



## Risikobewertung von Pestizidmischungen - von standardisierten Einzelartentests zu Modell-Ökosystemen

Simone Hasenbein<sup>1,2</sup> ([shasenbein@ucdavis.edu](mailto:shasenbein@ucdavis.edu)), Sharon P. Lawler<sup>3</sup> ([splawler@ucdavis.edu](mailto:splawler@ucdavis.edu)),  
Jürgen Geist<sup>2</sup> ([geist@wzw.tum.de](mailto:geist@wzw.tum.de)), Richard E. Connon<sup>1</sup> ([reconnon@ucdavis.edu](mailto:reconnon@ucdavis.edu))

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA.

<sup>2</sup>Aquatic Systems Biology Unit, Technische Universität München, Mühlenweg 22, D-85354 Freising, Germany.

<sup>3</sup>Department of Entomology and Nematology, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

### Zusammenfassung

Schadstoffe und ihre Mischungen stellen eine der größten Gefährdungen für aquatische Ökosysteme dar. In der Risikobewertung von Pestiziden werden meist Daten verwendet, die lediglich auf Einzelartentoxizitätstests beruhen, mit Konzentrationen, die nicht umweltrelevant sind, und keine subletalen Effekte berücksichtigen. In dieser Studie wurde die Eignung von standardisierten artspezifischen Toxizitätstests und Freiland-Mesokosmen zur Bewertung der Effekte von Pestizidmischungen auf aquatische Ökosysteme untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kombination beider Ansätze für eine ökotoxikologische Risikobewertung am besten geeignet ist. Durch die Einbeziehung sublethaler Endpunkte kann darüber hinaus die Identifizierung niedriger Pestizidkonzentrationen, selbst unter dem Detektionslimit von Standardmethoden, mit Auswirkung auf Gewässerökosysteme verbessert werden.

### Einleitung

Schadstoffe stellen eine der größten Gefährdungen für die weltweite Biodiversität dar [1-3], wobei besonders aquatische Ökosysteme als Senken fungieren und Chemikalien verschiedensten Ursprungs ausgesetzt sind [4]. Es ist bekannt, dass Pestizidmischungen aquatische Lebensgemeinschaften negativ beeinflussen können [5, 6]; dennoch beruhen Daten für die Risikobewertung von Pestiziden meist nur auf Einzelartentoxizitätstests, die oft nur mit einer einzelnen Substanz und in Konzentrationen, die nicht umweltrelevant sind, durchgeführt werden. Aufgrund zunehmender Verwendung von Insektiziden und den damit verbundenen schädlichen Auswirkungen auf Nichtzielarten in aquatischen Ökosystemen und Nahrungsnetzen, stellt das Verständnis von komplexen Pestizidmischungen eine der aktuell größten Herausforderungen in der Ökotoxikologie dar. Um die Auswirkungen von Pestizidmischungen, insbesondere in Konzentrationen, die unter dem Detektionslimit von Standardmethoden liegen, besser zu verstehen, wurden in dieser Studie die Vor- und Nachteile von Einzelartentoxizitätstests im Labor im Vergleich zu Mehrarten-Mesokosmentests im Freiland untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Verwendung von sublethalen Endpunkten gelegt, welche die Detektion niedriger Pestizidkonzentrationen und hiervon ausgehender Auswirkungen auf Gewässerökosysteme erleichtern könnten.

### Material und Methoden

Um die Vor- und Nachteile von laborbasierten Einzelartentoxizitätstests zu untersuchen, wurden zunächst die individuellen Effekte von zwei Pyrethroiden (Lambda-Cyhalothrin und Permethrin) und einem Organophosphat (Chlorpyrifos) im Vergleich zu konstanten Dreifachmischungen untersucht. Dazu wurden 10-Tages-Toxizitätstests mit der Zuckmückenlarve *Chironomus dilutus* unter Anwendung von Toxic Units (TU) durchgeführt, welche auf der mittleren letalen Konzentration (LC50) für jede Substanz, die in der Mischung enthalten ist, basieren [7]. Die Summe der Einzel-TUs beschreibt daher die Gesamtkonzentration einer Mischung, welche dazu verwendet werden kann, die Toxizität einer Dreifachmischung zu bestimmen. Die für die Studie als Grundlage verwendeten nominalen LC50<sub>96h</sub> betragen: 189,00 ng/L Permethrin [8]; 37,90 ng/L Lambda-Cyhalothrin und 470,00 ng/L Chlorpyrifos [9]. Basierend auf diesen Werten wurden *C. dilutus* zu den folgenden equipotent toxischen Einzel-TUs bzw. Mischungs-TUs exponiert: 0,167; 0,25; 0,33; 0,5; 1; 1,5 und 3 bzw. 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 und 3. Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, um sowohl umweltrelevante Konzentrationen als auch höhere Konzentrationen zu erfassen [10-13], wie sie z.B. bei Overspray oder Oberflächenabfluss vorkommen können.

Neben der Überlebensrate, wurden vor allem die sublethalen Endpunkte Immobilität und Wachstum analysiert. Am Ende der 10-Tagestests wurde das Verhalten der überlebenden Organismen ausserhalb ihrer Röhren für 80 Sekunden aufgezeichnet und die prozentuale Immobilität mit Ethovision XT 6.1 Software (Noldus Information Technology Inc.) berechnet [14]. Danach wurden die Organismen in Aluminiumschalen über Nacht bei 60°C getrocknet [15] und gewogen (0,1 mg Genauigkeit). Signifikante Unterschiede zwischen den Belastungsstufen und zur Kontrolle wurden mittels Analysis of Variance (ANOVA) bestimmt. Wenn parametrische Annahmen nicht erfüllt wurden, wurde ein Kruskal Wallis Test, mit einer Dunnett's post hoc comparison durchgeführt. Konzentrationen, die eine mittlere 50% Reduzierung der Überlebensrate (LC50) und Wachstums (EC50) hervorgerufen haben, wurden mit Hilfe des DRC Pakets Version 2.3-96 [17] in R [18] berechnet.

Um die Langzeiteffekte von Pestizidmischungen auf Invertebratengemeinschaften zu untersuchen, wurde eine sechsmonatige Mehrarten-Mesokosmenstudie im Freiland durchgeführt. Das dafür verwendete Mesokosmensystem befindet

sich auf dem Putah Creek Riparian Reserve der University of California at Davis (USA) und besteht aus 16 Polyäthylen-Becken, welche 30 cm in den Boden eingelassen wurden. Jedes Becken wurde mit einer ca. 10 cm hohen Schicht an natürlichem Sediment und mit ca. 1000 L unbelastetem Teichwasser (50 cm Wasserhöhe), welches die notwendigen Organismen, Algen und Bakterien lieferte, befüllt. Die Wasserpflanzen *Elodea canadensis* und *Myriophyllum verticillatum* wurden anschließend in gleicher Anzahl auf die Becken verteilt. Vor Beginn des Experiments (Februar bis Mai 2013), wurde dem System die Möglichkeit gegeben, sich zu stabilisieren. Dabei konnte die Besiedelung von fliegenden Taxa (e.g., *Odonata*, *Ephemeroptera*) erfolgen.

Insgesamt wurden drei Belastungsstufen der Dreifachmischungen und eine Kontrolle mit je vier Replikaten verwendet. Die Belastungsstufen basierten auf umweltrelevanten Konzentrationen (ERC) und Konzentrationen, die in vorangegangenen Einzelartentoxizitätstests jeweils mit *H. azteca* (LC-Hya) and *C. dilutus* (LC-Chiro) bestimmt wurden [19]. Insgesamt wurden fünf Pestizid-Applikationen in den Wochen 0, 7, 13, 15, und 17 durchgeführt, wobei die Konzentrationen für ERC gleich blieben und die laborbasierten Konzentrationen von LC10 zu LC50 schrittweise erhöht wurden (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Nominale und durchschnittlich gemessene (n = 4) Konzentrationen für die verwendeten Belastungsstufen und die fünf Applikationen in Woche 0, 7, 13, 15 und 17 nach der ersten Pestizidapplikation.

		Pestizidkonzentration (ng/L)														
		0			7			13			15			17		
		N	M	SE	N	M	SE	N	M	SE	N	M	SE	N	M	SE
ERC																
CF		7,50	7,36	1,47	7,50	5,63	0,62	7,50	5,48	0,99	7,50	9,02	1,96	7,50	12,86	4,76
LC		3,50	2,78	0,05	3,50	3,59	0,05	3,50	4,15	0,65	3,50	5,46	1,29	3,50	8,00	2,81
PM		5,70	6,60	0,73	5,70	10,69	5,35	5,70	7,50	4,10	5,70	8,63	7,48	5,70	13,13	11,38
LC-Hya																
CF		58,10	51,18	2,37	66,95	59,37	2,87	66,95	70,78	10,75	77,15	66,46	26,17	77,15	75,06	16,38
LC		0,14	0,70	0,20	0,17	1,21	0,35	0,17	1,93	0,32	0,21	2,54	0,81	0,21	3,28	0,96
PM		48,56	43,99	4,74	55,01	56,06	2,10	55,01	66,63	16,15	62,30	71,63	15,91	62,30	77,63	0,96
LC-Chiro																
CF		161,78	137,92	14,83	284,41	264,80	31,02	284,41	323,31	126,45	522,97	326,34	48,44	522,97	384,06	93,71
LC		37,78	30,10	2,97	43,31	49,90	2,13	43,31	47,58	10,62	49,65	58,85	0,47	49,65	56,16	7,62
PM		128,52	115,47	16,21	192,07	187,53	35,75	192,07	188,26	44,42	267,11	266,50	28,47	267,11	229,05	111,98

PM = permethrin, LC = lambda-cyhalothrin, CF = chlorpyrifos, N = nominale Konzentration, M = durchschnittliche gemessene Konzentration (n = 4), SE = Standardfehler

Für die Pestizid-Applikation wurden im Handel erhältliche Formulierungen von Permethrin (Pounce 25 WP™), Lambda-Cyhalothrin (Warrior II™), und Chlorpyrifos (Lorsban-4E™) in destilliertem Wasser gelöst, und dann entsprechend den nominalen Konzentrationen gemischt (siehe [16]). Die Applikationslösungen (50 mL pro Becken) wurden mit Hilfe eines Sprayers (Volumen: 1,8 L) gleichmäßig über die Wasseroberfläche verteilt. Der Verbleib der Insektizide wurde wöchentlich sowohl in der Wassersäule als auch im Sediment aller 16 Becken gemessen, um den Einfluss dieser Passage auf die Arten, die in den verschiedenen Habitaten der Mesokosmen leben, differenzieren zu können (für detaillierte Methoden siehe [16]). Der abiotische und biotische Abbau war allerdings nicht Teil dieser Studie, und konnte daher in der Interpretation der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden.

Die Probenahme erfolgte wöchentlich ab sechs Wochen vor der ersten Pestizidapplikation am 19. Juni 2013 (Woche 0) bis zum 31. Oktober 2013 (Woche 19). Dabei wurden physikalisch-chemische Parameter (Wassertemperatur, pH, gelöster Sauerstoff und spezifische Leitfähigkeit) in jedem

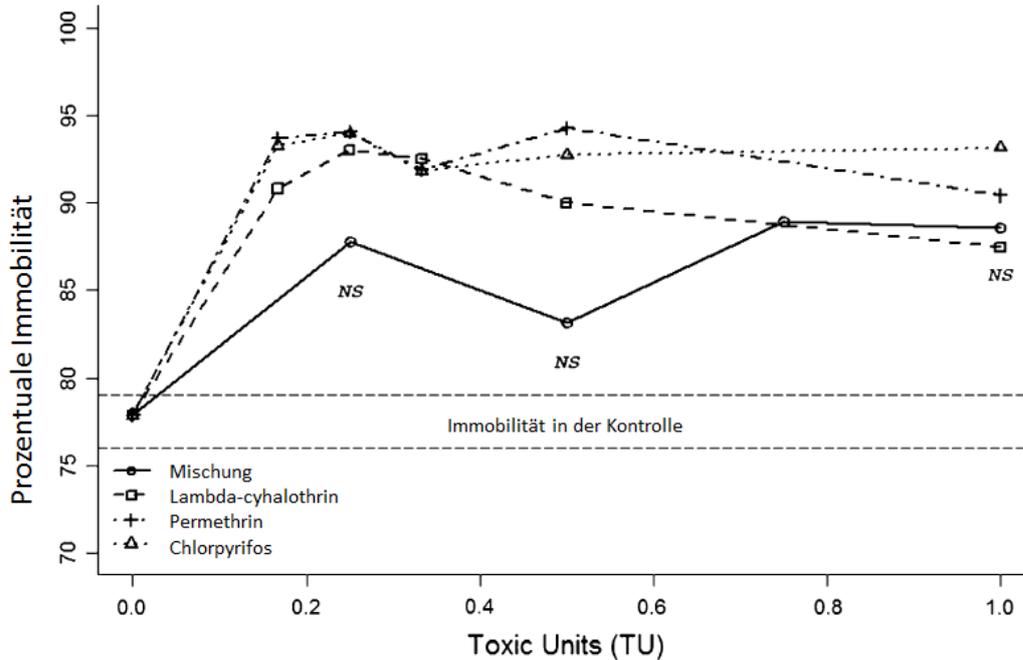
Becken gemessen. Daraufhin erfolgte die Erfassung der biologischen Parameter. Für die Beprobung der Makroinvertebratengesellschaft wurden Kescher (Maschenweite = 150 µm, Durchmesser = 30,48 cm, Gesamtöffnungsfläche = 510 cm<sup>2</sup>, BioQuip Products) sowie Kunstsubstrate, sogenannte Kieskörbe, verwendet. Die gefangenen Organismen wurden jeweils in weiße Fotoschalen gespült, lebend ausgezählt, und in das entsprechende Becken zurückgesetzt. Für die Probenahme des Zooplanktons wurde ein PVC Rohr (Durchmesser = 4,8cm; Länge = 1m) mit einem Stopper verwendet. Das gesammelte Wasser (~2,8 Liter) wurde mit einem Edelstahlsieb (Porengröße = 63µm, Durchmesser = 30,48 cm) gefiltert und die Organismen dann in 90% Ethanol konserviert, mit einer Bengalrosalösung angefärbt und mittels Mikroskop ausgezählt.

Physikalisch-chemische und biologische Parameter wurden mittels repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA) analysiert. Bei einer signifikanten Zeit x Belastung Interaktion, wurde eine one-way ANOVA gefolgt von einer Dunnett's multiple comparison verwendet, um die signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Belastungsstufen und

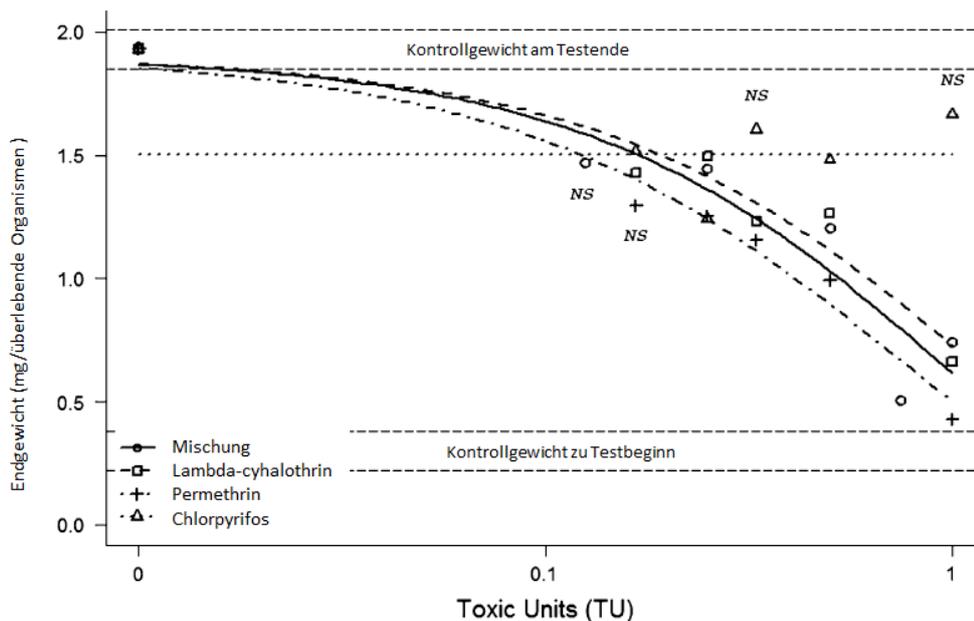
Kontrollen, sowie zwischen den Beprobungstagen festzustellen. Für alle statistischen Berechnungen wurde Minitab 16 2010 verwendet. Das Signifikanzlevel in allen Tests war  $p \leq 0,05$ . Alle Unterschiede die hier erwähnt werden, sind signifikant, wenn nicht anders vermerkt. Die Analyse der Gesellschaftsstruktur erfolgte mittels Principal Response Curves (PRC) in Canoco 5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA) [20].

## Ergebnisse und Diskussion

In den Laborversuchen wurde eine erhöhte Immobilität sowohl für Mischungskonzentrationen  $\geq 1$  TU (7,45 ng/L Lambda-cyhalothrin x 24,90 ng/L Permethrin x 129,70 ng/L Chlorpyrifos), als auch für Einzelkonzentrationen  $\geq 0,25$  TU (5,50 ng/L Lambda-Cyhalothrin; 24,23 ng/L Permethrin bzw. 90,92 ng/L Chlorpyrifos) beobachtet (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Prozentuale Immobilität gemessen mittels 80s Videoanalysis von *C. dilutus* nach einem 10-Tagestest mit Lambda-Cyhalothrin, Permethrin und Chlorpyrifos und den entsprechenden Dreifachmischungen, dargestellt bis zu 1 TU (Überlebensrate  $\geq 50\%$ ), NS = Nicht signifikant, alle anderen Datenpunkte  $p < 0,05$ . Eingekreiste Datenpunkte = nicht signifikant.



**Abb. 2:** Endgewicht in mg/überlebenden Organismen von *C. dilutus* am Ende eines 10-Tagestests mit Lambda-Cyhalothrin, Permethrin und Chlorpyrifos und den entsprechenden Mischungen, dargestellt bis zu 1 TU (Überlebensrate  $\geq 50\%$ ), NS = Nicht signifikant, alle anderen Datenpunkte  $p < 0,05$ . Kontrollgewicht zu Testbeginn = 0,345 mg/Organismus. Kontrollgewicht am Testende = 1,932 mg/Organismus.

Das Wachstum von *C. dilutus* war bei den Mischungskonzentrationen  $\geq 0,125$  TU (1,04 ng/L Lambda-Cyhalothrin x 3,15 ng/L Permethrin x 15,47 ng/L Chlorpyrifos) und Einzelkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin  $\geq 0,25$  TU (5,50 ng/L) und Permethrin  $\geq 0,167$  TU (18,21 ng/L) signifikant gehemmt (Abbildung 2).

Sowohl für die Dreifachmischung als auch für die einzelnen Pyrethroide waren NOECs für Immobilität und Wachstum bis zu 8 bzw. 12 mal niedriger als die entsprechenden NOEC-Konzentrationen für die Überlebensrate. Die mittleren Effekt-

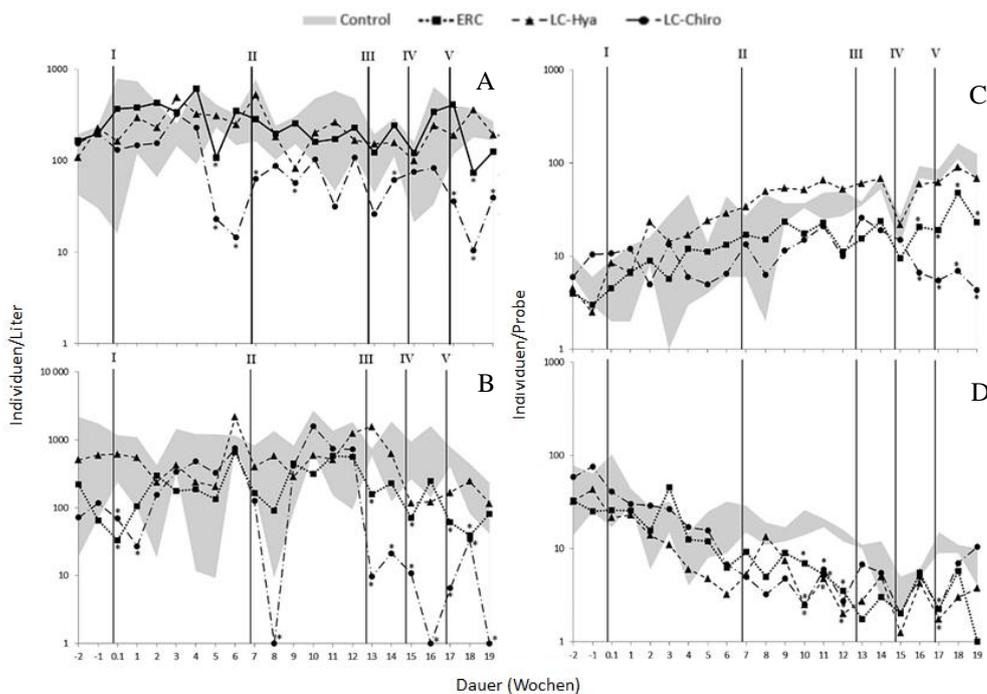
konzentrationen (EC50) für Wachstum (Mischung und einzelne Pyrethroide) waren bis zu 7 mal niedriger als die entsprechenden LC50 Werte (Tabelle 2).

In der Mesokosmenstudie wurden für zwölf von fünfzehn Makroinvertebraten und zehn von sechzehn identifizierten Zooplankton taxa signifikante Effekte durch die Pestizidbelastung gemessen. Die sensitivsten Taxa waren die Schneckenart *Radix*, der Amphipod *H. azteca*, der Wasserfloh *Daphnia magna* und die Gruppe der Copepoden (Abbildung 3A-D).

**Tabelle 2:** Effektive Konzentrationen berechnet für die 10-Tages-Einzelartentoxizitätstests mit *C. dilutus* basierend auf gemessenen Konzentrationen (n = 4).

Chemikalie	Effektkonzentration (ng/L)						Immobilität NOEC
	Überlebensrate			Wachstum			
	NOEC	LC50	SE	NOEC	EC50	SE	
LC	21,98	32,99	2,56	4,39	18,13	5,20	< 4,39
PM	144,59	159,41	16,36	< 18,21	22,51	7,75	< 18,21
CF	361,90	571,49	88,68	---	---	---	< 55,89
Mischung	1,50 TU	1,90 TU	0,28	0,125 TU	0,49 TU	0,19	0,50 TU

LC = Lambda-Cyhalothrin, PM = Permethrin, CF = Chlorpyrifos, NOEC = No observed effect concentration (die höchste getestete Konzentration, die keinen Effekt hat), LC50 = mittlere Konzentration, die eine Mortalität von 50% verursacht (n = 4), EC50 = mittlere Konzentration, die das Wachstum von 50% der Population beeinflusst (n = 4), SE = Standardfehler



**Abb. 3:** Abundanzverlauf für Copepoden (A), *Daphnia magna* (B), *Radix* sp. (C) und *Hyalella azteca* (D) für jede Belastungsstufe im Mesokosmenexperiment verglichen mit der Kontrolle (grau-schattierte Fläche) über die gesamte Probennahmedauer. Sterne (\*) stellen signifikante Unterschiede zur Kontrolle dar (p = 0,05). Vertikale Linien zeigen den Tag der Applikation in Woche 0, 7, 13, 15 und 17 nach der ersten Applikation. Die Konzentrationen für LC-Hya und LC-Chiro wurden schrittweise erhöht (I = LC10, II und III = LC25, IV und V = LC50). ERC = umweltrelevante Konzentrationen. LC-Hya und LC-Chiro = letale Konzentrationen, die in vorangegangenen Studien mit *H. azteca* und *C. dilutus* bestimmt wurden.

Umweltrelevante Konzentrationen hatten den stärksten Einfluss auf die Zooplanktongemeinschaft und verursachten innerhalb von 24h nach der Applikation akute Effekte auf *D. magna* und *H. azteca*, während verzögerte Effekte für die *Radix*-Schnecken und die Copepoden beobachtet wurden. Die verzögerten Effekte weisen auf potentielle chronische subletale Auswirkungen hin. Die Pyrethroide waren nach weniger als drei Wochen nicht mehr in der Wassersäule messbar, während Chlorpyrifos bis zu sechs Wochen nachweisbar war. Obwohl die Pyrethroide nicht mehr detektierbar waren, wurden dennoch unabhängig von der Belastungsstufe biologische Effekte gemessen, was auf chronische Auswirkungen auf die Artengemeinschaft hindeutet. Dies hat möglicherweise wichtige Implikationen für die Gewässerüberwachung und die Regulierung von Pestiziden.

## Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die Anwendung von laborbasierten Toxizitätstests war es möglich, ökologisch relevante subletale Effekte auf Wachstum und Motilität unter kontrollierten Bedingungen in 10-Tagestests zu bestimmen. Andererseits ermöglichte die Einbeziehung von Mesokosmenversuchen im Freiland die Abschätzung von Langzeiteffekten auf ganze Biozönosen und das Nahrungsnetz, weshalb dieser Versuchsansatz eine realistischere Einschätzung der Effekte darstellte als die Einzelartentests. Beide Versuchsansätze lieferten essentielle und komplementäre Informationen, um die Mischungstoxizität besser zu verstehen und die daraus resultierenden Effekte auf aquatische Ökosysteme bewerten zu können. Diese Kombination von beiden Versuchsansätzen sollte in der Risikobewertung von Schadstoffen Anwendung finden. Besonders die Integration von subletalen Endpunkten in die Gewässerüberwachung und Pestizidregulierung kann die wirkungsbezogene Identifizierung von niedrigen Pestizidkonzentrationen, die langfristig negative Effekte auf die Nahrungsnetze und Gesellschaftsstrukturen in Gewässern verursachen können, erleichtern.

## Literatur

- [1] Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J. and Sullivan, C.A. (2006). "Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges." *Biological Reviews* 81(02): 163-182.
- [2] Geist, J. (2011). "Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation." *Ecological Indicators* 11(6): 1507-1516.
- [3] Connon, R.E., Geist, J. and Werner, I. (2012). "Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment." *Sensors* 12(9): 12741-12771.
- [4] Scholz, N.L., Fleishman, E., Brown, L., Werner, I., Johnson, M.L., Brooks, M.L., Mitchelmore, C.L. and Schlenk, D. (2012). "A perspective on modern pesticides, pelagic fish declines, and unknown ecological resilience in highly managed ecosystems." *BioScience* 62(4): 428-434.
- [5] Silva, E., Rajapakse, N. and Kortenkamp, A. (2002). "Something from 'nothing': Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below noecs produce significant mixture effects." *Environmental Science and Technology* 36(8): 1751-1756.
- [6] Kortenkamp, A. (2008). "Low dose mixture effects of endocrine disruptors: Implications for risk assessment and epidemiology." *International Journal of Andrology* 31(2): 233-237.
- [7] McCarty, L.S., Dixon, D.G., Ozburn, G.W. and Smith, A.D. (1992). "Toxicokinetic modeling of mixtures of organic chemicals." *Environmental Toxicology and Chemistry* 11(7): 1037-1047.
- [8] Harwood, A.D., You, J. and Lydy, M.J. (2009). "Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: Toxicokinetic confirmation." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(5): 1051-1058.
- [9] Ankley, G.T. and Collyard, S.A. (1995). "Influence of piperonyl butoxide on the toxicity of organophosphate insecticides to three species of freshwater benthic invertebrates." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 110(2): 149-155.
- [10] Anderson, B.S., Phillips, B.M., Hunt, J.W., Connor, V., Richard, N. and Tjeerdema, R.S. (2006). "Identifying primary stressors impacting macroinvertebrates in the Salinas river (California, USA): Relative effects of pesticides and suspended particles." *Environmental Pollution* 141(3): 402-408.
- [11] Budd, R., O'Geen, A., Goh, K.S., Bondarenko, S. and Gan, J. (2009). "Efficacy of constructed wetlands in pesticide removal from tailwaters in the Central Valley, California." *Environmental Science and Technology* 43(8): 2925-2930.
- [12] Werner, I., Deanovic, L.A., Markiewicz, D., Khamphanh, M., Reece, C.K., Stillway, M. and Reece, C. (2010). "Monitoring acute and chronic water column toxicity in the northern sacramento-San Joaquin estuary, California, USA, using the euryhaline amphipod, *Hyalella azteca*: 2006 to 2007." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(10): 2190-2199.
- [13] Weston, D. P. and Lydy, M. J. (2012). Stormwater input of pyrethroid insecticides to an urban river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 1579-1586.
- [14] Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE. 2015. The use of growth and behavioral endpoints to assess the effects of pesticide mixtures upon aquatic organisms. *Ecotoxicology* 24:746-759.
- [15] Nahon, S., Charles, F., Lantoiné, F., Vétion, G., Escoubeyrou, K., Desmalades, M. and Pruski, A.M. (2010). "Ultraviolet radiation negatively affects growth and food quality of the pelagic diatom *Skeletonema costatum*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 383(2): 164-170.
- [16] Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE. 2016. A long-term assessment of pesticide mixture effects on aquatic invertebrate communities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35:218-232.
- [17] Ritz, C. and Streibig, J. (2005). "Bioassay analysis using R" *Journal of Statistical Software* 12(5): 1-22.
- [18] R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org/>.
- [19] Hasenbein S, Connon R, Lawler S, Geist J. 2015. A comparison of the sublethal and lethal toxicity of four pesticides in *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*. *Environmental Science and Pollution Research* 22:11327-11339.
- [20] Braak, C.T. and Šmilauer, P. (2002). "Canoco reference manual and canodraw for windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5)." Section on Permutation Methods. Microcomputer Power, Ithaca, New York (2002).