos hunner, hvor det er tegn på accept af hannen (Ivanov og Rupprecht 1992).

Æglægning hos *A. fuscipes* foregår ved, at hunnen dykker ned i vandet og lægger æggene på siden af større sten. Æggene dækkes herefter med små sten, såkaldte *capstones*, for at beskytte dem mod strømmende vand og prædation (Becker 1991, 2005).

6.1 Eksponering af adulte *Agapetus ochripes* over for Karate og Confidor

I denne del af projektet undersøgte vi effekterne af Karate og Confidor, der indeholder hhv. lambda-cyhalothrin og imidacloprid på parringsadfærd og æglægning hos *A. ochripes*. Da denne vårflue er relativt lille (kropslængde ca. 1 cm), blev alle iagttagelser af parringsadfærd gennemført i petriskåle, hvorefter dyrene blev overført til mere naturtro arenaer (miniakvarier med en stor sten som delvist rager op over vandet), hvor æglægning blev undersøgt.

Indsamling og klækning af larver er beskrevet på side 25-26. Efter klækning blev dyrene kønsbestemt på baggrund af genitalierne på bagkroppen (se Figur 12), hvorefter én hun og to hanner blev overført til petriskål med fugtigt filterpapir i bunden for at undgå udtørring.



FIGUR 12. Genitalierne (placeret på bagkropsspidsen) hos hanner (1-5) og hunner (6-8) af *Agapetus ochripes*. Genitalier set fra siden (1, 2, 6) og fra undersiden (3, 4, 7, 8). Hannerne identificeres let ved deres tydelige par vedhæng, som benyttes til at fastholde hunnerne under parringen. Bemærk i øvrigt, at begge køn har et par veludviklede tappe på hhv. 7. og 8. led (det 9. led bærer genitalierne). Tappene benyttes til at lave bankesignaler. Fotos fra Tobias & Tobias (se: <http://trichoptera.insects-online.de/Trichoptera%20fennoscandianica-aktuell/index.htm>).

Vårfluerne blev ved adfærdsundersøgelsen kun udsat for en koncentration af hvert insekticid bestemt på baggrund af range-finding og efterfølgende test for akut toksicitet, se Kapitel 4. Eksponering af dyrene foregik ved afsætning af 1 µL insekticidopløsning med mikropipette på thorax. For Karate (lambda-cyhalothrin) anvendtes koncentrationen 0,0000002 µg a.s. µL⁻¹ og for Confidor (imidacloprid) 0,02 µg a.s. µL⁻¹. Karate-opløsningerne indeholdt 10 % ethanol for at optimere stoffets opløselighed. Kontrol dyr tilførtes 1 µL 10% ethanolopløsning. Samlet indgik 90 dyr (3 dyr (1 ♀, 2 ♂ pr. petriskål) x 3 behandlinger (2 insekticider + kontrol) x 10 replikater) i undersøgelsen. Undersøgelsen blev igangsat 6. juni 2017 og varede samlet 5 døgn.

lagttagelsen af adfærd forløb over 2 døgn og blev startet 15 minutter efter eksponering (t = 0 minutter) og blev gentaget efter 20, 22, 40 og 44 timer. lagttagelserne omfattede trommen, spark, bevægelser med antenner og vinger (vingeløft), gang, samt evne til fasthæftning (sidde fast på undersiden af låget af petriskålen). Under dataindsamlingen blev dyrene tildelt point for hver aktivitet, 1 point pr. aktivitet. For en given aktivitet kan der tildeles tre point pr. petriskål. Alle aktiviteter blev også samlet til et aktivitetsindeks, der beregnes pr. individ. Mortalitet blev noteret og blev givet et minus point.

På dag 3 blev overlevende dyr overført til arenaer til undersøgelse af æglægning. Da der var en større dødelighed hos dyr eksponeret overfor Confidor (imidacloprid) end for øvrige behandlinger, se nedenfor, indgik kun 2 arenaer med imidaclopridbehandlede dyr (2 ♀, 2 ♂ pr. arena), 3 arenaer med lambda-cyhalothrin (2 ♀, 4 ♂ pr. arena) og 3 arenaer med kontrol dyr (2 ♀, 4 ♂ pr. arena). På dag 5 blev alle sten undersøgt for ægmasser, og antal af disse blev noteret.

6.2 Erfaringer med eksponering af adulte *Leuctra fusca* over for Confidor

Slørvingen *L. fusca* indtager føde i voksenstadiet primært i form af alger, som findes på grene på træer og buske langs vandløb (Wiberg-Larsen, pers. com.). Indledningsvis forsøgte vi at skrabe algerne af grenene og blande dem med pesticid, men dyrene spiste ikke dette alge-skrab – heller ikke alger, der ikke var kontamineret. Derfor blev grenene med algebelægning

i stedet dyppet i Confidor opløsning (0,05 og 0,005 g a.s. i 100ml vand), hvilket dog gav den ulempe, at vi ikke kunne måle den indtagne mængde og heller ikke koncentrationen af insekticid i algerne. Når algerne sad på grenene, gik slørvingen i gang med at spise, så snart den blev sat på grenen, og det uanset om grenen var dyppet i insekticid. Ved begge koncentrationer indtog dyrene føde i 1-2 minutter, hvorefter de fik spasmer og døde efter mindre end 2 minutter. Da klækningen af voksne fra laboratoriekulturen desværre gik i stå, havde vi ikke mulighed for at gentage forsøget ved lavere doseringer. En anbefaling til fremtidige undersøgelser vil være at sprøjte grenene med insekticid i afdrift-relevante koncentrationer, dvs. max 15-20% af markdosis, men også betydeligt lavere doser.

6.3 Statistik

Mortalitet blev analyseret ved anvendelse af en generaliseret model, hvor fordelingen er binomial og link funktionen er logit. I denne model analyseres, om mortalitet er forskellig i de forskellige behandlinger.

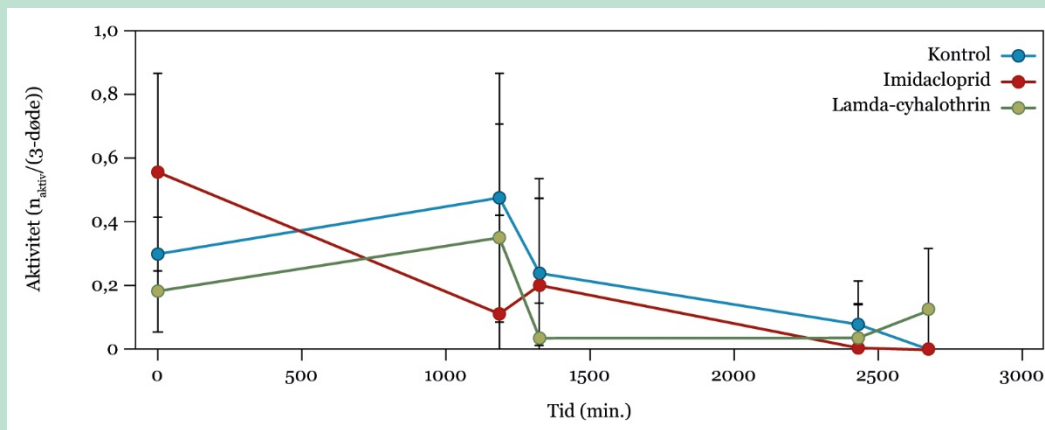
Adfærd blev analyseret dels for hver adfærdskomponent særskilt, dels som den samlede adfærd, dvs. at alle adfærdsparametre adderedes sammen til en parameter. Den samlede parameter analyseredes i en lineær kovarians model med mortalitet som kovariabel. I den lineære model er det specifikt effekt af behandling, der analyseres. Den lineære model antager, at residualer er normalfordelte.

6.4 Resultater - Eksponering af adulte *Agapetus ochripes* over for Karate og Confidor

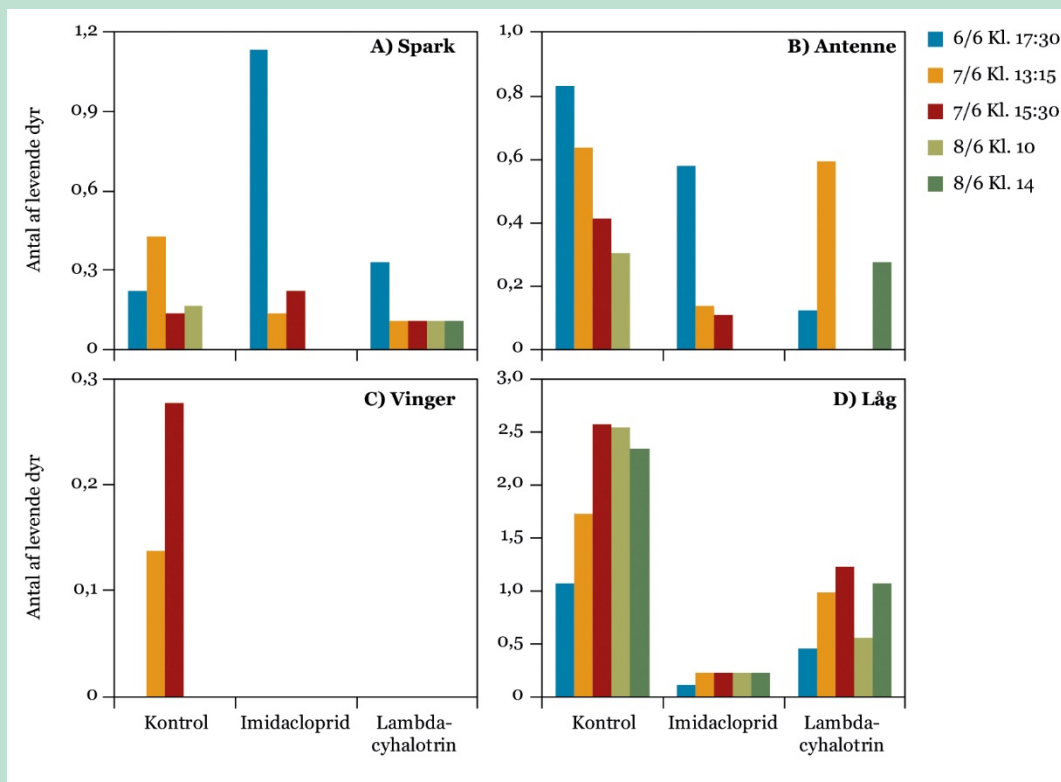
I forbindelse med kønsbestemmelse og håndtering af dyr forud for eksponering observerede vi rytmisk trommen. Denne adfærd blev dog ikke observeret i selve observationsperioden efter insektideksponering, heller ikke for kontroldyr.

Vi fandt, at insekticid-doser, der ved akut test (korttidseksponering) var subletale, kan resultere i signifikant højere dødelighed ved længere eksponering for især Confidor ($p=0,0001$), men også for Karate ($p=0,0170$), sammenlignet med kontrollerne.

Sammenligning af aktivitetsniveau for dyr eksponerede over for Karate og Confidor viste interaktion mellem tid og aktivitetsniveau (Figur 13). Umiddelbart efter eksponering over for insekticiderne sås således en forøget aktivitet hos dyr eksponeret overfor Confidor, hvorefter aktivitetsniveauet pr. levende individ faldt (Figur 13). Under den første adfærdsstimulering hos Confidor-eksponerede dyr løb dyrene meget i cirkler, et respons, der dog ikke blev kvantificeret, og foretog krampagtige spark (Figur 14A). Aktivitetsniveauet for Karate-eksponerede dyr og kontrol-dyr var først lavere, men steg derefter det første døgn, hvorefter det faldt for såvel eksponerede dyr som kontrol-dyr. Karate-eksponerede dyr havde gennem hele observationsperioden en lavere aktivitet end kontrol-dyr (Figur 13). Kun kontroldyr laver vingeløft i observationsperioden (Figur 14C).

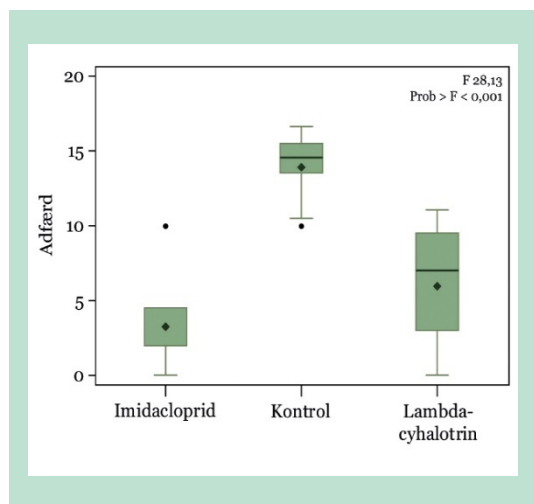


FIGUR 13. Aktivitetsindeks, dvs. gennemsnitlig samlet adfærd (gang, trommen, vingeløft, antennebevægelse, evne til fasthæftning) pr. levende individ til et givet tidspunkt hhv. 15 min. efter eksponering ($t=0$) og derefter til $t=20$, 22, 40 og 44 timer efter eksponering for voksne vårfluer (*A. ochripes*) eksponeret over for Confidor (imidacloprid) og Karate (lambda-cyhalothrin). Observationerne forgik i petriskål med 3 dyr (1 ♀, 2 ♂) pr. skål og 10 replikater. Observationsperioden var 15 minutter. Aktivitetsindeks angiver den gennemsnitlige aktivitet pr. levende individ, idet et individ tildeles 1 point, hvis en given adfærd gennemføres inden for observationsperioden.



FIGUR 14. Adfærdsobservationer hos vårfluen *A. ochripes* eksponeret overfor Confidor (imidacloprid) og Karate (lambda-cyhalothrin). A: Spark, B: Antenne-vift, C: Vingebbevægelser, D: Evne til fasthæftning på undersiden af låg i petriglassene

For ingen af de undersøgte adfærdsparametre (spark, vingeløft, antennebevægelse, evne til fasthæftning) betragtet enkeltvis var der signifikant påvirkning i forhold til kontrol (Figur 14 A-D). Hvis man imidlertid ser på den samlede adfærd, var adfærden reduceret for både Confidor (imidacloprid)- ($p=0,006$) og Karate (lambda-cyhalothrin)-eksponerede dyr ($p=0,002$) (Figur 15). I Figur 15 er adfærd analyseret som den samlede adfærd, dvs. at alle adfærdsparametre er adderet sammen til en parameter. Den parameter analyseres i en lineær kovarians model med mortalitet som kovariabel. I den lineære model er det specifikt effekt af behandling, der analyseres for. Den lineære model antager at residualer er normalfordelte.



FIGUR 15. Samlet (adderet)adfærdsaktivitet hos vårfluen *A. ochripes* eksponeret overfor Confidor (imidacloprid) ($0,02 \mu\text{g a.s. } \mu\text{L}^{-1}$) og Karate (lambda-cyhalothrin) ($0,0000002 \mu\text{g a.s. } \mu\text{L}^{-1}$).

Produktionen af ægmasser var påvirket af insektideksponeringen, men ikke signifikant (antagelig pga. af det begrænsede datagrundlag). Confidor (imidacloprid)-eksponerede dyr producerede ikke æg i forsøget, og der var en tydelig, men ikke signifikant, reduceret æglægning hos Karate (lambda-cyhalothrin)-eksponerede dyr (Tabel 13).

TABEL 13. Observerede antal ægmasser på sten i areaner for Karate (lambda-cyhalothrin)-eksponerede dyr (3 areaner), Confidor (imidacloprid)-eksponerede dyr (2 areaner) og kontrol (3 areaner).

Arena	Kønssammensætning	Antal ægmasser
Kontrol	2 ♀, 4 ♂	1
Kontrol	2 ♀, 4 ♂	0
Kontrol	2 ♀, 4 ♂	4
Karate	2 ♀, 4 ♂	1
Karate	2 ♀, 4 ♂	0
Karate	2 ♀, 4 ♂	1
Confidor	2 ♀, 2 ♂	0
Confidor	2 ♀, 2 ♂	0

7. Flyvetider, fødesøgning, spredning hos repræsentative akvatiske insekter

7.1 Makroinvertebrat diversitet i danske vandløb

Det anslås, at der forekommer mindst 7-800 arter af såkaldte makroinvertebrater i danske vandløb (Wiberg-Larsen et al. 2013b). Mere end halvdelen af disse udgøres af insekter, fordelt på 10 ordener (Tabel 14). Blandt disse vandløbsinsekter blev i alt 76 arter udvalgt til beskrivelse af specifikke biologiske egenskaber hos det voksne stadium. Ved udvælgelsen blev der taget hensyn til så vidt muligt at dække samtlige ordener samt den tilhørende biodiversitet (artsrigdom), men der blev også taget hensyn til arternes udbredelse og hyppighed i vandløbene (se nedenfor). Således har hensigten især været at medtage særligt biologisk vigtige arter (vidt udbredte, ofte talrige, med væsentlig funktionel betydning for vandløbs struktur), men samtidig også medtage sjældne (og evt. rødlistede) arter. Ved udvælgelsen blev der også taget hensyn til, om der fandtes de ønskede biologiske oplysninger om arterne.

TABEL 14. Oversigt over biodiversiteten af insekter i danske vandløb, samt hvor mange af disse som ved nærværende undersøgelse blev udvalgt til beskrivelse af forskellige biologiske egenskaber.

Orden (dansk navn)	Orden (latinsk navn)	Antal arter i danske vandløb	Antal udvalgt
Slørvinger	Plecoptera	25	13
Døgnfluer	Ephemeroptera	ca. 35	12
Guldsmede	Odonata	ca. 10	2
Tæger	Hemiptera	ca. 5	0
Dovenfluer	Megaloptera	3	2
Netvinger	Neuroptera	2	0
Biller	Coleoptera	ca. 60	3
Årevinger	Hymenoptera	1	0
Vårfluer	Trichoptera	ca. 100	32
Myg & fluer	Diptera	ca. 300	12

Oplysninger om arternes hyppighed (her skaleret som: 1 – vidt udbredt; 2 – relativt vidt udbredt; 3 – sjælden) er primært hentet fra NOVANA (databaserne Winbio, ODA) samt med inddragelse af faglig ekspertise i projektgruppen. Ud over som kriterie ved udvælgelsen af arterne er hyppigheden brugt til test for forskelle i flyvetid, fødeoptagelse og fekunditet.

Af de relevante ordener er kun guldsmede og tæger p.t. officielt rødlistet. Derudover foreligger der forslag til rødlistning af slørvinger, døgnfluer og vårfluer (Peter Wiberg-Larsen, upubliceret 2017). Rødlistning af de øvrige udvalgte arter er provisorisk foretaget af Peter Wiberg-Larsen (alle disse arter klassificeret som LC: Least Concern – dvs. ikke truet). Ved rødlistningen er anvendt retningslinjer i Moeslund et al. (2015).

7.2 Forekomst af voksenstadiet i forhold til insekticidanvendelse

For samtlige arter er "flyveperiode/flyvetid", dvs. arternes voksne forekomst uden for vandløbsmiljøet, søgt kvantificeret relativt over tid. Dette er gjort med en nøjagtighed på ½ måned, idet der er fordelt i alt 10 point over perioden, hvor de voksne optræder på land. Hvor der er tale om mere end én generation på et år, er der dog fordelt 10 point for hver generations flyveperiode (for en enkelt art 4 perioder = 40 point). Der er altså tale om forekomsten af den samlede population af en given art, ikke de enkelte voksne individers levetid. Oplysninger om flyveperioder er indhentet fra en lang række publikationer samt i flere tilfælde via data beroende på projektgruppen (Peter Wiberg-Larsen). Ud fra de enkelte arters relative forekomst igennem flyveperioderne er der beregnet en samlet relativ forekomst for alle arter over et givet år, ligesom det er beregnet hvor mange arter, der forekommer som voksne på et givet tidspunkt.

Ligeledes er oplysninger om arternes levetid som voksne, fødesøgning, sværmning hos hannerne, præference for ophold i den vandløbsnære (ripariske) zone (typisk 10-30 m langs vandløbene), spredning vinkelret bort fra vandløbet, lang-distance spredning (væsentlig ud over den ripariske zone), samt antallet æg, som hver hun lægger (fekunditet), indsamlet fra diverse publikationer samt i flere tilfælde via data og vurderinger beroende på projektgruppen (Peter Wiberg-Larsen).

Oplysninger om de udvalgte arters flyveperioder og relative forekomst inden for disse er sammenholdt med tidspunkterne for sprøjtning med insekticider og omfanget af behandlede afgrødetyper og dermed anvendt til en relativ vurdering af risikoen for at de enkelte arter påvirkes. Oplysninger om sprøjtetidspunkter og afgrøder er til formålet sammenstillet på baggrund af data fra Planteværn-Online (<https://www.landbrugsinfo.dk/planteavl/plantevaern/plantevaern-online/sider/startside.aspx>). Data er aggregeret på samme ½-måned skala som flyveperioderne. Relativ påvirkning er simpelt opgjort ud fra de samlede danske arealer af forventet insekticid-sprøjtede afgrødetyper. Arealerne er indhentet fra Danmarks statistik (data fra 2016). Der er ikke herved taget hensyn til de konkrete arealer, som de enkelte afgrøder udgør langs danske vandløb.

Som omtalt tidligere kan voksne individer af visse vandløbsinsekter, der har et terrestrisk livsstadie, blive eksponeret over for pesticider i denne periode. Det kan ske dels ved direkte eksponering ved ophold i områder, hvor der sprøjtes, eller hvor pesticiderne ved vindafdrift eller afsætning af fordampet pesticid afsættes på dyrenes overflade. Arter, der indtager føde (fx nektar, alger eller lichener) i voksenstadiet, kan desuden blive eksponeret via føden. Men med mindre dyrene bliver udsat for direkte sprøjtning, vil de koncentrationer af insekticider, som insekterne udsættes for, formodentlig generelt kun medføre subletale effekter. For bl.a. bier vides således, at sådanne lave koncentrationer af neurotoksiner tilhørende insekticidgrupperne pyrethroider (fx lambda-cyhalothrin) og neonicotinoider (fx imidacloprid) kan have signifikante negative effekter på blandt andet adfærd og reproduktion (Blacquiere et al. 2012, Whitehorn et al. 2012). Lambda-cyhalothrin og imidacloprid er systemiske insekticider, der påvirker insekternes centralnervesystem (Elbert et al. 1991), der typisk medfører en overstimulering af nervecellerne, som potentielt kan føre til muskelkrampe (fx Wiberg-Larsen et al. 2013a). Effekten af stofferne kan således både iagttages som hyperaktivitet (Blacquiere et al. 2012) og i form af reduceret aktivitet. Hos fx asiatisk træbuk (*Anoplophora glabripennis*) er observeret reduceret aktivitet (gang, vingeløft, antenneløft, evne til fasthæftning) efter eksponering overfor imidacloprid (Russell et al. 2010).

Flyvetiderne for de udvalgte arter varierer fra første halvdel af februar til slutningen af november. Langt de fleste arter forekommer dog fra første halvdel af maj til første halvdel af oktober med maksimum i sidste halvdel af juni (Figur 16A). I forhold til den kvantitative relative fordeling af arternes flyvetider ligger tyngdepunktet fra april til slutningen af september med maksimum i første halvdel af juni (Figur 16B).

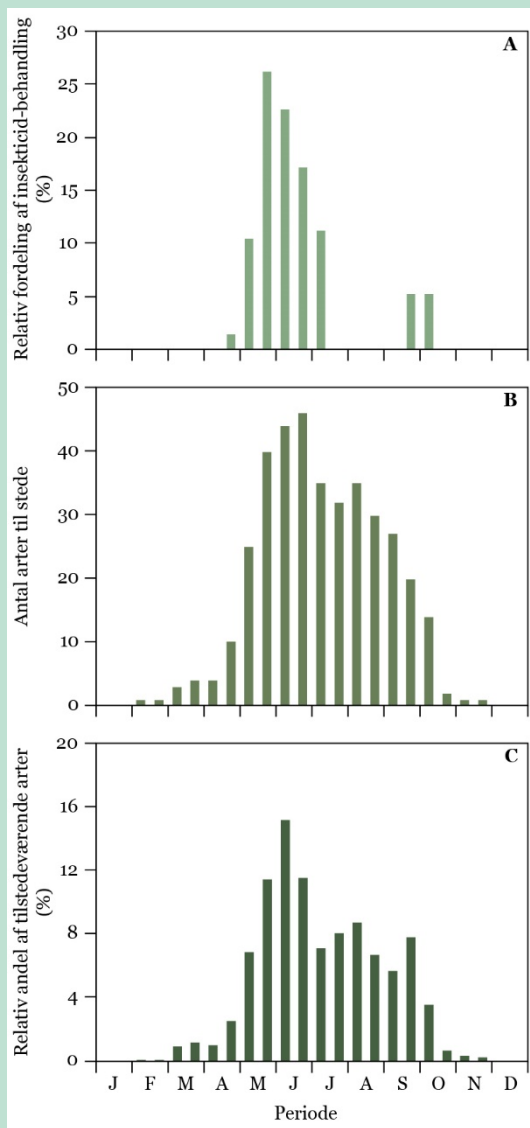
Påvirkningen med insekticider er primært koncentreret til perioden første halvdel af maj til første halvdel af juli, idet der også forekommer en mindre påvirkning i september/oktober (Figur 16C).

Den primære påvirkning af insekticider er overvejende sammenfaldende med maksimum for tilstedeværelsen af arter og deres relative hyppighed. Således er, hvad angår artsantal og den relative hyppighed, 53-55% af arterne i særlig risiko for at blive påvirket af insekticider i den primære sprøjteperiode. I den sekundære sprøjteperiode om efteråret er tilsvarende 9-11% af arterne i særlig risiko for at blive påvirket.

Samlet set er omkring 2/3 af de udvalgte arter i potentiel risiko for at blive påvirket af insekticidsprøjtning.

Blandt de udvalgte arter kan de 45 betragtes som vidt udbredte, 18 som relativt vidt udbredte og de resterende 13 som sjældne, mens 66 kan klassificeres som ikke-truede (røddlistekategori LC) og kun 10 som truede: kategorierne EN ("endangered"), VU ("vulnerable") og NT ("near threatened").

Flyvetiderne (opgjort som relativ hyppighed) var ikke signifikant forskellige mellem grupperne af hhv. vidt udbredte, relativt vidt udbredte og sjældne arter (Wilcoxon Signed Rank test, $P > 0,50$), mens der ligeledes ikke var signifikant forskel i flyvetider mellem grupper af truede og ikke-truede arter (Wilcoxon Signed Rank test, $P = 0,76$).

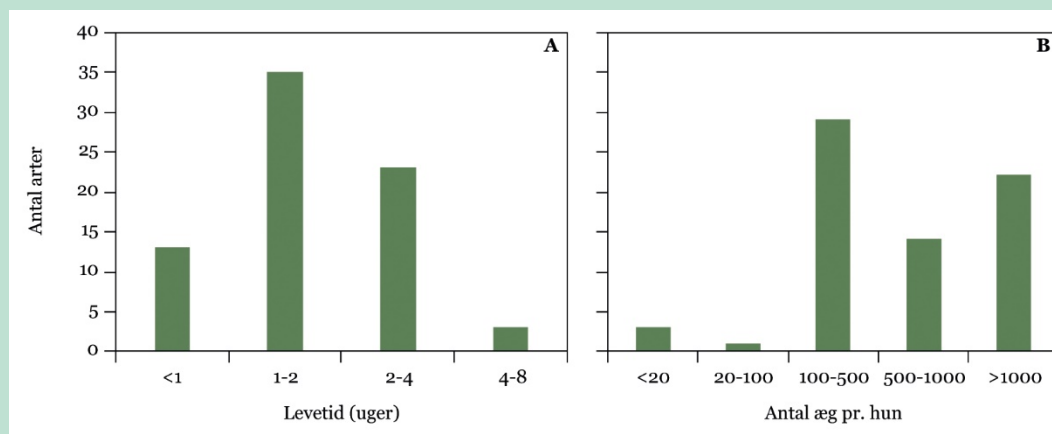


FIGUR 16. Oversigt over tilstedeværelse (A) og relativ hyppighed (B) af voksne af 76 udvalgte vandløbsinsekter samt den relative insekticidbehandling af markafgrøder inden for en periode af et år (C). Perioden er opdelt månedsvis i hhv. første (I) og anden (II) halvdel af disse. Tilstedeværelse og relativ hyppighed af de udvalgte arter af vandløbsinsekter er et generaliseret "billede" på tværs af danske vandløb. Ligeledes er den relative behandling med insekticider et generaliseret "billede" for det samlede danske markareal – og altså ikke behandling af marker der specifikt støder op til vandløb.

Selvom flyvetiderne er lange, lever de enkelte individer som hovedregel væsentlig kortere tid. Levetiden som voksen hos de undersøgte vandløbsinsekter varierede fra få timer til 1-3 dage hos døgnfluer til 8 uger hos visse vårfluer (Figur 17). Levetiden var i gennemsnit 1,5 uge og i median 1 uge.

Omkring 43% af arterne vurderes at indtage føde, mens dette ikke er tilfældet hos 46%; for de resterende 11% mangler der viden om fødeoptagelsen. Arter som indtager føde lever ikke overraskende længere (i median 2 uger) end arter, der ikke indtager føde (i median 1 uge) (Mann Whitney U-test, $P < 0,001$). Der er ikke fundet væsentlige forskelle i flyvetider mellem udbredte, relativt udbredte og sjældne arter, eller mellem truede og ikke-truede arter.

Fekunditeten hos de udvalgte arter varierer betydeligt fra omkring 10 æg pr. hun hos enkelte klobiller til omkring 8000 æg hos enkelte døgnfluer (Figur 17). Der blev fundet en signifikant, om end ikke særlig stærk positiv, sammenhæng mellem fekunditet og levetid ($r^2=0,18$, $P<0,001$). Til gengæld synes der ikke at være nogen sammenhæng mellem fødeoptagelse og fekunditet på tværs af de taksonomiske grupper (ordener). Ligeledes er der ingen forskel i fekunditet mellem udbredte, relativt udbredte og sjældne arter, eller mellem truede og ikke-truede arter.



FIGUR 17. Gennemsnitlig levetid for de udvalgte voksne vandløbsinsekter (tv.) og gennemsnitligt antal æg (fekunditet) pr. hun (th.).

Langt de fleste af de udvalgte arter (>85%) vurderes at være knyttet til den ripariske zone, inden for hvilken de (baseret på en dokumenteret adfærd hos en række arter af slørvinger, døgnfluer og vårfluer) antages at fordele sig efter en negativ eksponentiel kurve vinkelret på og bort fra vandløbet. Hos hannerne af omkring en 1/3 af arterne (primært inden for døgnfluer, vårfluer og dansemyg) er der fundet sværmning, der har til formål at tiltrække hunnerne med henblik på parring. Sværmningen foregår hos en del arter tæt på vandløbet og inden for den ripariske zone, men hos en del andre arter foregår sværmningen typisk relativt langt fra vandløbet, fx i tilknytning til såkaldte sværmemarkører i landskabet (træer, buske). Ligeledes foregår der hos ca. halvdelen af arterne en aktiv eller passiv (med vinden) lang-distancespredning – dvs. spredning væsentlig uden for den ripariske zone. Denne type spredning omfatter dog typisk kun en meget lille del af en given population. Der synes med hensyn til spredning og sværmning ikke at være forskel mellem udbredte, relativt udbredte og sjældne arter, eller mellem truede og ikke-truede arter.

For detaljerede oplysninger om de udvalgte arters flyvetider, levetid, sværmning, spredning, fekunditet og øvrige "traits" (egenskaber/karakteristika) henvises til bilag 1-4.

8. Risikomodel baseret på viden om flyvetider, spredning og akut toksicitet

Der er udarbejdet en model, der generaliserer information omkring adfærd i forhold til sprøjtemiddelanvendelse (kapitel 7) og følsomhed (kapitel 8). Modellen samler således risikofaktorer omkring dyrets adfærd, dets følsomhed over for et aktivstof og sprøjetidspunkt. Risikomodelen estimerer forholdet mellem en mulig eksponering og artens følsomhed for denne eksponering. Dette bygger på samme grundlæggende princip, som det der anvendes i risikovurderingen af kemikalier. Værdier omkring 1 og derover indikerer en risiko for påvirkning, mens en værdi under 1 indikerer en mindre risiko. Meget lave værdier indikerer lille eller slet ingen risiko for påvirkning. Påvirkningen beregnes ud fra: (1) Det iboende toksiske effektpotentiale for behandlingen; (2) Den fysiske størrelse af dyret; (3) Sandsynligheden for at dyret opholder sig, hvor det kan eksponeres fra sprøjtning; (4) Sandsynligheden for at dyret flyver på det tidspunkt, der sprøjtes.

Modellen beregner den relative risiko for insekticidpåvirkning af vandløbsinsekter med et terrestrisk voksenstadium på individniveau, der samler risikofaktorer omkring dyrets adfærd og følsomhed over for et aktivstof i én model.

At modellen er relativ betyder, at den estimerer risikoen som værende højere eller lavere for en art sammenlignet med en anden art. Den relative risiko bestemmes ved følgende udtryk:

$$R_{\text{individ}} = \text{Tox} \cdot \text{Dose} \cdot \text{FracDep} \cdot \text{FracOphold} \quad (1)$$

hvor *Tox* udtrykker følsomheden for pesticidet ved en bestemt eksponering, *Dose* udtrykker den eksponering, som kan forekomme, hvis dyret eksponeres og *FracDep* udtrykker den andel af en sprøjtning, som kan ramme dyret, der opholder sig i afstanden *x* fra brinken.

Tox beregnes som akut toksicitet, men der kunne dog også vælges andre mål:

$$\text{Tox} = \frac{1}{\text{LD50} \cdot \text{InsectWeight}} \quad (2)$$

hvor den letale dose (*LD50*) er i enheden ng stof per g insekt (ng/g). Udbringning af pesticidet har en tidlig variation, så *Dose* kan deles op efter:

$$\text{Dose} = D_0 \cdot p(\text{udbringning}|\text{måned}) \quad (3)$$

hvor $p(\text{udbringning}|\text{Måned})$ svarer til sandsynligheden for udbringning inden for en bestemt måned. Modellen forudsættes at gælde for et individ, der opholder sig på og omkring en mark, som sprøjtes på et eller andet tidspunkt gennem året, således at $p(\text{udbringning}|\text{alle måneder}) = 1$. D_0 er standard dosen af det pågældende middel.

Den mængde pesticid, der deponer på dyret, *FracDep*, afhænger af insekters effektive overfladeareal, der er disponeret for at modtage pesticid ved deposition. Det er en relativ usikker størrelse, og pesticidet kan også komme til insektet via damp transport, hvilket ikke er med i denne simple model. Men for at fastlægge en størrelsesorden i realistisk påvirkning indføres dette overfladeareal. Det betyder, at en indikatorværdi over 1 estimerer, at der er risiko for effekter. Det giver følgende ligning:

$$FracDep = InsectArea \cdot FracDrift \quad (4)$$

$FracOphold$ udtrykker sandsynligheden for, at dyret opholder sig i afstanden x til tiden t og er beregnet som:

$$FracOphold = p(tilstede|flyver) \cdot p(flyver|måned) \quad (5)$$

hvor $p(tilstede|flyver)$ er sandsynligheden for, at et dyr er i afstand x , og givet at det flyver (altså er levende og adult). $p(flyver|Måned)$ er sandsynligheden for, at dyret flyver og givet en bestemt måned. Begrebet "måned" bruges her som tids-interval, men det kan være et hvilket som helst tidsrum, fx dage eller uger, alt afhængig af de data, der indgår og den viden man i øvrigt har. Det forudsættes, at $p(tilstede|flyver)$ kan regnes for uafhængig af $p(flyver|måned)$, altså at den afstand, dyret flyver fra vandløbsbrinken, ikke afhænger af, hvornår på året dyret flyver. Med disse tilføjelser kan indikatorer skrives op som:

$$R_{indiv} = \frac{D_0 \cdot InsectArea}{LC50 \cdot InsectWeight} \cdot p(udbringning|måned) \cdot p(flyver|måned) \cdot FracDrift \cdot p(tilstede|flyver) \quad (6)$$

Denne faktor kan opdeles i fire faktorer, som bestemmer dyrets samlede risiko: (1) $\frac{D_0}{LC50}$: beskriver pesticidet potentielle påvirkning, eller "iboende" påvirkning af dyret, $\frac{InsectArea}{InsectWeight}$ beskriver dyrets fysiske følsomhed ud fra areal/vægt forholdet, overfor en påvirkning. (2) $p(udbringning|måned) \cdot p(flyver|måned)$: beskriver sammenfald mellem det tidspunkt dyret flyver og det tidspunkt, der sprøjtes. (3) $FracDrift \cdot p(tilstede|flyver)$ beskriver sammenfaldet mellem hvor dyret opholder sig, og hvor der sprøjtes.

Sandsynligheden for at være tilstede inden for en meter (tætheden) og i en given afstand er defineret gennem følgende to udtryk:

$$p(tilstede | flyver) = p_0, \text{ for } x \leq x_0 \quad (7)$$

$$p(tilstede | flyver) = \alpha e^{-\beta(x-x_0)}, \text{ for } x > x_0 \quad (8)$$

Her defineres et område omkring vandløbsbrinken ud til afstanden x_0 , hvor sandsynligheden regnes for konstant (Ligning 7), mens sandsynligheden regnes for aftagende eksponentielt i større afstande (Ligning 8).

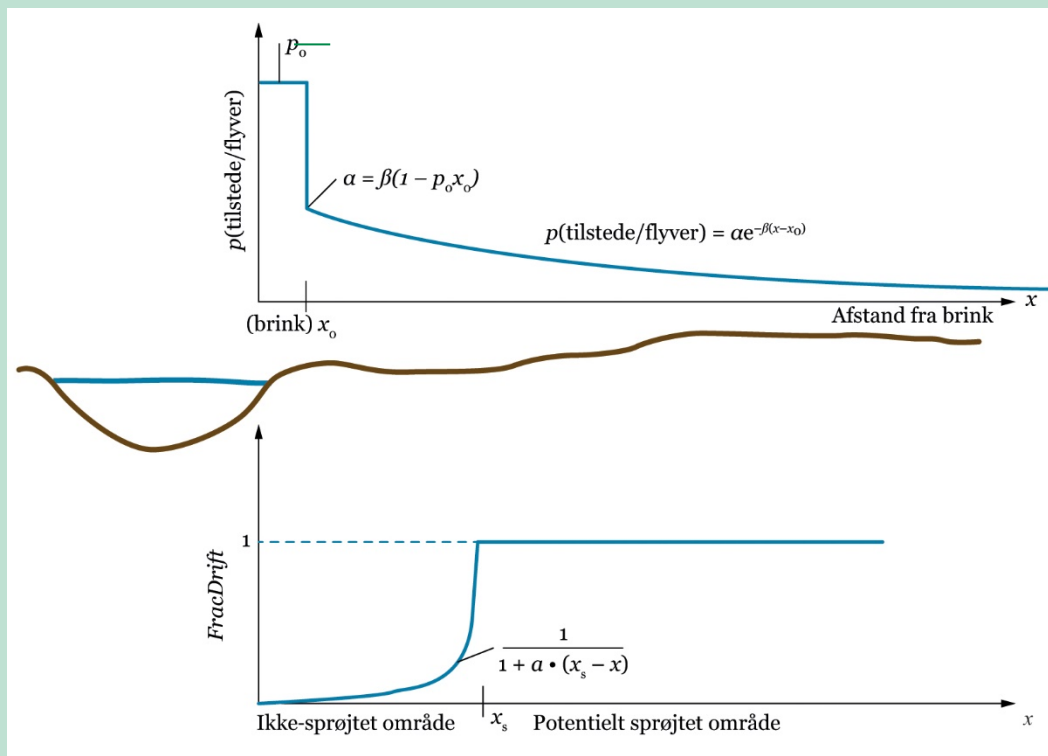
Andelen af udsprøjtet mængde, der kan ramme dyret er beskrevet ved følgende udtryk:

$$FracDrift = \frac{1}{1 + \alpha \cdot (x_s - x)}, \text{ for } x \leq x_s \quad (9)$$

$$FracDrift = 1, \text{ for } x \geq x_s \quad (10)$$

Her indgår en mulig sprøjtefri randzone med bredden x_s . Når dyret er længere væk end afstanden, vil det kunne påvirkes af fuld markdosis, svarende til $FracDrift = 1$.

Ligningerne 7-10 er vist grafisk i Figur 18.



FIGUR 18. Illustration af den rummelige variation i tilstedeværelsen (øverst, Ligning 7 og 8) og afsætning af pesticid (nederst, Ligning 9 og 10).

Relationen mellem α og β fås på følgende måde: Den samlede sandsynlighed for, at en tilstedeværelse under flyvning i en hvilken som helst afstand er 1, kan beskrives som:

$$1 - p_0 x_0 = \alpha \int_{x_0}^{\infty} e^{-\beta(x-x_0)} dx \Leftrightarrow \alpha = \beta(1 - p_0 x_0) \quad (11)$$

Både afstanden x_s og x_0 er kritiske parametre i modellen, som kan indtage forskellige værdier. Derfor skal modellen opstilles for alle kombinationer af hhv x_s og x_0 , hvilket gøres i det følgende:

For $x_s \geq x_0$

$$FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{0-x_0} = p_0 \cdot \int_0^{x_0} \frac{1}{1+a(x_s-x)} dx = \frac{p_0}{a} \cdot \ln\left(\frac{1+a \cdot x_s}{1+a \cdot (x_s-x_0)}\right) \quad (12)$$

$$\begin{aligned} FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{x_0-x_s} &= \alpha \cdot \int_{x_0}^{x_s} \frac{e^{-\beta \cdot (x-x_0)}}{1+a(x_s-x)} dx \approx \alpha \cdot \int_{x_0}^{x_s} \frac{1-\beta \cdot (x-x_0)}{1+a(x_s-x)} dx \\ &= \frac{1+\beta x_0}{a} \cdot \ln(1+a(x_s-x_0)) + \frac{\beta}{a} \cdot \left(x_s-x_0 + \frac{1+a x_s}{a} \cdot \ln(1+a(x_s-x_0))\right) \end{aligned} \quad (13)$$

I Ligning 13 er der brugt en Taylor række tilnærmelse af første orden for at løse integralet, og baseret på en numerisk analyse har denne tilnærmelse vist sig tilstrækkelig nøjagtig for $\beta \cdot (x_s - x_0) < 1$.

$$FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{x_s-\infty} = \int_{x_s}^{\infty} \alpha e^{-\beta(x-x_0)} dx = \frac{\alpha}{\beta} \cdot e^{-\beta(x_s-x_0)} \quad (14)$$

For $x_s \leq x_0$

$$FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{0-x_s} = p_0 \cdot \int_0^{x_s} \frac{1}{1+a(x_s-x)} dx = \frac{p_0}{a} \cdot \ln(1+a x_s) \quad (15)$$

$$FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{x_s-x_0} = p_0 \quad (16)$$

$$FracDrift \cdot p(\text{tilstede} | \text{flyver})|_{x_0-\infty} = \alpha \int_{x_0}^{\infty} e^{-\beta(x-x_0)} dx = \frac{\alpha}{\beta} \quad (17)$$

Nu er det muligt at beregne en relativ risiko, hvis de nødvendige oplysninger forligger om et dyrs følsomhed for en udbringning af pesticidet (Dose og Toksicitet) samt om dyrets adfærd med at flyve i forskellige afstande fra brinken ($p_0, \beta, (\alpha)$) samt om afdrift funktionen for pesticidet (a).

I Tabel 15 vises et eksempel på en beregning. Her er brugt værdier for *Ephemera danica* og lambda-cyhalothrin. LD50 værdien er fra dette projekt, mens oplysninger om dosering er taget fra Vejledning i Planteværn. De anslåede værdier er taget som kvalificerede estimater ud fra forskellige kilder. Det ses i dette eksempel, at insekter, der opholder sig, hvor der sprøjtes, er udsat for reel risiko med en værdi på 2.25, men risikoen falder, når der tages hensyn til, at en del insekter slet ikke opholder sig på markfladen under sprøjtning. Den samlede risikofaktor på 0,46 er dog stadig i "nærheden" af 1 og derfor en indikation for en vis risiko. Dertil kommer, at værdien for døgnfluens overfladeareal er det effektive areal, det vil sige skyggearealet, og ikke det totale. Formålet med denne tabel er at vise opbygningen af indikatoren med brug af realistiske værdier.

TABEL 15. Eksempel på en beregning

Art:	Ephemera danica		
Vægt:	0,012		g (Anslået)
Effektivt areal:	0,4		cm² (Anslået)
Middel:	Lambda-cyhalothrin		
Standard Dose:	150	ng/cm²	0.015 kg/ha
LD50	2	ng/g	
a:	10		anslået
x_s :	2	m	
x_0 :	1	m	Anslået, ud fra forudsat brinkvegetations bredde på 1 m
p_0 :	0,5		Anslået
β :	0,1		Anslået
α :	0,05		Beregnet ud fra x_s , x_0 og p_0 (Ligning 11)
$f^*p 0-x0$:	0,032331		Ligning 12
$f^*p x0-xs$:	0,26437		Ligning 13
$f^*p xs-infint$:	0,452419		Ligning 14
	p(flyv)		
Måned		p(udbr)	p(flyv)*p(udbr)
Majb	0,3	0,2	0,06
Junia	0,4	0,3	0,12
JUnib	0,3	0,3	0,09
Julia	0	0,15	0
Julib	0	0,05	0
$\frac{D_0}{LD50}$	75 g/cm ²	Potentiel belastning fra pesticidet (iboende belastning)	
$\frac{InsectArea}{InsectWeight}$	33 cm ² /g	Dyrets fysiske sårbarhed	
$\frac{D_0}{LD50} \cdot \frac{InsectArea}{InsectWeight}$	2,25	Risikofaktor for insekt, der oversprøjtes, da den er over 1 indikere det en reel risiko.	
$p(udbringning måned) \cdot p(flyver måned)$	0,27	Sammenfald mellem flyvetid og udbringning af pesticid	
$FracDrift \cdot p(tilstede flyver)$	0,75	Sammenfald mellem dyrets ophold og hvorhenne der sprøjtes	
R_{indiv}	0,46	Samlet risikofaktor	

9. Erfaringer fra pilotprojektet

9.1 Tilvejebringelse af voksne forsøgsdyr

Indsamling af voksne insekter blev foretaget ved lysfælder, Malaisefælder eller ketsjer. Metoderne er velafprøvede og fungerede i princippet udmærket. Der er dog en række ulemper. Først og fremmest kan det være vanskeligt at indsamle tilstrækkeligt antal. Dernæst kan der være en betydelig dødelighed i forbindelse med især Malaisefælderne, hvor de opsamlede dyr dør eller skades i opsamlingsbeholdere, inden disse tømmes. Dette problem kan utvivlsomt løses ved at anvende netbure i stedet for beholdere. Endelig er det et problem, at alderen på de indsamlede individer ikke er kendt. Dette har uheldig indflydelse på dyrenes anvendelse i forsøgene, først og fremmest i form af øget dødelighed.

Samlet set viste det sig vanskeligt at fremskaffe de forudsatte og nødvendige antal forsøgsdyr. Det var således nødvendigt at udelade enkelte arter og søge disse erstattet med andre. Det var overordnet forudsat, at langt de fleste arter skulle indsamles som enten nymfer/larver eller pupper, og de voksne søges klækket under laboratorieforhold. Kun enkelte skulle alene indsamles som voksne, fordi det vurderes vanskeligt at opnå tilstrækkelig succes ved at klække de voksne under de givne laboratorieforhold.

Vanskelighederne kan kort sammenfattes således:

- Arten var ikke til stede på de formodede egnede lokaliteter på det ønskede tidspunkt (eksempel: *Prodiamesa olivacea*).
- Arternes juvenile alder var så fremskreden, at det ikke var muligt at indsamle juvenile individer til klækning, hvorfor der i stedet blev indsamlet voksne (eksempel: *Nemoura cinerea*).
- Det lykkedes at indsamle det ønskede antal juvenile individer (nymfer/larver), men selve "produktionen" af voksne lykkedes kun i meget begrænset omfang. Årsagen vurderes at være ringe overlevelse af nymfer/larver pga. for stor tæthed i de anvendte containere (eksempler: *Leuctra fusca*, *Isoperla grammatica*, *Anabolia nervosa*) med deraf følgende mulig indbyrdes prædation og/eller for ringe mængde byttedyr (eksempel: *Isoperla grammatica*). Den ringe overlevelse blev formodentlig yderligere forstærket for de arter, som skulle opholde sig relativt lang tid i containerne og evt. yderligere skulle forpuppe sig (*Anabolia nervosa*).
- "Timing" af tilvejebringelsen af forsøgsdyrene (dvs. at det nødvendige antal var til stede, præcis når det planlagte forsøg skulle gennemføres) var i flere tilfælde et problem.

Størst succes mht. produktion af voksne blev opnået for *Ephemera danica*, som blev indsamlet umiddelbart inden de under naturlige forhold skulle klækkes, og *Agapetus ochripes*, der blev indsamlet som pupper.

Selve klækningen fra nymfer/pupper til voksne kan desuden have været et problem, men vurderes generelt ikke at have været det.

9.2 Håndtering og eksponering

Som det altid er tilfældet, når man arbejder med "nye" forsøgsdyr, krævede de testede arter lidt træning af dem, der udførte forsøgene. Det lykkedes at håndtere og eksponere alle arter på forsvarlig vis, men især for nogle af de mindste arter (*A. ochripes*, *H. angustipennis* og *N. cinerea*) var der et vist spild i form af dyr, der blev skadet af "fejlhåndtering".

9.3 Forsøgsperiodens længde

På trods af en forventning om at nogle arter, specielt *E. danica* og i nogen grad *A. ochripes*, ville være meget kortlivede og derfor blev tilset også i de første timer efter pesticideksponeringen, viste det sig i vore set-up muligt at køre testene for alle arter i min. 24 timer, uden at varigheden påvirkede kontroldødeligheden. De præsenterede data stammer fra observationer fra den forsøgsperiode, der tydeligst viste effekten af pesticiderne.

9.4 Vurdering af de undersøgte arters anvendelighed som testorganismer

Denne vurdering adresserer dels muligheden for at indfange voksne individer eller klækning af disse i laboratoriet, dels hvor nemme dyrene var at håndtere i forbindelse med udførelsen af testene og kontroldyrenes dødelighed.

E. danica blev som beskrevet indsamlet som store nymfer. Klækningsraten var lidt mindre end forventet, men vi opnåede dog dyr nok til at gennemføre de planlagte test af den akutte toksicitet. Det kræver lidt øvelse at skelne sub-imago fra imago, men til gengæld er arten så stor og forholdsvis robust, at den er let at håndtere i forsøgsøjemed. Vi havde forventet at måtte opføre overlevelsen efter 4 timer på grund af den korte livslængde, men det viste sig muligt også at måle overlevelsen 24 timer efter eksponering, uden at kontroldødeligheden var for stor. LD₅₀ kunne bestemmes med et forholdsvis smalt konfidensinterval, idet forskellen mellem øvre og nedre grænse i 95 % konfidensintervaller var ≤ en faktor 10.

L. fusca blev indsamlet som nymfer i stort antal, men klækningssuccessen var meget begrænset, hvorfor vi ikke kunne gennemføre de planlagte test i fuldt omfang. Arten er forholdsvis let at håndtere, men kontroldødeligheden i vore forsøg var for høj, og sammen med det lave antal dyr betød det, at usikkerheden på bestemmelsen af LD₅₀ var meget stor.

N. cinerea blev indsamlet som voksne individer, men det viste sig, at indsamlingsperiodens længde var kortere end forventet, så vi ikke fik dyr nok til testen med Confidor (imidacloprid). Det var tidskrævende at skille arten fra de to andre arter, som blev fanget samtidig, og selvom *N. cinerea* var nogenlunde håndterbar trods sit bløde ydre, var kontroldødeligheden for høj. På grund af disse forhold blev bestemmelsen af LD₅₀ meget usikker.

I. grammica blev indsamlet som nymfer, og klækningsraten af voksne var meget lav, så kun range-finding med Confidor (imidacloprid) blev gennemført.

A. ochripes blev indsamlet i puppestadiet, og der klækkede et stort antal voksne. På grund af deres størrelse og skrøbelighed krævede det nogen øvelse og tilpasning af metoder at håndtere dyrene, og dette kan have haft betydning for kontroldødeligheden i de første test med Karate. Bestemmelsen af LD₅₀ var behæftet med en ret høj usikkerhed, idet forskellen mellem øvre og nedre grænse i 95 % konfidensintervaller i nogle test var en faktor 500.

H. angustipennis blev indsamlet som voksne individer i tilstrækkeligt antal til at gennemføre de planlagte test. Kontroldødeligheden var dog for høj, især i testen med Karate, hvilket måske hænger sammen med, at det kræver øvelse at håndtere de forholdsvis små og bløde dyr. Dette giver sig også udslag i et stort konfidensinterval for LD₅₀-værdien. Der blev indsamlet med to metoder (lysfælder, ketsjer), begge fuldt anvendelige.

A. nervosa blev i første omgang indsamlet på larvestadiet, men da klækningssuccessen i laboratoriet var alt for ringe, måtte vi indsamle voksne individer til testene. Der kunne dog ikke indsamles individer nok til de ønskede 10 dyr pr. koncentration. Dette afspejler sig sammen med en lidt høj dødelighed af kontroldyr i en stor usikkerhed på bestemmelsen af dosis-respons-sammenhængen.

9.5 Potentielle arter til brug for fremtidige toksikologiske test med voksne

Fremtidige standardtest kræver frem for alt reproducerbarhed. Dette forudsætter ideelt set, at en art kan holdes i kultur, således at det kan sikres, at det nødvendige antal testdyr er til stede på et givet tidspunkt. For at dette skal kunne lykkes, er det en fordel, hvis artens generations-tid er kort. Desuden skal det være muligt at holde den under relativt simple laboratorieforhold og ikke mindst i passende store tætheder, uden at dette resulterer i stor dødelighed. I forbindelse med håndteringen af de voksne individer under de egentlige toksikologiske test, skal dyrene være passende robuste, ligesom det skal være nemt at identificere hanner og hunner. Livslængden for det enkelte individ skal være væsentligt længere end den ønskede testperiode for at hindre kontroldødelighed.

Arterne anvendt i nærværende pilotundersøgelse er enten ét-årige eller kræver 2-3 år til at gennemføre fuld udvikling. Sidstnævnte vurderes umiddelbart for vanskelige at anvende i kultur, idet det dog er gjort for en amerikansk art af døgnfluer (Lawrence 1981). Derimod burde samtlige én-årige arter, hvis juvenile stadier enten er græssere eller detritusædere, være relativt enkle at holde i kultur, hvorimod rovdyr bør undgås. Det vurderes dog som en forudsætning, at opdrætsanlæggene skal være så store, at individtætheden ikke bliver så stor, at det medfører overdødelighed. Dette var langt fra tilfældet i pilotforsøgene.

Samtlige anvendte arter kunne relativt enkelt kønsbestemmes, forudsat at de forinden blev bedøvet. Brug af CO₂ til bedøvelse synes at være en god løsning.

Voksne slørvinger og vårfluer vurderes som udgangspunkt som relativt robuste, når de skal håndteres. Små arter er dog helt klart vanskeligere at håndtere sammenlignet med større arter (Tabel 16).

Vi skal umiddelbart pege på to arter, som har potentiale som testarter:

- *Nemoura cinerea*: Vurderes som relativt nem at holde, fordi nymferne stiller relativt små krav til strøm- og iltforhold, er detritusædere (som vil kunne opfostres på kunstigt foder), samt relativt robust som voksen. Der kan dog muligvis være et problem med at fodre de voksne, således at de overlever længe nok til at lægge æg.
- *Agapetus ochripes/fuscipes*: Er muligvis relativt nem at holde, forudsat at der skabes gode ilt- og strømforhold. De voksne er relativt robuste, ligesom de ikke kræver føde for at overleve til æglægning.

Imidlertid vurderes det mere optimalt at anvende arter, som allerede med succes har været anvendt i kultur, også selvom de ikke er "typiske" repræsentanter for særligt strømkrævende vandløbsinsekter. Det gælder således dansemyggene *Chironomus riparius* (McCahon & Pascoe, 1988) og *Prodiamesa olivacea* (Møhlenberg et al. 2004). Især førstnævnte anvendes som standardorganisme, fordi den er nem at holde i kultur og gennemfører en generation på relativt kort tid (måneder). Den vurderes også, trods sin relative spinkelhed, som relativt robust og håndterbar. Desuden kan kønnene let adskilles. Dette forudsætter dog kendskab til deres følsomhed relativt til de andre grupper af akvatiske insekters voksenstadier, og ideelt at deres følsomhed ligger fornuftigt midt i følsomhedsfordelingen for de øvrige.

TABEL 16. Vurdering af de undersøgte vandinsekters egenskaber med hensyn til egnethed som forsøgsdyr ved undersøgelser af voksenstadiers pesticidfølsomhed.

Art	Indsamling	Laboratorie op-dræt	Håndter-barhed	Kønsbestem-melse	Kontrol døde-lighed
Ephemera danica	Relativt enkel (juv.)	Relativt enkel	Relativt nem	Relativt nem	Relativt lille
Isoperla grammatica	Relativt enkel (juv.)	Svær	Relativt nem	Relativt nem	Relativt lille
Leuctra fusca	Relativt enkel (juv.)	Svær	Relativt nem	Relativt nem	Uacceptabelt stor
Nemoura cinerea	Vanskelig (ad.)	Relativt enkel	Relativt vans-kelig	Relativt nem	Uacceptabelt stor
Agapetus ochripes	Nem (pup.)	Relativt enkel	Relativt vans-kelig	Relativt nem	Relativt stor
Hydropsyche angustipennis	Relativt nem (ad.)		Relativt vans-kelig		Relativt stor
Anabolia nervosa			Relativt nem		Relativt stor

10. Samlet diskussion

Projektets formål var at undersøge følgende hypoteser:

1. Følsomheden over for insekticider hos voksne vandløbsinsekter varierer (kan rangordnes), og variationen er den samme som for arternes akvatiske stadier.
2. Ikke-dødelige doser kan via direkte (topikal) eksponering medføre væsentlige effekter på de voksne vandinsekters reproduktion.
3. Indtagelse af pesticideksponeret føde medfører væsentlige effekter på voksne vandinsekter, og arter med fødesøgning i det voksne stadium har derfor ekstra høj risiko for pesticidpåvirkning.
4. En væsentlig del af vandløbsinsekterne er – set i forhold til biodiversitet eller funktionel betydning i vandløbsøkosystemerne – potentielt i risiko for at blive alvorligt påvirket af insekticider i forbindelse med marksprøjtning og efterfølgende vinddrift.

Følsomheden over for insekticider hos voksne vandløbsinsekter varierer (kan rangordnes), og variationen er den samme som for arternes akvatiske stadier.

Studiet af seks arters følsomhed for Confidor og Karate viste, at der var stor variation i dyrenes følsomhed for de to insekticider. Det samme ser man hos voksenstadier af rent terrestriske insekter, hvor Hardstone og Scott (2010) i et review fandt at LD50 for imidacloprid varierede mellem 0,001-133 $\mu\text{g g}^{-1}$. Ligeledes var der ingen tendens til, at man ud fra kendskab til følsomheden for det ene insekticid kunne sige noget om samme arts følsomhed for det andet insekticid. Der var med baggrund i de relativt få testede arter ikke tendens til, at nogle af insektfamilierne generelt var mere følsomme end andre, hverken på individ niveau eller med udgangspunkt i deres biomasse. Der blev heller ikke fundet nogen sammenhæng mellem følsomheden for lambda-cyhalothrin hos juvenile og voksne.

Alt i alt betyder det, at der ikke er nogen oplagte genveje uden om mere viden til at gennemføre risikovurdering af effekter af insekticider på voksne stadier af akvatiske insekter. Den anbefalede dosering for lambda-cyhalothrin ligger mellem 7 og 15 g a.s./ha. Ved en afdrift på 2,5% svarer det til en afsætning på 0,002 – 0,004 $\mu\text{g a.s./cm}^2$. De to 2,5% afdrift stemmer godt overens med resultater fra det netop afsluttede PENTA forsøg (Strandberg et al. subm), der anvendte afdriftsreducerende dyser og bestemte afsætningen i naboarealet til 2,8% af markdosis (Strandberg et al. subm). Døgnfluen *Ephemera danica*'s overfladeareal og vægt kan estimeres til henholdsvis 1,3 cm^2 og 12 mg tør vægt. Dette svarer til, at et individ af denne art, der udsættes for 2,5% afdrift, modtager en dosis på 0,005 $\mu\text{g a.s.}$ ved den højeste markdosis. I vores forsøg fandt vi, at LD50 for *Ephemera danica* var 0,006 $\mu\text{g a.s./individ}$. Dette indikerer, at anerkendte størrelsesordner af afdrift nær marker (Schmitz et al 2013, 2014) kan have betydning for nogle akvatiske arters voksenstadier, der befinder sig i den ripariske zone, hvor denne grænser op til marker der sprøjtes.

Ikke-dødelige doser kan via direkte (topikal) eksponering medføre væsentlige effekter på de voksne vandinsekters reproduktion

Da det kun lykkedes at undersøge denne problemstilling for en enkelt art, er det begrænset, i hvilken grad dette projekt kan bruges til at generalisere om effekter af subletale doser på adfærd og reproduktion. Observationerne af vårfluen *Agapetus ochripes* viste imidlertid, at doser, der på baggrund af korttidseksponeringer (akut toksicitet) betegnes som subletale, ved eksponering over længere tid (samlet observationsperiode 5 dage) resulterede i signifikant øget dødelighed og reduceret reproduktiv adfærd, ligesom der var en tendens til lavere ægproduktion.

Umiddelbart efter eksponering over for imidacloprid observerede vi hyperaktivitet, hvor dyrene løb i cirkler og sparkede krampagtigt. Lignende effekt af imidacloprid er tidligere observeret hos humlebier (Desneux et al 2007, Blacqui re et al. 2012), men samlet var der for både imidacloprid og lambda-cyhalotrin signifikant reduceret parringsadfærd sammenlignet med kontrol dyr. Tilsvarende reduceret aktivitet er også dokumenteret for bier (Blacqui re et al. 2012) og for asiatisk tr buk (Russell et al. 2010).

Reduceret aktivitet kan have negativ indflydelse på succesfuld parring og æglægning og desuden øge risikoen for prædation (Lima 1998). I projektet fandt vi hos *Agapetus ochripes* en tendens til reduceret æglægning, men der var ingen signifikant forskel mellem æglægning hos kontrol dyr og eksponerede dyr; dog lagde imidacloprid-eksponerede dyr ingen  g.

Samlet set indikerer denne del af undersøgelsen, at eksponering af det terrestriske voksenstadium hos vandløbsinsekter med subletale insekticiddoser kan have signifikant negativ effekt på adfærd og reproduktion og dermed vil kunne medføre reducerede populationsst relser hos disse insekter.

Potentiel risiko

Vi udvalgte et relativt stort antal arter af vandløbsinsekter til belysning af, hvordan den samlede biodiversitet af denne gruppe ved danske vandløb er relateret til arternes biologi i form af for insekticidpåvirkning relevante egenskaber, de såkaldte "biological traits". Spørgsmålet er derfor, i hvor høj grad de udvalgte arter er repræsentative for den samlede artspulje af danske vandløbsinsekter.

Dette spørgsmål er ikke let at besvare. Først og fremmest mangler der åbenlyst biologiske data for de mange arter, som findes i danske vandløb, ligesom problemstillingen så vidt vi ved ikke er undersøgt overhovedet, hverken i Danmark eller udlandet.

For flyvetider er der dog enkelte upublicerede data at sammenligne med. Grøn (1980) undersøgte således bl.a. voksne sl rvingers "fænologi" (tidlige forekomst) ved hhv. en lille skovb k og tre kildebække i Østjylland. Samlet set forekom der 11 arter, som optrådte som voksne fra primo marts til primo juli (10 arter) og medio august til ultimo september (1 art). Omkring 80% af arterne og 98% af individerne forekom i perioden primo maj til ultimo juni. Tilsvarende undersøgelse af fænologien hos voksne vårfluer ved en anden primært kildef dt  stjysk bæk viste, at 60% af populationerne af de 16 dominerende arter forekom i perioden ultimo juni til primo august, men også yderligere 10% af disse populationer i perioden ultimo september til primo oktober (P. Wiberg-Larsen, upublicerede data). Tilsvarende var ca. 60% af arterne til stede fra ultimo april til ultimo november. De nævnte undersøgelser er naturligvis kun små "stikprøver", som blot repræsenterer to om end vigtige insektordener. Undersøgelserne antyder imidlertid, at de udvalgte arter fra disse grupper med en vis sandsynlighed er rimelig repræsentative for danske slørvinger og vårfluer, som lever i vandløb. Om artsudvalget for de øvrige insektgrupper ligeledes er repræsentativt vides ikke, men vi vurderer, at det er sandsynligt. Vi vurderer derfor, at de primære spr jteperioder med insekticider tidsmæssigt må antages at udgøre en potentiel og væsentlig trussel for de voksne stadier af danske vandløbsinsekter.

For de øvrige biologiske egenskaber m.v. (levetid, hyppighed, rødliste-status, fødeoptagelse, fekunditet og ophold i riparisk zone) har det ikke – som for flyvetiderne – været muligt at foretage i det mindste forsigtige test af, om de udvalgte arter er repræsentative. Vi vurderer dog, som for de voksnes forekomst, at de udvalgte arter på rimelig vis afspejler forholdene for danske vandløbsinsekter generelt.

Levetiden hos de voksne varierede betydeligt. Kort levetid skønnes umiddelbart at betyde en relativt mindre risiko for at blive påvirket af insekticid-tilførsel, mens længere levetid øger

denne risiko. Kun en relativt lille del af populationerne af arter med lang flyvetid og kort levetid vil således være i risiko i forbindelse med få, kortvarige sprøjtninger, mens relativt lang levetid øger risikoen.

For fødeoptagelse hos de voksne vurderes det, at denne medfører en øget potentiel risiko for at blive påvirket af insekticider via kontaminering af føden, en risiko som er større end for arter uden fødeoptagelse.

For at en population skal kunne opretholdes over lang tid, kræves det – i gennemsnit – at hver hun efterlader sig to reproducerende efterkommere. Fekunditeten (antal æg/afkom pr. hun) er overordnet relateret til den naturlige dødelighed hos de efterfølgende stadier (de lagte æg, nymfe- og larvestadiet, det evt. puppestadium og voksenstadiet). De relativt få undersøgelser af dødelighed tyder på, at denne er høj. Således er dødeligheden hos voksne *Baetis vernus* og *B. rhodani* (inden æglægningen er udført) væsentlig over 90% (Werneke & Zwick 1992), og noget tilsvarende må formodes at være tilfældet under ungdomsstadierne. Det må derudover antages, at der er en positiv sammenhæng mellem ægtalet og størrelsen af den efterfølgende dødelighed. De nævnte *Baetis*-arter lægger således 1000-4000 æg og har øjensynlig generelt en høj dødelighed. Voksensdødeligheden er også over 90% hos visse vårfluer (Enders & Wagner 1996, Jackson & Fisher 1986), mens dødeligheden var væsentlig lavere (30%) hos slørvingen *Leuctra nigra* (Petersen et al. 2006), der lægger ca. 240 æg (Elliott 1987). Muligvis er dødeligheden samlet set også markant lav hos de såkaldte klobiller, som kun lægger ca. 10 æg. Spørgsmålet er så bare, i hvor høj grad en "overdødelighed" i forbindelse med insekticidpåvirkning har indflydelse på arter med hhv. høj og lav fekunditet og høj og lav naturlig dødelighed. Umiddelbart skønnes betydningen at være størst for arter med lav fekunditet og naturlig lav dødelighed.

Risikoen for at blive påvirket af insekticider afhænger af arternes levesteder. Arter, som er vidt udbredte, dvs. forekommer i mange vandløb, har overordnet set stor risiko for at blive "ramt". Til gengæld er de netop vidt udbredte og dermed formodentlig over tid i stand til at genopbygge deres tidligere udbredelse, forudsat at de ikke alt for hyppigt rammes igen. Sjældne arter vil til sammenligning have meget vanskeligere ved at tackle en påvirkning. Til gengæld lever de muligvis på steder, hvor risikoen for påvirkning er lille. Det sidste gælder formodentlig også for arter, som er rødliste-vurderet til kategorierne "near threatened" og ikke mindst "vulnerable" (hhv. relativt sjældne og sjældne arter, som ikke umiddelbart er vurderet at være i akut tilbagegang). Formodningerne er dog ikke søgt efterprøvet, hvilket i givet fald er vanskeligt.

Den ripariske zone synes at være helt essentiel for det store flertal af voksne vandløbsinsekter (Collier & Smith 1998, Petersen et al. 2004). Her foregår de fleste af arternes aktiviteter, som "søgen skjul" for at undgå prædation, fødesøgning, sværmning og parring. Karakteren af den ripariske zone er uden tvivl meget essentiel for disse aktiviteter, selvom der kun findes få undersøgelser af dette. Tæt skov skaber et relativt køligt klima med høj luftfugtighed, hvilket øger overlevelsen for mange arter (Jackson 1988; Chen et al. 1993; Collier & Smith 2000). Tæt vegetation vides at hæmme spredningen hos dansemyg, døgnfluer og vårfluer (Larsen 1999, Delettre & Morvan 2000), mens dette tilsyneladende ikke er tilfældet hos visse arter af slørvinger og andre vårfluer (Petersen et al. 1999, Briers et al. 2002, Petersen et al. 2004). Tæt vegetation kan desuden direkte og indirekte betyde større fødeudbud for visse slørvinger og vårfluer (Sweeny 1993, Smith & Collier 2000), men vil samtidig gavne potentielle prædatorer som fx edderkopper og småfugle (Briers et al. 2004). Den ripariske korridors udseende kan således have betydning for de voksne insekters laterale spredningsmuligheder, om end samspillet mellem de betydende faktorer er yderst kompliceret. Kun relativt få individer bevæger sig dog samlet set uden for denne zone. Og den ripariske zone er derfor vigtig i forhold til insekticidpå-

virkning via vinddrift fra sprøjtning af afgrøder på de tilstødende marker. Men nogle arter bevæger sig væsentligt længere bort fra vandløbet og er derfor potentielt i risiko for kontaminering med større doser af insekticid, hvis de bevæger sig ind over markerne.

Risikomodel

Risikomodellen estimerer forholdet mellem en mulig eksponering og en følsomhed over for denne eksponering, hvilket bygger på samme grundlæggende princip som det, der anvendes i risikovurderingen af kemikalier. En værdi over 1 indikerer en risiko for påvirkning, mens en værdi under 1 indikerer en mindre eller slet ingen risiko for påvirkning. Påvirkningen beregnes ud fra: (1) Det iboende toksiske effektpotentiale for behandlingen; (2) Den fysiske størrelse af dyret; (3) Sandsynligheden for at dyret opholder sig, hvor det kan eksponeres fra sprøjtning; (4) Sandsynligheden for at dyret flyver på det tidspunkt, der sprøjtes. Det er et simpelt indeks, der tager udgangspunkt i et standardscenarie, der primært skal ses som et relativt indeks, som kan udpege de mest udsatte dyr og de mest problematiske pesticider. Eksemplet i kapitel 8 viser beregningen for *Ephemera danica*, men modellen kan anvendes på andre arter.

Der kan dog være stor usikkerhed om arters spredning fra vandløbet samt deres følsomhed, så modellen kunne evt. primært konsekvensregne forskellige mulige kombinationer af funktionelle egenskaber (traits) i form af spredning og følsomhed. Dette vil så efterfølgende kunne bruges til at vurdere, hvilke funktionelle egenskaber ved insekterne, der giver højst risiko. Man vil også kunne bruge modellen til at vurdere effekter af sprøjtefrie randzoner med forskellig bredde.

11. Konklusioner

Pilotprojektet har vist:

LD₅₀ hos de terrestriske voksenstadier varierer mellem arter af voksenstadiet af de forskellige arter af vandinsekter (Kapitel 4).

Rangordningen af følsomheden for de to insekticider er forskellig hos de seks testede arter (Kapitel 4 og 5).

Rangordningen for lambda-cyhalothrin er forskellig for voksne og juvenile. Vi fandt ikke data på test af imidacloprid på juvenile stadier af de arter, vi har arbejdet med (Kapitel 5). Forskellene i rangordning tyder på, at også voksendyrene bør indgå i risikovurderingen af pesticider. Forsøgene med effekter af subletale doser blev kun gennemført for en art, *Agapetus ochripes*. Disse forsøg viste, at der var effekter på adfærd og reproduktion, og at dødeligheden ved de subletale doser forøgedes over tid relativt til kontroldyrene. Det vil sige, at der for arter, der ikke er fødesøgende, godt kan ske en påvirkning som følge af lave doser, hvis deres voksenstadium er sammenfaldende med en periode, hvor der sprøjtes med insekticider (Kapitel 6).

Det var vanskeligere end forventet at gennemføre forsøg med effekter via fødeindtag i form af alger for slørvinger og i form af nektar for vårflyer. Pilotprojektet viste, at en succesfuld gennemførelse af sådanne forsøg som minimum kræver, at man har adgang til kulturer af de pågældende arter eller til indsamling af et stort antal arter, at man har forhåndskendskab til den dosis, der skal anvendes, og at man har forhåndskendskab til de respons, der skal observeres (Kapitel 6 og 9).

Der er et stort overlap mellem tidsrum for anvendelse af insekticider og perioden, hvor arterne optræder som voksne, hvilket peger på, at der kan være risiko for voksendyr, hvor deres habitat ligger nær landbrug med pesticidanvendelse (Kapitel 7 og 8). Det er således realistisk, at nogle arters voksenstadier i væsentligt omfang bliver påvirket i områder, hvor den ripariske zone grænser op til landbrug med anvendelse af lambda-cyhalothrin (Kapitel 7 og 8).

Pilotprojektet har endvidere indikeret at:

Eftersom det ikke lykkedes at gennemføre forsøg med pesticidindtag via føden, er det mere usikkert, i hvilken grad arterne påvirkes af imidacloprid, som overvejende anvendes til bejdning af frø og i mindre grad udsprøjtes.

12. Perspektivering

12.1 Administrative perspektiver

Den manglende overensstemmelse mellem rangordningen af juvenile og voksne insekter viser, at hvis man vil gennemføre en mere sikker risikovurdering, bør begge livsstadier inddrages. Påvisningen af, at der er et tidsligt og rumligt sammenfald mellem flyvetid for flertallet af de akvatiske insekters voksenstadier og hovedsæsonen for sprøjtemiddelanvendelse, viser, at der er stor sandsynlighed for, at der sker en påvirkning af mange akvatiske insekters voksenstadie. Hvis dette skal undgås, vil det være nødvendigt at mindske påvirkningen af den ripariske zone, hvor flertallet af disse non-targetinsekter befinder sig. Dette kan gøres ved at øge bredden af den sprøjtefri bufferzone eller påbyde brug af afdriftsreducerende dyser omkring disse dyrs levesteder, hvilket i praksis vil sige søer og vandløb. Et andet virkemiddel kunne være at give ekstra støtte til økologisk omlægning sådanne steder.

12.2 Forskningsmæssige perspektiver

Pilotprojektet har vist, at der potentielt kan ske en påvirkning af det terrestriske voksenstadie af vandlevende insekter. Dette er dog ikke i sig selv et mål for effekter på populationsniveau. Der sker under alle omstændigheder ofte et stort tab af individer i voksenstadiet, og det er et åbent spørgsmål, om pesticidpåvirkningen øger dette tab i en grad, der medfører betydende populationsændringer. Det må forventes, at det sker for nogle arter og artsgrupper. Faktorer som flyvetid for art og individ, fødeindtag og sjældenhed må forventes at skulle inddrages i fremtidige undersøgelser af effekter på populationsniveau.

I dette pilotprojekt lykkedes det ikke at gennemføre de planlagte forsøg med fødeindtagelse hos de akvatiske insekter. Dette aspekt er dog vigtigt, da afsætning af midler i dyrenes føde kan påvirke ud over den periode, hvor pesticiderne medfører direkte eksponering via afsætning på dyrene. Pilotprojektet peger på nogle af de udfordringer, der skal overvindes for at undersøge effekter af fødeoptag på terrestriske stadier af vandlevende insekter. Det betyder, at (i) der ideelt set bør etableres kulturer af arter, der er velegnede til studiet af fødeoptag, (ii) arternes akutte følsomhed for de pågældende sprøjtemidler skal være kendt, da det viste sig vanskeligt først at undersøge følsomheden i rangefinding og akut-test og derefter subletale effekter på grund af den korte varighed af det stadium, hvor de ville indtage føde, (iii) der skal udvikles metoder til kontrolleret eksponering af føden i de tilfælde, hvor dyrene kun vil indtage algeføde direkte fra grene, og (iv) det vil være nødvendigt at måle den reelle eksponering af testdyrene.

Sandsynliggørelsen af at voksne vandløbsinsekter bliver udsat for pesticider og herunder insekticider har betydning for de arter, som spiser disse insekter, fx akvatiske og terrestriske rovinsekter, små pattedyr, fisk og fugle. Dette er dog ikke meget forskelligt fra den påvirkning, der i øvrigt sker, når terrestriske insekter uden akvatisk livsstadie udsættes for afdrift af herbicider i marknære habitater. Den væsentligste forskel er nok, at det for flertallet af de akvatiske insekter må forventes, at en større andel af de påvirkede insekter ender i vandmiljøet, alene af den årsag at voksenstadier af akvatiske insekter af natur for manges vedkommende opholder sig nær og over vandmiljøet. Umiddelbart er en sådan påvirkning af vandløbsmiljøet næppe særlig stor. Dette pilotprojekt havde dog ikke som formål at afdække denne problematik. Perspektivet er derfor i dette tilfælde, at det er usikkert, hvor stor betydning sådanne sekundære forgiftningsveje har for andre organismer, og at fremtidige undersøgelser må afdække denne problematik betydning både i det akvatiske og det terrestriske miljø.

Referencer

- Armitage, PD, Cranston, PS & Pinder, LCV (1995) The Chironomidae. Biology and ecology of non-biting midges. Chapman & Hall, 572 s.
- Becker, G. (1991). Ovipositing behaviour of *Agapetus Fuscipes* (Trichoptera:Glossosomatidae) In a small central european upland stream. Proceedings of the Sixth international Symposium on Trichoptera, Poland 12-16 September 1998: 143-147.
- Becker, G., 2005. Life cycle of *Agapetus fuscipes* (Trichoptera, Glossosomatidae) in a first-order upland stream in central Germany. *Limnologica* 35: 52–60
- Beer-Stiller, A & Zwick, P (1995) Biometric studies of some stoneflies and a mayfly (Plecoptera and Ephemeroptera). *Hydrobiologia* 299: 169-178.
- Beketov, M, Kefford, B, Schäfer, RB, Liess, M (2013) Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Science* 110: 11039-11043.
- Blacqui re, T., Smagghe, G., van Gestel, C. A. M. & Mommaerts, V. (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992
- Briers, R.A., Cariss, H.M. & Gee, J.H.R. (2002) Dispersal of adult stoneflies (Plecoptera) from upland streams draining catchments with contrasting land-use. *Archiv f r Hydrobiologie* 155: 627-644.
- Briers, R.A., Gee, J.H.R., Cariss, H.M. & Geoghegan, R. (2004) Inter-population dispersal by adult stoneflies detected by stable isotope enrichment. *Freshwater Biology* 49: 425-431.
- Bruus, M, Andersen, HV, L fstr m, P, Kj r, C, Glasius, M, Jensen, B, Strandberg, MT, Bak, JL, Hansen, KM, Bossi, R (2008) Omfang og effekt af herbicidafdrift til l hegn. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen Nr. 120. 86 s.
- Chen, J.Q., Franklin, J.F. & Spies, T.A. (1993) Contrasting microclimates among clear-cut, edge, and interior of old-growth Douglas fir forest. *Agr. Forest Meteorol.* 63: 219-237.
- Collier K.J. & Smith, B.J. (1998) Dispersal of adult caddisflies (Trichoptera) into forests alongside three New Zealand streams. *Hydrobiologia* 361: 53-65.
- Conrad, KF, Willson, KH, Harvey, IF, Thomas, CJ, Sherratt, TN (1999) Dispersal characteristics of eleven odonate species in an agricultural landscape. *Ecography* 22: 524-531.
- Crichton, MI (1957) The structure and function of the mouth parts of adult caddisflies (Trichoptera). *Phil. Trans. R. Soc. London (B)* 241: 45-91.
- De Snoo, G.R., and P.J. De Wit. (1998) Buffer zones for reducing pesticide drift to ditches and risks to aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41:112–118
- Delettre, Y.R. & Morvan, N. (2000) Dispersal of adult aquatic Chironomidae (Diptera) in agricultural landscapes. *Freshwater Biology* 44: 399-411.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81–106
- Elbert, A., Becker, B., Hartvig, J., Erdelen, C. 1991. Imidacloprid – a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*.
- Elliott, J.M. (1987) Egg Hatching and Resource Partitioning in Stoneflies: The Six British Leuctra Spp.(Plecoptera: Leuctridae). *Journal of Animal Ecology*, Vol. 56, No. 2 (Jun., 1987), pp. 415-426.
- Enders, G. & Wagner, R. (1996) Mortality of *Apatania fimbriata* (Insecta: Trichoptera) during embryonic, larval and adult life stages. *Freshwater Biology* 36: 93-104.

- Estenik, JF & Federle, PF (1974) The susceptibility of an adult damselfly, *Ischnura verticalis*, to selected insecticides. *Ohio Journal of Science* 75: 81-82.
- Extence, CA, Balbi DM & Chadd RP (1999) River flow indexing using British benthic macroinvertebrates: A framework for setting hydroecological objectives. *Regulated Rivers-Research & Management* 15: 543-574.
- Fremling, CR (1960) Biology and possible control of nuisance caddisflies of the upper Mississippi River. *Iowa Agr. Home Econ. Expt. Sta. Res. Bull.* 483: 856-879.
- Friberg, N, Skriver, J, Larsen, SE, Pedersen, ML, Buffagni, A (2010): Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology* 55: 1405–1419.
- Georghiou, GP & Metcalf, RL (1961) A bioassay method and results of laboratory evaluation of insecticides against adult mosquitoes. *Mosq. News* 24: 328-337.
- Gill, RJ, Ramos-Rodriguez, O & Raine, NE (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491:105-109.
- Hardstone, M.C. & Scott, J.G. (2010) Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest. Manag. Sci.*, 66,1171–1180.
- Ivanov, V.D. (1997) Vibrations, pheromones, and communication patterns in Trichoptera. In: Holzenthal, R.W. & Flint, O.S., Jr. (Eds.) *Proceedings of the 8th International Symposium on Trichoptera*. Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, pp. 183–188.
- Ivanov, V. D. & Rupprecht, R. (1992) Substrate vibration for communication in adult *Agapetus fuscipes* (Trichoptera: Glossosomatidae). *Proceedings of the Seventh International Symposium on Trichoptera*, Umeå, Sweden, 3-8 August 1992: 273-278.
- Jackson, J.K. (1988) Diel emergence, swarming and longevity of selected adult aquatic insects from a Sonoran desert stream. *Amer. Midland Naturalist* 119: 344-352.
- Jackson, J.K. & Fisher, S.G. (1986) Secondary production, emergence, and export of aquatic insects of a Sonoran desert stream. *Ecology* 67: 629-638.
- Jeffery, GM (1956) Blood meal volume in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus* and *i.* *Exp. Parasit.* 5: 371-375.
- Kovats, ZE, Ciborowski, JJH. & Corkum, LD (1996) Inland dispersal of adult insects. *Freshwater Biology* 36: 265-276.
- Köhler, H & Triebelskorn, R (2013) Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341: 759-765
- Larsen, M.R. (1999) Spredning af voksne vårfluer (Trichoptera) og døgnfluer (Ephemeroptera) i tre forskellige vegetationstyper. *Specialrapport, Ferskvandsbiologisk Laboratorium, Københavns Universitet*, 65 pp.
- Lawrence, S. G. (ed.). (1981) *Manual for the culture of selected freshwater invertebrates*. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 54: 169 p.
- Liess, M & von der Ohe, PC (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 954-965.
- Liess, M, Schäfer, RB & Schriever, CA (2008) The footprint of pesticide stress in communities – Species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment* 406: 484-490.
- Lima S.L. (1998) Stress and decision making under the risk of predation: Recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advan Stud Behav* 27:215–290
- Ludvik, GP (1953) Topical application of insecticide solutions to *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Econ. Entomol.* 46: 364-365.
- McCahon, C.P. & Pascoe, D. (1988) Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17 (12), 2471-2480.

Mendl, H & Müller, K (1974) Die Plecopteren des Messauregebietes. – Ent. Tidskr. 95: 129-147.

Moeslund, J.E., Ejrnæs, R. & Wind, P. (2015) Manual til rødlistevurdering af danske arter 2013-2019. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 26 s. - Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 54 (<http://dce2.au.dk/pub/TR54.pdf>)

Mommaerts, V & Smagghe, G (2011) Side-Effects of Pesticides on the Pollinator *Bombus*: An Overview. I: Pesticides in the Modern World – Pest Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. Ed. M. Stoytcheva. InTEch, Croatia. Pp 507-552.

Nienstedt KM, Brock TCM, van Wensem J, Montforts M, Hart A, et al. (2012) Development of a framework based on an ecosystem services approach for deriving specific protection goals for environmental risk assessment of pesticides. Science of the Total Environment 415: 31–38.

OECD 1998a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test. No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test.

OECD 1998b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test. No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test.

Peterson, DG (1952) Observations on the Biology and Control of Pest Trichoptera at Fort Erie, Ontario. The Canadian Entomologist, 84, pp 103-107.

Petersen, I., Winterbottom, J.H., Orton, S., Friberg, N., Hildrew, A.G., Spiers, D.C. & Gurney, W.S.C. (1999) Emergence and lateral dispersal of adult Plecoptera and Trichoptera from Broadstone Stream, U.K. Freshwater Biology 42: 401-416.

Petersen, I., Masters, Z., Hildrew, A.G. & Ormerod, S.J. (2004) Dispersal of aquatic insects in catchments of differing land use. Journal of Applied Ecology 41: 934-950.

Petersen, I., Masters, Z., Ormerod, S.J. & Hildrew, A.G. (2006) Sex ratio and maturity indicate the local dispersal and mortality of adult stoneflies. Freshwater Biology 51: 1543-1551.

Rautmann, D, Streloke, M & Winkler, R (2001) New basic drift values in the authorization procedure for plant protection products. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch. No. 383. Berlin.

Russell, C., Ugine, T. A., Hajek, A. E. (2010) The effect of imidacloprid on *Metarhizium anisopliae*-treated Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)) (Coleoptera: Cerambycidae) survival, feeding and conidia production from mycosed individuals. J. Invertebr. Pathol. 105, 305-311

Sand-Jensen, K. (ed) (2013). Naturen i Danmark – De ferske vande. Gyldendal. 504 s.

Schäfer, RB, Caquet, T, Siimes, K, Mueller, R, Lagadic, L & Liess, M (2007) Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. Science of the Total Environment 382: 272-285.

Schäfer, RB, von der Ohe, PC, Rasmussen, JJ, Kefford, B, Beketov, M, Schulz, R, Liess, M (2012) Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. Environmental Science & Technology 46: 5134-5142.

Schmitz J, Schäfer K, Brühl CA. (2013) Agrochemicals in field margins—Assessing the impacts of herbicides, insecticides, and fertilizer on the common buttercup (*Ranunculus acris*). Environ Toxicol Chem 32:1124–1131

Schmitz J, Schäfer K, Brühl CA (2014) Agrochemicals in field margins—field evaluation of plant reproduction effects. Agric Ecosyst Environ 189:82–91

Schulz, R & Liess, M (2001) Toxicity of aqueous-phase and suspended particle-associated fenvalerate: Chronic effects after pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (Trichoptera). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 185-190.

Schmitz J., Schäfer K., Brühl C.A. 2013. Agrochemicals in field margins – Assessing the impacts of herbicides, insecticides, and fertilizer on the common buttercup (*Ranunculus acris*). Environ. Toxicol. Chem. 2013 32(5), 1124-1131.

Schmitz J., Schäfer K., Brühl C.A. 2014. Agrochemicals in field margins – Field evaluation of plant reproduction effects. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2014 189, 82-91.

Schwarzenbach, RP, Escher, BI, Fenner, K, Hofstetter, TB, Johnson, CA, von Gunten, U, Wehrli, B (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313: 1072-1077.

Siegfried, B (1993) Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1683-1689.

Skriver, J, Friberg, N, Kirkegaard, J (2000) Biological assessment of running waters in Denmark: introduction of the Danish Stream Fauna Index (DSFI). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 27: 1822-1830.

Smith, B.J. & Collier, K.J. (2000) Interactions of adult stoneflies (Plecoptera) with riparian zones II. Diet. *Aquatic Insects* 22: 285-296.

Sode, A & Wiberg-Larsen, P (1993) Dispersal of adult Trichoptera at a Danish forest brook. *Freshwater Biology* 30: 439-446.

Stettmer, C (1996) Colonisation and dispersal patterns of banded (*Calopteryx splendens*) and beautiful demoiselles (*C. virgo*) (Odonata: Calopterygidae) in south-east German streams. *European Journal of Entomology* 93: 579-593.

Strandberg, B. Boutin, C. Carpenter, D. Mathiassen, S.K. Damgaard, C.F. Sørensen, p.B. Bruus, M. Dupont, Y.L. Bossi, R. Andersen, D.K. Baatrup-Pedersen, A. Larsen, S.E. (submitted) Pesticide effects on non-target terrestrial plants at individual, population and ecosystem level (PENTA). *Pesticidforskning fra Miljøstyrelsen nr xxx*.

Sweeney, B.W. (1993) Factors influencing life-history patterns of aquatic insects. Pp. 56-100 i: Resh, V.H. & Rosenberg, D.M. (red.) *The Ecology of Aquatic Insects*. Praeger Scientific, New York, USA.

Werneke, U. & Zwick, P. (1992) Mortality of the terrestrial adult and aquatic nymphal life stages of *Baetis vernalis* and *Baetis rhodani* in the Breitenbach, Germany (Insecta: Ephemeroptera). *Freshwater Biology* 28, 245-255.

Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* **336**, 351–352

Wiberg-Larsen, P (2004) Danish Trichoptera – species diversity, biological traits, and adult dispersal. Ph.D.-thesis, Freshwater Biological Laboratory, University of Copenhagen & Fyn County, Dept. Nature & Aquatic Environment, 220 s.

Wiberg-Larsen, P (2006) The terrestrial life of stream-dwelling insects. Pp. 75-81 i: Sand-Jensen, K., Friberg, N. & Murphy, J. (red.) *Running Waters – Historical development and restoration of lowland Danish streams*. National Environmental Research Institute, EPA, Denmark, 159 s.

Wiberg-Larsen, P., Graeber, D., Kristensen, E.A., Baatrup-Pedersen, A., Friberg, N., Rasmussen, J.J., 2016. Trait characteristics determine pyrethroid sensitivity in nonstandard test species of freshwater macroinvertebrates: a reality check. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4971–4978

Wiberg-Larsen, P., Nørum, U., Friberg, P. (2013a). betydningen af gentagne pulse af lambda-cyhalothrin for makroinvertebratefaunaen i vandløb (PESTPULS). *Bekæmpelsesmiddelforskning nr. 145*, 2013.

Wiberg-Larsen, P, Windolf, J, Baatrup-Pedersen, A, Bøgestrand, J, Ovesen, NB, Larsen, SE, Thodsen, H, Sode, A, Kristensen, E, Kjeldgaard, A (2010) Vandløb 2009. NOVANA. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. 98 s. – Faglig rapport fra DMU nr. 804

Wiberg-Larsen, P. Windolf, J. Bøgestrand, J. Baatrup-Pedersen, A. Astrup Kristensen, E.A. Larsen, S.E. Hans Thodsen, H. Ovesen, N.B. Bjerring R. Kronvang, B. & Kjeldgaard, A. (2013b) Vandløb 2012. NOVANA. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 84 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 75. <http://dce2.au.dk/pub/SR75.pdf>

Winterbourn, MJ (2005) Dispersal, feeding and parasitism of adult stoneflies (Plecoptera) at a New Zealand forest stream. *Aquatic Insects* 27: 155-166.

Ordforklaring

Adulte – bruges om insekters voksenstadie, se også imago

Aktivstof – pesticider indeholder et eller flere virksomme stoffer, kaldet aktive stoffer eller aktivstoffer, og en række hjælpestoffer, som kan medvirke til at øge opløseligheden i vand eller evnen til at fastholde pesticidet på planters overflade.

Chironomider – dansemyg

Confidor - er et insektmiddel som indeholder aktivstoffet imidacloprid

Detritus - dødt organisk materiale fra planter og dyr

Fekunditet - en arts potentielle forplantningskapacitet; evnen til at danne afkom eller kønsceller, fx antal æg pr. hundyr

Feromoner - kemiske substanser, der kan udskilles i det omkringværende miljø og påvirke individer af samme art over afstand. Bruges blandt andet til at tiltrække det modsatte køn.

Fænologi - er en videnskabsgren og læren om de periodiske fænomeners indtræden hos dyr og planter, samt at udforske sammenhængen mellem disse og de klimatiske faktorer, fx æglægning, klækning, forpupning

Imago – er betegnelsen for voksenstadium hos insekter. Hos døgnfluer findes voksenstadiet både som sub-imago og imago.

Imidacloprid - Imidacloprid er en nervegift. Imidacloprid er en videreudvikling af nikotin, som har været benyttet som et insektbekæmpelsesmiddel. Imidacloprid fungerer ved at hæmme acetyl-cholin receptorer hos insekter, som derved dør.

Juvenile – bruges som samlebetegnelse for de forskellige ungdomsstadier hos insekter, fx larver og nymfer

Karate – er et insektmiddel, som indeholder aktivstoffet lambda-cyhalothrin

Lambda-cyhalothrin – et pyrethroid

Lichen – lav, en symbiotisk organisme dannet af svampe i symbiose med alger

Linkfunktion – Link funktionen er et begreb fra generaliserede lineære modeller og forbinder middelværdien af responsvariablen med den lineære ligning.

Logit funktion - Logit funktionen er defineret ved $\text{logit}(p) = \ln(p/(1-p))$, hvor p angiver en sandsynlighed

Metapopulationer – består af adskilte bestande af den samme art som interagerer på et eller andet niveau

Neonikotinoid - Neonikotinoider er en klasse af neuro-aktive insektgifte, der kemisk minder om nikotin og er meget anvendt. Neonikotinoider er en videreudvikling af

nikotin, som har været benyttet som et insektbekæmpelsesmiddel. Neonikotinoider fungerer ved at hæmme acetyl-cholin receptorer hos insekter, som derved dør.

Nikotin - Nikotin virker som en nervegift i mennesker og andre dyr. Tobaksplanten producerer nikotin for at beskytte sig mod planteædende insekter.

PENTA forsøg – Miljøstyrelsesprojekt med titlen ”Effekter af pesticider på non-target planter på individ, populations og økosystemniveau (PENTA)” (2014/MST-667-00180), gennemført 2014 til 2017 med Beate Strandberg som projektleder. Forventes publiceret som Miljøstyrelsesrapport i 2018 eller 2019.

Pyrethroid - Pyrethroider er en gruppe af insekticider, der virker som nervegift. Stofferne er udviklet på basis af naturlige insektgifte, pyrethriner, som dannes i bestemte arter af Krysanthemum. Pyrethroiderne påvirker nervecellernes elektrisk ladede natriumkanaler både hos hvirveldyr og hvirvelløse dyr ved at forsinke både aktiverings- og inaktiveringssignaler. Efter få minutter bliver de ramte dyr ude af stand til at koordinere bevægelser. Derefter får de krampes, lammelser, og til sidst dør de.

Ripariske zone - Grænseområdet mellem vandløbet og det omgivende land

Rødlistevurderet - rødlisten er en vurdering af arters risiko for at uddø. Den danske rødliste vurderer risikoen for, at arter uddør i Danmark. Arter på den danske rødliste er derfor ikke nødvendigvis i risiko for at uddø i vore nabolande

Sigmoid – matematisk funktion med en S-formet kurve

Subimago – se imago

Topikalt – kropsoverfladen; i den aktuelle sammenhæng betyder det, at midlet tilføres på overfladen af dyrene

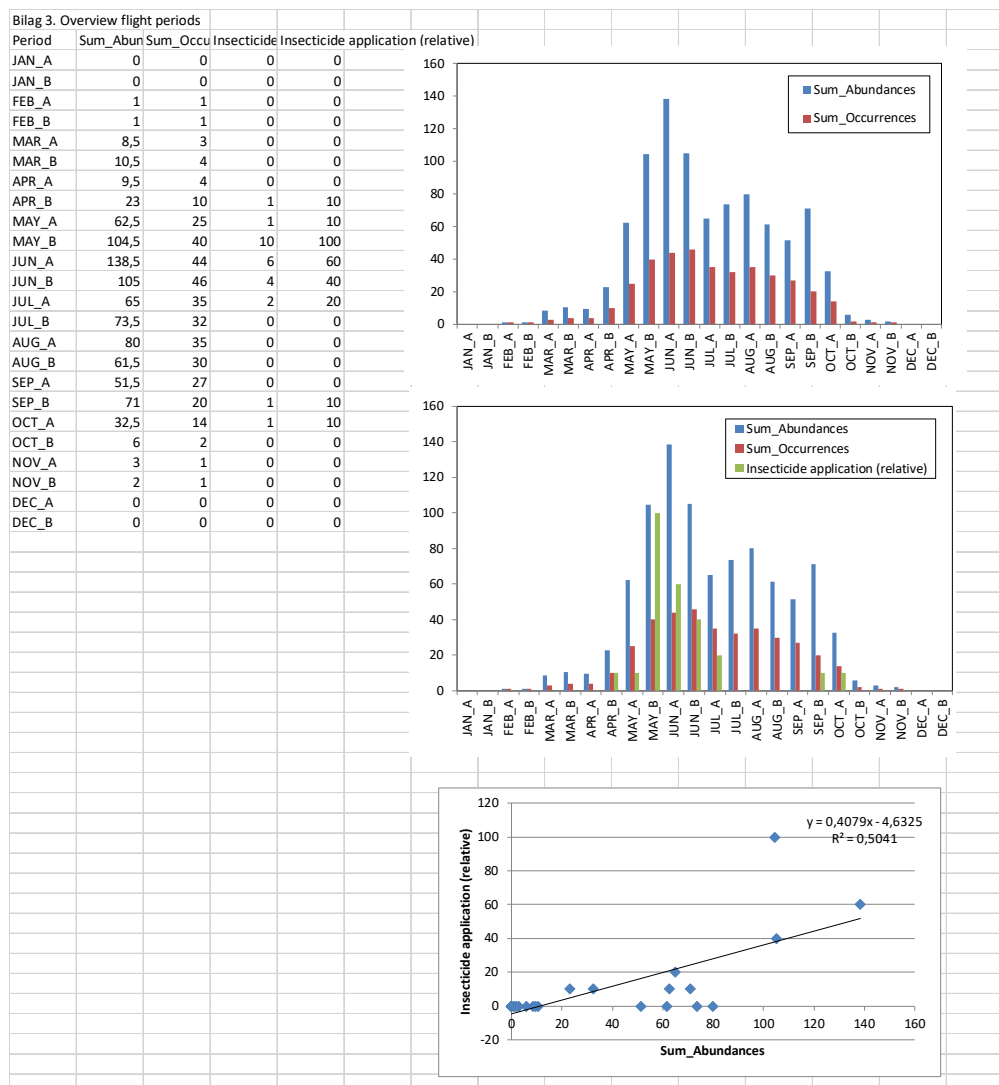
Bilag 1. Data dispersal

Bilag 1. Data dispersal											
Order	Family	Species	Red List	Abundance class	Adult life length (weeks)	Feeding (+/-)	Aerial swarming	Preference for riparian zone (10-30 m)	Lateral dispersal: negative exponential model	Long Distance Dispersal	Fecundity (no. eggs/female)
Coleoptera	Elmidae	Elmis aenea	(LC)	3	1	?	+	+	+	+	6
Coleoptera	Elmidae	Limnius volckmari	(LC)	3	1	?	+	+	+	+	12
Coleoptera	Scirtidae	Elodes minuta	(LC)	3	1	?	+	+	+	+	?
Diptera	Chironomidae	Brillia bifida	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Chironomidae	Conchapelopia menalops	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Chironomidae	Micropsectra spp.	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Chironomidae	Paracladopelma camptolabis	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Chironomidae	Rheocricotopus fuscipes	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Chironomidae	Tvetenia veralli	(LC)	3	1	+	+			passive/wind	1000
Diptera	Limoniidae	Eloeophila sp.	(LC)	3	1	-		+	+		500
Diptera	Pediciidae	Dicranota bimaculata	(LC)	3	1	-		+	+		500
Diptera	Ptychopteridae	Ptychoptera paludosa	(LC)	3	1	-		+	+		380
Diptera	Simuliidae	Odagmia ornata	(LC)	3	3	+				active	400
Diptera	Simuliidae	Simulium cryophilum	(LC)	3	3	+				active	200
Diptera	Simuliidae	Simulium vernum	(LC)	3	3	+				active	210
Ephemeroptera	Ametropodidae	Metretopus borealis	NT	3	0,1	-	+	+	+	passive/wind	2000
Ephemeroptera	Baetidae	Baetis niger	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Baetidae	Baetis rhodani	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	4000
Ephemeroptera	Baetidae	Baetis vernus	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Caenidae	Caenis rivulorum	LC	1	0,01	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Ephemerellidae	Ephemerella notata	VU	3	0,1	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Ephemerellidae	Serratella ignita	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Ephemeridae	Ephemera danica	LC	1	0,4	-	+	+	+	passive/wind	6000
Ephemeroptera	Heptageniidae	Heptagenia sulphurea	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	5000
Ephemeroptera	Heptageniidae	Rhithrogena germanica	EN	3	0,1	-	+	+	+	passive/wind	5000
Ephemeroptera	Leptophlebiidae	Paraleptophlebia submarginata	LC	1	0,1	-	+	+	+	passive/wind	1000
Ephemeroptera	Siphonuridae	Siphonurus aestivalis	LC	2	0,1	-	+	+	+	passive/wind	2000
Megaloptera	Sialidae	Sialis fuliginosa	(LC)	2	1	-		+	+		700
Megaloptera	Sialidae	Sialis lutaria	(LC)	3	1	?		+	+		600
Odonata	Calopterygidae	Calopteryx virgo	(LC)	2	4	+		+	+	active; passive/	300
Odonata	Gomphidae	Ophiogomphus cecilia	(LC)	2	2	+		??	??	active	200
Plecoptera	Capnidae	Capnia bifrons	LC	3	2	+		+	+		350
Plecoptera	Leuctridae	Leuctra fusca	LC	3	1	+		+	+	passive/wind	600
Plecoptera	Leuctridae	Leuctra hippopus	LC	3	1,5	+		+	+		650
Plecoptera	Leuctridae	Leuctra nigra	LC	2	1,5	+		+	+		240
Plecoptera	Nemouridae	Amphinemura standfussi	LC	3	2	+		+	+		500
Plecoptera	Nemouridae	Nemoura cinerea	LC	3	2	+		+	+		1400
Plecoptera	Nemouridae	Nemoura flexuosa	LC	3	2	+		+	+		1000
Plecoptera	Nemouridae	Protonemura meyeri	LC	2	2	+		+	+		290
Plecoptera	Perlodidae	Isoperla grammatica	LC	3	3	+		+	+		150
Plecoptera	Perlodidae	Perloides microcephala	LC	2	2	-		+	+		1000
Plecoptera	Plecoptera	Protonemura hrabei	NT	1	2	+		+	+		250
Plecoptera	Taeniopterygidae	Brachyptera risi	LC	3	2	+		+	+		900
Plecoptera	Taeniopterygidae	Taeniopteryx nebulosa	LC	3	1,5	+		+	+		1000
Trichoptera	Beraeidae	Beraeodes minutus	LC	3	1	-		+	+		16
Trichoptera	Glossosomatidae	Agapetus fuscipes	LC	2	1	-		+	+		150
Trichoptera	Glossosomatidae	Agapetus ochripes	LC	3	1	-		+	+	+	150
Trichoptera	Glossosomatidae	Glossosoma boltoni	VU	1	1	-		+	+		??
Trichoptera	Goeridae	Silo pallipes	LC	3	1	-		+	+		??
Trichoptera	Hydropsychidae	Ceratopsyche silfvenii	VU	1	1	?	+	+	+		500
Trichoptera	Hydropsychidae	Hydropsyche angustipennis	LC	3	1	?	+	+	+	+	700
Trichoptera	Hydropsychidae	Hydropsyche saxonica	LC	2	1	?	+	+	+	?	700
Trichoptera	Hydropsychidae	Hydropsyche siltalai	LC	3	1	?	+	+	+	+	600
Trichoptera	Hydroptilidae	Hydroptila sparsa	LC	2	0,5	-	+	+	+	+	150
Trichoptera	Lepidostomatidae	Lepidostoma hirtum	LC	2	1	+		+	+	+	130
Trichoptera	Leptoceridae	Mystacides azurea	LC	3	1	+	+	+	+	+	200
Trichoptera	Limnephilidae	Anabolia nervosa	LC	3	1	+		+	+		100
Trichoptera	Limnephilidae	Chaetopteryx villosa	LC	3	6	+		+	+		200
Trichoptera	Limnephilidae	Ecclopteryx dalecarlica	LC	2	1	-		+	+		100
Trichoptera	Limnephilidae	Halesus radiatus	LC	3	2	-		+	+	+	??
Trichoptera	Limnephilidae	Ironoquia dubia	LC	2	2	-		+	+		??
Trichoptera	Limnephilidae	Limnephilus extricatus	LC	3	4	+	+	+	+	+	125
Trichoptera	Limnephilidae	Limnephilus hirsutus	NT	2	2	-		+	+		150
Trichoptera	Limnephilidae	Limnephilus lunatus	LC	3	6	+		+	+	+	425
Trichoptera	Limnephilidae	Micropterna sequax	LC	3	8	+		+	+	+	??
Trichoptera	Limnephilidae	Potamophylax cingulatus	LC	3	2	-		+	+	+	220
Trichoptera	Limnephilidae	Potamophylax nigricornis	LC	3	2	-		+	+		??
Trichoptera	Molannidae	Molannodes tinctus	NT	2	2	-		+	+		400
Trichoptera	Odontoceridae	Odontocerum albicorne	NT	1	2	-		+	+		360
Trichoptera	Phryganeidae	Oligostomis reticulata	NT	1	2	+		+	+		500
Trichoptera	Polycentropodidae	Plectrocnemia conspersa	LC	3	3	+		+	+	+	270
Trichoptera	Psychomyiidae	Lype reducta	LC	2	1	-	+	+	+		230
Trichoptera	Psychomyiidae	Tinodes pallidulus	LC	2	1	-		+	+		50
Trichoptera	Rhyacophilidae	Rhyacophila fasciata	LC	3	3	+		+	+	+	700
Trichoptera	Sericostomatidae	Notidobia ciliaris	LC	2	1	-		+	+		200
Trichoptera	Sericostomatidae	Sericostoma personatum	LC	3	1	-		+	+		200

Bilag 2. References flight periods

Bilag 2. references flight periods	
REFERENCE (short)	REFERENCE - FULL TEXT
Andersen 1983	Andersen, T. (1983) Caddis flies (Trichoptera) on sugar baits. Fauna nor. Ser. B. 30, 54-55.
Andersen et al. 1978	Andersen, T., Jølleim, A., Larsen, R. & Øilo, C. (1978) Relative abundance and flight periods of Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera in a regulated West Norwegian river. Norw. J. Ent. Vol. 25, pp. 139-144. Oslo. ISSN 0029-1897.
Bass 1998	Bass, J.A.B. (1998) : Last-instar larvae and pupae of the Simuliidae of Britain and Ireland. A key with brief ecological notes. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 55, 105pp.
Becker 1991	
Bengtsson 1972	Bengtsson, J. (1972) Vækst og livscyklus hos Nemoura cinerea (Retz.) (Plecoptera). Flora og Fauna 78, 97-101.
Brittain (1990)	Brittain, J.O. (1990) Life history strategies in Ephemeroptera and Plecoptera. Pp 1-12 in: I.C. Campbell (ed.) Mayflies and Stoneflies, Kluwer Academic Publishers.
Crichton et al. 1978	Crichton, M.I., Fisher, F. & Wolwood, I.P. (1978) Life histories and distribution of British Trichoptera, excluding Limnephilidae and Hydroptilidae, based on the Torhamsted Insect Survey. Holarctic Ecology 1, 31-45.
Davies 1957	Davies, L. (1957) A Study of the Blackfly, <i>Simulium ornatum</i> Mg. (Diptera), with particular Reference to its Activity on Grazing Cattle. Bulletin of Entomological Research 48, 407-424.
Elliott 1969	Elliott, J.M. (1969) Life history and biology of <i>Sericostoma personatum</i> Spence (Trichoptera). Oikos 20, 110-118
Elliott 1977	
Elliott 1982	Elliott, J.M. (1977) A key to British freshwater Megaloptera and Neuroptera. Freshwater Biological Association Scientific Publications 35, 52 pp.
Elliott 1982	Elliott, J.M. (1982) A quantitative study of the life cycle of the case-building caddis <i>Odontocerus albicorne</i> (Trichoptera: Odontoceridae) in a Lake District stream. Freshwater Biology 12, 241-255.
Elliott 1983	Elliott, J.M. (1983) Life cycle and growth of <i>Dicranota bimaculata</i> (Schummel) (Diptera, Tipulidae). Entomologist's Gazette 34, 291-296.
Elliott 1986	Elliott, J.M. (1986) The Effect of Temperature on the Egg Incubation Period of <i>Capnia bifrons</i> (Plecoptera:Capniidae) from Windermere (English Lake District). Holarctic Ecology, 113-116.
Elliott 1987	Elliott, J.M. (1987) Egg Hatching and Resource Partitioning in Stoneflies: The Six British Leuctra Spp.(Plecoptera: Leuctridae). Journal of Animal Ecology, Vol. 56, No. 2 (Jun., 1987), pp. 415-426.
Elliott 1988	Elliott, J.M. (1988) Interspecific and Intraspecific Variations in Egg Hatching for British Populations of <i>Taeniopteryx nebulosa</i> and <i>Brachyptera risi</i> (Plecoptera: Taeniopterygidae). Holarctic Ecology 11, 55-59.
Elliott 2006	Elliott, J.M. (2006) Critical periods in the life cycle and the effect of a severe spate vary markedly between four species of elmid beetles in a small stream. Freshwater Biology 51, 1527-1542.
Elliott 2008	Elliott, J.M. (2008) The ecology of riffle beetles (Coleoptera: Elmidae). Freshwater Reviews 1, 189-203.
Findal 1931	Findal, J.K. (1931) Ubudne gæster paa sukkerlokning og lys. Flora og Fauna 37, 142-146.
Greenwood et al. 2001	Greenwood, M.T., Bickerton, M.A. & Petts, G.E. (2001) Assessing adult Trichoptera communities of small streams: a case study from Charnwood Forest, Leicestershire, UK. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 11, 93-107.
Grøn 1980	Grøn, P.N. (1980) Økologiske undersøgelser af slørvinger (Plecoptera) med særligt henblik på opstrømsflugt. Specialrapport, Zoologisk Laboratorium, Århus Universitet, 169 pp.
Grøn 1999	Grøn, P.N. (1999) Udbredelsen af døgnfluer og slørvinger i Ringkjøbing Amt 1988-1997. Status og udvikling. Ringkjøbing Amt & Bio/consult, 123 pp.
Hoffmann 1997	Hoffmann, A. (1997) Adult feeding and reproduction in Lasiocephala basalis [Kol.] females (Trichoptera: Lepidostomatidae). Pp. 145-149, In: Holzenthal, R. & Flint, O.S. (eds.) Proceedings of the 8th International Symposium on Trichoptera, 1997, Ohio Biological Survey.
Jedlicka 1980	Jedlicka, L. (1980) Age structure of larval populations and life cycle of black flies <i>Odagmia ormata</i> (Meigen, 1818) and <i>Odagmia spinosa</i> (Doby et Deblöck, 1957)(Diptera, Simuliidae). Biologia, Czechoslovakia 35,321-333.
Jensen 1961	Jensen, C.F. (1961) <i>Ephemerella notata</i> Etn., <i>Caenis undosa</i> Ts. Og <i>Hegragenia longicauda</i> (Steph.) nye for Danmark. Flora og Fauna 67, 97-104.
Jensen 1969	Jensen, C.F. (1969) <i>Baetis buceratus</i> Eat. Og <i>Metreotopus borealis</i> Eat. Nye for Danmark. Flora og Fauna 75, 129-134.
Jensen 1978	Jensen, C.F. (1978) Døgnfluer/faunaen (Ephemeroptera) i Linding Å. 1964-1965. Natura Jutlandica 20, 59-78.
Jensen 1996	Jensen, F. (1996) Diptera, Simuliidae, Blackflies. Pp. 209-242, In: Anders Nilsson (ed.) The Aquatic Insects of North Europe 2.
Jensen et al. 1986	Jensen, F., Jensen, C.F. & Mink, T. (1986) Nye fund fra Danmark af slørvingen <i>Protonemura rabei</i> Rausser 1956, samt nogle biologiske iagttagelser. Flora og Fauna 92, 13-16.
Jäch 1997	Jäch, M.A. (1997) Daytime swarming of rheophilic water beetles in Austria (Coleoptera: Elmidae, Hydranidae, Halplidae). Latissimus 9, 10-11.
Kaiser 1950	Kaiser, E.W. (1950) <i>Sialis nigripes</i> Ed.Pict., ny for Danmark, og udbredelsen af <i>S. lutaria</i> L. og <i>S. fuliginosa</i> Pict. i Danmark. Flora og Fauna 56, 17-36.
Kaiser 1961	Kaiser, E.W. (1961) On the biology of <i>Sialis fuliginosa</i> Pict. and <i>S. nigripes</i> Ed. Pict.. Flora og Fauna 67, 74-96.
Kaiser upubl.	Kaiser, E.W. (upubl.) Plecopter-faunaen i Linding Å. Linding Å undersøgelser 1964-65. Manuskript.
Kho 1968	Kho, S.G. (1968) Experimental studies on diapause in stoneflies III. Eggs of <i>Brachyptera risi</i> (Morton). Proc. R. ent. Soc. Lond. [A] 43, 141-146.
Kwiatkowska & Majecki 2014	Kwiatkowska, K. & Majecki, J. (2014) Life strategy and dynamics of egg laying behaviour of <i>Chaetopteryx villosa</i> (Trichoptera: Limnephilidae). Conference paper, II Polish-Evolutionary Conference.
Lawrence 2005	Lawrence, J.F. (2005) Scirtidae Flemming, 1821. Pp. 443-450, In: Beutler R.G. (Ed.) et al., Handbuch der Zoologie/Handbook of Zoology, Band 4: Arthropoda, 2. Hälfte: Insecta Coleoptera, Beetles. Teilband/Part 38, Volume 1: Morphology and systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga Partim).
Lindegård & Mortensen 1988	Lindegård, C. & Mortensen, E. (1988) Abundance, life history and production of Chironomidae (Diptera) in a Danish lowland stream. Arch. Hydrobiol./Suppl. 81, 563-587.
Malmqvist & Sjöström 1989	Malmqvist, B. & Sjöström, P. (1989) The life cycle and growth of <i>Isonychia grammica</i> and <i>I. difformis</i> (Plecoptera) in southernmost Sweden: Intra- and interspecific considerations. Hydrobiologia 175: 97-108.
Malmqvist et al. 2004	Malmqvist, B., Adler, P.H. & Strasevicus, D. (2004) Testing hypotheses on egg number and size in black flies (Diptera: Simuliidae). Journal of Vector B Marshall, J.F. (1978) Trichoptera: Hydroptilidae. Handbooks for identification of British insects Vol. 1, part 14 (a).
Marshall 1978	
Munk 1984	Munk, T. (1984) Døgnfluen <i>Rhithrogena germanica</i> Eaton i Højen Bæk. Flora og Fauna 90, 103-105.
Neu 1999	Neu, P.J. (1999) Beitrag zur Kenntnis der Köcherfliegen-Fauna des Eichtersbachtals bei Brecht (Südde) (Insecta: Trichoptera). Dendrocopos 26, 301-318.
Nielsen 1943	Nielsen, S. (1943) Trichopterologische Notizen. Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren. 107, 105-120.
Petersen et al. 1999	Petersen, I., Winterbottom, J.H., Orton, S., Friberg, N., Hildrew, A.G., Spiers, D. C. & Gurney, W.S.C. (1999) Emergence and lateral dispersal of adult Plecoptera and Trichoptera from Broadstone Stream, U.K. Freshwater Biology 42, 401-416.
Pettersson 1987	Pettersson, E. (1987) Weight-associated male mating success in the swarming caddis-fly <i>Mysticodes azureus</i> L. Ann. Zool. Fennici 24, 335-339.
Poepperl 2000	Poepperl, R. (2000) The Filter Feeders <i>Hydropsyche angustipennis</i> and <i>H. pellucidula</i> (Trichoptera: Hydropsychidae) in a Northern German Lowland Stream: Microdistribution, Larval Development, Emergence Pattern, and Secondary Production. Limnologia 30, 65-72.
Rasmussen 1978	Rasmussen, K. (1978) Livscyklus og habitat præference hos <i>Helodes marginata</i> Fabr. og <i>Helodes minuta</i> L. (Coleoptera), og de to arters udbredelse i Jylland. Flora og Fauna 84, 80-84.
Reideltbach & Christl 2002	Reideltbach, J. & Christl, H. (2002) A quantitative investigation into the temporal and spatial variations in the emergence of adult blackflies (Diptera: Simuliidae) from the Breitenbach, a small upland stream in Germany. Limnologia 32, 206-235.
Salmela 2001	Salmela, J. (2001) Adult <i>Caenophlebia</i> (Diptera: Hemiptera) around springs in southern Finland. — Entomol. Fennica 12: 139-152.
Siltala 1996	Siltala, A.J. (1996) Trichopterologische Untersuchungen. I. Über den Lich der Trichopteren. Acta Soc. Pro Fauna et Flora Fennica 28/4, 1-128
Sode & Wiberg-Larsen 1993	Sode, A. & Wiberg-Larsen, P. (1993) Dispersal of adult Trichoptera at a Danish forest brook. Freshwater Biology 30, 439-446.
Stephens 2000	Stevens, David J. (2000) Developmental trade-offs and resource allocation in caddis flies. PhD thesis. http://theses.gla.ac.uk/3764/
Stettmer 1996	Stettmer, C. (1996) Colonisation and dispersal patterns of banded (<i>Calopteryx splendens</i>) and beautiful demoiselles (<i>C. virgo</i>) (Odonata: Calopterygidae) in south-east German streams. Eur. J. Entomol. 93, 579-593.
Svensson (1972)	Svensson, E. (1972) Larval development and adult life with particular reference to ovarian maturation in certain stoneflies (Plecoptera) of the upper part of the river Wear. MS thesis. Durham theses, Durham University. Available at Durham E-Theses Online: http://etheses.dur.ac.uk/10080/
Svensson 1972	Svensson, B.W. (1972) Flight Periods, Ovarian Maturation, and Mating in Trichoptera at a South Swedish Stream. Oikos 23: 370-383.
Svensson 1977	Svensson, B. (1977) Life cycl, energy fluctuations and sexual differentiation in <i>Ephemera danica</i> (Ephemeroptera), a stream-living mayfly. Oikos 29, 78-86.
Tachet 1967	Tachet, H. (1967) Quelques aspects du cycle biologique de <i>Plectrocnemia conspersa</i> (Curtis 1834) (Trichoptera, Polycentropodidae). Annales Limnol. 3, 177-184.
Thierno de Figueroa & Fochetti (2000)	Thierno de Figueroa, J.M. & Fochetti, R. (2000) On the feeding of several European stoneflies (Plecoptera). Ent. News 112, 130-134.
Thierno de Figueroa & Palamino-Morales (2002) Adult biology of <i>Sialis nigripes</i> Pictet, 1865 (Megaloptera, Sialidae). Boln. Asoc. Esp. Ent. 26, 59-67.	
Thierno de Figueroa & Sanchez-Ortega (2000)	Thierno de Figueroa, J.M. & Sanchez-Ortega, A. (2000) Imaginal Feeding of Twelve Nemouridae Stonefly Species (Insecta, Plecoptera). Ann. Entomol. Soc. Am. 93, 251-253.
Thorup et al. 1987	Thorup, J., Jensen, T.M., Absalonson, N.O., Holm, T., Jessen, J. & Olsen, J. (1987) Life cycles of four species of Baetis (Ephemeroptera) in three Danish streams. Arch. Hydrobiol. 109, 49-65.
Timm 1993	Timm, T. (1993): Lebensstrategie und Populationsdynamik von <i>Neveermannia verna</i> , einer Kriebelmücke permanenter und periodischer Waldbäche (Diptera, Simuliidae). – Zool. Jb. Syst. 120: 289-307.
van Helsingden et al. 1996	van Helsingden, P.J., Willems, L. & Speight, M.C.D. (1996) (eds.) Background information on invertebrates of the Habitats Directive and the Bern Convention. Part II - Mantodean Odonata, Orthoptera and Arachnida. Nature and Environment 80
Wagner 1986	Wagner, R. (1986) Egg Development and Life Cycle of <i>Chaetopteryx villosa</i> (Trichoptera). Holarctic Ecology 9, 294-300
Wagner 1990	Wagner, R. (1990) A laboratory study of the life cycle of <i>Sericostoma personatum</i> (Kirby & Spence), and light dark-dependent food consumption. Hydrobiologia 208, 201-212
Wiberg-Larsen 1984	Wiberg-Larsen, P. (1984) Slørvinger og døgnfluer. Miljøstyrelsen, 91 pp.
Wiberg-Larsen 1995	Wiberg-Larsen, P. (1995) Identification of Danish Adult Females of Lype (Trichoptera: Psychomyiidae), with Notes on Reproduction. Aquatic Insects 17, 65-70
Wiberg-Larsen 2004	Wiberg-Larsen, P. (2004) Danish Trichoptera - species diversity, biological traits and adult dispersal. PhD thesis, University of Copenhagen & Fyn County.
Wiberg-Larsen et al. 2013	Wiberg-Larsen, P., Nørum, U. & Friberg, N. (2009) Betydningen af gentagne pulse af lambdacyhalothrin for makroinvertebratafaunaen i vandløb (PESTPULS). Bekæmpelsesmodelforskning nr. 145. Miljøstyrelsen. 103 pp.
Wiberg-Larsen, upubl. (A)	Lysfældefangst fra Brandbjerg Søderskov (Hjtrup Å, N.F. Vejle). 1998, Benny Steen Larsen legit.
Wiberg-Larsen, upubl. (B)	Lysfældefangst fra Lysholm (Haslev). 2009, Benny Steen Larsen legit.
Wiberg-Larsen, upubl. (C)	Malaisefælde/lysfaelder ved Skjærns/Omme Å (2011, 2013, 2014), P. Wiberg-Larsen, Liffe Terndrup legit.
Wiberg-Larsen, upubl. (D)	Lysfældefangst fra Lysholm (Mølle), 2007-2012, Per Stadel legit.
Wiberg-Larsen, upubl. E	Lysfældefangst fra Gevinge, 2016, Per Stadel legit.
Wolf & Zwick 2001	Wolf, B. & Zwick, P. (2001) Life cycle, Production and Survival Rates of Psychoptera paludola (Diptera: Psychopteridae). Internet. Rev. Hydrobiol. 86, 661-674.

Bilag 3. Overview flight periods



Bilag 4. Spraying periods

Bilag 4. Spraying periods		APR_A	APR_B	MAY_A	MAY_B	JUN_A	JUN_B	JUL_A	JUL_B	AUG_A	AUG_B	SEP_A	SEP_B	OCT_A	OCT_B
Afgrøde	Præcisering af tidsangivelse														
Byg, vår	Fra slutningen af maj til ca. 1. juli.			x	x	x									
Byg, vår	Fra slutningen af maj til ca. 10. juli.			x	x	x	x								
Hvede, vår	Ingen														
Hvede, vinter	Fra midten af september til midten af oktober.											x	x		
Hvede, vinter	Fra begyndelsen af maj til ca. 1. juli.			x	x	x									
Hvede, vinter	Fra slutningen af maj til ca. 10. juli.			x	x	x	x	x							
Rug, vinter	Midt i maj lige før skridning.			x											
Byg, vinter	Fra midten af september til midten af oktober.			x											
Triticale, vinter	Midt i maj lige før skridning.			x											
Triticale, vinter	Fra slutningen af maj til midt i juni.			x	x										
Raps, vår	Ingen														
Raps, vinter	Voksne rapsjordlopper: Fra kimbladsstadiet og frem ca. 4 løvblade er udviklet.														
Raps, vinter	Sidste halvdel af april.	x													
Raps, vinter	I sidste halvdel af maj. (Ved begyndende blomstring)			x											
Havre	Fra slutningen af maj til ca. 1. juli.			x	x	x									
Havre	Fra slutningen af maj til ca. 10. juli.			x	x	x	x								
Total		0	1	2	11	7	5	3	0	0	0	0	1	1	0

Pilotprojekt: Insekticiders effekt på de terrestriske stadier af vandinsekter – en overset faktor af betydning for makroinvertebrat-samfundene i danske vandløb?

Når vandløbsinsekter skal formere sig, forlader de vandet og bliver til voksne individer, som parrer sig og hunnerne lægger æg. Voksenstadiet er indtil nu blevet overset i vurderingen af effekter af pesticider på vandløbsinsekter. Det kan være et problem at overse et stadium i risikovurderingen af pesticiders effekter, ikke mindst når dette stadium optræder i den vandløbsnære zone, som blandt andet medvirker til at beskytte vandløbet mod tilførsel af pesticider. Det er især tilfældet når den vandløbsnære zone er nabo til marker der sprøjtes.

Projektet AQUATERRA har vist, at de voksne insekter potentielt kan blive ramt af afdrift af sprøjtemidler, når de forlader vandmiljøet for at sikre generationsskiftet. Hvor udsatte de er afhænger af en kombination af flere faktorer: (i) hvilke sprøjtemidler der anvendes, (ii) hvornår insekterne opholder sig i den vandløbsnære zone, (iii) om de tager føde til sig, og (iv) hvor følsomme de er. Projektet viser også, at der er stort overlap mellem tidspunkt for sprøjtning og forekomsten af mange vandinsekters voksenstadier.

Projektet undersøgte følsomheden af 6 arter af vårfluer, slørvinger og døgnfluer, alle tilknyttet vandløb, over for 2 insekticider: Karate (m. pyrethroid) og Confidor (m. neocotinoid). Undersøgelserne viste, at arternes følsomhed over for de to midler varierede meget, men også at de voksnes følsomhed rangmæssigt var forskellig fra ungdomsstadiernes følsomhed (i vandfasen). De voksne var desuden så følsomme, at den mængde af sprøjtemiddel, som vinden blæser ind i den vandløbsnære zone, kan dræbe en stor del af dem.



Miljøstyrelsen
Tolderundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk