



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

KompetensCentrum för Kemiska
Bekämpningsmedel (CKB)

Ove Jonsson och Jenny Kreuger

Studie av växtskyddsmedels stabilitet i honungsbin samt av individvariation i fältexponering



CKB rapport 2017:1

Uppsala 2017

Kompetenscentrum för kemiska bekämpningsmedel
Sveriges lantbruksuniversitet

Centre for Chemical Pesticides
Swedish University of Agricultural Science

KompetensCentrum för Kemiska Bekämpningsmedel

CKB

CKB Rapport 2017:1

Studie av växtskyddsmedels stabilitet i honungsbin samt av individvariation i fältexponering

Kompetenscentrum för kemiska bekämpningsmedel, CKB
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU. 2017

Tryck: Repro, SLU

ISBN: 978-91-576-9368-6 (tryckt version)
978-91-576-9369-3 (elektronisk version)

Omslagsbilder:

Vänster: Matning av ett bi med sockerlösning innehållande växtskyddsmedel
Höger: Mikroprovtagning av nektar från honungsmagen i ett bis bakkropp
(Foton: Ove Jonsson)

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	1
1. Inledning.....	2
2. Metodik	3
2.1. Matning av bin för stabilitetsutvärdering	3
2.2. Studie av individvariationer i bin och nektar	4
2.3. Analysmetodik i korthet	5
2.3.1. Analys av bin för stabilitetsutvärdering.....	5
2.3.2. Analys av enskilda bin för studie av individvariation	5
2.3.3. Mikroprovtagning och analys av nektar från enskilda bin	5
2.3.4. Enheter.....	7
3. Resultat och diskussion	7
3.1. Pesticiders stabilitet i bin.....	7
3.1.1. Matning av bin.....	7
3.1.2. Generellt om graden av nedbrytning	8
3.1.3. Stabilitet i levande honungsbin och vid förvaring i rumstemperatur	8
3.1.4. Stabilitet vid frysförvaring	9
3.1.5. Neonikotinoiders stabilitet.....	9
3.1.6. Administreringens relevans	9
3.1.7. Förgiftningssymptom observerade i samband med stabilitetsstudien	9
3.2. Bestämning av kemiskt sura växtskyddsmedel i bin.....	10
3.3. Pesticiders individvariation i bin	10
3.3.1. Nektarprovtagning.....	10
3.3.2. Bianalys	11
3.3.3. Individvariation	11
3.3.4. Klotianidin i honungsbin och nektar	12
3.3.5. Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor.....	15
3.3.6. Tiaklopid i honungsbin och nektar.....	16
3.3.7. Azoxystrobin i honungsbin och nektar.....	17
3.3.8. Prokloraz i honungsbin.....	19
4. Slutsatser	19
5. Tackord.....	20
6. Referenser.....	20
7. Bilagor	21
Bilaga 1 – Stabilitet vid olika förvaring	22

Bilaga 2 – Spridning i tillsatsprover jämfört med stabilitetsprover.....	26
Bilaga 3 – Förgiftningspåverkan efter matning av bin med mix av 91 växtskyddsmedel.....	28
Bilaga 4 – Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor	29
Bilaga 5 – Analyismetodik	30

Sammanfattning

Stabilitet vid förvaring

Växtskyddsmedels stabilitet i honungsbin, *Apis mellifera*, har studerats genom förvaring i frys vid minus 20°C i upp till 21 månader. För detta syfte matades individuella bin med en sockerlösning innehållande en mix av ett stort antal växtskyddsmedel (91 st). Då bina fick i sig dessa ämnen på ett biologiskt relevant sätt via födan kunde även ämnernas stabilitet i det levande biet bedömas. Vidare studerades stabiliteten vid 22 timmars förvaring i rumstemperatur av bina. Resultaten visar att flertalet av de 91 studerade växtskyddsmedlen är stabila i bin vid långtidsförvaring i frys. Däremot sker en betydande nedbrytning för 56 % av substanserna i det levande biet och/eller i rumstemperatur. Detta visar på vikten av att snabbast möjligt kyla ner och sedan frysa de insamlade biproverna och undvika transport och förvaring i rumstemperatur innan analys.

Individvariation i fältexponering

Koncentrationen av fyra växtskyddsmedel bestämdes i individuella honungsbin och i nektar som samlats in av dessa bin. Vidare analyserades nektar insamlat av jordhumlor, *Bombus terrestris*. Resultaten visar att exponering för växtskyddsmedel i fält varierar mycket från bi till bi, med relativa standardavvikelser på 44 % till 180 % för fyra av de funna ämnena som uppvisade en mer allmän exponering i de analyserade bisamhällena. Det fanns ingen korrelation mellan halterna i nektar och i bivävnad för dessa ämnen. Utöver dessa fyra växtskyddsmedel förkom även enskilda fynd av andra substanser i endast ett eller två bin av de som analyserades. Detta trots att individerna kommer från samma bisamhälle och har samlats in under kontrollerade förhållanden vid ett och samma tillfälle. Denna variation är dock en naturlig konsekvens av bins födosökande i olika grödor, över stora områden, och av att halterna i nektar och pollen kan variera mellan enskilda plantor inom ett och samma fält.

Utökning av antalet analyserade substanser

I samband med stabilitetsstudien undersöktes även möjligheten att bestämma fenoxisyror och andra växtskyddsmedel med sura egenskaper i bin. För 16 av dessa ämnen gav den använda analysmetodiken tillräckligt bra resultat för att kunna bedöma stabilitet vid olika förvaring. Tio av dessa uppvisade även data som bedömdes vara av tillräckligt hög kvalitet, med avseende på signal/brus i masspektrometri-detektionen för att användas för framtida exponeringsbestämning i fältstudier.

Provtagningsstrategi

Någon generell, enkel och billig strategi för provtagning av ett bisamhälle är svår att ge. Om man baserar analysen på en hopslagning av ett stort antal bin kan man estimerar medelxponeringen för bisamhället, men man riskerar å andra sidan att späda ut eventuella höga individuella exponeringar och därmed missa viktig information. Om man å andra sidan väljer att analysera ett större antal individuella bin ökar informationsvärdet, men så också analyskostnaderna. Om möjligt bör därför provtagningen anpassas efter den aktuella studien och dess frågeställningar. Om man i framtiden önskar inkludera analyser av växtskyddsmedel i bin/pollen/nektar inom miljöövervakningen i syfte att studera spridning av dessa substanser i den terrestra miljön bör man sträva efter att förenkla analysförfarandet ytterligare, om så även med ett visst avkall på analytisk kvalitet. Detta ökar möjligheten att analysera fler prover och ger sannolikt mesta möjliga information om växtskyddsmedels terrestra spridning, med avseende på de satsade resurserna.

1. Inledning

Detta projekt var ett samarbete mellan Institutionen för vatten och miljö vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala, Institutionen för ekologi, SLU, Uppsala, Kompetenscentrum för kemiska bekämpningsmedel (CKB) och Naturvårdsverket. I ett tidigare projekt, redovisat i CKB rapport 2013:1 (Jonsson, et al., 2013), utfördes en screeningstudie 2012 där bin och pollen från 14 bisamhällen i södra Sverige analyserades med avseende på växtskyddsmedel (pesticider) med hjälp av nyutvecklade analysmetoder. I samband med det arbetet och efterföljande diskussioner mellan Naturvårdsverket och rapportförfattarna, restes frågor om hur man ytterligare skulle kunna kvalitetssäkra provtagningen och hanteringen av honungsbin för bestämning av växtskyddsmedel. Två viktiga, och ibland något förbisedda, aspekter av analytiskt arbete identifierades som kritiska i detta. Den första rör individvariationen i exponeringen vilket ligger till grund för att kunna bedöma hur en representativ provtagning av ett bisamhälle ska utföras. Den andra handlar om de olika växtskyddsmedlens stabilitet i bin under olika förhållanden, kunskaper som behövs för korrekt provtagning och förvaring av biprover. Ökade kunskaper kring dessa två frågeställningar var huvudsyftet med studien.

Att studera förvaringsstabilitet för växtskyddsmedel i bin på ett relevant sätt är en komplicerad uppgift. Medlen bör administreras till "bimatrisen" på ett sätt som i möjligaste mån efterliknar situationen i fält. Att endast tillsätta en lösning med växtskyddsmedel till döda bin eller till ett homogenat av döda bin är visserligen det enklaste tillvägagångssättet, men kan inte anses avspegla verkliga prover. Istället bör tillsatsen ske genom födan till det levande biet, då detta är den huvudsakliga naturliga exponeringsvägen. Efter administreringen bör man dessutom vänta en stund så att ämnena hinner tas upp av biet och i viss mån fördela sig på ett naturligt sätt, innan biet avlivs. Att mata enskilda, levande bin på ett kvantitativt sätt (dvs. med en exakt mängd) är visserligen svårt, men det är möjligt. Detta tack vare att bin har en reflex som gör att de suger i sig en sockerlösning som erbjuds, förutsatt att den innehåller en viss minimihalt socker. En ytterligare styrka med att tillföra växtskyddsmedlen via födan är att man även kan undersöka eventuell påverkan på ämnens stabilitet från den bakterieflora som finns i binas honungsmage. En kontrollerad tillförsel på detta sätt möjliggör även studier av specifika ämnens stabilitet i det levande biet.

För att bedöma hur stort antal bin som behövs för att få ett representativt mått på ett bisamhälles medexponering för en kemikalie behöver man kunna bestämma koncentrationen i enskilda bin. I detta syfte har ny analysmetodik utvecklats på laboratoriet för organisk miljökemi (OMK) vid Institutionen för vatten och miljö, SLU, dels för analys av enskilda bin, men även analys av nektar insamlat av enskilda bin. Som fältprover för att studera individvariation användes bin som blivit över dels från 2012 års screeningstudie (Jonsson et al., 2013), och dels från en studie under 2013 där effekten på honungsbin, jordhumlor och andra vilda bin av neonicotinoiders användning i rapsodling studerades (Rundlöf et al., 2015a).

Ett tredje mål med denna studie var att undersöka möjligheten att med den framtagna analysmetodiken även bestämma en grupp växtskyddsmedel med kemiskt sura karaktärer, t.ex. fenoxisyror, i bin som av tidsskäl inte inkluderades i den föregående screeningstudien. Detta gjordes istället i samband med stabilitetsstudien i detta projekt.

Ett annat syfte med den tidigare utförda screeningstudien (Jonsson et al., 2013) var att undersöka om honungsbin är lämpliga att använda för att studera spridningen av växtskyddsmedel till de landbaserade näringsvävarna och därmed kanske kunna användas i generella miljöövervakningsstudier. Att använda just bin för detta syfte skulle kunna vara av extra intresse då

honungsbin, vilda bin, inklusive humlor, blomflugor, m.fl. insekter är mycket viktiga pollinatörer och bidrar till att säkerställa goda skördar i det moderna jordbruket. Det är därför av stor vikt att kunna identifiera potentiella hot mot deras hälsa och långsiktiga överlevnadsförmåga. Kunskapsläget kring pesticiders eventuella påverkan på biologisk mångfald i allmänhet i jordbrukslandskapet har tidigare sammanställts i en CKB rapport (Rundlöf et al., 2012).

Fördelen med honungsbin ur ett miljöövervakningsperspektiv är att de hålls i en stor del av landet, de födosöker bland annat i jordbrukslandskapet där växtskyddsmedlen används och de är lätta att provta om man jämför med t.ex. vilda bi-arter. Honungsbisamhället erbjuder också olika provmatriser att analysera, som t.ex. nektar, honung, pollen, bibröd (pollen blandat med honung och packat i vaxkakor i kupan), vax, larver och förstas själva biet i sig. Biet är dock ingen väldefinierad matris då vissa bin bär på nektarvolymmer motsvarande upp till halva biets kroppsvikt och då det ofta följer med pollen även om man försöker avskilja eventuella pollensäcken. Provet utgör således ofta en blandning av tre olika matriser. Nektar och pollen är de minst bearbetade provmatriserna vilket kan vara av intresse om man vill analysera verksamma ämnen som kan vara instabila i biologiska system eller vid förvaring. Nektar och pollen är också de huvudsakliga födokällorna för ett stort antal vilda bin och andra insekter, varför dessa är extra relevanta att analysera. Honungsbin och deras relaterade provmatriser har länge använts i syfte att bedöma spridningen av oönskade ämnen i naturen, såsom tungmetaller, radionukleider och växtskyddsmedel (Devillers & Pham-Delègue, 2002; Chauzat et al., 2006; Chauzat et al., 2011; Bernal et al., 2010; Mullin et al. 2010; Bromenshenki et al. 1985). Studier av rester av växtskyddsmedel i bimatriser har dock oftast fokus på hälsoeffekter för honungsbin och vilda biarter, samt på ekotjänster som pollinering, mer än på miljöövervakning i allmänhet. Vad gäller analysen av vissa växtskyddsmedel bör man vara medveten om att matriser som bin, pollen, bibröd och vax är mycket komplexa och innehåller bland annat en mängd olika fetter som gör bestämning med gaskromatografiska metoder komplicerade. En viktig och svåranalyserad ämnesgrupp som vanligen bestäms med gaskromatografi kopplat till masspektrometri är pyretroider. Däremot är bestämning av växtskyddsmedel med vätskekromatografi kopplat till masspektrometri betydligt mer robust i detta hänseende och metoder baserade på denna teknik lämpar sig väl för analys av birelaterade prover.

I denna rapport presenteras data från laborativa studier av olika pesticiders stabilitet i honungsbin, av individvariation i fältexponering för några funna pesticider, samt hur antalet analyserade pesticider kunnat utökas med en modifierad analysmetodik. Användbarheten för bin i miljöövervakningssyfte berörs.

2. Metodik

2.1. Matning av bin för stabilitetsutvärdering

I studien ingick ett stort antal av de växtskyddsmedel, samt några nedbrytningsprodukter till dessa, som analyseras inom den löpande nationella miljöövervakningen i ytvatten. De 91 substanser som valdes ut analyseras normalt med analysmetod OMK 57, dvs. med vätskekromatografi kopplat till masspektrometri (LC-MS/MS) med positiv jonisering och redovisas i Bilaga 1a, samt med metod OMK 58 dvs. med LC-MS/MS med negativ jonisering, se Bilaga 1b.

För att administrera växtskyddsmedlen till bina på ett så relevant sätt som möjligt matades enskilda bin med en exakt volym sockerlösning innehållande en blandning av alla ämnena. En sockerlösning bestående av 30 % socker i avjonat vatten spikades med växtskyddsmedel. Då de ursprungliga lösningarna med växtskyddsmedels som användes var gjorda i acetonitril och aceton, dvs. lösningsmedel som kan antas vara giftiga för bin, gjordes ett lösningsmedelsbyte till etanol. Detta

genom att en milliliter var av tre ursprungslösningar blandades och indunstades under kvävgas för att slutligen återlösas i 75 mikroliter (μl) etanol. Denna lösning späddes sedan till 3 ml med sockerlösning, resulterande i en etanolhalt på cirka 2,5 % (v/v).

De bin som ingick i studien hämtades från två olika bikupor vid Avdelningen för lantbruksentomologi, Institutionen för ekologi, SLU. Varje enskilt bi matades med 10 μl av sockerlösningen med växtskyddsmedel. Vid matningen hölls biet försiktigt fast över ryggen och vingarna och sockerlösningen fördes fram nära huvudet med hjälp av en glaspipett fylld med exakt 10 μl (Figur 1, vänster). Sedan biet sugit i sig sockerlösningen, vilket möjliggörs av en sugreflex som aktiveras då vätskan innehåller tillräckligt mycket socker, placerades det i ett 50 ml plaströr. I varje rör placerades 4 bin, som tillsammans utgjorde ett delprov (Figur 1, höger). Röret, med löst fastsittande lock för ökad syretillförsel, fick stå en timme på bänken. Efter denna en timme långa *in vivo* exponering av bina för växtskyddsmedlen ställdes röret in i frysen varvid bina dog. Totalt matades 120 bin, resulterande i 30 delprov med fyra bin i varje. Tre delprov frystes in omedelbart efter matningen, alltså utan föregående *in vivo* inkubering, och användes som referensprover att jämföra med bin som gått en timme efter matning. Denna jämförelse ger en uppskattning av stabiliteten *in vivo*. För att kunna studera stabilitet i döda bin vid rumstemperatur togs ytterligare tre delprov som frystes in omedelbart och som sedan, efter fyra timmar i frysen, tinades och förvarades 22 timmar i rumstemperatur före analys. Alla övriga prover förvarades frysta vid ca -20°C i väntan på analys efter olika lång förvaringstid (0,5; 1; 2,5; 4,5; 21 månader).



Figur 1. Matning av ett bi med 10 μl sockerlösning innehållande växtskyddsmedel (vänster). Till höger syns ett delprov bestående av fyra matade bin. Foton: Ove Jonsson.

I samband med matningen av bina blev det tydligt att vissa bin en stund efter matningen reagerade med förgiftningssymptom. Att utvärdera dessa oönskade effekter ingick inte i syftet med studien och det fanns ingen förutbestämd strategi för detta. Trots det ansågs detta vara så pass intressant och allvarligt att ett sätt att värdera förgiftningssymptomen skapades och effekten på 96 bin protokollfördes. Detta redovisas i sektion 3.1.7 samt i Bilaga 3.

2.2. Studie av individvariationer i bin och nektar

Variationen i exponering för växtskyddsmedlen tiaklopid, azoxystrobin och prokloraz mellan individuella honungsbin hållna under naturliga fältförhållanden studerades för två bisamhällen provtagna under screeningstudien utförd 2012 (Jonsson et al., 2013). Från dessa samhällen analyserades 16 bikroppar vardera samt nektar insamlad av dessa bin. Vidare har 12 individuella honungsbin och deras insamlade nektar analyserats från vardera tre samhällen placerade vid rapsfält där utsädet betats med neonikotinoiden klotianidin, i en studie utförd 2013 (Rundlöf et al., 2015a). Bina fångades vid ingången till kuporna och inte ute i fälten. Slutligen, också med prover från nämnda studie (Rundlöf et al., 2015a), har nektar från totalt 36 individuella jordhumlor, där samhällena

placerats i kanten av åtta klotianidinbetade rapsfält, samt poolade nektarprov från åtta kontrollfält, analyserats med avseende på klotianidin.

Alla de undersökta bina och humlorna var insamlade i samband med, och överblivna ifrån, de ovan refererade studierna. Således samlades inga separata biprover in för bedömningen av individvariation i fältexponering beskrivna i denna rapport.

Förekomsten av alla de substanser som bestäms med LC-MS/MS metoden med positiv jonisering (listade i Bilaga 1a) undersöktes i denna delstudie, men endast de fyra ovan nämnda ämnena återfanns i alla eller merparten av de analyserade individerna från ett visst bisamhälle. Enstaka fynd av andra växtskyddsmedel redovisas ej i rapporten.

2.3. Analyismetodik i korthet

2.3.1. Analys av bin för stabilitetsutvärdering

Varje delprov, á fyra bin, homogeniserades med torkmedel i ett provrör med hjälp av en glasstav, varefter det extraherades med en blandning av aceton och etylacetat under starkt ultraljud. En fraktion av extraktet togs ut för bestämning av sura analyter som t.ex. fenoxisyror. Resterande extrakt uppenades ytterligare med dispersiv fastfasextraktion. De båda delextrakten indunstades under kvävgas och återlöstes i 200 µl acetonitril vardera, varefter de analyserades med vätskekromatografi kopplat till tandem-masspektrometri (LC-MS/MS) enligt två olika metoder. Kalibreringslösningar på sju olika koncentrationsnivåer tillreddes i acetonitril. Tillsattsprover där bi-homogenat spikats med växtskyddsmedel vid en koncentrationsnivå motsvarande halva den mängden bina matades med tillreddes och hanterades på samma sätt som stabilitetsproverna. Dessa tillsattsprover användes för att beräkna omräkningsfaktorer gentemot kalibreringskurvan i rent lösningsmedel och därmed möjliggöra bestämning av koncentrationer i biprover. En utförligare metodbeskrivning av bialysen finns i Bilaga 5. För detaljerade instrumentella parameterinställningar för LC-MS/MS metodiken hänvisas till tidigare publikation (Jansson & Kreuger, 2010).

2.3.2. Analys av enskilda bin för studie av individvariation

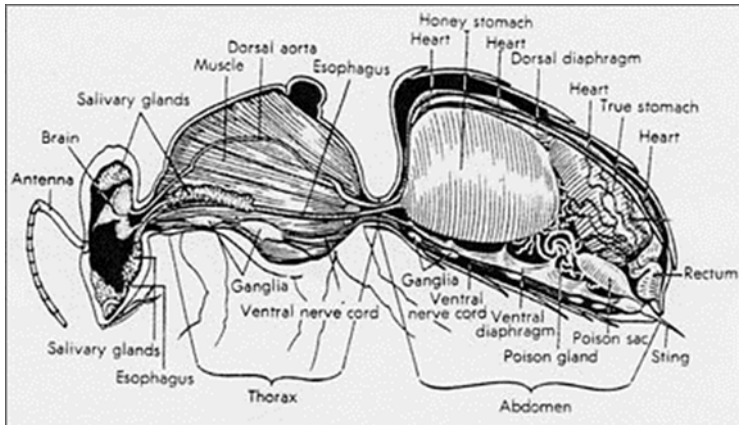
Samma princip användes som för stabilitetsproverna, med skillnaderna att volymerna minskades ytterligare och den avslutande fastfasreningen uteslöts. För dessa bin hade först merparten av nektarn från biets honungsmage separerats enligt metodik nedan.

2.3.3 Mikroprovtagning och analys av nektar från enskilda bin

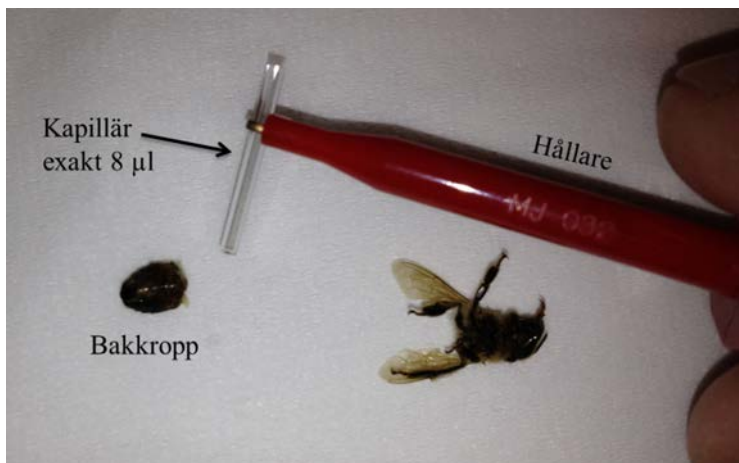
Bin och humlor som förvarats frysta tinades, varpå bakkroppen avskildes med en skalpell. Nektarn förvars i honungsmagen (honey stomach, Figur 2) och genom att lägga den avkapade bakkroppen med buksidan uppåt och sedan försiktigt trycka på den från sidorna med fingrarana eller med en pincett kunde nektarn pressas ut genom den kapade matstrupen (esophagus, Figur 2 och 3). Nektarn samlades upp i en 8 µl glaskapillär som, då den fyllts från ände till ände av kapillärkraft, ger en exakt provvolym. Kapillären placerades sedan i ett 1 ml provrör (Figur 3, höger) och frystes in i väntan på analys, alternativt analyserades samma dag.

Kalibreringslösningar på sex koncentrationsnivåer tillreddes i 30 % sockerlösning och 8 µl överfördes med kapillär till provrör. Kvalitetskontrollprover i nektar insamlat av bin från områden fria från mätbara halter av växtskyddsmedel tillreddes på två nivåer enligt en matrismatchningsprocedur. Detta genom att föra över åtta mikroliter blank nektar med kapillär till ett provrör och sedan istället tillsätta lämplig mängd växtskyddsmedel i en separat lösning till provröret som mixas kraftigt för att blanda de två vätskorna.

Till alla rören sattes internstandardlösning i acetonitril samt ytterligare acetonitril, totalt 72 μl för att fälla ut proteiner ur provet. Rören mixades sedan och centrifugerades, varefter ca 60 μl överfördes till en injektionsvial för LC-MS/MS analysen, där 10 μl injicerades.



Figur 2. Honungsbi i genomsnitt, nektar transporteras i honungsmagen, "honey stomach". Från <http://beekeeping.glorybee.com>. Humlors anatomi är snarlik.



Figur 3. Mikroprovtagning av nektar från honungsbi, vänster. Nektar från honungsmagen i bakkroppen pressas försiktigt ut genom den avkapade matstrupen och samlas upp i en glaskapillär med exakt volym. Till höger syns kapillären med åtta mikroliter nektar placerad i ett provrör för vidare analys. Foton: Ove Jonsson.

Ett modifierat tillvägagångssätt att ta ett nektarprov för bestämning av växtskyddsmedel, samtidigt som den totala volymen nektar uppskattas illustreras i Figur 4. Detta kan göras då man, förutom koncentrationen, även vill bedöma den totala mängden växtskyddsmedel som transporteras till samhället av ett honungsbi eller humla. All nektar som kunde pressas ut ur honungsmagen samlades först upp i en större glaskapillär med känd volym och längd. Som synes i Figur 4 gick det ibland även att pressa ut delar av tarminnehållet som är grumligt och färgat. Nektar definierades här som en klar vätska och den färgade volymen räknades således inte med. Längden på nektarpelaren i kapillären mättes och den totala volymen nektar kunde beräknas. En exakt volym nektar fördes sedan över till en mindre kapillär och upparbetades och analyserades med avseende på växtskyddsmedel enligt proceduren ovan. Detta tillvägagångssätt användes för bestämning av neonikotinoiden klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor.



Figur 4. Innehållet från honungsmage och delar av tarmsystemet uppsamlat i en 35 µl glaskapillär. Genom att mäta längden på nektarpelaren kan man uppskatta den totala volym nektar som transporteras av ett visst bi. Ett delprov tas ut för bestämning av växtskyddsmedel. Foto: Ove Jonsson.

2.3.4. Enheter

Koncentrationer i bin anges i denna rapport som nanogram per gram bi (ng/g), och koncentrationer i nektar som nanogram per milliliter (ng/ml). I samband med de observerade förgiftningseffekterna i denna studie och även i andra sammanhang anges även koncentrationer i bin som ng (eller mikrogram, µg) per bi. Då bin väger olika mycket är omräkningen mellan dessa enheter inte exakt. Dock kan man som en tumregel säga att ett bi väger ca 0,1 gram vilket leder till att koncentrationsdata presenterade som ng/g ska divideras med 10 för att få motsvarande ungefärliga koncentration i enheten ng/bi.

3. Resultat och diskussion

3.1 Pestidciders stabilitet i bin

3.1.1 Matning av bin

För att få relevanta prover för att studera stabiliteten vid frysförvaring matades individuella bin med sockerlösning innehållande alla de studerade växtskyddsmedlen. Tanken var att så långt som möjligt efterlikna en naturlig exponering via föda. Fördelarna med detta tillvägagångssätt är flera. Den kanske viktigaste är att det är betydligt mer relevant att mata levande bin än att spika döda bin, eller ett homogent av döda bin med växtskyddsmedel, eftersom då varken biets egen metabolism eller den orsakad av bakteriefloran i honungsmagen och tarmen är närvarande. Substanserna får ej heller möjlighet att binda till bimatrisen på ett relevant sätt. Upplägget i denna studie medgav, förutom utvärdering av stabilitet vid frysförvaring och i rumstemperatur, även en uppskattning av olika växtskyddsmedels stabilitet i levande bin. Nackdelen med att tillföra växtskyddsmedlen via födan skulle kunna vara en risk att missbedöma stabilitet hos föreningar som bin exponeras för via andra exponeringsvägar t.ex. damm eller direkt besprutning, och som därmed inte passerar matsmältningskanalen.

Matning av ett stort antal individuella bin på detta sätt möjliggjordes dels av den sugreflex som honungsbin har och som gör att de reflexmässigt suger i sig vattenlösningar innehållande tillräckligt hög sockerhalt, även då de hålls fast, och dels av den kunskap som professor Ingemar Fries vid Institutionen för ekologi, SLU, hade i denna matningsteknik. Det faktum att spridningen i resultaten för flera av de undersökta substanserna, angivet som relativ standardavvikelse, ligger under 10 % (Bilaga 1a och 1b) visar att precisionen i matningen var god.

Sockerlösningen som bina matades med innehöll förutom växtskyddsmedlen även 2,5 % etanol. Det gjordes ett antagande att denna etanolhalt ej skulle påverka binas naturliga bakterieflora på ett negativt

sätt och att man därmed kan anta att resultaten från studien inkluderar effekten av metabolismen orsakad av en relativt intakt bakterieflora.

3.1.2. Generellt om graden av nedbrytning

Som ett generellt mått på signifikant nedbrytning sattes i denna studie en minskning på 30 % eller mer för medelvärdet av återfunnen mängd, jämfört med referensvärdet. Vissa substanser uppvisar generellt sett en liten variation i data och man skulle där troligen kunna sätta en något snävare gräns. Å andra sidan uppvisar många andra substanser en betydligt större variation och det kan istället vara svårt att yttra sig om en funnen nedbrytning på 30 % är signifikant eller snarare ett resultat av den underliggande spridningen och slumpen. En annan aspekt är om den observerade variationen faktiskt härrör från biologisk variation eller från stor spridning i analysmetodiken. En vägledning i detta är att studera variationen för de tillsattsprover som beretts vid varje analystillfälle och jämföra med variationen för stabilitetsproverna. För alla växtskyddsmedel som ingick i studien visade en sådan jämförelse på ett spann för relativa standardavvikelserna för tillsattsproverna på 2,2-23 % med ett medel på 8,1 % emedan stabilitetsprovernas motsvarande siffror var 10-52 % med ett medel på 25 % (Bilaga 2). Detta antyder att det föreligger en väsentlig biologisk individvariation, där det aktuella växtskyddsmedlet bryts ner olika fort i olika bin. Detta är intressant information samtidigt som det i denna studie försvårade utvärderingen något. En alternativ förklaring till nedbrytning som orsak till variation kan vara att substanserna hinner fördela sig i skiftande grad till det levande biets olika vävnader och binda mer eller mindre hårt till dessa. Vid en ofullständig extraktion av hårt bundna ämnen skulle detta kunna tolkas som nedbrytning. Denna aspekt är dock mycket svår att utvärdera vetenskapligt. Den valda ultraljudstekniken och de utprovade lösningsmedlen får i sammanhanget anses vara kraftfulla och förmodas ge en kvantitativ extraktion.

3.1.3. Stabilitet i levande honungsbin och vid förvaring i rumstemperatur

Av de 91 växtskyddsmedlen som kunde analyseras med den i studien använda metodiken var det 39 stycken som uppvisade en nedbrytning på 30 % eller mer under en timmes inkubering i det levande biet (*in vivo* stabilitet), jämfört med referensproven, se Bilaga 1a och 1b.

Vidare var det av de 91 växtskyddsmedlen 40 stycken som uppvisade en nedbrytning på 30 % eller mer vid 22 timmars förvaring i rumstemperatur, jämfört med referensproven, Bilaga 1a och 1b.

Merparten (28 stycken) av de instabila ämnena uppvisade nedbrytning både i levande bin och vid förvaring i rumstemperatur, medan andra var stabila vid den ena betingelsen och instabila vid den andra. Att vissa ämnen bryts ner under båda betingelserna är rimligt, svårare är då att förklara nedbrytning vid endast en av betingelserna. Denna studie ger inga svar, utöver de spekulativa, på dessa frågor. Det man kan konstatera om förutsättningarna är dock att de biprover som förvarats 22 timmar i rumstemperatur inte utsatts för det levande biets metabolism och cirkulation. Däremot fanns den enzymatiskt nedbrytande effekten orsakad av bakteriefloran i honungsmagen och av biets sekretion i den tidiga matkanalen närvarande under en relativt lång tid. För proverna där växtskyddsmedlen endast utsatts för den en timme långa *in vivo* exponeringen i bina var tiden under vilken nedbrytningen skedde kortare men å andra sidan var både biet och bakteriefloran i full aktivitet. Beroende av födostatusen vid själva matningen kom troligen hela eller delar av den givna 10 µl dosen som givits till biet också att exponeras för tarmkanalen och eventuell nedbrytning i inre organ.

3.1.4. Stabilitet vid frysförvaring

Fjorton av de 91 studerade ämnena visade på nedbrytning med 30 % eller mer vid 21 månaders frysförvaring vid cirka -20 °C. Väger man sedan in resultaten från stabilitetsmätningen vid kortare frysförvaring, rumstemperatur och *in vivo* inkubering, samt variationen i data är det bara 9 substanser som med något större säkerhet uppvisade nedbrytning vid frysförvaring, Bilaga 1a och 1b.

Generellt var det många av substanserna som uppvisade stor variation i återfunna halter. För att bedöma eventuell nedbrytningstrend av dessa under frysförvaring bör man ta hänsyn till alla tidpunkterna, även om den sista tidpunkten vid 21 månader väger tyngst. Detta dels på grund av den långa förvaringstiden men också eftersom den var något säkrare bestämd med åtta replikat istället för övriga tidpunkters 3-4 replikat. Man kan anta att växtskyddsmedel som uppvisar nedbrytning, och stor variation i denna, i det levande biet även ha en stor variation i data i frysstabilitetsdelen av studien. Det finns därmed en risk att man i vissa fall misstar nedbrytning som skett i det levande biet för nedbrytning i frys.

3.1.5. Neonikotinoiders stabilitet

Stabiliteten för den intensivt studerade och globalt diskuterade neonikotinoiden klotianidin (insekticid) fanns vara god under alla studerade förhållanden. Den genomgående låga spridningen i data för denna substans stärker resultaten ytterligare. Även neonikotinoiden tiametoxam fanns vara stabil, även om data uppvisade större variation. Övriga tre studerade substanser i ämnesgruppen neonikotinoider, acetamiprid, imidakloprid och tiakloprid uppvisade nedbrytning *in vivo* med 44, 44 respektive 43 %, men verkar i övrigt vara stabila under de studerade betingelserna, se vidare Bilaga 1a.

3.1.6. Administreringens relevans

Även om stabilitetsstudien designats för att ge största möjliga biologiska relevans kan man ändå inte hävda att studiens resultat kan motsvara exponeringen under verkliga fältförhållanden. Det stora antalet ämnen som bina matats med och den relativt höga totalkoncentrationen (290 ng/bi varav 50 ng insekticider) är inte fältrealistisk. Det råder också osäkerhet kring hur stabiliteten för ett enskilt ämne påverkas av närvaron av många andra substanser på en gång. Om biets, alternativt de i honungsmagen eller tarmen symbiotiskt levande bakteriernas enzymatiska nedbrytningsförmåga är begränsad kan man tänka sig att nedbrytningen skulle kunna vara relativt sett effektivare vid lägre totalkoncentration och exponering för enskilda eller ett fåtal substanser. Detta gäller främst i det levande biet och vid förvaring i rumstemperatur. Vid frysförvaring bör den enzymatiska aktiviteten vara betydligt långsammare och påverka mindre, även om den inte kan antas avstanna helt.

3.1.7. Förgiftningssymptom observerade i samband med stabilitetsstudien

De nedan beskrivna observationerna och data i Bilaga 3 ska ses i ljuset av att studien inte hade till syfte att utvärdera toxicitet i bin och därmed inte var designad för detta.

Efter matningen av bina, i samband med den efterföljande 1-timmes *in vivo* inkuberingen då bina förvarades i 50 ml provrör, kunde man observera att ett flertal bin uppvisade förgiftningssymptom. Effekten syntes bli värre över tid om man jämförde de först matade bina med de som matades senare. Det verkade också finnas en skillnad mellan de två olika samhällena som bina hade tagits ifrån. Det första samhället, kallat A, vars bin matades på förmiddagen var ett relativt hälsosamt samhälle med låg angreppsgrad av *Varroa* kvalster, medan det andra som matades på eftermiddagen, kallat B, var ett samhälle kraftigt angripet av *Varroa*. Att två olika samhällen användes var inte planerat utan ett

misstag och något som delvis komplicerade syftet med studien - att utvärdera växtskyddsmedlens stabilitet i bin. Med det viktiga förbehållet att studien alltså inte var designad för att utvärdera akuta förgiftningssymptom (t.ex. fanns inga kontrollgrupper matade med endast sockerlösning) så är det ändå intressanta observationer värda att ta med i rapporten.

I ett försök att gradera hur allvarligt påverkat varje bi var sattes siffror enligt följande lekmannamässiga poängskala: opåverkat bi=0, påverkat=1, kraftigt påverkat=2, dött bi=3. Poängen summerades för varje delprov á fyra bin och resultaten sammanställda i tabellform visas i Bilaga 3. Tydligast är en till synes allvarligare förgiftningseffekt (4,5 ggr högre med den använda utvärderingsmetodiken) på bin från det kraftigt Varroa-angripna samhället jämfört med samhället med lägre angreppsgrad. Om det var angreppsgraden av Varroa i sig som gav de observerade effekterna eller om dessa bin var känsligare för växtskyddsmedelsexponering som ett resultat av andra patogener, t.ex. virus eller bakterier, är oklart. Att växtskyddsmedel och patogener kan samverka negativt är känt sedan tidigare (Doublet et al., 2015; Di Priscoa et al., 2013; Goulson et al., 2015). Tittar man på förgiftningseffekterna inom ett samhälle, A för sig och B för sig, ser det ut att finnas en tidseffekt där bin som har förvarats en längre stund i väntan på att bli matade uppvisar kraftigare symptom än de som matats direkt efter att de tagits från samhället. Denna effekt skulle kunna bero på att bina gått utan föda en längre stund och därför snabbare utnyttjar sockerlösningen innehållande växtskyddsmedel som föda, varvid de olika substanserna kommer ut i djurets cirkulation och hinner nå organ som påverkas. Räknat per bi var den totala mängden växtskyddsmedel 290 ng och av detta var 50 ng insekticider. Då ett bi kan antas väga ca 0,1 g motsvarar dosen insekticider ungefär 0,5 ppm.

3.2 Bestämning av kemiskt sura växtskyddsmedel i bin

Nytt i detta projekt var att utvärdera i vilken grad kemiskt sura växtskyddsmedel, bl.a. fenoxysyror, kan analyseras med den beskrivna uppberedningsmetodiken följt av detektion med LC-MS/MS med negativ jonisering. För 16 av dessa föreningar kunde stabiliteten i bimatrix utvärderas (Bilaga 1b). Beaktande att stabilitetsstudien utfördes vid relativt höga koncentrationer uppvisade följande tio ämnen så pass god analytisk kvalitet, med avseende på signal/brus-förhållanden för kvantifierings- och kvalificeringsjoner, samt spridning i data, att de sannolikt även är möjliga att analysera i fälstudier med lägre exponeringar: 2,4-D, bentazon, diklorprop, flupysulfuronmetyl, jodsulfuronmetyl, karfentrazonsyra, klopuralid, MCPA, mekoprop, mesosulfuronmetyl.

För följande substanser med kemiskt sura karaktärer som normalt ingår i miljöövervakningen för ytvatten var det inte möjligt att utvärdera stabilitet i bin med den för ytvatten framtagna metodiken med negativ jonisering, trots relativt höga koncentrationer: benazolin, diflufenikan, flonicamid, fluazinam, fludioxonil, metsulfuronmetyl, pikloram, propoxykarbazon, pyroxsulam, trinexapak-syra. Dock ingår diflufenikan, fludioxinil, metsulfuronmetyl och pyroxsulam även i LC-MS/MS metoden med positiv jonisering och stabiliteten för dessa ämnen i biprover kunde istället bestämmas med denna metodik och redovisas i Bilaga 1a.

3.3. Pesticiders individvariation i bin

3.3.1. Nektarprovtagning

Den använda provtagnings- och analysmetodiken för nektar från enskilda bin är nyutvecklad på laboratoriet för organisk miljö kemi (OMK), vid SLU, och användes för första gången i större skala i detta projekt. Principen är att en liten exakt volym nektar samlas in i en glaskapillär som sedan kan hanteras rationellt och med stor noggrannhet i det efterföljande analyssteget. Metodiken, kallad

capillary microsampling (CMS), har tidigare använts inom läkemedelsutveckling för hantering av små volymer blod, blodplasma och andra vätskeformiga provmatriser i studier på gnagare (Jonsson et al., 2012, Jonsson, 2013).

Positivt och något överraskande med metodiken var att det var så pass lätt är att utvinna nektar från bin som förvarats frysta, även under så långa perioder som flera år. Detta gör att nektarn inte behöver samlas i fält, i samband med provtagningen, utan istället kan utvinnas på det analytiska laboratoriet under rena och kontrollerade former. Den beskrivna proceduren där biets bakkropp avlägsnas och nektarn försiktigt pressas fram och samlas direkt i den analytiska kapillären är dessutom betydligt enklare än att försöka dissekera fram en intakt honungsblåsa, från vilken sedan en exakt volym ska tas för analys. I denna studie upparbetades nektarproverna med en enkel proteinfällning med acetonitril, men man kan även tillämpa en miniatyriserad vätske/vätske extraktion om det skulle behövas.

Alternativet där först den totala volymen nektar bestäms i en större glaskapillär varefter en exakt mindre volym överförs i en andra kapillär för analys fungerade bra och medförde inget större merarbete. I vissa fall, då biet var fuktigt efter frysförvaring och tining kunde det vara svårare att samla upp all nektar då denna delvis flöt ut åt sidorna på bakkroppens utsida. I dessa fall kan totalvolymen underskattas något. Ett exempel där detta tillvägagångssätt applicerats på nektar från jordhumlor visas i Bilaga 4 och Figur 8. Erfarenheterna hittills av hanteringen av jordhumlor är att de jämfört med honungsbin är svårare att extrahera nektar ifrån, detta då de är betydligt hårdare byggda.

Den utvecklade mikroprovtagningmetodiken lämpar sig för alla typer av vätskeformiga prover där volymen är starkt begränsad. Ett intressant område, vid sidan av nektar från enskilda bin, kunde vara att bestämma växtskyddsmedel och andra ämnen i guttationsdroppar och daggdroppar, som båda kan vara viktiga vattenkällor för bin och andra insekter, varför de kan utgöra en transportväg för kemikalier från fälten till de terrestra näringsvävarna.

3.3.2. Biallys

Metodiken som användes för analys av enskilda bin var något förenklad med avseende på upprensning av extrakten jämfört med den som användes för stabilitetsstudien och i tidigare screening studie (Jonsson et al., 2013). Detta motiverades av att endast ett bi upparbetades per prov och att därmed den förväntade mängden bakgrundsmatris som skulle kunna störa analysen minskades. Den i LC-MS/MS metoden använda injektionstekniken där provet först renas med hjälp av on-line SPE bidrog troligen till att metodiken uppförde sig robust trots den måttliga upprensningen i föregående steg. Metodiken skulle sannolikt kunna förenklas ytterligare med avseende på manuella moment och därmed erbjuda ökad provgenomströmning.

3.3.3. Individvariation

Koncentrationen av två insekticider, neonicotinoiderna klotianidin och tiakloprid, och de två fungiciderna (svampmedel) azoxystrobin och prokloraz, studerades i bin och nektar. De nyutvecklade analysmetoderna medgav att bivävnad och nektar kunde analyseras från ett och samma bi. Mellan 12 och 16 honungsbin från respektive samhälle studerades. Bina hade förvarats i frys vid ca -20°C i upp till två år. Då ett fullgott nektarprov tagits och honungsmagen tömts på nektar togs biets bakkropp och mellankropp med huvud och upparbetades och analyserades för sig.

Generellt kan man säga att spridningen var relativt stor mellan olika individer (Figur 5, 6, 8, 9,10, 12, 13 och 15). Nektar uppvisade större variation än själva bivävnaden, vilket är rimligt med tanke på att bivävnadens koncentration blir ett genomsnitt över en längre tid än bara den senaste

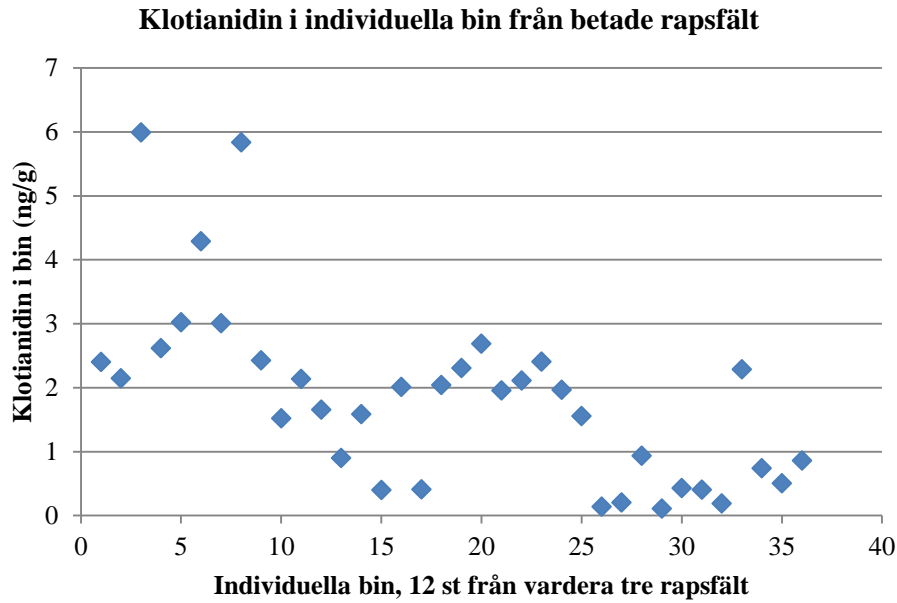
nektarinsamlingen. De funna relativa standardavvikelserna på 44-180 % för individvariationen i denna del av studien kan sättas i relation till de i den förhållandevis mycket mer kontrollerade stabilitetsstudien där varje bi matats med en exakt mängd (Bilaga 1). Med undantag för klotianidin uppvisade också dessa data en betydande variation med RSD värden kring 30-35 % i medel. Sett ur detta perspektiv är de funna variationerna i fältproverna inte anmärkningsvärt höga. Resultaten presenteras här som koncentrationsgrafer och med uträknade medelvärden och spridningsmått i form av procentuella relativa standardavvikelser ($\% \text{ RSD} = 100 * \text{standardavvikelse} / \text{medelvärde}$). Förutom de nedan redovisade fallen där i stort sett alla analyserade individer var exponerade för en viss substans, förekom det även enskilda fynd av andra substanser, där t.ex. endast ett eller två bin av de 16 bin som analyserats uppvisade detekterbara halter (data från dessa sporadiska fynd redovisas inte i rapporten). Detta visar återigen att bin inom ett samhälle födosöker på vitt skilda platser och grödor. Att endast analysera poolade prover, baserade på ett homogent av ett stort antal bin, ger här en ofullständig bild av exponeringen.

3.3.4. Klotianidin i honungsbin och nektar

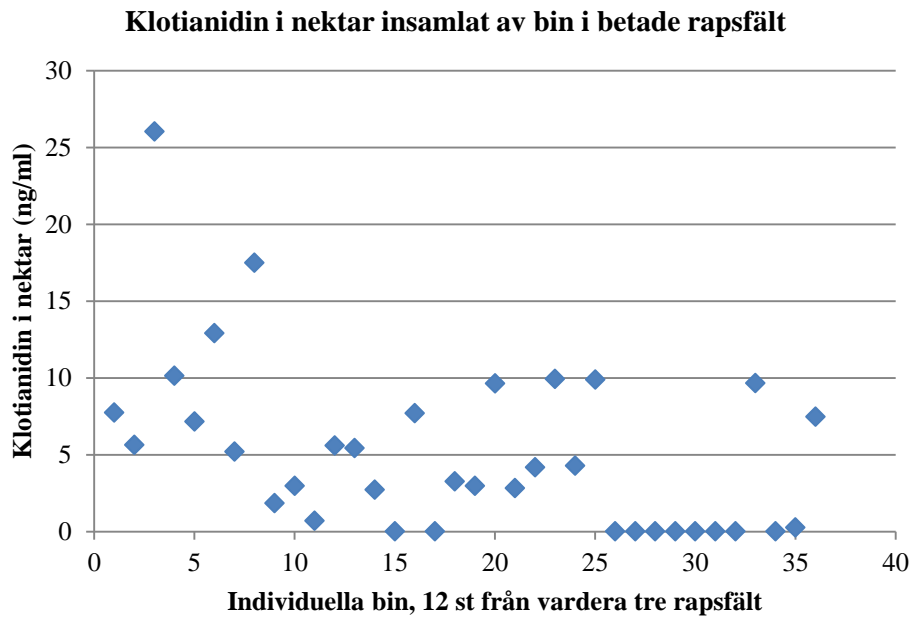
Koncentrationer av klotianidin funna i honungsbin och deras nektar visas i Tabell 1 och Figur 5-7. Bina var överblivna från tidigare fältstudie (Rundlöf et al., 2015a) och hade fångats in vid ingången till kupan och inte i själva rapsfälten. Data från de tre samhällena tyder på att spridningen är större i nektarproverna än i bivävnaden. Vidare kan man se att i det tredje samhället (C) är det åtta av tolv bin som troligen har födosökt utanför det betade rapsfältet då deras nektar inte innehåller detekterbara halter av klotianidin. De låga halterna i bivävnaden visar ändå på exponering från tidigare födosök. En viss korrelation mellan halter i bivävnad och nektar kan ses i Figur 7.

Tabell 1. Klotianidin i bivävnad och i nektar insamlat från 36 individer (samma bi analyserades för bägge matriserna) fördelat på tre samhällen (A, B och C) nära betade rapsfält. Proverna är från fältstudien utförd 2013 i södra Sverige (Rundlöf et al., 2015a)

Bi (samhälle och nr)	Bivävnad ng/g bi	Medel ng/g bi	% RSD	Nektar ng/ml	Medel ng/ml	% RSD
A1	2,4			7,7		
A2	2,1			5,6		
A3	6,0			26		
A4	2,6			10		
A5	3,0			7,2		
A6	4,3			13		
A7	3,0			5,2		
A8	5,8			17		
A9	2,4			1,8		
A10	1,5			3,0		
A11	2,1			0,7		
A12	1,7	3,1	49	5,6	8,6	84
B1	0,90			5,4		
B2	1,6			2,7		
B3	0,40			0		
B4	2,0			7,7		
B5	0,41			0		
B6	2,0			3,3		
B7	2,3			3,0		
B8	2,7			9,6		
B9	2,0			2,8		
B10	2,1			4,2		
B11	2,4			9,9		
B12	2,0	1,7	44	4,3	4,4	74
C1	1,6			9,9		
C2	0,14			0		
C3	0,20			0		
C4	0,93			0		
C5	0,11			0		
C6	0,43			0		
C7	0,41			0		
C8	0,19			0		
C9	2,3			9,7		
C10	0,74			0		
C11	0,51			0,3		
C12	0,86	0,70	94	7,5	2,3	180
Medel		1,8	77		5,1	111

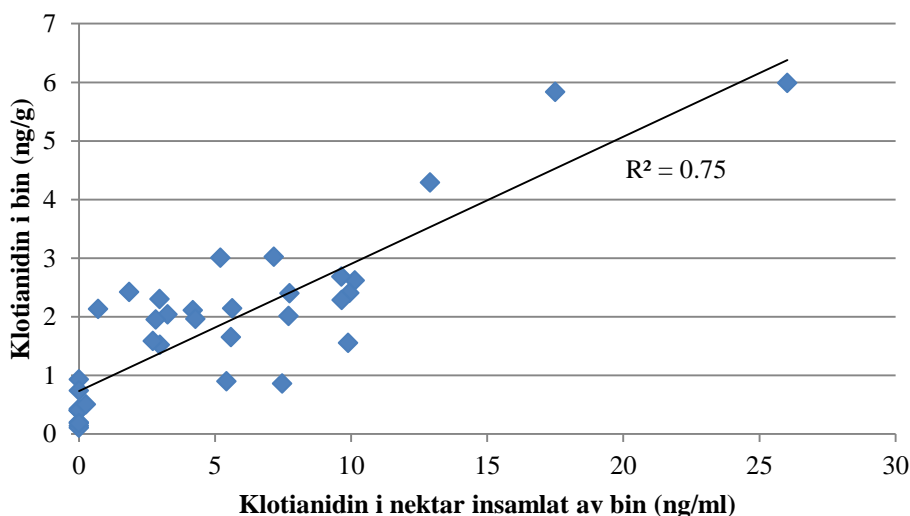


Figur 5. Halter av klotianidin i bivävnad (data från Tabell 1). Bina härrör från tre olika samhällen placerade invid tre geografiskt skilda rapsfält. Relativa standardavvikelsen för de 36 bina är 77 % och omfattar således även mellanfältsvariation. Proverna härrör från en fältstudie utförd 2013 i södra Sverige (Rundlöf et al., 2015a).



Figur 6. Halter av klotianidin i nektar (data från Tabell 1). Bina vars honungsblåsor tömtes på nektar härrör från tre olika samhällen placerade invid tre geografiskt skilda rapsfält. Relativa standardavvikelsen för nektarkoncentrationerna är 111 % och omfattar således även mellanfältsvariation. Proverna härrör från en fältstudie utförd 2013 i södra Sverige (Rundlöf et al., 2015a).

36 bin från betade rapsfält: Koncentration klotianidin i bin mot koncentration i nektar i samma bi

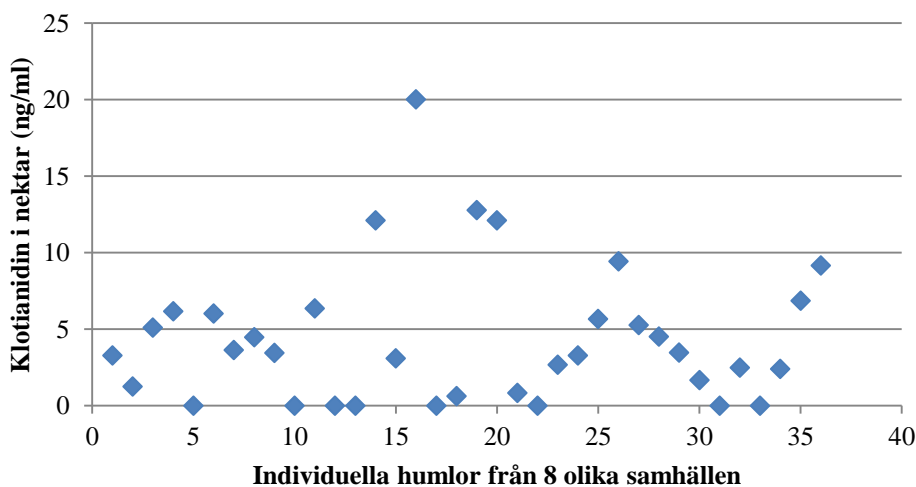


Figur 7. Korrelation mellan klotianidinkoncentrationer i bivävnad och i nektar insamlat av samma bi. Proverna härrör från en fältstudie utförd 2013 i södra Sverige (Rundlöf et al., 2015a).

3.3.5. Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor

I studien av nektar insamlat av jordhumlor, inom ramen för samma fältstudie som ovan (Rundlöf et al., 2015a), var det tillgängliga materialet mindre och endast 3-5 humlor analyserades från respektive samhälle. Å andra sidan kunde humlor från åtta olika klotianidinbetade fält studeras och det totala antalet exponerade humlor blev 36 stycken, se Figur 8. Medelkoncentrationen var 4,4 ng/ml och relativa standardavvikelsen var 103 %. Detta inkluderar variationen mellan fält och humlesamhällen. I samband med dessa analyser praktiserades för första gången även metodiken att uppskatta den totala nektarvolymen enligt beskrivning ovan. Resultaten från detta återges i Bilaga 4.

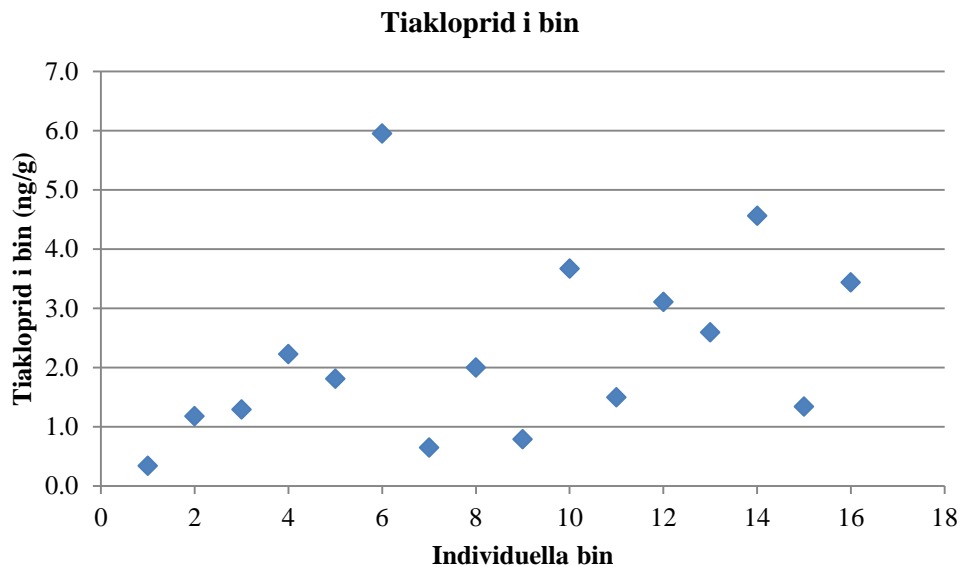
Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor vid betade rapsfält



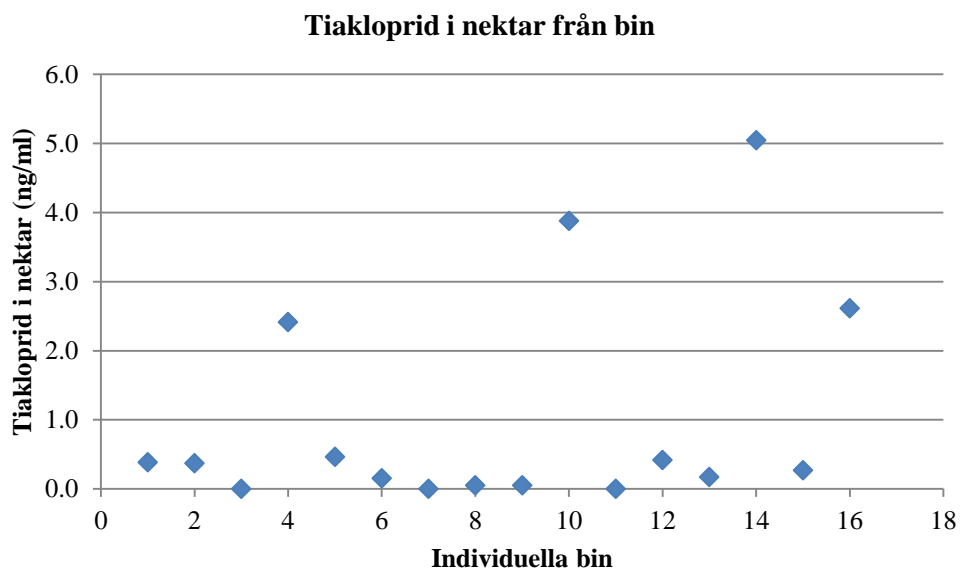
Figur 8. Klotianidinkoncentrationer i nektar insamlat av jordhumlor. Relativa standardavvikelsen är 103 %. Proverna härrör från en fältstudie utförd 2013 i södra Sverige (Rundlöf et al., 2015a).

3.3.6. Tiaklopid i honungsbin och nektar

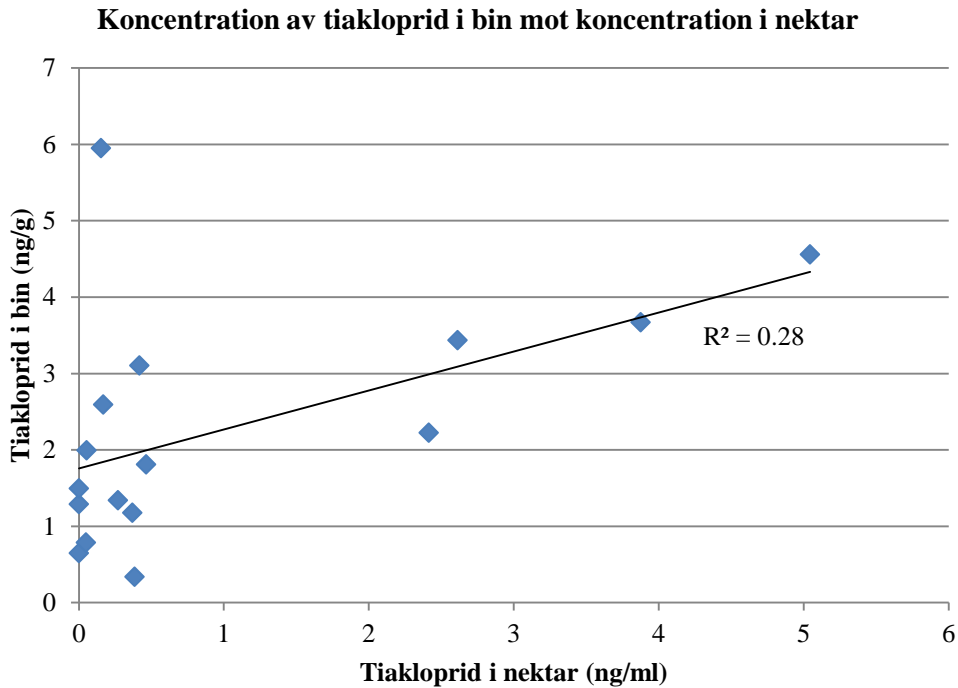
Koncentrationen av tiaklopid i bivävnad och nektar från 16 honungsbin insamlade från ett samhälle i samband med screeningstudien 2012 (Jonsson et al., 2013) visas i Figur 9-10. Medelkoncentrationen i bivävnad var 2,3 ng/g med en relativ standardavvikelse på 67 %, medan motsvarande siffror för nektar var 1,0 ng/ml och 155 %. Detektionsgränsen för tiaklopid i nektar var i denna studie 0,03 ng/ml, tre prover låg under denna gräns. Det finns ingen tydlig korrelation mellan halterna i dessa båda matriser, Figur 11.



Figur 9. Tiaklopidkoncentrationer i bivävnad. Proverna härrör från en screeningstudien utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).



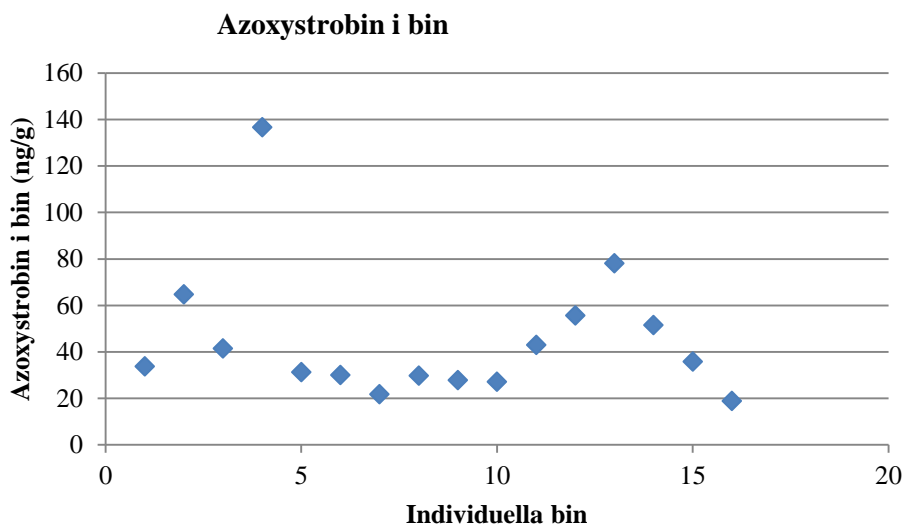
Figur 10. Tiaklopidkoncentrationer i nektar insamlat av honungsbin. Proverna härrör från en screeningstudien utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).



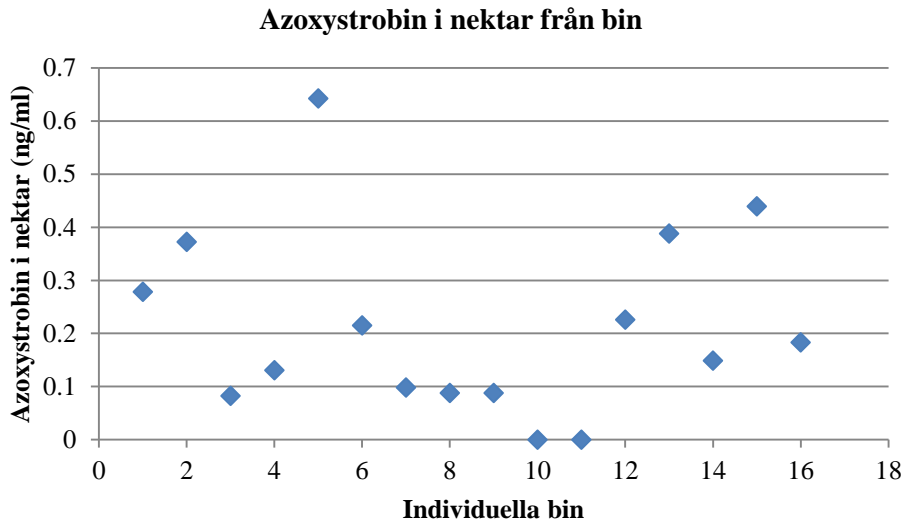
Figur 11. Korrelation mellan tiaklopridkoncentrationer i bivävnad och i nektar insamlat av samma bi. Proverna härrör från en screeningstudie utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).

3.3.7. Azoxystrobin i honungsbin och nektar

Azoxystrobin bestämt i 16 bin från ett samhälle i samband med screeningstudien 2012 (Jonsson et al., 2013). Medelkoncentrationen var 45 ng/g i bivävnad med en relativ standardavvikelse på 64 %, Figur 12. Motsvarande siffror för nektar var 0,21 ng/ml med en relativ standardavvikelse på 83 %, Figur 13.

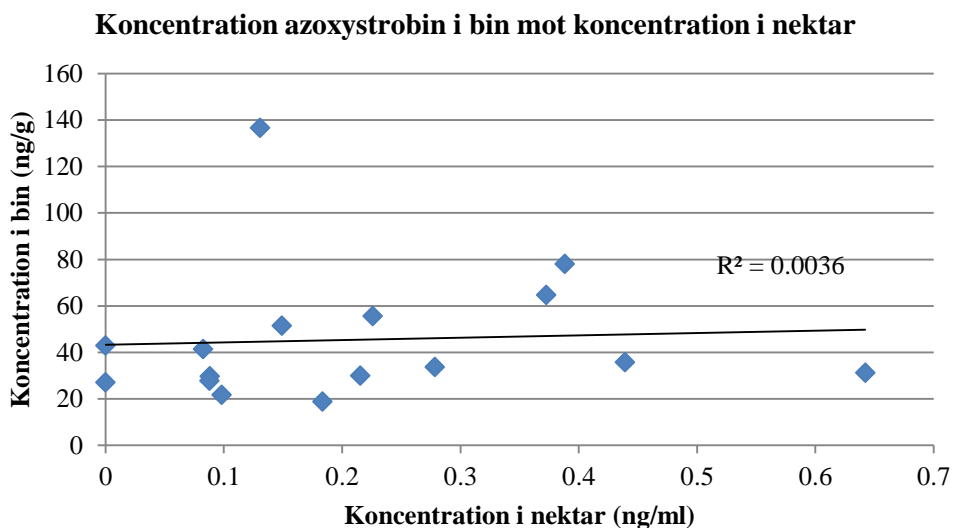


Figur 12. Azoxystrobinkoncentrationer i bivävnad. Proverna härrör från en screeningstudie utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).



Figur 13. Azoxystrobinkoncentrationer i nektar insamlad av bin. Proverna härrör från en screeningstudie utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).

Den stora skillnaden mellan koncentrationer i bivävnad mot de i nektar (ca 200 gånger) kan antyda att bina exponerats på annat sätt än via nektar. Det kan då vara så att de uppmätta halterna av azoxystrobin i bivävnaden härrör från binas exoskelett och behåring efter exponering från besprutning eller dammpartiklar, och att värdena därmed inte återspeglar vad som cirkulerar i biet. Alternativt härstammar den analyserade nektarn från födosök i andra växter än de som behandlats och de relativt höga halterna i bivävnad kommer sig av tidigare intag av annan nektar med förhöjda koncentrationer azoxystrobin. Bioackumulering skulle kunna vara en annan förklaring, men den uppmätta *in vivo* nedbrytningen på ca 50 % på en timme talar emot detta, Bilaga 1a. Den genomförda studien ger tyvärr inte några svar på dessa frågor. Som framgår av Figur 14 råder det ingen korrelation mellan koncentrationsdata för bivävnad och nektar för de studerade individerna.

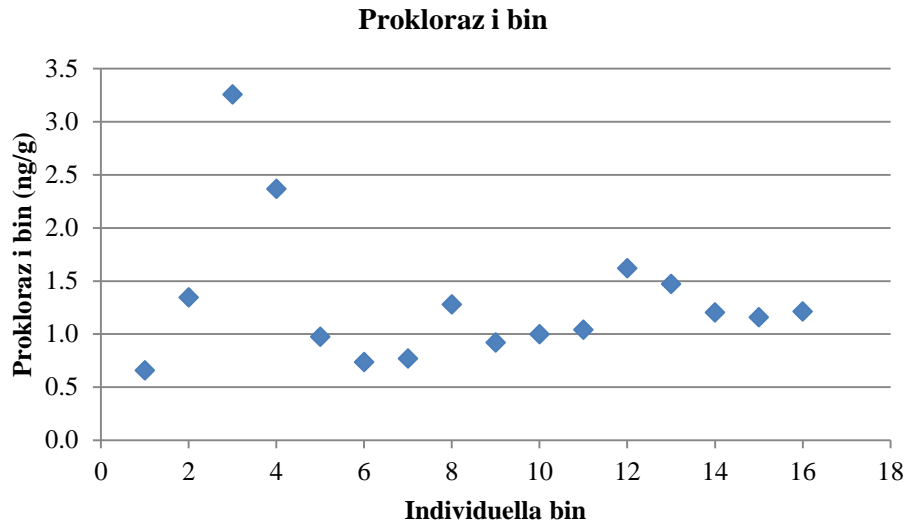


Figur 14. Korrelation mellan azoxystrobinkoncentrationer i bivävnad och i nektar insamlad av samma bi. Proverna härrör från en screeningstudie utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).

3.3.8 Prokloraz i honungsbin

Proklorazkoncentrationer bestämda i bin från screeningstudie 2012 presenteras i Figur 15.

Medelkoncentration för 16 bin var 1,3 ng/g med en relativ standardavvikelse på 50 %. I nektar från dessa bin gick det inte att påvisa någon prokloraz vid den aktuella detektionsgränsen på 0,5 ng/ml.



Figur 15. Proklorazkoncentrationer i bivävnad. Proverna härrör från en screeningstudie utförd 2012 i södra Sverige (Jonsson et al., 2013).

4. Slutsatser

- Den viktigaste orsaken till nedbrytning av växtskyddsmedel i insamlade biprover är för hög temperatur
- Biprover ska således kylas, eller ännu hellre frysas, i direkt anslutning till provtagningen och därefter transporteras och förvaras frysta i väntan på analys
- Växtskyddsmedel kan bestämmas i enskilda bin och i nektar insamlat av enskilda bin med bibehållen hög analyskvalité
- Korrelationen mellan koncentrationer i bivävnad och i nektar är obefintlig
- Exponeringen mellan olika individer i ett bisamhälle uppvisar stora variationer
- Vad som är en representativ provstorlek för ett bisamhälle kommer att variera från situation till situation och vara beroende av studerad substans, exponeringsvägar och förutsättningarna vad gäller födotillgång i samhällets närhet
- Att för biansalyser förenkla provhanteringen och analysen så mycket som möjligt, eventuellt med visst avkall på analytisk kvalité, till förmån för analys av ett större antal prover ger troligen mesta möjliga information om växtskyddsmedels spridning i den terrestra miljön, i förhållande till de satsade resurserna

5. Tackord

Den här rapporterade studien finansierades av Naturvårdsverket och CKB. Insamlingen av fältprover från honungsbisamhällen och jordhumlesamhällen organiserades dels av Institutionen för ekologi, SLU, Uppsala och dels av Biologiska institutionen vid Lunds Universitet. Matning av bin för efterföljande stabilitetsstudie utfördes av professor Ingemar Fries vid Institutionen för ekologi, SLU, Uppsala.

6. Referenser

- Bernal, J., Garrido-Bailon, E., del Nozal, M.J., Gonzalez-Porto, A.V., Martin-Hernandez, R., Diego, J.C., Jimenez, J.J., Bernal, J.L., Higes, M. 2010. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J. Econ. Entomol.* 103,1964–1971.
- Bromenshenki, J.J., Carlson, S.R., Simpson, J.C., Thomas, J.M. 1985. Pollution Monitoring of Puget Sound with Honey Bees. *Science* 4687, 632-634.
- Chauzat, M-P., Faucon, J-P., Martel, A-C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99, 253-262.
- Chauzat, M-P., Martel, A-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J-P. 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera Apidae) to monitor pesticide presences in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 103–111.
- Devillers, J., Pham-Delègue, M.-H. (redaktörer och medförfattare) 2002. Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. E-Bok, ISBN 0-203-27408-3.
<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Beekeeping/Honey-Bees-Estimating.pdf>
- Di Priscoa, G., Cavaliereb, V., Annosciac, D., Varricchioa, P., Caprioa, E., Nazzic, F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS* 110, 46, 18466–18471.
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.M., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J. 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology* 17, 969-983.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 6229, 347.
- Jansson C. and Kreuger J. 2010. Multiresidue analysis of 95 pesticides at low nanogram/liter levels in surface waters using online preconcentration and high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 93, 1732-1747
- Jonsson, O., Palma Villar, R., Nilsson, L.B., Norsten-Höög, C., Brogren, J., Eriksson, M., Königsson K., Samuelsson, A. 2012. Capillary microsampling of 25 µL blood or plasma for the determination of toxicokinetic parameters in regulatory studies in animals. *Bioanalysis* 4, 661-674.

Jonsson, O. 2013. Capillary microsampling, samt del i kapitlen "Case studies" (96-118) och "Future perspectives" (134-143). In: *Microsampling in pharmaceutical bioanalysis* (eBook), Emmons, G. och Zane, P. (Eds). Future Medicine.

Jonsson, O., Fries, I., Kreuger, J. 2013. Utveckling av analysmetoder och screening av växtskyddsmedel i bin och pollen. CKB rapport 2013:1. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.

Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S. 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* 5, e9754.

Rundlöf M., Lundin O., Bommarco R. 2012. Växtskyddsmedlens påverkan på biologisk mångfald i jordbrukslandskapet. CKB rapport 2012:2. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.

Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G. 2015a. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77-80.

Rundlöf, M., Bommarco, R., Fries, I., Smith, H.G., Rahbek Pedersen, T. 2015b. Inventering av risken för förgiftning av bin med växtskyddsmedel av typen neonicotinoider under svenska förhållanden. Jordbruksverkets rapport 2015:24.

7. Bilagor

Bilaga 1. Stabilitet vid olika förvaring

Bilaga 2. Spridning i tillsatsprover jämfört med stabilitetsprover

Bilaga 3. Förgiftningspåverkan efter matning av bin med en mix av 91 växtskyddsmedel

Bilaga 4. Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor

Bilaga 5. Analysmetodik

Bilaga 1 – Stabilitet vid olika förvaring

Bilaga 1a. Stabilitet för olika pesticider (bestämda med LC-MS/MS och positiv jonisering) vid förvaring i frys i 0,5-21 månader, samt efter 1 timme i levande bin (*in vivo*) och 22 timmar i döda bin i rumstemperatur. Värden anger återfunnen halt i procent av halten uppmätt vid noll månader, följt av relativ standardavvikelse (%) för de ingående stabilitetsproverna (n=3 för 0,5, 1, 2,5 månader, 1 h *in vivo* och 22 h rum; n=4 för 4,5 månader; n=8 för 21 månader)

Substans	0,5 mån	% RSD	1 mån	% RSD	2,5 mån	% RSD	4,5 mån	% RSD	21 mån	% RSD	1 h <i>in vivo</i>	% RSD	22 h rum	% RSD
acetamiprid	139	45	116	39	106	3	128	46	119	22	56	13	90	1
alaklor	84	52	50	66	54	26	73	48	66	36	29	32	28	2
atrazin	130	21	102	12	102	18	84	23	78	22	108	10	108	3
atrazindesetyl	119	11	92	31	81	7	86	27	80	19	104	10	107	3
atrazindesisopropyl	134	26	97	23	99	12	95	23	90	19	103	1	105	3
azoxystrobin	125	32	96	43	103	9	98	55	91	26	49	15	70	18
BAM	145	19	102	25	102	7	98	31	104	14	96	5	108	7
bifenox	127	12	110	11	88	11	84	18	91	28	83	11	60	17
bitertanol	106	15	73	34	88	23	69	37	81	47	72	18	69	10
cyanazin	159	30	97	26	93	7	87	30	89	23	76	10	90	12
cyazofamid	151	17	86	26	92	12	107	16	104	49	58	30	59	3
cybutryn	129	23	73	18	74	7	98	27	80	31	67	5	64	11
difenokonazol	99	12	82	48	72	14	83	33	26	23	64	6	52	2
diflufenikan	109	28	104	23	186	92	120	30	115	18	92	12	66	4
dimetoat	102	18	88	28	80	4	79	48	89	37	70	8	86	4
diuron	137	15	108	11	113	18	97	42	64	25	87	7	94	22
epoxikonazol	112	8	68	39	80	10	89	26	83	43	60	26	75	8
fenarimol	110	15	77	20	92	2	86	27	57	11	81	2	79	6
fenpropidin	142	25	77	46	96	25	112	40	19	19	48	84	84	5
fenpropimorf	148	15	109	30	112	12	155	20	147	25	58	61	68	9
fludioxonil	153	27	83	38	91	25	119	41	121	62	108	13	81	7
flurprimidol	161	35	117	34	99	8	129	59	117	57	39	22	52	21

Substans	0,5 mån	% RSD	1 mån	% RSD	2,5 mån	% RSD	4,5 mån	% RSD	21 mån	% RSD	1 h <i>in vivo</i>	% RSD	22 h rum	% RSD
flurtamon	108	27	92	21	86	9	102	29	116	15	75	3	66	17
flusilazol	113	24	76	26	74	14	101	40	77	32	51	15	64	8
foramsulfuron	118	39	102	53	95	28	129	63	95	25	145	19	94	6
fuberidazol	125	18	101	40	102	13	94	49	98	24	65	11	88	5
hexazinon	162	21	109	31	107	2	107	32	115	25	60	16	87	4
hexytiasox	84	12	72	9	72	4	91	15	109	35	68	24	50	17
imazalil	122	17	93	18	103	6	108	29	90	11	83	7	80	2
imidakloprid	122	32	115	18	109	17	112	38	112	22	56	15	100	4
isoproturon	103	6	91	15	93	10	83	29	97	18	83	5	75	11
karbendazim	120	17	84	8	81	11	74	31	76	20	98	9	108	3
karbofuran	174	34	135	41	104	19	109	52	90	35	36	31	42	19
klomazon	86	45	65	46	77	20	82	46	76	43	44	28	61	17
klorfeninfos	111	59	58	76	55	28	80	61	44	37	29	36	25	39
kloridazon	117	17	103	20	90	15	98	30	94	19	106	6	89	2
klorpyrifos	90	22	76	3	70	6	108	17	169	34	70	16	54	11
klotianidin	114	16	105	10	99	9	99	25	99	8	90	5	99	6
linuron	86	33	74	33	64	23	108	61	132	25	75	12	61	17
mandipropamid	121	44	75	53	81	9	102	43	147	25	41	7	43	22
metabenstiazuron	128	5	105	14	123	31	85	25	80	25	93	7	100	9
metalaxyl	138	31	123	26	128	26	110	48	122	27	43	21	74	12
metamitron	126	15	93	28	84	11	92	33	91	23	88	6	95	3
metazaklor	114	35	98	45	109	30	94	63	99	40	34	32	58	1
metiokarb	93	46	56	72	35	6	76	41	79	28	22	44	14	45
metolaklor	89	53	54	66	63	36	86	54	82	38	27	26	39	14
metrafenon	103	23	85	34	87	20	81	23	83	32	64	21	62	7
metribuzin	136	22	115	20	97	26	90	14	92	17	103	6	99	2
metsulfuronmetyl	118	25	96	39	95	36	125	50	141	29	129	17	90	9
pendimetalin	83	22	82	12	66	10	100	26	144	27	56	12	41	5
penkonazol	127	21	84	19	87	21	107	13	73	40	60	29	68	7

Substans	0,5 mån	% RSD	1 mån	% RSD	2,5 mån	% RSD	4,5 mån	% RSD	21 mån	% RSD	1 h <i>in vivo</i>	% RSD	22 h rum	% RSD
pikoxystrobin	97	24	74	16	75	9	89	26	98	21	65	3	67	15
pirimikarb	202	45	170	47	124	21	150	44	137	42	31	24	38	1
prokloraz	86	25	59	56	60	22	75	42	55	35	51	8	48	1
propikonazol	111	57	74	52	75	25	79	44	56	37	45	22	63	7
propyzamid	109	18	88	21	74	1	85	29	104	30	78	4	75	19
prosulfokarb	96	10	80	22	75	12	113	49	9	99	61	8	55	4
pyraklostrobin	101	20	90	13	87	11	120	22	119	17	93	8	78	4
pyroxsulam	118	12	83	39	106	31	113	43	108	31	141	25	107	13
quinoxifen	92	17	89	5	67	6	106	18	140	30	81	9	62	6
rimsulfuron	99	17	83	44	80	19	156	78	84	25	125	19	18	37
siltiofam	90	43	68	61	71	20	92	42	79	37	34	21	48	8
simazin	173	16	111	27	102	9	106	16	99	23	87	14	96	5
spiroxamin	213	37	82	49	91	21	123	33	99	19	45	86	69	11
taufaluvalinat	100	53	136	35	96	18	133	71	NA	-	92	23	79	18
terbutryn	128	19	79	26	80	13	93	27	NA	-	69	10	65	9
terbutylazin	102	5	91	6	91	5	79	27	95	11	98	5	94	4
terbutylazindesetyl	123	53	143	34	125	34	87	31	89	28	148	17	102	5
tiaklopid	164	57	130	56	118	7	143	49	100	37	57	3	91	2
tiametoxam	157	81	124	54	94	17	160	86	119	32	78	31	89	14
tolklofosmetyl	108	33	88	11	81	18	95	28	63	56	72	40	54	18
tribenuronmetyl	135	39	121	33	106	17	99	35	99	27	97	9	36	34
trifloxystrobin	103	14	85	15	82	1	91	22	90	24	86	5	68	4
trinexapak-etyl	124	21	111	25	97	27	85	24	94	31	79	6	72	4
tritikonazol	106	20	76	38	87	14	79	44	78	35	54	18	77	11

NA= ingick ej vid analystillfället

Bilaga 1b. Stabilitet för olika pesticider (bestämda med LC-MS/MS och negativ jonisering) vid förvaring i frys, efter 1 timme i levande bin samt 22 timmar i döda bin i rumstemperatur. Värden anger återfunnen halt i procent av halten uppmätt vid noll månader, följt av relativ standardavvikelse (%) för de ingående stabilitetsproverna (n=3 för 0,5, 1, 2,5 månader, 1 h *in vivo* och 22 h rum, n=4 för 4,5 månader och n=8 för 21 månader).

Substans	0,5 mån	% RSD	1 mån	% RSD	2,5 mån	% RSD	4,5 mån	% RSD	21 mån	% RSD	1 h <i>in vivo</i>	% RSD	22 h rum	% RSD
2,4-D	106	11	86	24	98	10	106	20	111	12	108	6	101	2
bentazon	105	32	114	5	102	10	95	23	96	13	73	11	83	15
bifenox-syra	90	1	79	13	78	16	65	17	50	43	95	4	101	22
diklorprop	121	11	98	15	84	2	100	17	104	13	93	11	87	6
florasulam	104	22	86	16	91	27	69	33	91	20	141	17	148	28
flupyrsulfuronmetyl	106	21	95	17	92	13	93	22	88	31	84	13	65	23
fluroxipyr	131	11	91	32	114	29	100	32	95	17	123	20	116	24
jodsulfuronmetyl	85	21	88	28	78	19	89	18	63	25	85	10	68	10
karfentrazensyra	106	11	116	18	135	10	104	20	94	13	109	19	139	6
klopyralid	151	25	117	34	116	13	133	27	132	19	85	19	79	11
MCPA	90	4	90	17	84	21	88	17	85	17	99	14	88	12
mekoprop	105	11	91	11	86	19	97	15	105	15	78	17	83	9
mesosulfuronmetyl	97	28	89	35	101	12	118	23	140	18	79	13	74	13
sulfosulfuron	80	14	90	21	96	16	86	24	73	14	99	14	98	7
tifensulfuronmetyl	102	17	85	11	99	13	80	21	61	23	130	6	91	30
triflursulfuronmetyl	100	10	83	35	69	21	70	40	52	41	54	6	57	32

Bilaga 2 – Spridning i tillsatsprover jämfört med stabilitetsprover

Jämförelse av medelvärden för spridning, uttryckt som % RSD (% relativ standardavvikelse), mellan tillsatsprover och stabilitetsprover.

Substans	Tillsatser	Stabilitetsprover	Substans	Tillsatser	Stabilitetsprover	Substans	Tillsatser	Stabilitetsprover
acetamiprid	7	28	hexazinon	5	22	pirimikarb	5	40
alaklor	5	43	hexytiasox	14	15	prokloraz	4	32
atrazin	4	18	imazalil	6	15	propikonazol	7	41
atrazindesetyl	6	17	imidakloprid	4	23	propyzamid	11	17
atrazindesisopropyl	6	18	isoproturon	2	14	prosulfokarb	8	33
azoxystrobin	6	30	karbendazim	7	15	pyraklostrobin	4	15
BAM	4	17	karbofuran	4	35	pyroxsulam	19	30
bifenox	7	16	klomazon	9	38	quinoxifen	13	15
bitertanol	6	31	klorfenvinfos	5	49	rimsulfuron	22	35
cyanazin	8	21	kloridazon	6	17	siltiofam	6	36
cyazofamid	6	27	klorpyrifos	15	16	simazin	6	18
cybutryn	5	21	klotianidin	3	12	spiroxamin	13	28
difenokonazol	6	23	linuron	13	31	taufluvalinat	17	40
diflufenikan	6	34	mandipropamid	8	29	terbutryn	5	22
dimetoat	6	25	metabenstiazuron	6	18	terbutylazin	6	10
diuron	8	20	metalaxyl	4	30	terbutylazindesetyl	9	35
epoxikonazol	4	26	metamitron	5	20	tiakloprid	8	35
fenarimol	4	13	metazaklor	3	41	tiametoxam	7	52
fenpropidin	12	35	metiokarb	8	43	tolklofosmetyl	17	27
fenpropimorf	6	30	metolaklor	4	45	tribenuronmetyl	9	27
fludioxonil	15	36	metrafenon	5	25	trifloxystrobin	5	13
flurprimidol	10	36	metribuzin	6	18	triflusuulfuronmetyl	13	31
flurtamon	3	17	metsulfuronmetyl	23	32	trinexapak-etyl	9	25
flusilazol	6	25	pendimetalin	14	18	tritikonazol	6	27
foramsulfuron	13	37	penkonazol	8	24			
fuberidazol	7	26	pikoxystrobin	5	17			

Substans	Tillsatser	Stabilitetsprover	Substans	Tillsatser	Stabilitetsprover
2,4-D	9	14	karfentrazonsyra	9	15
bentazon	6	16	klopyralid	6	23
bifenox-syra	8	16	MCPA	9	15
diklorprop	6	12	mekoprop	6	15
florasulam	9	22	mesosulfuronmetyl	11	21
flupyrsulfuronmetyl	10	19	sulfosulfuron	12	17
fluroxipyr	9	24	tifensulfuronmetyl	15	15
jodsulfuronmetyl	10	20	triflusulfuronmetyl	13	26

Ämnena på denna sida analyseras med en LC-MS/MS metod med negativ jonisering till skillnad från de som listats på föregående sida som analyseras med hjälp av positiv jonisering, därav uppdelningen i tabellen.

Bilaga 3 – Förgiftningspåverkan efter matning av bin med mix av 91 växtskyddsmedel

Förgiftningspåverkan på bin efter individuell matning med 10 µl sockerlösning innehållande 290 ng växtskyddsmedel, varav 50 ng insekticider, för efterföljande stabilitetsstudie. Observationer gjorda 50-60 min efter matning. I matningsstudien ingick bin från två olika bisamhällen, A och B, där samhälle B var mer påverkat av varroakvalster än samhälle A. Totalt ingick 96 bin (2 samhällen x 12 matningar x 4 bin per matning).

Bisamhälle	Matningsordning	Antal bin per kategori				Summa poäng (påverkan)	Medel poäng per samhälle
		Opåverkade (0 poäng/bi)	Påverkade (1 poäng/bi)	Kraftigt påverkade (2 poäng/bi)	Döda (3 poäng/bi)		
A	1	3	1			1	
A	2	2	2			2	
A	3	4				0	
A	4	4				0	
A	5	4				0	
A	6	4				0	
A	7	2	2			2	
A	8	2	2			2	
A	9	1	2	1		4	
A	10	3	1			1	
A	11	1	2	1		4	
A	12	3	1			1	1,4
B	1	2	1		1	4	
B	2	2	2			2	
B	3	1	2		1	5	
B	4	1	3			3	
B	5	1	2		1	5	
B	6		3	1		5	
B	7			4		8	
B	8			3	1	9	
B	9			2	2	10	
B	10			4		8	
B	11			4		8	
B	12			3	1	9	6,3

Graden av förgiftningspåverkan bedömdes lekmanmässigt och graderades enligt: Opåverkade= 0 poäng/bi. Påverkade (svårt att flyga, vingligt rörelsemönster) =1 poäng/bi. Kraftigt påverkade (flyger ej, kan ej gå, ligger på sida eller rygg, krampar)=2 poäng/bi. Döda =3 poäng/bi.

Bilaga 4 – Klotianidin i nektar insamlat av jordhumlor

Lokal Nr-individ	Koncentration klotianidin i nektar (ng/ml)	Uppskattad total volym nektar (ml)	Total mängd klotianidin (ng)
Kontroll 1 ^a	0	0,081	0
Kontroll 2 ^a	0	0,058	0
Kontroll 3 ^b	0	0,011	0
Kontroll 4 ^a	0	0,028	0
Kontroll 5 ^c	0	0,067	0
Kontroll 6 ^c	0	0,08	0
Kontroll 7 ^c	0	0,116	0
Kontroll 8 ^a	0	0,074	0
Betat 1-2	3,3	0,012	0,039
Betat 1-3	1,2	0,010	0,012
Betat 1-4 (4µl)	5,1	0,004	0,020
Betat 1-5 (3µl)	6,2	0,003	0,019
Betat 2-1	0	0,018	0
Betat 2-2	6,0	0,003	0,018
Betat 2-3	3,6	0,04	0,146
Betat 2-4	4,5	0,021	0,094
Betat 2-5	3,5	0,008	0,028
Betat 3-1	0	0,024	0
Betat 3-2	6,4	0,035	0,223
Betat 3-3 (2,75µl)	0	0,0028	0
Betat 3-5 (4µl)	0	0,0070	0
Betat 4-1	12	0,039	0,472
Betat 4-2	3,1	0,0080	0,025
Betat 4-3	20	0,041	0,821
Betat 4-4 (2,5µl)	0	0,0025	0
Betat 4-5 (2,5µl)	0,6	0,0025	0,002
Betat 5-1	13	0,058	0,741
Betat 5-2	12	0,012	0,145
Betat 5-3	0,84	0,008	0,007
Betat 5-4	0	0,063	0
Betat 5-5	2,7	0,028	0,075
Betat 6-1	3,3	0,014	0,046
Betat 6-2	5,7	0,068	0,386
Betat 6-3	9,4	0,018	0,170
Betat 6-4	5,3	0,012	0,063
Betat 6-5	4,5	0,020	0,090
Betat 7-1	3,5	0,020	0,070
Betat 7-2 (4µl)	1,7	0,007	0,012
Betat 7-3 (4µl)	0	0,007	0
Betat 7-4	2,5	0,014	0,035
Betat 7-5	0	0,035	0
Betat 8-2	2,4	0,008	0,019
Betat 8-3	6,9	0,039	0,267
Betat 8-5	9,2	0,010	0,092

^a poolat från 3 humlor ^b baserat på 1 humla, ^c poolat från 4 humlor.

Värden inom parentes anger provvolym från humlor som hade mindre än 8 µl nektar.

Där ingen volym anges analyserades 8 µl nektar av den totala volymen.

Bilaga 5 – Analysmetodik

Analysmetodik för bin, provupparbetning.

1. Fyra bin (motsvarar ca 0,4-0,5 g) i ett 50 ml polypropenrör (PP) (tex Falcon).
2. Tillsatts av torkmedel
Torr Na_2SO_4 , ca 2,5 g vägs in i provrören.
3. Homogenisering av prov/torkmedel.
Provet och torkmedlet homogeniseras manuellt med hjälp av en 8 mm glasstav med rundad ände. Viktigt att provet finfördelas så mycket som möjligt. Glasstaven rengörs mellan varje prov, dels ”mekaniskt” med pappersservett och dels med etanol och aceton. Staven torkas slutligen torr med en ren servett.
4. Tillsatts av internstandard till homogenatet.
5. Tillsatts av extraktionsmedium
6 ml aceton:etylacetat (7:3, v/v) sätts till provet
6. Extraktion under ultraljud
Proverna extraheras med hjälp av en ultraljudsutrustning, Sonics VCX-130 utrustad med en 6 mm probe, i 1 minut och vid 50 % amplitud.
7. Centrifugering, 3000 x g i 3 minuter
8. Dekantera supernatanten till 15 ml Falconrör
9. Tillsats av ytterligare 3 ml aceton:etylacetat (7:3)
10. Extraktion på vortex-mixer, Heidolph MultiReax, maxfart, 2 minuter
11. Centrifugering, 3000 x g i 3 minuter
12. Överför 1,5 ml av supernatanten till en 2 ml glasvial för efterföljande bestämning av sura analyter med LC-MS/MS, ES-.
13. Resterande ca 6 ml extrakt dekanteras till dispersiv fastfasextraktions (dSPE) rör (Phenomenex, KSO-8921) innehållande 150 mg primär/sekundär amin (PSA), 150 mg octadecyl (C18) silica och 900 mg magnesiumsulfat.
14. Rören mixas på vortex-mixer, Heidolph MultiReax, maxfart, 2 minuter
15. Centrifugering, 3000 x g i 3 minuter
16. Dekantera till nytt 15 ml PP rör för indunstning
17. Tvätta dSPE röret med 2 ml aceton:etylacetat (7:3), mixa i 1 minut, centrifugera 3000 x g i 3 min, dekantera även denna volym till 15 ml röret.
18. Indunstning i 40°C vattenbad och under kvävgasflöde.
19. Återlösning av indunstningsrest:
100 µl acetonitril tillsätts och rören mixas på Heidolph MultiReax 10 min vid maxfart.
(Observera att alla indunstningsrester ej kommer gå i lösning under dessa förhållanden, vilket är i sin ordning)
20. Centrifugera 3 min vid 3000 x g
21. Överföring till injektionsvialer
Extraktet förs över till en 300 µL insatsvial som placeras i en 2 ml glasvial
22. Upprepa steg 19-21 men med 2 min skak.

23. För de kemiskt sura substanserna återlöstes först indunstningsresten i 1 ml 2,2 mM ammoniumacetatlösning, pH ca 6, på skak i 30 min. Efter sprutfiltrering ner i 2 ml vial tillsattes 0,6 ml 2 % myrsyra och 250 µl injicerades på LC-MS/MS (ES-) systemet

24. Kromatografisk haltbestämning

Positiv jonisering.

LC-MS/MS (ES+) utrustad med trapsystem (Strata C18 och Strata X i serie, Agilent) och C18 kolonn (Eclipse plus 3x100 mm, 3,5 µm, Agilent), 10 µl acetonitrilextrakt injiceras. En metanolgradient i ammoniumformiat, pH 4, används för eluering.

Negativ jonisering (för fenoxisyror och andra sura substanser).

LC-MS/MS (ES-) utrustad med trapsystem (PLRP trapkolonn) och kromatografisk C18 kolonn (Eclipse plus 3x100 mm, 3,5 µm, Agilent), 250 µl (5x50 µl) av de återlösta och pH justerade extrakten injiceras. En acetonitrilgradient i vatten och 0,1% ättiksyra, används för eluering.

I övrigt utfördes analyserna med den instrumentering och de inställningar som används för det certifierade miljöövervakningsarbetet vid laboratoriet för organisk miljökemi. För detaljer hänvisas till metodbeskrivningar för OMK 57 (LC-MS/MS ES+) och OMK 58 (LC-MS/MS ES-).

Analysmetodik, kalibreringsprover och tillsattsprover

Kalibreringsprover för upprättande av standardkurvor som används till kvantifiering tillverkades i acetonitril.

Tillsattsprover bereddes genom att spika bi-homogenat motsvarande fyra bin i 50 ml PP rör med lämplig mängd standardlösning spädd i 400 µl aceton. Rören fick stå och dunsta minst en timme utan lock under punktutug. Proverna upparbetades sedan enligt beskrivningen ovan och den relativa LC-MS/MS responsen för var och en av substanserna (i relation till internstandarderna) jämfördes med motsvarande för kalibreringskurvan för att beräkna halter.

Blank provmatris och lösningsmedelsblankar ingick i alla analysomgångar