



Miljø- og
Fødevareministeriet
Miljøstyrelsen

Makroinvertebraters følsomhed overfor pyrethroider i ferskvand med naturlige koncentrationer af partikler og organisk materiale **ToxPath**

Bekæmpelsesmiddel
forskning nr. 192

Januar 2021

Udgiver: Miljøstyrelsen

Forfattere:

Bjarne W. Strobel¹, Helle Marcussen¹,
Hans Chr. B. Hansen¹, Kristoffer Dalhoff¹,
Jenny Holmberg-Perez², Geert Cornelis²,
Nina Cedergreen¹

¹ Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet

² Göteborg Universitet

Fotos:

Anja Weibel (Fig 4.1)

ISBN: 978-87-7038-273-1

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

Forord

Projektet som er afrapporteret i denne rapport "Eksponeringsveje og toksicitet af pyrethroider bundet til partikler i ferskvand - ToxPath" er finansieret af Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning (J. nr. MST-667-00184). Projektet er udført ved Københavns Universitet (KU), Institut for Plante- og Miljøvidenskab.

Der indgår karakterisering af partikler i suspension med avancerede instrumenter til vådanalyser som er udført på Göteborg Universitet hos Geert Cornelis og Jenny Holmberg-Perez. De nye analysemetoder til bestemmelse af pyrethroider ved hhv. HPLC med radiodetektor og silikone stave i scintillationsapparat til ^{14}C -mærkede pyrethroider er sammenlignet med resultater fra standard GC-MS analyser til pyrethroid monitoring foretaget på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala hos Jenny Kreuger.

Projektet har været fulgt af en følgegruppe med følgende sammensætning:

- Henrik Frølich Brødsgaard, Miljøstyrelsen
- Anne Louise Gimsing, Miljøstyrelsen
- Jakob Lanstorp, Miljøstyrelsen
- Philip Grinder Pedersen, Miljøstyrelsen
- Lektor Bjarne W. Strobel, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, KU
- Professor Poul Løgstrup Bjerg, Institut for Vand og Miljøteknologi, DTU
- Seniorforsker Vibeke Ernstsén, GEUS
- Peter Jørgensen, PJ-Bluetech ApS
- Specialkonsulent Marian Damsgaard Thorsted, SEGES
- Afdelingsleder Niels Lindemark, Dansk Planteværn
- Afdelingsleder Birgitte Biilmann Rønn, Lægemiddelindustriforeningen
- Walter Brüschi, Danmarks Naturfredningsforening
- Professor Merete Styczen, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, KU
- Post doc Jes J. Rasmussen, Institut for Bioscience, Aarhus Universitet
- Forskningsprofessor Jens Aamand, GEUS
- Seniorforsker Anders R. Johnsen, GEUS
- Seniorrådgiver Morten T. Strandberg, Institut for Bioscience, Aarhus Universitet
- Instituttleder Carsten Suhr Jacobsen, Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet

Bjarne W. Strobel

Sammendrag

Fine partikler er en del af almindeligt rent vandløbsvand, hvor vandets strømning og turbulens holder partiklerne hvirvlet op i vandet som en suspension. Partiklerne består af organisk materiale eller fine korn af mineralsk materiale, og mange af partiklerne har en kerne af lermineral eller jernoxid med en belægning af organisk materiale udenpå. Hydrofobe pesticider bindes til disse partikeloverflader, og fordi de fine partikler er suspenderet transporteres de med strømmen og bringer det bundne pesticid med sig. Den kemiske sammensætning af partiklernes overflade sammen med det specifikke overfladeareal er afgørende for, hvor meget pesticid der bindes, og i dette projekt er undersøgt betydningen af naturligt forekommende koncentrationer af fine suspenderede partikler på giftigheden af de meget hydrofobe pyrethroider overfor 11 arter af vandløbsdyr.

Med naturligt organisk stof isoleret fra Susåen, og lermineralet montmorillonit og jernoxidet goethit fremstilles suspensioner til undersøgelse af bindingsstyrke og mængde bundet pyrethroid til rene mineral partikler og partikler med belægning af naturligt organisk materiale. Suspensionernes partikelstørrelse og størrelsesfordeling bestemmes med en kombination af metoder, og fraktioner med fine og grove partikler fremstilles til at undersøge effekten af partikelstørrelsesfordelingen på binding af pyrethroid. Tilstedeværelse af opløst organisk stof fra Susåen øgede overfladearealet på goethit ved at begrænse flokkuleringen til større aggregater. Opløst organisk stof havde ingen effekt på suspensionen med fin montmorillonit, og meget lille effekt på grov montmorillonit suspensionernes samlede partikeloverfladeareal.

Sorption eller binding af cypermethrin (pyrethroid) i de meget lave og miljørealistiske koncentrationer blev undersøgt med en nyudviklet metode, hvor en lille silikonestav optager en relativt stor mængde ^{14}C -mærket cypermethrin. Under sorptionsforsøgene dannes en ligevægt mellem koncentrationen af opløst cypermethrin i vandfasen og cypermethrin i silikonestaven, og fordi staven har et meget højt indhold i forhold til vandfasen, vil koncentrationen af cypermethrin i vandfasen være konstant, uanset hvor meget der måtte fjernes ved sorptionsreaktionen med de suspenderede partikler. I praksis betyder det, at man kan måle mængden af sorberet cypermethrin til partikler i en suspension som differencen mellem scintillationstælling på glas med suspension og glas uden suspension uden af skulle adskille de meget fine partikler fra vandfasen. Metoden blev anvendt til bestemmelse af lineære fordelingskonstanter for ligevægtskoncentrationer $0,1 - 9 \mu\text{g L}^{-1}$ cypermethrin, og fordi reproducerbare målinger i intervallet $0,1-0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ er væsentlige, fordi pyrethroiders giftighed er på det niveau.

Økotoksikologisk virkning af partikelbundne pyrethroider blev undersøgt med *Gammarus pulex* for 5 og 25 mg L^{-1} suspenderede goethit og montmorillonit partikler med og uden belægning af naturligt organisk materiale (totalt tilsat organisk materiale svarende til $0,2 \text{ mg C L}^{-1}$). Overordnet viser undersøgelseerne, at suspenderede partikler ikke giver en mærkbar forskel i den opløste koncentration af pyrethroid, og dermed ikke nogen mærkbar effekt på giftigheden overfor *G. pulex* i de undersøgte naturlige koncentrationer af partikler, organisk stof og pyrethroid i kunstigt ferskvand i laboratorieforsøg.

Ferskvandsarters følsomhed overfor pyrethroid blev undersøgt ved dosis-responskurver for 11 arter af ferskvandsdyr eksponeret for pyrethroid i kunstigt ferskvand. Beregning af EC_{50} værdier herfra viser over 100-fold forskelle fra $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ til over $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Sammenstillet viser tallene arternes følsomhedsfordeling, og beregning af HC_5 (hazard koncentration) på 32 ng L^{-1} viser, at vanddyrene er meget følsomme overfor pyrethroider.

Summary

Fine particles are common constituents in stream water of good quality, as turbulence and current constantly whirled the particles in suspension. The particles consist of organic material or fine grains of mineral material, and many of the particles have a core of clay mineral or iron oxide with a coating of organic material on the outside. Hydrophobic pesticides bind to these particle surfaces, and because the fine particles are suspended, they will be transported with the flow and bring the bound pesticide. The chemical composition of the particle surface, together with the specific surface area is crucial for how much pesticide bound, and in this project is examined the significance of naturally occurring concentrations of fine suspended particles of the toxicity of the very hydrophobic pyrethroids against 11 species of aquatic life.

Natural organic matter isolated from the river Suså, together with the clay mineral montmorillonite and iron oxide goethite we produced suspensions for investigation of bond strength, and quantity bound pyrethroid to clean mineral particles and particles coated with natural organic material. The suspensions' particle size and particle size distribution was determined by a combination of methods, and fractions with fine and coarse particles was prepared to investigate the effects of particle size distribution on binding of pyrethroid. The presence of dissolved organic matter from the river Suså increased the surface area of goethite by limiting the flocculation into larger aggregates. Dissolved organic matter had no effect on the suspension with fine montmorillonite, and very little effect on coarse montmorillonite suspensions total particle surface area.

Sorption of cypermethrin (pyrethroid) in the very low and environmentally realistic concentrations were examined with a newly developed method where a small silicone rod sorbs a relatively large amount of ^{14}C -labelled cypermethrin. In sorption experiments, the silicone rod cause a constant concentration of dissolved cypermethrin in the water phase and cypermethrin in silicone rod. The rod has a very high content relative to the concentration of cypermethrin in the water, and therefore the concentration stays constant regardless of the small amount removed by sorption to the suspended particles. In practice, this means that you can measure the amount of sorbed cypermethrin to particles in a suspension simply by difference between the scintillation counts for vials with suspension compared to vials without suspension. Linear distribution constants were derived for equilibrium concentrations of $0.1\text{--}9\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ cypermethrin and reproducible determinations in the range $0.1\text{--}0.2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ is important because toxicity of pyrethroids is that low.

Ecotoxicological effects of particle-bound pyrethroids were examined with *Gammarus pulex* for suspension with 5 and 25 mg L^{-1} suspended goethite and montmorillonite particles both with and without coating of natural organic material (total added OM equal to 0.2 mg C L^{-1}). Overall, the studies indicate that the suspended particles do not give a noticeable difference in the solute concentration of pyrethroid and thus not have any remarkable effect on toxicity towards *G. pulex* for the investigated natural concentrations of particulate matter, organic matter and pyrethroid in artificial fresh water in laboratory tests.

Freshwater species sensitivity to pyrethroid was examined by dose-response curves for 11 species of freshwater organisms exposed to pyrethroid in artificial fresh water. Calculation of EC_{50} values show more than 100-fold differences from $0.08\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ to over $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Compiled figures show the species sensitivity distribution and calculation of HC_5 (hazard concentration) of 32 ng L^{-1} shows that the fresh water organisms are very sensitive to pyrethroids.

Indhold

1.	Introduktion	8
1.1	Introduktion	8
1.2	Formål	8
2.	Opløst organisk materiale og partikler af montmorillonit og goethit	10
2.1	Opløst organisk materiale	10
2.1.1	Indsamling af opløst organisk materiale (DOM)	10
2.1.2	Karakterisering af DOM	10
2.2	Lermineral og jernoxid suspensioner	11
2.2.1	Valg af montmorillonit og goethit som mineral til suspensioner	11
2.2.2	Adskillelse af montmorillonit og goethit i partikelstørrelsesfraktioner	11
2.2.3	Karakterisering af montmorillonit og goethit stamsuspensioner	12
2.2.4	Fremstilling af soft water medie og suspensioner	12
2.3	Karakterisering af montmorillonit og goethit suspensioner	13
2.3.1	Introduktion	13
2.3.2	Materialer	14
2.3.3	Metoder	14
2.3.3.1	Dynamisk Lys Spredning	15
2.3.3.2	Disk Centrifugering	15
2.3.3.3	Atomar Kraftmikroskopi	16
2.3.4	Resultater og Diskussion	16
2.3.4.1	Dynamisk Lysspredning (DLS)	17
2.3.4.2	Disk Centrifugering (DCS)	17
2.3.4.3	Grov montmorillonit	18
2.3.4.4	Fint Montmorillonit	21
2.3.4.5	Goethit	22
2.3.4.6	Atomar kraftmikroskopi (AFM)	24
2.3.4.7	Grov Montmorillonit	24
2.3.4.8	Fin Montmorillonit	25
2.3.4.9	Goethit	26
2.3.4.10	Oversigt over partikelstørrelse bestemt med AFM	27
2.3.4.11	Bestemmelse af geometrisk overfladeareal	27
2.3.5	Delkonklusion	32
3.	Sorption af cypermethrin med passiv doseringsmetoden	33
3.1.1	Baggrund og formål	33
3.2	Optimering af passiv doseringsmetode for sorption af pyrethroider	34
3.2.1	Støbt silikone metoden	34
3.2.2	Ladning af støbt silikone med cypermethrin ved fortrængningsmetoden	36
3.2.3	Ladning af støbt silikone med cypermethrin uden fortrængning	37
3.2.4	Ladning af silikonestave	38
3.2.5	Konklusion	44
3.3	Sorption af cypermethrin til montmorillonit, goethit og naturligt organisk materiale	45
3.3.1	Beregning af sorption	45
3.3.2	Eksperimentel procedure for sorption	45
3.3.3	Bestemmelse af metodens detektionsgrænse	46

3.3.4	Organisk opløsningsmiddel til ekstraktion af sorberet cypermethrin	46
3.3.5	Undersøgelse af partikel skygning ved direkte scintillationsmåling	47
3.3.6	Sorptionsresultater for cypermethrin	48
3.3.7	Betydning af den eksperimentelle metode i sorptionsforsøg og anvendelse af partikelstørrelse	54
3.3.8	Delkonklusion	56
4.	Økotoxikologisk virkninger af partikel-bundne pyrethroider	57
4.1	Gammarus' følsomhed overfor cypermethrin bundet til sorbenter	57
4.1.1	Baggrund og formål	57
4.1.2	Metode	57
4.1.2.1	Indsamling af <i>G. pulex</i>	58
4.1.2.2	Gammarus puls-eksponering	58
4.1.3	Resultater og Diskussion	59
4.1.3.1	Effekten af partikler på giftigheden af cypermethrin	59
4.1.3.2	Effekten af opløst organisk materiale på giftigheden af cypermethrin	61
4.1.3.3	Udviklingen af giftighed over tid	62
4.1.3.4	Årstidsvariationer i gammarus følsomhed	63
4.2	11 invertebraters følsomhed overfor cypermethrin	64
4.2.1	Baggrund og formål	64
4.2.2	Materialer og Metode	65
4.2.2.1	Indsamling af organismer	65
4.2.2.2	Bestemmelse af arters følsomhed	67
4.3	Invertebraters optagelses- og udskillelses-kinetik af ¹⁴ C cypermethrin	69
4.3.1	Baggrund og formål	69
4.3.2	Materialer og Metode	70
4.3.2.1	Prøveforberedelse (QuEChERS)	70
4.3.2.2	Metodeudvikling for HPLC med Radio detektor (LC-RD)	70
4.3.3	Resultater og Diskussion	71
4.3.3.1	Bestemmelse af pyrethroider med LC-RD metode	71
4.3.3.2	Optags- og elimineringskinetik af cypermethrin	72
5.	Risikovurdering af sorberede pyrethroider	73
5.1	Risikovurdering	73
6.	Konklusion	75
7.	Referencer	76

1. Introduktion

1.1 Introduktion

Ny forskning har vist at hydrofobe insekticider transporteres i partikelbunden form via dræn og overfladeafstrømning til danske vandløb. For disse insekticider er det derfor ikke længere tilstrækkeligt alene at se på atmosfærisk afdrift fra marksprøjtninger; binding til og transport med partikler er en vigtig faktor. Endvidere tyder nye resultater fra Miljøstyrelsens bekæmpelsesmiddelforskning overraskende på, at pyrethroid bundet til partikler kan have en skadevirkning på ferskvandsinsekter der er lige så stor som for "frit" ikke partikelbundet pyrethroid. Naturlige nanopartikler af ler, metaloxider og organisk materiale som forbliver svævende i vandet udgør en overset eksponeringsvej, da partiklerne kan fungere som transportører af insekticider i vandet hen til og ind i organismer. En sådan eksponeringsvej er kendt for antropogene nanopartikler i miljøet og er nu genstand for intens forskning. Dette projektets hovedhypotese er, at hydrofobe pyrethroider vil bindes stærkt til naturlige nanopartikler og dermed bidrage til et større optag af pyrethroider i vandlevende invertebrater resulterende i en større toksicitet end forventet ud fra mængden af pyrethroid i opløst form.

Test af hypotesen kræver forsøg under laboratorieforhold, og med velkontrollerede partikler. Til undersøgelserne anvendes fire typer partikler i tre størrelses-fraktioner ($<0,02$; $0,02-0,45$; $>0,45$ μm) adskilt med ultracentrifugering. De fire partikeltyper er henholdsvis ler og jernoxid med og uden belægning af naturligt organisk materiale. Partikelstørrelse, egenskaber og sammensætning karakteriseres bl.a. med nanoparticle tracking, field-flow fraktionering, og spektroskopi. Hastigheden af pyrethroidbinding og -frigivelse til partiklerne undersøges med ^{14}C -mærket pyrethroid med passiv doserings- og prøvetagningsteknikker ved naturligt lave koncentrationer af pyrethroid og sorbent – forsøgsbetingelser der stort set ikke har været anvendt i tidligere forskning indenfor området. Toksiciteten af bundne og frie pyrethroid-fraktioner testes ved puls-eksponering af ferskvandstangloppen *Gammarus pulex*, og toksiciteten sammenholdes med pyrethroid-binding til partiklerne, hvor især pyrethroid-frigivelseshastigheden fra partiklerne forventes at spille en central rolle. Efterfølgende vil optags- og elimineringshastigheder af pyrethroider bundet til den partikeltype og størrelsesfraktion, der udviser størst toksicitet i forsøgene med *G. pulex*, blive sammenlignet med optags- og eliminationshastigheder af frit pyrethroid for 10 arter ferskvands invertebrater med forskellig fylogeni, levested og fødevalg. Formålet er at kvantificere det partikel-faciliterede optag for flere arter og identificere de mest følsomme overfor denne type eksponering. Projektet vil munde ud i en diskussion af hvordan partikel-faciliteret pyrethroid-optag og -toksicitet kan påvirke risikovurderingen af pyrethroider, og diskussion af vigtige partikelegenskaber som er kritiske for pyrethroid binding og akut toksicitet i relation til eksponeringsveje for følsomme arter. Hvis projektet bekræfter at partikelbårne hydrofobe insekticider er biotilgængelige kan det få stor indflydelse på regulering af pesticidanvendelse.

1.2 Formål

Pyrethroider bundet til organisk stof og partikler suspenderet i jordvand transporteres via overfladeafstrømning og dræn til vandløb. Et tidligere forskningsprojekt fra Miljøstyrelsen (Bekæmpelsesmiddelforskning nr 155) viste reduceret toksicitet ved tilstedeværelse af humussyre, og en signifikant øget toksicitet for pyrethroider bundet til montmorillonit partikler overfor makroinvertebrater i ferskvand. Dette understreger behovet for dybere forståelse af sorption, transport og biologisk optagelsesprocesser for nano- og mikropartikler suspenderet i vandløb, og en revidering af påvirknings- og toksicitetstest for partikelbundne pesticider. I dette projekt undersøges dette ved:

- Kvantifikation af betydningen af partikelstørrelse, kemisk sammensætning og overflade reaktivitet for pyrethroid sorption, desorption og toksisk potentiale overfor ferskvandsmakroinvertebrater

- Undersøge optagelse og toksikokinetik af pyrethroider i 10 arter af ferskvandsmakroinvertebrater i vand med og uden tilstedeværelse af partikler og naturligt organisk stof. Målet er at *i*) identificere arter der er mest følsomme arter overfor partikelbundne pyrethroider, *ii*) kvantificere potentiel øget toksicitet af partikelbundne pyrethroider, og *iii*) bestemme eksponeringsparametre der bedst beskriver optagelse og toksicitet
- Give råd om risikovurdering af partikelbundne insekticider og den kvantitative betydning af en potentiel øget toksicitet af partikel-bundne pyrethroider overfor makroinvertebrater i ferskvand.

2. Opløst organisk materiale og partikler af montmorillonit og goethit

2.1 Opløst organisk materiale

2.1.1 Indsamling af opløst organisk materiale (DOM)

Belægning af organisk materiale på suspenderede partikler i danske vandløb kan ændre bindingsegenskaberne for pyrethroider til partiklerne, og dermed påvirke de økotoxikologiske effekter af pyrethroid overfor hvirvelløse dyr i vandløbene. Organisk materiale isoleret fra vandløb eller materiale med tilsvarende fysisk-kemiske egenskaber er ikke kommercielt tilgængeligt. Suså er et dansk vandløb med landbrugsopland og vand blev indsamlet hvor åen løber under Vrangstrup Øvej som er opstrøms i forhold til tilløbet fra Ringstedå. Indsamling af organisk materiale fra vandløbet blev foretaget én gang og for at kunne opbevare materialet stabilt til hele projektet blev det opkoncentreret med omvendt osmose og frysetørret. Fra midt i strømmen i Suså indsamledes ca. 400 L åvand med koncentration på $10,0 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ kulstof og pH 7,9. Hjemme i laboratoriet, blev vandet filtreret gennem to in-line filtre med porediameter 1,0 og 0,45 μm for at fjerne partikler og uopløst organisk materiale. Kulstofindholdet i vandet blev opkoncentreret med et mobilt omvendt osmose (RO, reverse osmosis) system (Model PROS/2S, RealSoft, Norcross, GA, USA) udviklet til isolering af fulvosyre og humussyre fra flod og søvand, og beskrevet af Serkiz and Perdue (1990) og Sun et al. (1995). Resultatet blev 14 liter vand med kulstofkoncentration på 460 mg C L^{-1} . De 14 L opløsning blev frysetørret til et slutprodukt på 107 g tørret naturligt organisk materiale fra et dansk vandløb. Materialet opbevares tørt og uden sollys, og anvendes til fremstilling af stamopløsninger af DOC til sorptionsforsøg og økotoxikologiske eksperimenter.

Åvand med naturligt opløst organisk materiale blev indsamlet fra yderligere tre vandløb, Ryå, Esumå og Lille Vildmose (Vildmosen), for at undersøge om andre typer af organisk materiale kunne have en effekt på toksiciteten af cypermethrin. Disse lokaliteter blev udvalgt fordi de repræsenterer forskellige tre forskellige danske landskabstyper og det organiskstof fra disse kan forventes at have forskellig sammensætning. Vandet fra Lille Vildmose, Nordjylland, blev indsamlet fra Haslevgård Å, der hvor åen løber under Solbergvej. Åen der løber gennem et område domineret af sphagnum udgravning og græsningsarealer omkring 2 km syd for Lille Vildmose. Ry Å er den største å i Vendsyssel, der løber i områder præget af landbrugsdrift. Vandet blev indsamlet, der hvor åen passerer under Glinvadvej omkring 1 km sydvest for Hjallerup og omkring 10 km fra udspringet i Jyske Ås. Der blev indsamlet ca. 100 L af alle tre typer åvand blev filtreret og opkoncentreret til ca. 14 L som beskrevet i det ovenstående. Før opkoncentrering havde de tre åvand kulstof koncentrationer på $5,2 \pm 0,2$, $28,4 \pm 0,3$ og $3,1 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ for Ryå, Vildmose og Esumå, mens dette steg til $70,6 \pm 0,6$, $142 \pm 0,9$ and $41,1 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ efter opkoncentrering. Derudover er anvendt filtreret og kationbyttet naturligt organisk materiale fra jordvæsken i en sur skovbund under en rødgran bevoksning, domineret af fulvosyre (Strobel et al., 2001), og indkøbt Aldrich humic acid (humussyre med en del uopløselige partikler) til sammenligning med de indsamlede typer naturligt organisk materiale fra danske vandløb.

2.1.2 Karakterisering af DOM

Det isolerede materiale fra Suså indeholder alt stof som kan passere de to filtre. Bestemmelse af kulstofindholdet i det tørrede materiale viste, at det indeholdte $6,12 \pm 0,04\%$ total C og opløsning af materialet viste at lidt over halvdelen af dette kunne opløses svarende til et genopløse-

ligt kulstofindhold på 3,9% C. Dette viser, at opkoncentreringen af organisk materiale også opkoncentreret opløste salte i åvandet. En del af saltene kan ikke genopløses, disse salte fjernes ved filtrering med 0,45 µm filter før sorptions- og økotoxikologiske test udføres. Det opkoncentrerede DOM fra Suså blev genopløst og anvendt i forskellige koncentrationer i sorptions- og toksicitetsforsøg. Bidraget af salte til disse forsøg fra genopløsningen blev bestemt for den højest anvendte DOM koncentration på 10 mg L⁻¹ er givet i Tabel 2.1.

2.2 Lermineral og jernoxid suspensioner

2.2.1 Valg af montmorillonit og goethit som mineral til suspensioner

Sorptions- og økotoxikologiske forsøg skal udføres med kendte mængder partikler af velbeskrevne mineraler. Goethit og montmorillonit er almindeligt forekommende i danske jorde og danske vandløb som repræsentanter for hhv. jernoxider og 2:1-lags silikat-lermineraler. Stabile stamsuspensioner af mineralerne skal fremstilles for at kunne udtage ens kendt masse af suspenderet mineral fra stamsuspensionen med høj præcision og reproducerbarhed til delforsøg. Dette er også vigtigt for at kunne sammenligne resultaterne fra forsøg med forskellige mineraler og partikelstørrelsesfraktioner over en længere periode. Der findes nogen enkelte stabile mineralsuspensioner med afgrænset og kendt partikelstørrelsesfordeling som er kommercielt tilgængelige, men de er alle stabiliseret med overfladeaktive stoffer (organiske surfaktanter), som ændrer overflade egenskaberne for sorption og påvirker de økotoxikologiske effekter.

I projektet fremstilles rene mineral suspensioner ud fra standard mineral af montmorillonit (SWy-2 Na-montmorillonite, University of Missouri-Columbia, Source Clay Minerals Repository, Columbia, USA) og goethit (Bayferrox 910 standard 1986, Bayer). Begge har en bred partikelstørrelsesfordeling, og fraktionering i en fin og grov partikelfraktion foretages med en serie centrifugeringer af suspensionerne.

2.2.2 Adskillelser af montmorillonit og goethit i partikelstørrelsesfraktioner

Hver for sig afvejes 15 g montmorillonit og goethit til bluecap flasker og tilsættes 600 mL milliQ vand. Suspensionen rystes end-over-end ved 30 rpm i to timer. Suspensionen fordeles i 50 centrifugeglas og centrifugeres med beregnede tider og g-kraft som vist i Tabel 2.1 for at opnå grov, medium og fin fraktion af partikelstørrelser. Første adskilles grov fraktion fra medium og fin fraktion ved almindelig centrifugering (trin 1), og dernæst adskilles medium og fin fraktion ved ultracentrifugering med en betydeligt højere g-kraft (trin 2). Det høje saltindhold og store indhold af partikler i første centrifugering, forårsager at partiklerne aggregerer, derved kan medium og fine partikler også nedcentrifugeres. Den første centrifugering kommer da ikke kun til at bestå af de grove partikler. Centrifugeringskagen fra første trin resuspenderes og centrifugeringen gentages i alt otte gange for hvert mineral.

Supernatanten efter de otte gentagelser med centrifuge i trin 1 overføres til ultracentrifuge glas og behandling på tilsvarende måde blot med ultracentrifugering (se Tabel 2.1).

TABEL 2.1 Separation af partikelstørrelsesfraktioner

Trin	Partikel type	Forkortelse	Centrifugering	Fraktion
1	Montmorillonit-grov	M_grov	15 min, 1046 g	Kage ¹
1	Goethit-grov	G_grov	15 min, 1046 g	Kage ¹
2	Montmorillonit-medium	M_medium	60 min, 83073 g	Kage ¹
2	Goethit-medium	G_medium	60 min, 83073 g	Kage ¹
2	Montmorillonit-fin	M_fin	60 min, 83073 g	Supernatant
2	Goethit-fin	G_fin	60 min, 83073 g	Supernatant

Centrifugeringskagen fra alle gentagelser i grov og medium fraktion samles og det store vandvolumen fra resuspension gentagelserne reduceres ved frysetørring til et volumen på mellem 250 og 1000 ml afhængigt af partikelstørrelsesfraktionen. Disse stamsuspensioner opbevares ved 4 °C indtil partikel- og suspensions karakterisering, og anvendelse til sorptions- og økotoxikologiske eksperimenter.

Centrifugering af trin 2 af Bayferrox goethit viste meget klar supernatant med kun meget få suspenderede fine partikler. Derfor kunne denne goethit suspension ikke producere en stamopløsning med tilstrækkelig indhold af fine partikler. En anden goethit syntetiseret i eget laboratorium efter forskriften af Schwertmann and Cornell (1991), og som tidligere er blevet finmalet i en agat kuglemølle (morter) blev i stedet for anvendt. Denne goethit havde højt indhold af finkornede goethit partikler.

2.2.3 Karakterisering af montmorillonit og goethit stamsuspensioner

Koncentration af partikelmasse i stamsuspensioner blev bestemt med to metoder. Den grove fraktion havde tilstrækkelig høj densitet til at kunne bestemmes på 5-decimal vægt som tørvægt af 1-5 mL suspension i et præparat efter indtørring. Suspensionerne med medium og fine partikler var for tynde til direkte vægt bestemmelse, og deres indhold blev bestemt indirekte ud fra koncentrationen af total jern og aluminium efter syreoplukning af hhv. goethit og montmorillonit og deres respektive kemiske sammensætning.

Bestemmelse af partikelmasse i afpipetteringer fra stamsuspensionerne under konstant og ensartet omrøring og udtag fra samme geometriske position i suspensionen viste relativ standard afvigelsen på under 1%, og dermed en brugbar reproducerbar metode til at overføre suspension ved fremstilling af suspensioner til sorptions- og økotoxikologiske eksperimenter.

2.2.4 Fremstilling af soft water medie og suspensioner

For i højest mulig grad at anvende vand, der ligner dansk vandløbsvand, blev der brugte et standard blødt-vands-medie (soft water) (OECD 2004). Mediet er fremstillet af deioniseret vand i toksicitetstest og til partikelkarakterisering og sorptionsforsøg blev der anvendt milliQ vand. Mediet indeholder 48 mg L⁻¹ NaHCO₃, 30 mg L⁻¹ CaSO₄·2H₂O, 30 mg L⁻¹ MgSO₄ og 2 mg L⁻¹ KCl og pH blev justeret i intervallet 7,2-7,6.

Montmorillonit og goethit stamsuspensioner blev omrørt mindst en time, og derefter blev der afpipetteret i et volumen til mediet, så de ønskede koncentrationer i forsøgene blev opnået. Ved forsøg med Suså DOC blev en mere koncentreret opløsning først fremstillet ved afvejning af det frysetørret materiale til milliQ-vand og omrøring i en time efterfulgt af filtrering gennem et 0,45 µm filter og måling af total kulstof indhold (TOC-V_{CPM}, Shimadzu, Holm & Halby). Herefter blev den ønskede volumen af opløsningen tilsat mediet.

TABEL 2.2. Indhold af makrometaller og anioner i blødt-vands-mediet med og uden tilsætning af DOC. Koncentrationerne var for Suså DOC den højest anvendte i sorptionsforsøgene på 10 mg L⁻¹ og Ryå og Vildmosen DOC havde koncentrationer på 50 mg L⁻¹ DOC, mens Esumå DOC havde en koncentration på 41 mg L⁻¹

Medium	Na	K	Ca	Mg	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻
Blødt-vand	12,8±0,2	1,34±0,21	6,93±0,4 2	6,03±0,31	40,1±0,5	0,7±0 ,3
Suså DOC	17,3±1,2	3,12±0,05	10,2±0,1	7,12±0,2	61,9±0,2	3,1±0 ,5
Ryå DOC	20,3±1,4	5,34±0,12	13,4±0,6	10,4±1,2	57,3±3,6	7,2±0 ,9
Vildmosen DOC	18,4±1,8	5,62±0,15	11,6±0,7	11,3±2,2	55,3±2,2	5,3±1 ,1
Esumå DOC	15,5±3,9	6,12±0,61	12,4±1,5	9,62±0,56	69,5±1,7	10,4± 0,9

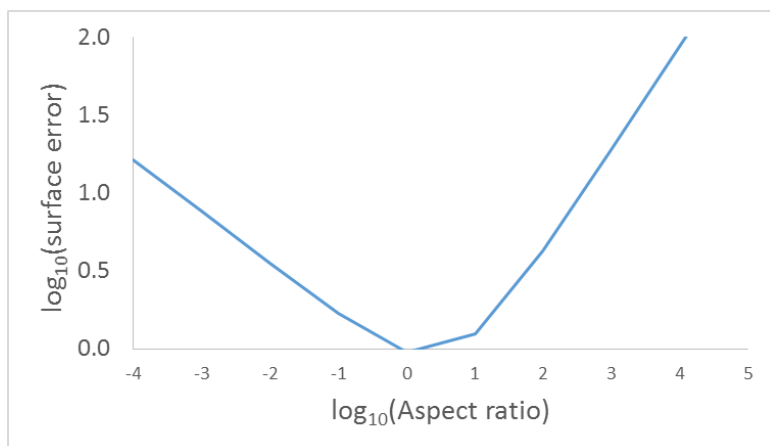
Det opkoncentrerede DOC fra Ryå, Vildmosen og Esrumå blev kun anvendt til toksicitetstest. Det blev anvendt i højere koncentrationer end Suså DOC for at teste den maksimale effekt af organisk materiale på toksiciteten af cypermethrin. Vildmosen og Ryå DOC blev anvendt i en koncentration på 50 mg L⁻¹ og Esrum i en koncentration på 41 mg L⁻¹, da det ikke var lykkedes at opkoncentrere denne yderligere.

Tilsætning af Suså DOC og de opkoncentrerede DOC fra Ryå, Vildmosen og Esrumå påvirkede saltkoncentrationen soft water mediet. De målte koncentrationer makroindholdsstoffer målt i soft water mediet med og uden tilsætning af DOC er givet i Tabel 2.2.

2.3 Karakterisering af montmorillonit og goethit suspensioner

2.3.1 Introduktion

Naturlige partikler som silikat lermineraller, f.eks. montmorillonit er ikke kugleformede, og det kræver analyse med flere forskellige metoder for at kunne beskrive deres form (Gallego-Urrea et al., 2014). Goethit kan antages at være sfærisk fordi jernoxider af natur er meget ensartede i facon og næsten altid kugleformede (Cornell & Schwertmann, 2003). Lermineraller derimod er pladeformede. Figur 2.1 viser hvordan overfladen af en cylinder er i forhold til en kugle ved forskellige forhold mellem pladediameter og pladetykkelse af en cylinder (aspect ratio). Overfladearealet af en cylinder er klart underestimeret i forhold til en kugle uanset forhold mellem diameter og tykkelse. Adsorption af kemiske stoffer til partikler er ofte i batchforsøg med en suspension af sorbent, og adsorptionen beskrives som med en Langmuir konstant ud fra forholdet mellem adsorberet stof til partiklerne og ligevægtskoncentrationen i væskefasen. Hvis antal adsorptionspladser på overfladen er bestemt, udtrykt som mol m⁻², kan man bestemme en adsorptionskapacitet som kan overføres til andre eksperimenter med et andet indhold af sorbent i suspensionen. Viden om partiklernes dimensioner kan så give et estimat for tilgængeligt overflade areal som indgår i adsorptionsprocessen som funktion af massen af sorbent. Antages partiklen at være kugleformet og ikke cylinderformet vil adsorptionen undervurderes fordi overfladearealet underestimeres. Fejlen er mindst ved ratio 1 og stiger jo mere ratio ændres i forhold til 1. For lermineralet montmorillonit er pladediameter : pladetykkelse ratio mellem 180-2900³, og det leder til undervurdering af mineraloverfladen og dermed også adsorptionskapaciteten med ca. 300–2000% hvis der antages kugleformede partikler.



FIGUR 2.1. Logaritmen af fejlen ved at antage kugleform ved beregning af overfladeareal og adsorptionskapacitet af en partikel som funktion af pladediameter og pladetykkelse ratioen for en cylinderformet partikel.

Korrekt bestemmelse af overfladeareal af en partikel kræver præcis bestemmelse af dimensionerne og af formen, især for flade partikler som er tilfældet med lagdelte silikat lermineraller⁴.

En multimetode tilgang er anvendt for at opnå dette for de to partikel suspensioner der anvendes som sorbent i dette projekt: Goethit suspension og montmorillonit suspension. De vigtigste egenskaber for disse to suspensioner som blev bestemt var: 1) overfladearealet af montmorillonit og goethit partikler, og 2) stabiliteten af partikelsuspensionerne som påvirker det aktive overfladeareal. Partikelstørrelsesfordelingen i suspensioner med fine, medium og grove partikler fremstillet ved centrifugering og ultracentrifugering er bestemt. Effekten af ioner (fra softwater medium til de økotoxikologiske eksperimenter) og opløst organisk materiale (DOC) isoleret fra Suså på Sjælland på partikelstørrelsesfordelingen er også bestemt.

2.3.2 Materialer

Suspensioner af montmorillonit og goethit fremstillet som beskrevet i forrige afsnit blev sendt til Göteborg University, Environmental Nanochemistry laboratory (Tabel 2.3). Stamsuspensionerne fortyndes med ionbyttet vand (Milli-Q) eller soft water for at få en optimal densitet til bestemmelse tilpasset til hvert instrument.

TABEL 2.3 Oversigt over suspensioner som er undersøgt for partikelstørrelsesfordeling. "Grov" indikerer at fraktionen er fremstillet som grove partikler ved centrifugering (trin 1, og "Fin" indikerer at fraktionen er fra supernatanten efter ultracentrifugering (trin 2). "Fraktion" henviser til to forskellige DCS bestemmelser for grovfraktionen af montmorillonit (se i teksten).

Nr	Materiale	Ønsket finhed*	Fraktion	Suspension i
1	Montmorillonit	Grov	large	H ₂ O
2	Montmorillonit	Grov	small	H ₂ O
3	Montmorillonit	Grov	large	soft H ₂ O**
4	Montmorillonit	Grov	large	H ₂ O + DOM***
5	Montmorillonit	Fin	-	H ₂ O
6	Montmorillonit	Fin	-	H ₂ O + DOM
7	Goethit	Fin	-	H ₂ O + DOM
8	Goethit	Fin	-	soft H ₂ O + DOM

* via centrifugeringshastighed i trin 1 og 2 (se Tabel 2.2),

** soft water

*** Opløst organisk materiale isoleret fra Suså, Danmark

2.3.3 Metoder

Fortyndede partikel suspensioner blev analyseret med DLS (Dynamic Light Scattering, dynamisk lysspredning), DCS (Differential Centrifugal Sedimentation, også kaldet Disk centrifugering), and AFM (Atomic Force Microscopy, atomar kraftmikroskopi) for at bestemme hydrodynamisk diameter, Stokes diameter, samt pladediameter og pladetykkelse (Tabel 2.4). Flere detaljer om teknikkerne skrives sammen med resultaterne senere i dette kapitel. Alle bestemmelser blev foretaget ved rumtemperatur (ca. 22 °C).

TABEL 2.4 Partikelkarakteriseringsmetoder og parametre bestemt

Metode	For-kor-telse	Mål	Kommentarer
Dynamisk lysspredning	DLS	Hydrodynamisk diameter	Meget påvirkelig af partikelstørrelse og partikelstørrelsesfordeling
Disk centrifugering	DCS	Stokes diameter	Relativt høj afskæringsgrænse for partikelstørrelse
Atomar kraftmikroskopi	AFM	Pladetykkelse og pladediameter	Kun anvendt til montmorillonit

2.3.3.1 Dynamisk Lys Spredning

Dynamisk lys spredning (Dynamic light scattering, DLS) er anvendt til bestemmelse af hydrodynamisk størrelse af montmorillonit og goethit suspensionerne. I DLS er der en matematisk sammenhæng mellem fluktuationerne i intensiteten af lysspredning og diffusionskoefficienten for en gruppe partikler som kan beskrives ved hjælp af en intensitetskorrelationsfunktion. Hvis systemet er tilstrækkeligt fortyndet, så vil diffusionskoefficienten derfor kunne relateres til den hydrodynamiske partikelstørrelse ved hjælp af Stokes-Einstein ligningen (ligning 2.1)

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (2.1)$$

Hvor D er den kollektive diffusionskoefficient, k_B er Boltzmanns konstant, T er den absolutte temperatur, η er viskositeten af mediet, og r_H er den hydrodynamiske radius (Finsy, 1994; Dhondt, 1996). Den målte diffusionskoefficient vil derfor give en intensitetsbaseret gennemsnitspartikelstørrelse (Z-gennemsnitsdiameter).

For partikler som er små i forhold til bølgelængden af det lys der spredes gælder at intensiteten af spredt lys er proportional med volumen kvadreret eller partikelstørrelsen opløftet i 6. potens (Finsy, 1994). For DLS bestemmelser betyder det at tilstedeværelse af selv meget små mængder store partikler giver en meget forstørret Z-gennemsnitsdiameteren sammenlignet med f.eks. median partikeldiameteren. For polydisperse prøver resulterer det i signifikant større Z-gennemsnitsdiameter end geometrisk diameter bestemt ved andre teknikker, som f.eks. AFM. Den intensitets-baserede størrelsesfordeling bestemt med DLS kan omregnes til volumenbaseret størrelsesfordeling ved hjælp af Mie teorien (Mie, 1908; van der Hulst, 1981), som er en teori der delvist kompenserer for skævheden i intensiteten. Transformationen er betinget af en del forudsætninger er opfyldt, bl.a.: 1) alle partikler er kugleformede; 2) partikelsuspensionen er homogen, dvs. monodispers; og, 3) intensiteten er konstant for hele partiklen (Malvern). Resultatet af denne korrektion kaldes volumetrisk gennemsnitsdiameter.

Suspensioner af montmorillonit og goethit blev fortyndet med Milli-Q vand før bestemmelser med DLS instrumentet (Malvern Zetasizer Nano ZEN3600). Bølgelængden for dette instrument var 633 nm. Indledende analyser af suspensionerne (data ikke vist) indikerede at suspensioner er meget polydisperse, og derfor er DLS bestemmelserne mest at betragte som screeninger af partikelstørrelsen. Bestemmelserne med DLS gav intensitetsbaserede og volumenbaserede gennemsnitspartikelstørrelser.

2.3.3.2 Disk Centrifugering

Adskillelse af partikelfraktioner efter størrelse med disk centrifuge bygger på princippet om forskelle i sedimentationshastighed (differential centrifugal sedimentation, DCS). Kernen i en disk centrifuge er en hurtigt roterende hul disk fyldt med en væske, og i centeret er et hul til injektion af prøven, og yderst i periferien af disken er en detektor der måler turbiditet, og dermed partikler som passerer detektoren. Den roterende hule disk fyldes med en sucrose-opløsning så der skabes en gradient af sucrose ved at tilsætte lavere og lavere koncentration af sucrose efterhånden som disken fyldes op. Når prøven, dvs. suspensionen injiceres i den fyldte disk begynder partikler straks at vandre ud af mod diskens periferi (sedimentere). Sucrose gradienten tilbageholder de vandrede partikler i for forskelligt omfang afhængigt af partikelstørrelsen. De største partikler vandrer hurtigere end de mindre partikler. Disken med den anvendte sucrose-gradient kalibreres med en suspension med kendt densitet og et antal partikelstørrelser, og ud fra sedimentationsteorien kan størrelsen af de ukendte partikler i suspensionen beregnes ud fra sedimentationstiden. Kendes det refraktive index så kan massen af hver størrelsesfraktion beregnes ud fra intensiteten af lysspredningen i følge Mie teorien (Mie, 1908). Partiklerne adskilles som funktion af tiden fra injektion til de passerer detektoren, dvs. partiklerne der passerer detektoren samtidig har samme størrelse og dermed svarer det til en monodispers prøve. Omregning med Mie teorien bliver derfor mere præcis for diskcentrifuge sammenlignet med DLS hvor suspensionerne blev bestemt som polydisperse suspensioner.

Partikelstørrelsesintervallet som bestemmes ved en disk centrifuge analyse (og andre DCS metoder) afhænger af densitet af partiklerne, viskositeten af suspensionsmedium, og rotationshastigheden. Det betyder at nogle partikler ikke bestemmes med i den aktuelle opsætning af instrumentet, fordi de er for store og passerer forbi detektoren meget hurtigt eller inden målingen er startet. For polydisperse suspensioner skal prøven analyseres flere gange med skiftende rotationshastighed for at få alle partikelstørrelsesintervaller bestemt. Baseret på forundersøgelserne i dette projekt var det særligt vigtigt for fraktionen med grove montmorillonit partikler. Meget fine partikler er ofte dårligt bestemt, fordi intensiteten af lysspredning aftager med mindre størrelse i størrelsesorden 6. potens. Dertil kommer at bestemmelse af mindre partikler tager meget længere tid, fordi sedimentationshastigheden aftager med kvadratet af partikelradius. For meget små partikler tager sedimentationen meget lang tid og derfor betyder diffusionen af partikler forholdsvis mere (jf. ligning 2.1). Denne diffusion giver en spredning i alle retninger og dermed bredere signaltoppe, og derfor er det sværere at bestemme meget små partikler præcist. Størrelses detektionsgrænsen for små partikler målt med DCS bliver derfor afhængig af densitet og refraktivt indeks for partiklen. Den præcise værdi af størrelsesdetektionsgrænsen er ikke kendt, men f.eks. montmorillonit har relativt lav densitet og lavt refraktivt indeks, og der resulterer i en relativt højere størrelsesdetektionsgrænse sammenlignet med goethit. Før måling blev suspensionerne fortynder med Milli-Q vand eller soft water (medium til de økotoxikologiske eksperimenter) afhængigt af materiale koncentrationen, og blandet grundigt ved 600 rpm på magnetomrører i mindst 30 minutter. Rotationshastigheden blev sænket til 200 rpm under prøveudtagning fra suspensionen. Prøvetagning foregik med sprøjte og derefter direkte injektion i disk centrifugen. Partiklerne blev centrifugeret i en 2-24% w/w sucrose gradient i disk centrifuge (CPS Instruments, UK). Dette instrument havde en laser kilde med bølgelængde source 405 nm, og lysspredningen blev detekteret med en fotomultiplier i en 90 graders vinkel. Der blev anvendt to forskellige centrifugeringshastigheder på 4620 rpm og 18000 rpm for at bestemme hhv. grove og fine partikler. En suspension af 239 nm store polyvinyl chlorid (PVC) partikler med en kendt materialedensitet på $1,385 \text{ g cm}^{-3}$ blev anvendt som kalibreringsstandard.

2.3.3.3 Atomar Kraftmikroskopi

Atomar kraftmikroskopi (AFM) er et højopløsningsmikroskop til probe scanning. Information om størrelse af partikler eller kanter på en overflade fås ved en "tiltrækning" eller let berøring af overfladen med en mekanisk nål. Nålen består af piezoelektriske elementer som muliggør bestemmelse af meget fine men nøjagtige og præcise bevægelser op og ned mens nålen scanner hen over en overflade. AFM har en resolution på mindre end en nanometer, og det kræver at partiklerne er monteret på en perfekt flad overflade som f.eks. en glimmer flage (mica-sheets). Dette gælder for Z-retningen, dvs. op og ned på overfladen. De vandrette (X og Y) dimensioner af ujævnheder på overfladen bestemmes fordi ændringer i Z-retningen kræver en vis minimum udstrækning for at kunne bestemmes. Den lodrette resolution er op til 1000 gange ringere end i Z-resolutionen. I dette projekt anvendtes kun målinger i Z-retning. Uregelmæssigheder af partiklerne betyder at størrelsen af en given partikel varierer. Pladetykkelsen blev derfor estimeret med AFM bestemmelser af den højeste vertikale afstand fra det synlige/målbare underliggende glimmer mineral.

Montmorillonit og goethit stamsuspensioner blev fortyndet med Milli-Q vand og afpipetteret (25,0 μL) ovenpå en flage af glimmer. Prøven blev lufttørret til næste dag (ca. 16 timer) før AFM analyse (Digital Instruments Dimension 2000 AFM). Tidligere eksperimenter har vist at det er vigtigt at finde en optimal fortynding af suspensionen for at få brugbare størrelsesbestemmelser. Forskellige fortyndingsforhold blev afprøvet og proceduren der gav det bedste resolutionsbillede og bedste partikeladskillelse blev valgt. Lodrette afstande blev målt for hver prøve på glimmerflagerne.

2.3.4 Resultater og Diskussion

2.3.4.1 Dynamisk Lysspredning (DLS)

Partikel diameter montmorillonit, goethit og standard PVC partikel suspensioner bestemt med DLS målinger er vist i Tabel 2.5. Grov montmorillonit med DOM coating er ikke målt, fordi disse suspensioner er så polydisperse at Z-average ikke vil kunne beregnes. Program algoritmen korrigerer i et vist omfang for den større lysspredning fra store partikler, men effekten af polydispersitet og partikel aggregering i suspensionen er i mange tilfælde uadskillelige. AFM analysen af fraktionen med både fint montmorillonit og DOM viste at de mindre partikler er mere talrige end de større aggregater (se Figur 2.10), men de mindste partikler ses ikke med DLS i grov fraktionen af montmorillonit pga. den størrelsesafhængige lysspredning.

TABEL 2.5: Intensitets-baseret og volumen-baseret hydrodynamisk partikelstørrelse fra DLS

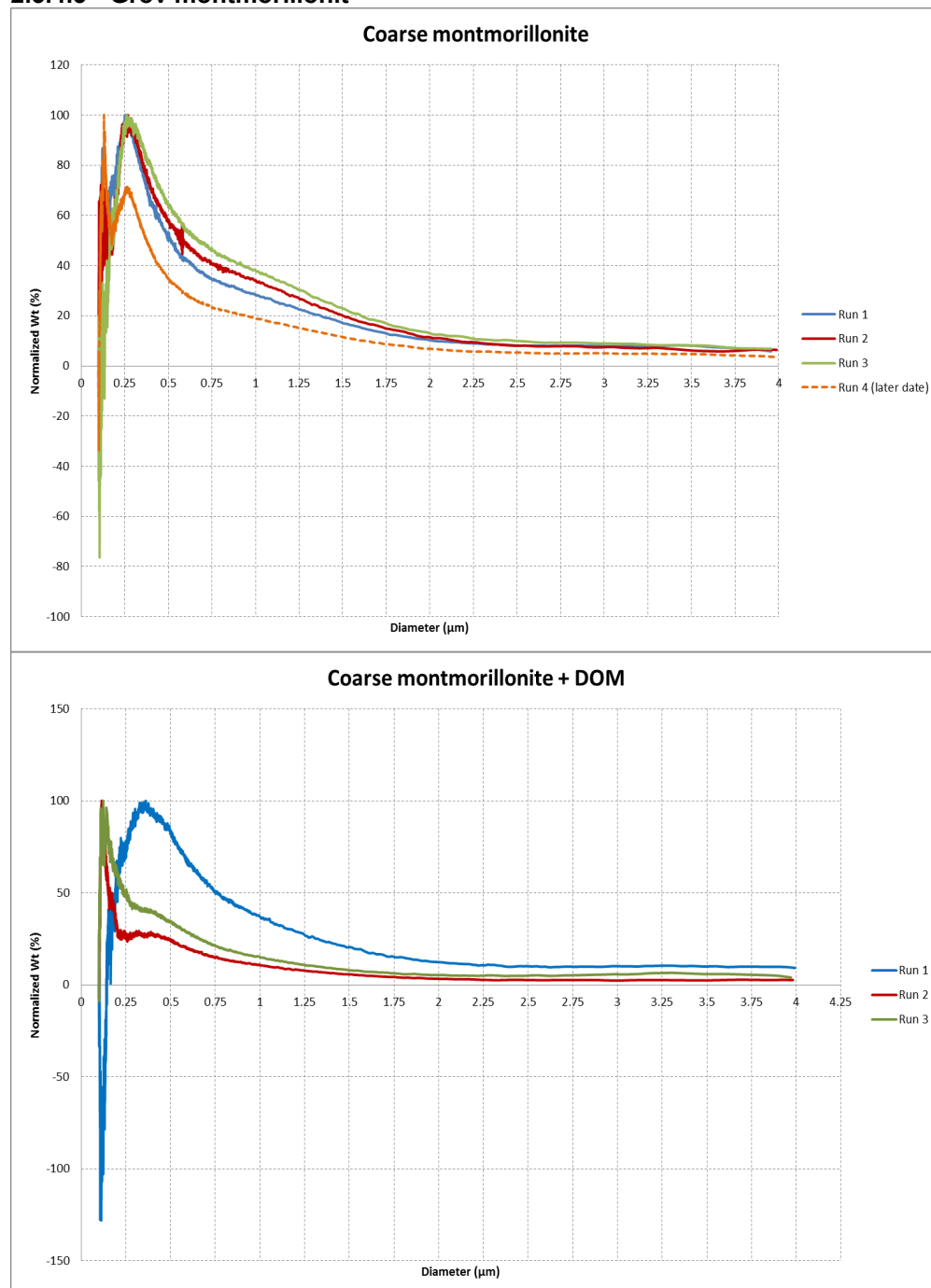
Materiale	Fortynding medium	Z-ave diameter (nm)	Volumen-gennemsnitsdiameter (nm)
PVC (DCS standard)	x5, Milli-Q H ₂ O	245,3 ± 6,21	255,6 ± 6,54
Grov montmorillonit	x10, Milli-Q H ₂ O	1834,7 ± 759,65	446,0 ± 83,9
Grov montmorillonit	x10, soft H ₂ O	639,7 ± 121,52	601 ± 216,23
Fin montmorillonit	Stamsuspension	231,6 ± 5,37	343 ± 16,9
Fin montmorillonit + DOM	Stamsuspension	6308,3 ± 141,83	4089 ± 1357,7

De store aggregater skævvrider signalet for størrelsesfordelingen så meget at partikeldiameter bestemt med DLS ikke er repræsentative for den aktuelle størrelsesfordeling i suspensionen. Standard PVC suspensioner blev anvendt til kalibrering af DLS, og som det ses i Tabel 2.5 er der også variation og forskel på den målte gennemsnits partikelstørrelse for metoderne selv for en nærmest ideal suspension som den anvendte PVC standard suspension er. Den certificerede partikelstørrelse på 239 nm er mindre end de 245 nm målt som Z-average med DLS, og de 256 nm målt som volumen gennemsnit med DLS. Den relativt store standard i DLS måledata bidrager til usikkerheden af det beregnede ækvivalente partikel volumen og derfor bliver bestemmelsen af det geometriske overfladeareal mere en approksimation end en absolut størrelse.

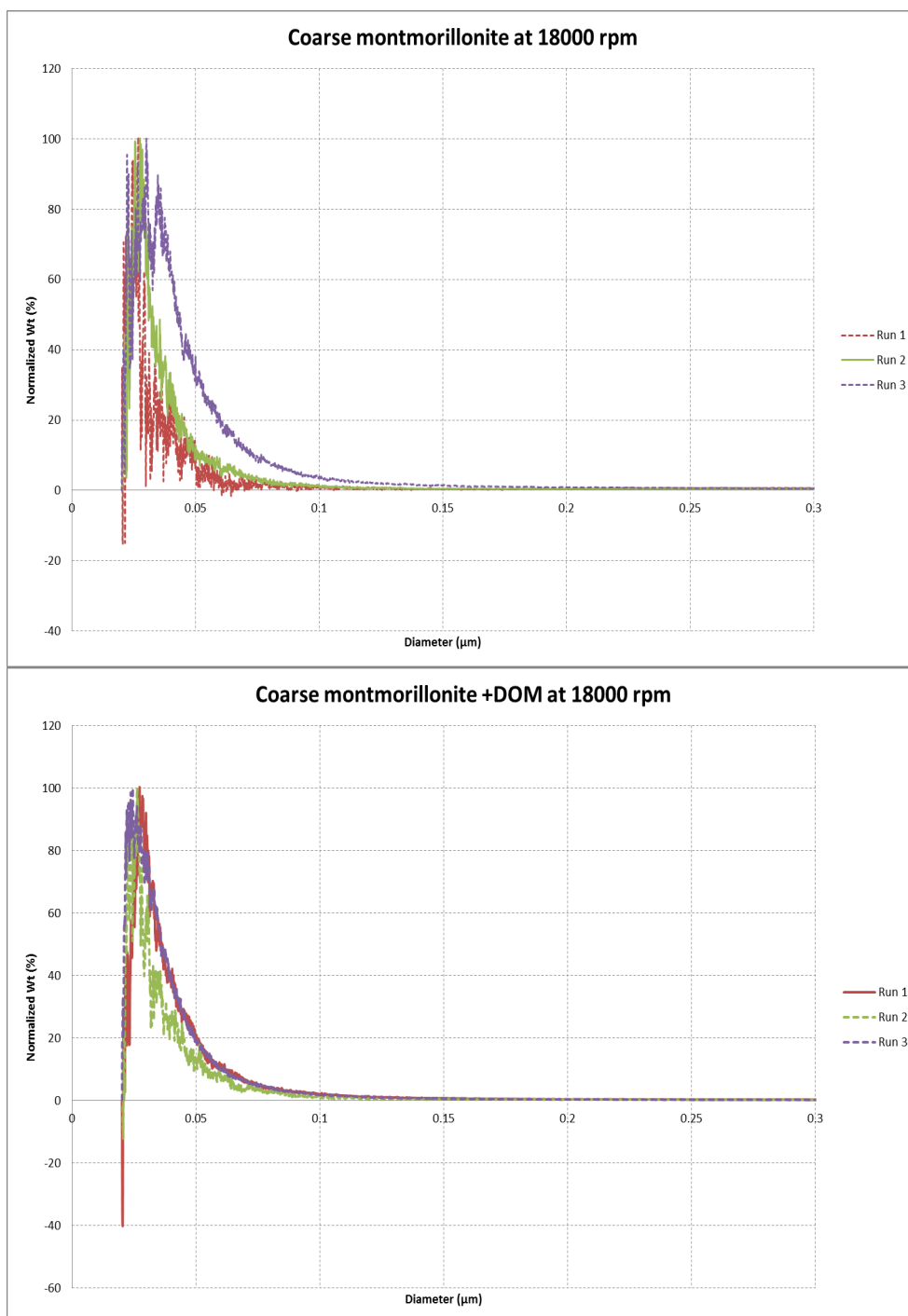
2.3.4.2 Disk Centrifugering (DCS)

Partikelstørrelsesfordelingen for de grove montmorillonit suspensioner blev bestemt ved to forskellige omdrejningshastigheder, 4620 rpm (større partikler) og 18000 rpm (mindre partikler) (Figur 2.1, 2.2 og 2.3). Disse fraktioner kaldes i det følgende for "large" og "small" fraktion fordi der er forskellige beregninger til her af fraktionerne. I Figur 2.1a ses de tre indledende målinger fra samme dag (run 1-2-3) med en gennemsnits partikelstørrelse omkring 250 nm. Et andet toppunkt omkring 130 nm ligger tæt på cut-off i målingerne som var indstillet til at måle fra 80 nm og op efter i de indledende målinger. En fjerde måling af samme suspension blev foretaget to dage senere (stiplet orange linje) og her ses et skifte i størrelsesfordelingen så det nu er den mindre diameter som dominerer. Dette indikerer at de større lermineral partikler i den anvendte fortyndede suspension (i dette tilfælde 336 mg L⁻¹) brydes op i mindre dele over tid.

2.3.4.3 Grov montmorillonit



FIGUR 2.1: Partikelstørrelsesfordeling af grov montmorillonit suspension fortyndet i H_2O og målt ved 4620 rpm. a) uden DOM, x10 fortynding til 336 mg L^{-1} . b) med tilsat DOM, x2 fortynding til 336 mg L^{-1} montmorillonit ler og $67,5 \text{ mg L}^{-1}$ DOM.



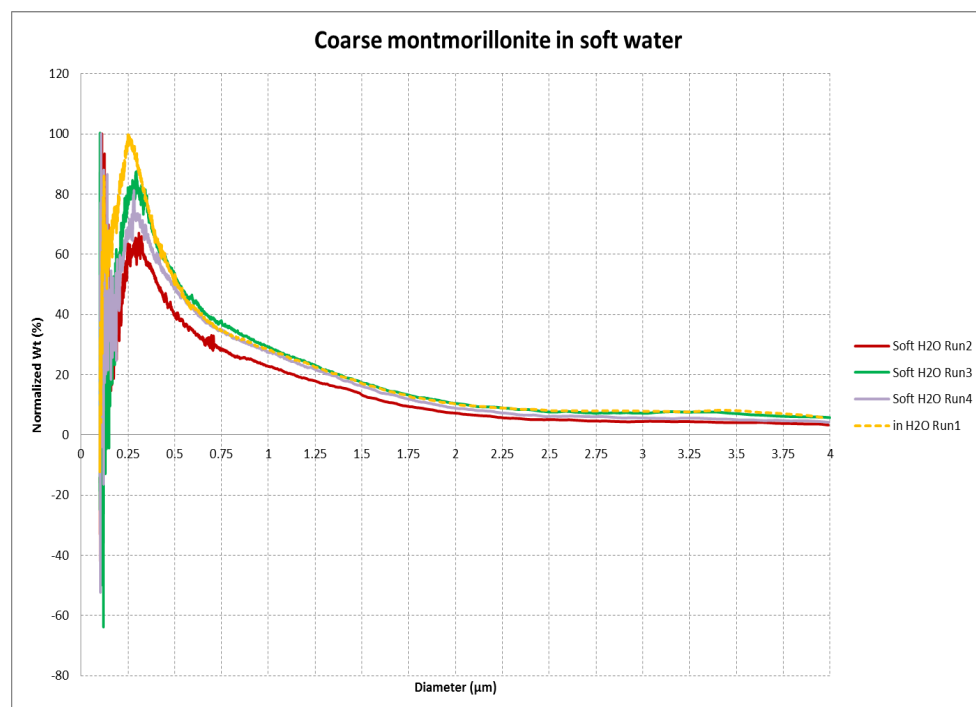
FIGUR 2.2: Partikelstørrelsesfordeling af grov montmorillonit suspension fortyndet i H₂O og målt ved 18000 rpm. a) uden DOM, x10 fortynding til 336 mg L⁻¹. b) med tilsat DOM, x2 fortynding til 336 mg L⁻¹ montmorillonit ler og 67,5 mg L⁻¹ DOM.

Tilstedeværelsen af DOM ser ud til at fremme denne disintegration som ses i Figur 2.1b. Alle målinger blev lavet i forlængelse af hinanden på samme dag med undtagelse af Run 4 i Figur 2.1. Det lidt afvigende billede i første gennemløb kan skyldes en påvirkning af den foregående kalibrering, men anden og tredje bestemmelse har en tydelig bimodal fordeling med tendens til partikelstørrelser under 0,25 μm. Tendensen for montmorillonit ler til at bryde op i mindre partikler gør det nødvendigt med den højere centrifugeringshastighed end 4620 rpm.

Figur 2.2 viser partikelstørrelsesfordelingen for den lille (small) fraktion af grov montmorillonit (omdrejningshastighed på 18000 rpm) for fortyndede suspensioner med ler alene og ler med DOM. I Figur 2.2a ses fordelingen i Run 3 at afvige lidt fra de to første (Run 1 og 2), og det

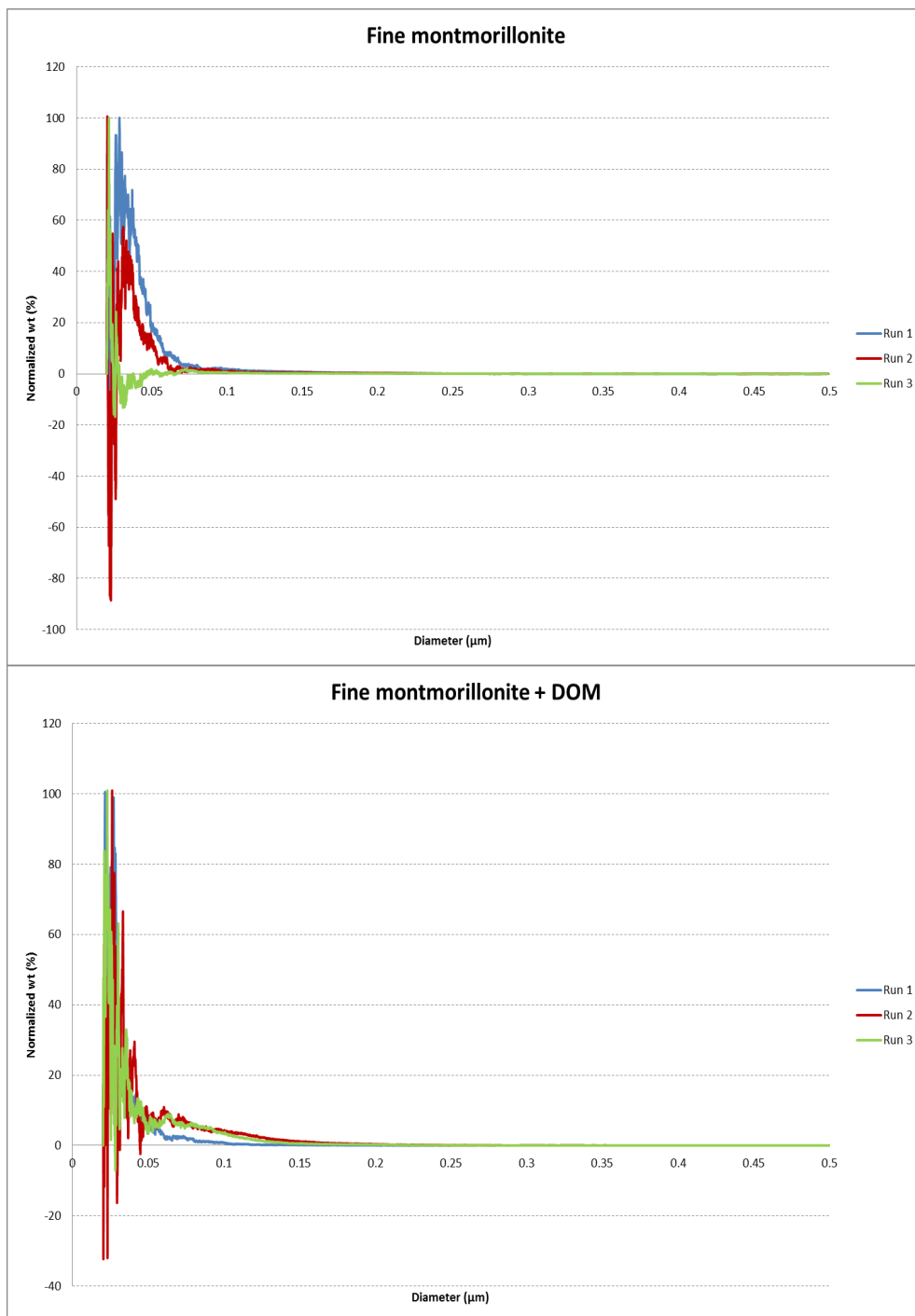
skyldes måske en begrænset holdbarhed af sucrose gradienten i centrifugen. Målinger ved den høje hastighed tager længere tid (mindst 45 minutter pr kørsel) for at de mindste partikler kan nå at sedimentere til periferien af disken og måles af detektoren. Kvaliteten af tredje kørsel kan derfor være tvivlsom hvis sucrosegradienten ikke er intakt efter så lang tid. Sammenlignet med Figur 2.2b hvor suspensionen af lermineral også indeholder DOM så ser partikelstørrelsesfordelingen ud til at være ret ens, og det ser ud til at de små partikler under 50 nm (small) ikke påvirkes af DOM på samme måde og DOM ikke resulterer i en opbrydning i endnu mindre partikler som vi så for de store partikler i grov montmorillonit fraktionen.

Effekten af ionstyrke på størrelsen af partikler i grov montmorillonit blev testet ved at fortynde stamopløsningen 10 gange med soft water. Soft water er et standard medium til økotoxikologiske test af ferskvandsorganismer. I Figur 2.3 ses at partikelstørrelsesfordelingen er ens for suspensioner i både soft water medium og i Milli-Q vand (orange stiptet linje), og deraf konkluderes at ændring i ionstyrke under de aktuelle koncentrationsforhold (336 mg L^{-1}) ikke har nogen nævneværdig betydning. Det ville have været interessant at undersøge effekten af soft water for partikler mindre end 50 nm, men det blev ikke gjort i dette projekt pga. instrumentets max omdrejninger på 18000 rpm er en begrænser DCS teknikken for så små partikler.



FIGUR 2.3: Partikelstørrelsesfordeling af grov montmorillonit fortyndet i soft water x10 til 336 mg L^{-1} og målt ved 4620 rpm. Måling Run 1 er ikke vist pga. kalibreringsfejl. En måling af grov montmorillonit fortyndet i Milli-Q water (orange stiptet linje) er plottet til sammenligning.

2.3.4.4 Fint Montmorillonit



FIGUR 2.4 Partikelstørrelsesfordeling af fin montmorillonit stamsuspension målt ved 18000 rpm. a) 275 mg L⁻¹ uden DOM. b) 177 mg L⁻¹ lermineral med tilsat 35,5 mg L⁻¹ DOM.

Stamsuspensioner af fin montmorillonit blev analyseret ved 18000 rpm og resultaterne ses i Figur 2.4. Gennemsnits diameter for fint montmorillonit både med og uden DOM tilsat er ret ens på ca. 24 nm. Det er meget tæt på eller måske under detektionsgrænsen for den mindste størrelse som instrumentet kan bestemme fordi 18000 rpm allerede er max omdrejningshastighed, og der ses store udsving i intensiteten under ca. 50 nm. Dertil kan afvigelsen i Run 3 i Figur 2.4a måske skyldes nedbrydning af sucrose i matricen der skaber gradienten i disken fordi hver måling ved 18000 rpm tager 45 minutter. Bemærk der er en hale på størrelsesfordelingskurven for fin montmorillonit når der er DOM til stede (Figur 2.4b). Halen som går ud til

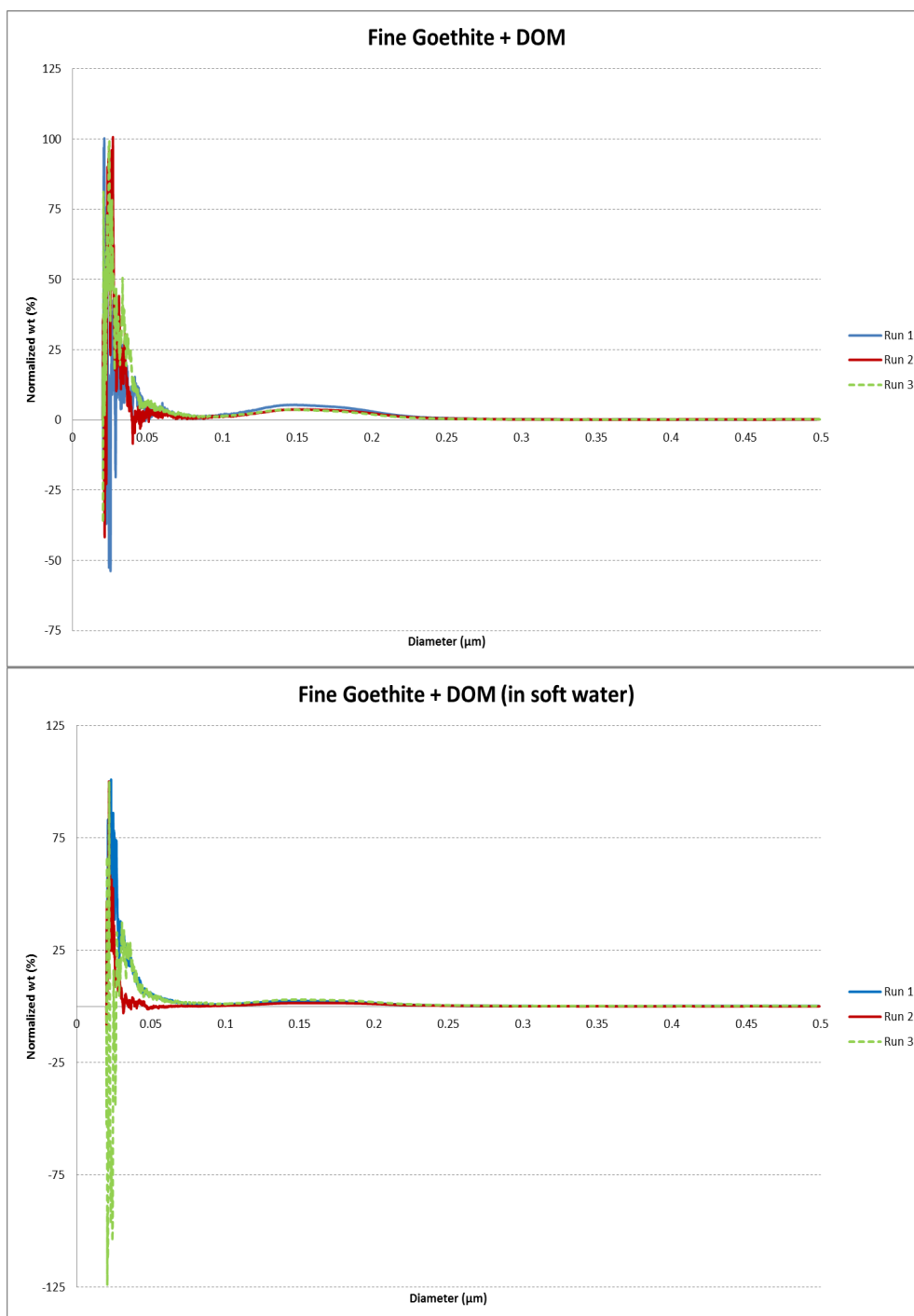
omkring 150 nm indikerer at der sker en aggregering af de fine lerpartikler, og det understøttes af observationer fra AFM som vises senere Figur 2.11.

2.3.4.5 Goethit

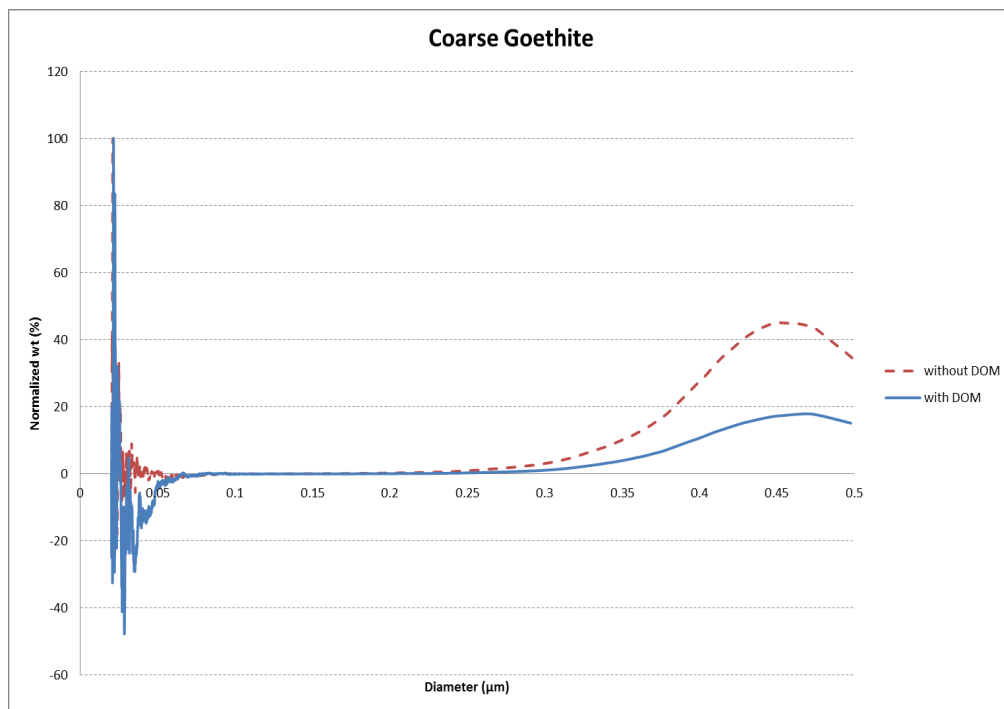
Fin goethit med tilsat DOM blev analyseret med DCS (Figur 2.5), men goethit uden DOM blev ikke vist. De indledende forsøg viste at goethit i suspension uden DOM aggregerede meget hurtigt ved pH omkring neutral. Mineraloverfladens ladning betyder meget for aggregeringshastigheden og omkring neutral punktet hvor overfladens gennemsnitlige ladning er nul (point of zero charge (pzc)) går det hurtigst (Dhondt 1996, Elimelech et al., 1995). Goethits pzc varierer meget, men ligger ofte i nærheden af neutral pH (Kosmulski et al, 2003), og dermed forventes aggregering af goethit kolloider at være hurtig ved pH nær pzc som forklarer den ringe stabilitet af goethit suspension uden DOM coating. Adsorption af DOM på goethit giver et lag af organiske molekyler som skal foldes og overlapper for at mineral kolloidernes overflade kan komme tæt på hinanden. DOM laget resulterer i et osmotisk tryk som skubber kolloiderne fra hinanden og aggregering er ikke entropisk favorabelt, et fænomen som kaldes sterisk stabilisering (Elimelech et al., 1995). Suspensionen med den fine goethit og DOM i blanding blev fortyndet 10 gange i enten Milli-Q vand eller soft water i hver sit glas. Partikelstørrelsesfordelingen for hver suspension er vist i Figur 2.5. Bemærk at det andet toppunkt ved ca. 150 nm er mere udpræget for goethit i Milli-Q vand sammenlignet med goethit i soft water. Til trods for at denne top er mindre end 25% af den normaliserede vægt, så er den absolutte vægt (i μg) af partikler omkring 150 nm størrelsen 1/10 af den absolutte masse af partikler i toppen under 50 nm. Derfor er denne top og partiklerne omkring 150 nm også inkluderet i beregningen af partikeloverfladeareal for goethit suspensionen.

Et samlet plots af den grove goethit fraktion er vist i Figur 2.6. Størrelsesfordelingen for suspensionen af goethit uden DOM har toppunkt omkring 450 nm og der er partikler mindre end 50 nm. For suspensionen med goethit der indeholder DOM ses også et toppunkt omkring 450 nm men med mindre amplitude og mindre relativ forekomst. Ud fra de foreliggende resultater kan vi ikke drage en endelig konklusion om partikelstørrelsesfordelingen af grov goethit suspension.

Det kræver en fuldstændig karakterisering af hele suspensionen, og den anvendte protokol i dette projekt blev udviklet og optimeret til karakterisering af partikler under 500 nm i diameter. For grove goethit partikler tyder undersøgelserne på at en væsentlig fraktion af partiklerne er større end 500 nm og sandsynligvis også større end 1 μm i diameter. For at undersøge de store partikler op til og over 1 μm skal der optimeres en ny protokol og finde nye standard suspensioner. I DCS målingerne har vi anvendt PVC nanopartikler (239 nm diameter, densitet 1,385 g mL^{-1}) som kalibreringsstandard. I en modificeret protokol for den grove goethit suspension med større partikeldiameter kræves en standard med større diameter og densitet tættere på goethits densitet (4,25 g mL^{-1}). Sådan en standard har ikke været tilgængelig i projektet.



FIGUR 2.5: Partikelstørrelsesfordeling af fin goethit med tilsat DOM, fortyndet x10 til 14,5 mg L⁻¹ goethit og 2,9 mg L⁻¹ DOM, og målt ved 4620 rpm. a) fortyndet i Milli-Q vand, og b) fortyndet i soft water.



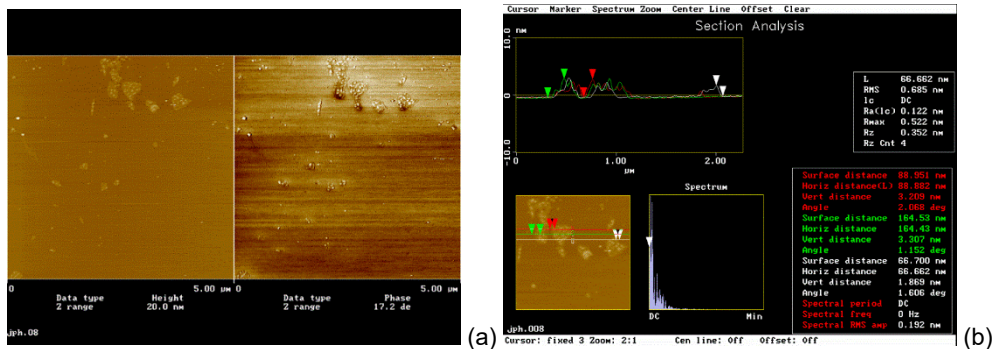
FIGUR 2.6: Partikelstørrelsesfordeling af grov goethit fortyndet i Milli-Q vand og målt ved 4620 rpm. Den stiplede røde linje viser suspension uden DOM, fortyndet til 135,2 mg L⁻¹ goethit. Den blå linje viser suspension med DOM, fortyndet til 27 mg L⁻¹ goethit og 5,4 mg L⁻¹ DOM.

2.3.4.6 Atomar kraftmikroskopi (AFM)

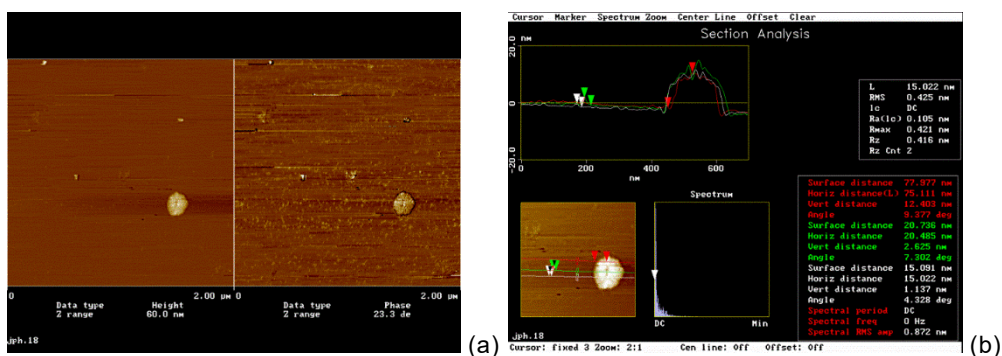
2.3.4.7 Grov Montmorillonit

Billederne fra AFM af grov montmorillonit uden og med tilsat organisk materiale (DOM) ses i hhv. Figur 2.7 og 2.8. En suspension af partikler er afsat på en plan overflade af et glimmermineral (mica) som anvendes til prøveholder i alle de AFM billeder der vises her. I Figur 2.7 ses partikulære afsætninger som tydelige små toppe, men der ses også en tynd film af noget materiale rundt om toppene. Det er uvist om den tynde film er et monolag af orienteret ler. Det er med sikkerhed ikke tilfældige defekter i mica underlaget da mica ikke forventes at have sådanne defekter. Kanterne på det afsatte tynde lag bruges til at måle højden af laget. Sektionsvis analyse giver gennemsnits afstand fra mica til top af partikel på 3,26 nm for partiklerne og 1,869 nm for tykkelsen af den tynde film.

Opløst organisk materiale (DOM) giver tilsyneladende nogen fordele ved at adskille lerpartiklerne som ses ved mange partikler med ens størrelse i. I samme AFM scan ses også store aggregater (f.eks. 12,40 nm høje ved de to røde markører). Det er svært at bestemme gennemsnitsstørrelsen af de store partikler med en statistisk præcision fordi der er så få sammenlignet med de små partikler. Derudover er det usikkert aggregeringen skete i den fortyndede suspension eller som et artefakt i prøvetørningsprocessen inden AFM scan. I projektet blev AFM mest anvendt til at bestemme størrelse af de fine lerpartikler.



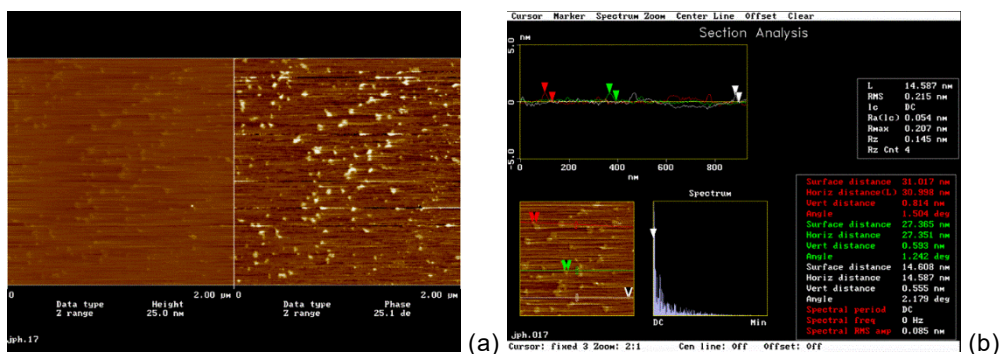
FIGUR 2.7: Grov montmorillonit, 35 gange fortyndet i H_2O . a) AFM scan viser toppe og tynde film på overfladen. b) Sektionsanalyse, den gennemsnitlige vertikale afstand er 3,26 nm for toppe (røde og grønne linjer), og vertikal højde af den tynde film er 1,87 nm (hvid linje).



FIGUR 2.8: Grov montmorillonit med tilsat DOM, 100 gange fortyndet i H_2O . a) AFM scan viser tilstedeværelse af både dispergerede partikler og aggregater. b) Sektionsanalyse viser den gennemsnitlige vertikale afstand er 1,881 nm for små toppe (grønne og hvide linjer), og vertikal højde af den store partikel er 12,403 nm (rød linje).

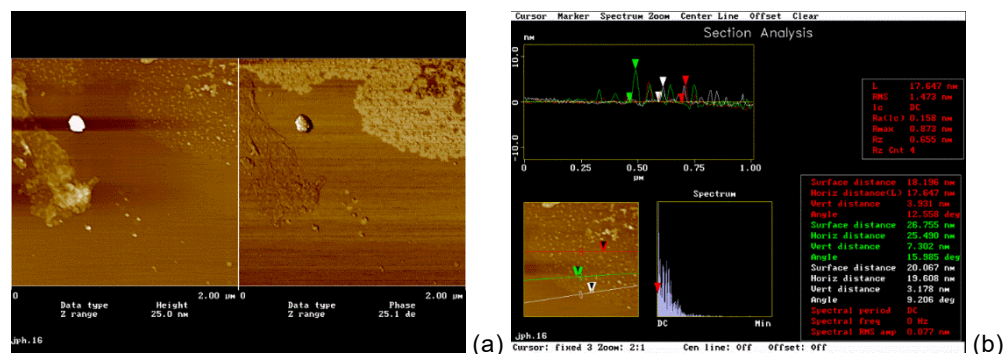
2.3.4.8 Fin Montmorillonit

Fin montmorillonit suspension blev afsat på mica overfladen og AFM billederne ses i Figur 2.9 og 2.10. For fin montmorillonit uden tilsat DOM var det nødvendigt at fortynde 500 gange i H_2O for at få et brugbart AFM scan. Det er et lidt uklart scan, men analyse af de afsatte toppe som ses i Figur 2.9 måles den lodrette afstand til under 1 nm (0,65 nm målt gennemsnit af tre toppe), og det er meget mindre end størrelsen målt for grove montmorillonit partikler.



FIGUR 2.9: Fin montmorillonit, x500 fortynding i H_2O . a) AFM scan viser små spredte partikler. b) Sektionsanalyse giver gennemsnitlig lodret højde på 0,654 nm.

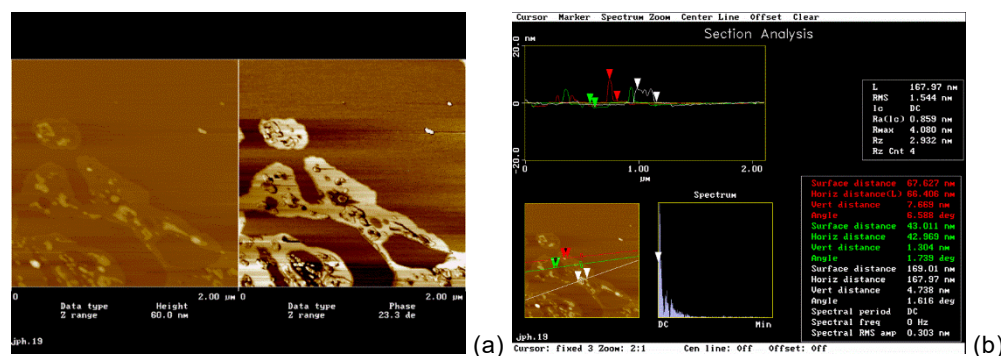
Tilsætning af DOM til den fine montmorillonit resulterer i den samme effekt som ses for grov montmorillonit. Det organiske stof hjælper i et vist omfang med at adskille partiklerne, men der ses også både større aggregater og en tynd film som er tydeligt anderledes end de fine partikler afsat på mica overfladen. Partikelstørrelsen måles for de afsatte partikler til en lodret højde på 3,6 nm i gennemsnit, og det er uklart om den tynde film består af organisk materiale eller et monolag af orienteret ler, eller måske en kombination.



FIGUR 2.10: Fin montmorillonit med tilsat DOM, 1000 gange fortyndet i H_2O . a) AFM scan viser tilstedeværelse af både dispergerede partikler, en tynd film og større aggregater. b) Sektionsanalyse viser den gennemsnitlige vertikale afstand er 3,555 nm for små toppe (røde og hvide linjer).

2.3.4.9 Goethit

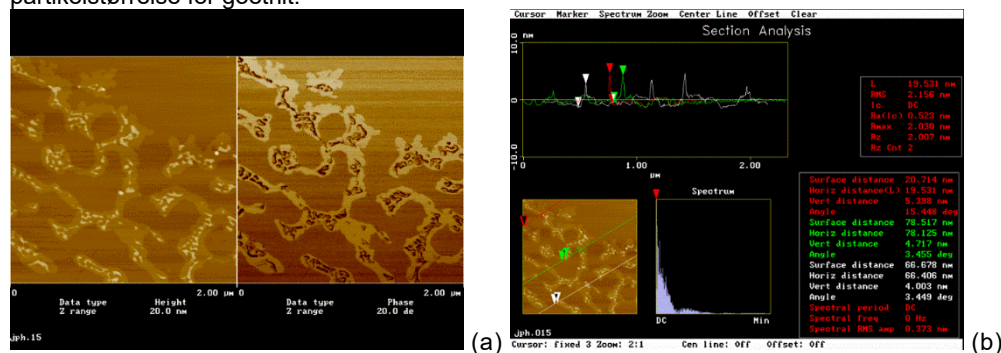
Grov og fin goethit suspension med tilsat DOM blev afsat på mica og AFM scan er vist i 2.11 og 2.12. For grov goethit uden tilsat DOM ($13,5 \text{ g L}^{-1}$) var det ikke muligt at få en tilstrækkelig adskillelse af partiklerne til at optage gode AFM billeder, og det er stemmer overens med DCS observationerne af at det er domineret af meget store partikler.



FIGUR 2.11: Grov goethit med tilsat DOM, 1000 gange fortyndet i H_2O . a) AFM scan viser polydisperse partikler omgivet af en tynd film. b) Sektionsanalyse viser et bredt interval af partikelstørrelser med den højeste valgte top med vertikal afstand på 7,669 nm (rød linje).

På AFM billederne ses stor variation i partikel størrelsen indenfor korte afstande og dermed høj polydispersitet. En gennemsnits partikelstørrelse målt for tre steder i billedet giver vertikal afstand på $4 \pm 3 \text{ nm}$. På den anden side viser Figur 2.12a at partikler i den fine goethit fraktion er mere ensartede i størrelse end for den grove goethit fraktion. Dette kan skyldes forskel i fremstilling og lagring af de to goethit mineraler (afsnit 2.2.2). Sektionsanalyse af den fine goethit fraktion (Figur 2.12b) viser en gennemsnitsstørrelse med mindre variation, og partiklerne er målt til $4,7 \pm 0,7 \text{ nm}$. For goethit er det kun omtrentlige størrelser, fordi metoden er optimeret til lagdelte lermineraler, dvs. fortyndingsfaktor og valg af mica til prøveholder er optimeret for suspensioner af montmorillonit. I et tidligere projekt blev goethit aflejret på et Indium folie for at karakterisere partiklerne (Dideriksen & Stipp, 2003), og det er muligt at fortyndingsgrad og/eller

medium kan påvirke goethit partiklerne under afsætningen på underlaget og give en lidt anden partikelstørrelse for goethit.



FIGUR 2.12: Fin goethit tilsat DOM, x500 fortynding i H₂O. a) AFM scan viser partikler omgivet af en tynd film. B) Sektionsanalyse giver en gennemsnitshøjde af partiklerne på 4,706 nm.

2.3.4.10 Oversigt over partikelstørrelse bestemt med AFM

Den målte lodrette højde af montmorillonit og goethit partikler afsat på krystallen ses i Tabel 2.6. Værdierne anvendes sammen med partikelstørrelse til at beregne overfaldeareal af partiklerne.

TABEL 2.6: Partiklernes lodrette højde bestemt med AFM

Materiale	Gennemsnitlig lodret højde (nm)	Standard-afvigelse (nm)	Kommentar
Montmorillonit, grov	3,26	0,07	Gennemsnit af tophøjde for afsatte partikler. Overfladeareal estimeres også for thin film thickness (1,869 nm)
Montmorillonit grov + DOM	1,9	1,2	Store aggregater ses (12,403 nm højde)
Montmorillonit, fin	0,7	0,1	
Montmorillonit, fin + DOM	3,6	0,5	Højere toppe ses (7,302 nm), måske dobbeltlag

2.3.4.11 Bestemmelse af geometrisk overfladeareal

Stokes diameter, som her er partikelstørrelse bestemt med DCS, refererer til diameteren af kugleformet partikel med samme faldhastighed (sedimentationshastighed) som den partikel der bliver målt. Antagelsen af kugleform (sfærisk) er en model simplifikation som ikke nødvendigvis repræsenterer de aktuelle partiklers geometriske former, og især montmorillonit fladelagdelte struktur er ikke sfærisk. For DCS bestemmelse beregnes Stokes partikelstørrelse ud fra vandringstiden i et centrifugalfelt, dvs. tiden mellem injektion af prøven i midten af væskehaskiven til partiklen passerer turbiditetsdetektoren tæt ved periferien af disken. Tiden afhænger af drag, centrifugalkræfter og friktion i væske (Gallego-Urrea et al., 2014) som vist i ligning 2.2 og 2.3

$$\frac{\ln(R_2/R_1)}{(1 - \rho_f/\rho_p) * \omega^2 * m/f} \quad (2.2)$$

$$f = 3\pi\mu d_H \quad (2.3)$$

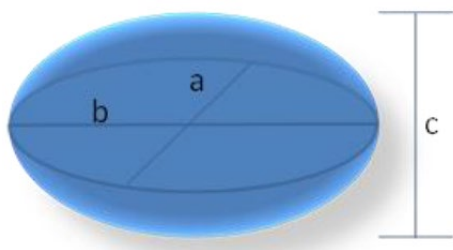
I ligning (2), t er vandringstiden i væske i centrifugeskiven fra injektionspunkt til detektor (hhv R_1 og R_2); ρ_p er partikeldensiteten; ρ_f er densitet af suspensionsvæsken i skiven; ω er rotationshastighed i radianer; m er partiklens masse. Friktionskoefficienten (f) er udtrykt i ligning 2.3 i som funktion af viskositet af medium (μ) og den ækvivalente sfæriske diameter bestemt hydrodynamisk diameter (d_H).

For partikler som ikke er perfekt kugleformede vil uregelmæssig geometri medføre at partiklens massecentrum, opdrift og hydrodynamisk stress spiller en rolle i den dominerende orientering af partiklerne ved afsætning på mica overfladen, og dermed den målte partikelhøjde som estimat for partikeldiameter (Sharma et al., 2009). For et mere præcist estimat af det specifikke overfladeareal er det nødvendigt at korrigere for disse effekter og relatere den ækvivalente målte diameter til de aktuelle geometriske dimensioner af partiklen.

Jennings og Parslow (1988) har lavet en teoretisk sammenligning mellem ækvivalente sfæriske diameter og aktuelle partikel dimensioner fra forskellige eksperimentelle teknikker ved at korrigere for de størrelsesafhængige parametre. For gravitationsmetoder (f.eks. DCS) kan diameteren af en kugleformet partikel som sedimenterer (falder) med sammen hastighed som den målte partikel beregnes ud fra ratioen vist i ligning 2.4

$$d_s = \left[\frac{(d_v)^3}{d_H} \right]^{1/2} \quad (2.4)$$

Hvor d_s er Stokes diameteren (fra DCS måling), d_v er den volumen ækvivalente sfæriske diameter, og d_H er den hydrodynamiske diameter. Det antages heri at geometrien er lidt fladtrykt i den ene dimension som vist i Figur 2.13.



FIGUR 2.13: Fladtrykt sfæroid med hovedakser $a = b$, og kortere akse c (efter Gallego-Urrea et al., 2014).

Diameteren d_v i ligning 2.4 er udtrykt som sfæroid parametre i ligning 2.5

$$d_s = \left[\frac{8 \left(\frac{d_p}{2} \right)^2 \frac{H_p}{2}}{d_H} \right]^{1/2} \quad (2.5)$$

hvor d_p er den cirkulære diameter af sfæroiden og H_p er sfæroid tykkelsen. Den cirkulære diameter kan udledes ved at isolere d_p i ligning 2.5 og få dette udtryk (ligning 2.6)

$$d_p = \left[\frac{(d_s)^2 d_H}{H_p} \right]^{1/2} \quad (2.6)$$

Montmorillonit er et 2:1-lags lermineral og ligner meget et andet hyppigt forekommende illit i Danmark. I en tidligere undersøgelse af illit nanopartikler (Gallego-Urrea et al., 2014) blev den hydrodynamiske diameter udtrykt med disse sfæriske parametre som vist i ligning 2.7

$$d_H = \frac{8 \cdot d_p \cdot (1 - \varphi^2)^{3/2}}{-(2 \cdot \varphi^2 - 3) \cdot \arcsin(\sqrt{1 - \varphi^2}) + (1 - 2 \cdot \varphi^2) \cdot \arctan\left(\frac{\sqrt{1 - \varphi^2}}{\varphi}\right)} \quad (2.7)$$

hvor φ er ration mellem d_p og H_p . Den geometriske parametre d_p , som skal bruges til beregning af partiklens overflade areal afhænger af at vi kender d_H og H_p , og dertil er følgende antagelser taget

- Den sfæriske tykkelse H_p antages at være pladetykkelsen fra den lodrette højde målt med AFM
- Den hydrodynamiske diameter d_H antages at være den gennemsnitlige volumen diameter fra DLS måling (se
-
- Tabel 2). DCS metoden kobler målte vægte af partikler med partikelstørrelse ud fra densiteten af materialet. Ved at anvende den gennemsnitlige volumetriske størrelse fra DLS sammenlignes samme type af partikler (samme form). Det skal nævnes at denne størrelse er påvirket af de almindelige artefakter som knytter sig til lyssprednings målinger.

Til sammenligning kan forholdet mellem højde og areal af fladen for en skiveformet partikel estimeres ud fra tidligere AFM undersøgelser af montmorillonit (Cao et al., 2010, Ploehn og Liu 2006). Ved antagelse af at partiklerne er flade og skiveformede kan forholdet (α) beskrives med ligning 2.8 (Cao et al., 2010)

$$\alpha = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{\sqrt{A}}{t} \quad (2.8)$$

hvor A er fladens areal og t er skivens tykkelse. Målinger af ultralyd behandlet Cloisite Na⁺ (en kommercielt tilgængelig montmorillonit) viste forhold på 180-2900, og heraf havde >34% en $\alpha > 1000$ (Cao et al., 2010). I et andet studium, blev montmorillonit partikler målt til 400 nm med DLS og et forhold på 100-200 med AFM (Ploehn og Liu 2006).

Den sfæriske tykkelse (H_p) og den hydrodynamiske diameter (d_H) bestemt med henholdsvis AFM og DLS er enkelt værdier og ikke fordelinger. Størrelsesfordelingen fra DCS og DLS er ikke de samme pga. forskelle i prøvestørrelse, og andre grundlæggende tekniske forskelle. Den modale Stokes diameter (partikeldiameter med maksimum forekomst, dvs. toppunkt af fordelingskurven) er valgt som udgangspunkt for omregning til geometrisk ækvivalent og efter korrektion for hydrodynamiske bidrag anvendes til enkelt punkt estimat for overfladeareal. Størrelsesparametrene til omregning ses i Tabel 1.7. Det er angivet i tabellen hvilke mål fra AFM eller hvilke toppe i den bimodale størrelsesfordeling fra DCS der er anvendt til beregning.

TABEL 1.7 Størrelsesparametre til beregning af partiklernes overfladeareal. "Grov" indikerer den grove fraktion fra centrifugeringen. "Fin" indikerer den fine fraktion fra centrifugering

Materiale	Sfærisk tykkelse, H_p fra AFM (nm)	Hydrodynamisk diameter, d_H fra DLS (µm)	Stokes diameter, d_s fra DCS (µm)
Grov montmorillonit (i H ₂ O, large fraction)	3,26 ^(a) 1,87 ^(b)	0,45	0,262 ± 0,0061
Grov montmorillonit (i H ₂ O, small fraction)	3,26 ^(a) 1,87 ^(b)	0,45	0,028 ± 0,0018
Grov montmorillonit (soft H ₂ O, large fraction)	3,26 ^(a) 1,87 ^(b)	0,60	0,106 ± 0,0055 ^(c) 0,294 ± 0,0134 ^(d)

Grov montmorillonit + DOM (i H ₂ O, large fraction)	1,88	(ikke målt)	0,200 ± 0,1393 ^(c) 0,363 ± 0,0022 ^(d)
Fin montmorillonit (i H ₂ O)	0,65	0,34	0,0235 ± 0,0043
Fin montmorillonit + DOM (i H ₂ O)	3,56	4089 (ikke troværdig)	0,0235 ± 0,0024
Fin goethit + DOM (i H ₂ O)	4,70	0,80	0,0242 ± 0,0029 ^(c) 0,151 ± 0,0017 ^(d)
Fin goethit + DOM (soft H ₂ O)	4,70	(ikke målt)	0,022 ± 0,0008 ^(c) 0,153 ± 0,0004 ^(d)

(a) AFM partikel toppe; (b) AFM tynd film; (c) PSD primær top i DCS; (d) PSD sekundær top i DCS

De følgende ligninger (2.9 – 2.13) er anvendt til beregning af ellipticitet (ε), overflade areal (S_{oblate}), og volumen (V_{os}) af hver partikel, under antagelse af fladtrykt sfærisk geometri. Til sammenligning er overflade arealet af en sfærisk partikel (S_s) og volumen af partiklen (V_s) også beregnet med Stokes radius (r).

$$\varepsilon^2 = 1 - \frac{c^2}{a^2} \quad (2.9)$$

$$S_{oblate} = 2\pi a^2 \left(1 + \frac{1 - \varepsilon^2}{\varepsilon} \tanh^{-1} \varepsilon \right) \quad (2.10)$$

$$V_{os} = \frac{\pi}{6} A^2 C \quad (2.11)$$

$$S_s = 4\pi r^2 \quad (2.12)$$

$$V_s = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (2.13)$$

I ligning 2.9 til 2.11 er c og a radius for hhv. den lille og store akse. A er diameter for den store akse (sfærisk diameter d_p) og C er tykkelsen af pladeformen ved den lille akse (H_p). De beregnede værdier for overfladeareal for en enkelt partikel og tilhørende forhold mellem højde og diameter ses i Tabel 2.8. Tilhørende AFM lodrette højder og DCS top diameter anvendt til beregning er anført (se Tabel 2.8 fodnote).

TABEL 2.8 Beregnet overfladeareal og forhold mellem højde og diameter. "Grov" indikerer den grove fraktion fra centrifugeringen, mens "Fin" indikerer den fine fraktion fra centrifugering

Materiale	Overflade areal pr partikel		Forhold (aspect ratio), α
	Stokes sfærisk, S_s (μm^2)	Korrigeret fladtrykt kugle, S_{oblate} (μm^2)	
Grov montmorillonit (i H ₂ O, large fraction)	0,215	14,72 ^(a) 25,66 ^(b)	939 ^(a) 2162 ^(b)

Grov montmorillonit (i H₂O, <i>small</i> fraction)	2,48x10 ⁻³	1,70x10 ⁻¹ (a) 2,96x10 ⁻¹ (b)	101 ^(a) 232 ^(b)
Grov montmorillonit (<i>soft</i> H₂O, large fraction)	0,036 ^(c)	3,29 (a,c) 5,73 (b,c)	444 (a,c) 1021 (b,c)
Grov montmorillonit + DOM (i H₂O, large fraction)	0,271 ^(d)	25,02 (a,d) 43,61 (b,d)	1224 (a,d) 2817 (b,d)
Grov montmorillonit + DOM (i H₂O, large fraction)	0,167 ^(c) 0,414 ^(d)	(d _H ikke målt)	
Fin montmorillonit (i H₂O)	1,78x10 ⁻³	0,47	824
Fin montmorillonit + DOM (i H₂O)	1,75x10 ⁻³	(d _H ikke troværdig)	
Fin goethit + DOM (i H₂O)	1,85x10 ⁻³ (c) 7,21x10 ⁻² (d)	1,57x10 ⁻¹ (c) 6,12 ^(d)	67 ^(c) 419 ^(d)
Fin goethit + DOM (<i>soft</i> H₂O)	1,57x10 ⁻³ (c) 7,40x10 ⁻² (d)	(d _H ikke målt)	

(a) AFM partikel toppe; (b) AFM tynd film; (c) PSD primær top i DCS; (d) PSD sekundær top i DCS

Ved at anvende materiale densitet ($\mu\text{g } \mu\text{m}^{-3}$) og vægten (i μg) af partikler ved toppunktet af partikelstørrelsesfordelingen fra DCS kan man udlede en værdi for total volumen af materiale. Dette volumen anvendes til at beregne total antal partikler med størrelse svarende til toppunktet, ved at dividere med volumen af en enkelt partikel enten med sfærisk geometri eller fladtrykt kugleform. Multiplikation af antal partikler med overflade arealet giver et estimat for total tilgængelig overflade areal for partikler i den størrelsesfraktion, og dette total overfladeareal kan sammenlignes for forskellige montmorillonit og goethit partikler i de to medier vand og soft water (Tabel 2.9).

TABEL 2.9 Estimat af total overfladeareal for forskellige partikelstørrelsesfraktioner. "Grov" indikerer den grove fraktion fra centrifugeringen, mens "Fin" indikerer den fine fraktion fra centrifugering

Materiale	Total overflade areal i dominerende størrelse	
	Stokes sfærisk, S_S (μm^2)	Korrigeret fladtrykt kugle, S_{oblate} (μm^2)
Grov montmorillonit (i H₂O, large fraction)	2,58x10 ⁶	1,03x10 ⁸ 1,80x10 ⁸
Grov montmorillonit (i H₂O, small fraction)	1,04x10 ⁹	4,48x10 ⁹ 7,81x10 ⁹
Grov montmorillonit (soft H₂O, large fraction)	2,34x10 ⁶ (c)	3,85x10 ⁷ (a,c) 6,72x10 ⁷ (b,c)
Grov montmorillonit + DOM (i H₂O, large fraction)	1,78x10 ⁶ (d)	8,07x10 ⁷ (a,d) 1,41x10 ⁸ (b,d)
Grov montmorillonit + DOM (i H₂O, large fraction)	1,16x10 ⁶	(d_H ikke målt)
Fin montmorillonit (i H₂O)	7,63x10 ⁸	1,32x10 ¹⁰
Fin montmorillonit + DOM (i H₂O)	7,48x10 ⁸	(d_H ikke troværdig)
Fin goethit + DOM (i H₂O)	1,68 x10 ⁷ (c) 2,12x10 ⁵ (d)	4,31x10 ⁷ (c) 3,42x10 ⁶ (d)

(a) AFM partikel toppe; (b) AFM tynd film; (c) PSD primær top i DCS; (d) PSD sekundær top i DCS
(b)

2.3.5 Delkonklusion

Dimensionerne for suspendede montmorillonit og goethit partikler blev karakteriseret i detaljer for at bestemme overfladearealet og koncentration af partikler i suspensioner. Ved antagelse af sfærisk form af partikler fås en stor fejl i beregning af overfladeareal og dermed fejl ved beregning af adsorberet mængde pyrethroid som funktion af partikel masse. En kombination af metoder var påkrævet til karakterisering af tykkelse og ellipsoid diameter af de suspendede partikler, og derved at bestemme det præcise overfladeareal tilgængeligt for adsorption til suspensionerne. Tilstedeværelse af DOM isoleret fra Suså havde en stor effekt på overfladearealet af goethit. DOM havde en mindre effekt på størrelsesfordelingen af montmorillonit ler, men disse suspensioner var domineret af meget små pladeformede partikler. De små plader står også for størstedelen af det totale overfladeareal. Den lille forandring i ionstyrke ved anvendelse af soft water (påkrævet som medium i de økotoxikologiske forsøg) gav ikke en signifikant ændring af overfladearealet for montmorillonit og goethit partikler i suspensionerne.

3. Sorption af cypermethrin med passiv doseringsmetoden

3.1.1 Baggrund og formål

Cypermethrin er hydrofob med en høj oktanol:vand fordelingskonstant og en lav vandopløselighed (Tabel 3.1). Cypermethrin forventes derfor, at sorbere stærkt til partikler og have en lav mobilitet i terrestriske og akvatiske miljøer. Dette bekræftes af miljøundersøgelser fra både Danmark og Sverige. En undersøgelse af 15 danske vandløbssedimenter viste at 27% af prøverne indeholdte cypermethrin i koncentrationer på 1,52-4,84 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tørvægt (Bossi et al. 2009). Rasmussen et al. (2014) gjorde lignende fund i Sverige hvor cypermethrin blev detekteret i 5% af 42 analyserede sediment prøver med koncentrationer op til 5,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Derimod viser det svenske overvågningsprogram at cypermethrin sjældent ses i vandfasen med over 700 prøver analyseret og en fundprocent på 0,1% med en maksimal koncentration på under 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Derimod detekterede Kronvang et al. (2003) cypermethrin i 10% af 8 analyserede prøver af suspenderet sediment fra danske vandløb. Dette viser, at suspenderet partikler kan have betydning for koncentrationen af cypermethrin i vandløb.

Tabel 3.1 Fysiske og kemiske egenskaber for cypermethrin.

Log K_{ow}	Log K_{oc}	Vandopløselighed ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hydrolyse halveringstid (dage)	Reference
6,6 (pH=7)	5,49	4	1,9-619	ATSDR (2003)
6,94		10 (25 °C)		TBCP Council (2014)

Prøvetagnings- og analysemetoden for partikel bundet cypermethrin i vandløb vil være afgørende for hvilke resultater man opnår. Partikelbundet cypermethrin vil forekomme som pulser umiddelbart efter regn episoder, og der er stor usikkerhed forbundet med indsamling af sådanne prøver. En anden usikkerhed ligger i sorption til udstyr, der anvendes under prøveindsamling og selve analysen og nedbrydning efter prøveindsamling, hvor opbevaring af prøver i selv få døgn kan føre til betydelig nedbrydning af cypermethrin afhængigt af det aktuelle kemiske og fysiske forhold (Albaser et al. 2011). Det er derfor vanskeligt, at estimere koncentrationer og transport af cypermethrin i danske vandløb og den evt. medfølgende eksponering for vandlevende organismer.

Den potentielle transport og eksponering til cypermethrin kunne estimeres via fordelingskonstanter (K_d) for cypermethrin til partikler, der typisk findes i danske vandløb. Der er kun ganske få publicerede studier af cypermethrin sorption. Oudou og Hansen (2002) undersøgte sorptionen af cypermethrin til aluminiumoxid, kvarts, kaolinit og montmorillonit, mens Ali og Baugh (2003) har undersøgt sorption til en jord med et carbon indhold på 2,1%. En begrænsningen for disse studier er dog, at de er udført med sorbentkoncentrationer på henholdsvis 10000 og 100000 mg L^{-1} , der er urealistisk høje for danske vandløb. Nyere studier af lambda-cyhalothrins sorption til humussyre og montmorillonit tyder på at selv meget små ændringer i sorbent koncentrationer fra 5-125 mg L^{-1} kan medføre en ændring i fordelingskonstanterne på op til en faktor 50 (Rasmussen et al. 2014). Endvidere skal det bemærkes, at disse sorptionsstudier er udført ved start koncentrationer, der overstiger den teoretiske vandopløselighed for cypermethrin (Rasmussen et al., 2014). Før resultater fra sorptionsstudier kan anvendes i modellering af cypermethrin transport og toksicitet i danske vandløb, er det nødvendigt at undersøge

sorptionen i koncentrationsintervallet under opløseligheden og med relevante sorbent koncentrationer.

Formålet med denne del af projektet var derfor at undersøge sorptionen af cypermethrin til partikler og organisk materiale, der er naturligt forekommende i danske vandløb, under realistisk cypermethrin og sorbent koncentrationer. Indflydelsen af partikelstørrelse og coating af partikeloverflader med organisk materiale blev også undersøgt. Cypermethrin fungerer i dette studie som et modelstof for pyrethroider. Der anvendes ^{14}C -mærket cypermethrin for at opnå en lav detektionsgrænse og høj analyse effektivitet.

De specifikke formål var at undersøge:

- om den passive doseringsmetode (PDM) (Eng: Passive Dosing Method) kan optimeres og anvendes til undersøgelse af cypermethrin sorption til partikler
- sorptionen af cypermethrin til:
 - o fin montmorillonit
 - o grov montmorillonit
 - o fin montmorillonit coatet med organisk materiale
 - o fin goethit coatet med organisk materiale
 - o grov goethit
 - o partikulært og opløst organisk materiale

3.2 Optimering af passiv doseringsmetode for sorption af pyrethroider

Da optimering af passiv doseringsmetoden for cypermethrin var en iterativ proces er metode, metodeudvikling, resultater, diskussion og konklusion løbende inkluderet i dette kapitel. Forskellige metoder blev anvendt og de præsenteres i kronologisk orden.

3.2.1 Støbt silikone metoden

Publiceret studier der har benyttet PDM med støbte silikone har typisk anvendt 500 mg silikone i glas (Birch et al. 2010). Da ^{14}C -labeled cypermethrin er meget dyrt og har en forventet høj fordelingskonstant (K_d) mellem silikone og vand vil det ikke være økonomisk muligt, at anvende 500 mg silikone til støbninger. Derfor var det fra projektets start intentionen at støbe 100 mg silikone i glas. Fra et tidligere samarbejdsprojekt med Phillipp Mayer, ved vi at PMD glas med 100 mg silikone er blevet støbt på AU, Roskilde. Her blev silikonen blandet i en 1:1 ratio med pentan for at gøre silikonen mindre viskøs, så den flyder ud over hele glassets bund og dermed opnår samme overfladeareal for alle glas. Fra studiet på AU, Roskilde ved vi, at kun omkring 10% af de støbte glas må forventes at kunne bruges grundet at omkring 90% af glas der støbes ikke vil opfylde følgende tre kriterier: 1) vægten af silikonemassen må ikke variere mere end 1% mellem støbninger, 2) der må ikke være bobler i silikonen og 3) silikonen skal flyde jævnt ud over glasset bund. Metoden gav store problemer og tilfredsstillende resultater blev ikke opnået for nogle af de tre kriterier. Særligt gav fordampningen af pentan problemer med at opnå ens vægt for støbningerne. Vi arbejdede herefter over et par måneder på at optimere støbningen af PDM glas. Den endelige metode indeholdt følgende ændringer: 1) hexan blev brugt i stedet for pentan til at mindske viskositeten, 2) ny støbt og endnu ikke hærdet silikone blev udsat for et undertryk, så boblerne kunne frigives fra silikonen og 3) massen af silikonen blev øget til 120 mg for at dække hele glassets bund med silikone støbningen. Metoden viste sig meget succesfuld da 25% af de støbte glas kunne anvendes. Den optimerede procedure er givet i Figur 3.1.

Protocol for casting silicone in passive dosing vials

Principle: Silicone is mixed with a curing agent, cast into the bottom a glass vial, heated for curing and rinsed for monomers. After quality control of the rinsed vials the ones suitable for passive dosing vials are chosen.

Mixing the silicone: Thoroughly mix 1 part of curing agent with 10 parts of base elastomer by weight in a metal cup.

Addition of hexane: Since a very low mass (110 mg) are to be cast into the vials, there is a need to increase the viscosity of the silicone by adding hexane. Mix the silicone mass with hexane in a 1:1.3 ratio on weight basis.

Casting the vials:

1. Use new 10 mL glass vials with metal crew cap and a Teflon lid insert (Mikrolab, Århus). The lid is not put on before the casting and curing has been finished.
2. One lid will be used for making a vacuum in the vials. Take the Teflon lid out and make a hole in the crew cap, use for example a screwdriver with star-shaped tip and a hammer. Make a rubber septum to fit the lid and inset it in the crew cap.
3. Mark all vials a unique number.
4. Weight the vial (with the label on) and make an excel sheet showing the number and mass of the glass.
5. Thoroughly mix the curing agent and base elastomer in a metal cup with a metal spoon. It can be a bit messy so cover the table with plastic or something else to protect the surface.
6. Add the hexane to the silicone mix and mix until the silicone mix and hexane is homogeneous.
7. Cover the metal container with alufoil and leave the mix for 20 minutes in the fridge.
8. Add silicone to a 10 mL plastic syringe and put on Ø 0.60x30 mm sterican. Any air in the end of the syringe is pushed out. Put the syringe in the fridge upside down (piston end downwards) and leave it overnight.
9. The next part of the process can be a bit messy, be careful not to put silicone on the balance. If you put silicone on the balance immediately rinse with ethanol.
10. Add 220 ± 0.5 mg silicone from the syringe (half of the mass will be hexane and will evaporate) to the middle of a vial using an analytical balance. If too much silicone is added to the vial use a small syringe with a small sterican to remove some of the silicone. The final mass of the silicone after evaporation of hexane should be about and not exactly 110 mg but the difference between vials must not be more than 1 mg.
11. When the silicone has been added to the vial take the lid made under bullet 2. Screw on the lid and take an empty plastic syringe with Ø 0.60x30 mm sterican and crate a vacuum by inserting the needle in the lid and pull back the pistol. Repeat 2-3 times, until all the air bubbles are busted. Now remove the vacuum by blowing air back in the vial before taking the lid of. If the vacuum is not removed before the vial is opened there is a risk of creating new air bubbles in the silicone.
12. For every 5-10 samples produced put them in the fridge and keep them there for at least 24 hours to avoid reappearing of bubbles in the silicone.
13. Then transfer the vials to room temperature for at least 72 hours.
14. Transfer the vials to 110 °C for 48 hours to cure the silicone.
15. Add 3-5 mL ethanol three times and leave the vials for a total contact time of at least 48 hours and one of them at least 24 hours (e.g. 24 hours for each volume of ethanol).
16. Rinse the vials 5 times with about 6 mL ultrapure water.
17. Determine the mass of the finished vials and enter it in the excel sheet. Calculate the mass of the silicone.
18. Quality check the vials according to the following criteria:
 - a. silicone has been put on the sides of the glass
 - b. the silicone does not form an even layer in the bottom of the vial
 - c. there is bubbles in the silicone
 - d. select a mass close to 110 mg for which as many vials as possible does not deviate more than 1 mg (vials to be used)

Figur 3.1 Optimerede procedure for støbning af silikone til PDM i glas vials.

3.2.2 Ladning af støbt silikone med cypermethrin ved fortrængningsmetoden

For at lade den støbte silikonemasse i glassene med cypermethrin tilsættes en cypermethrin opløsning (lade-opløsningen), derefter indstiller der sig en ligevægt mellem opløsningen og silikonen, således at silikonen opnår en cypermethrin koncentration, der vil afhænge af koncentration af lade-opløsningen og fordelingskonstanten mellem lade-opløsningen og silikonen. Den ladede silikone skal herefter bruges til ligevægtsstudier med soft water mediet. Fordelingskonstanten K_{PDMS} mellem silikone og en vandig opløsning er defineret som (ligning 3.1)

$$K_{PDMS} = \frac{C_{PDMS}}{C_{aq}} \quad 3.1$$

hvor C_{PDMS} er koncentrationen i silikonen og C_{aq} koncentrationen i vandet. Da $\log K_{PDMS}$ er høj, f.eks. har Hunter et al. (2009) bestemt denne til 6,26, kræves en høj cypermethrin koncentration i silikonen for at opnå passende cypermethrin koncentrationer i soft water mediet. Den anvendte radioaktivt mærkede cypermethrin er meget dyr, hvorfor en effektiv ladning er påkrævet. Birch et al. (2010) anvendte en ladningsmetode for PAH'er, hvor PAH'erne blev fortrængt ind i silikonen ved gradvist at tilføje vand til den mere hydrofobe ladningsopløsning bestående af metanol (fortrængningsmetoden). En modificeret version af fortrængningsmetoden af Birch et al. (2010) blev undersøgt for cypermethrin.

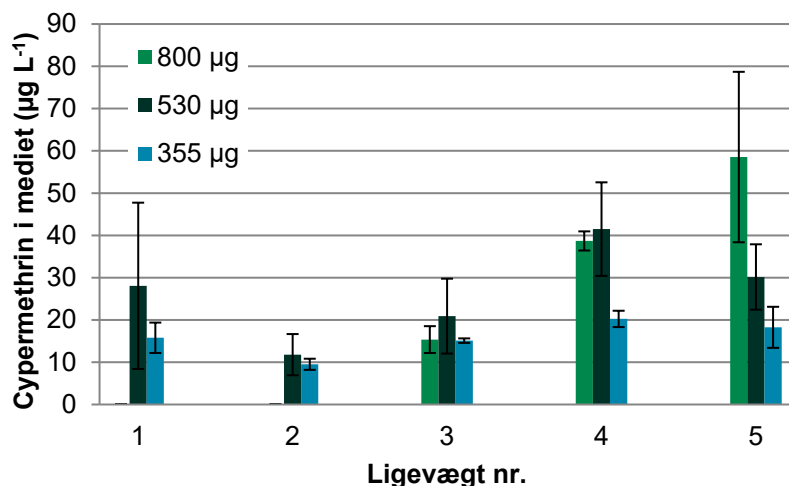
De indledende ladningsforsøg blev udført med kold cypermethrin for at undgå at spilde ^{14}C -mærket cypermethrin på ladninger, der senere ikke viste sig anvendelig til PDM studier. Der blev tilsat 200 µl ladningsopløsning med et indhold på henholdsvis 800, 530 og 355 µg cypermethrin i methanol til tre støbte silikoneglas med to gentagelser for hver tilsætning. Glassene henstod i mørke i 24 timer. Herefter blev der tilsat i alt 5470 µl vand ($<18,2 \mu\text{S cm}^{-1}$, Purelab® Chorus 2, Elga, Veolia) startende med at tilsætte seks gange 5 µl, efterfulgt af syv gange 10 µl, og en gang 20, 50, 100, 200 og 5000 µl. Der var minimum en time mellem hver tilsætning af vand.

Trods at tilsætningen af vand startede med et lavt volumen på 5 µl for at undgå udfældning af cypermethrin, blev der observeret en mælkevid sky i alle glas. Dog var denne mest udtalt for den højeste cypermethrin ladning på 800 µg. For de første tilsætninger af vand forsvandt denne sky i løbet af få sekunder, men for senere tilsætninger havde den varighed af minutter til timer. I så tilfældet blev nyt vand først tilsat næste dag, hvor opløsningen altid var klar igen, sandsynligvis pga. udfældning af cypermethrin.

Efter ladning blev glasset og silikonen aftørret med fnugfrit papir for at fjerne eventuelle cypermethrin udfældninger efterfulgt af vask med vand, hvor glasset tilsættes 3 mL vand lukkes med låg og vortexes i et par minutter. Efter tre gange vask blev der udført rystestudier med soft water medium. Hvert glas blev tilsat 6 mL soft water mediet og blev sat til omrystning 24 timer på et horisontalt rystebord med en hastighed på 150 rpm. Mellem hvert rystestudie blev der fortaget en vask. Der blev udført i alt 4 rystestudier og soft water mediet fra disse overføres til en glas vial, med vejning af den overførte masse. Derefter blev 2 mL hexan tilsat soft water mediet og blandingen blev vortexet og herefter frosset ved 18 °C. Efter frysning blev 1 mL hexan blev udtaget over den frosne prøve og der blev tilsat cyhalothrin i koncentrationer af 20, 50 eller 100 µg L⁻¹ som intern standard. Koncentrationen af cypermethrin blev bestemt ved væske:væske ekstraktion og GC-ECD analyse.

Ligevægtsstudierne viste, at koncentrationen af cypermethrin i soft water mediet var højere end forventet, med koncentrationer mellem 8 til 72 µg L⁻¹ (Figur 3.2). Disse koncentrationer ligger betydeligt over opløseligheden for cypermethrin på 4 µg L⁻¹ og endvidere ses det, at variationen mellem gentagelser er høj. Dette indikerer, at cypermethrin udfældet på overfladen af silikonen frigives til soft water mediet under rysteforsøgene og at disse udfældninger opløses under væske:væske ekstraktionen. Endvidere ses det, at nogle af de målte koncentrationer ved rysteforsøg nr. 4 og 5 er højere ved end ved forsøg nr. 1 til 3, og at standardafvigelserne ikke falder med antallet af rystestudier. Der er derfor ikke tegn på, at de ladede silikoneglas er på vej mod

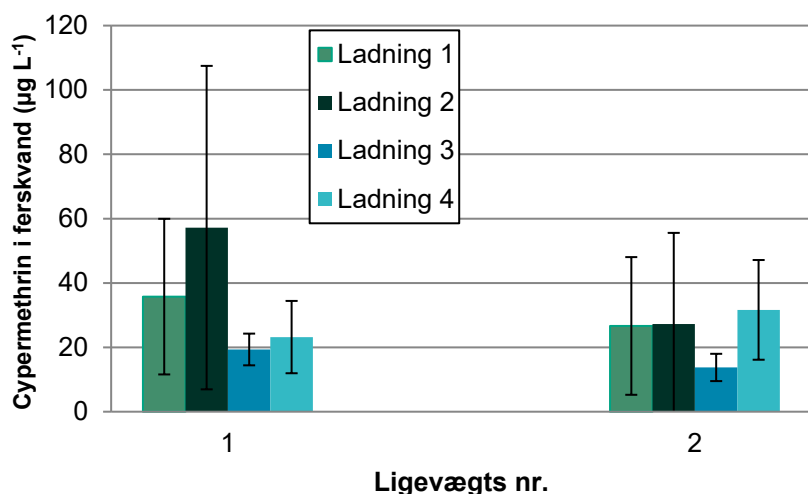
en ligevægtsstyret koncentration, men at koncentrationen i efterfølgende rysteforsøg vil være domineret af frigivelse af udfældet cypermethrin. Det er muligt, at mange gentagne vask/rystestudier af den støbte silikone vil kunne fjerne krystallerne, for derefter at resultere i ligevægtskontrollerede cypermethrin koncentrationer. Det er dog ikke undersøgt i dette studie, da usikkerheden forbundet med evt. frigivelse af enkelte udfældninger efter en ligevægt kontrolleret koncentration synes at være opnået, blev vurderet for høj. Derudover vurderes det, at antallet af nødvendige vask/ligevægtsstudier kan overstige det praktisk mulige.



FIGUR 3.2. Cypermethrin koncentrationen i soft water mediet efter 24 timers rysteforsøg med silikoneglas ladet med 800, 530 og 355 µg cypermethrin ved fortrængningsmetoden i 5 på hinanden følgende ligevægtsstudier med to gentagelser, og angivet standardafvigelse. Prøven for ligevægt nr. 1 og 2 gik tabt for ladning med 800 µg cypermethrin.

3.2.3 Ladning af støbt silikone med cypermethrin uden fortrængning

På grund af problemerne med at opnå ligevægtskontrollerede koncentrationer ved fortrængningsmetoden, blev det undersøgt om en alternativ metode uden fortrængning og med trinvis brug af laddingsopløsningen kunne resultere i ligevægtskontrollerede koncentrationer. Princippet var at fremstille en laddingsopløsning som bringes i ligevægt med den støbte silikone, der skal lades med den højeste koncentration af cypermethrin. Herefter overføres den brugte laddingsopløsning, der nu har et lavere indhold af cypermethrin, til den støbte silikone, der skal have den næst højeste koncentration af cypermethrin. Denne overførsel forsættes til det relevante koncentrationsinterval er dækket. Den præcise fremgangsmetode var: 400 µl af en 5000 mg L⁻¹ cypermethrin opløsning i methanol blev tilsat den støbte silikone, der blev vortexet i 2 min og glasset henstod med låg i mørket i 24 timer. Herefter, blev opløsningen overført ved hældning til den næste støbte silikone, der skulle lades og denne blev udsat for samme behandling før opløsningen blev overført til den næste støbte silikone. Der blev ladet med to gentagelser. Dette forsøg blev ligesom forsøget med ladning ved fortrængning udført med kold cypermethrin og den støbte silikone blev vasket og ligevægtsstudier blev udført på samme måde, bortset fra at der kun blev udført to rysteforsøg for hver ladet silikoneglas. Ekstraktion og måling af cypermethrin koncentrationer blev også udført på samme måde. Resultaterne af de to ligevægtsstudier fremgår af Figur 3.3.



FIGUR 3.3. Cypermethrin koncentrationen i soft water mediet efter 24 timers rysteforsøg med silikoneglas ladet uden fortrængning i 2 på hinanden følgende rysteforsøg med to gentagelser og angivet standardafvigelse. Silikonen er ladet trinvis. Ladning 1 angiver den silikone, der først er i kontakt med ladeopløsningen, Ladning 2 den silikone der er nummer to i kontakt med ladeopløsningen osv.

Rysteforsøgene med soft water mediet viser, at silikonen ladet uden fortrængning har resulteret i lignende problemer som fortrængningsmetoden med koncentrationer der langt overstiger opløseligheden ($7-93 \mu\text{g L}^{-1}$) og store standardafvigelser. En årsag til dette kan være, at ikke alt af ladningsopløsningen kan overføres til næste støbt silikone. De dråber af cypermethrin opløst i metanol, der efterlades på overfladen af silikonen kan fordampe, hvorved cypermethrinen efterlades på overfladen og udfælder. Alternativt vil den efterfølgende vask med vand medføre at cypermethrin i de tilbageværende dråber udfælder på samme måde som ved ladning med fortrængningsmetoden. Der er heller ikke tegn på at den trinvis brug af ladningsopløsningen resultere i lavere koncentrationer for senere ladningstrin. Dette kunne dog måske være opnået ved at fortynde ladningsopløsningen for hvert trin, hvilket ikke er blevet undersøgt i dette studie.

3.2.4 Ladning af silikonestave

Da ladning af silikone med og uden fortrængning viste, at udfældning af krystaller tyder på at være et dominerende problem ved PDM metoden for cypermethrin, blev en alternativ ladningsmetode udviklet. Da krystaller ikke synes, at kunne undgås i ladningen, blev strategien i stedet at udvikle et system, der fremmer muligheden for at vaske silikonen fri for krystaller og øge sandsynligheden for, at udfældede krystaller ikke sætter sig på overfladen af silikonen. Der anvendes fortrængning ved trinvis tilsætning af vand for maksimal overførsel af cypermethrin til silikonen. Et af problemerne ved støbt silikone i glas er, at silikonen støbes ned i et smalt 10 mL glas (Mikrolab, Århus), der snævre lidt ind i halsen med skruegangen til metal låget med Teflon indsats (Figur 3.4). Det er derfor relativt vanskeligt, at skylle krystaller ud af glasset. Ydermere støbes silikonen i bunden af glasset, således at krystaller, der bundfælder, vil ende op på overfladen af silikonen. Det blev derfor testet om tilfredsstillende ladning med cypermethrin kan opnås ved i stedet at lade små silikonestave med cypermethrin i et glas, og derefter overfører silikonestavene til et andet glas for vask og endelig et tredje glas for ligevægtsstudier.



FIGUR 3.4 10 mL glas (Mikrolab, Århus) brugt til støbning af silikone og silikonestave ladet med cypermethrin til PDM.

Der blev lavet et forforsøg med silikonestave og cypermethrin der ikke var ^{14}C -mærket, hvor 1 mL 500 mg L^{-1} cypermethrin opløst i henholdsvis 41,5, 28 og 14,5% metanol, tilsættes tre silikone stave for hver koncentration, og der vortexes i 30 sekunder, hvorefter 250 μL vand tilføjes 12 gange (3 mL) og der vortexes i 30 sekunder mellem hver tilsætning. De tre metanolkoncentrationer anvendes, for at undersøge om slut-metanolkoncentrationerne efter fortrængning (10,2, 7,0 og 3,6%) har betydning for overførsel af cypermethrin til silikonen. Efter fortrængning blev silikonestavene vasket ved at overføre dem til et nyt glas, tilsætte 3,5 mL vand og vortexe og herefter påfylde nyt vand for næste vask. Disse ladede silikonestave viste tendens mod en mere stabil cypermethrin koncentration i ligevægtsstudier med soft water mediet, men GC-ECD analyserne havde for stor usikkerhed og høj detektionsgrænse til fuldstændigt at afgøre dette (resultater ikke vist). Det blev derfor besluttet, at arbejde videre med ladning af silikonestave med ^{14}C -mærket cypermethrin i en 28% methanol. Cypermethrin med en ^{14}C -mærkning på carbon nr. 1 på cyclopropyl-gruppen blev anvendt. En stamopløsning blev fremstillet ved at opløse en ampul fra Izotop, Institute of Isotopes Co. Ltd. i 10 mL methanol således, at cypermethrinkoncentrationen var 479,5 mg L^{-1} og aktiviteten 1850 MBq L^{-1} . Fortyndinger af denne stamopløsning i metanol blev fremstillet efter behov. Den endelige laddningsmetode var som følger:

Ladning:

1. 70 ± 1 mg silikonestave skåret af polydimethylsiloxane (PDMS) slanger med en diameter på 2,87 til 3,13 mm (Altec, Cornwall, United Kingdom) renses i acetonitril eller metanol og tørres ved afdampning i en glas petriskål.
2. Tre silikonestave overføres med en metal pincet til en brun glas vial og 1 mL af den ønskede koncentration af ^{14}C -mærket cypermethrin i 28% methanol til tilsættes. De anvendte laddningsmasser af cypermethrin fremgår af Tabel 3.2. Stavene i opløsningen vortexes i 30 sek. og herefter rystes de på et horisontalt rystebord en time ved 150 rpm.
3. Trinvist tilføres 250 μL Milli-Q vand indtil metanol koncentration er 7%. Mellem hver vand tilførsel vortexes der i 30 sek. og rystes ved 150 rpm i 10 min.
4. De cypermethrin ladede stave vaskes ved at overfører dem til et 10 mL glas og der tilsættes 6 mL Milli-Q vand. Vandet skiftes og der vaskes i alt 3 gange.
5. Silikonestavene renses nu ved at gnide dem med fnugfrit papir, og de er nu klar til brug i ligevægtsstudier.

Efter ladning af silikonestavene udføres rysteforsøg med soft water medium på følgende måde:

1. Hver silikone stav overføres til en 10 mL klar glas vial (Mikrolab, Århus (se figur 3.4)) med 6 mL soft water medie. Glasset dækkes med aluminiumsfolie.
2. Glasset rystes i 24 timer på et horisontalt rystebord ved 150 rpm.
3. Herefter blev der foretaget ekstraktion med en organisk opløsning eller direkte måling på soft water mediet. Årsagen til de forskellige ekstraktionsmåder skyldes, at sorption ikke kunne måles med de organiske ekstraktioner, hvilket forklares i afsnit 3.2. Den organiske ekstraktion blev foretaget ved at overføre soft water mediet til et nyt glas, hvor det blev tilsat 2 mL hexan eller 2 mL af en 1:1 blanding af hexan og ethylacetat, vortexet, frosset hvorefter 1 mL organisk opløsning blev udtaget over den frosne vandfase. Alternativt blev ca. 2 mL af rysteopløsningen overført direkte til en scintillationsvial ved hældning (efter vortex) med bestemmelse af den overførte masse og målt koncentrationen af cypermethrin bestemt direkte ved scintillationstælling uden ekstraktion.
4. ^{14}C -mærket cypermethrin bestemmes ved scintillationstælling (Perkin Elmer, TriCarb 2800TR). Ved hver måling blev der altid udført en normalisering på en reference standard og en blank som anbefalet af Perkin Elmer. Der foretages en et-punkts kalibrering på en $14,9 \mu\text{g L}^{-1}$ cypermethrin standard og en blank måling for prøve matrix. Kalibreringsstandardens fremstilles ved at tilsætte $60 \mu\text{L}$ $497,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ^{14}C -mærket cypermethrin til 2 mL soft water medie. Kalibreringen, blank prøve og alle soft water medieprøver fra rysteforsøgene tilsættes alle 3,5 mL scintillationsvæske Ultima Gold for vandige prøver og Ultima Gold F for organiske solventer (Perkin Elmer).

For rysteforsøgene med soft water medie uden sorbent med de ladede silikonestave viste, at ^{14}C målinger at der over 24 timer blev opnået et koncentrationsinterval, der varierede fra 0,11 til $8,95 \mu\text{g L}^{-1}$ for de anvendte ladninger (Tabel 3.2). De silikonestave, der er blevet ladet med $400 \mu\text{g}$ cypermethrin, har således en koncentration, der ligger tæt på opløseligheden for cypermethrin på $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Gentagne studier med længere kontakt tid på 48 til 120 timer viste, at målingen af radioaktivitet i soft water mediet steg med kontakttiden. Således var koncentrationen for den højeste ladning efter 120 timer en faktor 2 højere sammenlignet med koncentrationen efter 24 timer (resultater ikke vist). Samme effekt blev set for de lavere ladninger, dog var dette mindre udtalt, hvor 120 frem for 24 timer førte til en 1,3 gange højere cypermethrin koncentration.

Det tyder således på, at der ikke er opnået en ligevægt i det passive doseringssystem, men at reproducerbare resultater for soft water mediets cypermethrin koncentrationen kan opnås ved at holde kontakt tiden konstant på 24 timer. Samtidig tyder det på, at eksisterende opløselighedskonstanter for cypermethrin er underestimerede, men da kinetikken for opløsning af højere koncentrationer er langsom vil det under naturlige forhold ikke forventes at have en betydning. En alternativ forklaring på denne øgede ^{14}C måling over tid, kan være at cypermethrin i vandfasen hydrolyseres, og at ligevægten derved forskydes mod yderligere opløsning af ^{14}C -mærket stof.

Tabel 3.2 viser endvidere, at der var en betydelig variation mellem soft water mediets cypermethrin koncentrationer for de 18 gentagne 24 times rysteforsøg med relative standard afvigelser (RSD), der ligger mellem 11 og 20%. Det viser en høj analytisk usikkerhed. Når det tages i betragtning, at cypermethrin er et hydrofobt stof, og at der her arbejdes i lave koncentrationer, og at andre doserings- og analysemetoder har reproducerbarhed, der er mindre gode, må disse resultater betragtes som værende tilfredsstillende. Det er særlig interessant, at RSD synes at vise en faldende tendens for faldende cypermethrin koncentrationer, da andre analysemetoder ofte giver stigende usikkerhed med faldende cypermethrin koncentration.

At der er opnået pålidelige målinger af koncentrationen af cypermethrin i koncentrationsintervallet $0,1$ til $9 \mu\text{g L}^{-1}$ med passiv doseringsmetoden, må betragtes som en succes. På grund af den relative usikkerhed for målingerne anbefales det at bruge gennemsnitsværdier for gentagne forsøg med soft water mediet for samme silikonestav til fastlæggelse af væskekoncentrationer uden tilstedeværelse af sorbenter, for at mindske effekten af tilfældig variation.

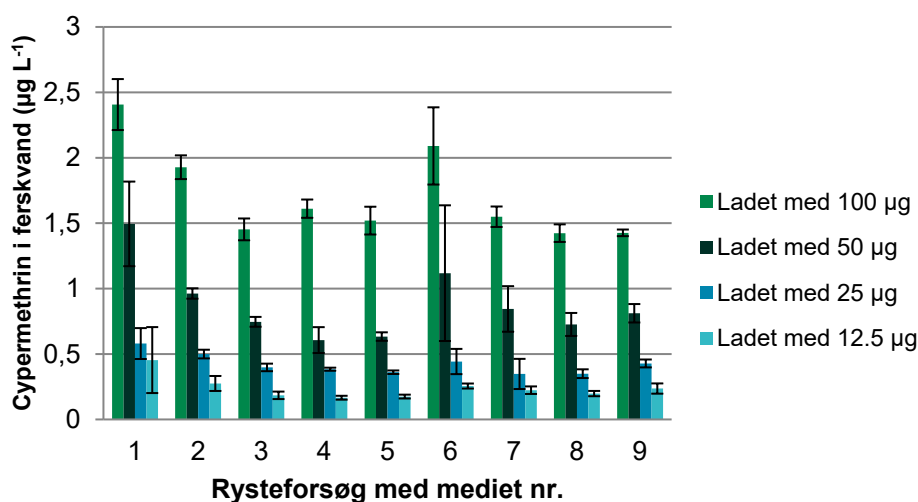
I dette studie er der udført over 70 soft water medie- og sorptionsforsøg, og der er ikke observeret en tendens til faldende cypermethrin koncentrationer for de ladede silikonestave i rysteforsøg med soft water medie. Dog skal silikonestavene og de opnåede cypermethrin koncentrationer i soft water mediet altid inspiceres efter et sorptionsforsøg, da sorbenterne i nogle tilfælde kan coate overfladen af silikonestavene. Dette blev observeret i et forsøg med ufiltreret humussyre fra Aldrich (se kapitel 3.2), hvor silikonestavene blev farvet sorte og efterfølgende rysteforsøg med soft water mediet gav forhøjede cypermethrin koncentrationer, muligvis pga. frigivelse af organiske partikler fra overfladen. Ved gentagne rensninger, hvor silikonestavene blev gnedet grundigt med fnugfrit papir gav de igen koncentrationer med soft water mediet i det forventede interval. Ladede silikonestave bør derfor altid renses med fnugfrit papir efter et sorptionsstudie.

TABEL 3.2. Tabel Middelværdi, standardafvigelse og relativ standard afvigelse for cypermethrinskoncentrationer i soft water mediet for 18 gange 24 times rysteforsøg med 6 mL soft water medie ved direkte scintillationstælling uden ekstraktion. Silikonestavene er ladet med 8 forskellige cypermethrin masser med tre stave for hver masse. En stav for de to ladningsmasser på 4,16 og 400 µg er gået tabt. Detektionsgrænsen (LOD) for sorptionen for hver ladet silikonestav er beregnet som 1,5 gange standard afvigelsen for cypermethrin koncentrationen i soft water mediet for 18 rysteforsøg og ud fra denne er LOD beregnet i µg kg⁻¹ og for K_d under antagelse af at der anvendes 25 mg L⁻¹ sorbent.

Ladning	Stav	Midl.	SD	RSD	LOD _{sorp.}	LOD _{sorp}	LOD K _d
µg	nr.	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	%	µg L ⁻¹	µg kg ⁻¹	L kg ⁻¹
4,16	1	0,11	0,01	12,2	0,02	786	7333
4,16	2	0,11	0,01	10,9	0,02	709	6543
6,5	1	0,15	0,02	15,2	0,03	1398	9145
6,5	2	0,14	0,02	12,5	0,03	1065	7529
6,5	3	0,15	0,02	13,8	0,03	1243	8286
12,5	1	0,19	0,03	15,4	0,04	1708	9211
12,5	2	0,19	0,03	13,9	0,04	1564	8336
12,5	3	0,20	0,04	17,6	0,05	2128	10544
25	1	0,30	0,04	12,7	0,06	2256	7646
25	2	0,30	0,04	12,9	0,06	2299	7746
25	3	0,29	0,05	15,7	0,07	2754	9395
50	1	0,61	0,10	15,9	0,15	5801	9557
50	2	0,61	0,10	16,2	0,15	5904	9742
50	3	0,62	0,09	15,1	0,14	5634	9080
100	1	1,00	0,14	14,3	0,21	8566	8570
100	2	1,02	0,16	15,6	0,24	9497	9346
100	3	1,04	0,19	18,1	0,28	11311	10849
200	1	4,31	0,72	16,7	1,08	43294	10039
200	2	4,17	0,82	19,5	1,22	48956	11729
200	3	4,41	0,79	18,0	1,19	47603	10798
400	1	8,62	1,38	16,0	2,07	82951	9621
400	2	8,95	1,80	20,1	2,70	107978	12063
Min		0,11	0,01	10,9		709	6543
Maks		8,95	1,80	20,1		107978	12063

For silikonestave med samme ladningskoncentration ses det, at der blev opnået cypermethrin koncentrationer i soft water mediet, der ligger tæt på hinanden (Tabel 3.2). For at minimere måleusikkerheden på soft water mediets cypermethrin koncentrationerne anbefales det dog at bruge gennemsnittet for den enkelte silikonestav og ikke anvende gennemsnittet for silikonestave, der er ladet ved samme cypermethrin koncentration.

Resultaterne for første 9 rysteforsøg med soft water mediet for udvalgte ladningsmasser fremgår af Figur 3.5. Figuren viser, at det første rysteforsøg havde højere cypermethrin koncentrationer, hvorefter koncentrationerne nåede et stabilt niveau. I det 6. rysteforsøg stiger cypermethrinkoncentrationen igen, hvorefter den falder til det tidligere niveau i rysteforsøg 7. Det skyldes sandsynligvis, at der blev holdt en pause med rysteforsøgene mellem forsøg 5 og 6, hvor staverne blev opbevaret i glas, med kun nogle dråber soft water medie. Dette viser, at det er vigtigt at konditionere silikonestavene før forsøg, hvis de har været opbevaret kortere eller længere tid. Dette kan gøres ved at ryste dem 24 timer med blødt-vands-medium. Kommer de direkte fra et ligevægtsstudie med soft water mediet eller et sorptionsstudium er konditionering normalt ikke nødvendigt. Proceduren i de efterfølgende forsøg blev derfor at ryste silikonestavene med soft water medie mindst 24 timer før ligevægtsstudier med soft water mediet eller sorbenter blev udført. Det blev i øvrigt vist, at silikonestavene kan opbevares på frost ved -18 °C, hvis blot de konditioneres ved ryst med soft water mediet nogle gange efterfølgende.



FIGUR 3.5. Cypermethrin koncentrationer i soft water mediet efter 24 times rystetid med silikonestave ladet med 4 forskellige cypermethrinkoncentrationer. Hver ladningskoncentration er udført med tre gentagelser og standardafvigelse er givet. Ligevægt 1-5 er udført umiddelbart efter hinanden, mellem ligevægt 5 til 6 hvilede silikonestavene og ligevægt 6-9 blev da udført umiddelbart efter hinanden.

3.2.5 Konklusion

Dette studie i optimering af passiv doseringsmetoden til bestemmelse af sorption af cypermethrin har vist:

- At cypermethrin danner udfældninger ved ladning af silikone til passiv dosering og at disse udfældninger må fjernes fra silikonen for at opnå stabile koncentrationer ved passiv dosering.
- At silikonestavene, der lades i et glas og herefter overføres til nye glas for vask og passiv doseringsstudier, giver repeterbare koncentrationer i passiv dosering, der kan bruges til sorptionsstudier.

3.3 Sorption af cypermethrin til montmorillonit, goethit og naturligt organisk materiale

I dette kapitel præsenteres metoder, metode udvikling, resultater, diskussion og konklusion for studier af cypermethrin sorption via passiv doseringsmetoden.

3.3.1 Beregning af sorption

Sorptionsstudier udføres på samme måde som rysteforsøg med soft water mediet med den modifikation and sorbenten tilsættes soft water mediet i den ønskede koncentration. Sorptionen blev beregnet som differencen mellem cypermethrinkoncentrationen i soft water mediet med og uden sorbenter via ligning 3.2

$$C_{\text{sorbent}} = \frac{(C_{\text{Medium med sorbent}} - C_{\text{Medium}}) \cdot V}{m_{\text{sorbent}}} \quad 3.2$$

hvor C_{sorbent} er sorptionen i $\mu\text{g kg}^{-1}$, $C_{\text{Medium med sorbent}}$ er koncentrationen af cypermethrin i soft water mediet i tilstedeværelse af sorbenten i $\mu\text{g L}^{-1}$, C_{Medium} er koncentrationen af cypermethrin i soft water mediet uden sorbenten i $\mu\text{g L}^{-1}$, V er volumen af soft water mediet i L og m_{sorbent} er massen af sorbent i kg.

Sorptionen af cypermethrin kan beskrives ved fordelingskonstanten (K_d) mellem sorbenten og soft water mediet og beregnes via ligning 3.3

$$K_d \left(\frac{\text{L}}{\text{kg}} \right) = \frac{C_{\text{sorbent}}}{C_{\text{Medium}}} \quad 3.3$$

3.3.2 Eksperimentel procedure for sorption

Sorptionsstudierne blev lavet med følgende eksperimentelle fremgangsmåde:

1. Hver silikone stav blev overført til en 10 mL klar glas vial (Mikrolab, Århus (se Figur 3.4)) med 6 mL soft water medie med sorbenten. Sorbenten har altid omrørt mindst en time i soft water mediet før sorptionsforsøget udføres. Glasset dækkes med aluminiumsfolie.
2. Glasset rystes i 24 timer på et horisontalt rystebord ved 150 rpm.
3. Herefter blev der foretaget ekstraktion med en organisk opløsning eller direkte måling på soft water mediet. Årsagen til de forskellige ekstraktionsmåder skyldes, at sorption ikke kunne måles med de organiske ekstraktioner, hvilket forklares i det følgende. Den organiske ekstraktion blev foretaget ved at overføre soft water mediet til et nyt glas, hvor det blev tilsat 2 mL hexan eller 2 mL af en 1:1 blanding af hexan og ethylacetat, vortexet, frosset hvorefter 1 mL organisk opløsning blev udtaget over den frosne vandfase. Alternativt blev ca. 2 mL af rysteopløsningen overført direkte til en scintillationsvial ved hældning (efter vortex) med bestemmelse af den overførte masse og målt koncentrationen af cypermethrin bestemt direkte ved scintillationstælling uden ekstraktion.
5. ^{14}C -mærket cypermethrin bestemmes ved scintillationstælling som beskrevet for rysteforsøg med soft water mediet, med den modifikation at der ud over soft water mediet også tilsættes sorbent til kalibreringsstandard og blank prøven.
6. Sorptionen beregnes ud fra differencen mellem koncentrationen af cypermethrin i soft water mediet med sorbent og soft water mediet uden sorbent.
7. Der udføres altid mindst et rysteforsøg med soft water mediet mellem to sorptionsstudier for at undersøge om silikonstavene er påvirket af forrige sorptionsforsøg således af de afgiver højere eller lavere koncentrationer af cypermethrin til soft water mediet.

De udførte sorptionsforsøg er givet i Tabel 3.3.

TABEL 3.3. Anvendte koncentrationer af sorbenter i sorptionsforsøgene. Der henvises til kapitel 1 for fremstilling af sorbent suspensioner og DOC

Sorbent	Sorbent koncentrationer
Fin montmorillonit	25,2 mg L ⁻¹ montmorillonit
Fin montmorillonit med Suså DOC^a	25,0 mg L ⁻¹ montmorillonit og 9,6 mg L ⁻¹ Suså DOC
Grov montmorillonit	25,0 mg L ⁻¹ montmorillonit
Fin goethit^a	Ikke anvendt
Fin goethit med Suså DOC^b	7,7 mg L ⁻¹ goethit og 9,0 mg L ⁻¹ Suså DOC
Grov goethit	27,0 mg L ⁻¹ goethit
Opløst og partikulært Aldrich humussyre	79 mg L ⁻¹ partikulært materiale og 10,7 mg L ⁻¹ opløst humussyre
Opløst Aldrich humussyre	23,0 mg L ⁻¹ humussyre
Suså DOC	13,8 mg L ⁻¹ DOC
Suså vand	2,6 mg L ⁻¹ suspenderet materiale og 32 mg L ⁻¹ DOC

^a Opløst organisk materiale (Eng. Dissolved organic material) (DOC).

^b Fint goethit er ikke stabilt. Når små partikler af goethit dannes, starter der straks en aggregering. Derfor er der ikke lavet sorptionsforsøg med fint goethit. Organisk materiale stabiliserer partikelstørrelsen af fin goethit, hvorfor der er lavet forsøg med denne fraktion.

3.3.3 Bestemmelse af metodens detektionsgrænse

For at det kan afgøres om en sorbent udviser sorption skal den hæve koncentrationen af cypermethrin over det niveau der ses i rysteforsøg med rent soft water medie. I dette studie er det antaget, at der er sorption når difference mellem koncentrationerne af cypermethrin med og uden sorbent overstiger den standard afvigelsen der er for koncentrationen i soft water mediet med en faktor 1,5. Derfor er detektionsgrænsen (LOD) angivet som standardafvigelsen for de 18 studier med blødt-vands-medium uden sorbent gange med 1,5 og ud fra denne værdi er LOD for K_d beregnet og givet i Tabel 3.2 for hver ladet silikonestav. Det ses, at LOD for K_d ligger i intervallet 6543 til 12063 L kg⁻¹, for de forskellige silikonestave. Det vil sige, at K_d minimum skal antage disse værdier for en sorbent i en koncentration på 25 mg L⁻¹, før der med rimelighed kan antages at være sorption. Det ses som forventet, at den laveste ladningskoncentration har den laveste LOD for K_d og den højeste ladningskoncentration den højeste, pga. den højere analytiske usikkerhed ved højere ladning, der giver koncentrationer tæt på den maksimale opløselighed.

3.3.4 Organisk opløsningsmiddel til ekstraktion af sorberet cypermethrin

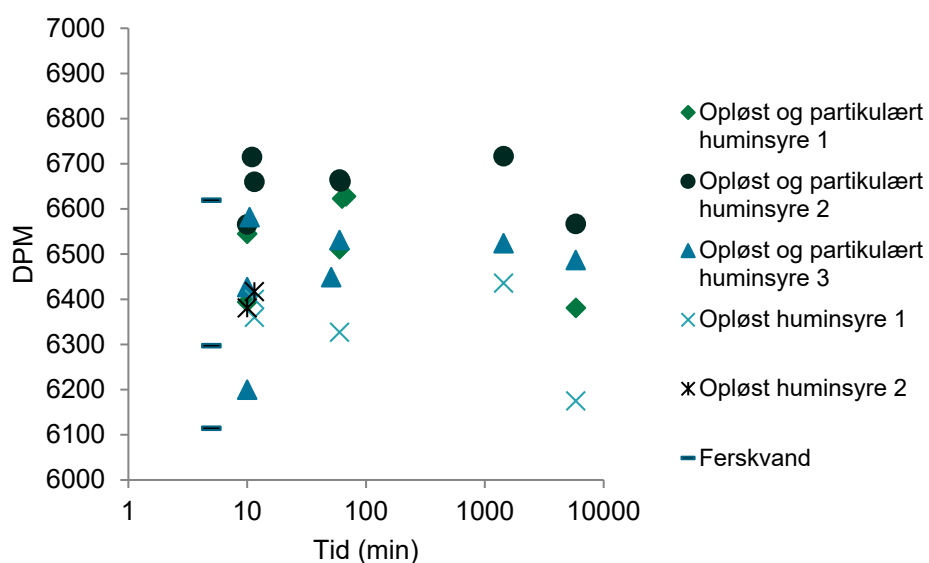
Der blev først anvendt hexan som opløsningsmiddel, da der kan opnås en opkoncentrering af ¹⁴C-mærket cypermethrin fra de 6 mL soft water medie til de 2 mL hexan, der kan give ønsket lavere detektionsgrænse i forhold til, hvis der måles direkte på soft water mediet (se ekstraktionsmetode i ovenstående afsnit). Endvidere forventes ekstraktionen ikke at overføre partikler fra soft water mediet til den organiske fase, hvorfor partikelskygning undgås under ¹⁴C-måling. Først blev der udført 6 sorptionsforsøg med forskellige kombinationer og koncentrationer af Suså DOC, fin montmorillonit og grov montmorillonit med hexan som ekstraktionsmiddel. Alle forsøgene viste ingen sorption. For at undersøge om den manglende sorption skyldes, at sorptionen lå under metodens detektionsgrænse, blev koncentrationerne af montmorillonit øget med en faktor 16 og Suså DOC med en faktor 10 i forhold til de i Tabel 3.3 angivne koncentrationer, men der blev stadig ikke observeret sorption. Det blev derfor besluttet, at undersøge om ekstraktionsmidlet hexan er for hydrofobt til at ekstrahere cypermethrin fra de relative hydrofile sorbenter.

En 1:1 opløsning af hexan:ethylacetat blev ny anvendt som ekstraktionsmiddel, da ethylacetat øger polariteten. To sorptionsstudier blev nu udført med henholdsvis 1) 76 mg L⁻¹ Suså DOC og 2) 79 mg L⁻¹ partikulært materiale og 10,7 mg L⁻¹ opløst humussyre med 1:1 hexan:ethylacetat som ekstraktionsmiddel. Disse to studier viste en lav sorption. Målinger på opløsninger med soft water medie og sorbenter uden brug af solventer, viste at sorbentopløsningerne stadig havde høj ¹⁴C-aktivitet, hvilket viser at 1:1 hexan:ethylacetat, trods at det er mere effektivt end hexan, stadig ikke er tilstrækkeligt effektivt til at ekstrahere alt sorberet cypermethrin fra de relativt hydrofile sorbenter. Direkte scintillationsmåling på sorbent og soft water mediet blev derfor besluttet.

3.3.5 Undersøgelse af partikel skygning ved direkte scintillationsmåling

Der blev udført en test af om partikler i sorptionsforsøgene skygger scintillationsmålingen, når der ikke udføres ekstraktion med et organisk solvent og der måles direkte på soft water mediet med partiklerne efter rysteforsøget som beskrevet i ovenstående metode. Testen blev udført ved at fremstille 2 mL 14,9 µg cypermethrin standardopløsninger, der indeholdte henholdsvis 1) soft water medie, 2) soft water medie og 23 µg L⁻¹ opløst Aldrich humussyre og 3) soft water medie, 79 mg L⁻¹ partikulært Aldrich humussyre og 10,7 mg L⁻¹ opløst Aldrich humussyre. Opløsningerne der indeholder sorbenter blev målt efter omrystning og efter henstand i op til ca. 4 dage for at undersøge om sedimentation af sorbenterne påvirker scintillationsmålingerne.

Af Figur 3.6 ses resultatet af testen om partikler eller sedimentation påvirker scintillationsmålingerne. Det ses at variationen mellem scintillationsmålingerne for partikulært og opløst humussyre ligger indenfor variationen for gentagne målinger af soft water mediet på forskellige



FIGUR 3.6. Scintillationsmålinger i disintegrationer pr. min (DPM) for 2 mL 14,9 µg cypermethrin standardopløsninger, der indeholdte henholdsvis 1) soft water mediet, 2) soft water mediet og 23 µg L⁻¹ opløst Aldrich humussyre og 3) soft water mediet, 79 mg L⁻¹ partikulært Aldrich humussyre og 10,7 mg L⁻¹ opløst Aldrich humussyre målt til forskellige tider efter omrystning. 1-3 angiver replikater.

dage, samt at henstand af en opløsning med sorbent, efter omrystning af denne, ikke synes at påvirke målingen. Det blev derfor besluttet at udfører alle sorptionsforsøgene angivet i Tabel 3.2 ved direkte scintillationsmåling på soft water mediet som beskrevet i ovenstående metode.

3.3.6 Sorptionsresultater for cypermethrin

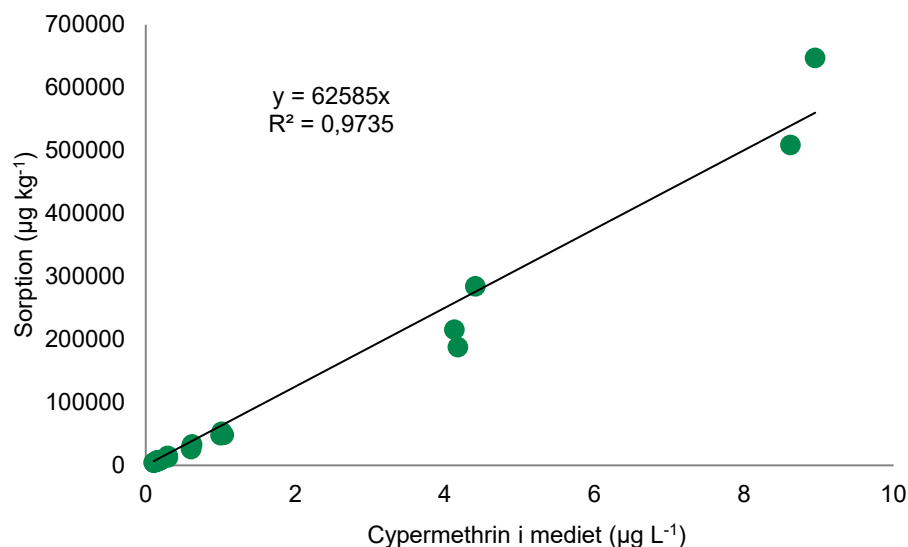
Sorptionsstudierne viste, at der ikke kunne observeres sorption for grov montmorillonit, fin goethit med Suså DOC, grov goethit, Suså DOC og ufiltreret vand fra Suså. Det er sandsynligt at der foregik en sorption til disse materialer med fordelingskonstanter under 12000 L kg^{-1} , som er detektionsgrænsen for metoden med de dimensioner som er anvendt i dette projekt (Tabel 3.4). Mængden af sorberet pyrethroid vil være kvantitativt lille fordi der er så lave koncentrationer af sorbent i de vandsløbsrealistiske forsøg. En worst-case beregning, hvori det antages, at der er $10 \mu\text{g L}^{-1}$ opløst cypermethrin i et dansk vandløb, en sorbent koncentration på 25 mg L^{-1} og en fordelingskonstant på 12000 L kg^{-1} for sorbenten viser, at sorbenten vil øge cypermethrin koncentrationen med $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ til i alt $13 \mu\text{g L}^{-1}$. Det tyder derfor på, at sorbenterne der ikke udviste sorption over detektionsgrænsen, vil have en ringe betydning for cypermethrin koncentrationer i danske vandløb, med mindre cypermethrin sorberes irreversibelt under markforhold og derefter transporteres til vandløb. Studier har vist, at når cypermethrin er sorberet er graden af reversibilitet lav (Zhu & Selim 2002, Zhou et al. 2002).

TABEL 3.4. K_d for cypermethrin sorption til 8 forskellige sorbenter bestående af kombinationer af fin og grov montmorillonit, fin og grov goethit, organisk karbon isoleret fra Suså, opløst og partikulært Aldrich humussyre og ubehandlet vand fra Suså. K_{d1} værdier angiver K_d værdier beregnet ved lineær regression for cypermethrinkoncentration i intervallet $0,1$ til $9 \mu\text{g L}^{-1}$, mens K_{d2} værdier er beregnet for koncentrationsintervallet $0,1$ til $1 \mu\text{g L}^{-1}$. For $K_{d,DOM}$ værdier er massen af tilsat DOM inkluderet i sorbentens masse i beregning af K_d , mens de øvrige K_d værdier ikke inkludere massen af DOM. Værdierne i parenteserne angiver kvadratet på korrelationskoefficienten for den respektive K_d værdi.

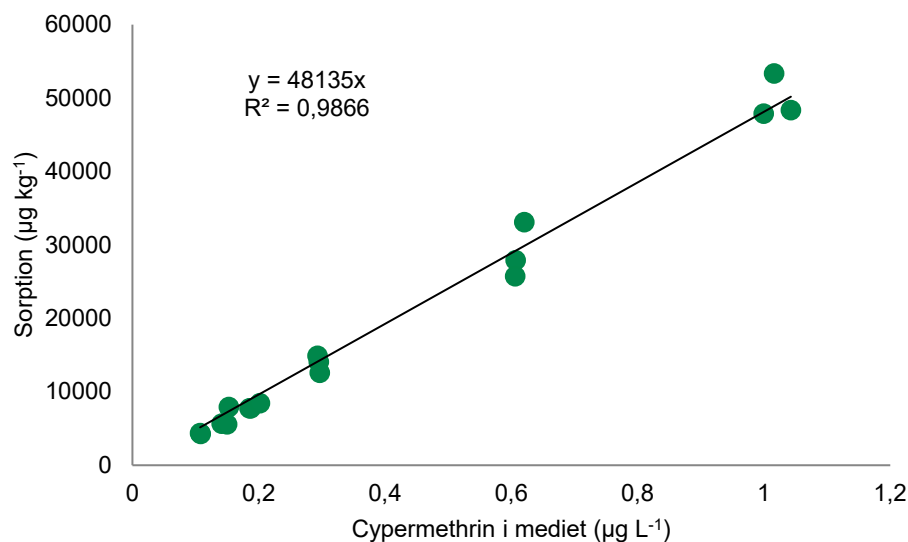
Sorbent	$K_d (\text{L kg}^{-1})$	Bemærkninger
Fin montmorillonit	$K_{d1}=62,6 \cdot 10^3 (0,97)$ $K_{d2}=48,1 \cdot 10^3 (0,99)$	$25,2 \text{ mg L}^{-1}$ montmorillonit
Fin montmorillonit med Suså DOC	$K_{d1}=18,3 \cdot 10^3 (0,97)$ $K_{d1,DOM}=13,2 \cdot 10^3$ $K_{d2}=20,4 \cdot 10^3 (0,94)$ $K_{d2,DOM}=14,7 \cdot 10^3$	$25,0 \text{ mg L}^{-1}$ montmorillonit og $9,6 \text{ mg L}^{-1}$ Suså DOC.
Grov montmorillonit	<LOD	$25,0 \text{ mg L}^{-1}$ montmorillonit
Fin goethit med Suså DOC	<LOD	$7,7 \text{ mg L}^{-1}$ goethit og $9,0 \text{ mg L}^{-1}$ Suså DOC.
Grov goethit	<LOD	$27,0 \text{ mg L}^{-1}$ goethit
Opløst og partikulært Aldrich humussyre	$K_{d1}=25,0 \cdot 10^3 (0,96)$ $K_{d1,DOM}=21,9 \cdot 10^3$ $K_{d2}=32,2 \cdot 10^3 (0,94)$ $K_{d2,DOM}=28,4 \cdot 10^3$	79 mg L^{-1} partikulært materiale og $10,7 \text{ mg L}^{-1}$ opløst humussyre.
Opløst Aldrich humussyre	$K_{d1,DOM}=11,5 \cdot 10^3 (0,88)$ $K_{d2,DOM}=16,3 \cdot 10^3 (0,64)$	$23,0 \text{ mg L}^{-1}$ humussyre.
Suså DOC	<LOD	$13,8 \text{ mg L}^{-1}$ DOC.
Suså vand	<LOD	$2,6 \text{ mg L}^{-1}$ suspenderet materiale og 32 mg L^{-1} DOC.

Den højeste sorption blev observeret for fin montmorillonit med en K_{d1} værdi på $62,6 \cdot 10^3 \text{ L kg}^{-1}$ for det fulde koncentrationsinterval for cypermethrin i blødt-vands-medium op til $9 \mu\text{g L}^{-1}$ og en K_{d2} værdi på $48,1 \cdot 10^3 \text{ L kg}^{-1}$ for koncentrationsintervallet op til $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabel 3.4, Figur 3.7 og

3.8). Som forventet for hydrofobe stoffer udviser sorptionen et lineært forløb som funktion af cypermethrin koncentrationen, og de opnåede høje korrelationskoefficienter bekræfter metodens høje repeterbarhed. Dette studie viser, at partikelstørrelsen for montmorillonit har betydning for i hvilken grad cypermethrin sorberes til montmorillonit. Den grove montmorillonit viste ingen cypermethrin sorption over detektionsgrænsen, mens den fine montmorillonit havde relative høje K_d værdier på $48,1-62,6 \cdot 10^3 \text{ L kg}^{-1}$ (Tabel 3.4). Det højere overflade areal for fin montmorillonit synes at resultere i flere sorption pladser på overfladen af montmorillonit



FIGUR 3.7. Sorption af cypermethrin til fin montmorillonit som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til $9 \mu\text{g L}^{-1}$. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en sorbent koncentration på $25,2 \text{ mg L}^{-1}$ montmorillonit.

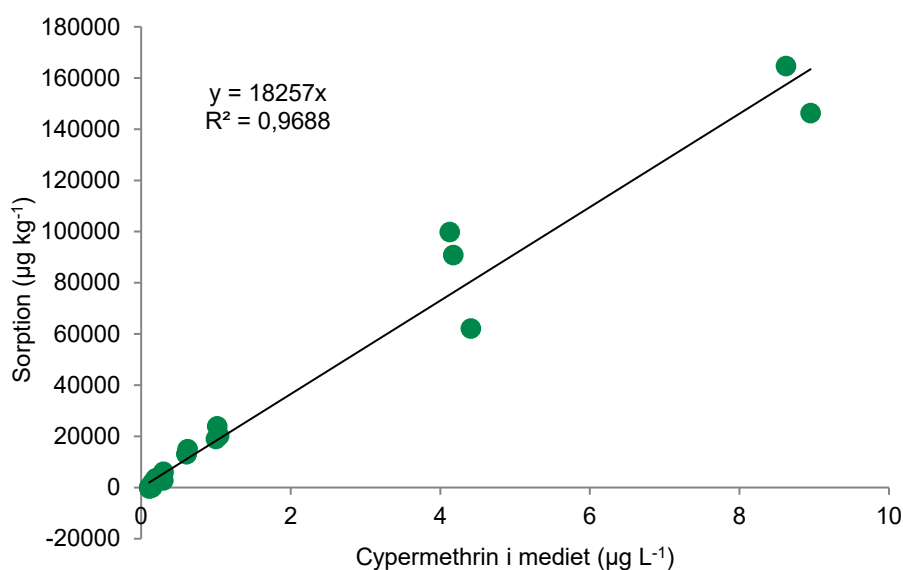


FIGUR 3.8. Sorption af cypermethrin til fin montmorillonit som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en sorbent koncentration på $25,2 \text{ mg L}^{-1}$ montmorillonit.

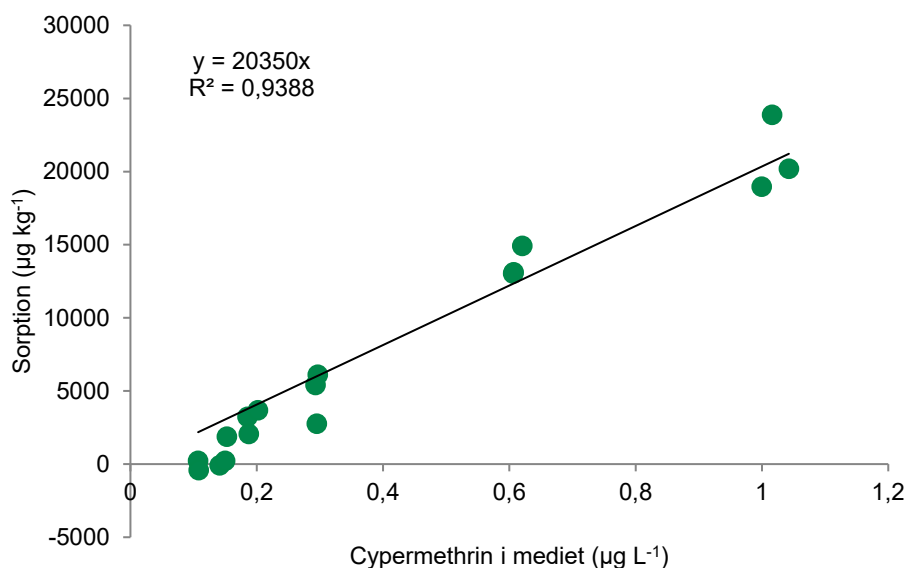
Tilsætning af DOC fra Suså reducerede sorptionen til fin montmorillonit og fordelingskonstanterne K_{d1} og K_{d2} faldt med henholdsvis en faktor 3,4 og 2,4 (Tabel 3.4, Figur 3.9 og 3.10). Det ses, at ændring i overfladeareal for montmorillonit ved tilsætning af Suså DOC er begrænset

(Tabel 7 i kap 2.3), faldet i sorption til montmorillonit ved tilsætning Suså DOC må derfor skyldes, at overfladen af montmorillonit ændrer sig ved coating med organisk materiale. Da det organiske materiale er indsamlet ved at indhente vand fra Suså som filtreres og opkoncentreres, frysetørres og derefter genopløses efterfulgt af en filtrering, vil det organiske materiale bestå af små hydrofile letopløselige organiske forbindelser. Coating af montmorillonit overfladen med disse forbindelser kan måske gøre overfladen mere hydrofil og derfor mindske sorptionen af cypermethrin.

Af Figur 3.10 ses det, at de laveste cypermethrin koncentrationer giver en negativ sorption og at sorptionen for andre lave cypermethrin koncentrationer ikke følger den lineære sorptionsisotherm. Dette skyldes, at sorptionen for disse koncentrationer er så lav at målingen af dem er behæftet med en større usikkerhed. De fire laveste undersøgte koncentrationer viste da også en sorption, der var under den definerede LOD for metoden.

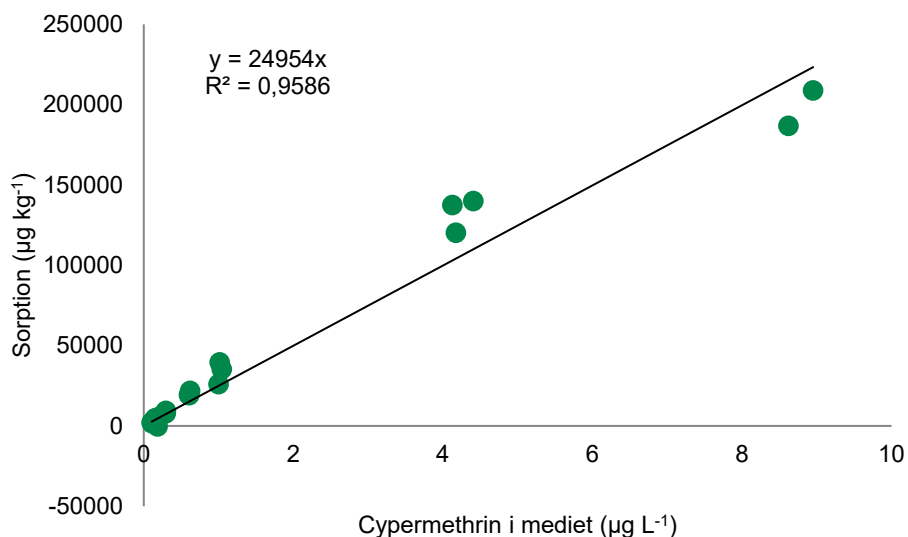


FIGUR 3.9. Sorption af cypermethrin til fin montmorillonit tilsat Suså DOC som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 9 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en sorbent koncentration på 25,0 mg L⁻¹ montmorillonit og 9,6 mg L⁻¹ Suså DOC. Massen af DOC er ikke inkluderet i beregning af sorptionen.

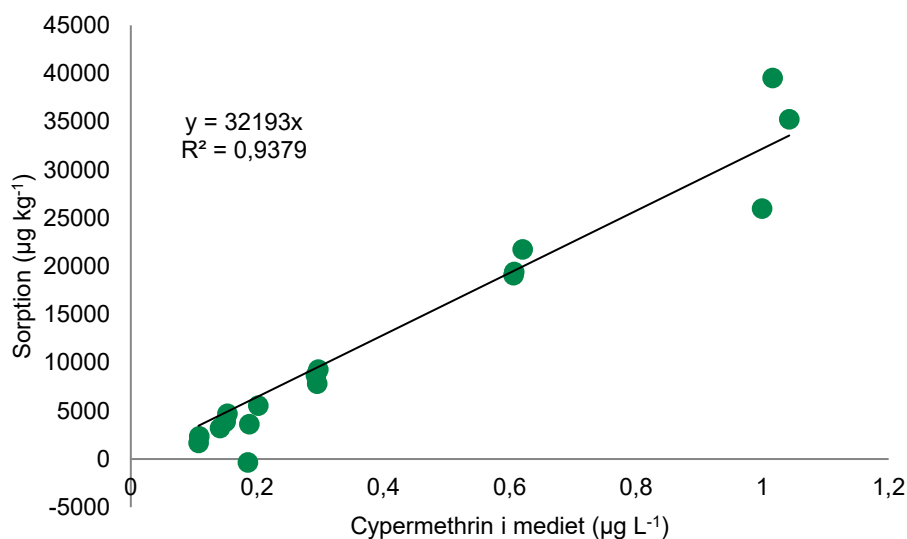


FIGUR 3.10. Sorption af cypermethrin til fin montmorillonit tilsat Suså DOC som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 1 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en sorbent koncentration på 25,0 mg L⁻¹ montmorillonit og 9,6 mg L⁻¹ Suså DOC. Massen af DOC er ikke inkluderet i beregning af sorptionen.

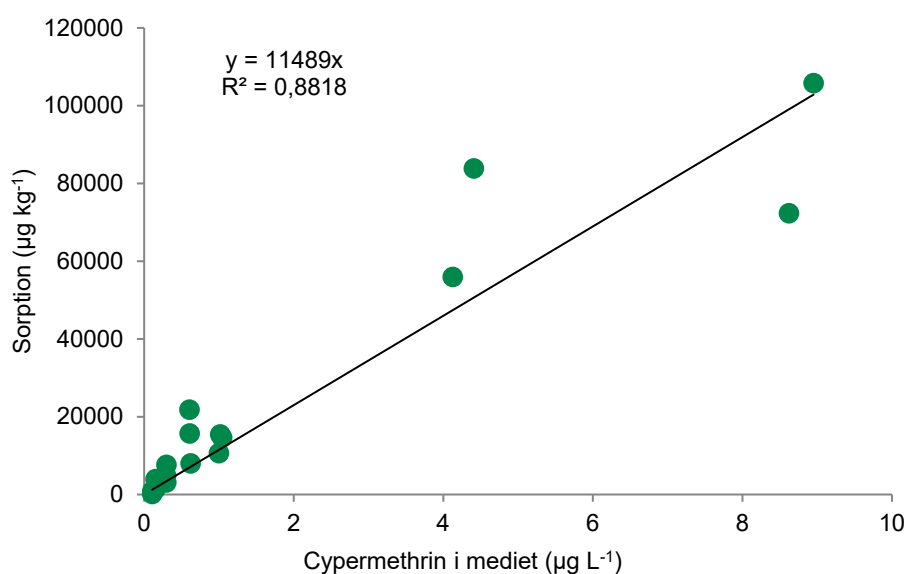
Sorptionen af cypermethrin til Aldrich humussyre ses både til opløst og partikulært materiale, men sorptionen var højest for den ufiltrerede opløsning, der indeholdte partikulært materiale (Tabel 2, Figur 3.11 til 3.14). Den højere sorption til partikulært Aldrich humussyre er forventet, da det materiale, der ikke opløses er den mest hydrofobe del af det organiske materiale. Endvidere er Aldrich humussyre karakteriseret ved at have et højt askeindhold. Aske kan have meget høj sorptionskapacitet for hydrofobe sorbater.



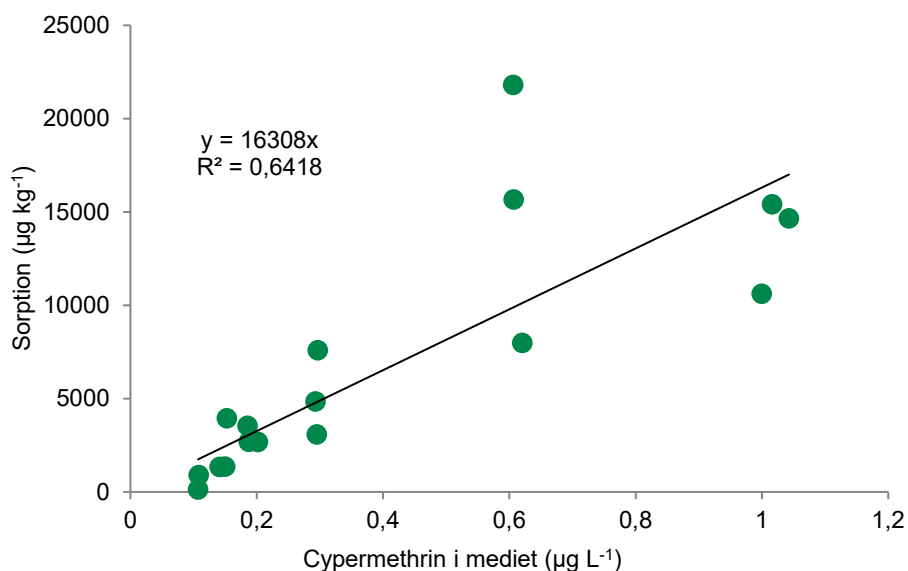
FIGUR 3.11. Sorption af cypermethrin til partikulært og opløst Aldrich humussyre som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 9 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en koncentration på 79 mg L⁻¹ partikulært materiale og 10,7 mg L⁻¹ DOC. Massen af DOC er ikke inkluderet i beregning af sorptionen.



FIGUR 3.12. Sorption af cypermethrin til partikulært og opløst Aldrich humussyre som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 1 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en koncentration på 79 mg L⁻¹ partikulært materiale og 10,7 mg L⁻¹ DOC. Massen af DOC er ikke inkluderet i beregning af sorptionen.

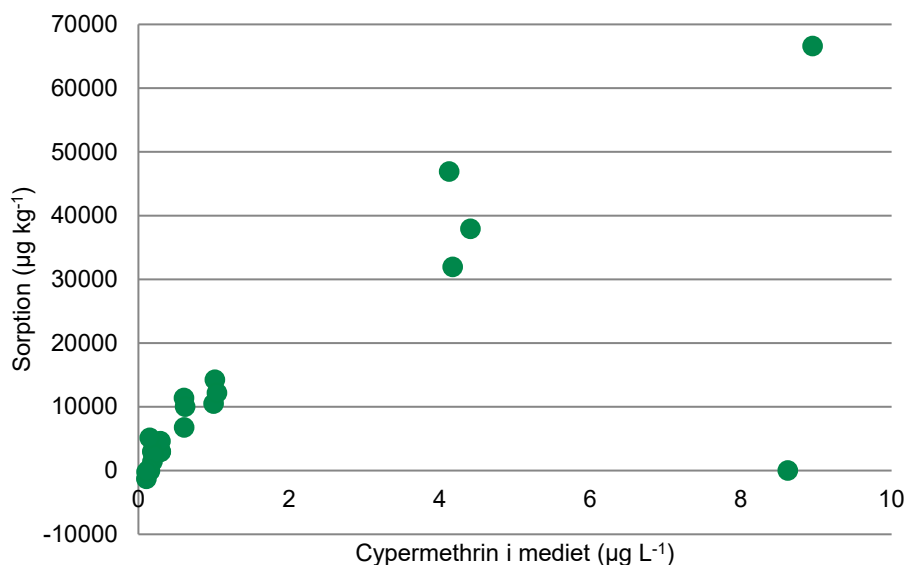


FIGUR 3.13. Sorption af cypermethrin til opløst Aldrich humussyre som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 9 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en koncentration på 23,0 mg L⁻¹ DOC. Massen af DOC er inkluderet i beregning af sorptionen.



FIGUR 3.14. Sorption af cypermethrin til opløst Aldrich humussyre som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 1 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en koncentration på 23,0 mg L⁻¹ DOC. Massen af DOC er inkluderet i beregning af sorptionen.

Sorption af cypermethrin til opløst humussyre ligger kun lidt over den definerede detektionsgrænse for metoden, og der ses derfor også en større usikkerhed på resultaterne og en lavere korrelationskoefficient for den lineære regression for sorptionen som funktion af koncentrationen. Trods K_d værdiernes usikkerhed for opløst Aldrich humussyre viser forsøget, at opløst organisk materiale kan øge koncentrationen af cypermethrin i opløsning, dog kun med en faktor 1,4 for 25 mg L⁻¹ DOC i forhold til soft water mediet uden organisk materiale. Andre studier har også vist af DOC kan sorbere eller agere som co-solvent for pyrethroider (Zhu og Selim 2002, Lee et al. 2003, Liu et al. 2004). Det er muligt, at en lignende med svagere effekt kan ses for Suså DOC. Sorptionsforsøget med Suså DOC viste da også en tendens til lineær sorption som funktion af cypermethrin koncentrationen, men da 11 af koncentrationerne viste sorption under den definerede LOD for metoden skal disse resultater fortolkes med forsigtighed (Figur 3.15).



FIGUR 3.15. Sorption af cypermethrin til Suså DOC som funktion af cypermethrinkoncentrationen i intervallet 0,1 til 9 µg L⁻¹. Forsøget er udført med en rystetid på 24 timer, en koncentration på 13,8 mg L⁻¹ DOC. 11 af punkterne ligger under den definerede detektionsgrænse for metoden så resultaterne skal benyttes med forsigtighed.

3.3.7 Betydning af den eksperimentelle metode i sorptionsforsøg og anvendelse af partikelstørrelse

Studier der har undersøgt sorptionen af cypermethrin til forskellige sorbenter således, at der kan bestemmes en K_d -værdi, er få (Tabel 3.5). I Tabel 3.5 er K_d -værdier både bestemt for cypermethrin og lambda-cyhalothrin, derfor medtaget til sammenligning med værdierne bestemt i dette studie. Det ses, at dette studie sammen med studiet af Rasmussen et al. (2014) er de eneste studier, der anvender sorbentkoncentrationer, der er relevante for danske vandløb i koncentrationsintervallet 20-125 mg L⁻¹. I denne sammenhæng er det interessant, at netop disse studier viser K_d -værdier, der ligger mere end en faktor 100 over K_d -værdier bestemt for sorbentkoncentrationer på 10000-100000 mg L⁻¹. 10000-100000 mg L⁻¹ ligger indenfor det normale L:S forhold i sorptionsstudier, da disse ofte er rettet mod sorption i jord, og at arbejdet med de lavere sorbentkoncentrationer giver nogle særlig analytiske udfordringer. De højere K_d -værdier observeret for lave sorbentkoncentrationer kunne tyde på, at der er et større partikeloverfladeareal tilgængeligt for sorption i tynde suspensioner som vandløb. I tynde suspensioner vil interaktion mellem partikler være mindre og dermed kan der opstå mindre aggregering og resultatet er et større samlet overfladeareal for en given masse sorbent.

Både Oudou og Hansen (2002), Rasmussen et al. (2014), Fojut and Young (2011) og dette studie havde i deres sorptionsforsøg ligevægtskoncentrationer af pyrethroid der ligger indenfor vandopløseligheden (Tabel 3.5). Start koncentrationen af cypermethrin var dog langt over vandopløseligheden, bortset fra i dette studie. I alle studierne observeres der en tilnærmelsesvis lineær sorption, og det er derfor antaget, at anvendte korrektioner for sorption til glasudstyr, via en beregning af K_d for glasudstyret, har korrigeret for cypermethrin der ikke er i opløsning eller sorberet til den undersøgte sorbent. Trods de tilsyneladende gode resultater rummer sådanne metoder betydelige usikkerheder, da bestemmelsen af sorbentens sorption bliver afhængig af hvor godt sorptionen til glasudstyret kendes og med hvilken usikkerhed.

TABEL 3.5. Tabellen viser K_d -værdier fra litteraturen og dette studie samt vigtige eksperimentelle parameter.

Py-rethroid	Sorbent	Sorbent (mg L ⁻¹)	Start/slut cypermethrin konc. (µg L ⁻¹)	K_d (L kg ⁻¹)	Reference
Cypermethrin	Fin mont-morillonit	25,2 mg L ⁻¹	0,1-9,0/0,1-9,0	48-63*10 ³	Dette studie
Cypermethrin	Fin mont-morillonit med Suså DOC	25,0 mg L ⁻¹ mont. og 9,6 mg L ⁻¹ DOC	0,1-9,0/0,1-9,0	13-20*10 ³	Dette studie
Cypermethrin	Grov mont-morillonite	25,0 mg L ⁻¹	0,1-9,0/0,1-9,0	<12*10 ³	Dette studie
Cypermethrin	Fin goethit med Suså DOC	7,7 mg L ⁻¹ goe. og 9,0 mg L ⁻¹ DOC	0,1-9,0/0,1-9,0	<12*10 ³	Dette studie
Cypermethrin	Grov goethit	27,0 mg L ⁻¹	0,1-9,0/0,1-9,0	<12*10 ³	Dette studie

Cyper-methrin	Opløst og partikulært Aldrich humussyre	79 mg L ⁻¹ part. og 10,7 mg L ⁻¹ opl.	0,1-9,0/0,1-9,0	22-32*10 ³	Dette studie
Cyper-methrin	Opløst Aldrich humussyre	23,0 mg L ⁻¹ humussyre	0,1-9,0/0,1-9,0	12-16*10 ³	Dette studie
Cyper-methrin	Suså DOC	13,8 mg L ⁻¹ DOC	0,1-9,0/0,1-9,0	<12*10 ³	Dette studie
Cyper-methrin	Suså vand	2,6 mg L ⁻¹ susp mat og 32 mg L ⁻¹ DOC.	0,1-9,0/0,1-9,0	<12*10 ³	Dette studie
Cyper-methrin	Aluminium oxid	10000	1-100/<3	2960 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Cyper-methrin	Quartz	10000	1-100/<3	192 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Cyper-methrin	Kaolinit	10000	1-100/<3	470 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Cyper-methrin	Montmorillonit	10000	1-100/<3	5070 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Cyper-methrin	Jord, 2,1% OC	100000	250-1500/<50	5,28 ^a	Ali og Baugh (2003)
Lambda-Cyhalothrin	Aluminium oxid	10000	1-100/<3	2034 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Lambda-Cyhalothrin	Quartz	10000	1-100/<3	940 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Lambda-Cyhalothrin	Kaolinit	10000	1-100/<3	8083 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Lambda-Cyhalothrin	Montmorillonit	10000	1-100/<3	12219 ^a	Oudou og Hansen (2002)
Lambda-Cyhalothrin	Jord, 2,1% OC	100000	250-1500/<50	6,04 ^a	Ali og Baugh (2003)
Lambda-Cyhalothrin	Flodsediment	1200	-/0,1-10	8170 ^a	Fojut and Young (2011)
Lambda-Cyhalothrin	Suspendet flodsediment	1000	-/0,1-10	23170 ^a	Fojut and Young (2011)
Lambda-Cyhalothrin	Montmorillonit	5	1-100/<16	42,8-63,8*10 ³	Rasmussen et al. (2014)

Lambda-Cyhalothrin	Montmorillonit	25	1-100/<16	2,89-11,4*10 ³	Rasmussen et al. (2014)
Lambda-Cyhalothrin	Montmorillonit	125	1-100/<16	1,76-2,62*10 ³	Rasmussen et al. (2014)
Lambda-Cyhalothrin	Aldrich Humussyre	5	1-100/<16	38,2-91,1*10 ³	Rasmussen et al. (2014)
Lambda-Cyhalothrin	Aldrich Humussyre	25	1-100/<16	7,58-12,9*10 ³	Rasmussen et al. (2014)
Lambda-Cyhalothrin	Aldrich Humussyre	125	1-100/<16	0,836-0,590*10 ³	Rasmussen et al. (2014)

^a K_d er estimeret ved 0,1 µg L⁻¹ Aldrich via Freundlich parametrene K_F og n bestemt fra en sorptionsisoterm.

Passive dosing metoden hvor start- og slutkoncentrationen af frit pyrethroid kendes og er indenfor dennes opløselighed giver derfor et mere sikkert estimat for K_d -værdier.

Dette studie viste, at partikelstørrelsen for montmorillonit have betydning for graden af sorption af cypermethrin (Tabel 3.5). Dette kan også være dele af årsagen til, at der i dette studie er fundet højere sorption af cypermethrin, da de øvrige studier ikke har anvendt partikelstørrelsesseparering for sorbenten. Mindre partikler udviser en højere sorption, hvilket er relevant for transporten i vandløb, da mindre partikler vil være suspenderet i højere grad og kunne transporteres over længere afstande.

3.3.8 Delkonklusion

Dette studie med passiv dosering af cypermethrin i sorptionsstudier har vist:

- At sorberet cypermethrin til de undersøgte sorbenter ikke kan bestemmes ved ekstraktion med hexan eller en 1:1 blanding af hexan og ethylacetat.
- At sorberet ¹⁴C-mærket cypermethrin kan måles direkte uden ekstraktion ved scintillationstælling uden tegn på partikelskygning.
- At fin montmorillonit viste den højeste sorption af de undersøgte sorbenter og havde fordelingskonstanter i intervallet 48100-62600 L kg⁻¹, mens grov montmorillonit ikke udviste sorption over detektionsgrænsen. Tilsætning af DOC til den fine montmorillonit sænkede sorptionen af cypermethrin med en faktor 2,3 til 3,4.
- Sorptionen af cypermethrin til Aldrich humussyre ses både til opløst og partikulært materiale, men sorptionen var højest for det partikulære materiale.

Der blev ikke observeret sorption af cypermethrin over metodens detektionsgrænse for fin goethit med Suså DOC, grov goethit, Suså DOC og ufiltreret vand fra Suså.

4. Økotoksikologisk virkninger af partikel-bundne pyrethroider

4.1 Gammarus' følsomhed overfor cypermethrin bundet til sorbenter

4.1.1 Baggrund og formål

Parallelt med studierne af sorption af cypermethrin til partikler og humussyre beskrevet i forrige afsnit, foretog vi studier af giftigheden af cypermethrin overfor den følsomme ferskvands organisme *Gammarus pulex*. Baggrunden var de divergerende resultater fundet i litteraturen omkring giftigheden af sorberede stoffer. Der er studier, hvor øget giftighed af hydrofobe giftstoffer bundet til nano-partikler er blevet observeret (se f.eks. Hund-Rinke, 2006, Aruoja, 2009), mens andre studier har vist en nedsat giftighed af giftstoffer sorberet til fødemateriale eller humussyre (Hoss, 2011, Fliedner, 1997). Pyrethroider er blandt de pesticider, som mistænkes for at have størst negativ effekt på sammensætningen af samfundene af invertebrater (hvirvelløse dyr) i danske vandløb (Rasmussen et al., 2013). Samtidig er pyrethroider så ekstremt lipofile at de forventes at sorbere stærkt til overflader, og det er oplagt at undersøge om sorption til partikler eller humussyre ændrer på den giftighed man bestemmer i rent vand. Formålet med forsøgene var at undersøge i hvilken grad forskellige typer af sorbenter (goethit, montmorillonit og humussyre) og partiklernes størrelsesfordeling påvirkede giftigheden af en 90 minutters puls-eksponering med cypermethrin overfor *Gammarus pulex*. Vi valgte en puls-eksponering, da det ofte vil være den type af kortvarige pulse med høje eksponerings-koncentrationer som makroinvertebrater udsættes for sammen med partikler, der udvaskes og re-suspenderes i vandsøjlen i forbindelse med kraftige regnvejrhændelser. Vores hypotese var, at giftigheden af cypermethrin ville falde med tilstedeværelsen af partikler, da en sorption ville gøre pyrethroiderne mindre biotilgængelige. Vi forventede også et større fald i giftighed ved eksponering til de mindre partikler i forhold til de større partikler, da disse var forventet at kunne sorbere mere cypermethrin grundet deres større relative overfladeareal.

4.1.2 Metode

Test medium og kemikalier

For i højest mulig grad at anvende vand, der ligner dansk vandløbsvand, brugte vi et standard blød-vands-medie (OECD 2004). Mediet er fremstillet på baggrund af deioniseret vand tilsat 48 mg L⁻¹ NaHCO₃, 30 mg L⁻¹ CaSO₄·2H₂O, 30 mg L⁻¹ MgSO₄ og 2 mg L⁻¹ KCl, justeret til en pH i intervallet 7,2-7,6. Cypermethrin (CAS; 52315-07-8, purity; 94,3%, Sigma Aldrich, USA) blev opløst og fortyndet i ethanol (CAS; 64-17-5, purity; 96,0%, VWR, USA) til de ønskede koncentrationer, der skulle bruges i forsøgene.

Konditionering af bøgeblade

For at minimere stress af *G. pulex* under forsøgene, blev de givet et præ-konditioneret bøgeblad at æde af og gemme sig under efter overflytning til rent vand efter puls eksponeringen. Bøgebladene var plukket af en vissen bøgehæk, for at undgå kontaminering med mikroorganismer fra jorden. Tre uger før et forsøg blev en håndfuld blade placeret udendørs i en spand med postevand i tre dage, for at vaske let opløselige naturlige giftstoffer ud af bladene. Derefter blev vandet skiftet ud med vandløbsvand og bladene blev placeret i et klimakammer ved 10 °C i 2-3 uger for at tillade kolonisering med ferskvandssvampe på bladene.

4.1.2.1 Indsamling af *G. pulex*

G. pulex blev indsamlet fire dage før start af et eksperiment fra et mindre vandløb, Mølleåen, nord for København (55°48'58"N 12°18'45"E (d°m's")) (Figur 4.1). Derefter blev de akklimatiseret til laboratorie forhold i et klimakammer ved 10 °C og en 12:12 timers lys:mørke periode i spande med vandløbsvand, vandplanter og døde blade, der kunne give både føde og gemmesteder. Dagen efter blev vandløbsvandet udskiftet med gennemluftet medie. Før start af hvert eksperiment blev 20 repræsentative *G. pulex* frosset, frysetørret og vejjet, og et andet sæt på 8 x 5 gammarus blev frosset i flydende kvælstof og gemt ved -80 °C. Det sidste blev gjort for at muliggøre målinger af fysiologiske parametre, der måtte varierer over sæsonen.



FIGUR 4.1. Den lokalitet på Mølleåen, hvor gammarus blev samlet. Billederne er fra henholdsvis marts og juni (Foto: Anja Weibell).

4.1.2.2 Gammarus puls-eksponering

For at teste variationen mellem eksperimenter, som f.eks. kunne skyldes at gammarus blev indsamlet på forskellige årstider og derfor kan have forskellig følsomhed, blev der altid inkluderet et forsøg med gammarus i rent medie uden sorbenter. Dette muliggjorde, at effekten af sorbenterne altid kunne sammenholdes med data fra forsøg uden sorbenter på dyr indsamlet på samme tidspunkt. Ud over testen med rent medie, blev der på hvert tidspunkt testet to sorbenter sammen med cypermethrin. De tre tests med hver ni behandlinger med 12 individer var maksimal kapacitet for en forsøgsrunde.

I hvert forsøg blev 7-8 cypermethrin koncentrationer testet: 0,000; 0,125; 0,250; 0,500; 1,000; 2,000; 3,900; 7,800 and 15,600 µg L⁻¹. Dertil kom test af sorbenter uden tilsætning af cypermethrin, for at teste om sorbenterne alene påvirkede *G. pulex* f.eks. via sorption til gæller eller lignende. Et overblik over behandlingerne med sorbenter og sorbent koncentrationerne er givet i Tabel 4.1. Opløsningerne med sorbenter blev udført som beskrevet i afsnit 2.2.

Ved forsøgsstart blev 6 gammarus med en gennemsnits-længde på 10-13 mm overført til en metalsi (maske-størrelse 400 µm) med en plastik pipette, for at fjerne overskydende vand. Derefter blev de forsigtigt overført til et bægerglas med 50 mL medie eller medie+sorbent. To bægerglas per behandling med i alt 12 dyr blev inkuberet sammen 6 kontrolbægre med og uden sorbent (36 dyr for henholdsvis rent medie og 2 x medie+sorbent). Iltkoncentration og pH blev målt inden 5 µL cypermethrin stamopløsning blev tilsat til hvert bægerglas med en glaspipette (ethanol < 0,01% v/v). Kontrol bægerne blev tilsat ren ethanol. Mediet blev derefter omrørt forsigtigt med en glas-pind og tidspunktet blev noteret.

Efter 90 minutter blev gammarus atter overført til en metalsi, hvorefter de blev skyllet i tre på hinanden følgende spande med rent medie, for at vaske sorbent og cypermethrin af. Herefter blev de med en blød pincet forsigtigt overført til en brønd i en 6-brøndsplade (type; 92006, TPP, Switzerland) indeholdende 10 mL medie og et konditioneret bøgeblad. Testpladerne blev placeret i en klimaskab ved 10 °C og en 12:12 timers lys:mørke cyklus og antallet af upåvirkede, påvirkede og døde gammarus blev observeret efter 24, 48, 72, 96 og 168 timer.

TABEL 4.1. Tabellen giver et overblik over de sorbent sammensætninger og deres koncentrationer, som er testet på *G. pulex* sammen med cypermethrin. Karakteriseringen af sorbenterne er beskrevet i afsnit 2.3

Behandling	M. grov (mg L ⁻¹)	M. fin (mg L ⁻¹)	G. grov (mg L ⁻¹)	G. medium (mg L ⁻¹)	OM (mg C L ⁻¹)
Grov montmorillonit	25,0				
Grov montmorillonit + organisk stof	25,0				0,21
Grov goethit	25,0				0,21
Grov goethit + Organisk stof			25,0		0,21
Fin montmorillonit		5,1			
Fin montmorillonit + organisk stof		5,1			0,21
Medium goethit				5,58	
Medium goethit + organisk stof				5,58	0,21
Organisk stof					0,21
Grov montmorillonit + organisk stof ¹	25,0				5
Grov goethit + Organisk stof ¹			25,0		5

¹ Grov montmorillonit og goethit med organisk stof viser en effekt på toksiciteten af cypermethrin og derfor er det gentaget med højere koncentration af organisk stof

Ud over test med cypermethrin, udførte vi også en test med humussyre alene i med koncentrationerne 0,00; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 and 20,00 mg C L⁻¹ og uden cypermethrin eller sorbenter. Humussyren alene i de testede koncentrationer havde ingen målbar virkning på overlevelsen af *G. pulex*, og vil derfor ikke blive diskuteret yderligere.

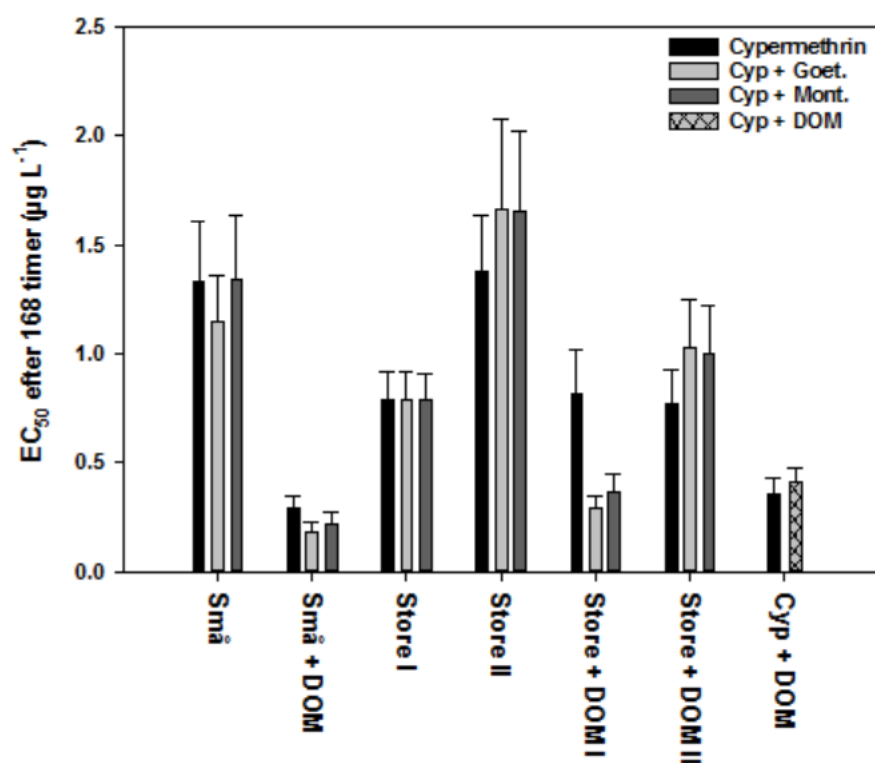
4.1.3 Resultater og Diskussion

4.1.3.1 Effekten af partikler på giftigheden af cypermethrin

Resultaterne af pulsforsøgene med og uden sorbenter er givet som EC₅₀-værdier efter 168 timer Figur 4.2. Der var forskel i gammarussernes følsomhed mellem de forskellige tidspunkter eksperimenterne blev udført, men tilstedeværelsen af partikler påvirkede ikke giftigheden signifikant, vurderet visuelt på baggrund af standardfejlen på EC₅₀, som alle overlappede kraftigt. Den eneste undtagelse var forsøget med store partikler coatet med DOM, hvor det så ud til at partiklerne øgede giftigheden af cypermethrin. Hvis vi sammenligner med sorptionsstudierne er der ingen indikation på, at de grove partikler hverken med eller uden DOM skulle sorbere cypermethrin i en mængde som ville reducere den opløste koncentration mærkbart. Og resultaterne med de grove partikler uden DOM, som blev gentaget to gange, viste heller ingen tegn på giftighed. Det eneste som visuelt blev observerede var anderledes for de grove partikler plus DOM var, at de aggregerede og bundfældede sig under eksponeringsforsøget. Den øgede aggregering sammenlignet med ikke-coatede partikler skyldes givetvis ændrede overflade strukturer, der ved coating med DOM reducerede frastødningen mellem partiklerne og dermed faciliterede aggregering. Da *G. pulex* bevæger sig på bunden af bægerglasset, kan de være blevet eksponeret til større mængder af cypermethrin i det aggregerede materiale, end de ville være, hvis cypermethrin var jævnt fordelt i vandsøjlen. Partiklerne har i så fald ageret

som "passive dosers" sådan som tidligere observeret med syntetiske nano-partikler af TiO_2 , CuO og ZnO (Hund-Hinke & Simon, 2006, Aruoja et al., 2009).

Med baggrund i viden om sorption til de suspendede sorbenter, giver resultaterne rigtig god mening. Her var det kun den fine fraktion af montmorillonit der viste betydelig sorption med en K_d på ca. $60 \cdot 10^3 \text{ kg L}^{-1}$ som rent lermineral og på ca. $20 \cdot 10^3 \text{ kg L}^{-1}$ når den var coated med Suså organisk materiale (Tabel 3.4). Med en K_d værdi på $60 \cdot 10^3 \text{ L kg}^{-1}$ og de sorbentkoncentrationer der blev anvendt i toksicitetsforsøgene svarer det til at ca. 77% af den tilsatte cypermethrin var i fri opløsning, mens 23% var bundet til den fine montmorillonit. Hvis den bundne cypermethrin fraktion ikke var biotilgængelig burde giftigheden for denne blanding derfor være faldet med ca. 23%, hvilket ikke er særligt meget og ligger inden for usikkerheden på EC_{50} bestemmelserne i de fleste tilfælde. I tilfældet med de små montmorillonit partikler var EC_{50} uforandret, hvilket viser at cypermethrin ikke har været hårdt bundet, men har kunnet desorbere hurtigt. En hurtig desorption af bifenthrin fra montmorillonit (og andre partikler) har været vist i desorptionsforsøg (K.F. poster Basel). Her blev en opløsning med partikelbundet alpha-cypermethrin tilsat et glas med silicone stave, der fungerer som passive samplere. Stavene blev så fjernet med korte tidsintervaller og absorptionshastigheden ind i stavene blev sammenlignet mellem rent medie med cypermethrin og fra medie med partikel-bundet cypermethrin. Der var stort set ingen forskel, hvilket viser at sorptionen er reversibel, når cypermethrin og partiklerne kun har været i kontakt i timer til døgn, som det har været tilfældet i både studierne fra dette projekt og i bifenthrin studierne fra et tidligere specialeprojekt.



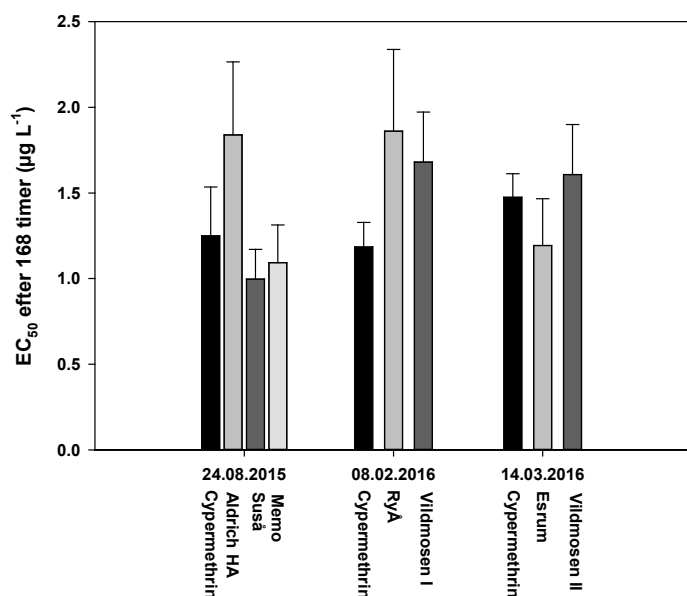
FIGUR 4.2: EC_{50} -værdier med deres tilhørende standardfejl (SE) for de syv eksperimenter med *G. pulex* og partikler. Cyp: Cypermethrin, Goet.: Goethit, Mont.: Montmorillonit and DOM: Op-løst Organisk Materiale isoleret fra Suså. Eksperimenterne er givet i rækkefølgen med de fine partikler først og ikke kronologisk, som de var udført. Et overblik over kronologien kan fås i Tabel 4.2

Partiklerne og cypermethrin blev blandet ca. 24 timer før forsøgets start, så det kan ikke udelukkes at cypermethrins binding til partiklerne kunne øges med længere kontakt tid. Men eftersom forsøgene simulerer transport af cypermethrin med partikler via overflade afstrømning og dræn i

forbindelse med kraftige regnskyl tæt på sprøjtetidspunktet, er en kort kontakt-tid en realistisk "worst case". Vi kan konkludere at den meget begrænsede binding til partiklerne i hvert fald ikke øgede toksiciteten overfor gammarus.

4.1.3.2 Effekten af opløst organisk materiale på giftigheden af cypermethrin

Selvom coating af de fine montmorillonit partikler med organisk materiale fra Suså betød at cypermethrin sorberede svagere til partiklerne, så viste Aldrich humussyrer alene at kunne sorbere cypermethrin med en K_d på $15\text{--}30 \cdot 10^3 \text{ L kg}^{-1}$ afhængigt af om uopløste partikler var til stede eller ej. For at teste en række mere naturlige humus-sammensætninger, blev disse opkoncentreret fra vand indsamlet fra danske søer og åer. Resultaterne er præsenteret samlet i Figur 4.3.



FIGUR 4.3: Virkningen af ko-eksponering med opløst organisk materiale på giftigheden af cypermethrin på *G. pulex* efter 168 timer vist som EC₅₀ (µg L⁻¹) ± standardfejl (SE). Selvom både "Aldrich HA", "Ryå" og "Vildmosen" øgede EC₅₀ og dermed nedsatte giftigheden, var denne ændring ikke signifikant (SE var ikke overlappende).

Forsøgene viste en tendens til faldende giftighed for tre af eksponeringerne med en maximal stigning i EC₅₀ på 56% for Ryå, men denne tendens var ikke signifikant. Forsøget med organisk materiale fra Vildmosen blev gentaget, da det viste sig at pH i første forsøg havde været nede på pH 5,6 under puls-eksponeringen. I andet forsøg blev pH justeret til pH 7,9, hvilket ikke ændrede EC₅₀, der var $1,68 \pm 0,29$ og $1,61 \pm 0,29 \text{ µg L}^{-1}$ i de to forsøg. Den samlede konklusion på resultaterne med opløst organisk materiale var derfor, at de måske kunne sænke giftigheden en smule, men ikke væsentligt, når de var tilstedet i naturlige koncentrationer (Tabel 2.1).

En årsag til forskellen i påvirkning af biotilgængeligheden af cypermethrin mellem de forskellige typer af naturligt organisk materiale, hvis vi tillader os at tolke på ikke-signifikante tendenser, er givetvis sammensætningen af det organiske materiale. Studier af effekten af forskellige typer af organisk materiale på biotilgængeligheden af de lipofile pesticider carbofuran, lindan og chlorpyrifos udført af Lundqvist et al. (2012), viser at interaktionerne er komplekse og svære at kvantificere og beskrive. De to typer organisk materiale som påvirkede EC₅₀ værdierne mindst, materialet fra Suså og opløst organisk materiale i jordvæsken fra en sur skovbund under rødgran (Memo), bestod primært af fulvosyre (Strobel et al., 2001), hvorimod de tre typer organisk materiale, som nedsatte EC₅₀ mest (Aldrich humussyre, og materiale fra Ryå og Vildmosen) i højere grad er domineret af humussyre som generelt har flere aktive grupper end fulvosyre. Humussyrs evne til at nedsætte giftigheden af hydrofobe stoffer var også fundet af Mezin & Hale (2004), der målte en nedsat giftighed af DDT og chlorpyrifos

overfor *Cerio-daphnia dubia*, når de eksponerede sammen med filtreret Aldrich humussyre i intervallet 10-100 mg L⁻¹.

4.1.3.3 Udviklingen af giftighed over tid

Da det blandt andet for dafnier (Kretschmann et al. 2015, Dalhoff et al. 2016), men også for andre organismer (Rasmussen et al., 2014), var blevet observeret at giftigheden af en puls af pyrethroid insekticid kan have en effekt i mange dage efter puls eksponeringens ophør, blev overlevelsen af eksponerede *G. pulex* observeret i en uge. Modsat forventet så vi ikke en systematisk øget toksicitet med tid, hvilket ville have givet sig til udtryk i systematisk faldende EC₅₀ værdier (Tabel 4.2). For gammarus kan vi derfor konkludere, at størstedelen af toksiciteten udtrykkes indenfor de første 24 timer efter eksponering.

TABEL 4.2: Estimerede EC₅₀-værdier for samtlige observationstidspunkter for de forskellige pulseksponeringer med cypermethrin samt cypermethrin plus forskellige partikelstørrelser af goethit og montmorillonit med og uden DOM

Cypermethrin													
Dato	16.02.2015		02.03.2015		16.03.2015		27.04.2015		11.05.2015		15.06.2015		
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	
24 t	0,94	± 0,25	2,17	0,40	1,60	± 0,22	0,21	± 0,04	0,72	± 0,18	0,72	± 0,12	
48 t	0,63	± 0,11	-	-	1,35	± 0,22	0,32	± 0,06	1,29	± 0,26	0,86	± 0,15	
72 t	0,85	± 0,16	0,87	0,21	1,30	± 0,25	0,30	± 0,06	1,22	± 0,26	0,77	± 0,15	
96 t	0,75	± 0,15	0,86	0,19	1,23	± 0,24	0,28	± 0,07	1,37	± 0,27	0,72	± 0,15	
168 t	0,79	± 0,13	0,82	0,20	1,33	± 0,28	0,29	± 0,06	1,37	± 0,27	0,77	± 0,16	
Cypermethrin + goethit (DOM = Suså)													
Dato	16.02.2015		02.03.2015		16.03.2015		27.04.2015		11.05.2015		15.06.2015		
Størrelse	Store		Store + DOM		Små		Små + DOM		Store		Store + DOM		
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	
24 t	1,06	± 0,34	1,73	± 0,38	1,52	± 0,25	0,13	± 0,03	0,74	± 0,15	0,95	± 0,17	
48 t	0,79	± 0,13	-	± -	1,27	± 0,20	0,19	± 0,05	1,74	± 0,39	1,01	± 0,19	
72 t	0,84	± 0,14	0,43	± 0,08	1,27	± 0,20	0,20	± 0,04	1,86	± 0,42	1,22	± 0,24	
96 t	0,75	± 0,13	0,44	± 0,08	1,28	± 0,20	0,22	± 0,05	1,66	± 0,42	1,22	± 0,24	
168 t	0,79	± 0,13	0,29	± 0,06	1,15	± 0,21	0,18	± 0,05	1,66	± 0,42	1,03	± 0,22	
Cypermethrin + montmorillonit (DOM = Suså)													
Dato	16.02.2015		02.03.2015		16.03.2015		27.04.2015		11.05.2015		15.06.2015		
Størrelse	Store		Store + DOM		Små		Små + DOM		Store		Store + DOM		
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	
24 t	0,56	± 0,16	2,44	± 0,49	2,54	± 0,35	0,17	± 0,03	1,01	± 0,14	0,74	± 0,15	
48 t	0,85	± 0,12	-	± -	1,60	± 0,24	0,26	± 0,05	1,72	± 0,32	1,07	± 0,24	
72 t	0,63	± 0,12	0,44	± 0,07	1,71	± 0,28	0,21	± 0,05	1,91	± 0,33	1,27	± 0,28	
96 t	0,85	± 0,16	0,49	± 0,09	1,45	± 0,25	0,15	± 0,05	1,66	± 0,36	1,12	± 0,24	
168 t	0,79	± 0,12	0,37	± 0,08	1,34	± 0,29	0,22	± 0,05	1,66	± 0,36	1,00	± 0,22	

TABEL 4.2-FORTSAT: Estimerede EC₅₀-værdier for samtlige observationstidspunkter for de forskellige pulseksponeringer med cypermethrin, cypermethrin plus DOM fra forskellige lokaliteter og DOM alene. Bemærk at man ikke som i tabellen ovenfor kan sammenligne eksponeringerne direkte kolonnevis, men kun per dato, som er angivet øverst for hvert forsøg.

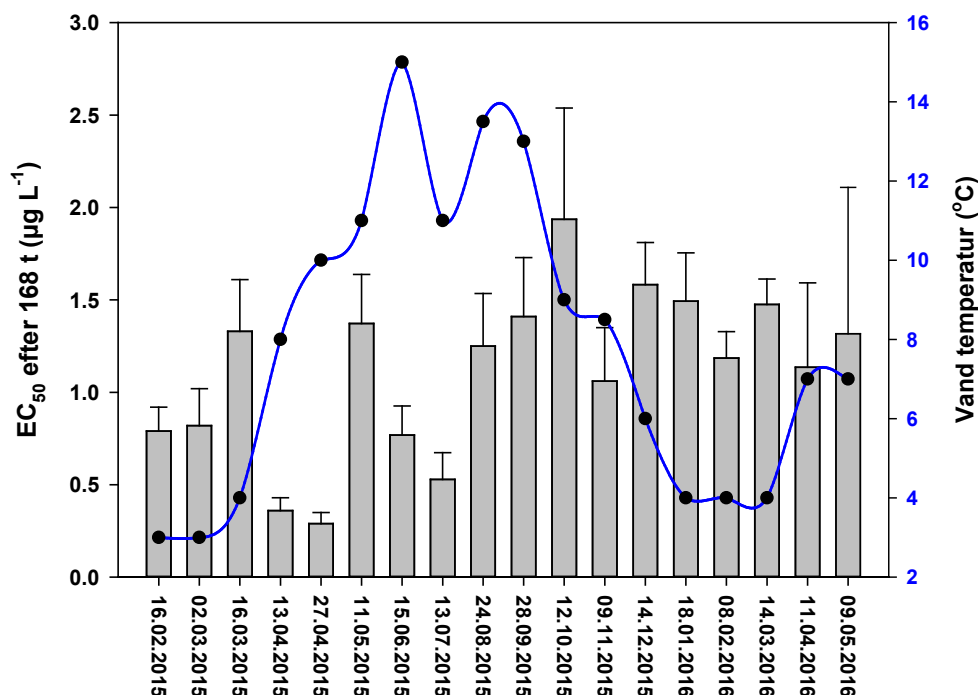
Cypermethrin												
Dato	13.04.2015		13.07.2015		24.08.2015		28.09.2015		12.10.2015		09.11.2015	
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE
24 t	0,21	± 0,05	1,01	± 0,07	1,51	± 0,31	4,70	± 1,42	6,60	± 3,46	0,93	± 0,16
48 t	0,28	± 0,06	1,74	± 0,52	1,18	± 0,25	1,85	± 0,40	3,55	± 1,01	0,83	± 0,14
72 t	0,30	± 0,06	2,01	± 0,14	1,52	± 0,32	1,69	± 0,38	2,82	± 0,73	0,93	± 0,16
96 t	0,27	± 0,06	2,36	± 0,61	1,42	± 0,31	1,39	± 0,31	2,41	± 0,58	0,87	± 0,16
168 t	0,36	± 0,07	0,53	± 0,14	1,25	± 0,29	1,41	± 0,32	1,94	± 0,60	1,06	± 0,29
Cypermethrin + DOM												
Dato	13.04.15				24.08.2015		24.08.2015		24.08.2015			
Lokation	Suså				Suså		Aldrich HA		Memo			
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE
24 t	0,22	± 0,03		±	0,70	± 0,12	3,14	± 0,91	1,11	± 0,20		±
48 t	0,46	± -		±	0,84	± 0,15	1,69	± 0,34	1,02	± 0,22		±
72 t	0,29	± 0,06		±	1,19	± 0,22	2,66	± 0,71	1,04	± 0,19		±
96 t	0,24	± 0,08		±	1,00	± 0,16	3,65	± 1,10	1,25	± 0,22		±
168 t	0,41	± 0,07		±	1,00	± 0,17	1,84	± 0,43	1,09	± 0,22		±
Cypermethrin												
Dato	14.12.2015		18.01.2016		08.02.2016		14.03.2016		11.04.2016		09.05.2016	
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE
24 t	1,49	± 0,21	0,98	± 0,18	1,06	± 0,15	1,36	± 0,14	0,62	± 0,23	0,65	± 0,38
48 t	2,57	± 0,47	1,78	± 0,29	1,33	± 0,15	1,35	± 0,18	0,97	± 0,34	1,93	± 0,86
72 t	2,00	± 0,34	1,58	± 0,25	0,90	± 0,10	1,36	± 0,14	1,08	± 0,42	2,21	± 0,93
96 t	2,01	± 0,56	1,49	± 0,28	1,26	± 0,18	1,48	± 0,14	1,14	± 0,46	1,90	± 0,83
168 t	1,58	± 0,23	1,49	± 0,26	1,19	± 0,14	1,48	± 0,14	1,14	± 0,46	1,32	± 0,79
Cypermethrin + DOM												
Dato	08.02.2016				08.02.2016		14.03.2016		14.03.2016			
Lokation	Ryå				Vildmosen		Vildmosen		Esrum			
	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE	EC ₅₀	SE
24 t		±	1,92	± 0,39	1,18	± 0,19	0,90	± 0,14	1,01	± 0,08		±
48 t		±	1,59	± 0,30	1,78	± 0,26	1,40	± 0,25	0,94	± 0,15		±
72 t		±	1,17	± 0,23	1,24	± 0,25	2,00	± -	1,41	± 0,32		±
96 t		±	3,06	± 0,55	1,99	± 0,30	1,61	± 0,29	1,21	± 0,24		±
168 t		±	1,86	± 0,48	1,68	± 0,29	1,61	± 0,29	1,19	± 0,27		±

4.1.3.4 Årstidsvariationer i gammarus følsomhed

Da det har været diskuteret blandt økotoksikologer, i hvor høj grad tiden på året hvor man indsamler sine forsøgsdyr påvirke ens resultater van den Brink et al. (2016), fandt vi det oplagt at se på årstidsvariationen af gammarus' følsomhed når de udsættes for cypermethrin alene. Vi havde i forbindelse med alle forsøgene med partikler og organisk materiale indsamlet gammarus hver 2.-4. uge i næsten halvandet år. Med tilføjelse af nogle tidspunkter, hvor kun cypermethrin var testet, kom vi op på i alt 18 parallelle forsøg. I Figur 4.4 er EC₅₀ værdierne afbilledet sammen med den målte temperatur i vandløbet under indsamlingen.

Data viste en variation i følsomhed fra en EC₅₀ værdi på 0,29 ± 0,06 µg L⁻¹ målt i april 2015 til 1,94 ± 0,60 µg L⁻¹ målt i oktober 2015. Pyrethroiders giftighed er kendt for at være temperaturafhængig med højere giftighed ved lavere temperaturer (Harwood et al., 2009; Weston et al., 2009). Den øgede giftighed ved lave temperaturer skyldes givetvis nedsat detoksificeringsrate. Den manglende sammenhæng mellem følsomhed og temperatur under indsamling viser, at akklimatiseringen af vores gammarus til 10 °C og udførslen af alle forsøg ved samme temperatur udjævnede den effekt der kunne have været, hvis f.eks. vinter gammarus havde et lav detoksificeringspotentiale, hvorimod sommer dyr havde et højt. Den højere følsomhed, der blev observeret i foråret 2015 bekræftede i første omgang Bottger et al., (2012), der observerede større følsomhed i *Gammarus roesli* overfor insektmidlet imidacloprid på dyr indsamlet i foråret i forhold til dyr indsamlet i efteråret. Den høje følsomhed i forårs-dyr i vores forsøg kunne dog ikke reproducere i 2016. Årsagen til den højere følsomhed i foråret 2015 kunne skyldes forskellige faktorer. Størrelsen af organismerne var generelt mindre i foråret. Så selvom målet var kun at teste organismer i størrelses-intervallet 10-13 mm, vil de givetvis have

ligget i den lavere ende af intervallet det første forår, hvor vi ikke var så rutinerede i indsamlings-proceduren og derfor hjembragte færre organismer at vælge imellem end i 2016, hvor faste procedurer for indsamling og sortering var blevet etableret. Mindre organismer er ofte mere følsomme end større organismer pga. deres større overflade volumen forhold (Wiberg-Larsen et al. 2016). Forskellige personer har også været involveret i forsøgene, hvilket kan give usikkerhed på data. Den lave variation mellem forsøgene fra august 2015 til maj 2016 kunne skyldes, at den samme person stod for størstedelen af forsøgene, som hun udførte efter nøje indarbejdede procedurer. Det gav resultater, hvor EC_{50} værdierne ikke var signifikant forskellige fra hinanden gennem 10 på hinanden følgende indsamlinger der strakte sig over en periode på næsten 10 måneder.



FIGUR 4.4. Sæson svingninger i gammarus følsomhed overfor en 90 min puls af cypermethrin givet som $EC_{50} \pm SE$. Temperaturen i bækken på indsamlingstidspunktet er angivet som sorte cirkler og blå kurve (smooth fit). Den højeste følsomhed blev observeret i april 2015 med EC_{50} estimer så lave som $0,29 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$, og den laveste følsomhed blev målt i oktober 2015 med en EC_{50} på $1,94 \pm 0,60 \mu\text{g L}^{-1}$. Der var ingen signifikant korrelation mellem følsomheden af gammarus og vandtemperaturen ved indsamling (*Pearsons korrelation coefficient* = 0,02; F-test, $p = 0,57$).

4.2 11 invertebraters følsomhed overfor cypermethrin

4.2.1 Baggrund og formål

Formålet var at følge op på et tidligere projekt (RAINTOP, Wiberg-Larsen et al. 2013), der viste flere tusindfold forskel i følsomhed overfor pyrethroidet lambda-cyhalothrin i tests på >30 invertebrat-arter. Disse forsøg var dog, for at fange den varierende følsomhed, blevet udført med meget store spring mellem koncentrations-intervallerne (en faktor 10). Dette siger noget om den relative følsomhed, men giver ikke noget særligt præcist EC_{50} -estimat. En efterfølgende analyse af data (Wiberg-Larsen et al. 2016) viste at en øget følsomhed korrelerede med et stort overfladevolumen forhold af dyret, samt at dyr der foretrak groft substrat var de mest følsomme. Dette kunne indikere, at følsomheden er dikteret af hastigheden, hvormed dyrene optager py-

rethroid i kroppen. Dyr med et højt overfladevolumen forhold vil typisk opnå en hurtigere ligevægt med pyrethroid koncentrationerne i det omgivende miljø, end dyr med et lavt overfladevolumen forhold. I følgende forsøg testede vi derfor følsomheden overfor cypermethrin på et udvalgt sæt af organismerne fra Wiberg et al. (2013) med flere koncentrationer af cypermethrin.

Da vi i forsøgene med *G. pulex* ikke fandt væsentligt ændret giftighed af cypermethrin i tilstedeværelsen af sorbenter i koncentrationer, som kunne være naturligt forekommende i forbindelse med en regnvejrshændelse, blev der i de følgende forsøg kun arbejdet med ren cypermethrin.

4.2.2 Materialer og Metode

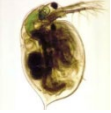
Test-medium og kemikalier

For i højest mulig grad at anvende vand, der ligner dansk vandløbsvand, valgte vi at bruge et standard blød-vands-medie som beskrevet i forrige afsnit. Cypermethrin (CAS; 52315-07-8, 94,3%, Sigma Aldrich, USA) blev opløst og fortyndet i ethanol (CAS; 64-17-5, 96,0%, VWR, USA) til de ønskede koncentrationer, der skulle bruges i forsøgene.

4.2.2.1 Indsamling af organismer

De fire akvatiske invertebrater *Chaetopteryx villosa*, *Nemoura cinerea*, *Asellus aquaticus* og *Radix balthica* blev indsamlet i Lemming Å nord for Silkeborg (56°14'40,3"N 9°31'47,5"E (d°m's)). *Gammarus pulex*, *Ephemera Danica*, *Hydropsyche pellucidula* og *Heptagenia sulphurea* blev indsamlet i Matstrup Å vest for Horsens (55°54'36,9"N 9°36'43,8"E (d°m's)). Alle dyr blev bragt til Aarhus Universitets ferskvandslaboratorium i Silkeborg i å-vand og blev derefter forsigtigt overført til mediet og akklimatiseret i klimakammer ved 15 °C i 24 timer. Forsøgene på organismer indsamlet i Jylland blev udført i laboratorierne i Silkeborg. *Daphnia magna*, *Chironomus riparius* og *Tubificidae* blev taget fra laboratorie-kulturerne på Københavns Universitet, Sektion for Miljøkemi og -fysik. Kulturerne bliver vedligeholdt efter standard guidelines (OECD 2004, 2011), og forsøgene blev udført under samme forhold som i Aarhus Universitets ferskvandslaboratorium i Silkeborg, men i laboratorierne på Københavns Universitet. En oversigt over de forskellige testorganismer samt deres indsamlingssted og forsøgsperiode er givet i Tabel 4.3.

TABEL 4.3: Oversigt over de 11 testorganismer med deres "Raintop critical score", indsamlingslokalitet samt tidspunkt for forsøgsgennemførelse.

Gruppe	Art	"Raintop-critical score"	Indsamlings-sted	Indsamlings / forsøgsperiode
Krebsdyr	<i>Daphnia magna</i>	?	Laboratoriet i København	marts 2016
				
	<i>Gammarus pulex</i>	1	Mattrup Å	marts 2016
	<i>Asellus aquaticus</i>	2	Lemming Å	november 2015
Insektlarver	<i>Chironomus riparius</i>	? or 4	Laboratoriet i København	marts 2016
				
	<i>Chaetopteryx villosa</i>		Lemming Å	marts 2016
	<i>Ephemera danica</i>		Mattrup Å	marts 2016
	<i>Nemoura cinerea</i>		Lemming Å	november 2015
	<i>Heptagenia sulphurea</i>		Mattrup Å	marts 2016
	<i>Hydropsyche pellucidula</i>		Mattrup Å	marts 2016
Orm	<i>Tubifex tubifex</i>	7	Laboratoriet i København	april 2017
				
Snegl	<i>Radix balthica</i>	7	Lemming Å	november 2015



4.2.2.2 Bestemmelse af arters følsomhed

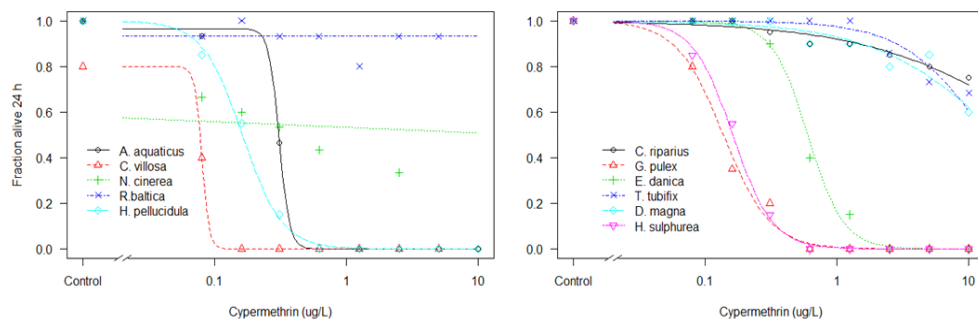
Alle arter blev testet ved 6-9 koncentrationer af cypermethrin (0,00; 0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50, 5,00 and 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) med tre til fire replika per koncentration og fem dyr per replika. Ved starten af hvert eksperiment blev hvert bægerglas med 50 mL medie tilsat 5 μL cypermethrin stamopløsning i ethanol ved hjælp af en glassprøjte. Ved at bruge en glas sprøjte frem for plast pipetter minimerer man sorption af cypermethrin til plast og kan stadig tilsætte stamopløsning meget præcist. Ethanol koncentrationen i alle glas blev på denne måde holdt ens og $\leq 0,01\%$ v/v. Efter tilsætningen blev vandet i hvert bægerglas omrørt forsigtigt med en glas stang og mediet fik lov til at indstille sig i en ligevægt med glasset over 45 minutter før dyrene blev overført til glasset. Organismerne blev eksponeret i 24 timer i mørke ved 15 °C før de blev overført til en metalsi (net størrelse: 300 μm), hvorefter de blev grundigt men forsigtigt skyllet i tre på hinanden følgende bægerglas med rent medie. Dyrene blev derefter overført til nye bægerglas med rent medie. For at undgå kannibalisme blandt *G. pulex* blev disse inkuberet enkeltvis i 6-brønds-plader (type; 92006, TPP, Switzerland) tilsat 10 mL medie per brønd, og de blev givet et præ-inkuberet bøgeblad for føde og skjul, som beskrevet i forrige afsnit. *N. cinerea*, *C. villosa*, *H. sulphurea* og *H. pellucidula* fik en lille sten i hvert bægerglas, som de kunne krybe i skjul af, *E. Danica* og *C. riparius* fik sediment fra Matstrup Å (som var vasket og varmebehandlet) til at gemme sig i, mens *A. aquaticus* og *R. balthica* blev givet et stykke af et præ-inkuberet elleblad. Antallet af mobile og døde organismer blev talt efter 24, 48, 72, 96, 120, 144 og 168 timer.

TABEL 4.4: EC₅₀-værdier for alle testede arter og tidspunkter. Arterne er opstillet efter følsomhed efter 168 timer og deres EC₅₀ værdier varierede fra 0,08 – >10 $\mu\text{g L}^{-1}$. IT (ikke tilgængeligt) er angivet for standardfejlen af EC₅₀-estimerterne, hvor denne ikke kunne beregnes, eller hvor den ikke gav biologisk mening (*R. balthica* og *T. Tubifex*). *Hydropsyche pellicidula* døde efter 96 timer, men da dens EC₅₀ var den samme for alle monitorerede tidspunkter, er dens følsomhed vurderet på baggrund af estimatet efter 96 timer

Art	Estimeret EC ₅₀ (24 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (48 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (72 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (96 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (120 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (144 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estimeret EC ₅₀ (168 t) ± SE ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1 <i>Chaetopteryx villosa</i>	0,08 ± 0,00	0,08 ± IT	0,08 ± IT	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,09	0,08 ± 0,09	0,08 ± 0,09
2 <i>Gammarus pulex</i>	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02
3 <i>Hydropsyche pellucidula</i>	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03	- ± -	- ± -	- ± -
4 <i>Heptagenia sulphurea</i>	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,05
5 <i>Nemura cinerea</i>	0,41 ± 0,24	0,32 ± 0,13	0,34 ± 0,15	0,30 ± 0,11	0,42 ± 0,26	0,37 ± 0,19	0,19 ± 0,06
6 <i>Asellus aquaticus</i>	0,27 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,04
7 <i>Chironomus riparius</i>	>10,0 ± IT	2,84 ± 0,86	1,75 ± 0,61	0,60 ± 0,25	0,37 ± 0,14	0,35 ± 0,12	0,24 ± 0,06
8 <i>Ephemera danica</i>	0,60 ± 0,06	0,64 ± 0,05	0,64 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,47 ± 0,07	0,42 ± 0,06
9 <i>Daphnia magna</i>	>10,0 ± IT	4,68 ± 0,90	3,85 ± 0,91	2,25 ± 0,45	1,89 ± 0,40	1,48 ± 0,28	1,53 ± 0,27
10 <i>Radix balthica</i>	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT
11 <i>Tubificidae</i>	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	9,84 ± 2,93	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT	>10,0 ± IT

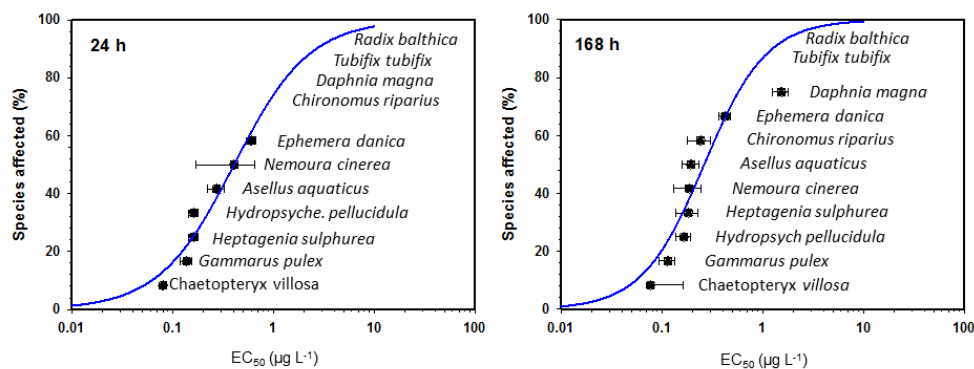
De 11 invertebrat arter udviste, som forventet, en meget forskellig følsomhed overfor cypermethrin med EC₅₀ værdier, der varierede mere end 100-fold fra 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *Chaetopteryx villosa* til modelestimer langt over de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *Radix baltica* og *Tubifex tubifex*, som var den højeste testede pulskoncentration, hvorfor EC₅₀-estimer over 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ er opgivet som: > 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ med et ikke tilgængeligt (IT) estimat for usikkerheden. Ved eksperimenternes afslutning havde syv ud af de 11 arter EC₅₀ værdier under 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, hvilket indikerer meget høj følsomhed (Tabel 4.4, Figur 4.5, Figur 4.6). Det sidste tidspunkt hvor følsomheden kunne bestemmes for *Hydropsyche pellucidula* var efter 96 timer, da dyrene begyndte at dø derefter. Dette skyldes givetvis deres høje krav til rindende vand, som ikke kunne efterkommes i bægerglassene. Der blev også observeret høj mortalitet (53% af kontrollerne) for *Chaetopteryx villosa* efter 168 timer. Men allerede efter 24 timer, hvor kontrolmortaliteten kun var ca. 20% var EC₅₀ værdien nede på 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$. Den høje følsomhed af *C. villosa* var også bekræftet af

Nepomnyashchikh et al. (1988) som rapporterede EC_{50} værdier for methyl parathion, et organofosfat insekticid, overfor rør-bygning på $0,011 \mu\text{g L}^{-1}$. Den meget lave følsomhed observeret for *R. balthica* og *T. tubifex* skyldes sandsynligvis at de enten detoxificerer cypermethrin meget hurtigt eller at deres nervesystem ikke er følsomme overfor en Na-kanal-hæmmer, som cypermethrin.



FIGUR 4.5: Koncentrations-respons kurver for alle arter efter 24 timer. Hvert symbol er gennemsnittet af tre til fire replika med hver 5 organismer. Kurverne er beskrevet med en tre-parameter log-logistisk kurve.

Der er få studier, der har følsomheden af en større gruppe af indsamlede arter overfor pyrethroider, så sammenlignings grundlaget er sparsomt. Wiberg-Larsen et al (2013, 2016) har dog, som tidligere nævnt, testet 34 makroinvertebraters følsomhed overfor lambda-cyhalothrin udsat for en 90 minutters puls eksponering. Af de 34 arter er 8 af arterne overlappende med arterne i dette studie (*G. pulex*, *H. sulphurea*, *N. cinerea*, *A. aquaticus*, *E. danica*, *R. balthica*, *Tubificidae*). Derudover testede de *Chironomus luridus* agg. og *Hydropsyche angustipennis*, som er sammenlignelige med *C. riparius* og *H. pellucidula* i nærværende studie. Deres EC_{50} værdier varierede fra $0,011 \pm 0,011 \mu\text{g L}^{-1}$ for *Chironomus lugubris* til $> 10 \mu\text{g L}^{-1}$ for *H. angustipennis*, *R. balthica* og *Tubificidae*.



FIGUR 4.6: De beregnede EC_{50} -værdier efter 24 and 168 timer plottet som arternes følsomhedsfordeling. Positioner er ikke beregnet for *C. riparius*, *D. magna*, *T. tubifex* og *R. balthica* efter 24 timer og ligeledes ikke for *T. tubifex* og *R. balthica* efter 168 timer, da deres beregnede EC_{50} -værdi lå over den højest testede koncentration af cypermethrin på $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Den høje følsomhed af de testede organismer er tydeligt indikeret ved den beregnede HC_5 (hazard concentration) efter 168 timer, som var på $32,5 \pm 20,4 \text{ ng L}^{-1}$. For *H. pellucidula* er det EC_{50} -værdien efter 96 timer, som er plottet sammen med EC_{50} -værdierne efter 168 timer for de resterende arter.

Wiberg-Larsen et al (2016) finder generelt lavere EC_{50} værdier for lambda-cyhalothrin sammenlignet med cypermethrin i nærværende studie, på trods af at vi inkuberede i 24 timer, mens Wi-

berg-Larsen brugte 90 minutter. Det kunne skyldes at lambda-cyhalothrin er et mere potent aktivstof sammenlignet med cypermethrin. Hvis man ser på de anbefalede markdoser til bekæmpelse af skadedyr i korn og raps, så ligger dosis på ca. 7,5 g aktivstof per hektar, hvorimod den ligger på 13-20 g aktivstof per hektar for produkter med cypermethrin (www.middel-databasen.dk). Det kunne indikere, at lambda-cyhalothrin var mere giftigt på vægt basis. Wiberg-Larsen et al (2016) eksponerede også deres dyr i plast bakker, som pyrethroider sorberer stærkt til (målinger viste en 30% genfindning af tilsatte mængder). Det er derfor muligt, at deres reelle eksponerings-koncentrationer var lavere end de nominelle koncentrationer, som danner basis for EC-bestemmelserne. I vores forsøg eksponerede vi i glas, som sorberer væsentligt mindre. Yderligere blev produceren for fremstilling af de anvendte stok-koncentrationer verificeret til 101-106% af den nominelle koncentration, og alle testede koncentrationer blev spiket med en analytisk glassprøjte efter en procedure, hvor eksponeringskoncentrationen for pyrethroider tidligere er blevet verificeret til 80% af den nominelle (Kretschmann et al. 2015). EC-bestemmelserne i dette studie er derfor baseret på koncentrationer, der ligger nærmere de nominelle koncentrationer. Årsagen til at alle eksponeringskoncentrationerne ikke kan verificeres analytisk, er at detektionsgrænsen for de fleste GC-ECD og GC-MS analyseinstrumenter ligger over den samlede mængde stof, der er i bægerglassene under eksponeringen. Vi må derfor basere vores genfindingsværdier på analyser lavet på de højeste koncentrationer og antage at sorptionen til glas og andre overflader er proportional med den tilsatte mængde. Den sidste årsag til variationerne mellem resultaterne fundet i Wiberg-Larsen et al. (2016) og nærværende studie, kan være størrelsen af de testede organismer. Specielt insektlarvernes størrelse er utrolig afhængig af indsamlingstidspunktet. Da det netop i Wiberg-Larsen et al. (2016) blev vist, at størrelse påvirker organismens følsomhed meget, har forskelle i størrelse af dyr ved indsamling givetvis spillet en stor rolle for deres følsomhed.

4.3 Invertebraters optagelses- og udskillelses-kinetik af ^{14}C cypermethrin

4.3.1 Baggrund og formål

For at teste hypotesen om de observerede forskelle i følsomhed overfor cypermethrin blandt de elleve arter af testorganismer kunne skyldes artsspecifikke forskellige i toksikokinetik (optag og eliminering) blev alle arter eksponeret for ^{14}C -mærket cypermethrin i 24 timer og efterfølgende flyttet til rent medie for eliminering i ligeledes 24 timer. Alle arter blev eksponeret til koncentrationer svarende til den artsspecifikke 24 timers EC_{10} bestemt i fase 2B, og for at opnå en tilstrækkelig biomasse for den efterfølgende prøveoprensning og analytiske kvantificering varierede antallet af organismer fra 5 (de fleste arter) til 20 (5 dage gamle dafnier) per replika med fire replika per prøvetidspunkt. For at sikre at et eventuelt højt optag af cypermethrin ikke påvirkede eksponeringskoncentrationen blev alle replika eksponeret i 100 mL soft water spiket med 10 μL stamopløsning af ^{14}C -mærket cypermethrin i ethanol til den bestemte eksponeringskoncentration ved hjælp af en eVol-XR automatisk glassprøjte (SGE Analytical Science, Australien). Da tidligere toksikokinetiske forsøg med cypermethrin havde vist en relativ hurtig udskille efter endt eksponering (Kretschmann et al. 2015) blev hovedparten af prøverne fokuseret på den tidlige elimineringsfase, hvorfor der blev udtaget fire prøver per art efter følgende tider: 5 og 24 timers optag samt efter 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 og 24 timers eliminering. Kun organismer der havde overlevet de 24 timers eksponering (ca. 90%) blev anvendt og ved hver prøvetidspunkt blev organismene forsigtigt flyttet med til en metalsi og skyllet med ionbyttet vand to gange inden de blev overflyttet til 2 mL eppendorf rør og lynfrosset i flydende kvælstof, inden de blev opbevaret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for senere QuEChERS-oprensning og kvantificering ved LC-RD.

4.3.2 Materialer og Metode

4.3.2.1 Prøveforberedelse (QuEChERS)

De frosne organismer blev forsigtigt overført til hulbundede fast-prep-rør indeholdende 0,5 mm rustfri stål kugler (300-500 mg afhængigt af organismernes størrelse og vandindhold). 750 µL acetonitril blev tilført og de største af organismerne blev indledningsvist manuelt homogeniseret i fast-prep-rørene med en vævsknuser, inden alle organismerne blev yderligere homogeniseret ved hjælp af en FastPrep® (FP120 Bio101, Savant Instruments Inc, USA) i 2 x 20 sekunder med iskøling før, imellem og efter homogeniseringen. Efterfølgende blev ekstraktet overført til et 4 mL brunt glas og fast prep-røret skyllet med yderligere 500 µL acetonitril for et totalvolumen på 1250 µL. For at udsalte eventuelt polære forbindelser i ekstraktet samt for at fjerne eventuelt overført vand blev ekstraktet tilsat 1250 µL af en NaCl/MgSO₄ anhydrid opløsning (7,14 / 28,6 g per 100 mL Milli-Q H₂O). Glassene blev herefter rystet grundigt i 2 x 1 minut før faserne blev adskilt ved centrifugering i 5 minutter ved 1860 g og 5 °C. Den øverste organiske fase (1 mL) blev efterfølgende afpipetteret til QuEChERS d-SPE rør (roQTM QuEChERS, Phenomenex, USA) indeholdende 150 mg MgSO₄, 50 mg primær og sekundære aminer og 50 mg endelukket C18 for fjernelse af eventuelt vand, organiske syrer, sukker og pigmenter samt fedtsyrer og andre apolære komponenter. SPE rørene blev rystet grundigt i 2x1 minut og efterfølgende centrifugeret ved 1860 g og 5 °C i fem minutter, før 310 µL af supernatanten blev overført til et LC glas med en 350 µL. For at opkoncentrere prøverne og for at få lave et solventsift til 20% acetonitril i vand blev prøverne forsigtigt inddampet til næsten tørhed under en let strøm af N₂, før prøven blev genopløst i først 30 µL acetonitril og efterfølgende 120 µL Milli-Q H₂O.

4.3.2.2 Metodeudvikling for HPLC med Radio detektor (LC-RD)

For kvantificering af ¹⁴C-mærkede pesticider (propiconazole, prochloraz, cypermethrin, lambda-cyhalothrin og bifenthrin) blev en væskekromatografi-radiometrisk (LC-RD) metode udviklet på en Alliance 2695 væskekromatograf (Waters, USA) koblet til en G1314A UV-detektor (Hewlett Packard, USA) fulgt af en β-RAM Model 5 radiodetektor (LabLogic, England). For separation blev anvendt en Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm kolonne med en partikelstørrelse på 3,5 µm med 2 mM ammonium format og acetonitril som solvent A og B, respektivt. Da online radiometrisk kvantificering sker ved hjælp af en flowcelle, blev metoden udviklet og optimeret i forhold til to celledimensioner (200 og 500 µL) med henblik på at opnå størst mulig resolution mellem toppene samt lavest mulige detektionsgrænse.

Følgende LC-gradient med en flowhastighed på 0,6 mL min⁻¹ dannede baggrund for optimering af radiodetektoren, start: 63% A i 15 minutter, 25% A efter 18 minutter og holdt i syv minutter, 5% A efter 29 minutter inden konditionering af kolonnen med 63% A efter 31 og holdt i tre minutter. Først blev effekten af pH i solvent A (ammonium format) testet og optimeret før respons-lineariteten blev testet ved forskellige injektionsvolumener og endeligt blev tælle tiden (s) og opholdstiden i flowcellen (s) optimeret. Effekten af alle optimeringstrin blev testet og evalueret baseret på injektioner i triplicat og alle radiokromatogrammer blev evalueret uden nogen form for "smoothing".

Detektionsgrænsen (LOD) og nedre grænse for kvantifikation (LOQ) blev beregnet ud fra Ligning 4.1 og 4.2 tilnærmelsesvis efter ICH guidelines (ICH 2005), hvor σ var standardafvigelsen af toparealet for hvert pesticid efter fire injektioner ved en koncentration på 10 µg L⁻¹, en koncentration tæt på LOD, mens S er hældningen på standardkurven:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S} \quad (4.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad (4.2)$$

4.3.3 Resultater og Diskussion

4.3.3.1 Bestemmelse af pyrethroider med LC-RD metode

En tilfredsstillende separation blev opnået mellem fungiciderne og bifenthrin, hvorimod lambda-cyhalothrin og cypermethrin ikke kunne separeres ved pågældende LC-metode (de var dog separeret fra de øvrige pesticider). Alle tre insekticider var relativt pH-inaktive, hvorfor solvent pH udelukkende blev optimeret i forhold til retentionstiden og formen af toppene for propiconazol og prochloraz. Da den anvendte kolonne havde et pH-optimum på 3-9 blev pH 8,3 anvendt i den endelige metode for at sikre protonering af aminerne i de to fungicider uden at øge risikoen for kolonneblødning (Figur 4.7a).

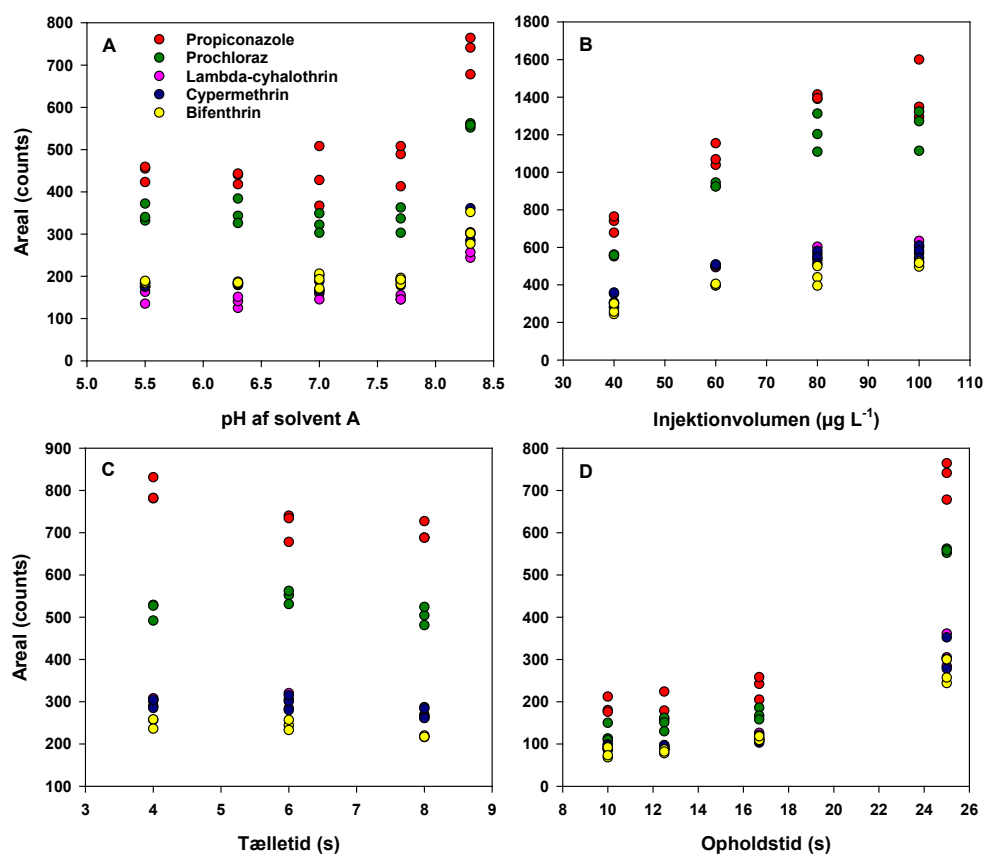
Hovedformålet med at teste effekten af forskellige injektionsvolumener var for at øge følsomheden overfor specielt cypermethrin med henblik på optags- og elimineringsforsøgene for de 11 test organismer. Fire forskellige injektionsvolumener blev testet (40, 60, 80 og 100 µL) og en klar afbøjning i respons blev observeret for 80 og specielt 100 µL for alle analyter, dog mindre for propiconazol end de resterende (Figur 4.7b). Dette skyldes højst sandsynligt en ufuldstændig blanding mellem eluenten for kolonnen og den tilførte scintillationsvæske, hvilket har medført en "quenching"-effekt og dermed et lavere signal end forventet. Til trods for dette blev 100 µL valgt som injektionsvolumen for den endelige metode, grundet den forøgede respons (88-120% for alle analyter sammenlignet med 40 µL injektioner).

En væsentlig forbedring af S:N forholdet og toparealet blev opnået ved optimering af tælltiden (dwell time), som blev testet i intervallerne 4, 6 og 8 s for stadig at sikre et passende antal datapunkter under hver top. Effekten af tælltiden på selve signalintensiteten og arealet under hver top varierede blandt analyterne, blandet andet grundet den lave resolution mellem propiconazole og prochloraz, hvilket med den øgede tælltid resulterede i et tidsinterval med en ko-eluering af begge stoffer, som vanskeliggjorde præcisionen af den efterfølgende integration af toppene. For at gå på kompromis med dette og for at opnå den mindst mulige responsvariation blev en tælltid på 6 sekunder valgt til den endelige metode (Figur 4.7c).

Med den anvendte online-tællemetode, hvor stop-flow-tælling ikke var muligt kunne opholdstiden i detektoren kun reguleres ved at justere flowhastigheden af scintillationsvæske, som mikses med LC kromatografi-eluenten umiddelbart før detektoren. Fire forskellige flowhastigheder af scintillationsvæsken blev testet svarende til en opholdstid i detektoren på 10; 12,5; 16,7 og 25 sekunder (Figur 4.7d).

Kortere opholdstid i flowcellen medfører smallere toppe og dermed ofte en forbedret resolution, men vil som regel også medføre en tilsvarende reduktion af følsomheden (Cuyckens et al. 2008), hvilket vores resultater tydeligt understøttede. For alle analyter var toparealet mere end 3 gange større ved en opholdstid i detektorcellen på 25 s sammenlignet med en opholdstid på 10 s. Til trods for en lille forøgelse topbredden for specielt propiconazole og prochloraz blev et scintillationsvæske flow på 0,6 mL min⁻¹ valgt til den endelige metode, svarende til en opholdstid i flowcellen på 25 s for at minimere detektionsgrænsen.

Baseret på den optimerede metode og ligningerne 4.1 og 4.2 blev detektionsgrænsen for hver af de fem pesticider bestemt til henholdsvis 3,0; 1,15; 1,65; 1,67 og 2,69 µg L⁻¹ for hhv. propiconazole, prochloraz, lambda-cyhalothrin, cypermethrin og bifenthrin, mens de tilsvarende grænser for kvantificering blev beregnet til hhv. 9,05; 3,48; 5,01; 5,06; 8,15 µg L⁻¹.



FIGUR 4.7. Resultater af LC-RD metodeudvikling for de to fungicider og tre insekticider, hvor A) effekten af solvent pH, B) injektionsvolumen, C) tælle tid, og D) og opholdstiden blev optimeret i forhold til at minimere LOD og LOQ

4.3.3.2 Optags- og elimineringskinetik af cypermethrin

Til trods for at 100 µL af de forberedte prøver blev injiceret og analyseret ved den ovenfor beskrevne metode var det ikke muligt at måle cypermethrin eller tilhørende metabolitter i nogle af de elleve forsøgsorganismer, selv ved prøverne taget efter 24 timers optag, hvor den interne koncentration måtte forventes at være højest. Dette skyldes mest sandsynligt at eksponeringskoncentrationerne svarende til de individuelle organismeres 24 timers EC_{10} var for lave. For nogle af testorganisme så som *N. cererea*, var det ikke overraskende, at interne cypermethrin koncentrationer ikke kunne måles, da *N. cererea* kun blev eksponeret for 0,18 ng L⁻¹, og samtidigt er en relativt lille organisme, hvorfor biokoncentreringen antages for at være mindre end i større og mere fedtholdige organismer som *H. pellucidula* eller *C. villosa*. Omvendt var det lidt overraskende at det ikke lykkedes at måle cypermethrin i nogle af de mindre følsomme testorganismer som *C. riparius*, *D. magna*, *T. tubifex* og *R. balthica*. Specielt for de sidste to arter, som blev eksponeret for relativt høje cypermethrin koncentrationer under optagsfasen (2,8 og 3,2 µg L⁻¹) var det forventet at interne koncentrationer kunne måles. Mulige forklaringer kan være at optaget af cypermethrin i *T. tubifex* og *R. balthica* var lavere end forventet, da det antages at cypermethrin ikke kan optages gennem skallen på *R. balthica*, eller at organismerne har udgjort en meget vanskelig matrix, hvilket ville have vanskeliggjort ekstraktionen af cypermethrin under prøveoprensningen. Til trods for den lave detektionsgrænse ved den anvendte metode, er det muligt at man med forbedrede teknikker kunne måle de interne cypermethrin koncentrationer. Enten ved hjælp af et såkaldt variabelt scintillationsflow, hvor man nedsætter flowhastigheden gennem detektorcellen eller helt stopper den, når en top registreres, og dermed øger tælle tiden (Nassar et al. 2003; Cuyckens et al. 2008). En endnu mere følsom metode er baseret på offline tælling, hvor LC kromatografi-eluenten opsamles i prædefinerede fraktioner fx i en 96 brønds mikrotiterplade, hvilket tillader markant længere tælle tid på fx 10 minutter og en tilsvarende lavere detektions- og kvantifikationsgrænse (Krauser et al. 2012).

5. Risikovurdering af sorberede pyrethroider

5.1 Risikovurdering

Formålet med nærværende projekt var at vurdere i hvor høj grad partikler eller andre sorbenter i kunne fungere som vektorer for lipofile, stærkt sorberende pesticider overfor vandlevende makroinvertebrater. Sorptionsstudierne viste en stærk sorption til de meget små (fine) partikler af montmorillonit ler uden organisk stof, og en noget mindre men stadig stærk sorption når der var coating af organisk stof på lerminerallerne. De lidt større (grove) partikler af montmorillonit og goethit viste en svagere sorption af cypermethrin. Kombineret med de lave koncentrationer af suspenderede sorbenter vi finder i vandløb, der typisk ligger i intervallet 1-10 mg sorbent L⁻¹ (Kronvang et al., 2003), vil selv den stærkest bindende sorbent (fint montmorillonit) kun sorbere 6-38% af den samlede mængde cypermethrin, mens resten vil findes på opløst form i vandet. Ved en kraftig regnvejrshændelse kan mængden af suspenderet materiale komme op på 300 mg L⁻¹, selvom den sjældent overstiger 100 mg L⁻¹. I sådanne tilfælde vil 85-95% af cypermethrinen være bundet til de suspenderede partikler, hvis hele suspensionen består af fine montmorillonit partikler. Det gør den næppe, og det skal ydermere kombineres med anvendelses sæsonen for pyrethroider for at koncentrationen af pyrethroider kommer op i de niveauer vi har undersøgt her. I forsøgene med ufiltreret vand fra Suså med en samlet koncentration af partikler og opløst organisk materiale på ca. 35 mg L⁻¹ (og en temmelig uklar farve) kunne der ikke måles sorption over LOD for K_d som ligger på ca. 12000 L kg⁻¹ (Tabel 3.2). Dette betyder, at den sorberede fraktion af cypermethrin ville være <30%, selv hvis vi bruger den højeste LOD for K_d på 12000 L kg⁻¹. Studierne viser derfor, at størstedelen af cypermethrin i vandfasen vil være på opløst form ved naturligt forekommende mængder af suspenderet materiale i danske vandløb. Da vi heller ikke kunne observere en øget giftighed af cypermethrin doseret sammen med den stærke sorbent (Figur 4.2), konkluderer vi, at en risikovurdering af cypermethrin overfor vandlevende makroinvertebrater kan baseres på opløste pyrethroid koncentrationer. Dette gælder sandsynligvis også andre pyrethroider, fordi de har meget sammenlignelig sorption.

I testen af en 24 timers puls eksponering med cypermethrin på 11 arter af makroinvertebrater så vi at følsomheden målt som EC₅₀ efter 168 timer varierede fra 0,08-1,53 µg L⁻¹ for de 9 testede artropoder (Tabel 4.4). Standard test organismen *D. magna* var den mindst følsomme af arthropoderne og ca. 20-fold mindre følsom end den mest følsomme art *Chaetopteryx villosa*. Hvis man laver en arts-følsomheds fordeling (Species Sensitivity Distribution: SSD) for arthropoderne og inkluderer de to ikke-arthropoder (en snegl og en orm, som ikke var synligt påvirkede af test-koncentrationer op til 10 µg L⁻¹) i rangordningen, finder man en 5% Hazard Concentration (HC₅) på 32,5 ±20,4 ng L⁻¹ (Figur 4.6). Hvis man antager at de testede arter repræsenterer makroinvertebrat-samfundet i et vandløb, betyder det, at ved koncentrationer på under ca. 30 ng L⁻¹ vil mere end 95% af arterne opleve effekter, der er mindre end 50% dødelighed. Da vi ønsker at beskytte makroinvertebrater også overfor sublethale effekter, anbefales det i EFSA's "Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters" (EFSA, 2013) at bruge en sikkerhedsfaktor på 3-6 i forhold til den gennemsnitlige HC₅-værdi (eller alternativt den nedre 95% konfidensgrænse). Det anbefales også at bruge et gennemsnit for eksponerings-koncentrationerne, frem for de nominelle koncentrationer, som vi har anvendt i beregningen af EC₅₀-værdierne i dette studie. Da de fleste eksponerings-koncentrationer er for lave til at kunne måles med f.eks. GC-ECD eller GC-MS, har vi estimeret den gennemsnitlige koncentration over de 24 timer på baggrund af en DT₅₀ på 6 timer til at være ca. 40% af den nominelle start koncentration. Hvis de reelle gennemsnitlige cypermethrin koncentrationer er 40% af de nominelle, sænker det HC₅ til ca. 13 ng L⁻¹. Hvis vi yderligere dividerer med en sikkerhedsfaktor på 3 eller 6 ender vi med en

grænseværdi, der kan beskytte makroinvertebrat-samfundet på 4.3 ng L^{-1} . Så lave koncentrationer af pyrethroider er det meget svært at måle da detektionsgrænsen typisk ligger på $10\text{-}100 \text{ ng L}^{-1}$ med GC-ECD eller GC-MS. Vi står derfor i en situation, hvor giftigheden af en gruppe pesticider i vandmiljøet ligger under det vi nemt kan monitorere. For at analysere så lave koncentrationer kræver det store prøvemængder og en opkoncentrering minimum $10\text{-}100$ gange og en effektiv konservering af prøven før bestemmelse med kromatografiske analysemetoder. I forhold til risikovurdering af de lipofile pyrethroider konkluderer vi derfor, at tilstedeværelsen af suspenderet materiale i vandfasen næppe øger giftigheden overfor vandlevende organismer ved realistiske koncentrationer og naturlige sammensætninger af suspenderet materiale. Situationen kan være en anden for sediment levende organismer, der vil opleve meget højere koncentrationer pga. den høje densitet af partikler i sedimentet i forhold til i vandfasen. Til gengæld er den høje toksicitet af pyrethroider i sig selv et problem, da vi ikke kender niveauet og frekvensen af eventuelle overskridelser af grænseværdierne i danske ferskvands økosystemer.

6. Konklusion

Størrelsen af suspenderede montmorillonit og goethit partikler blev karakteriseret med flere teknikker for at tage højde for den store spredning i partikelstørrelse i suspensionerne. Overfladearealet blev beregnet og bidraget fra fine og grove partikler til det samlede overfladeareal af partikler i suspensioner. Silikat lerminerale er skiveformede og ved antagelse af sfærisk form fås en stor fejl i beregning af overfladeareal og dermed fejl ved beregning af adsorberet mængde pyrethroid som funktion af partikel masse for forskellige partikel størrelser. En kombination af metoder blev anvendt til karakterisering af tykkelse og diameter af de suspenderede partikler, og derved bestemmelse af det præcise overfladeareal tilgængeligt for adsorption i suspensionerne. Tilstedeværelse af opløst organisk stof (DOM) isoleret fra Suså havde en stor effekt på overfladearealet af goethit, fordi suspensionen blev stabiliseret ved at DOM reducere den ellers hurtige flokkulering til større aggregater. Tilsætning af DOM havde en ingen effekt på størrelsesfordelingen af fint montmorillonit ler, men en lille reduktion af overflade arealet blev målt for groft montmorillonit ved tilstedeværelse af DOM. Suspensioner af montmorillonit var domineret af meget små skiveformede lerpartikler, og de små partikler bidrager med størstedelen af det totale overfladeareal. Den lille forandring i ionstyrke ved anvendelse af soft water (påkrævet som medium i de økotoxikologiske forsøg) gav ikke en signifikant ændring af overfladearealet for montmorillonit og goethit partikler i suspensionerne.

Adsorption af cypermethrin til suspensioner af montmorillonit og goethit blev undersøgt med en nyudviklet passiv doseringsmetode. Resultaterne viste at adsorberet eller bundet ^{14}C -mærket cypermethrin kan måles direkte ved scintillationstælling af suspensioner uden tegn på partikelskygning. Derved undgås det vanskelige eller umulige ekstraktionstrin for at adskille de meget fine partikler i suspensionen fra frit opløst cypermethrin i væskefasen, og den store fejlkilde er elimineret. Den adsorberede mængde bestemmes som differencen mellem total mængde ^{14}C -mærket cypermethrin for en prøve med pyrethroid og suspension fratrasket en tilsvarende prøve med pyrethroid uden suspension. Fin montmorillonit adsorberer mere cypermethrin end groft montmorillonit med fordelingskonstanter i intervallet 48100 til 62600 L kg⁻¹. Tilsætning af naturligt DOM fra 4 danske vandløb havde meget ringe påvirkning af sorption til mineralerne, og til den fine montmorillonit faldt sorptionen af cypermethrin med en faktor 2,3 til 3,4. Sorptionen af cypermethrin til Aldrich humussyre ses både til opløst og partikulært materiale, men sorptionen var højest for det partikulære materiale. Der blev ikke observeret sorption af cypermethrin over metodens detektionsgrænse til fin goethit med Suså DOM, grov goethit, Suså DOM alene og heller ikke til ufiltreret vand fra Suså.

Suspensioner af montmorillonit og goethit ved naturligt forekommende koncentrationer af partikler for danske vandløb (dvs. ca. 5-10 mg L⁻¹) kan adsorbere lipofile insekticider som f.eks. pyrethroider. Dermed reduceres koncentrationen af frit opløst pyrethroid i vandfasen, og samtidig kan partikler optræde som transportør med forhøjet koncentration af pyrethroid adsorberet til partikeloverfladen. Den adsorberede mængde afhænger af partiklens mineralogi og om der er en belægning af organisk stof på partikeloverfladen. Fint montmorillonit uden belægning af naturligt DOM viste den højeste sorption i projektets eksperimenter. Resultaterne viser at pyrethroid bindes stærkt til de undersøgte suspensioner, men mængden af suspenderet materiale i danske vandløb er for lav til at have nogen nævneværdig betydning for koncentrationen af cypermethrin opløst i vandfasen som makroinvertebraterne eksponeres for. Toksiciteten af pyrethroider bestemt i forsøg med nominelle koncentrationer af pyrethroid kan derfor give et retvisende estimat for eksponeringen i vandløb med lav mængde suspenderet materiale.

7. Referencer

- Albaseer, S.S., Nageswara, R., Swamy, Y.V., Mukkanti, K. (2011). Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids. *Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 1771-1780.
- Akerblom, N., Goedkoop, W., Nilsson, T., Kylin, H. (2010). Particle-specific sorption/desorption properties determine test compound fate and bioavailability in toxicity tests with *Chironomus riparius*-high-resolution studies with lindane. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**, 1520-1528.
- Ali, M.A., Baugh, P.J. (2003). Sorption-desorption studies of six pyrethroids and mirex on soils using GC/MS-NICI. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **83**, 923-933.
- Aruoja, V., Dubourguier, H., Kasemets, K., Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, **407**, 1461-1468.
- ATSDR 2003. *Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA.
- Birch, H., Gouliarmou, V., Lutzhoft, H.C.H., Mikkelsen, P.S., Mayer, P. (2010). Passive dosing to determine the speciation of hydrophobic organic chemicals in aqueous samples. *Analytical Chemistry*, **82**, 1142-1146.
- Bossi, R., Sortkjær, O., Juhler, R.K., (2009). Screening for udvalgte pesticider i vandløb og grundvand. *Arbejdsrapport fra DMU*, nr. 252.
- Cao, T., Fasulo, P.D., Rodgers, W.R. (2010). Investigation of the shear stress effect on montmorillonite platelet aspect ratio by atomic force microscopy. *Applied Clay Science*, **49**, 21-28.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U. (2003). *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Wiley.
- Cuyckens, F., Koppen, V., Kembuegler, R., Leclercq, L. (2008). Improved liquid chromatography-online radioactivity detection for metabolite profiling. *Journal of Chromatography A*, **1209**, 128-135.
- Dalhoff, K., Gottardi, M., Kretschmann, A., Cedergreen, N. (2016). What causes the difference in synergistic potentials of propiconazole and prochloraz toward pyrethroids in *Daphnia magna*? *Aquatic Toxicology*, **172**, 95-102.
- Dhondt, J.K.G. (1996). *An introduction to dynamic of colloids*. Elsevier, New York.
- Dideriksen, K., Stipp, S.L.S. (2003). The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: a molecular-scale atomic force microscopy study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**, 3313-3327.
- Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G., Wilkinson, K.J. (2009). Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science and Technology*, **43**, 7277-7284.
- EFSA (2013). Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal*, **11**, 3290.
- Elimelech, M., Gregor, J., Jia, X. (1995). *Particle Deposition and Aggregation: Measurement, Modeling, and Simulation*. Elsevier.
- Finsy, R. (1994). Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Advances in Colloid and Interface Science*, **52**, 79-143.
- Fojut, T.L., Young, T.M. (2011). Pyrethroid sorption to Sacramento River suspended solids and bed sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**, 787-792.

- Gallego-Urrea, J., Hammes, J., Cornelis, G., Hassellöv, M. (2014). Multimethod 3D characterization of natural plate-like nanoparticles: shape effects on equivalent size measurements. *Journal of Nanoparticle Research*, **16**, 1-17.
- Harwood, A.D., You, J., Lydy, M.J. (2009). Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: Toxicokinetic confirmation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**, 1051-1058.
- Hund-Rinke, K., Simon, M. (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research*, **13**, 225-232.
- Hunter, W., Yang, Y., Reichenberg, F., Mayer, P., Gan, J. (2009). Measuring pyrethroids in sediment pore water using matrix-solid phase microextraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**, 2467-2468.
- ICH (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Conference paper from international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. International Council for Harmonisation, London.
- Jennings, B.R., Parslow, K. (1988). Particle Size Measurement: The Equivalent Spherical Diameter. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, **419**, 137-149.
- Kosmulski, M., Maczka, E., Jartych, E., Rosenholm, J.B. (2003). Synthesis and characterization of goethite and goethite-hematite composite: experimental study and literature survey. *Advances in Colloid and Interface Science*, **103**, 57-76.
- Krauser, J., Walles, M., Wolf, T., Graf, D., Swart, P. (2012). A unique automation platform for measuring low level radioactivity in metabolite identification studies. *PLoS One*, **7**, 10.
- Kretschmann, A., Gottardi, M., Dalhoff, K., Cedergreen, N. (2015). The synergistic potential of the azole fungicides prochloraz and propiconazole toward a short α -cypermethrin pulse increases over time in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **162**, 94-101.
- Kretschmann, A., Cedergreen, N., Christensen, J.H. (2015). Measuring Internal Azole and Pyrethroid Pesticide Concentrations in *D. magna* Using QuEChERS and GC-ECD – Method Development With a Focus on Matrix Effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **408**, 1055-1066.
- Kronvang, B., Iversen, H.L., Vejrup, K., Mogensen, B.B., Hansen, A., Hansen, L.B. (2003). *Pesticides in streams and subsurface drainage water within two arable catchments in Denmark: Pesticide application, concentration, transport and fate*. Miljøstyrelsens Bekæmpelsesmiddelforskning rapport nr 69.
- Lee, S., Gan, J., Liu, W.P., Anderson, M.A. (2003). Evaluation of K_d underestimation using solid phase microextraction. *Environmental Science and Technology*, **37**, 5597–5602.
- Liu, W., Gan, J., Lee, S., Kabashima, J.N. (2004). Phase distribution of synthetic pyrethroids in runoff and stream water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 7–11.
- Lundqvist, A., Bertilsson, S., Goedkoop, W. (2012). Interactions with DOM and biofilms affect the fate and bioavailability of insecticides to invertebrate grazers. *Ecotoxicology*, **21**, 2398-2408.
- Malvern (2016). *Malvern Dynamic Light Scattering: Common Terms Defined*. www.malvern.com
- Mezin, L.C., Hale, R.C. (2004). Effect of humic acids on toxicity of DDT and chlorpyrifos to freshwater and estuarine invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 583-590.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, **330**, 377-445.
- Nassar, A.E.F., Bjorge, S.M., Lee, D.Y. (2003). On-line liquid chromatography-accurate radioisotope counting coupled with a radioactivity detector and mass spectrometer for

- metabolite identification in drug discovery and development. *Analytical Chemistry*, **75**, 785-790.
- Nepomnyashchikh, V.A., Flerov, B.A., Khenri, M.G. (1988). Effect of methyl parathion on the building behavior of caddis-fly *Chaetopteryx-villosa* f. Larvae. *Biologicheskies Nauki Report* (Moscow), **9**, 70-73.
- OECD (2004). *OECD Guideline for Testing of Chemicals, 2004*. Daphnia sp., Acute Immobilization Test. No. 202. Paris
- OECD. 2011. *OECD guideline for testing of chemicals, 2011*. Chironomus sp., acute immobilization test. No. 235 Paris. Available online: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-235-chironomus-sp-acute-immobilisation-test_9789264122383-en.
- Oudou, H.C., Hansen, H.C.B. (2002). Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere*, **49**, 1285-1294
- Ploehn, H.J., Liu, C. (2006). Quantitative Analysis of Montmorillonite Platelet Size by Atomic Force Microscopy. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **45**, 7025-7034.
- Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., McKnight, U.S., Kreuger, J., Jacobsen, D., Kristensen, E.A., Friberg, N. (2015). The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. *Water Research*, **84**, 25-32.
- Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Kristensen, E.A., Cedergreen, N., Friberg, N. (2013). Pyrethroid effects on freshwater invertebrates: A meta-analysis of pulse exposures. *Environmental Pollution*, **182**, 479-485.
- Rasmussen, J.J., Strobel, B.W., Kronvang, B., Nørum, U., Hansen, H.C.B. (2014). Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand. Miljøstyrelsens Bekæmpelsesmiddelforskning rapport nr 155. 122 pp.
- Sharma, V., Park, K., Srinivasarao, M. (2009). Shape separation of gold nanorods using centrifugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 4981-4985.
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C. (2011). Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*, **83**, 538-544.
- Sutcliffe, D.W. (1993). Reproduction in gammarus (crustacea, amphipoda): Female strategies. *Freshwater Forum*, **3**, 26-64.
- TBCPC (2014). *The e-Pesticide Manual*. The British Crop Protection Council (TBCPC).
- van den Brink, P.J., Van Smeden, J.M., Bekele, R.S., Dierick, W., De Gelder, D.M., Noteboom, M., Roessink, I. (2016). Acute and chronic toxicity of neonicotinoids to nymphs of a mayfly species and some notes on seasonal differences. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **35**, 128-133.
- van der Hulst, H.C. (1981). *Light scattering by small particles*. Dover publications, New York.
- Weston, D.P., You, J., Harwood, A.D., Lydy, M.J. (2009). Whole sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: Iii. Temperature manipulation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**, 173-180.
- Wiberg-Larsen, P., Graeber, D., Kristensen, E.A., Baattrup-Pedersen, A., Friberg, N., Rasmussen, J.J. (2016). Trait characteristics determine pyrethroid sensitivity in nonstandard test species of freshwater macroinvertebrates: A reality check. *Environmental Science and Technology*, **50**, 4971-4978.
- Wiberg-Larsen, P., Kristensen, E.A., Friberg, N., Rasmussen, J.J., Bjerregaard, P. (2013). *Rangordning af vandløbssmådyrs tolerance over for miljørealistiske koncentrationer af pyrethroider*. Miljøstyrelsens Bekæmpelsesmiddelforskning rapport nr 151. 71 pp.
- Wiberg-Larsen, P. (2016). Personlig kommunikation.
- Zhou, J.L., Rowland, S.J., Mantoura, R.F.C., Lane, M.C.G. (1997). Desorption of tefluthrin insecticide from soil in simulated rainfall runoff systems: Kinetic studies and modeling. *Water Research*, **31**, 75-84.
- Zhu, H., Selim, H.M. (2002). Retention and mobility of deltamethrin in soils: 1. Adsorption desorption. *Soil Science*, **167**, 513-523.

Makroinvertebraters følsomhed overfor pyrethroider i ferskvand med naturlige koncentrationer af partikler og organisk materiale - ToxPath

Fine partikler er en del af almindeligt rent vandløbsvand, hvor vandets strømning og turbulens holder partiklerne hvirvlet op i vandet som en suspension. Partiklerne består af organisk materiale eller fine korn af mineralsk materiale, og mange af partiklerne har en kerne af lermineral eller jernoxid med en belægning af organisk materiale udenpå. Hydrofobe pesticider bindes til disse partikeloverflader, og fordi de fine partikler er suspenderet transporteres de med strømmen og bringer det bundne pesticid med sig. Den kemiske sammensætning af partiklernes overflade og det specifikke overfladeareal er afgørende for, hvor meget pesticid der bindes, og i dette projekt er undersøgt betydningen af naturligt forekommende koncentrationer af fine suspenderede partikler på giftigheden af de meget hydrofobe pyrethroider over for vandløbsdyr.

Med naturligt organisk stof isoleret fra Susåen, og lermineralet montmorillonit og jernoxidet goethit fremstilles suspensioner til undersøgelse af bindingsstyrke og mængde bundet pyrethroid til rene mineral partikler og partikler med belægning af naturligt organisk materiale. Tilstedeværelse af opløst organisk stof fra Susåen øgede overflade-areal på goethit ved at begrænse flokkuleringen til større aggregater. Opløst organisk stof havde ingen effekt på suspensionen med fin montmorillonit, og meget lille effekt på grov montmorillonit suspensionernes samlede partikel-overfladeareal.

Økotoxikologisk virkning af partikelbundne pyrethroider blev undersøgt med *Gammarus pulex* for 5 og 25 mg L⁻¹ suspenderede goethit- og montmorillonit-partikler med og uden belægning af naturligt organisk materiale. Undersøgelserne viser, at suspenderede partikler ikke giver en mærkbar forskel i den opløste koncentration af pyrethroid, og dermed ikke nogen mærkbar effekt på giftigheden over for *G. pulex* i de undersøgte naturlige koncentrationer af partikler, organisk stof og pyrethroid i kunstigt ferskvand i laboratorieforsøg.



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk