



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier

- og metoder til undersøgelse af denne

Bekæmpelsesmiddelforskning fra
Miljøstyrelsen nr. 148, 2013

Titel:

Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier – og metoder til undersøgelse af denne

Redaktion:

Marianne Bruus¹, Yoko L. Dupont¹, Ruth Grant¹, Solvejg K. Mathiassen², Per Kryger², Niels Henrik Spliid², Michael Stjernholm¹, Beate Strandberg¹, Peter Borgen Sørensen¹

1. Aarhus Universitet, Institut for Bioscience
2. Aarhus Universitet, Institut for Agroøkologi

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2013

ISBN nr.

978-87-92903-76-1

Ansvarsfraskrivelse:

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	7
Undersøgelsens hovedkonklusioner	7
Summary	9
Main conclusions	9
1. Baggrund	11
2. Metoder	15
2.1 Feltundersøgelser.....	15
2.1.1 Udvalgelse og karakterisering af værkstedsområder.....	15
2.1.2 Pesticideksponering af humlebier	17
2.1.3 Humlebiernes trivsel.....	20
2.1.4 Abundans og diversitet af bier i kløvermarker	20
2.2 Giftighed af udvalgte sprøjtemidler for forskellige typer bier	20
2.2.1 Test med murerbi.....	21
2.2.2 Test med humlebi.....	22
2.3 Indirekte effekter – målt på rød- og hvidkløver	23
2.3.1 Dyrkning.....	23
2.3.2 Valg af herbicider	23
2.3.3 Sprøjtning.....	23
2.3.4 Effekt på biomasse	24
2.3.5 Længde af blomstringsperioden	24
2.3.6 Herbiciders effekt på pollenproduktion, nektarproduktion og nektarkvalitet.	24
2.3.7 Effekt på frøproduktion	24
2.3.8 Data analyse	25
2.4 Sukkermængde og -indhold i mulige fokusplanter	25
3. Resultater	27
3.1 Feltundersøgelser.....	27
3.1.1 Værkstedsområdernes karakteristika	27
3.1.2 Pesticidindhold i jordhumler	32
3.1.3 Humlebiernes trivsel.....	38
3.1.4 Forekomst af blomsterbesøgende bier	39
3.2 Giftigheden af forskellige sprøjtemidler for murerbi og jordhumle	39
3.2.1 Direkte effekter på jordhumle og murerbi	39
3.3 Indirekte effekter målt på rød- og hvidkløver	41
3.3.1 Effekt på biomasse	41
3.3.2 Effekt på blomstring	43
3.3.3 Effekt på nektar- og pollenproduktion	43
3.3.4 Effekt på frøproduktion	46
3.4 Sukkermængde i mulige fokusplanter	47
4. Diskussion	51
4.1 Eksponering	51

4.1.1	Værkstedsområder	51
4.1.2	Pesticidindhold i jordhumler	52
4.1.3	Humblebiernes trivsel.....	53
4.1.4	Forekomst af blomsterbesøgende bier	53
4.2	giftigheden af forskellige sprøjtemidler	54
4.2.1	Direkte effekter på jordhumle og murerbi	54
4.2.2	Indirekte effekter målt på rød- og hvidkløver.....	55
4.3	Suktermængde og –indhold i samt forekomst af mulige fokusplanter	56
5.	Konklusioner	59
6.	Perspektivering	61
6.1	Forskningsmæssige perspektiver	61
6.2	Administrative perspektiver	62
	Referencer	63
Bilag 1:	Prioriteret rækkefølge af udvalgte parametre ved udvælgelse af mulige værkstedsområder	67

Forord

I denne rapport beskriver vi resultaterne af det arbejde, der er udført i forbindelse med pilotprojektet ”Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier og honningbier”. Projektet er udført af Aarhus Universitet med støtte fra Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning i perioden 2010-2012.

Ud over forfatterne til denne rapport har følgende AU-medarbejdere bidraget til projektet: Anna Marie Plejdrup, Lise Lauridsen, John Rytter, Trine Guldager Sørensen, Elin Jørgensen, Kirsten Heinrichson og Zdenek Gavor. Desuden har Vibeke Simonsen deltaget i optællingen af honning- og humlebier i kløvermarkerne. De to værkstedsområder ligger på bedrifterne ejet af Peter Stougaard, Fensten, og Kirsten Eriknauer, Rodstenseje. Forfatterne takker ejerne for deres velvillighed til at deltage i undersøgelsen og tolerance over for vores færden i og uden for deres marker.

Projektet har været fulgt af en følgegruppe bestående af Ilse Ankjær Rasmussen fra ICROFS (Internationalt Center for Forskning i Økologisk Jordbrug og Fødevarer-systemer), Poul Henning Petersen og Ghita Cordsen Nielsen fra Videncentret for Landbrug, Henrik Frølich Brødsgaard og Jørn Kirkegaard fra Miljøstyrelsen, Lise Nistrup Jørgensen og Kristian Kristensen fra Aarhus Universitet, Peter Esbjerg og Jens Erik Ørum fra Københavns Universitet, Niels Lindemark fra Dansk Planteværn, Ivar Lund fra Syddansk Universitet og Steen Fogde fra Danmarks Biavlerforening

Sammenfatning

Både i Danmark og andre steder er der observeret en nedgang i de insekter, der bestøver landmandens afgrøder og de vilde planter. Tilbagegangen falder sammen med, at landbrugsdriften er blevet mere intensiv, og anvendelsen af pesticider er øget. Vi ved imidlertid ikke, hvilken rolle pesticiderne har spillet i nedgangen i bestøvere sammenlignet med andre aspekter af landbrugspraksis. I den nuværende regulering af sprøjtemidlerne tages specielle hensyn til honningbierne, fordi de er vigtige for bestøvningen af nogle afgrøder, og for at sikre honningproduktionen. De vilde bier er dog også vigtige for bestøvningen af fx kløver og mange vilde planter. Da humlebier og andre vilde bier har en anden adfærd og placerer deres reder andre steder end honningbierne, er det ikke givet, at de er beskyttet mod pesticideksponering, selv om honningbierne er.

I pilotprojektet "Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier og honningbier" har Aarhus Universitet på to landbrugsbedrifter gennemført en indledende undersøgelse af, om humlebier udsættes for pesticider i danske landbrugsområder. Humlebistader blev sat ud i to værkstedsområder (ved Fensten og Rodstenseje syd for Odder), hvor driftsformen hovedsageligt var hhv. konventionelt og økologisk. Da der kun indgik to værkstedsområder i undersøgelsen, var det ikke målet at sammenligne økologiske og konventionelle brug, men at få to områder med maksimal forskel i pesticidbelastning for at få det bedste udgangspunkt for at vurdere pesticidernes mulige betydning for de vilde bier.

I løbet af sommeren fulgte vi humlebiernes trivsel ved at måle vægten af humlebistaderne og samlede bier fra staderne for at måle pesticidindholdet. Vi så på, om der var en sammenhæng mellem pesticidanvendelsen i de to områder, pesticidindholdet i humlebieerne og forekomsten af honningbier og humlebier i nærliggende kløvermarker.

Desuden blev humlebier og murerbiers følsomhed over for udvalgte pesticider testet i laboratoriet og sammenlignet med tidligere målte effekter på honningbier. Vi undersøgte også mulige indirekte effekter af pesticidanvendelsen i form af to ukrudtsmidlers påvirkning af blomstring i rød- og hvidkløver, som begge er vigtige fødekilder for bier. Der blev set på nektar- og pollenproduktion, længde af blomstringsperiode og antal af blomster samt effekt på biomasse og frøproduktion.

Endelig var et af hovedformålene med projektet at evaluere de anvendte metoder med henblik på en fremtidig, mere tilbunds gående undersøgelse af pesticidernes betydning for de bestøvende insekter i landbrugslandet.

Undersøgelsens hovedkonklusioner

- Analyserne af de udsatte humlebier viser, at humlebier udsættes for pesticider i det danske landbrugsland.
- De målte koncentrationer i humlebieerne er dog formentlig for lave til at slå humlebieerne ihjel, idet de ligger væsentligt under de doser, som er dødeligt giftige for honningbier. Om de målte koncentrationer kan have effekter på fx orienteringsevne, formeringsevne eller overlevelse af afkom er uvist.
- Pesticidindholdet i humlebieerne fra de to værkstedsområder var ikke afgørende forskelligt og stemmer dermed ikke umiddelbart overens med pesticidanvendelsen i de to områder.
- Optællingerne af vilde bier i kløvermarkerne viste, at der var ret klare forskelle i humlebifaunaen på de to landbrugsbedrifter (flere humlebier og flere forskellige arter i det

lavt belastede område), men forskellene hang ikke umiddelbart sammen med pesticidindholdet i de udsatte humlebier. Dette tyder på, at andre faktorer end pesticidbelastningen kan have haft betydning, bl.a. landskabets sammensætning.

- Humlebier og murerbier er formentlig mere følsomme over for visse pesticider end honningbier, hvilket kan betyde, at de hensyn, der tages til honningbier ikke nødvendigvis beskytter andre arter af bestøvende insekter.
- To udvalgte ukrudtsmidler havde ikke effekt på nektar- og pollenproduktionen i rød- og hvidkløver.
- På baggrund af denne indledende undersøgelse anbefaler vi, at pesticidernes effekter på de bestøvende insekter undersøges nærmere og sammenlignes med betydningen af andre faktorer såsom landskabets naturindhold og sammensætning.
- Da pesticider oftest anvendes i blandinger med andre pesticider, bør effekten af disse undersøges.
- Andre virkninger end dødelighed bør inddrages i vurdering af pesticiders effekter overfor bier, fx effekter på adfærd og aktivitet og effekter på yngel ved fodring med pesticidholdigt pollen og nektar, da sådanne effekter kan være afgørende for biernes overlevelse.

Ud over resultaterne indeholder rapporten en gennemgang af de anvendte metoder og forslag til forbedringer.

Summary

In Denmark as well as in other countries, a decline has been observed for insects that pollinate the farmer's crops and the wild plants. The decline coincides with the fact that agricultural practices have intensified and the use of pesticides has increased. However, we do not know what part pesticides have played in the decline of pollinators compared to other aspects of agricultural practices. In current regulations of pesticides, special precautions are taken in regards to honey bees, as they are important for pollinating certain crops and to ensure production of honey. Wild bees are also important for pollinating e.g. clover and many wild plants. As bumble bees and other wild bees have a different behavior and place their hives in other locations than honey bees, it is not given that they are protected from exposure to pesticides, even though the honey bees are.

In the pilot project "The importance of pesticides for the occurrence of wild bees and honey bees", Aarhus University has performed a preliminary study on two farms as to whether bumble bees are exposed to pesticides in Danish agricultural areas. Bumble bee hives were set out in two experimental areas (near to Fensten and Rodstenseje south of Odder) that used conventional and organic agricultural practices, respectively. As there were only two experimental areas in the study, it was not the goal to compare organic and conventional farms, but to get two widely different areas with respect to pesticide load in order to get the best starting point for evaluating the possible impact of pesticides on wild bees.

During the summer, we monitored bumble bee fitness by weighing the hives and collected bees from the hives to measure their pesticide content. We examined whether there was a connection between the use of pesticides in the two areas, the pesticide content in the bumble bees, and the presence of honey bees and bumble bees in nearby clover fields.

In addition, the sensitivity of bumble bees and mason bees to selected pesticides was measured in the laboratory and compared to previously measured effects on honey bees. We also examined possible indirect effects of pesticide use through the impact of two herbicides on the flowering of red and white clover, both of which are an important food source for bees. We examined nectar and pollen production, the length of the flowering period, the number of flowers, and the effect on biomass and seed production.

Finally, one of the main goals of the project was to evaluate the applied methods with the aim of a more detailed study on the importance of pesticides on pollinating insects in agriculture in the future.

Main conclusions

- Analysis of the exposed bumble bees showed that bumble bees are exposed to pesticides in Danish agricultural land.
- However, the measured concentrations in the bumble bees are probably too low to kill them, as they are substantially below the dosages that are lethal to honey bees. Whether the measured concentrations may have an effect on e.g. sense of locality, reproduction and survival of offspring is unknown.
- The pesticide content in the bumble bees from the two experimental areas did not vary critically and is, therefore, not on the face of it consistent with the use of pesticides in the two areas.

- The counts of wild bees in clover fields showed clear differences in the bumble bee fauna at the two farms (more bumble bees and more species in the low pesticide-load area), but the differences were not directly related to the pesticide content in the exposed bumble bees. This indicates that factors other than pesticide load may be important, e. g. the composition of the landscape.
- Bumble bees and mason bees are probably more sensitive to certain pesticides than honey bees, which may mean that precautions applied for honey bees do not necessarily protect other pollinating species.
- Two selected herbicides did not affect nectar and pollen production in red and white clover.
- Based on this preliminary study, we recommend that the effect of pesticides on pollinating insects be studied further and be compared to the importance of other factors such as the landscape's natural content and composition.
- As pesticides are mostly used in mixtures with other pesticides, the effects of such mixtures should be examined.
- Effects other than mortality should be considered when evaluating the effect of pesticides on bees, e. g. effects on behavior and activity and effects on offspring feeding on pollen and nectar containing pesticides, as such effects may be crucial to the bees' survival.

Apart from the results, the report includes a review of the methods and suggestions for improvements.

1. Baggrund

Bier, svirreflugter og sommerfugle er vigtige bestøvere både af vilde planter og af mange afgrøder og spiller således en central rolle såvel i produktionen af afgrøder som i naturen (Kremen et al. 2002, Klein et al. 2007). Nedgang i antal (fx Biesmeijer et al. 2006) og i nogle tilfælde også i tætheden (fx Dupont et al. 2011) af bestøvende insekter har stor betydning, både økologisk og økonomisk, og har derfor stor bevågenhed nationalt såvel som internationalt (Biesmeijer et al. 2006, Colla & Packer 2008, Grixti et al. 2009, Murray et al. 2009). Gallai et al. (2009) har estimeret den økonomiske værdi af insektbestøvning til 153 milliarder Euro/år (2005 niveau), hvilket svarer til 9,5 % af værdien af fødevarereproduktionen på verdensplan. Tilbagegangen i fx humlebier kan spores tilbage til 1950'erne og falder sammen med landbrugets intensivering (Kosier et al. 2007). Der er ligeledes i Holland og England dokumenteret et sammenfald mellem tilbagegangen i bestøvere siden 1980 og nedgangen i forekomsten af planter, der er afhængige af insektbestøvning (Biesmeijer et al. 2006, Carvell et al. 2006, Kleijn & Raemakers 2008).

Pesticidernes bidrag til den påviste tilbagegang i bestøverfaunaen er imidlertid ukendt, og vi ved derfor ikke, i hvilket omfang der er potentiale for at gavn bestøverfaunaen ved en regulering/ændring af pesticidanvendelsen.

Toksicitetstests med honningbier indgår i risikovurderingen af pesticider i forbindelse med godkendelser (OECD 1998a, OECD 1998b). I Danmark klassificeres pesticider i forhold til deres giftighed over for honningbier. Klassificeringen fremgår af midlets etikette i form af en af tre sætninger: 1) Ikke farlig for bier; 2) Farlig for bier – for at beskytte bier og andre bestøvende insekter må dette produkt ikke anvendes i blomstrende afgrøder; 3) Farlig for bier – for at beskytte bier og andre bestøvende insekter må dette produkt ikke anvendes i blomstrede afgrøder i biernes flyvetid fra kl. 03 til kl. 21. Den sidste sætning anvendes kun for stoffer, som er repellerende. Dokumentation for dette skal fremgå af det dossier, som danner baggrund for vores vurderinger af farlighed over for bier.

Det er imidlertid ikke kendt, i hvor høj grad de hensyn, man tager til honningbier, også beskytter andre bestøvende insekter (Thompson 2001). Der findes i Danmark ca. 275 arter af bier: 29 arter af humlebier og 245 arter af enlige bier, samt den domesticerede honningbi (Madsen & Calabuig 2008). Der er grund til at tro, at andre bier, som har anderledes aktivitetsperioder og anderledes fysiologi end honningbier, ikke nødvendigvis beskyttes mod eksponering og giftvirkning fra pesticider af de gældende godkendelsesprocedurer og retningslinjer for sprøjtning. Humlebier har fx længere aktivitetsperioder, sæsonbestemte kolonier samt større nektaroptagelse end domesticerede honningbier. Humlebier forventes derfor at have en anderledes følsomhed og udsættes muligvis mere for pesticider end domesticerede honningbier (Thompson 2001). Det er for nyligt vist, at humlebiolonier, som blev udsat for markdoser af imidacloprid (neonicotinoid) gennem forgiftet nektar og pollen, voksede dårligere og producerede langt færre dronninger (Whitehorn et al. 2012). Udsættelse for pesticid kan derfor også påvirke næste års bestand af humlebier. Formentlig er honningbier desuden specielle ved deres store produktion af esterase, som bl.a. kan uskadeliggøre nogle pyrethroider og dermed sænke honningbiernes følsomhed over for nogle af de mest anvendte insekticider (Johnson et al. 2006). Dog kan sub-letale doser af thiamethoxam medføre øget mortalitet pga. nedsættelse af orienteringsevnen hos honningbier, hvilket kan være medvirkende til tab pga. 'colony collapse disorder (CCD)' (Henry et al. 2012).

Via herbicidernes påvirkning af planterne kan pesticider desuden have en indirekte effekt på bestøverne. Der er gennem en årrække observeret sultedød hos honningbier (Per Kryger, pers.

obs.). Der er ligeledes noteret tilbagegang af vigtige fødeplanter for humlebier (Carvell et al. 2006), og det er sandsynligt, at sult også forekommer blandt humlebier og andre vilde bestøvere, der er afhængige af et konstant udbud af pollen og nektar. Igangværende og afsluttede projekter (Bekæmpelsesmiddelprojektet ”Indikatorer for biodiversitetsforbedringer i marknære småbiotoper ved etablering af sprøjtefrie randzoner” og FØJO III-projektet ”REFUGIA – Økologisk jordbrug som refugier for biodiversitet”) (ICROFS 2012) har vist, at forekomsten af egnede fødeplanter og mængden af blomster på disse planter påvirkes af herbicider, men herbiciderne kan potentielt også have effekt på produktionen af pollen og nektar.

Pilotprojektets hovedformål har været 1) at undersøge sandsynligheden for pesticideffekter på danske bier dvs. honningbier, humlebier og solitære bier, samt 2) at optimere metoderne til undersøgelser af sådanne effekter. Projektet adresserer hovedspørgsmålene vist i Tabel 1.1.

TABEL 1
OVERSIGT OVER PROJEKTETS HOVEDSPØRGSMÅL OG DE RELATEREDE UNDERSØGELSER.

	Hovedspørgsmål	Undersøgelser i pilotprojekt	Metodeoptimering	Behandles i metodeafsnit
Eksponering	Eksponeres bier for pesticider i pesticidbelastede områder?	Humblebistader udsættes i værkstedsområder med hhv. høj og lav pesticidbelastning	Udvælgelse af værkstedsområder	2.1.1
		Der måles pesticidindhold i bierne	Indsamlings- og analysemetoder	2.1.2
Giftighed for bier	Afspejles den målte eksponering i humlebistadernes trivsel?	Humblebistaderne tilses for flyveaktivitet, døde/syge bier, foderreserver og generel koloniudvikling	Frekvens af tilsyn Responsstørrelse, dimensionering	2.1.3
	Kan der ses effekter på antallet og diversiteten af bier?	Abundans og diversitet af vilde bier og honningbier estimeres i kløvermarkerne i værkstedsområderne	Brug af fokusplanter som ”fælder”; Responsstørrelse og variation, dimensionering	2.1.4
	Er andre bier mere eller mindre følsomme end honningbier?	Kontrollerede forsøg i laboratoriet med forskellige arter af bier til sammenligning med eksisterende data for honningbier	Variation i og størrelse af respons, dimensionering	2.2
Effekter på nektar og pollen	Påvirkes mængden og kvaliteten af nektar og pollen af pesticider?	Kontrollerede forsøg med kløver eksponeret til forskellig tid i forhold til knopdannelsen; måling af nektarproduktion og sukkerprocent	Udtagning af nektar Timing af eksponering	2.3
Valg af fokusplanter og værkstedsområder	Hvilke plantearter er brugbare som fokusplanter?	Måling af nektar- og sukkermængde i udvalgte plantearter med henblik på beregning af sukkerressourcen pr. blomsterstand	Udvælgelse af fokusplanter til undersøgelse af diversitet og densitet af bifaunaen i agerlandet	2.4
	Hvilke mulige fokusplanter findes i værkstedsområderne?	Registrering af forekomst og fordeling af mulige fokusplanter i mulig værkstedsområder	Valg af fokusplanter og valg af værkstedsområder til senere undersøgelser	2.1.1

2. Metoder

I projektet indgik fire typer af undersøgelser: 1) Feltundersøgelser af pesticideksponering af humlebier og effekter på deres trivsel; diversitet og abundans af vilde bier i en udvalgt afgrøde, samt forekomsten af mulige fokusplanter i to værkstedsområder, 2) laboratorieundersøgelser af direkte effekter af insekticiders giftighed på forskellige typer af bier, 3) kontrollerede undersøgelser af herbicideffekter på blomstring samt pollen- og nektarproduktion af en udvalgt afgrøde, der er afhængige af bibestøvning og samtidig er vigtige fødekilder for bier, 4) måling af nektarindhold og – sammensætning i mulige fokusplanter.

2.1 Feltundersøgelser

I et "hot spot" (område på 2 km × 2 km med høj anvendelse af pesticider) og et "cold spot" (område med lav eller ingen anvendelse af pesticider, her et område med udbredt økologisk dyrkning), der ellers ligner hinanden mht. parametre af betydning for bifaunaen, er pesticideksponeringen af humlebier og deres trivsel undersøgt.

2.1.1 Udvalgelse og karakterisering af værkstedsområder

I pilotprojektet er udvalgt to værkstedsområder med hhv. høj og lav pesticidbelastning. Begge områder skulle indeholde en mark med dyrkning af kløver til frø, idet tilstedeværelsen af kløver vil være med til at sikre, at de udsatte humlebier kan klare sig i området. Det var endvidere et krav, at områderne skulle være inden for rimelig køreafstand til Aarhus Universitet.

Udvælgelsen af værkstedsområder har været en iterativ proces, der involverede forhåndsudpegning af potentielle områder ud fra **det Generelle Landbrugsregister (GLR)** koblet til [markblok-kort](#) med oplysninger om hidtil dyrkede afgrøder og om, hvorvidt driftsformen er økologisk eller konventionel, samt oplysninger fra det tekniske og topografiske vektorgrundkort [Kort10](#), fra Kort- og Matrikelstyrelsen (KMS). I pilotprojektet er valgt områder, der ud fra tidligere afgrøder og henvendelse til de konkrete landmænd forventedes at indeholde kløvermarker.

De potentielle værkstedsområder blev sammenlignet i forhold til landskabselementer, som har vist sig at have indflydelse på abundansen (individer/ha) af humlebier i rødkløvermarker (Boll 2010), herunder andelen af opdyrket land, skov, småbiotoper, afgrødetyper (herunder blomstring), lineære strukturer (hegn, grøfter mv., som kan være vigtige redesteder), klima og jordbund (se evt. Bilag 1). Denne vurdering resulterede i en bruttoliste på bare tre potentielle værkstedsområder, bestående af et konventionelt og to økologiske brug syd for Odder.

De tre potentielle områder blev derefter undersøgt i forhold til pesticidbelastning ved brug af PestNab som beskrevet i Kjær et al. (2008). Dette værktøj kombinerer økotoxikologiske data for forskellige organismegrupper med oplysninger om afgrøder fra GLR og natur- og halvkulturelementer fra Kort10 (2007-udgave). Hver kvadratkilometer er rangordnet i forhold til alle andre (ca. 42.000) kvadratkilometer i hele landet for at udtrykke det relative niveau i pesticidbelastning. En rang i PestNab er altså et udtryk for den generelle pesticidbelastning omkring lokaliteten inklusiv de tilstødende markflader af den kvadratkilometer, som lokaliteten ligger i. Det er her udvalgt to temaer: (1) pesticidbelastningen på selve markfladen i forhold til det terrestriske økosystem; (2) pesticidbelastningen på de terrestriske kantbiotoper, der omgiver markfladerne. Det ses i Tabel 2.1, at lokaliteten Økologisk 1 ligger i et område med ret intensiv pesticidbelastning, både inde på markfladen samt langs kanterne. Det indikerer, at Økologiske 1 er

en økologisk ”ø” midt i et område med ret stor pesticidbelastning. Den konventionelle mark ligger i et område med meget stor belastning inde på markfladen, mens kantbelastningen kun er moderat; denne forskel kan skyldes landskabsstrukturen, hvor store marker ikke har så meget kontakt til kanterne sammenlignet med mindre marker. Lokaltiten Økologisk 2 ligger i et område med relativt lav pesticidbelastning både på markfladen og i de tilgrænsende terrestriske biotoper.

TABEL 2.1 RANG MED BRUG AF PESTNAB AF DE TRE LOKALITETER; VÆRDIEN NUL INDIKERER LAVESTE PESTICIDBELASTNING OG VÆRDIEN EN ER HØJESTE BELASTNING SET I FORHOLD TIL HELE DANMARKS LANDBRUGSOMRÅDER.

Lokalitet	PESTNAB rang for belastning af markflade	PESTNAB rang for belastning i kantbiotoper
Økologisk 1	0,936	0,933
Konventionel	0,999	0,640
Økologisk 2	0,619	0,267

De 3 potentielle områder vurderedes herefter ved besøg, idet erfaringerne fra et netop afsluttet specialeprojekt blev inddraget (Boll 2010). På baggrund af de tilgængelige data og observationerne i de potentielle værkstedsområder udvalgte vi 2 værkstedsområder med kommercielt dyrket hvidkløver som fokusplante, nemlig det konventionelle brug (herefter benævnt Fensten) og økologisk brug nr. 2 i Tabel 2.1 (herefter benævnt Rodstenseje), idet Rodstenseje lignede det konventionelle brug mht. afgrødesammensætning og samtidig gav maksimal forskel i pesticidbelastning.

Efterfølgende er værkstedsområderne karakteriseret mht. arealanvendelse, forekomst af småbiotoper, afgrødefordeling samt forekomst af mulige fokusplanter med udgangspunkt i et kvadratisk område på 2 km × 2 km med centrum midt mellem bistaderne i de enkelte områder. Da karakteriseringen ønskedes udført med baggrund i eksisterende og landsdækkende data er her benyttet 2 primære kilder: Kort10/FOT (Kort- og Matrikelstyrelsen 2010) og Markkort fra NaturErhvervsstyrelsen (NaturErhvervsstyrelsen 2011) samt egne observationer.

Arealanvendelse og forekomst af småbiotoper blev uddraget fra Kort10/FOT, som er det pt. mest detaljerede (målestok 1:10.000) landsdækkende topografiske vektordatasæt tilgængeligt. Der er benyttet enkelttemaer fra 2010 udgaven.

De udvalgte Kort10/FOT temaer er:

- Skov (flade)
 - Skovbryn (afledt linje)
- Sø (flade)
 - Søbred (afledt linje)
- Vandløbsbred (linje) – kun synlige vandløb
- Vandløb (kun synlige)
- Vådområde (flade)
- Hegn (linje)
- Dige (linje)
- Skrænt (linje)
- Trægruppe (punkt)
- Lav bebyggelse (flade)
- Industri (flade)
- Vejmidter (linje) - indeholder ikke stier
- Vejkanter (linje) – indeholder stier

Arealfordelingen af landbrugsafgrøder, samt klassifikation og opgørelsen af længden af markskel er sket på basis af anonymiserede markkort med afgrødekoder fra NaturErhvervsstyrelsen.

Markkortene angiver i modsætning til markblokkort en opdeling i enkeltmarker. Markkortene er indtegnet af landmændene eller deres konsulenter med flyfoto som baggrund. Utilsigtede overlap mellem de enkelte marker internt eller uønskede overlap mellem marker og Kort10 temaer, fx veje, har vi i dette pilotprojekt redigeret manuelt.

Forekomsten af fokusplanter og andre gode foderplanter for bestøvere i værkstedsområderne blev noteret i forbindelse med, at vi besøgte områderne for at tilse humlebistaderne og indfange jordhumler til pesticidanalyser.

2.1.2 Pesticideksponering af humlebier

Til undersøgelsen af humlebiernes pesticideksponering i agerlandet anbragte vi 12 humlebistader (4 trippel-stader, se Figur 2.1) i hvert af de udvalgte værkstedsområder. 6 stader blev placeret lige uden for marken med hvidkløver og 6 stader min. 500 m fra marken (og andre kløvermarker), idet bierne placeret tæt på marken formodedes at have deres hovedtræk derhen i kløverens blomstringstid, mens bierne længere væk i højere ville grad søge føde rundt omkring i landskabet. Dette indebar også, at humlebierne fra staderne placeret i det økologiske brug kunne forventes lejlighedsvis at ville fouragere i nogle af de omgivende konventionelt dyrkede marker, ikke mindst i en rapsmark i nærheden, som stadig havde en del blomster, da humlestaderne blev sat ud.



FIGUR 2.1. TRIPPELSTADER UDEN LÅG. TH. ER GITRENE TAGET AF TO AF ENKELTSTADERNE OG ISOLERINGSMATERIALET TRUKKET TIL SIDE, SÅ MAN KAN SE BOETS OPBYGNING.

Humblebistaderne blev sat ud den 26. maj. Hvert humlebistade havde ved udsætning ca. 40 arbejdere. Endvidere var hvert stade forsynet med pollen til 3-4 dage samt sukkervandsfoder. Den 16. juni og den 5. juli blev der udtaget ca. 5 bier fra hvert stade til pesticidanalyser. Det var planen også at indsamle humlebier i begyndelsen af august, men på det tidspunkt var humlebikolonierne allerede opløste eller døde. De udtagne bier blev bedøvet med CO₂, overført til udglødede glas og frosset ned, indtil pesticidanalyserne kunne udføres.

Selve metoden til indsamling af humlebier blev udviklet undervejs, da vi ikke havde en velbeskrevet procedure på forhånd. Idet vi helst ville have bier, som lige havde været ude at flyve, og samtidig ville være sikre på, hvilket stade de hørte til i, fandt vi frem til, at det var en fordel at lukke flyvehullerne i staderne, afvente biens landing ved hullet eller dens insisterende kredsen omkring et bestemt hul og derpå fange bier enten med sommerfuglenet eller med plasticpincet.

Ved telefonisk henvendelse indhentede vi oplysninger om anvendelsen af sprøjtemidler på den konventionelle kløvermark samt de konventionelle marker lige omkring begge kløvermarker. Det lykkedes ikke at få kontakt til eller oplysninger fra alle de relevante landmænd trods gentagne forsøg. Det gælder specielt markerne omkring Rodstenseje. Ifølge de indhentede oplysninger var følgende pesticider blevet anvendt dels i den konventionelt dyrkede kløvermark, dels i de konventionelt dyrkede marker omkring de to kløvermarker i den periode, humlebistaderne stod ude: Comet (pyraclostrobin, et svampemiddel til brug i korn, ikke bi-mærket), Karate (lambda-cyhalothrin, et bi-mærket insekticid), bentazon (et stof, der indgår i herbiciderne Troy og Fighter, som bl.a. anvendes i korn og kløver, ikke bi-mærket), Stomp (pendimethalin, et herbicid der anvendes i diverse afgrøder, ikke bi-mærket), Bell (boscalid + epoxiconazol, systemisk svampemiddel til anvendelse i korn og græs, ikke bi-mærket), Mavrik (tau-fluvalinat, et insekticid der anvendes i korn, raps, sennep og ærter, ikke bi-mærket), Orius (tebuconazol, et svampemiddel der anvendes i korn, raps, kløver, grønsager mv., ikke bi-mærket), og Galera (clopyralid + picloram, ukrudtsmiddel som anvendes i raps, ikke bi-mærket).

Kvantificering af pesticider er foretaget ved anvendelse af LC-MS-MS. 5 frosne humlebier blev homogeniseret i en Spex Certiprep 2000 Geno/Grinder (Metuchen N.J. U.S.A.). Prøveforberedelsen foregik ved modifikation af en metode efter C. A. Mullin (2010). De homogeniserede bier ekstraheres med 9 ml væske sammensat af 44 % vand, 55 % acetonitril og 1 % iseddike, der er tilsat 2 g magnesiumsulfat og 0,5 g natriumacetat. Prøven rystes og centrifugeres og 1 ml centrifugat oprenses ved dispersiv fastfaseekstraktion bestående af 0,05 g primær sekundær amin, 0,05 g C18 og 0,15 g magnesiumsulfat (Agilent SampliQ, part No. 5982-5122CH). Efter ryst og centrifugering er prøven klar til analyse ved LC-MSMS. Analysen foretages med ESI-ionisering i positiv og negativ mode og multiple reaction monitoring (MRM), der giver høj specificitet og følsomhed. I resultatafsnittet er de opnåede detektionsgrænser opgivet. Detektionsgrænsen er den grænse, hvor man med en vis grad af sandsynlighed vil detektere stoffet, hvis det er til stede, typisk 99 % sandsynlighed. Hvis detektionsgrænsen fx er 0,06 ng pr. bi, vil man ikke opgive resultater under denne værdi, men rapportere resultatet som mindre end detektionsgrænsen eller f. eks. < 0,06 ng pr. bi. Stoffet kan altså være til stede, men det kan ikke siges med den vedtagne grad af sandsynlighed. Detektionsgrænsen bestemmes ved at tilsætte en kendt mængde pesticid tæt på den forventede detektionsgrænse til bierne og ud fra resultaterne vurdere visuelt eller statistisk ved hvilken grænse stoffet vil kunne ses.

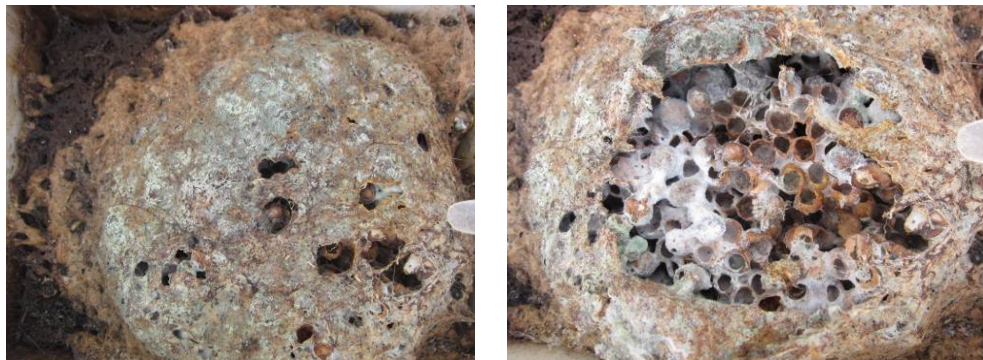
Der er analyseret for nedenstående stoffer (Tabel 2.2). Der er dels tale om produkter, som er anvendt af landmændene i og omkring de undersøgte kløvermarker, dels almindeligt anvendte pesticider i et forsøg på at sikre, at også midler anvendt i de marker, vi ikke kunne få oplysninger om, ville blive fundet. Tre af de anvendte pesticider, tebuconazol, clopyralid og picloram, indgik ikke i analyseprogrammet, da det ikke var tidsmæssigt muligt at få inkorporeret stofferne i analysemetoden inden for projektperioden.

TABEL 2.2 PESTICIDER, DER ER ANALYSERET FOR I UNDERSØGELSEN. HERBICIDER ER MÆRKET MED H, FUNGICIDER MED F OG INSEKTICIDER MED I. EFTER PESTICIDETS NAVN ER ANGIVET KONCENTRATIONEN I DET FORMULEREREDE PRODUKT. AKTIVSTOFFER MED FED SKRIFT ER OPLYST ANVENDT I OMRÅDERNE, HVOR HUMLEBIERNE HAR VÆRET UDSAT. STOFFER MED BI-MÆRKE ER ANGIVET.

Ativstof		Produkteksempler	Producent
Alfa-Cypermethrin 50 g l ⁻¹ Bimærket Cyhalothrin	I	Fastac 50	BASF
Azoxystrobin, 250 g l ⁻¹	F	Amistar	Syngenta
Bentazon , 480 g l ⁻¹	H	Basagran M75	BASF
Boscalid 267 g kg ⁻¹	F	Signum WG	BASF
Bromoxynil, 200 g l ⁻¹ Bimærket. Ioxynil, 200g l ⁻¹	H	Oxitril CM	Bayer CropScience
Diflufenican, 500 g l ⁻¹	H	DFF	Bayer CropScience
Dimethoat, 500 g l ⁻¹ Bimærket	I	Danadim Progress	Cheminova
Epoxiconazol , 125 g l ⁻¹	F	Opus	BASF
Fenpropidin 450 g l ⁻¹	F	Zenit 575 EC	Syngenta
Fenpyroximat 53 g l ⁻¹	I	Danitron 5 SC	Nordisk Alkali
Fluazifop-P-butyl 250 g l ⁻¹	H	Fusilade X-tra	Syngenta AG
Imidachloprid 700 g kg ⁻¹ Bimærket	I	Confidor WG 70	Bayer CropScience
Iodosulfuron 100 g l ⁻¹ lfuron methyl, natrium, 50 g kg ⁻¹ Mefenpyr-diethyl, 150 g kg ⁻¹	H	Hussar	Bayer CropScience
Ioxynil 200 g l ⁻¹ Bimærket	H	Oxitril CM	Bayer CropScience
Kresoxim-methyl, 500 g kg ⁻¹	F	Candit	BASF
Lambda-Cyhalothrin 25 g kg ⁻¹ Bimærket	I	Karate 2,5 WG	Syngenta
Malathion 440 g l ⁻¹ Bimærket	I	Malathion 440 EW	Cheminova
MCPA, 750 g l ⁻¹	H	M-750	Klarsø & Co.
Metamitron, 700 g kg ⁻¹	H	Goltix WG	Makhteshim
Pendimethalin , 400 g l ⁻¹	H	Stomp	BASF
Phosalon 500 g l ⁻¹ Bimærket	I	Zolone FLO	Cheminova A/S
Pirimicarb, 500 g kg ⁻¹	I	Pirimor G	Syngenta
Propyzamid, 500 g l ⁻¹	H	Kerb 500 SC	Dow
Prosulfocarb, 800 g l ⁻¹	H	Boxer EC	Syngenta
Prothioconazol, 250 g l ⁻¹	F	Proline EC 250	Bayer CropScience
Pyraclostrobin 67 g kg ⁻¹	F	Signum WG	BASF
Tau-fluvalinat 240 g l ⁻¹	I	Mavrik 2F	Makhteshim-Agan

2.1.3 Humlebiernes trivsel

Humblebiernes trivsel blev vurderet ved at veje staderne enkeltvis den 1. juni, 16. juni, 27. juni, 5. juli og 16. august. Desuden blev noteret observationer om døde bier, flyveaktivitet mv. Pga. stadernes indretning, specielt det anvendte isoleringsmateriale (se Figur 2.2), var det ikke muligt at følge udviklingen i bygning af celler, antal bier mv.



FIGUR 2.2. HUMLESTADERNES ISOLERINGSMATERIALE I AUGUST, URØRT (TV) OG ÅBNET (TH).

2.1.4 Abundans og diversitet af bier i kløvermarker

Da hvidkløveren var i fuld blomst, besøgte vi begge forsøgsmarker på en varm sommerdag (27. juni 2011). Der var skyfrit, svag vind, 20-23 grader, dvs. gode forhold for nektarproduktion (Free 1993), og kløveren duftede kraftigt. Der var således optimale forhold for humlebier. Alle blomsterbesøgende insekter blev observeret kl. 10-12 i kløvermarken ved Rodstenseje og kl. 14-16 i marken ved Fensten. Der var høj insektaktivitet gennem hele observationsperioden.

I hver mark blev der sat tre observationsplot op, hver på 18x18m, således at der samlet blev observeret en prøveflade på knap 1000 m² på hver mark. For at repræsentere de forskellige rumlige dele af en mark blev de tre plot placeret ved kanten, centralt og midt imellem de to første plots. De blomsterbesøgende insekter blev optalt ved at gå frem og tilbage i plottet, således at hvert blomsterhoved blev observeret ca. én gang. Antallet af blomsterhoveder per plot blev estimeret ved optælling i tre kvadrater på en kvadratmeter hver, fordelt diagonalt i plottet. Alle blomsterbesøgende insekter blev identificeret til art i felten.

Abundansen af insekter blev omregnet til individer per blomsterhoved. Vi testede forskelle i abundanser af blomsterbestøvende insekter (*B. terrestris* (jordhumle), *B. lapidarius* (stenhumle), *B. pascuorum* (agerhumle), *Apis mellifera* (honningbi) og andre) mellem de tre plots per mark med Wilcoxon tests. Derefter sammenlignede vi abundanserne af insektgrupperne i den økologiske mark med den konventionelle med Mann-Whitney U-tests.

2.2 Giftighed af udvalgte sprøjtemidler for forskellige typer bier

For at kunne sammenligne følsomheden af vilde bier over for udvalgte pesticider med honningbiens følsomhed blev der udført test af murerbiers, *Osmia rufa*, og jordhumlere, *Bombus terrestris*, følsomhed over for fire pesticider: Karate (lambda-cyhalothrin), der bl.a. anvendes mod kløversnudebillen og har dokumenterede effekter på honningbier; Mavrik (tau fluvalinat), der bl.a. bruges mod insekter i korn, raps og sennep og ikke er bi-mærket; Oxitril (bromoxynil + ionoxynil), et herbicid der anvendes i mange forskellige afgrøder og er bi-mærket; Basagran (bentazon), der anvendes mod ukrudt i bl.a. kløver og ikke er bi-mærket.

Testene blev gennemført som kontakttest på stort set samme måde som de rutinetest, der udføres med honningbier (OECD 1998a, OECD 1998b), dog tilpasset de to arters specifikke behov. Idet der ikke er tale om rutinemæssige tests, har der i projektet indgået for-forsøg forud for de egentlige tests, for at sikre, at disse kunne gennemføres uden væsentlige problemer. Denne indkøring

inkluderede erfaringsopsamling mht. forsøgsbetingelser samt forsøg med et begrænset antal murerbier og sprøjtemiddeldoser.

I litteraturen er der noget divergerende informationer om giftigheden af de 4 pesticider over for honningbier, se Tabel 2.3.

TABEL 2.3 LD₅₀-VÆRDIER FOR HONNINGBIER FUNDET I LITTERATUREN. K: KONTAKTTEST, O: ORAL TEST.

Pesticid	LD50, µg a.s./bi	Test	Reference
Karate	0,038	K	Footprint 2006
(lambda-cyhalothrin)	0,051	K	Gough & Wilkinson 1984
Mavrik	5,83	K	Footprint 2006
(tau fluvalinat)	0,2	K	EPA 2005
Oxitril	Hhv. 5 og 10,1	O	Footprint 2006
(bromoxynil + ionoxynil)	> 100	K	Cheminova 2007
Basagran	200 (o)	O	Footprint 2006
(bentazon)	>100 µg/bi	k	EPA 1994

2.2.1 Test med murerbi

Idet vores egen beholdning af overvintrende kokoner viste sig ikke at ville klække tilfredsstillende, fik/købte vi kokoner fra hhv. Polen og Tyskland. Murerbierne fra Polen blev brugt til test i juni-juli, mens bierne fra Tyskland først blev indkøbt og anvendt i august. Den gennemsnitlige vådvægt af murerbierne var 66±13 mg for hunner og 38±10 mg for hanner. De tilsvarende tørvægte var hhv. 31 og 17 mg.

Til testene anvendte vi nyklækkede voksne murerbier. Inden den egentlige test blev der udført en pilottest for at indkøre metoderne og bestemme testkoncentrationerne med udgangspunkt i LC₅₀ for honningbier (Tabel 2.4). Til selve testene anvendte vi fem koncentrationer af pesticiderne samt en kontrol. Bentazon blev testet som aktivstoffet og ikke som produktet Basagran, da vi på forsøgstidspunktet ikke kunne få en passende mængde Basagran. Hver test blev udført i tre replikater med cirka 10 dyr i hvert replikat for hver koncentration. Antallet blev om nødvendigt justeret ud fra det tilgængelige antal dyr. Inden eksponering blev bierne kønsbestemt, så vi kunne fordele de to køn ligeligt mellem koncentrationerne.

De fire pesticider blev anvendt i formuleringerne og koncentrationerne vist i Tabel 2.4.

TABEL 2.4 ANVENDTE DOSER OG FORMULERINGER I TEST MED MURERBIER.

Pesticid (aktivstof)	Formulering	Anvendte doser, µg a.s./bi
Bentazon	bentazon	24 – 48 – 96 – 192 - 384
Ioxynil+Bromoxynil	Oxitril CM	1 – 2 – 4 – 8 - 16
lambda-cyhalothrin	Karate 2,5 WG	0,01 - 0,02 - 0,04 - 0,08 - 0,16
tau fluvalinat	Mavrik 2F	Mellem 0,031 og 16*

***BREDT INTERVAL PGA. ÆNDRING I DOSERING UNDERVEJS I FORSØGENE**

Murerbierne blev eksponeret ved at afsætte en μl pesticidopløsning på thorax med en pipette. Idet de tre replikater i flere tilfælde blev kørt forskudt, så vi havde resultatet af det ene, inden vi gik i gang med det næste replikat, justerede vi i enkelte tilfælde testkoncentrationerne undervejs. Efter pesticideksponeringen blev murerbierne placeret i akrylrør/-bure med ventilationsnet. I hvert bur var der vand og blomster (se Figur 2.3). Burene blev placeret i et klimakammer justeret til 21 °C og 60-70 % relativ luftfugtighed. Antallet af døde og levende bier blev opgjort efter hhv. 24 og 48 timer.



FIGUR 2.3. MURERBIER EKSPONERET FOR PESTICID (TV) OG AKRYLBURE MED MURERBIER (TH).

LD50 blev estimeret ud fra ligningen

$$Overlevelse = \frac{k}{1 + \exp[c \cdot \log(dosis) - \log(LD_{50})]} \quad (1)$$

hvor k er overlevelsen i kontrollen og c er hældningen på dosis-responskurven.

2.2.2 Test med humlebi

For at sammenligne giftigheden for de fire pesticider for jordhumler med giftigheden for honningbier, blev der fremstillet en fortyndingsrække, så der i 2 μl pesticid opløst i acetone var de doser, som er vist i Tabel 2.5, og som ligger i et interval omkring de kendte LD₅₀-værdier for honningbier (Tabel 2.3). Da honningbier har en rimelig konstant størrelse på ca. 100 mg, er det enkelt at lave sådanne forsøg med denne art. Jordhumlerne varierer derimod betydeligt i størrelse, hvilket naturligvis gør det vanskeligere at sammenligne med effekterne på honningbier. De største og mindst humlebier blev fra valgt, men mellemgruppen udviste betydelig variation. Vådvægten var i gennemsnit 176 mg, men variationen er stor, fra 126 mg til 229 mg. I testene brugte vi 30 humlebier i hver koncentration og to kontroller à 30 bier (fælles for alle fire stoffer, idet testene blev udført samtidig). Humlebierne blev eksponeret på samme måde som murerbierne. De blev bedøvet med CO₂ og lagt på frysebord. Her blev de påført 2 μl acetone-opløsning af pesticiderne som beskrevet for murerbier.

TABEL 2.5 ANVENDTE DOSER OG FORMULERINGER I TEST MED HUMLEBIER.

Pesticid (aktivstof)	Formulering	Anvendte doser, $\mu\text{g a.s./bi}$
Bentazon	Basagran SG	12,5-25-50-100-200
Ioxynil+Bromoxynil	Oxitril CM	12,5-25-50-100-200
lambda-cyhalothrin	Karate 2,5 WG	0,006375-0,01275-0,0255-0,051-0,102
tau fluvalinat	Mavrik 2F	0,025-0,05-0,1-0,2

2.3 Indirekte effekter – målt på rød- og hvidkløver

De indirekte effekter af herbicider på bier blev undersøgt ved dosis-responsforsøg på hvid- og rødkløver, som er vigtige trækplanter. Eksponeringen i dosis-responsforsøgene blev gennemført på kritiske tidpunkter i forhold til dannelsen og udviklingen af pollen og nektar samt udvikling og udspring af blomster. Det var planlagt at udføre undersøgelserne på **enten** hvid- **eller** rødkløver, afhængig af hvilken art, der blev valgt i feltforsøget, men da begge plantearter var sået i pletter fra efteråret 2010 og var klar til behandling i foråret 2011, blev en del af undersøgelserne gennemført på begge arter.

2.3.1 Dyrkning

I september 2010 blev hvidkløverfrø (cv. *Milo*) og rødkløverfrø (cv. *Rajah*) sået i 2 L pletter i en blanding bestående af markjord (JB 6), sand og sphagnum (2:1:1 vægt), indeholdende alle nødvendige mikro- og makronæringsstoffer. Pletterne blev anbragt på udendørs borde og blev vandet 2 gange dagligt. Efter fremspiring blev der tyndet til 4 planter per plette. Planterne blev flyttet i drivhus sidst i oktober. Igennem vinteren blev temperaturen holdt over frysepunktet, og der blev ikke suppleret med kunstigt lys. Planterne blev flyttet udendørs igen i foråret. For at sikre, at planterne blev bestøvet, blev et bistade med honningbier placeret i nærheden af forsøget.

2.3.2 Valg af herbicider

Bentazon og metsulfuron-methyl blev valgt som herbicider til denne del af projektet. Bentazon er godkendt til brug i hvid- og rødkløver og er selektivt i disse afgrøder. Metsulfuron-methyl anbefales ikke til brug i hvid- og rødkløver, men er almindelig anvendt i mange kornafgrøder. I denne sammenhæng repræsenterer metsulfuron-methyl et herbicid, der kan spredes til biernes foderområder f.eks. ved afdrift i forbindelse med sprøjtning af tilgrænsende marker.

Metsulfuron-methyl (Ally ST, 500 g/kg, DuPont Denmark APS) er et sulfonylureamid, som hører til gruppen af AcetoLactatSyntase hæmmere (ALS hæmmere). Denne gruppe af midler blokerer ALS, hvorved syntesen af livsvigtige aminosyrer blokeres. Dette medfører, at celledeling og vækst i planten stopper, hvilket i løbet af 1-3 uger fører til plantens død. Metsulfuron optages både via rødder og blade og transporteres til plantens vækstpunkter. Ally er godkendt til bekæmpelse af tokimbladet ukrudt i korn og må kun anvendes om foråret. Selektiviteten i korn skyldes, at afgrøden er i stand til at omdanne herbicidet til non-toksiske forbindelser. Ally blev anvendt på knap 90.000 ha i 2010 (Miljøstyrelsen, 2011).

Bentazon (Fighter, 480 g/L, BASF A/S) er et bladmiddel, der blokerer fotosyntesen i følsomme ukrudtsarter. Bentazon er et kontaktmiddel, der ikke transporteres rundt i planten. Virkningen er bedst på ukrudtets kimbladsstadiet ved temperaturer over 12°C og høj lysintensitet. Virkningen ses relativt hurtigt som en gul- eller brunfarvning med efterfølgende nedvisning. Fighter er godkendt til anvendelse i majs, vårsæd, ærter, græs, kløver og andre frøafgrøder. Midlet anvendes forår eller sommer. Kornafgrøder og kløver tåler bentazon, fordi der sker en inaktivering i afgrøden, mens selektiviteten i ærter skyldes, at der afsættes mindre sprøjtemiddel på ærter end på ukrudt. Bentazon blev anvendt på 55.000 ha i 2010 (Miljøstyrelsen, 2010)

2.3.3 Sprøjtning

Herbiciderne blev udsprøjtet ved hjælp af en laboratoriepottesprøjte, som var udstyret med to ISO-F-02 dyser. Der blev anvendt et tryk på 3 bar og en hastighed på 5.6 km/t, hvilket gav en væskemængde på 140,7 L/ha. Med henblik på at estimere dose-respons kurven blev der anvendt 6 doser af metsulfuron-methyl, hvor den højeste dosering svarede til den maksimalt tilladte dosering i korn. Bentazon forventes at være selektivt i hvid- og rødkløver, og blev derfor kun anvendt i 3 doseringer svarende til ¼ N, ½ N og 1 N, hvor N er den maksimalt tilladte dosering i kløver (se Tabel 2.6). Bentazon blev, som anbefalet i brugsanvisningen, udsprøjtet i blanding med 0,5 L/ha

Renol (vegetabilsk olie) for at øge optagelsen i planterne. Udover de angivne behandlinger inkluderede forsøget ubehandlede pletter.

TABEL 2.6 ANVENDTE HERBICIDER OG DOSER (G A.S./HA) I DOSIS-RESPONS FORSØG PÅ HVID- OG RØDKLØVER. N SVARER TIL NORMALDOSERING.

Doser	Metsulfuron-methyl (g a.s./ha)	Bentazon (g a.s./ha)
0	0	0
1/32 N	0,19	
1/16 N	0,39	
1/8 N	0,75	
1/4 N	1,5	360
1/2 N	3	720
1 N	6	1440

2.3.4 Effekt på biomasse

Hvidkløver blev sprøjtet ved begyndende blomstring (6. maj) og rødkløver i blomsterknopstadiet (10. juni). Forsøget blev udført med 3 gentagelser per behandling samt 6 ubehandlede. Efter sprøjtning blev planterne anbragt udendørs. Planterne blev høstet 3 – 4 uger efter sprøjtning, hvor frisk- og tørvægt blev målt.

2.3.5 Længde af blomstringsperioden

Effekten af herbicidbehandling på længden af blomstringsperioden blev vurderet i hvidkløver, som var sprøjtet ved begyndende blomstring. Antallet af blomsterhoveder blev optalt 20 dage efter sprøjtning, og blev inddelt i 3 forskellige klasser: 1) tidligt blomstringsstadium, 2) medium blomstringsstadium og 3) sent blomstringsstadium.

2.3.6 Herbiciders effekt på pollenproduktion, nektarproduktion og nektarkvalitet.

Hvidkløver og rødkløver blev sprøjtet ved begyndende blomstring (henholdsvis 6. maj og 10. juni) og fuld blomstring (henholdsvis 19. maj og 17. juni). Efter sprøjtning blev planterne placeret på udendørs borde. Blomsterne blev dækket med net for at undgå insektbesøg. Nektarproduktionen blev undersøgt i udvalgte behandlinger. Otte blomsterhoveder per behandling blev centrifugeret, og nektaren blev opsamlet i kapillærrør. Nektarprøver i hvidkløver blev udtaget d. 26. maj (20 og 7 dage efter sprøjtning) og i rødkløverprøver d. 5. juli (25 og 18 dage efter sprøjtning). Mængden af nektar blev målt, og nektarkvalitet i form af sukkerprocent blev bestemt ved måling med refraktometer.

Pollenproduktionen blev målt i rødkløver (tidlig sprøjtning), da det var lettere at udtage støvdragerne i denne art frem for hvidkløver. Støvdragerne blev udtaget af 10 blomster per behandling med pincet og overført til Eppendorfrør (2 ml). Der blev tilsat 250 µl ethanol, og prøverne blev opbevaret mørkt i køleskab indtil tælling. Hver prøve blev fordelt på en tælleplade, og optælling af pollen blev udført under mikroskop.

2.3.7 Effekt på frøproduktion

Rød- og hvidkløver blev behandlet ved begyndende blomstring (henholdsvis 6. maj og 10. juni) og fuld blomstring (henholdsvis 19. maj og 17. juni). Efter sprøjtning blev planterne placeret på udendørs borde. I august, hvor frøindsamling var tilendebragt, blev de flyttet i væksthuse. Efter frømodning blev frøhovederne talt og klippet af. Frøene blev håndtærsket og renset. Tusindkornsvægten blev beregnet ud fra bestemmelse af vægt af 2 x 100 frø per behandling.

Frøenes spireevne blev bestemt ved spiring på filtrerpapir i petriskåle. For hver gentagelse blev der lavet 2 spireprøver med 25 frø i hver.

2.3.8 Data analyse

Der blev udført en variansanalyse på alle resultater. Der blev foretaget en parvis sammenligning af behandlingerne vha. Duncans Multiple Comparison Test (Duncan 1955).

På friskvægtdata for metsulfuron-behandling blev der udført en non-lineær regressionsanalyse vha. en log-logistic dosis-response model.

$$U_i = \frac{D - C}{1 + \exp[b(\log(ED_{50i}) - \log(z))]} + C \quad (1)$$

hvor U_i er procenten af reduktion i biomassen, z er dosen, D og C er øverste og nederste asymptote ved ubehandlet og meget høj herbiciddosis, ED_{50i} er den dosis, der resulterer i 50 % reduktion af plantebiomasse, b er hældningskoefficienten omkring ED_{50i} og i er de forskellige arter ukrudt. (Seefeldt et al. 1995).

ED_{90} doserne blev bestemt ved at re-parameterisere ligning 1:

$$U_i = \frac{D - C}{1 + \exp[b(\log(ED_{90i}) + 1.009/b - \log(z))]} + C \quad (2)$$

Antagelsen, at logistiske dosis-respons-kurver kan anvendes, blev testet ved hjælp af 'lack of fit', hvor residualerne fra variansanalysen og den non-liniære regression blev sammenlignet.

2.4 Sukkermængde og -indhold i mulige fokusplanter

Idet forekomsten af bier i et område kan undersøges ved at tælle de enkelte bi-arter på udvalgte planter (dvs. bruge disse planter som "fælder"), foretog vi en vurdering af potentielle indsamlingsplanter, herefter benævnt fokusplanter.

For at få flest mulige bi-arter med i undersøgelsen skal fokusplanterne: (1) være attraktive for alle/mange arter af bier, (2) være almindeligt og talrigt forekommende i agerlandet enten naturligt eller som afgrøde, og således være en vigtig blomsterressource i landskabet for bier og (3) blomstre på forskellige tidspunkter i sæsonen, således at de tilsammen vil dække størstedelen af biernes aktivitetsperiode, fra marts til september.

I projektet blev 7 planter (Seljepil (*Salix caprea*), raps (*Brassica napus*), mælkebøtte (*Taraxacum officinale*), hvidkløver (*Trifolium repens*), rødkløver (*T. pratense*), agertidsel (*Cirsium arvense*) og hedelyng (*Calluna vulgaris*)) undersøgt med henblik på en karakterisering af deres værdi som fokusplante. Pil er det man kalder tvebo, dvs. at han- og hunblomster findes på hver sin plante og er derfor analyseret hver for sig.

I projektet undersøgte vi udelukkende plantens værdi som fødeplante for bier og andre pollinatorer ved analyse af nektarmængde og sukkerindhold i nektaren. Nektar blev ekstraheret fra 40-50 enkelt blomster (raps og lyng) eller 20 blomsterstande (mælkebøtte, hvid- og rødkløver, agertidsel) ved centrifugering, og mængden blev bestemt ved brug af mikro-kapillærrør. Sukkerindholdet (sucrose æquivalenter per ml) bestemte vi ved hjælp af et refraktometer. Herefter blev den totale sukkermængde per blomst eller blomsterstand beregnet (μg sukker/blomsterenhed). Da variationen i nektarmængde og sukkerindhold ikke er kendt, ville vi desuden beregne det antal blomster/blomsterhoveder, der skal anvendes, for at standardafvigelsen bliver mindre end eller lig 5 % af middelværdien (power-analyse).

Alle blomster blev indsamlet på en tør og solrig dag efter at duggen var forsvundet. Blomsterne blev lagt i centrifugerør og derefter på køl indtil centrifugeringen i laboratoriet. Blomsterne var ikke overdækket forud for indsamlingen da dette påvirker nektarproduktionen negativt. Til gengæld forventede vi en større variation i nektarmængden mellem blomsterne, da nogle blomster kunne være besøgt umiddelbart forud for indsamlingen.

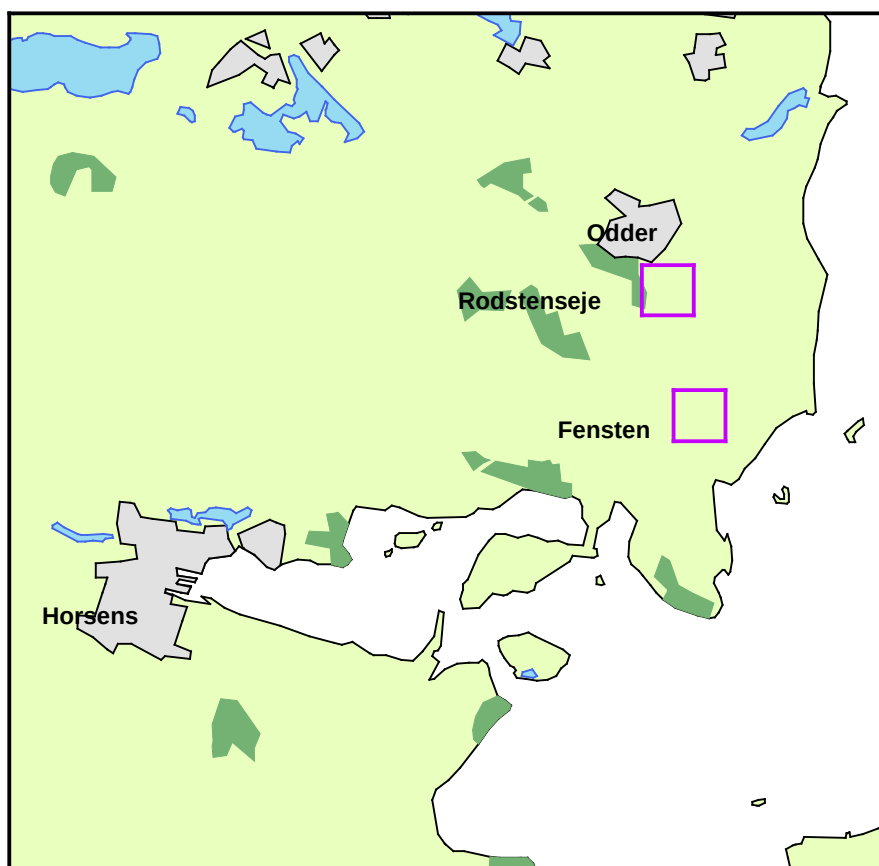
3. Resultater

Idet projektets formål som tidligere nævnt i høj grad har været afprøvning af metoder, omhandler resultatafsnit såvel egentlige data som observationer vedrørende de anvendte metoder.

3.1 Feltundersøgelser

3.1.1 Værkstedsområdernes karakteristika

De to udvalgte kløvermarker lå på to bedrifter sydøst for Odder (Figur 3.1). På godset Rodstenseje dyrkedes kløver økologisk (cold spot), mens bedriften ved Fensten dyrkedes konventionelt (hot spot). Hvidkløvermarken på Rodstenseje var 17,7 ha, mens kløvermarken ved Fensten kun var ca. 3 ha. De nærmeste afgrøder var begge steder vintersæd (vinterhvede, triticale, vinterbyg) (Figur 3.2), med en rapsmark inden for mulig flyveafstand. Der var 6 km mellem de to lokaliteter, hvilket er langt over den maximale fødesøgningsafstand for humlebier (fx Osborne et al. 2008, Knight et al. 2005). De udsatte humlebier forventedes derfor ikke at flyve fra den ene lokalitet til den anden. Begge steder var der sat honningbier ud ved kløvermarken.



FIGUR 3.1 VÆRKSTEDSOMRÅDERNES PLACERING SØ FOR ODDER.

Rodstenseje



Fensten



FIGUR 3.2 FLYFOTO FRA 2010 AF DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER MED ANGVELSE AF HUMLEBISTADERNES (RØDE TREKANTER) OG KLØVERFRØMARKERNES PLACERING (PINK KANT) HVERT FOTO DÆKKER ET AREAL PÅ 2 KM X 2 KM.

Tabel 3.1 viser fordelingen af arealanvendelsen i de to værkstedsområder. Det skal bemærkes, at lav bebyggelse dækker huse og haver og derfor er relevant i forhold til bierne. Tabellen viser, at området ved Rodstenseje er mindre homogent og har en højere dominans af græsarealer. Dog består begge områder altovervejende af arealer med korndyrkning (hhv. 89 og 57 % ved Fensten og Rodstenseje).

TABEL 3.1 FORDELING AF AREALANVENDELSEN (HA) PÅ DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER BESTEMT UD FRA MARKKORT 2011 OG KORT10/FOT DATA.

Arealtype	Fensten	Rodstenseje
Lav bebyggelse	17,3	13,5
Industri	1,2	0,5
Skov	0,4	24,0
Skov / Pyntegrønt		2,1
Vådområde		1,6
Vådområder brugt som udtagning		1,5
Sø	0,8	0,7
Ukendt (primært veje og lign.)	10,1	28,6
Korn i alt	355,1	229,2
Vinterraps	11,9	11,0
Ærter		17,5
Silomajs		11,3
Timothefrø		6,4
Kløverfrø	3,1	17,4
Kløvergræs under 50 pct. kløver (omdrift)		25,1
Græs uden kløver (omdrift)		0,1
Græs og kløvergræs (må ikke gødes)	0,2	2,6
Miljøgræs MVJ-ordn. 2 (græsset, ugødet)		1,1
Permanent græs		2,4
Udyrket mark		3,7
Sum	400	400

Af tabel 3.2 ses, at der ikke er store forskelle i den samlede længde af hegn, diger og skovbryn mellem de to værkstedsområder. Desuden er der i begge områder, men især ved Rodstenseje, betydelige arealer med vejkant og lignende.

TABEL 3.2 FORDELING AF LINEÆRE STRUKTURER PÅ DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER BESTEMT UD FRA KORT 10/FOT-DATA.

Linje type	Fensten	Rodstenseje
	Længde (km)	Længde (km)
Dige	3,38	0,65
Byhegn	3,39	1,97
Landhegn	6,72	9,09
Skovbryn	0,27	8,51
Søbred	1,41	0,88
Vandløb	1,68	3,40
Vandløbsbred*	1,90	4,33
Vej over 6 m		2,83
Vej 3-6 m	5,55	9,58
Anden vej	3,88	2,54

***VANDLØBSBRED TEGNES KUN FOR STØRRE VANDLØB**

Tabel 3.3, som viser fordelingen på ydre og indre markskel, dvs. hhv. skel der grænser op til andet end marker, og skel mellem marker, understøtter indtrykket af, at landskabet ved Rodstenseje er mere heterogent. Når man sammenholder med flyfotoet i Figur 3.2 ses, at dette primært skyldes indblanding af små pletter af fx skov, samt forekomsten af småparceller.

TABEL 3.3 FORDELING AF MARKSKEL PÅ DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER

Skel type	Fensten	Rodstenseje
	Længde (m)	Længde (m)
indre markskel	15.782	13.645
ydre markskel	20.932	32.076

3.1.1.1 Noter om fødetilgængelighed i områderne med humlebistader

I umiddelbar nærhed af stadernes placering (stader ved hvidkløver hhv. hegn) fandt vi de mulige fødeplanter for de udsatte humlebier, som er præsenteret i Tabel 3.4. Jordhumler placeret ved hegn vil dog sandsynligvis flyve de 600-700 m op til kløvermarken, hvis blomsterressourcen er betydelig sammenlignet med andre blomstrende planter i umiddelbar nærhed af deres bo.

TABEL 3.4 FOREKOMST AF GODE BI-PLANTER (AFGRØDER OG UKRUDT) I DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER.

Lokalitet	Dyrkede afgrøder	Blomstrende ukrudt i markerne	I nærliggende skovbund/ved skel	I nærliggende hegn
Rodstenseje, stader ved hvidkløvermark	Hvidkløver Raps	Kamille Rødkløver Spiltdraps Tidsler (flere slags) Valmuer	Brombær (få) Dueurt Gedebled(få) Hindbær (få) Ranunkler (flere slags) Ribs (få) Steffensurt Storkenæb	Lind Mirabelle Pil (en enkelt) Røn Tjørn
Rodstenseje, stader ved hegn	Ingen bi-planter (kornmark)	Agersvinemælk Agertidsel Forglemmegej Gulkløver Haremad Humlesneglebælg Kamille Ærenpris	Alm. Kællingetand Brunelle Gederams Klokke Kåltidsel Lodden dueurt Lucerne Ranunkel Røllike Skovjordsbær Steffensurt	Brombær Kirsebær Rose Røn Tjørn
Fensten, stader ved hvidkløvermark	Hvidkløver Raps	I grøftekant ved marken: Agertidsel Gul fladbælg Lådden dueurt Musevikke Perikon Ranunkel		Brombær Febernellikero Hestehov Korbær Mirabelle Pil Slåen Tjørn
Fensten, stader ved hegn	Ingen bi-planter (kornmark)	På nærliggende byggeplads: Hvidkløver Rødkløver Spiltdraps	Mange haver med blomster, bl.a. større bevoksning med Rynket rose	Haremad Hyld Mirabelle Mælkebøtte Rose Rødkløver Røn Snerle Tjørn

Der var generelt flere blomsterressourcer ved Rodstenseje primært pga. ukrudt i markerne, ved skel og i hegn. Blomstrende planter i hegn og grøftekant fandtes dog også ved Fensten.

3.1.2 Pesticidindhold i jordhumler

De opnåede detektionsgrænser for de analyserede stoffer fremgår af Tabel 3.5.

TABEL 3.5 TABELLEN VISER DETEKTIONSGRÆNSE (D.L.) I NG PR HUMLEBI FOR DE PESTICIDER, DER ER ANALYSERET FOR. AKTIVSTOFFER MED FED SKRIFT ER OPLYST ANVENDT I OMRÅDERNE, HVOR HUMLEBIERNE HAR VÆRET UDSAT. * ANGIVER, AT STOFFET ER BI-MÆRKET. F=FUNGICID, H=HERBICID, I=INSEKTICID

Aktivstof	Type	Eksempel på produktnavn(e)	Detektionsgrænse, ng/bi
Azoxystrobin	F	Amistar	0,06
Bentazon	H	Basagran	0,5
Boscalid	F	Signum, Bell	0,3
Bromoxynil	H*	Oxitril, Briotril	0,5
Cypermethrin	I*	Cyperb	0,4
Diflufenican	H	DFF	0,04
Dimethoat	I*	Danadim Progress	0,5
Epoxyconazol	F	Bell, Opera, Opus	0,2
Fenpropidin	F	Tern, Zenit	0,04
Fenpyroximat	I	Danitron	0,06
Fluazifop fri syre	H	Fusilade	0,2
Fluazifop-buthyl	H	Fusilade	0,2
Imidacloprid	I*	Confidor, Gaucho	2
Iodosulfuron methyl, natrium	H	Atlantis, Hussar, Majster	1
Ioxynil	H*	Oxitril, Briotril	0,1
Kresoxim-methyl	F	Candit	4
Lambda-Cyhalothrin	I*	Karate	1
Malathion	I*	Maladan	0,06
MCPA	H	Basagran, M-750	0,5
Metamitron	H	Goltix	2
Pendimethalin	H	Stomp	0,1
Phosalon	I*	Zolone	0,03
Pirimicarb	I	Pirimor	0,01
Propyzamid	H	Kerb	0,2
Prosulfocarb	H	Boxer	0,02
Prothioconazol	F	Proline	0,5
Pyraclostrobin	F	Signum, Comet, Opera	0,01
Tau-Fluvalinate	I	Mavrik	0,2

Nedenstående Tabel 3.6 viser, hvilke pesticidfund, der er gjort på/i bierne fra de forskellige stader i de to værkstedsområder. De pesticider fra ovenstående Tabel 3.5, der ikke fremgår af Tabel 3.6, har ikke kunnet påvises på/i bierne.

Af de 27 stoffer, der blev analyseret for, blev 12 fundet i en eller flere prøver. Der blev fundet boscalid i alle 48 udtagne prøver. Boscalid anvendes til bekæmpelse af svampesygdomme i gulerødder, persillerod, pastinak, hvid-, rød-, savoy-, rosen- og blomkål, broccoli, ærter, bønner, løg, kirsebær og blommer, jordbær, porrer, salat, spinat, rucola, solbær, ribs, hindbær, brombær, raps og kartofler. Pyraclostrobin, der sammen med boscalid blandt andet indgår i svampemidlet Signum, blev fundet i 34 prøver. Azoxystrobin blev fundet i 30 prøver, selvom det, så vidt vi ved, ikke er anvendt i nogen af områderne. Azoxystrobin er et svampemiddel, der er tilladt til bekæmpelse af svampesygdomme i korn, kartofler, kepaløg, skalotteløg, hvidløg, forårsløg, purløg, porrer, gulerod, persillerod, pastinak, hvidkål, rødkål, savojkål, rosenkål, blomkål, broccoli, grønkål, kinakål, blegselleri, knoldselleri (incl. selleriblade), salat, rucola, persille, jordbær, sukkerroer, rødbeder, majroer og kålroer, ærter, raps og frøgræs. Derudover var der tale om enkeltstående fund.

Det var overordnet set ikke den store forskel i pesticideksponering af jordhumlerne i de to områder. Der var nogenlunde overensstemmelse mellem de oplysninger, vi har fået om pesticidanvendelsen i markerne omkring humlebistaderne, bortset fra de ret hyppige fund af stoffet azoxystrobin samt den ”manglende” forekomst af tau-fluvanilat (Mavrik) i jordhumlerne trods anvendelsen i markerne ved værkstedsområderne.

TABEL 3.6 MÅLT PESTICIDINDHOLD I HUMLEBIER I NG/HUMLEBI. H: HERBICID, F: FUNGICID, I: INSEKTICID. STOFNAVNE FREMHÆVET MED FED SKRIFT ER OPLYST ANVENDT I VÆRKSTEDSOMRÅDERNE. ”< XX” ANGIVER, AT STOFFET VAR UNDER DEN AKTUELLE DETEKTIONSGRÆNSE.

Dato	lokalitet	Placering	Stade 5 bier pr. stade	Bentazon H	Diflufenican H	Metamitron H	Pendimethalin H	Prosulfocarb H	Azoxystrobin F	Boscalid F	Epoxyconazol F	Prothioconazol F	Pyraclostrobin F	Lambda- cyhalothrin I	Pirimicarb I
16-jun	Fernsten	Hegn	1	<0,5	0,7	<2	<0,5	<0,5	<0,06	0,9	<2	<0,5	0,1	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Hegn	2	<0,5	0,4	<2	<0,5	<0,5	<0,06	0,9	<2	10	0,19	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Hegn	3	<0,5	0,2	<2	<0,5	<0,5	<0,06	3,6	3	<0,5	1,95	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Hegn	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,06	0,8	<2	<0,5	0,05	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Hegn	5	<0,5	0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,06	0,8	<2	<0,5	0,05	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Hegn	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,06	1,2	<2	<0,5	0,35	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Kløver	1	<0,5	<0,04	<2	2	<0,5	<0,06	0,7	<2	<0,5	0,05	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Kløver	2	<0,5	<0,04	<2	0,5	<0,5	<0,06	0,6	<2	11	0,05	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Kløver	3	<0,5	<0,04	3	0,9	<0,5	<0,06	0,7	<2	<0,5	0,06	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Kløver	4	0,9	<0,04	<2	2	0,6	<0,06	1,5	<2	<0,5	0,04	<1	<0,01

16-jun	Fernsten	Kløver	5	1	<0,04	<2	2	0,6	<0,06	1,1	5	<0,5	0,06	<1	<0,01
16-jun	Fernsten	Kløver	6	<0,5	<0,04	<2	4	<0,5	<0,06	2,3	<2	<0,5	0,15	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Hegn	1	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,29	1,7	0,6	0,6	0,39	<1	0,03
16-jun	Rodstenseje	Hegn	2	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,08	1,0	<0,2	<0,5	0,04	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Hegn	3	<0,5	<0,04	3,7	<0,5	<0,5	0,08	0,8	<0,2	<0,5	0,15	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Hegn	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,08	0,7	0,4	<0,5	0,01	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Hegn	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,07	0,7	<0,2	<0,5	0,01	1,03	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Hegn	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,07	0,9	0,4	<0,5	0,07	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	1	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,13	1,4	<0,2	<0,5	0,04	2,6	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	2	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,14	0,5	<0,2	<0,5	0,01	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	3	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,08	0,9	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,25	0,5	<0,2	<0,5	0,02	1,1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,08	0,5	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
16-jun	Rodstenseje	Kløver	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,15	0,6	<0,2	0,8	<0,01	<1	<0,01

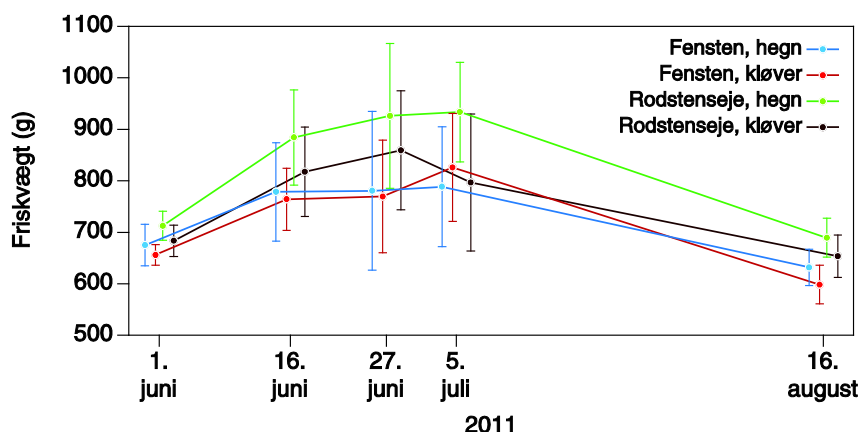
TABEL 3.6 FORTSAT

Dato	lokalitet	Placering	Stade 5 bier pr. stade	Bentazon H	Diflufenican H	Metamitron H	Pendimethalin H	Prosulfocarb H	Azoxystrobin F	Boscalid F	Epoxyconazol F	Prothioconazol F	Pyraclostrobin F	Lambda- cyhalothrin I	Pirimicarb I
05-jul	Fernsten	Hegn	1	<0,5	0,15	<2	<0,5	<0,5	0,03	0,73	<0,2	<0,5	0,03	3,2	<0,01
05-jul	Fernsten	Hegn	2	<0,5	0,17	<2	<0,5	<0,5	0,03	0,74	<0,2	<0,5	0,03	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Hegn	3	<0,5	0,18	<2	<0,5	<0,5	0,01	0,99	<0,2	<0,5	0,06	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Hegn	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,01	0,89	<0,2	<0,5	0,03	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Hegn	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,05	0,94	<0,2	<0,5	0,03	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Hegn	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	1,42	10	<0,5	0,03	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Kløver	1	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	0,53	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Kløver	2	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	1,35	<0,2	<0,5	0,03	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Kløver	3	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	0,8	<0,2	<0,5	0,04	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Kløver	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	1,6	<0,2	<0,5	0,05	<1	<0,01

05-jul	Fernsten	Kløver	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	1,33	<0,2	<0,5	0,02	<1	<0,01
05-jul	Fernsten	Kløver	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	0,96	<0,2	<0,5	0,02	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	1	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	0,4	<0,2	1,8	1,8	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	2	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	0,7	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	3	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,25	0,6	<0,2	<0,5	0,02	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,05	1,56	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,01	0,48	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Hegn	6	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	1,12	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	1	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,19	0,9	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	2	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,01	0,37	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	3	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,03	0,57	<0,2	0,9	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	4	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	0,44	<0,2	1,8	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	5	<0,5	<0,04	<2	<0,5	<0,5	<0,03	0,4	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01
05-jul	Rodstenseje	Kløver	6	0,53	<0,04	<2	<0,5	<0,5	0,02	0,36	<0,2	<0,5	<0,01	<1	<0,01

3.1.3 Humlebiernes trivsel

Udviklingen i vægten af humlebistaderne er vist i Figur 3.3. Der er en tendens til, at staderne på Rodstenseje voksede hurtigere end staderne ved Fensten. Desuden ser staderne ved hegnet på Rodstenseje ud til at have trivedes bedre end staderne ved kløvermarken på samme bedrift, mens der ikke er forskel på staderne ved Fensten.



FIGUR 3.3. GENNEMSNITLIGE VÆGTE AF ENKELTSTADER $\pm$ SD (N=6) FOR DE TO PLACERINGER PÅ DE TO BEDRIFTER I PERIODEN 1. JUNI-13. AUGUST 2011. I AUGUST VAR BOERNE FORLADTE ELLER UDDØDE.

I en del af humlestaderne var der mange "uvedkommende" smådyr, fx larver, bænkebidere, myrer, hvepse, løbebiller, ørentvister og iberiske skovsnegle, specielt efter at staderne var forladte eller uddøde, men også tidligere på sæsonen (se Figur 3.4).

Under indsamlingen af humlebier til analyse for pesticider bemærkede vi desuden, at der generelt var større aktivitet i de stader, der var mest solpåvirkede, hvilket i en grå og kølig sæson betød, at det var lettere at indsamle bier i de solbeskinne stader.



FIGUR 3.4. LØBEBILLE OG IBERISK SKOVSNGL I HUMLESTADER AUGUST 2011.

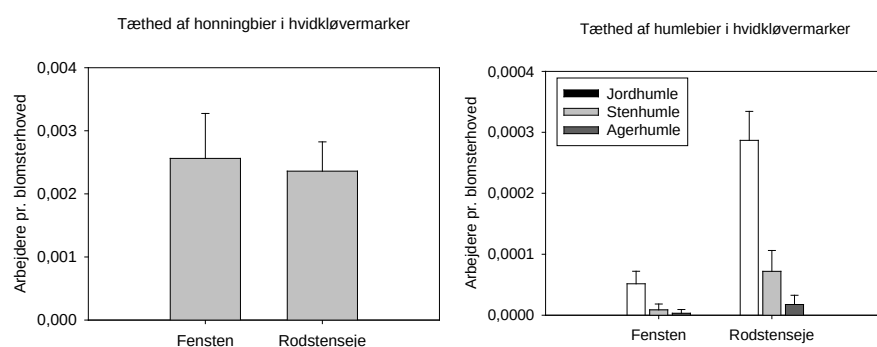
3.1.4 Forekomst af blomsterbesøgende bier

I hvidkløvermarkerne blev der set: bierne: Honningbi (*Apis mellifera*), Jordhumle (*Bombus terrestris/lucorum*), Stenhumle (*B. lapidarius*), Agerhumle (*B. pascuorum*), Hushumle (*B. hypnorum*), bladskærerbi (*Megachile* sp.), og sommerfuglen Nældens takvinge (*Aglais urticae*)).

Der var ikke signifikante forskelle på abundansen (individer/blomsterhoved) af de blomsterbestøvende insektgrupper i forskellige plots inden for hver af de to kløvermarker (Wilcoxon test, alle $P > 0.05$). Sammenlignes den økologiske mark (Rødstenseje) med den konventionelle (Fensten), fandt vi ikke signifikant forskel i abundansen af honningbier og "andre" (Mann-Whitney U-test, $P > 0.05$), men for de mest almindelige humlebiarter fandt vi signifikant flere ved Rødstenseje (jordhumle Mann-Whitney $U = 17,3$ og $P < 0,0001$, stenhumle $U = 13,6$ og $P < 0,0002$; agerhumle $U = 7,0$ og $P < 0,008$). Bemærk, at blomstertætheden (og dermed antallet af observerede honningbier) var højere i Fensten end Rødstenseje, og der derfor i observationsperioden blev set flere honningbier i Fensten (Tabel 3.7). Når der tages højde for blomstertætheden, var forskellen i abundans (bier/blomsterhoved) dog ikke signifikant (Fig. 3.5)

TABEL 3.7. TOTALE ANTAL AF DE HYPPIGST FOREKOMMENDE BI-ARTER I DE TO VÆRKSTEDSOMRÅDER.

Lokalitet	Jordhumle	Agerhumle	Stenhumle	Honningbi	Andre
Fensten	53	3	10	2603	4
Rødstenseje	180	11	45	1480	0



FIGUR 3.5. TÆTHED AF HONNINGBIER (VENSTRE) OG HUMLEBIER (HØJRE) I HVIDKLØVERMARKER DEN 27. JUNI 2011. SØJLER VISER GENNEMSIT ± SD.

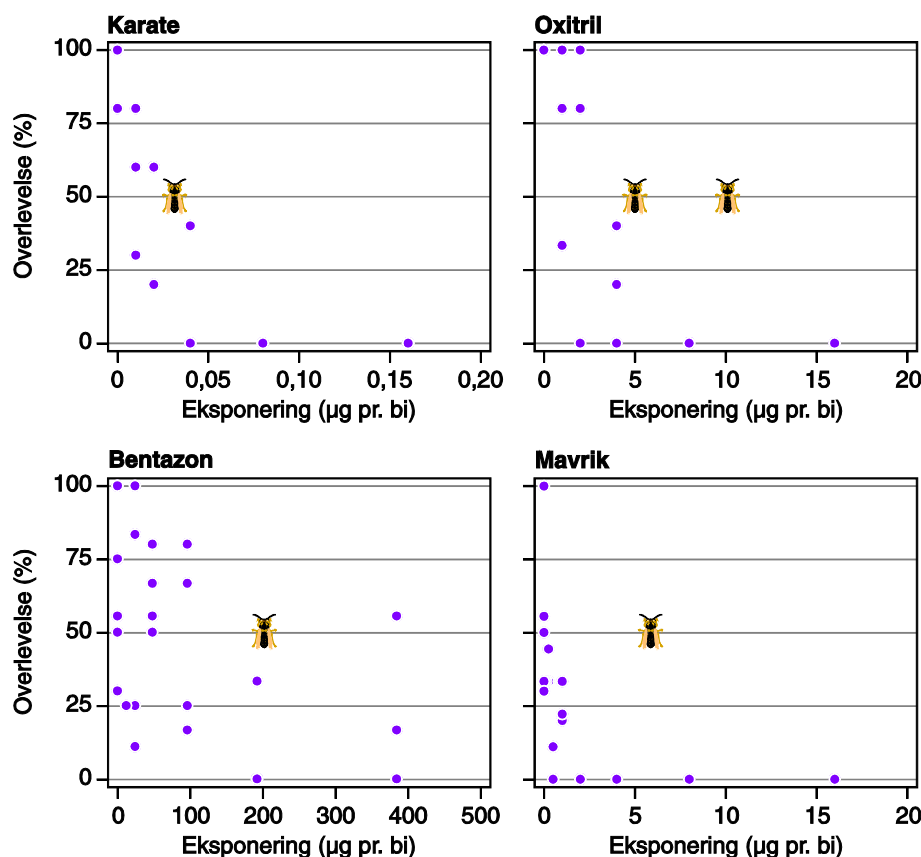
3.2 Giftigheden af forskellige sprøjtemidler for murerbi og jordhumle

3.2.1 Direkte effekter på jordhumle og murerbi

3.2.1.1 Murerbi

Overlevelsen af murerbier eksponeret for Karate, Oxitril, bentazon og Mavrik er vist i Figur 3.6. Til sammenligning er vist LD_{50} -værdierne for honningbier rapporteret i Footprint (2006). For Oxitril er der angivet to LD_{50} -niveauer, idet midlet består af to stoffer. De estimerede LD_{50} -værdier for murerbi for hhv. Karate, Oxitril og Mavrik er $0,03 \pm 0,3 \mu\text{g/bi}$, $3 \pm 1,4 \mu\text{g/bi}$ og $0,7 \pm 1,7 \mu\text{g/bi}$. LD_{50} for bentazon kunne ikke bestemmes. Det ses af Figur 3.6, at dødeligheden for murerbier er den samme som eller højere end for honningbi for de anvendte doser af de testede stoffer, dvs. LD_{50} er lavere for murerbierne. For Mavrik stemmer vore resultater for murerbi bedre overens med LD_{50} -værdien fra EPA (2005) på $0,2 \mu\text{g/honningbi}$ end med værdien fra Footprint (2006) (se evt. Tabel 2.3).

Af Figur 3.6 ses også, at der i nogle test var en stor kontroldødelighed. Dette var især tilfælde for de sidst udførte test, dvs. test udført i juli og august.



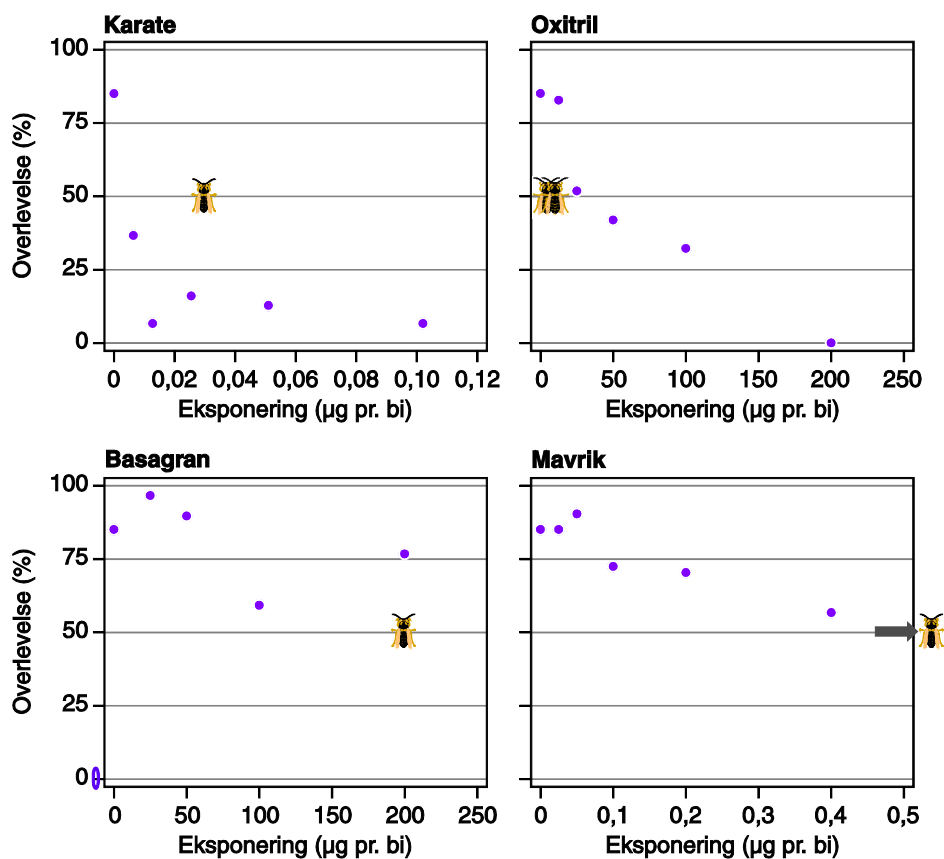
FIGUR 3.6. EFFEKT AF FORSKELLIGE PESTICIDER PÅ OVERLEVELSEN AF MURERBIER 48 TIMER EFTER EKSPONERING. HONNINGBI-SYMBOLERNE ANGIVER LD₅₀-VÆRDIER FOR HONNINGBIER (FOOTPRINT 2006).

I en enkelt test havde nogle af murerbierne forvildet sig ned i blomsternes vand. Disse bier indgår ikke i opgørelsen af testen.

3.2.1.2 Jordhumle

Resultatet af testene med jordhumle er vist i Figur 3.7. På grund af en høj kontroldødelighed mellem 24 og 48 timer fra forsøgsstart, er data fra 24 timer vist.

Sammenlignet med giftigheden for honningbier rapporteret i FOOTPRINT (2006) er jordhumle lige så følsom over for Oxitril og Basagran, lidt mere følsom over for Karate og markant mere følsom over for Mavrik. For Mavrik passer resultatet bedre overens med LD₅₀-værdien fra EPA (2005) på 0,2 µg/bi.



FIGUR 3.7. EFFEKT AF FORSKELLIGE PESTICIDER PÅ OVERLEVELSEN AF JORDHUMLE 24 TIMER EFTER EKSPONERING. HONNINGBI-SYMBOLERNE ANGIVER LD50-VÆRDIER FOR HONNINGBIER (FOOTPRINT 2006). FOR MAVRIK ER VÆRDIEN UDEN FOR RANGE (5,83 µG/B1).

3.3 Indirekte effekter målt på rød- og hvidkløver

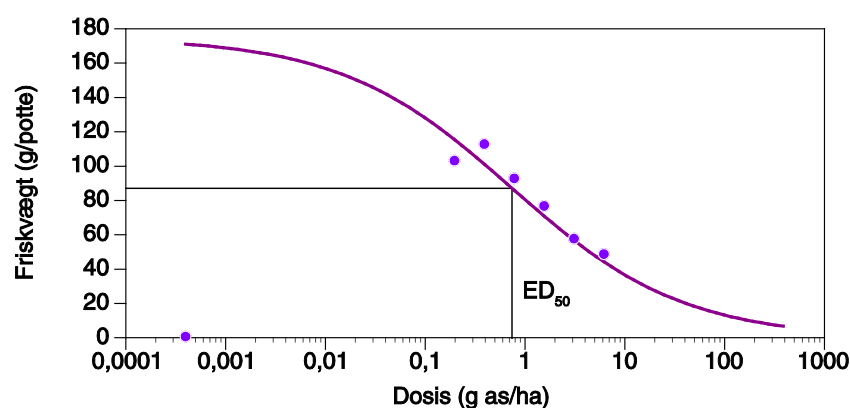
3.3.1 Effekt på biomasse

Der var stor forskel i følsomheden over for metsulfuron af de to kløverarter. Højeste dosering af metsulfuron reducerede biomasse af hvidkløver med 70%, men havde mindre end 10% effekt på rødkløver (Tabel 3.8 og Figur 3.8). Bentazon er godkendt i hvid- og rødkløver, og det var derfor ikke overraskende, at der ikke var effekt på biomasse af hvidkløver og rødkløver af dette herbicid (Tabel 3.8).

TABEL 3.8. EFFEKT AF METSULFURON OG BENTAZON PÅ BIOMASSE AF HVID- OG RØDKLØVER. FRISK- OG TØRVÆGT ER GENNEMSIT AF 3 GENTAGELSER. BØGSTAVER REFERERER TIL EN PARVIS SAMMENLIGNING AF RESULTATERNE VED DUNCANS MULTIPLE COMPARISON TEST. RESULTATER MED SAMME BØGSTAV ER IKKE SIGNIFIKANT FORSKELLIGE.

Herbicide	Dosis (g as./ha)	Hvidkløver		Rødkløver	
		Friskvægt (g/potte)	Tørvægt (g/potte)	Friskvægt (g/potte)	Tørvægt (g/potte)
Ubehandlet	0	175,1 a	51,4 a	209,1 ab	83,8 abc
Metsulfuron	0,19	103,4 cd	35,8 bcd	267,3 ab	98,1 ab
	0,39	113,0 bc	32,3 cd	241,2 ab	90,6 abc
	0,75	93,0 cde	29,4 d	227,4 ab	76,1 bc
	1,5	77,0 cde	26,6 d	175,5 b	64,9 c
	3	58,5 de	23,4 a	202,2 ab	72,9 bc
	6	49,9 e	22,3 d	197,3 ab	69,6 bc
Bentazon	360	163,2 a	46,2 ab	263,9 ab	98,1 ab
	720	151,2 ab	44,1 abc	263,9 ab	96,6 ab
	1440	164,4 a	45,0 abc	247,0 a	109,0 a

Da der ikke var effekt af bentazon og meget begrænset effekt af de anvendte doseringer af metsulfuron på rødkløver, var det ikke muligt at anvende non- liniær regressionsanalyse på disse resultater. Derimod blev den non-liniære model anvendt på resultaterne af hvidkløver behandlet med metsulfuron (Figur 3.8).



FIGUR 3.8. DOSIS- RESPONS AF METSULFURON PÅ HVIDKLØVER. ED50 ER BEREGNET TIL 0,75 G A.S./HA.

3.3.2 Effekt på blomstring

Tabel 3.9 viser effekten af bentazon og metsulfuron på blomsterproduktion og varighed af blomstringsperiode i hvidkløver behandlet i den tidlige blomstringsperiode. Metsulfuron reducerede antallet af blomsterhoveder, men påvirkede ikke fordelingen af blomstringstrin og dermed ikke længden af blomstringsperioden. Bentazon påvirkede ikke antallet af blomsterhoveder, men ved højeste dosering var der tendens til en forlænget blomstringstid. Andelen af blomsterhoveder på sent blomstringstrin ved højeste dosering blev reduceret og andelen på medium blomstringstid øget.

TABEL 3.9. EFFEKT AF METSULFURON OG BENTAZON PÅ VARIGHED AF BLOMSTRINGSPERIODEN I HVIDKLØVER. . BOGSTAVER REFERERER TIL EN PARVIS SAMMENLIGNING AF RESULTATERNE VED DUNCANS MULTIPLE COMPARISON TEST. RESULTATER MED SAMME BOGSTAV ER IKKE SIGNIFIKANT FØRSKELLIGE. GENNEMSNIT AF 3 GENTAGELSER.

Herbicide	Dosis	Blomstringstrin			Antal blomsterstande per potte
		Tidlig (%)	Medium (%)	Sen (%)	
Metsulfuron	0	44,5 a	17,2 a	38,3 ab	25,5 a
	0,19	31,5 a	11,3 a	57,1 ab	13,0 ab
	0,39	14,3 a	16,1 a	69,6 a	9,0 b
	0,75	0	0	0	0
	1,5	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
Bentazon	360	26,8 a	15,5 a	57,7 ab	19,0 ab
	720	38,7 a	8,9 a	52,4 ab	22,5 a
	1440	49,3 a	26,0 a	24,8 b	14,5 ab

3.3.3 Effekt på nektar- og pollenproduktion

Mængden af nektar per blomsterstand, og nektarens kvalitet (indhold af sukker) er vist i Tabel 3.10 og 3.11. De enkelte tal er gennemsnit af 8 gentagelser. I hvidkløver ses, at mængden af nektar i ubehandlet varierede forholdsvis meget mellem det hold planter, som blev sprøjtet ved begyndende blomstring, og det hold, som blev sprøjtet ved fuld blomstring (0,28 versus 0,67 µl per blomst). Der er ikke fundet signifikante forskelle i mængden af nektar mellem ubehandlede og behandlede planter indenfor hvert sprøjtetidspunkt. Sukkerindholdet varierede fra 0 til 29,5 % i de blomster, som blev sprøjtet ved begyndende blomstring, og den højeste dosering af begge herbicider havde en negativ effekt på sukkerkoncentrationen. Sukkerkoncentrationen i blomster sprøjtet ved fuld blomstring varierede fra 9 til 25,2 %, men der var ikke signifikante forskelle på behandlingerne. Omregnes mængden af nektar og koncentration af sukker til sukkerudbytte per blomsterstand, var der ikke signifikant forskel på de forskellige behandlinger (herbicider, doser, tidspunkter) og de ubehandlede uanset sprøjtetidspunkt.

For resultaterne i rødkløver ses ingen signifikante effekter på nektarproduktionen på nogen af sprøjtetidspunkterne. Sukkerkoncentrationen er signifikant højere i blomster behandlet med metsulfuron eller bentazon på knopstadiet sammenlignet med ubehandlet. Sammenlignes den

samlede sukkerproduktion per blomsterstand er der ikke signifikant forskel på ubehandlede og behandlede blomster.

TABEL 3.10. EFFEKT AF HERBICIDER PÅ NEKTARPRODUKTION OG KVALITET I HVIDKLØVER. TALLENE ER GENNEMSIT AF 8 GENTAGELSER. BOGSTAVERNE REFERERER TIL EN PARVIS SAMMENLIGNING AF RESULTATERNE VED HJÆLP AF DUNCANS MULTIPLE COMPARISON TEST. RESULTATER MED SAMME BOGSTAV ER IKKE SIGNIFIKANT FORSKELLIGE.

Herbicide	Dosis	Tidlig Sprøjtning (10. juni)			Sen sprøjtning (18. juni)		
		Mængde (µl pr. blomster stand)	Sukker %	Sukker- udbytte (µg pr. blomster stand)	Mængde (µl pr. blomster stand)	Sukker %	Sukker- udbytte (µg pr. blomster stand)
Ubehandlet	0	0,28 a	15,5 b	0,04 a	0,67 a	16,4 a	0,11 a
Metsulfuron	0,19	0,45 a	29,5 a	0,14 a	0,52 a	15,8 a	0,09 a
	0,39	0,15 a	0 c	0 a	0,68 a	13,4 a	0,08 a
	0,75	-			0,88 a	18,2 a	0,16 a
	1,5	-			0,57 a	16,4 a	0,07 a
	3	-			0,44 a	16,9 a	0,12 a
	6	-			0,71 a	25,2 a	0,18 a
Bentazon	360	0,37 a	26,7 a	0,09 a	0,33 a	9,0 a	0,03 a
	720	0,51 a	29,4 a	0,15 a	0,32 a	24,0 a	0,06 a
	1440	0,39 a	11,9 b	0,04 a	0,79 a	13,1 a	0,11 a

TABEL 3.11. EFFEKT AF HERBICIDER PÅ NEKTARPRODUKTION OG KVALITET I RØDKLØVER. TALLENE ER GENNEMSIT AF 8 GENTAGELSER. BOGSTAVERNE REFERERER TIL EN PARVIS SAMMENLIGNING AF RESULTATERNE VED HJÆLP AF DUNCANS MULTIPLE COMPARISON TEST. RESULTATER MED SAMME BOGSTAV ER IKKE SIGNIFIKANT FORSKELLIGE.

Herbicide	Dosis	Tidlig Sprøjtning (6. maj)			Sen sprøjtning (19. maj)		
		Mængde (µl pr. blomster stand)	Sukker %	Sukker- udbytte (µg pr. blomster stand)	Mængde (µl pr. blomster stand)	Sukker %	Sukker- udbytte (µg pr. blomster stand)
Ubehandlet	0	5,05 a	6,5 c	0,45 a	1,43 a	17,1 a	0,25 a
Metsulfuron	0,19	4,73 a	10,9 b	0,50 a	1,70 a	22,9 a	0,40 a
	0,39	1,55 a	12,3 a	0,19 a	0,93 a	28,2 a	0,20 a
	0,75				0,50 a	23,2 a	0,12 a
	1,5						
	3						
	6						
Bentazon	360	3,80 a	26,7 a	0,43 a	4,15 a	17,1 a	0,72 a
	720	5,40 a	29,4 a	0,71 a	3,79 a	20,7 a	0,82 a
	1440	5,09 a	11,9 b	0,77 a	0,96 a	17,3 a	0,17 a

Antallet af pollenkor per blomsterstand varierede fra 8 til 1931 indenfor de 10 ubehandlede prøver med et gennemsnit på 278 pollenkor per blomsterstand. På baggrund af den store variation i ubehandlet og indenfor de enkelte behandlinger blev der kun optalt pollen i to doseringer af hvert herbicide (Tabel 3.12).

TABEL 3.12. ANTAL POLLEN PR. HVIDKLØVERBLOMST VED BEHANDLING MED METSULFURON OG BENTAZON.

Herbicide	Dosis	Pollen (Antal/blomsterstand)
Ubehandlet	0	278 (8-1931)
Metsulfuron	0,19	7 (0-713)
	0,39	20 (12-34)
	0,75	-
	1,5	-
	3	-
	6	-
Bentazon	360	41 (0-126)
	720	528 (2-2021)
	1440	-

3.3.4 Effekt på frøproduktion

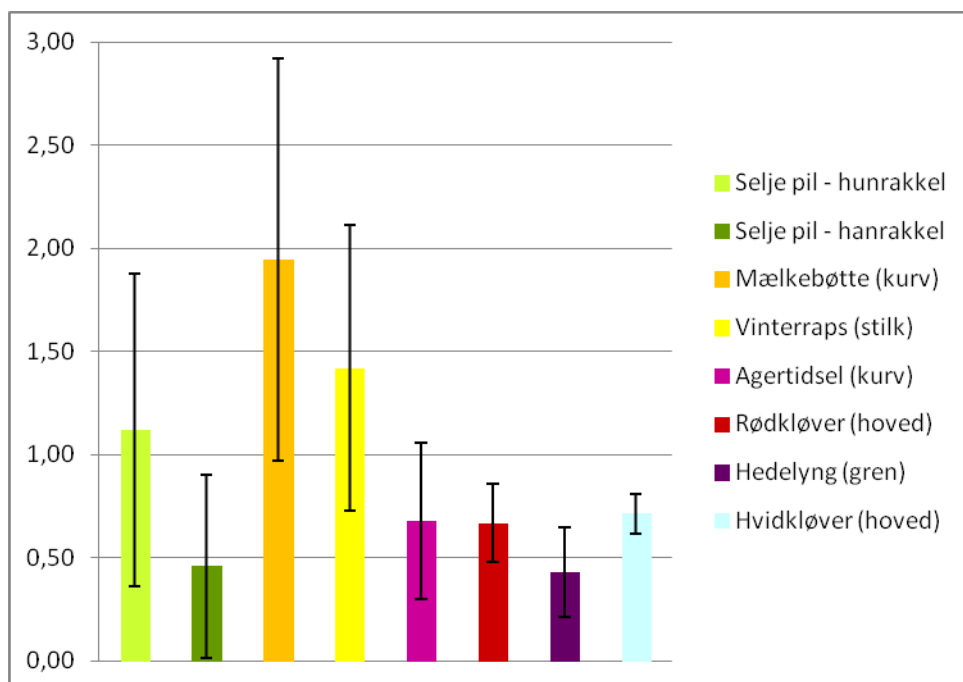
Metsulfuron havde en negativ indflydelse på antal frøstande, frøudbyttet pr. potte og tusindkornsvægten (TKV) uanset eksponeringstidspunkt (Tabel 3.13). Signifikante effekter af bentazon ses kun ved eksponering af planter i fuld blomst, hvor antal frøstande og frøudbyttet reduceres. Spiretest med de høstede frø viste, at spireprocenten var under 10 % for de ubehandlede frø, hvilket sandsynligvis skyldtes spirehvide i de nyligt høstede frø og ikke pesticidbehandlingerne (resultater ikke vist).

TABEL 3.13. EFFEKT AF METSULFURON OG BENTAZON PÅ FRØPRODUKTION AF HVIDKLØVER. FRØUDBYTTE I ANTAL FRØ PER POTTE ER BEREGNET UD FRA FRØUDBYTTET I G/POTTE OG TUSINDKORNSVÆGT (TKV). BOGSTAVER REFERERER TIL EN PARVIS SAMMENLIGNING AF RESULTATERNE VED DUNCANS MULTIPLE COMPARISON TEST. RESULTATER MED SAMME BOGSTAV ER IKKE SIGNIFIKANT FORSKELLIGE. GENNEMSIT AF 3 GENTAGELSER.

Hvidkløver eksponeret ved									
Herbicide	Dosis	Begyndende blomstring				Fuld blomstring			
		Frø-stande	Frøudbytte (g/potte)	TKV	Frøudbytte (stk/potte)	Frø-stande	Frøudbytte (g/potte)	TKV	Frøudbytte (stk/potte)
Ubehandlet	0	103 a	0,70 ab	0,63 a	1100 ab	77,4 ab	1,62 a	0,79 a	2055 a
Metsulforon	0,19	20,3 b	0,05 c	0,27 b	185 c	31,0 cd	0,10 b	0,27 b	371 b
	0,39	20,0 b	0	-		25,0 d	0,20 b	0,54 ab	370 b
	0,75	0	0	-		24,0 d	0,06 b	0,26 b	235 b
	1,5	0	0	-		21,8 d	0,07 b	0,26 b	261 b
	3	0	0	-		13,0 d	0 b	-	-
	6	0	0	-		21,5 d	0 b	-	-
Bentazon	360	79,0 a	1,17 a	0,72 a	1622 a	82,4 a	1,67 a	0,94 a	1770 ab
	720	58,0 a	0,61 ab	0,74 a	826 ab	65,8 ab	0,67 b	0,62 a	1082 ab
	1440	78,2 a	0,58 ab	0,74 a	786 ab	41 bcd	0,60 b	0,52 ab	1151 ab

3.4 Sukkermængde i mulige fokusplanter

Alle undersøgte planter indeholder nektar (Figur 3.9). For at gøre data for de enkelte arter så sammenlignelige som muligt er sukkermængden for raps og hedelyng i figuren vist som indholdet for samtidigt blomstrende blomster per stilk/gren dvs. indholdet pr. blomst er multipliceret med antallet af samtidigt udsprungne blomster på stilken/grenen. For øvrige arter er sukkermængden målt for blomsterstanden (rakkelt, kurv eller hoved). Som det fremgår af Figur 3.9 indeholder hunraklerne hos pil betydeligt mere nektar end hanraklerne.



FIGUR 3.9. SUGKERINDHOLD (µG SUCROSE-ÆKVIVALENTER PR BLOMSTERSTAND ± S.D.) I UDVALGTE FOKUSPLANTER, HVOR EN BLOMSTERSTAND UDGØR 1) EN RAKKEL HOS PIL, 2) EN KURV HOS MÆLKEBØTTE OG AGERTIDSEL, 3) ET BLOMSTERHOVED HOS RØD- OG HVIDKLØVER, OG 4) EN STILK ELLER GREN MED BLOMSTER HOS RAPS OG HEDELYNG.

Som det fremgår af figuren, er der betydelig variation i sukkerindholdet for de undersøgte arter. I Tabel 3.14 ses, hvor mange blomsterstande, der skal undersøges, hvis standardafvigelsen maksimalt må være 5 % af middelværdien. Hvidkløver er den eneste af de undersøgte arter, hvor variationen i det undersøgte materiale har været så begrænset, at standardafvigelsen udgør maksimalt 5 % ved anvendelse af 20 blomsterhoveder, og prøvestørrelsen kan nedsættes til 7. For de øvrige arter skal der analyseres betydelig flere blomsterstande, hvis den generelle variation svarer til variationen i det undersøgte materiale.

TABEL 3.14. ANTALLET AF BLOMSTERSTANDE, N, DER SKAL ANALYSERES, HVIS STANDARD AFVIGELSEN PÅ MIDDELVÆRDIEN HØJST MÅ VÆRE 5 %, ER ANGIVET (POWER ANALYSE).

Planteart	Antal blomsterstande, N
Seljepil, hun	184
Seljepil, han	373
Mælkebøtte	100
Vinterraps	93
Agertidsel	124
Rødkløver	32
Hedelyng	101
Hvidkløver	7

Alle planter er indsamlet under deres hovedblomstring. Indsamlingstidspunktet fremgår af Tabel 3.15.

TABEL 3.15. INDSAMLINGSTIDSPUNKTER FOR BLOMSTERSTANDE TIL MÅLING AF NEKTARPRODUKTION AF DE FORSKELLIGE PLANTEARTER.

Planteart	Indsamlingsdato
Seljepil	17. april
Mælkebøtte	9. maj
Vinterraps	26. maj
Agertidsel	28. juni
Rødkløver	28. juni
Hvidkløver	28. juni
Hedelyng	16. august

4. Diskussion

Idet et af hovedformålene med nærværende projekt har været at evaluere de anvendte metoder, er der i dette kapitel inden for hvert hovedemne et underpunkt med diskussion af metoder.

4.1 Eksponering

4.1.1 Værkstedsområder

Det viste sig umuligt at finde konventionelt dyrkede rødkløvermarker inden for køreafstand i 2011, hvilket bør tages i betragtning ved planlægning af nye undersøgelser. Heller ikke konventionelt dyrkede hvidkløvermarker var der mange af, hvorfor udvalget af mulige værkstedsområder blev meget begrænset. Som følge heraf var det heller ikke muligt at udvælge to værkstedsområder, som lignede hinanden helt med undtagelse af pesticidanvendelsen, som skulle være så forskellig som muligt. Som tilstræbt var afgrødefordelingen var nogenlunde ens, men resultaterne af feltundersøgelserne i de to områder samt den efterfølgende karakterisering af områderne mht. arealanvendelse mv. viser, at der i øvrigt var mange forskelle.

Ud fra analyserne af pesticidindholdet i humlebieerne kan vi ikke afgøre, om der som forudset er udvalgt hhv. et "hot spot" og et "cold spot" for så vidt angår pesticidbelastningen. Dog var det helt tydeligt, når man så på markerne i de to områder, at området ved Fensten var ukrudtsfrit som følge af behandling med herbicider, mens der på Rodsteneje var en tæt og blomsterrig ukrudtsflora.

4.1.1.1 Metoder

Det er åbenlyst, at de to datakilder anvendt til karakterisering af værkstedsområderne dels ikke giver et komplet billede af arealanvendelsen, dels giver forskellige bud på skovarealer. Ikke opgjorte arealer omfatter bl.a. veje og vejkanter, samt enkelte restarealer. Kort10/FOT indeholder ikke veje og stier som flader. Dermed er det heller ikke helt enkelt at få bestemt omfanget af vejrabatter, som kan være interessante biotoper for bier. Tilsvarende er fladen inden for kategorien *Vandløbsbred* heller ikke umiddelbart tilgængelig. *Vandløbsbred* er defineret ved kronekant, og arealet indeholder potentielt arealer med naturlig vegetation. Begge problemer kan helt eller delvist løses vha. yderligere GIS-behandling, men da der er tale om "håndarbejde", vil det være meget tidskrævende ved store arealer.

For så vidt angår, hegn kan det være svært ud fra Kort10/FOT-data at evaluere karakteren eller kvaliteten af disse. Der kan udmærket være sammenfald mellem flere temagrupper; fx kan *Hegn* (naturligvis) være grænse både mellem *Lav bebyggelse* og andre arealtemaer og ligge indeni *Lav bebyggelse*. Der er i enkelte tilfælde en vis tematisk unøjagtighed mellem *Hegn* og *Trægruppe*, formentlig på grund af tidspunkt for kortlægningen. Ved at supplere med tolkning af flyfoto samt registreringer i felten af fx tilstedeværende arter og deres udbredelse vil man kunne øge kvaliteten af data i forhold til relevansen for bier (som fødekilde eller redeplads).

Markkortene er ved levering ikke korrigeret for overlap mellem de enkelte marker. Markkortene er heller ikke begrænset til at ligge indenfor de officielle markblokke. I det aktuelle projekt er disse fejl rettet manuelt, men skal data benyttes i en landsdækkende sammenhæng, vil det være nødvendigt at udvikle automatiske procedurer.

Markskellene er klassificeret som henholdsvis indre og ydre markskel. Opdelingen i indre og ydre skel er udelukkende baseret på markkortene. Det har ved opdelingen ikke umiddelbart været muligt at tage hensyn til, hvorvidt sammenfaldende markgrænser er reelle interne skel eller f.eks. skel mod hegn, vandløb eller mindre veje. Her vil yderligere GIS-processering samt inddragelse af flyfoto kunne hjælpe på tolkningen.

I den anvendte udgave af PestNab er kortgrundlaget og landbrugsstatistikken fra 2007, hvilket er en mulig fejlkilde, da afgrødesammensætningen hele tiden ændrer sig. Ved anvendelse i et nyt projekt bør seneste kort- og registermateriale anvendes, hvilket dog kræver flere ressourcer end dem, der var afsat i dette projekt.

4.1.2 Pesticidindhold i jordhumler

Analyserne i dette projekt viser, at jordhumle eksponeres for pesticider i det danske landbrugsland. De målte koncentrationer er dog i alle tilfælde langt under den dødelige dosis for honningbier. Da der ikke var tydelige forskelle i pesticideksponeringen i de to vækstedsområder, er de umiddelbart svært at se en sammenhæng mellem det målte indhold og den forventede pesticidbelastning. Det kan der være mange grunde til. Måske eksponeres humlebieerne stort set ikke, selv om der anvendes pesticider i nogle marker, eller også har humlebieerne i området uden pesticider søgt føde uden for området.

Der er ikke mange undersøgelser at sammenligne med. Tilsyneladende er der slet ingen feltundersøgelser af humlebieers pesticidindhold, mens der er enkelte studier af, hvor meget honningbier eksponeres for pesticider. En italiensk undersøgelse viser således, at honningbier eksponeres for mange insekticider (Ghini et al. 2004) trods bestræbelserne på at undgå dette. Ligeledes rapporterer Mullin et al. (2010) samt Krupke et al. (2012) om høje niveauer af pesticider i honningbier i USA, hvor regler for pesticidanvendelse imidlertid afviger fra de europæiske. De danske erfaringer relaterer sig primært til analyser af indsendte, døde honningbier, hvor der generelt ikke findes nævneværdige pesticidkoncentrationer. Disse analyser kan imidlertid ikke antages at være dækkende for den reelle pesticideksponering, da bierne formentlig som oftest ikke vil dø af eksponeringen, men bare trives dårligere.

4.1.2.1 Metoder

Forekomsten af pesticider, som tilsyneladende ikke er brugt i nærheden af humlebistaderne viser, at det er vanskeligt at opnå sikre oplysninger om, hvilke stoffer man skal analysere for. Dette berettiger en bredere tilgang med analyse af flere pesticider, end de anvendte, inkl. de almindeligst anvendte.

For nogle af de analyserede pesticider er detektionsgrænsen pt. ret høj. Med skelen til de målte værdier må det konstateres, at det vil være ønskeligt og muligt at sænke detektionsgrænserne for nogle af stofferne ved yderligere metodeudvikling, også fordi det vil være ønskeligt at kunne analysere enkeltindivider i stedet for som her at måtte pulje dyrene 5 og 5. Måske vil det være en mulighed at supplere med målinger på dronningernes fedtlegemer, idet man kan forestille sig, at disse pga. den høje metabolisme i dronningerne vil opkoncentrere pesticiderne.

En optimering af metoderne burde også inkludere hyppigere indsamlinger under hensyntagen til, hvornår markerne sprøjtes, idet mange pesticider vil nedbrydes forholdsvis hurtigt efter udsprøjtning. Når man, som vi, gerne vil fange humlebieerne, der vender hjem til stadet, vil det være en fordel at placere staderne meget soleksporeret, da det giver en højere aktivitet og dermed en kortere ventetid på hjemvendende humlebieer. Selve metoden til indfangning af bier vil kunne effektiviseres, fx ved at etablere en eller anden form for fangpose, der kan påmonteres det flyvehul, som bierne kun kan flyve ind ad, samtidig med at de øvrige huller lukkes.

4.1.3 Humlebiernes trivsel

Bedømt ud fra stadevægtene trivedes humlebierne i hegnet på Rodstenseje lidt bedre end humlebierne placeret i kløvermarkerne ved Rodstenseje og Fensten samt hegnet ved Fensten. Når man sammenholder det med registreringerne af gode bi-planter, virker det sandsynligt, at hovedårsagen til den bedre trivsel kan være et bedre fødeudbud gennem sommeren. Særligt så staderne i hegnet ved Rodstenseje ud til at have haft en gunstig placering. De fundne pesticidmængder i humlebierne stemmer ikke umiddelbart overens med forskellene i trivsel målt som stadevægt, hvilket understøtter, at forskellen primært skyldes andre faktorer, herunder måske indirekte effekter af herbicider, idet fødeudbuddet på markerne (dvs. det blomstrende ukrudt) var langt bedre på Rodstenseje end ved Fensten.

4.1.3.1 Metoder

Vi har i dette projekt begrænset os til at bruge stadevægten som udtryk for humlebiernes trivsel, pga. at isoleringsmateriale hindrede adgangen til selve boet i løbet af sæsonen. Efterfølgende har vi dog fra andre brugere af humlebier erfaret, at det bør være muligt at fjerne isoleringsmaterialet ved undersøgelsens start, så udviklingen i boet kan følges og evt. prøver fra boet kan udtages i løbet af sæsonen. Dette kunne være en mulighed i et fremtidigt projekt.

Stadernes vægt fulgte et forventet mønster, med vægtstigning op mod koloniklimaks pga. opbygning af yngel- og oplagsceller, larver og nye arbejdere, og fald mod slutningen af sæsonen, hvor de fleste bier havde forladt staderne. Da staderne havde stort set ens startvægt og slutvægt, antager vi, at vægtstigningen afspejler stadernes succes, både med hensyn til indsamling af oplagsnæring og produktion af afkom. Sammenholder man forskellene i stadevægte med afvigelse inden for de enkelte lokaliteter, tyder de på, at antallet af enkeltstader pr. lokalitet bør være mindst seks som i dette projekt og gerne flere, med mindre man forventer større forskelle, end dem vi har set.

Måske vil målingen af stadevægten om natten være et mere pålideligt mål for trivslen, da man så undgår forskelle i bidraget fra biernes egen vægt som følge af forskelle i aktivitetsniveau. En anden mulighed er at lukke for udflyvningshullet i 1,5-2 timer, så er alle bierne hjemme, når staden vejes. Det vil også være en fordel at kunne veje staderne mere kontinuert, evt. ved at have dem stående på en vægt tilkoblet en datalogger, i stil med hvad man gør med vejestader med honningbier.

4.1.4 Forekomst af blomsterbesøgende bier

Tætheden og diversiteten af humlebier i kløvermarkerne viste, at der var bedre vilkår for humlebiernes i landskabet ved Rodstenseje. Her var hyppigheden i markerne (per blomsterhoved) større end i marken ved Fensten, på trods af, at kløvermarken ved Rodstenseje var langt større. I større marker forventes en udtyndingseffekt, samt muligvis en tendens til at humlebier ikke fouragerer midt på marken. For rødkløver og hestebønne ses et faldende frøudbytte med markens areal i marker over 12 ha (Hawkins 1958; Bond and Pope 1974). Men for mindre marker (<15,5ha) af rødkløver er der ikke påvist nogen sammenhæng mellem frøsætning (bestøvning) og markens areal (Brødsgaard and Hansen 2002; Wermuth and Dupont 2010).

Hvidkløver er en meget vigtig træklante for honningbier, som var de dominerende blomsterbesøgende insekter i markerne. Humlebier var langt mindre hyppige, repræsenteret ved 4 arter. I sammenligning med rødkløver (Dupont et al. 2011), var der både en lavere diversitet og hyppighed af vilde bier (primært humlebier på både hvid- og rødkløver). Hvidkløver er derfor ikke særlig egnet som "fælde" for en bred diversitet af insekter. Men da hvidkløver typisk blomstrer tidligere end rødkløver, kan den være en vigtig føderessource for humlebier i den tidlige sommer, mellem blomstringen af raps og rødkløver, som begge er vigtige ressourcer for humlebier.

Når man sammenholder registreringerne af gode bi-planter ved Rodstenseje og Fensten, forekommer det sandsynligt, at der sommeren igennem har været en bedre forsyning af bi-planter

ved Rodstenseje, hvilket formentlig er en del af forklaringen på forskellene i humlebifaunaen de to steder. Ydermere viser opgørelserne af arealanvendelse og småbiotoper, at landskabet ved Rodstenseje er mere heterogent, hvilket også kan forventes at være en fordel for humlebierne. For at adskille effekten af disse forskellige faktorer vil det dog være nødvendigt med målinger i flere forskellige landskaber.

4.1.4.1 Metoder

De bi-arter, vi så i kløveren, er næppe dækkende for værkstedsområderne samlede bi-fauna, idet kløver ikke kan udnyttes af korttunge insekter. Desuden er det kun et øjebliksbillede, der ses ved en enkelt indsamling. Vi må således forvente, at der har været flere arter af humlebier i værkstedsområderne, end de her fundne.

I det igangværende projekt EcoServe (Eriksen et al. 2011) er diversiteten af bestøvende arter undersøgt på urter, herunder mælkebøtte, agertidsel, rød- og hvidkløver, i græsmarker. De foreløbige resultater (pers. comm. B. Strandberg) viser, at især mælkebøtte, agertidsel og hvidkløver besøges af mange forskellige bestøvere, herunder humlebier, solitære bier, honningbier, sommerfugle og svirrefluer. Navnlig mælkebøtte ser ud til at være vigtig for solitære bier, da den især blomstrer i foråret og forsommeren, hvor aktiviteten af solitære bier er størst. Hvidkløver og agertidsel besøges også af mange forskellige bestøvere, men hos hvidkløver udgør honningbier langt de fleste blomsterbesøg (se også Figur 3.5), mens agertidsel især besøges af humlebier og sommerfugle. En anden undersøgelse på en skoveng (Hørhaven, Marselisborg Skov) viste et bredt spektrum af bestøvere på agertidsel, bl.a. humlebier, honningbier, sommerfugle, svirrefluer og biller (upubl. data). Rødkløver besøges næsten udelukkende af humlebier, og hvor den forekommer, foretrækker humlebier tilsyneladende denne art (Dupont et al. 2011). Både pil og hedelyng besøges af en bred vifte af insekter, herunder enlige bier, svirrefluer, humlebier og honningbier (Dupont & Olesen 2009).

4.2 giftigheden af forskellige sprøjtemidler

4.2.1 Direkte effekter på jordhumle og murerbi

Som det fremgår af Tabel 2.3, var der i litteraturen divergerende informationer om de fire testede pesticiders giftighed for honningbier, specielt for Mavrik (tau-fluvalinat) og Oxitril (bromoxynil + ionoxynil).

I de udførte test med murerbi var dødeligheden ved en given dosis generelt højere end for honningbi. Dette skal dog sammenholdes med, at murerbierne generelt er mindre end honningbier, idet hunner og hanner af murerbi har en vådvægt på hhv. 66 og 38 mg, mens honningbier vejer ca. 100 mg. Erfaringer med lignende test af insekticidet Pirimor og bejdsemidlet Thiamethoxam i EU-projektet STEP (endnu ikke publiceret) viser dog ikke en tilsvarende forskel i dødelighed.

For jordhumler stemte dødeligheden af de testede pesticider bedre overens med giftigheden for honningbier, men tager man hensyn til, at jordhumlerne i gennemsnit vejer 176 mg, er de mere følsomme over for Karate og især Mavrik. For både murerbi og jordhumle passer LD₅₀-værdien for Mavrik rapporteret af EPA (2005) bedre med vores resultater end FOOTPRINT (2006). På grund af disse divergencer i litteraturen samt den mulige effekt af forsøgstidspunkt vil det være optimalt køre test med honningbier samtidig med test på andre bier for at undgå eventuelle effekter af forsøgstidspunkt og -omstændigheder. Overordnet set var murerbierne lidt mere følsomme end humlebierne, når pesticideksponeringen udtrykkes som µg/bi. Hvis man tager hensyn til forskellen i vægt, ser der dog ikke ud til at være de store forskelle mellem de to arter.

Der er ikke mange tilsvarende undersøgelser i litteraturen. Thompson (2001) undersøgte giftigheden af en række andre pesticider over for jordhumle og fandt ikke nogen generel tendens til

større giftighed over for denne art end over for honningbi. Dette skal dog sammenholdes med sandsynligheden for eksponering. Pga. forskellene i aktivitetsperioder og levesteder kan der forventes forskelle i eksponering af forskellige arter af bier og andre typer bestøvere som fx svirreflugt og sommerfugle. Dertil kommer, at den direkte dødelighed på voksne individer måske ikke i alle tilfælde er et godt mål for effekten af pesticider på bier. Fx kan ynglen og dronningen tænkes at være mere udsat for pesticideffekter, dels pga. en større følsomhed og dels fordi de måske eksponeres mere pga. et større fødeindtag. Desuden vil pesticidpåvirkninger af arbejdernes adfærd eller aktivitetsniveau kunne være fatalt for bifamiliens trivsel, selv om de eksponerede arbejderbier ikke dør (Whitehorn et al. 2012, Henry et al. 2012). Endvidere er det måske ikke nok, at undersøge virkningen af de enkelte pesticider, da de jo ofte udbringes i en eller anden form for cocktail. I nogle tilfælde kan der opstå en synergistisk effekt af pesticiderne, hvilket bl.a. er rapporteret for en blanding af pyrethroid og fungicid (Thompson & Wilkins 2003). Den repellerende effekt af pyrethroidet mindskedes således, når pyrethroidet var blandet med fungicidet, hvilket kan føre til, at bierne eksponeres for et giftigt stof, som de ellers ville undgå. Hertil kommer synergistiske negative effekter af pesticider og andre stressorer, såsom sult eller parasitter (Aufauvre et al. 2012).

4.2.1.1 Metoder

Erfaringerne fra dette projekt viser, at overvintrende kokoner af murerbi bør klækkes og anvendes til test om foråret eller først på sommeren, idet dødeligheden i ikke-eksponerede dyr ellers bliver for høj. Selv om nogle firmaer kan levere dyr senere, kan det ikke anbefales at købe dem. Pga. faren for at murerbierne drukner i det vand, blomsterne står i, anbefales det at tætte mellem blomster og glas med fx parafilm.

Også ved test med jordhumle bør man tage hensyn til sæsonen og dyrenes alder. I dette projekt blev testene udført i august, og vi måtte opgive at køre testene i de 48 timer, som honningbitestene normalt køres, på grund af for stor dødelighed i de ubehandlede kontroller. Testene med murerbier blev opgjort efter 48 timer, men optællinger undervejs i forsøgene viste, at dødeligheden for nogle stoffers vedkommende steg en del fra 24 til 48 timer. Dermed kan vi ikke udelukke, at vi har underestimeret jordhumlernes dødelighed.

I testene med jordhumle blev pesticiderne opløst i acetone. Det kan dog være problematisk, idet acetone fordamper så hurtigt, at koncentrationerne kan ændre sig under opsætningen af forsøgene. Omvendt kan det for nogle pesticider være svært eller umuligt at opløse stoffet i vand, hvorfor der i stedet vil være tale om en opslæmning, som skal rystes konstant for at få en pålidelig dosering. Valget af opløsningsmiddel må derfor afhænge af stofvalg og de konkrete betingelser, eksponeringen udføres under.

4.2.2 Indirekte effekter målt på rød- og hvidkløver

Bentazon er som tidligere nævnt godkendt til anvendelse i kløver og forventes derfor at være selektiv i afgrøden, hvilket også var tilfældet i vore forsøg, da der ikke blev fundet nogen effekt på biomasse, blomstringsperiodens længde, udviklingstrin af hvid- og rødkløver efter sprøjtning med bentazon. Bentazon havde heller ikke signifikant effekt på antal frøstande og frøudbytte per potte i hvidkløver ved tidlig sprøjtning. Efter sprøjtning ved fuld blomstring var antal frøstande og frøudbyttet i g/potte dog signifikant reduceret efter hhv. den og de to højeste doseringer af bentazon, hvilket primært skyldtes en lavere tusindkornsvægt, idet antal frø per potte ikke viste signifikante forskelle mellem behandlingerne.

Som forventet udviste metsulfuron ikke den samme selektivitet over for hvidkløver, idet de anvendte doseringer af metsulfuron havde forholdsvis høj effekt på biomasse og især frøproduktionen af hvidkløver, hvorimod der ingen signifikant effekt var på rødkløvers biomasse. Mange af hvidkløvers blomsterhoveder er således gået til, og andre har produceret færre og mindre frø end ubehandlede planter. Allerede ved den næstlaveste dosering ophørte frøproduktionen i hvidkløver. Den større følsomhed af frøproduktion sammenlignet med biomasse

er i overensstemmelse med resultater fundet på en række non-targetarter i et tidligere projekt (Strandberg et al. 2011).

I hvidkløver blev der fundet større volumen nektar i planter, som var behandlet ved fuld blomstring sammenlignet med planter behandlet ved begyndende blomstring. Denne forskel var mest udpræget for de ubehandlede og må tilskrives, at der ved udvælgelsen af hold til de forskellige behandlingstider er sket en selektion i to udviklingstrin. Der var ingen forskel i produceret volumen nektar efter behandling med bentazon, og ingen af disse behandlinger medførte signifikant lavere sukkerudbytte end i den ubehandlede. Derimod reducerede alle metsulfuron-behandlingerne undtagen den laveste dosering nektarproduktionen i hvidkløver, når sprøjtningen var udført ved begyndende blomstring, hvilket især må tilskrives den høje effekt af metsulfuron på planternes vækst. Metsulfuron udsprøjtet ved fuld blomstring havde ingen signifikant effekt på nektarproduktionen i hvidkløver. Ligeledes var der ingen signifikant negativ effekt på nektarproduktionen i rødkløver uanset herbicider, timing og doseringer. Resultaterne giver således ikke anledning til at antage, at lave doseringer af pesticider har en negativ effekt på nektarproduktionen eller kvaliteten af denne. Derimod kan herbiciddoseringer, som reducerer plantens vækst, indirekte have betydning for biernes fødegrundlag, da de kan medføre et reduceret antal blomster.

4.2.2.1 Metoder

I det aktuelle forsøg var der meget stor variation i antallet af pollen i prøver fra samme behandling, hvilket muligvis skyldes, at afskærmning af blomsterne blev foretaget for sent (3 dage før udtagning af støvdragere). På baggrund af den store variation mellem gentagelserne, er det ikke muligt at drage konklusioner vedrørende de anvendte herbiciders påvirkning af pollenproduktionen. I en tidligere undersøgelse fandt man, at Starane 180S stimulerede pollenproduktionen i rødkløver og mælkebøtte (Christensen, 2008).

Metoder til bedømmelse af herbicideffekter på planter biomasse og frøproduktion er velkendte og uden problemer. Det viste sig vanskeligt at finde det optimale tidspunkt for måling af nektarproduktionen. Når planterne sprøjtes omkring blomstring, hvornår skal man så måle effekten? Vi valgte at måle effekten 20 dage efter sprøjtning, hvorved det ikke var effekten på direkte eksponerede blomster, men blomsterknopper vi bedømte. Der bør i fremtidige forsøg indlægges flere tidspunkter for høst af nektar. Det vil være vanskeligt at sammenligne nektarproduktionen mellem forskellige "høsttidspunkter", da nektardannelse er meget afhængig af klima. Til gengæld vil det være muligt at sammenligne behandlingerne inden for flere tidspunkter. Det viste sig ret arbejdskrævende at måle nektarproduktion, da planterne skulle afskærmes for insektbesøg et døgn forinden. Også pollentælling er arbejdskrævende. Dels i form af afskærmning af blomster, udtagning af støvdragere og sidst men ikke mindst optælling af pollen i prøverne.

4.3 Sukkermængde og –indhold i samt forekomst af mulige fokusplanter

Vi har i dette projekt ønsket at identificere et kontingent af planter, som blomstrer hen over hele biernes aktive periode, og som tiltrækker mange bier, fordi de tilbyder en god foderressource og forekommer i store bestande, med henblik på at kunne estimere hyppigheden og diversiteten af vilde bier ved at tælle deres tilstedeværelse i disse fokusplanter. Potentialet af syv plantearter, seljepil, vinterraps, mælkebøtte, hvidkløver, rødkløver, agertidsel og hedelyng, som fokusplanter for bestøvende insekter er i projektet primært undersøgt ved at analysere sukkermængden i nektaren. Nektaren havde hos alle undersøgte planter en tilstrækkelig høj sukkerprocent til, at de må betegnes som attraktive for bier og andre bestøvere.

4.3.1.1 Metoder

Nektar blev i alle tilfælde ekstraheret ved centrifugering, da ekstraktion med mikro-kapilærrør er meget vanskelig i blomsterstande som rakler, kurve og blomsterhoveder, hvor den enkelte blomst er meget lille. Til brug for bestemmelse af nektarmængde og sukkerindhold er centrifugering velegnet men nektaren vil undtages hos arter, der er tvebo, være "forurennet" med pollen Korn.

Variationen i nektarmængde og sukkerindhold var betydelig såvel inden for den enkelte art som mellem arterne. Andre undersøgelser (Nepi et al. 2003; Petanidou 2005; Pacini and Nepi 2007) har vist tilsvarende variation i nektarmængde og sukkerindhold. Nektarmængden og sukkerkoncentrationen er meget afhængig af vejrforhold, samt i nogle tilfælde også blomstens alder. Den store variation inden for arten betyder imidlertid, at der skal indsamles og analyseres nektar fra betydelig flere blomster, end det er tilfældet i nærværende projekt, hvis standardafvigelsen skal udgøre højst 5 % af middelværdien. En faktor, der også bidrager til variationen var, at blomsterne ikke var afdækkede før indsamlingen for ikke at hæmme nektarproduktionen. Registreringerne af gode bi-planter i de to værkstedsområder viser, at ikke alle de udvalgte kandidater til fokusplanter nødvendigvis er til stede i landbrugslandet. Dette gælder specielt lyng. På den anden side var der i begge værkstedsområder muligheder for at supplere med andre fokusplanter end dem, der på forhånd var udvalgt som kandidater. Fx var der i begge områder dueurt, som kunne være en kandidat som fokusplante. Alle de undersøgte planter indeholdt tilstrækkeligt nektar til at kunne betragtes som attraktive for pollinatorer. Idet de forskellige fokusplanter som beskrevet ovenfor ikke i lige høj grad tiltrækker forskellige typer pollinatorer, kan man overveje at supplere med forskellige typer fælder for at dække pollinatorfaunaen bredere. Valget af fælder kunne basere sig på fx Westphal et al. (2008), som indeholder en sammenligning af forskellige indsamlingsmetoder og deres anvendelighed til indsamling af forskellige typer af bestøvende insekter. Registrering af pollinatorer på fokusplanter kan evt. automatiseres ved at montere et kamera, som registrerer besøgende insekter (Steen & Aase 2011). Hvis man vil sikre en passende mængde af fokusplanter, kan man også vælge at udså en passende blanding af gode bi-planter i de områder, man vil undersøge.

5. Konklusioner

Projektet har svaret på de fleste af de hovedspørgsmål, som blev præsenteret i Tabel 1.1:

Karakteriseringen af værkstedsområderne vha. diverse GIS-værktøjer demonstrerede, at det ikke var lykkedes at finde et par af værkstedsområder, som lignede hinanden tilstrækkeligt bortset fra pesticidbelastningen. Dette skyldtes primært det ringe udvalg af kløvermarker.

Analyserne af de udsatte jordhumler viser, at humlebier eksponeres for pesticider i det danske landbrugsland. De målte koncentrationer er under LD₅₀-værdierne for honningbier, og eksponeringen kan ikke umiddelbart kobles til pesticidanvendelsen i de to værkstedsområder. Der er ikke umiddelbart nogen sammenhæng mellem det målte pesticidindhold i humlebiene og deres trivsel, hvilket dog formentlig i høj grad hænger sammen med, at der var større forskelle i andre faktorer, som påvirker humlebiernes trivsel, idet der var en tendens til forskel i trivsel mellem de forskellige lokaliteter, som syntes at hænge bedre sammen med udbuddet af føde og redesteder. Optællingerne af bier i kløvermarkerne viste, at der var ret klare forskelle i humlebifaunaen i de to kløvermarker, men disse forskelle hang ikke umiddelbart sammen med den målte pesticideksponering af de udsatte jordhumler.

Murerbier og humlebier er formentlig mere følsomme over for visse pesticider end honningbier, hvilket kan betyde, at de hensyn, der tages til honningbier ikke nødvendigvis beskytter andre arter af bestøvende insekter.

Bentazon, som er godkendt til ukrudtsbekæmpelse i kløver, har som forventet ingen effekt på kløvers biomasse og frø, og der er ikke fundet effekter på nektarproduktion og sukkerprocent i hvidkløver eller på pollenproduktion i rødkløver af behandling med bentazon.

Der er fundet negative effekter af metsulfuron på biomasse, blomstring og frøproduktion af hvidkløver, men ikke på rødkløver. Der er ingen indikation af, at nektarproduktionen påvirkes af behandling med metsulfuron, så længe planterne overlever behandlingen. Det er ikke muligt at vurdere effekter på pollenproduktion på grund af en meget stor variation imellem gentagelserne. Hvis der regnes med en normaldosering på 6 g/ha, kan man ud fra afdriftstabeller beregne, at der kan forventes effekt af metsulfuron på hvidkløver i en afstand på op til 10 m fra det sprøjtede areal. Eksponeringstidspunktet har betydning, idet planterne er mere følsomme for herbicider på de tidlige udviklingstrin. Tidlig eksponering kan derfor medføre et mindsket fødegrundlag for bierne på grund af færre overlevende planter og dermed færre blomster.

De undersøgte potentielle fokusplanter havde alle et sukkerindhold, som gjorde dem egnede som fokusplanter.

Bortset fra lyng, som ikke forekom i værkstedsområderne og heller ikke er almindeligt forekommende i agerlandet, skønnes det ud fra forekomsten i de to værkstedsområder, at de potentielle fokusplanter vil være egnede til at tiltrække bier mhp. opgørelse af bi-faunaen, evt. suppleret med andre fokusplanter samt forskellige former for fælder eller redetilbud.

Desuden har afprøvningen af metoder i projektet afsløret problemer ved flere af de anvendte metoder, og for de flestes vedkommende er der tilgængelige løsningsforslag. De indsamlede data vil kunne danne grundlag for en realistisk dimensionering af andre projekter til undersøgelse af pesticideffekter på bestøvere i Danmark. Dimensioneringen vil naturligvis skulle tilpasses den forventede effektstørrelse i de konkrete undersøgelser.

6. Perspektivering

6.1 Forskningsmæssige perspektiver

Nærværende projekt har vist, at vilde bier udsættes for pesticideksponering i de danske landbrugsområder, og projektets resultater indikerer, at der kan være effekter af pesticider på de vilde bier og dermed på deres bestøvning af afgrøder og vilde planter, som ikke altid er sammenfaldende med effekterne på honningbier. Dermed peger projektet på, at en grundigere undersøgelse vil være relevant. Idet dette projekt er gennemført som et pilotprojekt, peger det på en række problemstillinger, som bør medtages i en egentlig undersøgelse af pesticideffekter på bestøvende insekter og den service, de leverer.

Pesticidanalyserne af humlebier peger på, at bestøveres pesticidindhold muligvis vil kunne bruges til at kortlægge og monitorere økologisk og økonomisk vigtige organismers eksponering for pesticider, og at det vil være nødvendigt at måle direkte på organismer for at få det fulde billede af eksponeringen, idet opgørelser af de anvendte pesticider ikke nødvendigvis er dækkende. Der bør derfor arbejdes med udvikling af analysemetoderne med henblik på at opnå lavere detektionsgrænser. Ligeledes vil det være ønskeligt at etablere standardmetoder til analyser for flere pesticider. Kombineres pesticidanalyserne med pollenanalyser, kan man få indblik i, hvor bestøverne har fourageret, og dermed viden om væsentlige mekanismer bag pesticiders transport ind i økosystemet.

Vi har i dette projekt ikke forsøgt at udrede, hvorvidt den målte pesticideksponering primært er udtryk for 1) pesticidindholdet i det indsamlede pollen, som bierne havde på sig ved indfangningen, 2) hvad humlebieerne har optaget via nektar eller guttationsvand, eller 3) pesticider i den nektar, humlebieerne måtte have med sig hjem. Det er vores vurdering, at det vil være muligt at separere pollenet fra humlebieerne og måle på såvel pollen som bier. Dermed ville man få et fingerpeg om, hvorvidt hovedeksponeringen sker via pollen eller via nektar og gennem huden. Da det er muligt at artsbestemme pollen, vil man også kunne identificere, hvilke planter en eksponering stammer fra.

Derudover vil det være ønskeligt at sammenligne pesticideksponeringen af forskellige arter af bier med henblik på at afdække forskelle i eksponeringsgrad i relation til forskelle i levesteder, aktivitetsperioder, fødesøgningafstande mv.

Da projektets resultater antyder, at der kan være forskelle i forskellige biers følsomhed, vil det være oplagt at inddrage flere arter af både bier og andre bestøvere. Desuden bør flere pesticider testes. Andre typer effekter bør også inddrages, herunder effekter på andre livsstadier (dronninger, larver) samt effekter på adfærd og aktivitet, inkl. deres orienterings- og navigationsevne. Repellans af pesticider bør undersøges nøjere, idet en repellerende virkning kan hindre, at bierne eksponeres, men samtidig kan betyde, at bierne sulter, fordi de undgår de tilgængelige, sprøjtede fødekilder. Det var i dette projekt ikke muligt at undersøge en eventuel repellerende virkning af de testede stoffer, idet de anvendte forsøgsdyr ikke på samme måde som honningbier tiltrækkes af kunstige fødekilder som fx sucrose. Ligeledes vil det være relevant at se på effekten af blandinger, idet mange pesticider ofte udsprøjtes sammen med andre, og de forskellige pesticider kan påvirke hinandens virkning. En anden type interaktion, som vil være relevant at undersøge, er følsomheden af bier over for pesticider, når de i forvejen er belastet af parasitter, og omvendt, da det har vist sig at følsomheden for en stressor vil øges, når organismen i forvejen er svækket af en anden (Aufauvre et al. 2012).

De fundne effekter af herbicider på planters biomasseproduktion og blomstring er ikke overraskende. Effekterne vil i høj grad afhænge af pesticidernes selektivitet overfor den valgte modelplante, som vist i dette projekt med bentazon som et selektivt herbicid og metsulfuron som et ikke-selektivt herbicid på kløver. I nærværende pilotprojekt blev der ikke fundet effekter af de to herbicider på nektarproduktionen i kløver, men undersøgelserne afdækkede, at man i fremtidige nektarundersøgelser bør overveje nærmere, hvilke udtagningstidspunkter der er relevante i forhold til eksponeringstiming. Biernes formål med blomsterbesøg er opsamling af nektar og pollen, og såfremt lave doseringer af pesticider reducerer nektar- eller pollenproduktionen, kan det medføre udsultning af bierne, som må besøge flere blomster for at opsamle den nødvendige nektar. Det er ikke muligt at konkludere angående mulige effekter af pesticider på nektarproduktion ud fra den meget begrænsede undersøgelse i nærværende projekt. For at afklare dette spørgsmål kræves en bredere screening af forskellige pesticiders effekt på nektarproduktionen i udvalgte fokusarter. Hvad angår metoder til undersøgelse af pesticideffekter i felten peger pilotprojektets resultater og ikke mindst tidsforbrug på, at det vil være optimalt at effektivisere metoderne til optælling af bier ved fx at kombinere fokusplanter dels med forskellige typer fælder, dels fx ved at kombinere fokusplanterne med et kamera, der registrerer besøg af bier.

Den anvendte procedure til udvælgelse af fokusområder og den efterfølgende karakterisering indikerer, at det er vanskeligt at opnå fuldstændigt matchende par af værkstedsområder, som kun er forskellige mht. pesticidbelastning. Desuden peger projektets resultater ikke uventet på, at der foruden pesticider er en lang række andre faktorer, som påvirker tætheden og diversiteten af bestøvere. Hvis man i en større undersøgelse sørger for at have områder nok, som er godt nok beskrevet, vil man kunne analysere effekter af enkeltfaktorerne vha. en multivariat tilgang.

6.2 Administrative perspektiver

De administrative perspektiver af pilotprojektet er som følge af projektets omfang mere begrænsede. Analyserne af pesticidindholdet i humlebier og toksicitetstestene viser, at der kan være grund til at overveje, om bestøverne og deres services er beskyttet af de reguleringsmæssige tiltag, der skal beskytte honningbier. Undersøgelserne af herbicideffekter på kløver indikerer, at der også er indirekte effekter af pesticidanvendelsen på bestøverne, og at sådanne effekter kan opstå ikke bare i marken, men også i den natur eller halvnatur, der findes lige uden for marken, idet herbiciddoseringer svarende til de mængder pesticid, der driver ud af marken under sprøjtning, kan reducere blomstring og frøsætning. Projektet giver retningslinjer for, hvordan man kan undersøge mulige subletale og indirekte effekter på bier, der er administrativt vigtige i forhold til at sikre bestøvning af vilde planter og afgrøder. Desuden indikerer analyserne af pesticidindhold, at man vil kunne anvende bier som eksponeringsindikatorer for pesticider i agerlandet. Dermed giver projektet ideer til udvikling af en eksponeringsindikator, der vil kunne få administrativ betydning i vurdering af en tidlig og geografisk udvikling i terrestriske eksponering og fastlæggelse af de mest kritiske terrestriske eksponeringsveje.

Referencer

Aufauvre J., Biron D. G., Vidau C., Fontbonne R., Roudel M., Diogon M., Viguès B., Belzunces L. P., Delbac F., Blot N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Nature Scientific Reports* 2: 326.

Biesmeijer J. C., Roberts S. P. M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A. P., Potts S. G., Kleukers R., Thomas C. D., Settele J., Kunin W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351-354.

Boll, D. (2010). Effekten af arealanvendelse på diversiteten og tætheden af humlebier i landskabet., Kandidatafhandling, Aarhus Universitet, DMU (Afd. for Terrestrisk Økologi) og Biologisk Institut (Sektion for Genetik og Økologi)

Bond D. A., Pope M. (1974). Factors affecting the proportions cross-bred and self-bred seed obtained from field bean (*Vicia faba* L.) crops. *Journal of Agricultural Science* 83: 343-351.

Brødsgaard, C. J., Hansen H. (2002). Pollination of red clover in Denmark, Danish Institute of Agricultural Sciences, Ministry of Food, Agriculture and Fisheries: 3-49.

Carvell C., Roy D. B., Smart S. M., Pywell R. F., Preston C. D., Goulson D. (2006). Declines in forage availability for bumblebees at a national scale. *Biological Conservation* 132(4): 481-489.

Cheminova (2007). Data Fact Sheet, Oxitril CM.

Christensen K. K. K. (2008). Herbicidet Starane 180S's effekt på pollenproduktion hos mælkebøtte og rødkløver. Specialrapport, Institut for Økologi, Københavns universitet.

Colla S. R., Packer L. (2008). Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera : Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity and Conservation* 17(6): 1379-1391.

Duncan D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.

Dupont Y. L., Damgaard C., Simonsen, V. (2011). Quantitative historical change in bumblebee (*Bombus* spp.) assemblages of red clover fields. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0025172.

Dupont Y. L., Olesen, J. M. (2009) Ecological modules and roles of species in heathland plant-insect flower visitor networks. *Journal of Animal Ecology* 78: 346-353.

EPA. (1994). Reregistration Eligibility Decision for Bentazon. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. United States Environmental Protection Agency, September 1994.

EPA. (2005). Reregistration Eligibility Decision for Tau-fluvalinate. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. United States Environmental Protection Agency, September 2005.

Eriksen J., Strandberg B., Søgaard, K. (2011). Biodiversitet i græsmarken en fordel for både natur og fødevareproduktion. *Vand og Jord* 18(2): 61-63.

FOOTPRINT (2006). The FOOTPRINT Pesticide Properties Data-Base. Database collated by the University of Hertfordshire as part of the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). <http://www.eu-footprint.org/ppdb.html>.

Free J. B. (1993) Insect pollination of crops. Academic Press, London.

Gallai N., Salles J. M., Settele J., Vaissière B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68: 810-821.

Ghini S., Fernandez M., Pico Y., Marin R., Fini F., Manes J., Girotti S. (2004). Occurrence and Distribution of Pesticides in the Province of Bologna, Italy, Using Honeybees as Bioindicators. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 479–488. DOI: 10.1007/s00244-003-3219-y.

Gough H. J., Wilkinson W. (1984). Effect on honey bees. *British Crop Prot. Conf. Pest and diseases* 1: 331-335.

Grixti J. C., Wong L. T., Cameron S. A., Favret C. (2009). Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological Conservation* 142(1): 75-84.

Hawkins R. P. (1958). A survey of late flowering and singlecut red clover seed crops. *Journal of the National Institute of Agricultural Botany* 8: 450-461.

Henry M., Béguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J. F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. (2012). A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336: 348-350.

ICROFS (2012): FØJO III projekt: Økologisk jordbrug som refugier for biodiversitet (REFUGIA) (online). HTML:< http://www.icrofs.dk/Sider/Forskning/foejoIII_refugia.html>

Johnson, R.M., Wen, Z., Schuler, M.A. (2006): Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera : Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of Economic Entomology*. vol. 99, pp. 1046-1050.

Kjær, C., P.B. Sørensen, P. Kudsk, L.N. Jørgensen, J.E. Ørum, M.

Stjernholm & S. Gyldenkerne (2008): "Indikator for pesticiders belastning af naturen" (PestNaB). Miljøprojekt 1248, 2008. Miljøstyrelsen. <http://www2.mst.dk/udgiv/publikationer/2008/978-87-7052-831-3/pdf/978-87-7052-832-0.pdf>

Kleijn D., Raemakers I. (2008). A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89(7): 1811-1823.

Klein A. M., Vaissière B. E., Cane J. H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S. A., Kremen C., Tscharntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274: 303-313.

Knight M. E., Martin A. P., Bishop S., Osborne J. L., Hale R. J., Sanderson R. A., Goulson, D. (2005). An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology* 14: 1811-1822.

Kort- og Matrikelstyrelsen (2010): FotKort10, beskrivelse se:

<<http://www.kms.dk/Produkter+og+ydelse/Produktkatalog/Topografiske+data/Vektordata/FOTKort10/FOTKort10.htm>>

Kosior A., Celary W., Olejniczak P., Fijal J., Krol W., Solarz W., Plonka P. (2007) The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx* 41 (1):79-88.

Kremen C, Williams NM, Thorp RW (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99 (26):16812-16816

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K (2012) Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE* 7(1): e29268.
doi:10.1371/journal.pone.0029268

Kryger, Per (2012): Personlig kommunikation. Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet. Tlf: 87 15 82 19, E-mail: per.kryger@agrsci.dk

Madsen HB and Calabuig I (2008) Annotated checklist of the Bees in Denmark – Part 1: Colletidae (Hymenoptera, Apoidea). *Entomologiske Meddelelser* 76:145-163

Miljøstyrelsen 2011. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2010, Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 5.
Mullin, Christopher A. (2010). "High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health". *PloS one* (1932-6203), 5 (3), p. e9754.

Murray TE, Kuhlmann M, Potts SG (2009) Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie* 40:211-236

NaturErhvervsstyrelsen (2011) Markkort - tilgængelig via:
<<https://kortdata.fvm.dk/download/index.html>>

Nepi, M, Pacini, E, Nencini, C, Collavoli, E & Franchi, GG (2003). "Variability of nectar production and composition in *Linaria vulgaris* (L.) Mill. (Scrophulariaceae)." *Plant Systematics and Evolution* 238(1-4): 109-118.

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

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

Osborne, J.L., Martin, A.P., Carreck, N.L., Swain, J.L., Knight, M.E., Goulson, D., Hale, R.J. & Sanderson, R.A. (2008) Bumblebee flight distances in relation to the forage landscape. *Journal of Animal Ecology*, 77, 406–415.

Pacini, E. and M. Nepi (2007). Nectar production and presentation. *Nectaries and Nectar*. S. W. N. Nicolson, M., Pacini, E. (eds), Springer.

Petanidou, T. (2005). "Sugars in Mediterranean floral nectars: An ecological and evolutionary approach." *Journal of Chemical Ecology* 31(5): 1065-1088.

Seefeldt SS, Jensen JE & Fürst EP (1995). Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology* 9, 218-227

Steen, R, & Aase, ALTO (2011) Portable Digital Video Surveillance System for Monitoring Flower-Visiting Bumblebees. *Journal of Pollination Ecology*, vol 5, pp 90-94.

Strandberg, Beate (2012): Personlig Kommunikation. Institut for Bioscience, Aarhus Universitet.
Tlf: 87 15 88 41, E-mail: bst@dmu.dk

Strandberg BS, Mathiassen SK, Bruus M., Kjær C, Damgaard C, Andersen H.V., Bossi R., Løfstrøm SE, Bak J. & Kudsk P. (2011): Effects of herbicides on non-target plants: How do effects in standard plant tests relate to effects in natural habitats? Pesticidforskning nr. 139, Miljøstyrelsen

Thompson H.M. (2001) Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.), *Apidologie* 32, 305-321.

Thomson, H. and S. Wilkins (2003): Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology*, vol. 56, pp131-134

Wermuth, K. and Y. L. Dupont (2010). "Effects of field characteristics on abundance of bumblebees (*Bombus* spp.) and seed yield in red clover fields." *Apidologie* 41: 657–666.

Westphal C., Bommarco R., Carré, G., Lamborn E., Lamborn, E., Morison, N., Petanidou T., Potts S. G., Roberts S.P.M., Szentgyörgyi H., Tscheulin, T., Vassière, B.E. Woyciechowski, M., Biesmeijer, J.C., Kunin, W.E., Settele, J., Steffan-Dewenter, I. (2008): Measuring bee biodiversity in different European habitats and biogeographical regions. *Ecological Monographs*. Vol. 78, pp. 653-671

Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L. & Goulson, D. (2012) Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* 336: 351-352.

Bilag 1: Prioriteret rækkefølge af udvalgte parametre ved udvælgelse af mulige værkstedsområder

1. Marker med kløver til frø på bedriften
2. Både økologiske og konventionelle bedrifter
3. Geografisk placering (skal være tæt på hinanden parvis, dvs. økologisk/konventionel)
4. Jordbundsforhold
5. Landskabsstrukturer (km, km²)
 - a. Skov
 - b. Hegn
 - c. Diger
 - d. Øvrige småbiotoper
 - e. Km kant
6. Øvrige afgrøder
 - a. Bælgsæd
 - b. Kløver
 - c. Raps
 - d. Kløvergræs o/u 50 % kløver
 - e. Blandsæd
 - i. Ærter
 - ii. Lucerne
 - f. Øvrige blomstrende afgrøder
 - g. Majs
 - h. Kartoffler
 - i. Korn
 - iii. Vårsæd
 - iv. Vintersæd
 - j. Græs
 - v. I omdrift
 - vi. Vedvarende
 - k. Frugt
 - l. Bær
 - m. Grønsager
 - n. Juletræer
7. Vilde planter
 - a. Pil
 - b. Brombær
 - c. Lyng
 - d. Tidsel
 - e. Rose
 - f. Lind
 - g. Æble
 - h. Mirabel
 - i. Slåen

Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier - og metoder til undersøgelse af denne

I pilotprojektet "Betydningen af pesticider for forekomsten af vilde bier og honningbier" har Aarhus Universitet på to landbrugsbedrifter gennemført en indledende undersøgelse af, om humlebier udsættes for pesticider i danske landbrugsområder. Vi satte humlebibo ud, samlede bier fra boerne i løbet af sommeren og målte pesticidindholdet i bierne. Desuden har vi set på, om der er en sammenhæng mellem pesticidanvendelse, eksponering og forekomst af honningbier og vilde humlebier. Endelig har vi testet, om humlebier og murerbier dør ved de samme pesticidkoncentrationer som honningbier, ved at sætte en dråbe pesticidopløsning på ryggen af bierne og derefter tælle, hvor mange der døde. Også mulige indirekte effekter af pesticider via effekter på pollen- og nektarproduktion blev undersøgt.



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

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

www.mst.dk