



# Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken

Overzicht van open beschikbare peer reviewed laboratorium-, veld- en monitoringsstudies

Tjeerd Blacquière, Guy Smagghe, Kees van Gestel & Veerle Mommaerts







# Neonicotinoïden en Fipronil en sterfte van bijen en bijenvolken

Overzicht van open beschikbare peer reviewed laboratorium-, veld- en monitoringsstudies

Tjeerd Blacquière<sup>1</sup>, Guy Smagghe<sup>2</sup>, Kees van Gestel<sup>3</sup> & Veerle Mommaerts<sup>2</sup>

<sup>1</sup> [bijen@wur](mailto:bijen@wur), Plant Research International, Wageningen Universiteit & Research, Wageningen

<sup>2</sup> vakgroep Gewasbescherming, faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent

<sup>3</sup> afdeling Dierecologie, Faculteit der Aard- en Levenswetenschappen, Vrije Universiteit Amsterdam

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Biointeracties & Plantgezondheid.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

## **Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bijen**

Adres : Postbus 69, 6700 AB Wageningen  
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
Tel. : 0317 – 48 13 30  
Fax : 0317 – 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl) / [bijen@wur.nl](mailto:bijen@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl) / [www.bijen.wur.nl](http://www.bijen.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord	1
Korte Samenvatting	3
Leeswijzer	5
Veelgebruikte termen	7
Honingbijen en hun 'foerage'	8
1. Uitgebreide samenvatting	11
1.1 Aanleiding en beleidsvraag	11
1.2 Sterfte van bijenvolken en mogelijke oorzaken	11
1.3 Systemische insecticiden: neonicotinoïden en fipronil	12
1.4 Toelatingsdossier en open literatuur	12
1.5 Giftigheid en blootstelling	13
1.5.1 Giftigheid: letale en sub-letale effecten	13
1.5.2 Blootstellingsroutes en concentraties	14
1.6 Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus	14
1.7 Monitoringen van bijensterfte	15
1.8 Risicotoevoegingsschema voor neonicotinoïden	16
2. Inleiding	19
2.1 Sterfte van bijenvolken	19
2.2 Neonicotinoïden en fipronil: systemisch werkende insecticiden	19
2.3 Literatuuroverzicht over de relatie tussen neonicotinoïden en fipronil en bijen	19
3. Neonicotinoïden en fipronil en bijen: literatuuroverzicht	21
3.1 Toxiciteit	21
3.1.1 Acute letale toxiciteit	21
3.1.2 Chronische letale toxiciteit	22
3.1.3 Sub-letale effecten	23
3.1.4 Mengseltoxiciteit	26
3.2 Concentraties en metabolisme van neonicotinoïde insecticiden in planten en bijen in relatie tot de toepassing	26
3.2.1 Translocatie van residuen in planten, nectar en stuifmeel	26
3.2.2 Residuen in door bijen verzameld stuifmeel en in bijen, honing en was	28
3.3 Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus	38
3.4 Monitoring van volken van imkers in de praktijk	41
3.5 Risk assessment en vervolgonderzoek	42
4. Conclusies en aanbevelingen	45
4.1 Antwoord op de hoofdvraag	46
4.2 Aandachtspunten en perspectief	47
5. Beschikbare literatuur per actieve stof	49
5.1 Imidacloprid	50
5.1.1 Toepassingen (Ctgb):	50
5.1.2 LD <sub>50</sub> (Ctgb)	50
5.1.3 Acute giftigheid literatuur	50
5.1.4 Chronische blootstelling	50

5.1.5	Sub-letale effecten (gedrag)	51
5.1.6	Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	51
5.1.7	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	52
5.1.8	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD50	53
5.1.9	Metabolisme en bio-accumulatie	54
5.1.10	Monitoring van volken van imkers in de praktijk	54
5.2	Clothianidin	55
5.2.1	Toepassingen (Ctgb)	55
5.2.2	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	55
5.2.3	Acute giftigheid literatuur	55
5.2.4	Chronische blootstelling	55
5.2.5	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	55
5.2.6	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD <sub>50</sub>	55
5.2.7	Monitoring van volken van imkers in de praktijk	56
5.3	Thiamethoxam	57
5.3.1	Toepassingen (Ctgb):	57
5.3.2	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	57
5.3.3	Chronische blootstelling	57
5.3.4	Sub-letale effecten (gedrag)	57
5.3.5	Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	57
5.3.6	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	57
5.3.7	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD <sub>50</sub>	58
5.3.8	Monitoring van volken van imkers in de praktijk	58
5.4	Thiacloprid	59
5.4.1	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	59
5.4.2	Acute giftigheid literatuur	59
5.4.3	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	59
5.4.4	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD <sub>50</sub>	59
5.5	Acetamiprid	60
5.5.1	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	60
5.5.2	Acute giftigheid literatuur	60
5.5.3	Chronische blootstelling	60
5.5.4	Sub-letale effecten (gedrag)	60
5.5.5	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	60
5.5.6	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD <sub>50</sub>	61
5.5.7	Metabolisme en bio-accumulatie	61
5.6	Fonicamid	62
5.6.1	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	62
5.6.2	Acute giftigheid literatuur	62
5.7	Fipronil	63
5.7.1	Toepassingen (Ctgb):	63
5.7.2	LD <sub>50</sub> (Ctgb)	63
5.7.3	Acute giftigheid literatuur	63
5.7.4	Chronische blootstelling	63
5.7.5	Sub-letale effecten (gedrag)	63
5.7.6	Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing	64
5.7.7	Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek	64
5.7.8	Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD <sub>50</sub>	65
5.7.9	Metabolisme en bio-accumulatie	65
	Verantwoording en dankwoord	67
6.	Literatuur	69

# Voorwoord

Bestuivende insecten, vooral bijen, zijn van groot belang voor de land- en tuinbouw en voor de natuur.

Wilde bijen en door imkers gehouden honingbijen gaan de laatste decennia achteruit. Imkers worden geconfronteerd met jaarlijks terugkerende sterfte van een deel van hun volken. Allerlei oorzaken kunnen daaraan debet zijn, zoals veranderend landgebruik en achteruitgang van de natuurlijke bronnen, invasieve parasieten en ziekteverwekkers. Ook het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen wordt als een van de oorzaken gezien.

Eén groep van gewasbeschermingsmiddelen, de systemisch werkende insecticiden uit de groep van de neonicotinoïden, wordt vaak als verdachte aangewezen als een van de bepalende veroorzakers van de toegenomen sterfte van honingbijenvolken sinds het jaar 2000. Vanwege de maatschappelijke bezorgdheid over de rol van de neonicotinoïden bij bijensterfte heeft de staatssecretaris van landbouw opdracht gegeven tot een herbeoordeling van de toelatingsdossiers van vier neonicotinoïden en Fipronil, en tot het schrijven van een rapport over de openbare peer reviewed literatuur.

In 2011 zijn de toelatingsdossiers van vier neonicotinoïden en fipronil door het College voor de Toelating van Gewasbeschermingsmiddelen en Biociden (Ctgb) her-beoordeeld (verschenen 29 juni 2011). Het Ctgb gebruikte de door de aanvragers van de toelatingen aangeleverde en wettelijk vereiste dossiers. De herbeoordeling heeft niet geleid tot intrekking van toelatingen. Een paar toepassingen voldoen aan de meest recente wettelijke eisen nadat aanvullende gebruiksrestricties zijn doorgevoerd.

Dit rapport voegt daar een overzicht van de in de openbare wetenschappelijke literatuur bekende gegevens over deze stoffen in relatie tot bijen aan toe (ongeveer 100 publicaties). Deze publicaties zijn door het Ctgb in de herbeoordeling ook gebruikt als aanvulling op de dossiers.

In dit rapport bespreken we de giftigheid van de stoffen voor bijen, de blootstellingsroutes en blootstellingsconcentraties, en het toelatingsschema in relatie tot risico's voor bijen. De toelatingsdossiers en de daaraan ten grondslag liggende studies hebben we niet gebruikt omdat deze niet toegankelijk zijn.

De hoofdvraag die dit rapport beantwoordt is:

*Geeft de open beschikbare peer reviewed wetenschappelijke literatuur aanwijzingen dat met de huidige toelatingsbeoordeling ontoelaatbare risico's voor bijen (zijn) ontstaan?*

Een wetenschappelijke review gebaseerd op dit literatuuronderzoek (met uitsluiting van de gegevens over fipronil) is onlangs geaccepteerd en zal binnenkort verschijnen in het tijdschrift *Ecotoxicology* (Blacquièr *et al.*, 2012); Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk-assessment. DOI: 10.1007/s10646-012-0863-x).





# Korte Samenvatting

## Giftigheid van neonicotinoïden en fipronil

Neonicotinoïden en fipronil doden insecten via contactwerking (bijv. door een bespuiting) of via orale opname (het insect eet van het middel). Doordat neonicotinoïden systemisch zijn, wat betekent dat ze in de plant worden opgenomen en verplaatst, zal er vaak sprake zijn van opname met het voedsel. Sommige neonicotinoïden en fipronil zijn erg giftig voor bijen, andere minder. De giftigheid wordt bepaald in laboratoriumexperimenten, en uitgedrukt in de LD<sub>50</sub>, de dosis waarbij na contact of orale toediening 50% van de bijen sterft. De LD<sub>50</sub> van neonicotinoïden en fipronil bij orale toediening varieert van 3,7 ng/bij (zeer giftig) tot 53.3 miljoen ng/bij (weinig giftig).

## Blootstellingsroutes

Beide manieren van blootstelling, via contact en oraal, gelden voor de plaaginsecten waartegen de middelen ingezet worden, maar ook voor de niet-doel organismen, waaronder bijen. Contactblootstelling kan optreden bij bespuiting of blootstelling aan stof bij het zaaien van gecoatete zaden. Door het systemische transport in de plant kunnen neonicotinoïden ook terecht komen in de twee belangrijkste voedingscomponenten van bijen: stuifmeel en nectar. Dan treedt orale blootstelling op. Daarnaast zouden bijen ook kunnen worden blootgesteld via guttatievloeistof (druppels uitgescheiden door planten aan de bladranden) en via verontreinigd oppervlaktewater.

### *Resultaat*

Inderdaad werden neonicotinoïden aangetroffen in stuifmeel en nectar, en daardoor ook in het bijenvolk: in honing, bijenbrood (gevormd uit stuifmeel), in bijen zelf en in de was van de raat. Daarin zijn neonicotinoïden niet uniek, want ook een palet van andere stoffen (gewasbeschermingsmiddelen en diergeneesmiddelen) werden daarin aangetroffen. De gevonden concentraties van neonicotinoïden in nectar en stuifmeel zijn lager dan direct schadelijke concentraties, maar ze komen soms wel in de buurt. In de openbare literatuur waren maar van een paar plantensoorten gegevens te vinden over residuen en de concentraties daarvan. Deze moeten node aangevuld met extra onderzoek aan andere soorten, of aangevuld worden uit de toelatingsdossiers door deze peer reviewed te publiceren.

Volgens de literatuur is blootstelling van bijen via guttatievloeistof een niet waarschijnlijke blootstellingsroute. Over concentraties in het oppervlaktewater en blootstelling daaraan door het drinken van dit water hebben we geen wetenschappelijke publicaties gevonden.

De conclusie dat de concentraties in planten- en bijenproducten niet zo hoog zijn dat schade te verwachten is, is gebaseerd op een veelheid van laboratorium- en (semi-) veldstudies, waarin bijen zijn onderworpen aan doseringen van de stoffen, en waarin is gekeken naar sterfte maar ook naar diverse andere verschijnselen zoals gedrag, foerageeractiviteit, productie van broed (=voortplanting). Als bijen de blootstelling wel overleven, maar de genoemde gedragsuitingen worden aangetast, spreken we van sub-letale effecten. Sub-letale effecten zouden op de lange termijn bijen en bijenvolken toch de das kunnen omdoen, omdat het volk als geheel minder goed gaat. Sub-letale effecten zouden moeten blijken uit goed opgezette en voldoende grote veldstudies.

## Concluderend

Voor honingbijen is nectar de gevaarlijkste bron van blootstelling aan neonicotinoïden, omdat ze daar erg veel van gebruiken; vooral de werksters die nectar verzamelen zijn grootverbruiker. De uitgerekende langzaam opgebouwde dosis via nectar geeft op basis van de gevonden concentraties in nectar (0- 5 µg/kg) geen reden te vrezen voor chronische letaliteit. Dat zou anders kunnen zijn als blijkt dat bij sommige andere gewassen, waar nog geen (openbare) gegevens van zijn, veel hogere concentraties in de nectar zouden voorkomen.

De door het Ctgb in de toelatingsdossiers gebruikte kengetallen over giftigheid (LD<sub>50</sub>) en over de laagste concentraties waarbij nog schade optreedt, zijn dezelfde of overeenkomend met die in de open peer gereviewde

literatuur. Hier zijn derhalve geen discrepanties gevonden en blijkt de toelating door het Ctgb te berusten op adequate gegevens. Het risk assessment schema waarop de toelatingsbeoordeling door het Ctgb berust is bruikbaar om systemische insecticiden te beoordelen.

Tenslotte wijzen een aantal uitgevoerde grote monitor studies in het buitenland er niet op dat, ondanks aanwezige residuen in bijenvolken, massale sterfte van bijenvolken oorzakelijk verbonden is met de neonicotinoïden (hoewel het op grond daarvan ook niet pertinent uit te sluiten is), maar wel op de rol van een aantal andere factoren, zoals parasieten (waaronder de varroa-mijt) en de voedselvoorziening van bijenvolken.

*Resumerend is er op grond van peer reviewed literatuur geen aanwijzing dat de huidige toegepaste toelatingsbeoordeling belangrijke wetenschappelijke gegevens gemist heeft.*

# Leeswijzer

Dit rapport beschrijft de in de openbare peer gereviewde literatuur beschikbare gegevens over de effecten van neonicotinoïden in relatie tot honingbijen.

## Hoofdstuk 1. Uitgebreide samenvatting

De bevindingen zijn samengevat per onderwerp gevolgd door enkele conclusies. De onderwerpen in de samenvatting zijn gebaseerd op de daarna volgende uitgebreide beschrijvingen van proeven, en de compilatie van gegevens in grote overzichtstabellen.

## Hoofdstuk 2. Inleiding

In hoofdstuk 2 wordt de aanleiding en het kader geschetst voor deze studie: de al jaren alarmerende sterfte van honingbijenvolken en de mogelijke rol van gewasbeschermingsmiddelen bij deze sterfte.

## Hoofdstuk 3. Neonicotinoïden en fipronil en bijen: literatuuroverzicht

Dit is het eigenlijk hoofdstuk over de literatuurgegevens, en behandelt achtereenvolgens:

- 3.1: De giftigheid van de stoffen, op diverse niveaus: mortaliteit en sub-letale effecten op diverse gedragingen en eigenschappen van de bijen, samengevat in tabellen 2, 3 en 4
- 3.2: Residuen van de stoffen aangetroffen in planten en in de bijenkast, samengevat in Tabel 1.
- 3.3: op grond van de residuen uit 3.2 is maximale de blootstelling van bijen uitgerekend, en vergeleken met de giftigheid uit 3.1. De resultaten staan in Tabel 5 en 6.
- 3.4: monitor studies uit diverse landen: gezocht verband tussen gebruik van de middelen, residuen en bijensterfte. Ook allerlei andere belangrijke factoren betreffende bijen werden in deze monitoringstudies betrokken
- 3.5: Het toetsingsschema voor de middelen ten aanzien van bijen wordt behandeld en gespiegeld aan literatuurgegevens

## Hoofdstuk 4. Conclusies, aanbevelingen en vervolgonderzoek

In dit hoofdstuk worden enkele conclusies getrokken en lacunes in de kennis aangegeven. Ook enkele ontwikkelingen die in de toekomst betere middelen en betere toetsing mogelijk maken worden genoemd.

## Hoofdstuk 5. Overzichten per actieve stof

Hier staan nauwelijks extra gegevens in ten opzichte van de eerdere hoofdstukken, maar is alles gebundeld per actieve stof. Elk overzicht begint met de LD<sub>50</sub> zoals gebruikt door het Ctgb, en enige informatie over het gebruik van de stoffen in Nederland.

## Hoofdstuk 6. Literatuur

De literatuuropgave besluit het rapport.



## Veelgebruikte termen

### Definitie van veelgebruikte termen

Blootstelling aan (stof x):	Het in aanraking komen met (stof x) Blootstelling aan (stof x) in het laboratorium heet: dosering
Dosering (van stof x):	De hoeveelheid (van stof x) toegediend per bij (ng of µg per bij)
Toxiciteit (van stof x):	Gifigheid (van stof x). Meestal uitgedrukt in de dosis per bij waarbij de helft van de bijen sterft (= de LD <sub>50</sub> )
Letale dosis:	Dosis waarbij (een deel van) de bijen dood gaat
Sub-letale dosis:	Dosis waarbij de bijen niet dood gaan
Mortaliteit:	Sterfte
Letaal effect (van stof x):	Bijen gaan dood door blootstelling (aan stof x)
Sub-letaal effect (van stof x):	Bijen gaan niet dood aan de blootstelling (aan stof x) maar ondervinden wel (negatieve) effecten
Contact dosering / blootstelling:	Bij komt in directe aanraking met de dosis (lab) of de stof in het veld (bespuiting)
Orale dosering / blootstelling:	Bij krijgt de stof via de voedselgift (lab) of via het voedsel in het veld of in de bijenkast
Acute letale dosis:	Dosis waarbij (veel) bijen na toediening snel sterven (24 -48 uur)
Chronische letale dosis:	dosis waarbij (veel) bijen sterven na langdurige blootstelling Lab: na >48 uur tot (2) weken Veld: na 2 dagen of later: elke verkorting van de levensverwachting = chronische letaliteit
Chronische sub-letale dosis:	Dosis waarbij bijen na langdurige blootstelling niet sterven maar wel langdurige of uitgestelde (nadelige) effecten ondervinden
Residu:	Achtergebleven of getranslokeerde fractie van een toegediende stof, bijv. in delen van planten, of in honing
Metaboliet:	Een uit de moederstof ontstane dochterstof
Systemisch insecticide:	Insecticide dat door de plant worden opgenomen, in de plant worden getransporteerd en in een ander deel van de plant de insecticide werking heeft als het insect van dat deel eet.

Soms worden de termen en hun synoniemen naast elkaar gebruikt: bijvoorbeeld toxiciteit en gifigheid, mortaliteit en sterfte

## Honingbijen en hun 'foerage'



*Honingbijen: links werkster, midden dar, rechts koningin. (foto Zach Huang)*

### Het volk: werksters, darren, koningin

Honingbijen leven samen in bijenvolken, 's zomers bestaand uit 10-30.000 werksters (vrouwelijke bijen die zich normaliter niet voortplanten), een paar honderd (max 1000) darren (mannelijke bijen) en één koningin (volwassen vruchtbare vrouwelijke bij). Onder normale omstandigheden legt alleen de koningin eitjes (wel 1000 per dag), waaruit de larven ontstaan die na snelle groei en een verpoppingsfase weer jonge bijen opleveren. Voor de larven en de (jonge) bijen zelf is veel voedsel nodig.

De taken in het bijenvolk worden verdeeld tussen de werksters, deels op basis van leeftijd en van talent (erfelijke factoren). Veel taken gebeuren binnen in het nest, bijvoorbeeld raten maken, cellen poetsen, larven verzorgen en voeden, andere buiten het nest, bijvoorbeeld het nest bewaken, foerageren, de omgeving verkennen.

Van de werksters in het volk gaat onder goede omstandigheden ongeveer een derde deel naar buiten om te foerageren. Dus in een groot volk zo'n 10.000 werksters.

Bijen leven volledig van de te oogsten producten van bloemen (en soms ook nog van honingdauw, uitgescheiden door luizen) en planten. Hun energie wordt gehaald uit de suikers uit nectar en soms uit de suikers uit honingdauw. Eiwit, vitaminen en mineralen worden gehaald uit stuifmeel. Daarnaast halen bijen soms water (deels voor voeding en deels voor de klimaatbeheersing: verdampen koelt het nest), en propolis: harsen van knopschubben van vooral populier, die plakkerig zijn (denk aan voorjaarsknoppen van kastanjabomen).

### Stuifmeel

Stuifmeel wordt geoogst van de meeldraden van bloemen, opgevangen in het haarkleed van de bijen, en met de poten in de korfjes geveegd. Korfjes zijn speciale uithollingen in de achterpoten waar met behulp van stugge haren veel stuifmeel vast te steken en plakken is. De stuifmeelklompjes die bijen aldus maken worden naar de kast gebracht en opgeslagen in de raten.

Op jaarbasis heeft een bijenvolk ongeveer 20 kg stuifmeel nodig. Per trip kan een bij maximaal ongeveer 25-40 mg ophalen. Voor stuifmeel vliegen bijen zo nodig wel 6-8 km vanaf hun nest (de bijenkast), maar dat alleen als er dichtbij niet veel goeds te halen is.

In het volk eten en verteren voedsterbijen heel veel stuifmeel, waardoor ze veel eiwitrijk voedersap kunnen produceren dat als voeding voor de koningin (voor de eitjes) en de larven dient.

Reserve aan stuifmeel ligt in de raten opgeslagen als 'bijenbrood'. Voorraden stuifmeel in het bijenvolk zijn niet gigantisch groot, maar voldoende om een paar weken mee vooruit te kunnen.

### Nectar

Nectar is vanwege het hoge suikergehalte (~10 tot 50%) de energiebron voor bijen. Nectar wordt geproduceerd in nectarklieren (nectariën) van planten. De nectariën liggen meestal onderin de bloemen, maar er zijn ook nectariën die buiten de bloemen (op stengels, bladstelen en ranken) liggen. Nectar wordt door de bijen met hun speciale monddelen uit bloemen opgezogen en meegenomen in de honingmaag. Per trip neemt een bij maximaal ongeveer 40 mg nectar mee.

Op jaarbasis heeft een bijenvolk ongeveer 125 kg nectar nodig, maar ze kunnen bij voldoende beschikbaarheid veel meer ophalen. Zolang het maar opgeslagen kan worden blijven honingbijen voor nectar gaan. Voor nectar vliegen bijen zo nodig wel tot 14 km. In zulke gevallen moet het wel een heel goede nectarbron zijn: gemakkelijk te oogsten en met een heel hoog suikergehalte. Het spreekt voor zich dat de energieopbrengst van een trip hoger moet zijn dan de vlieggkosten van de trip. Daarom zullen bijen altijd zo dicht mogelijk bij hun nest foerageren.

Geogste nectar wordt in de kast overgedragen aan de bijen met de taak nectarverwerking en opslag. Deze bijen zorgen dat de nectar wordt ingedroogd tot een suikergehalte boven de 80%, en voegen daarbij enzymen aan de nectar toe. Is het product klaar dan worden de cellen waarin het is opgeslagen met dekseltjes van was afgesloten, en is het honing geworden. Honing is goed geconserveerd, en daardoor niet aan bederf onderhevig. De grote honingvoorraad van bijen dient als energiebron voor de overwintering. Bij een te kleine voorraad sterft het volk in de winter.

## Honingdauw

Een speciaal verhaal is de oogst van honingdauw: luizen op planten tappen het zoete sap uit de bastvaten van planten, filteren daaruit de aminozuren en mineralen, maar scheiden de overtollige suiker weer uit. Mieren maar ook bijen komen op deze zoetheid af. Honingdauw wordt door schimmels benut, en bevat daardoor vaak veel schimmelsporen. Als bijen veel honingdauw oogsten levert dat vaak een heel donkere honing op door de zwarte sporen, bijvoorbeeld in de beroemde Duitse 'Waldhonig'.

## Water

In gematigde streken verzamelen honingbijen ongeveer 25 kg water per jaar. Het meeste is nodig in het vroege voorjaar. Er zijn dan al weer larven aanwezig, maar er komt nog weinig verse nectar binnen. De in de raten opgeslagen honing heeft een suikerpercentage van 80% en moet daarom worden verdund met water om te kunnen worden gevoerd. Maar ook als het buiten erg heet weer is halen bijen veel water. Dat gebruiken ze dan om het klimaat in het nest mee te reguleren. Het water wordt verspreid over de raten en verdampt om de lucht te koelen. Bijen houden de temperatuur van hun nest en broed (larven en poppen) heel stabiel op 35-37 °C. Water wordt door bijen verzameld langs de rand van plassen, van dauw op planten en van natte grond. Maar ook langs vijvers en sloten halen ze water. Het verzamelde water wordt door de waterhaalster vervoerd in de honingmaag. Dat betekent dat de waterhaalster niet veel nectar als vliegbrandstof kan meenemen (dat zou ook in de honingmaag moeten), en daarom gaan bijen niet zo ver voor water, maximaal ongeveer 3 km.

## Propolis

Bijen oogsten harsen van knopschubben van vooral populieren. Ze gebruiken deze harsen als kithars om kieren te dichten, maar ook om een dun laagje aan te brengen aan de binnenkant van hun nestholte en over de raten. Propolis, zoals de door bijen bewerkte hars heet, heeft antibacteriële en schimmelwerende eigenschappen. Propolis wordt niet gegeten door de bijen.

## Residuen

Bijen kunnen in principe allerlei stoffen meenemen naar hun nest die in hun 'foerage' terecht zijn gekomen, inclusief gewasbeschermingsmiddelen en luchtverontreiniging. Vooral de eventuele stoffen in stuifmeel, nectar, honingdauw en water zijn van belang, omdat deze bronnen (deels) worden gegeten.



*Nectar oogst op bloem van Kamille (foto Bram Cornelissen). Zie ook het gele stuifmeelkorfje aan de achterpoot.*



# 1. Uitgebreide samenvatting

## 1.1 Aanleiding en beleidsvraag

De toegenomen sterfte van honingbijenvolken sinds 2000 heeft maatschappelijke bezorgdheid veroorzaakt. Eén groep van gewasbeschermingsmiddelen, de systemisch werkende insecticiden uit de groep van de neonicotinoïden, wordt vaak als verdachte oorzaak aangewezen voor de toegenomen sterfte. Vanwege de maatschappelijke bezorgdheid over de rol van de neonicotinoïden bij bijensterfte heeft de staatssecretaris van landbouw opdracht gegeven tot een herbeoordeling van de toelatingsdossiers van vier neonicotinoïden en Fipronil, en tot het schrijven van een rapport over de openbare peer gereviewde literatuur.

De herbeoordeling in 2011 van de toelatingsdossiers van vier neonicotinoïden en fipronil door het College voor de Toelating van Gewasbeschermingsmiddelen en Biociden (Ctgb) (verschenen 29 juni 2011) gaf geen aanleiding toelatingen in te trekken. Een paar toepassingen voldoen aan de meest recente wettelijke eisen nadat aanvullende gebruiksrestricties zijn doorgevoerd.

Dit rapport voegt daar een overzicht van de in de openbare wetenschappelijke literatuur bekende gegevens over deze stoffen in relatie tot bijen aan toe (ongeveer 100 publicaties). Deze publicaties zijn door het Ctgb in de herbeoordeling ook gebruikt als aanvulling op de dossiers.

De hoofdvraag die dit rapport beantwoordt is:

*Geeft de open beschikbare peer reviewed wetenschappelijke literatuur aanwijzingen dat met de huidige toelatingsbeoordeling ontoelaatbare risico's voor bijen zijn ontstaan?*

## 1.2 Sterfte van bijenvolken en mogelijke oorzaken

De sterfte van bijenvolken wereldwijd houdt de gemoederen al een paar jaar bezig, en een veelheid aan verklaringen wordt aangevoerd. Het grote onderzoeknetwerk 'Coloss' (<http://coloss.org/>) benadrukt dat veel oorzaken kunnen bijdragen aan de bijensterfte. Waarschijnlijk staan deze oorzaken niet los van elkaar (stapeling of wisselwerking van oorzaken) en kunnen ze regionaal verschillend zijn. Vorig jaar verscheen een overzicht van het United Nations Environment Program (UNEP) dat de zaken op een rij zet, ook voor andere bestuivende insecten dan honingbijen (Kluser *et al.*, 2011).

Belangrijke mogelijke oorzaken zijn de parasitaire<sup>1</sup> exotische<sup>2</sup> mijt *Varroa destructor* en allerlei andere ziekten en parasieten, deels gekoppeld aan *Varroa*, verlies van habitat<sup>3</sup> en foerageermogelijkheden<sup>4</sup> (door verstedelijking en schaalvergroting), een gebrek aan positieve uitdagingen en ontwikkelingen in de imkerij, maar ook milieuverontreiniging en het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen worden genoemd als mogelijke oorzaak.

### Conclusie

Naast andere evidente oorzaken is blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen een van de mogelijke oorzaken die bijdragen aan bijensterfte.

<sup>1</sup> Parasiet: een organisme dat energie of voedsel onttrekt aan een ander organisme, de gastheer. Een parasiet is afhankelijk van zijn gastheer.

<sup>2</sup> Exoot: een organisme dat van elders is binnengekomen in een land. De exoot *V. destructor* is ook nog eens afkomstig van een andere gastheer.

<sup>3</sup> Habitat = 'woonplaats': deel van de natuur waar een soort voorkomt, nestelt en zijn voedsel vindt.

<sup>4</sup> Foerageren: voedsel zoeken en verzamelen.

## 1.3 Systemische insecticiden: neonicotinoïden en fipronil

Systemische insecticiden vormen een mogelijk risico voor bijen. In deze rapportage beperken wij ons tot fipronil en de volgende neonicotinoïden: imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, thiacloprid, acetamiprid en flonicamid. De reden van de beperking is dat deze stoffen een toelating hebben in Nederland.

Het speciale aan de groep stoffen is dat ze systemisch werken: ze worden door de planten (het gewas) opgenomen waardoor de plant zelf giftig wordt voor de doelorganismen. Daarnaast zijn deze stoffen in het algemeen erg giftig voor de doelorganismen. Deze twee eigenschappen samen maken dat er heel weinig van het middel nodig is, en dat ze door aan te brengen in de coating van zaden aan elke plant in het gewas 'individueel' kunnen worden meegegeven. Hierdoor is er weinig arbeid nodig door de boer, en ontstaat ook weinig blootstelling van boeren (er hoeft niet gespoten te worden), en weinig 'drift' van het middel.

Sommige van de stoffen breken wel heel traag af in de bodem of in water. Ze zijn niet of weinig giftig voor zoogdieren.

Naast de toepassing in zaadcoating worden de middelen ook nog wel gespoten, aangegoten en daarnaast in kassen via de voedingsoplossing gedoseerd.

Er zijn veel toepassingen van fipronil en neonicotinoïden in Europa maar ook in Amerika en Australië. Neonicotinoïde als zaadcoating wordt in Europa toegepast voor onder andere mais, zonnebloem, koolzaad (toelating voor zonnebloem en koolzaad niet in Nederland) en bietenzaad; daarnaast vindt toepassing plaats als bespuiting in de fruitteelt (grootfruit, steenfruit, kleinfruit als bessen enz.) en boomteelt, als dompelmiddel bij bloembollen, en als druppeltoepassing in de voedingsoplossing in een aantal kasteelten: aubergine, paprika, courgette, pepers, tomaat, diverse siergewassen, en in het openbaar groen.

### Conclusie

De systemische insecticiden uit de groep van de neonicotinoïden en fipronil worden uitgebreid toegepast, ook in Nederland waardoor blootstelling van bijen aan neonicotinoïden en fipronil in Nederland in principe mogelijk is.

## 1.4 Toelatingsdossier en open literatuur

Zowel op EU niveau (stof), als later ook voor een middel (gebaseerd op stof) vindt een risicobeoordeling plaats. Slechts als het risico aanvaardbaar is komt er nationaal toelating. Schadelijke effecten mogen niet aanwezig zijn voor mens en dier en effecten moeten aanvaardbaar zijn voor het milieu. Daarvoor zijn richtsnoeren opgesteld en hebben we een goedgekeurd toetsingskader conform recente wetenschappelijke inzichten.

Daarvoor dient een toelatingsdossier opgesteld te worden dat wordt ingediend bij het College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden (Ctgb). Dit toelatingsdossier is niet openbaar. Elk opgesteld toelatingsdossier wordt door een aantal onafhankelijke deskundigen beoordeeld. Naast het toelatingsdossier is er openbare literatuur over vergelijkbare of dezelfde proeven. Deze open en peer gereviewde literatuur gebruiken wij in dit rapport. De literatuur behandelt de volgende onderwerpen:

- Giftigheid voor bijen (via contact en orale dosering)
  - Onmiddellijke sterfte
  - Sterfte na langdurige blootstelling
  - Sub-letale effecten (andere effecten dan sterfte)
  - Giftigheid van mengsels met andere middelen
- Blootstelling:
  - Routes: hoe komen bijen in aanraking met gif
  - Concentraties: met hoeveel komen ze in aanraking
    - Te veel of nog veilig?
- Monitoringstudies van bijensterfte
  - Oorzaken sterfte
- Het OEPP/EPPO schema voor toelatingsonderzoek

## 1.5 Giftigheid en blootstelling

Een middel is gevaarlijk voor bijen als het (erg) giftig is voor bijen, maar er ontstaat pas een risico als er tegelijkertijd sprake is van blootstelling aan het middel. Als volgt weergegeven:

$$\text{Risico} = \text{giftigheid} \times \text{blootstelling}$$

De vergelijking laat zien dat giftigheid op zichzelf niet per se tot schade hoeft te leiden, maar ook dat een stof die niet al te giftig is toch een risico gaat vormen als de blootstelling hoog is. Beide factoren zijn daarom belangrijk in de risicobeoordeling die ten behoeve van toelatingen wordt uitgevoerd.

Veel onderzoek naar de giftigheid is gedaan in laboratoriumstudies en in beperkte mate in veldstudies. Of er in de praktijk blootstelling zal optreden is lastig vast te stellen. Daarvoor zijn metingen in het veld, in veldproeven en in de praktijk nodig. Het is niet verwonderlijk dat er veel misverstanden ontstaan doordat men zich niet altijd realiseert dat giftigheid niet per definitie een risico op schade hoeft te betekenen.

### 1.5.1 Giftigheid: letale en sub-letale effecten

Uit de laboratoriumproeven geeft de LD<sub>50</sub> de letale dosis aan, dit is een eenmalige dosis waarbij 50% van de bijen dood gaan binnen 24 of 48 uur. Bij lagere doses gaan bijen niet (snel) dood, maar het is niet zeker of er dan toch geen schade kan optreden wanneer er sprake is van langduriger blootstelling. Na langdurige (lage) blootstelling kan de bij alsnog dood gaan door vergiftiging, dat is chronische letale toxiciteit. Als er bij korte of langer durende blootstelling wel een effect optreedt, maar geen sterfte, heet dat sub-letale toxiciteit. Dergelijke effecten zijn onderzocht in:

1. laboratorium experimenten: onderzoek aan individuele bijen: effecten op gedrag, weerstand tegen ziekten etc.
2. veldstudies: onderzoek aan individuele bijen: gedrag, levensverwachting, foerageeractiviteit, etc.
3. veldstudies: onderzoek op niveau van bijenvolken: (de volken werden blootgesteld door direct aanbieden aan het volk of via het gewas (nectar en stuifmeel)): ontwikkeling en overleving van volken (broed, bijen, voedselvoorraden); performance (hoeveelheid honing geoogst, stuifmeel); eventueel aanwezige ziekten

In laboratoriumstudies is heel secuur een relatie vast te stellen tussen de dosering en het resulterende effect (bijv. sterfte). Dat kan worden gedaan na eenmalige dosering waarbij de directe (binnen 24 of 48 uur sterfte wordt bepaald, maar het kan ook worden gedaan door chronische blootstelling met lagere dosering bijvoorbeeld dagelijks gedurende 10 dagen.

In veldstudies bleek het vaak lastig om een direct oorzakelijk verband met de toepassing van een bestrijdingsmiddel aan te tonen, omdat de blootstelling in experimenten op grote schaal niet exact was vast te stellen. Daarom moeten veldstudies van voldoende grootte zijn, veel metingen bevatten aan residuen (om blootstelling vast te stellen) en altijd goede controlebehandelingen bevatten.

De gegevens uit de publicaties worden besproken in de hoofdstukken 4.1 tot 4.4 en de tabellen 2 tot 4.

### Conclusie

Er is een groot verschil in giftigheid voor bijen tussen de neonicotinoïden gevonden: de giftigheid van imidacloprid is groter dan van clothianidin, die weer groter dan die van thiamethoxam. Thiamethoxam is giftiger dan dinotefuran, op zijn beurt giftiger dan nitenpyram. Een stuk minder giftig zijn acetamiprid en thiacloprid. Nog weer ver daaronder zit de giftigheid van flonicamid. De minst giftige (flonicamid) heeft een 14,4 miljoen keer hogere LD<sub>50</sub> dan imidacloprid. Thiacloprid is bijna 5000 X minder giftig dan imidacloprid. Fipronil is ongeveer even giftig als imidacloprid. Ook sommige afgeleide metabolieten<sup>5</sup> zijn heel giftig. De stoffen beïnvloeden gedrag, leervermogen, levensverwachting en reproductie van bijen. In veldtesten met normale te verwachten concentraties (bij normale toepassing) werden echter geen effecten vastgesteld. Effect op overwintering (en wintersterfte) werd slechts in twee studies onderzocht, er werd geen effect gevonden.

<sup>5</sup> Metaboliet: als een toegediende stof in de plant of in de bij of de bodem in andere componenten overgaat, zijn dat metabolieten.

## 1.5.2 Blootstellingsroutes en concentraties

Blootstelling is niet zo gemakkelijk vast te stellen. Een methode is om in het veld te onderzoeken hoe veel van het middel (na toepassing) teruggevonden wordt op de plant, in nectar en stuifmeel, en in de bijen. Dat kan een aanwijzing geven van de mate van blootstelling, maar het is nog niet sluitend omdat onbekend is hoeveel de bijen juist van het behandelde gewas oogsten en hoeveel van buiten het gewas. Dergelijke metingen van concentraties in diverse bronnen gebeuren veelal in grote veldproeven.

Een ander probleem is dat er sprake kan zijn van meerdere blootstellingsroutes, soms ook na elkaar in het seizoen. Het is dus zaak om alle blootstellingsroutes in kaart te brengen en hun relatieve aandeel in de blootstelling te bepalen. Tenslotte kan de blootstelling van verschillende levensstadia en van verschillende groepen binnen de bijenkolonie verschillen: de kans op (contact-)blootstelling in het veld is groot voor foerageersters (die de hele dag buiten actief zijn), maar gering voor voedsterbijen (die de hele dag in het hart van het bijenvolk blijven). Daarentegen hebben de laatste weer een groter risico op orale blootstelling via residuen in stuifmeel, omdat juist zij heel veel stuifmeel eten en verteren. Doordat zij stuifmeel verteren en omzetten in voedersap, waarmee de larven gevoed worden, kan in principe voedersap ook een secundaire blootstellingsroute worden. Met behulp van de beschikbare kennis over voedselgebruik van verschillende groepen/levensstadia is de te verwachten orale blootstelling wel te berekenen (zie Hoofdstuk 4.6), maar niet gemakkelijk echt vast te stellen.

De voor neonicotinoïden en fipronil mogelijke blootstellingsroutes zijn naast directe blootstelling aan een bespuiting of verse spuitvloeistof op bladeren van planten, of aan stof bij zaaïen van gecoat zaad, blootstelling via voedsel: nectar, honingdauw en stuifmeel. Daarnaast via water: oppervlaktewater en plassen op het land na een bespuiting en regen. Tenslotte kan ook guttatievloeistof van met een zaadcoating behandelde (kiem-) planten residuen bevatten. Guttatie is het verschijnsel dat waterdruppels worden uitgescheiden aan de randen van bladeren. Dit treedt vooral op bij lage verdamping ('s nachts en vroege ochtend). Over eventuele blootstelling van bijen via oppervlaktewater hebben we geen peer reviewde publicaties gevonden. De publicaties over blootstellingsroutes en concentraties worden besproken in Hoofdstuk 4 en Tabel 1.

### Conclusie

Naast eventuele directe blootstelling bij een bespuiting zijn de belangrijkste routes oraal via opname van stuifmeel en nectar met neonicotinoïden residuen, mogelijk ook guttatievloeistof en in sommige gevallen stof van zaaimachines met gecoat zaad.

Concentraties van neonicotinoïde residuen in stuifmeel en in nectar waren lager dan de letale concentraties in de laboratoriumtesten.

Concentraties residuen in guttatievloeistof waren een tot twee orden van grootte hoger dan in nectar en stuifmeel. Als bijen guttatievloeistof zouden oogsten is er duidelijk sprake van een risico. De aanwijzingen daarvoor zijn echter gering. Deze blootstellingsroute wordt wel meegenomen in het beoordelingsschema en de toelatingsbeoordeling. Over blootstelling via oppervlaktewater is geen openbare literatuur beschikbaar.

Residuen van neonicotinoïden werden teruggevonden in het bijenvolk, in opgeslagen stuifmeel (bijenbrood<sup>6</sup>), nectar en honing en in bijenwas, evenals in/op de bijen zelf.

## 1.6 Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van de literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen kunnen worden blootgesteld. Als deze dosis in de buurt komt van de LD<sub>50</sub>, is er een risico voor acute vergiftiging in het veld. Dat

<sup>6</sup> Bijenbrood is opgeslagen en geconserveerd stuifmeel.

wordt uitgedrukt in de TER (Toxicity Exposure Ratio: de  $LD_{50}$  gedeeld door de verwachte dosis). Hoe hoger de TER (door lage giftigheid = hoge  $LD_{50}$ , of door lage blootstelling = verwachte dosis), des te kleiner is het risico. Een TER groter dan 10 wordt als geen risico bestempeld (OEPP/EPPO, 2010). Bij een TER < 10 is er een risico en wordt altijd een veldstudie gevraagd in het kader van de toelating.

Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat via nectar van zonnebloemen bijen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. De TER was 6. Via stuifmeel van mais bleef de blootstelling veel verder verwijderd van toxische doses (TER = 168). Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, en nog slechts van een paar plantensoorten, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker-/energieconsumptie voor haalbijen de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

Resultaat (zie voor meer detail over de berekeningen hoofdstuk 3.3 en de tabellen 5 en 6)

Uit de berekeningen blijkt dat via opname uit nectar (Tabel 5) door nectarfoerageersters alleen voor imidacloprid en clothianidin de TER onder de 10 is (de studies betroffen zonnebloem (imidacloprid) en koolzaad (clothianidin), beide toepassingen niet toegelaten in Nederland), van Nederlandse gewassen hebben we geen gegevens gevonden om een TER mee te berekenen. In deze gevallen met een TER onder de 10 is er op grond van de giftigheid en de dosis reden om veldstudies te doen. Dat wordt dan ook geëist bij de toelating door het Ctgb. Het is waarschijnlijk dat het Ctgb wel gegevens heeft over residuen bij Nederlandse gewassen waaruit een TER is berekend.

Voor stuifmeel (Tabel 6) werd in geen geval een TER lager dan 10 gevonden, terwijl de hoogste concentratie uitschieters uit de literatuur zijn gebruikt. Voor de neonicotinoïden en fipronil geeft blootstelling via de opname via stuifmeel door de voedsterbijen geen risico op sterfte.

Uitgangspunt bij deze berekeningen is dat de gevonden residuconcentraties in nectar en stuifmeel (voornamelijk van zonnebloem, mais en koolzaad) representatief zijn voor veel meer gewassen. Helaas zijn er weinig gegevens in de openbare literatuur om dat te staven. Peer reviewed publicatie van de wel aanwezige gegevens in de toelatingsdossiers zouden deze lacune kunnen opvullen.

## Conclusie

In deze worst case benadering (gebaseerd op maximaal ingeschatte gebruik door bijen, en uitgaande van volledige afhankelijkheid van verontreinigde nectar of stuifmeel) ontstaat geen risico voor acute toxiciteit via blootstelling door stuifmeel. De gevonden concentraties zijn dusdanig dat steeds een TER > 10 wordt gevonden, en derhalve zelfs veldstudies overbodig zijn.

Langdurige blootstelling via nectar zou, bij 100% afhankelijkheid van de verontreinigde nectar, voor nectarfoerageersters mogelijk een risico op sterfte opleveren bij imidacloprid (zonnebloem) en clothianidin (koolzaad). Beide toepassingen zijn niet toegelaten in Nederland, waardoor dit concrete risico hier niet relevant is. Het risico zou relevant kunnen zijn als de gevonden concentraties in nectar van koolzaad en zonnebloem representatief zijn voor nectar van andere plantensoorten, en bij die bloeiende plantensoorten neonicotinoïden imidacloprid of clothianidin toegelaten zijn. Zaadbehandeling van bloeiende gewassen en bespuitingen vlak voor of tijdens de bloei zijn in Nederland niet toegelaten, dus het risico op blootstelling via nectar is hier niet van toepassing. Er zijn in de openbare literatuur weinig gegevens over de aanwezige concentraties residuen in nectar en stuifmeel beschikbaar.

## 1.7 Monitoringen van bijensterfte

Als er sterfte is van bijenvolken maar geen concrete aanwijzing waardoor dat komt, kan een monitoring gebruikt worden om te kijken waarmee de sterfte correleert. Hoe meer factoren zijn meegenomen in een dergelijke monitoring hoe groter de kans om een verband te vinden. Monitoronderzoek overtreft de schaal van de veldproeven en vindt plaats op provincie- of landsniveau of zelfs internationaal. Het meten van residuen van middelen in de bijenvolken is dan een pre. Er zijn een paar van dergelijke grote monitoring-studies gedaan: in Frankrijk, in Duitsland

en in Noord Amerika. Uit monitoringen kunnen ook aanwijzingen komen voor heel andere oorzaken dan de pesticiden, mits die andere gegevens zijn geregistreerd. Dat werd uitgebreid gedaan in de Franse en Duitse studies. In de genoemde monitoring studies werden heel veel stoffen teruggevonden, op bijen, in was, in stuifmeelvoorraden (bijenbrood) en in honing, waaronder fungiciden en insecticiden gebruikt in de landbouw, maar vooral ook hoge concentraties aan acariciden<sup>7</sup> toegepast door de bijenhouders ter bestrijding van de varroamijt en de tracheemijt (Amerika). Neonicotinoïden werden af en toe aangetroffen in de bijenvolken, meestal in lage concentraties. Er werd echter geen verband gevonden tussen aangetroffen residuen (in het algemeen en ook specifiek voor neonicotinoïden) en sterfte van volken. Dus volken met residuen hadden niet meer sterfte dan volken zonder (of met weinig) residuen. Dat kan betekenen dat de aangetroffen residuen geen meetbare rol spelen bij bijensterfte. Maar het kan ook betekenen dat een eventueel wel aanwezig effect niet is vast te stellen. Opmerkelijk is dat een aantal heel andere factoren wel aantoonbare invloed hadden. In de Franse studie bleek de gezondheidstoestand (ziekten en voeding) van de volken wel met sterfte te correleren. Veel van de bijenstanden met veel sterfte hadden ziekten als Amerikaans vuilbroed, of hadden gebrek aan voer (suiker, honing). De Duitse monitoring vond een verband tussen de sterfte en de mate van varroabesmetting in oktober, de mate van virusprevalentie (DWV en ABPV) in de herfst (de prevalentie van deze virussen is gekoppeld aan de varroabesmetting), de leeftijd van de koningin (oude koninginnen geven meer kans op sterfte van het volk) en met de grootte van het volk bij inwinteren (kleine volken overwinteren slechter). Er was geen verband tussen sterfte van volken in de winter en het eerder (het vorige voorjaar) gefoerageerd hebben op koolzaad geteeld uit met neonicotinoïden gecoat zaad. Hoewel de monitorstudies vaak aanwijzingen geven voor de rol van andere factoren dan neonicotinoïden (en andere stoffen) bij bijensterfte, hoeft dat niet per definitie te betekenen dat neonicotinoïden absoluut geen rol spelen. Als er maar een paar monsters positief zijn is het moeilijk / onmogelijk een statistisch betrouwbaar verband met bijensterfte te vinden. Bovendien zijn de positieve monsters voor neonicotinoïden ook meestal nog met andere residuen verontreinigd. Mocht er dan al een effect van de residuen op sterfte zijn dan is dat nog moeilijk aan een of twee specifieke stoffen toe te wijzen.

## Conclusie

Tot op heden geven monitoringstudies aan dat er geen reden is om de soms aanwezige residuen van neonicotinoïden verantwoordelijk te houden voor bijensterfte. Omdat monitoringsonderzoek complex is en de resultaten vaak niet eenduidig, is die rol echter ook niet met volledige zekerheid uit te sluiten. In de monitoringen werd soms wel een verband tussen sterfte en andere factoren dan blootstelling aan neonicotinoïden aangetoond (ziekten van bijen, besmettingsgraad met parasieten, voeding).

## 1.8 Risicotoetsingschema voor neonicotinoïden

Het nieuwe voorgestelde risk assessment schema (OEPP/EPPO, 2010) is geschikt voor de beoordeling van neonicotinoïden en fipronil, omdat het de mogelijke blootstelling via voedsel (stuifmeel en nectar) mee toetst. Studies in het laboratorium geven aanwijzingen over de effecten van gecontroleerde blootstelling op bijen: mortaliteit, gedrag enz. Conclusies zijn niet direct te vertalen naar het veld: de concentraties waarbij effecten zichtbaar zijn moeten in het veld benaderd worden, anders is het niet relevant. Het is dus nodig in de testen veld-realistische concentraties mee te nemen, zowel in het laboratorium als in het veld. Hetzelfde geldt voor de duur van blootstelling en beoordeling: veldstudies met hele volken moeten tot over de winter worden voortgezet, als conclusies over de langdurige effecten moeten worden getrokken. Micro-volkjes van hommels kunnen een deel van de veld-fase van het onderzoek naar het laboratorium halen, doordat het standaardisering en gecontroleerde foerage mogelijk maakt. Er moet wel meer onderzoek gedaan worden naar residuen in nectar, teneinde de veld-realistische blootstelling (zie boven) vast te stellen en toe te passen in het onderzoek. Zolang niet absoluut zeker is dat een blootstellingsroute veilig is moet die route worden meegenomen in de beoordeling, dat geldt bijv. voor guttatie. Deze wordt nu meegenomen in de beoordeling ondanks het feit dat blootstelling via die route niet waarschijnlijk is.

<sup>7</sup> Acariciden: middel effectief tegen acari: mijten. Door imkers gebruikt tegen varroa-mijten en tracheemijten.

## Conclusie

Het huidige OEPP/EPPO beoordelingsschema schema voldoet voor neonicotinoïden en fipronil. De beoordeling door het Ctgb volgt dat schema. Wij kunnen geen oordeel vellen over de beoordeling door het Ctgb omdat wij geen inzage hebben in de beoordelingsdossiers. De studies in de beoordelingsdossiers zijn niet op kwaliteit getoetst via peer review.

Er zijn leemten in de kennis in de openbare wetenschappelijke literatuur. Dat betekent dat niet op basis van open peer reviewed literatuur te toetsen is of de toelatingen van middelen op juiste data gebaseerd zijn. Het betreft vooral de residuconcentraties in nectar en stuifmeel van andere gewassen dan mais, zonnebloem en koolzaad (in Nederland bijv. open teelt boomkwekerijgewassen, vaste planten en bol- en knolbloementeelt), en het zeer beperkte aantal ruim opgezette veldstudies.

Op grond van het gebruikte schema, en op de rapportage van de herbeoordeling van het Ctgb van 2011 kan worden geconcludeerd dat die gegevens wel voorhanden zijn in de toelatingsdossiers. Deze gegevens zijn echter niet te controleren door buitenstaanders, op basis van de open literatuur, en de onderzoeken zijn niet peer reviewed hetgeen de waarde en betrouwbaarheid vermindert. Daarom is het van belang deze lacune in de openbaar beschikbare literatuur te vullen met nieuw onderzoek dan wel met peer reviewed publicatie van de gegevens uit de toelatingsdossiers door de toelatinghouder.

Wanneer de giftigheid van stoffen daartoe aanleiding geeft blijven goede en uitgebreide veldstudies de laatste en finale toets.

De gestelde hoofdvraag kan als volgt worden beantwoord:

Er is op grond van peer reviewed literatuur geen aanwijzing dat de huidige toegepaste toelatingsbeoordeling belangrijke wetenschappelijke gegevens gemist heeft.

Om beter uitspraken te kunnen doen over de 'indirecte effecten' (sub-letale effecten en interacties) zijn laboratorium- en veldstudies met veldrelevante blootstellingen aan zowel de neonicotinoïden als aan de eventuele indirecte factoren (bijvoorbeeld besmettingsproeven met ziekten) nodig, en proeven waarin binnen dezelfde opzet veld- en laboratoriumonderzoek gecombineerd wordt.





## 2. Inleiding

### 2.1 Sterfte van bijenvolken

De sterfte van bijenvolken wereldwijd houdt de gemoederen al een paar jaar bezig, en een veelheid aan verklaringen wordt aangevoerd. Het wereldwijde onderzoeknetwerk 'Coloss' (<http://coloss.org/>) benadrukt dat veel oorzaken kunnen bijdragen aan de bijensterfte. Waarschijnlijk staan deze oorzaken ook niet los van elkaar (stapeling of interactie van oorzaken) en kunnen ze ook regionaal verschillend zijn. Vorig voorjaar verscheen een overzicht door het United Nations Environment Program (UNEP) dat de zaken op een rij zet, ook voor andere bestuivende insecten dan honingbijen (Kluser *et al.*, 2011). Hoewel onderzoekers van mening kunnen verschillen over de relatieve impact van verschillende factoren heerst consensus dat het een multifactorieel probleem is (Neumann & Carreck, 2010). Lokaal en van tijd tot tijd kan ook de zwaarte van factoren verschillen.

Belangrijke mogelijke oorzaken zijn de parasitaire exotische mijt *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010), verlies van habitat en foerageermogelijkheden (door urbanisatie en schaalvergroting, Decourtye *et al.*, 2010), een gebrek aan kansen en ontwikkelingen in de imkerij (DelaRúa *et al.*, 2009), waardoor de sector vergriest en steeds minder vitaal wordt, en allerlei andere ziekten en parasieten naast varroa en deels gekoppeld aan Varroa (Genersch, 2010). Maar ook milieuverontreiniging en pesticidengebruik worden genoemd als mogelijke oorzaak (Maini *et al.*, 2010). Onder de pesticiden worden de neonicotinoïden het meest verdacht (Decourtye & Devillers, 2010).

### 2.2 Neonicotinoïden en fipronil: systemisch werkende insecticiden

Neonicotinoïden zijn een groep van chemische insecticiden, waarvan de werking gebaseerd is op de werking van nicotine, de plantaardige antivraatstof uit de tabaksplant en andere Solanaceae. Het zijn zenuwgifstoffen, die binden aan de receptoren van de zenuwcellen. Ze blijven daaraan gebonden zitten, zodat deze receptoren permanent onklaar gemaakt zijn. Neonicotinoïden binden vooral aan één soort receptoren, de nicotinerge acetylcholine receptoren, die juist veel bij insecten voorkomen. Daardoor zijn deze stoffen vooral effectief bij insecten, maar niet erg gevaarlijk voor sommige andere diergroepen, inclusief zoogdieren waaronder mensen. De stoffen zijn voor insecten erg giftig en dus al bij heel lage dosering effectief, zodat niet veel middel hoeft te worden ingezet. Bovendien werken de neonicotinoïden systemisch. Dat wil zeggen dat ze door de plant worden opgenomen en in de plant getransporteerd. Ook daardoor kan weer op de hoeveelheid middel worden bespaard: als een middel moet worden gespoten moet vaker worden behandeld, en komt veel middel naast de plant en via 'drift' in het milieu terecht. Deze systemische eigenschappen zijn gunstig uit milieuoverwegingen, maar daar staat tegenover dat sommige neonicotinoïden erg langdurig stabiel (en actief) zijn, en ook in de grond en in water slechts heel langzaam afbreken. Dat is milieutechnisch gezien juist weer minder gunstig.

### 2.3 Literatuuroverzicht over de relatie tussen neonicotinoïden en fipronil en bijen

Het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie (EL&I) heeft aan [bijen@wur.nl](mailto:bijen@wur.nl) van Plant Research Internationaal de opdracht gegeven een overzicht te maken van de relevante peer reviewed literatuur over neonicotinoïden en fipronil in relatie tot bijen. Dit rapport behandelt de effecten van bovengenoemde insecticiden op bijen, zoals bekend uit de openbare peer reviewed literatuur. De gegevens over acute toxiciteit zoals bepaald in laboratorium testen, worden gecombineerd met informatie over blootstellingsroutes en de mate van blootstelling, met gegevens uit (semi-) veldstudies en (grootschalige) monitoringen. Naast de (acuut) letale effecten worden de chronische letale effecten en eventuele sub-letale effecten behandeld.

De informatie in dit rapport dient als aanvulling op de (niet openbare) dossiers die worden/zijn aangeleverd aan het Ctgb in het kader van toelatingen van gewasbeschermingsmiddelen, en die vorig jaar door het Ctgb zijn herbeoordeeld.

### 3. Neonicotinoïden en fipronil en bijen: literatuuroverzicht

*Dit hoofdstuk geeft een overzicht van de resultaten van onderzoek over de effecten van neonicotinoïden en fipronil op bijen.*

*Het eerste sub-hoofdstuk (3.1) beschrijft de **giftigheid** van de middelen voor bijen:*

- *de onmiddellijke giftigheid (3.1.1): bij welke dosis gaat 50% van de bijen dood meteen na toedienen*
- *de chronische giftigheid (3.1.2): bij welke dosis gaan bijen na langdurige blootstelling (alsnog) dood*
- *de sub-letale giftigheid (3.1.3): in hoeverre ondervinden bijen nadelige effecten van concentraties gif waar ze niet aan dood gaan. Dit kunnen effecten zijn op gedrag, voortplanting, ziekteverstand enz.*
- *de giftigheid samen met andere stoffen (3.1.4): in hoeverre wordt de giftigheid versterkt of verminderd door andere middelen*

*Het tweede sub-hoofdstuk (3.2) behandelt de aangetroffen residuen van de middelen in planten, en in de door bijen van planten geogste producten. Dit gaat dus over **blootstelling**.*

*Het derde sub-hoofdstuk (3.3) berekent de daadwerkelijke orale **blootstelling** aan de hand van de voedselbehoefte van bijen gecombineerd met de in 3.2 gevonden **concentraties** in geogste producten, en relateert die aan de **giftigheidsgegevens**. Dit geeft een indicatie van mogelijke risico's voor bijen.*

*Het vierde sub-hoofdstuk (3.4) behandelt de grote **monitoringen** van bijenvolken en bijensterfte in de praktijk: in hoeverre zeggen deze gegevens iets over de oorzaken van bijensterfte en de eventuele rol van neonicotinoïden en fipronil daarin.*

*De grote hoeveelheid data uit de publicaties zijn samengebracht in vier tabellen.*

#### 3.1 Toxiciteit

##### 3.1.1 Acute letale toxiciteit

Mogelijke risico's van pesticiden worden vastgesteld in een stapsgewijze (tiered) benadering. De letale giftigheid wordt bepaald door in laboratoriumtesten de sterfte van bijen te scoren na 24 tot 48 uur na blootstelling aan een concentratiereeks van een middel, zowel via contact met het gif als via orale blootstelling. Hiermee wordt een mediane letale dosis of concentratie vastgesteld (LD<sub>50</sub> of LC<sub>50</sub>). In de tabellen zijn de in de literatuur gerapporteerde LD<sub>50</sub> en LC<sub>50</sub> waarden samengevat voor imidacloprid (tabel 2) en de andere neonicotinoïden + metabolieten van de stoffen (tabel 3). Het blijkt dat:

1. De giftigheid hangt af van de blootstellingsroute, contact blootstelling is minder giftig dan orale blootstelling. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat er grote variatie in de LD<sub>50</sub> is tussen verschillende onderzoeken (Decourtye en Devillers, 2010; Laurino *et al.*, 2011). Als het opgenomen gif effect heeft op de trophallaxis (het aan elkaar doorgeven van voedsel door honingbijen) kunnen verschillende individuen in een laboratoriumtest een verschillende dosis binnen krijgen. Bovendien kunnen hoge doses imidacloprid de opname van de (suiker-) oplossing door de bijen verminderen (Nauen *et al.*, 2001).
2. Bij vergelijking van de stoffen blijkt dat via contactblootstelling de nitro-groep bevattende neonicotinoïden (dat zijn imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, nitenpyram en dinotefuran) veel giftiger zijn dan de Cyano-groep bevattende neonicotinoïden (dat zijn acetamiprid en thiacloprid) (Iwasa *et al.*, 2004; Laurino *et al.*, 2011). Ook voor hommels (*Bombus terrestris*) bleken imidacloprid en thiamethoxam net zo giftig te zijn als voor honingbijen (Mommaerts *et al.*, 2010). De lagere toxiciteit van de cyano-groep neonicotinoïden wordt verklaard door het bestaan van verschillende subtypen nAcetylCholineReceptoren (nAChR), waarvan sommige niet worden

geblokkeerd door deze groep neonicotinoïden (Jones *et al.*, 2006), en door de snelle biotransformatie van deze groep (Suchail *et al.*, 2004a; Brunet *et al.*, 2005). Bij contact applicatie (LD<sub>50</sub> na 24 uur) werd de giftigheid van de stoffen door Iwasa *et al.* (2004) als volgt gerangschikt: voor de nitro groep: imidacloprid (18 ng/bij) > clothianidin (22 ng/bij) > thiamethoxam (30 ng/bij) > dinotefuran (75 ng/bij) > nitenpyram (138 ng/bij); en voor de cyano-groep: acetamiprid (7 µg/bij) > thiacloprid (15 µg/bij). Fonicamid volgt ver achter de minst giftige met een LD<sub>50</sub> van 51,1 mg/bij (gegevens Ctgb).

Fipronil sluit aan bij de giftigste uit de groep (LD<sub>50</sub> contact blootstelling, met 13 ng/bij, Mayer *et al.*, 1999). Ook de enantiomeren<sup>8</sup> van fipronil bleken giftig, LD<sub>50</sub> van 3,4 ng/bij na 48 u (Li *et al.*, 2010).

3. De metabolieten van neonicotinoïden dragen bij aan de giftigheid (Tabel 3, Nauen *et al.*, 2001, 2003; Suchail *et al.*, 2001; Decourtye *et al.*, 2003), behalve bij acetamiprid omdat hier geen van de metabolieten giftig was (Iwasa *et al.*, 2004). Tot dusver zijn de meeste gegevens bekend over de metabolieten van imidacloprid: die met een nitroguanidine groep (oleofine, hydroxy- en dihydroxy-imidacloprid) waren giftiger (orale LD50) dan de urea-metabooliet en 6-chloornicotinezuur (Nauen *et al.*, 2001). De metabooliet van thiamethoxam, clothianidin (ook apart als neonicotinoïde actieve stof op de markt) is erg giftig voor bijen (Nauen *et al.*, 2003).
4. Voor imidacloprid varieerde de giftigheid met insect-gerelateerde factoren zoals de leeftijd van de bij, met het volk, met de gebruikte ondersoort van *Apis mellifera* (Suchail *et al.*, 2000, 2001; Nauen *et al.*, 2001; Guez *et al.*, 2003) en met de gezondheid van de bijen: suboptimale eiwitvoeding (Wehling *et al.*, 2009) en een besmetting in het laboratorium met *Nosema ceranae* (Alaux *et al.*, 2010). Stark *et al.* (1995) zagen geen effect van het genus van de bijen, ze vonden dezelfde contact LD<sub>50</sub> in sociale bijen (*A. mellifera*) en solitaire bijen (*Megachile rotundata*, *Nomia melanderi*, Tabel 2). Vergelijkbare conclusies werden getrokken voor thiamethoxam met een contact LD<sub>50</sub> van 30 ng/bij voor *A. mellifera* en 33 ng/bij voor *Bombus terrestris* (Iwasa *et al.*, 2004; Mommaerts *et al.*, 2010). In onderzoek van Scott-Dupree *et al.*, (2009) waren bij contact blootstelling hommels (*Bombus impatiens*) echter iets minder gevoelig dan *Osmia lignaria* en *Megachile rotundata*.

Onlangs werd aangetoond dat bijen blootgesteld kunnen worden aan neonicotinoïden via de guttatie van planten gekweekt uit behandelde zaden. Guttatievloeistof van uit behandelde zaden binnen opgekweekte maisplanten bleek zeer giftig voor bijen in voerexperimenten (al dan niet aangezoet) in het laboratorium (Girolami *et al.*, 2009). Het is echter de vraag of bijen in het veld gebruik maken van guttatievloeistof, tot dusver zijn daar geen aanwijzingen voor gevonden (Thompson, 2010). Daarentegen veroorzaakte directe blootstelling aan stof van de zaaimachines hoge mortaliteit (Marzaro *et al.*, 2011). In die experimenten bereikten residuniveaus van clothianidin in dode bijen gemiddeld 279±142 ng/bij bij hoge luchtvochtigheid en 514±174 ng/bij bij lage luchtvochtigheid. Deze getallen overtreffen vele malen de LD<sub>50</sub> van 21.8 ng/bij. Vergelijkbare resultaten werden ook gevonden door Girolami *et al.* (2011), die bijen blootstelden aan het stof van met clothianidin en imidacloprid behandelde zaden. In hun studie trad de mortaliteit van de honingbijen alleen op bij hoge luchtvochtigheid. Guttatievloeistof en dauw van planten op omringende akkers van velden waar met gecoat zaden werd gezaaid in de proeven van Marzaro *et al.* (2011) veroorzaakte na drinken door bijen geen mortaliteit.

### 3.1.2 Chronische letale toxiciteit

Chronische orale/contact blootstelling gedurende 10 dagen aan 1 µg/bij acetamiprid en 1 ng/bij thiamethoxam gaf geen significante mortaliteit bij bijen werksters (Aliouane *et al.*, 2009). Laboratorium tests met imidacloprid toonden hoge verliezen aan werksters als ze verontreinigd stuifmeel (40µg/kg) aten (Decourtye *et al.*, 2001, 2003) of suikerwater (0.1, 1.0 en 10 µg/l) (Suchail *et al.*, 2001). Deze resultaten waren strijdig met veldstudies. Schmuck *et al.* (2001) rapporteerden geen toegenomen mortaliteit van werksters van kleine volkjes (500 bijen) in tunnelexperimenten, wanneer de volkjes 39 dagen werden blootgesteld aan zonnebloemnectar waaraan imidacloprid was toegevoegd in een range van 2.0-20 µg/kg. Ook Faucon *et al.* (2005) en Cresswell (2011) concludeerden dat orale blootstelling aan voedsel gecontamineerd met imidacloprid in realistische veldconcentraties geen mortaliteit van werksters veroorzaakte. Een mogelijke verklaring voor deze discrepantie tussen laboratorium en veldstudies kunnen verschillen in methodologie zijn. Het toxische effect van een stof op een individuele bij kan worden beïnvloed door de initiële fysiologische toestand, en door de levensduur van nest genoten (Decourtye & Devillers, 2010).

<sup>8</sup> Enantiomeer: een van twee isomeren van een molecuul dat in twee gespiegelde vormen voorkomt.

Bovendien moet de sociale interactie tussen de bijen in het oog worden gehouden bij langdurige blootstelling van honingbijen. Bij hommels kan de chronische toxiciteit van stoffen (blootstelling tot wel 11 weken) worden vastgesteld door onderzoek met microvolkjes (Mommaerts and Smagghe, 2011). Microvolkjes zijn nesten gemaakt van met drie tot vijf net geboren werksters. Na een week wordt in zo'n volkje één werkster dominant zoals de koningin in normale grote volken, en begint met het leggen van onbevuchte eitjes die zich ontwikkelen tot mannetjes. De andere werksters zorgen voor het broed en foerageren voor voedsel. De dominante werkster functioneert als een pseudo-koningin, de andere gewoon als broedverzorgsters en foerageersters. Het voedsel bestaat uit commercieel suikerwater en stuifmeel. Hiermee kan het effect van neonicotinoïden via verschillende blootstellingsroutes worden onderzocht: contact blootstelling zowel als orale blootstelling via het drinken van behandeld suikerwater of het eten van behandeld stuifmeel, gedurende een periode van 7 weken. Andere voordelen van dit systeem zijn de lage kosten, het gemakkelijke gebruik, de mogelijkheid om met standaard protocollen te werken en het grote aantal herhalingen, wat resulteert in voldoende statistische power om significante resultaten te bereiken. De experimentele opzet laat het ook toe om sociale interactie tussen de dieren plaats te laten vinden. Letale effecten worden beoordeeld door het aantal dode werksters per nest te scoren, terwijl sub-letale effecten worden beoordeeld door de aanwezigheid (en aantal) honingpotten, het aantal dode larven en het aantal geproduceerde mannetjes per nest te scoren (Mommaerts *et al.*, 2006a,b; Besard *et al.*, 2011). Gebaseerd op de laatste eindpunten konden Mommaerts *et al.* (2010) vaststellen dat de NOEC waarden voor imidacloprid vastgesteld met deze microvolkjes gelijk was aan die gevonden met behulp van normale volken met een koningin in een test in de kas.

### 3.1.3 Sub-letale effecten

#### Reproductie

Een belangrijke voorwaarde om het verdere voortbestaan van een volk te verzekeren is broedproductie. Het verlies van broed zou daarom wel nadeliger kunnen zijn dan het verlies van een aantal oudere werksters (haalbijen) (Decourtye en Devillers, 2010). Dit wordt ook ondersteund door studies naar de verdeling van taken in bijenvolken. Bijvoorbeeld bij hommels (*Bombus impatiens*) is de taakverdeling een dynamisch proces. Ze hebben maar een beperkte taakspecialisatie waardoor werksters verschillende taken uitvoeren tijdens hun leven (Jandt *et al.*, 2009). Daardoor is het bijvoorbeeld niet vreemd als foerageersters worden vervangen door andere werksters als er voldoende voedsel bij aanwezig zijn. Een paar studies hebben een negatief effect laten zien op de larvale ontwikkeling na blootstelling van volkjes aan imidacloprid (Tasei *et al.*, 2001a,b; Decourtye *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2008). Decourtye *et al.* (2005) rapporteerden een verlengde ontwikkeltijd van honingbijlarven tot adult als ze gevoed werden met voedsel dat was verontreinigd met 5 µg/kg imidacloprid. Vergelijkbare waarnemingen werden gedaan door Abbott *et al.* (2008) voor *Osmia lignaria* wanneer imidacloprid was gedoseerd met 30-300 µg/kg voedsel. Ook bij hommels (*B. terrestris*) werd een reductie van het broed (larven) gezien als microvolkjes oraal werden blootgesteld aan suikerwater met 10 µg/kg imidacloprid plus stuifmeel met 6 µg/kg imidacloprid (Tasei *et al.*, 2001a,b).

#### Gedrag

Sub-letale effecten die het proces van voedsel verzamelen en vervolgens het sociale verband in het volk, en daarmee ook de bestuiving van planten beïnvloeden moeten onderzocht worden (Thomspon en Maus, 2007; Desneux *et al.*, 2007; Mommaerts en Smagghe, 2011). De afgelopen jaren zijn diverse laboratorium- en veldtesten ontwikkeld waarmee het effect van neonicotinoïde insecticiden op motorische en sensorische functies kunnen worden onderzocht in verband met de foerageercapaciteit van bijen.

Neonicotinoïden werken als neurotoxische stoffen die ingrijpen op de receptoren van het zenuwstelsel en beïnvloeden daarmee de mobiliteit van de bijen door symptomen als verstarring, trillen, ongecoördineerde bewegingen, hyperactiviteit en beven (Lambin *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2001; Suchail *et al.*, 2001; Medrzycki *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004). Deze symptomen zijn gemakkelijk waar te nemen bij hoge blootstelling. Bij lagere concentraties zijn de effecten minder goed waarneembaar. El Hassani *et al.* (2005) hebben daarom een nieuwe laboratoriumtest ontwikkeld, bestaand uit een plastic doos met een transparante verlichte plaat, waarop het mogelijk is de verplaatsing van de bijen vast te stellen. Een contact blootstelling aan imidacloprid van 1.25 ng/bijen aan acetamiprid van ≤0.5 µg/bij stimuleerde de bewegingsactiviteit van de bijen, terwijl imidacloprid bij 2.5 ng/bij juist

de bewegingsactiviteit significant remde (Lambin *et al.*, 2001). Er werden geen significante effecten op de bewegingsactiviteit gevonden na acute en chronische (11 dagen) orale blootstelling aan 0.1 µg/bij acetamiprid en na acute blootstelling (contact en oraal) aan 1 ng/bij thiamethoxam (El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Een ander gedrag dat wordt beïnvloed door neonicotinoïden (acetamiprid en thiamethoxam) is de proboscis extension reflex (PER; het uitsteken van de proboscis na stimulatie van de antennen met suikerwater), na de perceptie van suiker en water (El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Het effect bleek afhankelijk te zijn van de route, de tijdsperiode en de dosis van blootstelling (El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Bovendien kon in diverse studies, na conditioneren van de respons met een geurstof, een verandering van het leren van geuren worden aangetoond na blootstelling aan neonicotinoïden. Het leren was verslechterd na chronische (tot 11 dagen) blootstelling aan imidacloprid (winter bijen: 48 µg/kg; oraal), aan de metaboliet 5-hydroxy-imidacloprid (winter bijen: 120 µg/kg; oraal) en thiamethoxam (0.1 ng/bij; contact) (Decourtye *et al.*, 2003; El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Door de PER test uit te breiden werd ook informatie verkregen over hoe neonicotinoïden met het geheugen interfereren. Orale opname van 0.1 µg/bij acetamiprid induceerde lange-termijn geheugen verliezen, terwijl chronisch contact met 1 ng/bij thiamethoxam (komt overeen met 1/5 van de LD<sub>50</sub>) geen lange termijn effecten veroorzaakte, want na 48 uur werd een herstel van het geheugen waargenomen (El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Voor imidacloprid werd door diverse auteurs gerapporteerd over middellange termijngeheugen effecten (Tabel 2) (Decourtye *et al.*, 2001, 2003, 2004a; Lambin *et al.*, 2001). Decourtye *et al.* (2004b) gaven aan dat zulke effecten een gevolg zouden zijn van een toegenomen cytochroom oxidase activiteit, in verband met beïnvloeding van het metabolisme in de 'mushroom bodies' in de hersenen. Het effect van imidacloprid op de gewenning bij de PER hing af van de leeftijd van de geteste bijen en dus van hun taak in het volk (Guez *et al.*, 2001a,b). Hoewel het duidelijk is dat neonicotinoïden het proces van het leren van geuren op diverse manieren kunnen beïnvloeden, is het moeilijk om deze laboratoriumeffecten rechtstreeks naar de werkelijke situatie in het veld te vertalen of te extrapoleren.

Neurotoxische stoffen zoals neonicotinoïden kunnen ook interfereren met oriëntatie processen van honingbijen. Associatief leren van een zichtbare markering via een beloning (suiker oplossing) in een complex labyrint liet zien dat slechts 38% van de bijen de voedselbron vonden na orale inname van 3 ng/bij thiamethoxam, vergeleken met 61% in de controle groep (Decourtye en Devillers, 2010). In een onderzoek met gemarkeerde foerageersters die eerst waren getraind om op een voedertafel te foerageren, zagen Bortolotti *et al.* (2003) dat een afstand van 500 m tussen de kast en de voedertafel resulteerde in geen foerageersters bij de kast / voedertafel tot wel 24 uur na behandeling, waarbij foerageersters waren gevoerd met imidacloprid in een concentratie van 500 en 1000 µg/l (Tabel 4). Deze auteurs vonden ook dat een lagere concentratie (100 µg/l imidacloprid) een verlengde terugkeertijd veroorzaakte naar de kast of de voedertafel. Dit werd bevestigd door onderzoek van Ramirez-Romero *et al.* (2005) en Yang *et al.* (2008). Gebaseerd op deze resultaten is het duidelijk dat neonicotinoïden bij dergelijke concentraties de foerageer capaciteiten van de bijen beïnvloeden. Echter de verschillende (semi-)veldstudies leveren samen een geschakeerd palet van resultaten. Cutler en Scott-Dupree (2007) rapporteerden bijvoorbeeld geen effecten op het foerageren van honingbijen van volken die waren blootgesteld aan bloeiend koolzaad gekweekt van met clothianidin gebeitste zaden. Dezelfde conclusie werd getrokken voor imidacloprid (Schmuck *et al.*, 2001; Faucon *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2009), maar voor thiacloprid was het foerageren tot 48 uur na behandeling enigszins verminderd (Schmuck *et al.*, 2003). Ook was er geen negatief effect op het foerageren van *Bombus terrestris* op met imidacloprid en thiamethoxam behandelde planten (Colombo en Buonocore, 1997; Tasei *et al.*, 2001b; Alarcón *et al.*, 2005), en ook geen negatieve effecten op *Bombus impatiens* blootgesteld aan kruidengrasland behandeld met imidacloprid via bevloeiing, noch wanneer deze hommels werden blootgesteld aan in het veld gevonden concentraties imidacloprid, en aan het hoogste gemeten residu niveau van clothianidin in pollen (6 µg/kg) (Gels *et al.*, 2002; Morandin & Winston, 2003; Franklin *et al.*, 2004). Er moet wel worden opgemerkt dat de *Bombus impatiens* volkjes die foerageerden op niet geïrrigeerd maar wel met imidacloprid behandeld onkruid een significant verminderde nestontwikkeling hadden (aantal broed kamers, honingpotten en biomassa aan werksters) en een verminderde foerageeractiviteit (Gels *et al.*, 2002).

Uit de voorgaande waarnemingen wordt duidelijk dat er soms een discrepantie bestaat tussen veld- en laboratoriumtesten van sub-letale effecten. Decourtye & Devillers (2010) geven aan dat dit wordt veroorzaakt doordat bijen in staat zijn hun gedrag aan te passen als ze blootstelling aan een pesticide opmerken. Mogelijk berust de werking van het natuurlijke 'insecticide' oftewel antivraatstof nicotine in tabaksplanten ook op deze vermijding: 30 µM nicotine (= 3,8 mg/L) verminderde de opname van suikerwater door bijen (Köhler *et al.*, 2012). Inderdaad weigerden honingbijen een saccharose oplossing met 20 µg/l imidacloprid, wat resulteerde in een sterke reductie

van de foerageeractiviteit (Mayer & Lunden, 1997; Kirchner, 1999; Schmuck, 1999, Maus *et al.*, 2003). Dit beschermende vermijdingsgedrag van bijen van verontreinigd voedsel zou het risico op blootstelling aan en negatieve effecten van pesticiden kunnen verminderen. Dergelijk gedrag zou echter ook kunnen bijdragen aan een verminderde algehele fitness (door bijvoorbeeld verminderde foerageeropbrengst) zoals door Cresswell (2011) werd afgeleid uit statistisch gefitte 'performance' gegevens: de berekende afname bij veld-realistische concentraties (tot 0,4 ng imidacloprid /bij via contactdosering of tot 10 µg/L via chronische orale dosering) beliep 6 tot 20%.

## **Interactie van neonicotinoïden en fipronil met de gezondheid van bijen en weerstand tegen ziekten**

In de publieke en populaire pers wordt vaak gerept over de effecten die sub-letale doses van neonicotinoïden en fipronil zouden hebben op de weerstand tegen ziekten van honingbijen. Het is goed voorstelbaar dat bijen die verzwakt zijn door een sub-letale dosis van een middel, minder weerstand tegen een ziekte hebben. De voorbeelden *Nosema* en *Varroa* worden vaak genoemd. Andersom kan het net zo goed gebeuren dat een bij die een ziekte onder de leden heeft gevoeliger is voor een bepaalde dosis van een gewasbeschermingsmiddel.

Slechts in een enkele studie hebben we aanwijzingen voor interacties tussen de blootstelling aan neonicotinoïden en fipronil en andere factoren zoals ziekteverweerstand aangetroffen. Een goede laboratoriumstudie van Alaux *et al.*, (2010), toonde aan dat chronisch aangeboden lage concentraties (0,7, 7 en 70 µg/kg) imidacloprid een lagere levensverwachting van bijen veroorzaken. Besmetting van de bijen met *Nosema ceranae* gaf een vergelijkbare verlaagde levensverwachting. De combinatie van besmetting met *Nosema* en blootstelling aan imidacloprid resulteerde in een optelling van beide effecten: de bijen leefden navenant korter. Wanneer werd gekeken hoe snel *Nosema* zich ontwikkelde in al dan niet aan imidacloprid blootgestelde bijen (concentratie niet genoemd door auteurs) dan bleek echter dat *Nosema* niet werd bevorderd door imidacloprid, maar juist iets geremd. Dus verminderde weerstand tegen *Nosema* werd niet aangetoond, en een interactie ook niet. In een vergelijkbare laboratoriumstudie zagen Vidau *et al.* (2011) interacties van fipronil (fipronil verlaagde de sporenontwikkeling) en thiacloprid (thiacloprid verhoogde de sporenontwikkeling) met *Nosema ceranae*. Ook toonde hun studie een meer dan additief effect: de sterfte van bijen met de combinatie van fipronil en *Nosema* was hoger dan de sterfte met *Nosema* opgeteld bij de sterfte met fipronil. Hier was dus wel sprake van interactie. Het is overigens de vraag of infectie-experimenten met *Nosema* in het laboratorium relevante gegevens over levensduur van besmette bijen opleveren (Fries, 2010), gezien de onnatuurlijk hoge kunstmatige besmetting, en de van nature hoge sterfte van bijen in kooitjes in het laboratorium.

In een studie van Wehling *et al.* (2009) en Von Der Ohe & Janke (2009) bleek in het laboratorium dat bijen die minder gezond zijn, in dit geval door ze op een eiwitarm dieet te zetten, gevoeliger zijn voor imidacloprid.

Studies die in het veld aantonen dat door blootstelling de weerstand vermindert zijn er nog niet. De chronisch aan imidacloprid (0,5 en 5 µg/l in suikeroplossing) blootgestelde bijenvolken van Faucon *et al.* (2005) bleken niet meer ziekten te hebben. Het is overigens niet per definitie logisch dat een ziekteverwekker vooral verzwakte organismen zou infecteren: een ziekteverwekker is veeleer gebaat bij een gezonde sterke gastheer, om zich goed te verspreiden. Het is natuurlijk wel mogelijk dat een verzwakte gastheer eerder bezwijkt aan een infectie.

Wu *et al.* (2011) lieten zien dat larven trager ontwikkelden in raten met veel residuen, waaronder neonicotinoïden, en onlangs verscheen een article in press (Wu *et al.*, 2012) waar bleek dat in zulke raten opgegroeide larven later als volwassen bijen een hogere besmetting met *Nosema* ontwikkelden. In deze laatste raten werden echter geen neonicotinoïden vastgesteld.

Een uitzondering is een zeer recente studie van Pettis *et al.* (2012), die de ontwikkeling van *Nosema* volgden in jonge bijen in het laboratorium, na infectie met  $3 \times 10^5$  sporen per bij. Zij vergeleken daarbij jonge bijen die waren opgekweekt in bijenvolken die chronisch waren blootgesteld aan 0 (controle) 5 en 20 µg/kg imidacloprid, toegediend via eiwitvoedingssupplement (deeg). Het bleek dat jonge bijen uit de blootgestelde volken vatbaarder waren voor *Nosema*, ze ontwikkelden in het laboratorium hogere aantallen sporen in de 10 dagen na infectie dan controle bijen. In de intacte volken werd echter geen enkel effect gevonden, en de auteurs vragen zich ook af hoe de laboratoriumresultaten zich laten vertalen naar het veld. Zowel de dosering van 5 als 20 µg/kg is hoger dan wat in stuifmeel wordt aangetroffen.

## Effect op de overwintering van bijenvolken

De laatste jaren is er in veel landen een sterfte van bijenvolken in de winter. Hoewel de exacte redenen voor deze sterfte niet gemakkelijk te achterhalen zijn wordt ook de chronische blootstelling aan pesticiden als een van de veroorzakers van een verminderde gezondheid van bijenvolken aangevoerd. Voor neonicotinoïden zijn slechts twee studies hier over verricht. Faucon *et al.* (2005) lieten zien dat chronische blootstelling van 8 bijenvolken aan 0.5 en 5.0 µg/l imidacloprid in saccharose siroop (gedurende 33 dagen in de zomer) geen effect had op de overwintering van de volken. Op vergelijkbare wijze was de voorjaarsontwikkeling (broed, werkster biomassa en de gezondheid van het volk) niet aangetast in overwinterde volken die de vorige zomer hadden gevoerd op koolzaad gekweekt uit zaad dat was behandeld met 0.4 mg/kg clothianidin (de hoogst aanbevolen concentratie)(Cutler & Scott-Dupree, 2007). Concluderend: deze studies lieten geen lange termijn effecten zien bij honingbijenvolken van blootstelling aan veld-relevante concentraties neonicotinoïden.

### 3.1.4 Mengseltoxiciteit

Hier worden onderzoeken behandeld waarin synergistische effecten zijn gevonden wanneer organismen werden blootgesteld aan mengsels van stoffen die neonicotinoïden bevatten. Helaas is er maar één studie beschikbaar die effecten van mengsels laat zien op bestuivende insecten, en dan nog alleen op de honingbij. Iwasa *et al.* (2004) vond dat de toevoeging van piperonyl butoxide en de fungiciden triflumizole en propiconazole de acute giftigheid (24 –uur LD<sub>50</sub> contact applicatie) voor honingbijen verhoogde van acetamiprid (met resp. een factor 6, 244 en 105), en van thiacloprid (met resp. een factor 154, 1141 en 559), maar weinig effect had op de giftigheid van imidacloprid (1,5 tot 1,9 keer giftiger). De giftigheid van acetamiprid werd 6,3 – 84 keer sterker door de fungiciden triadimefon, epoxiconazole en uniconazole-P. Al deze synergistische stoffen werden toegepast via contact applicatie met een dosering van 10 µg/bij 1 uur voor de applicatie van de neonicotinoïden (Iwasa *et al.*, 2004).

Voor bijen zijn geen andere voorbeelden van mengseltoxiciteit in de literatuur gevonden. Voor andere organismen zijn wel voorbeelden gevonden maar die laten we hier buiten beschouwing. Het is moeilijk te voorspellen of synergistische effecten in de praktijk optreden omdat er weinig gegevens zijn over de reële blootstellingen. Wel staat vast dat bijen aan een veelheid van pesticiden kunnen worden blootgesteld, zoals bleek uit de monitoringstudies (Mullin *et al.* (2010), Genersch *et al.* (2010), Bernal *et al.* (2010) en Chauzat *et al.* (2006, 2009, 2011). waaruit de aanwezigheid van mengsels van verschillende pesticiden in door bijen verzamelde en geproduceerde producten zoals stuifmeel (en bijenbrood), honing en was gebleken is. Die gegevens lenen zich echter niet voor een kwantitatieve risicoanalyse voor mogelijke mengseleffecten.

## 3.2 Concentraties en metabolisme van neonicotinoïde insecticiden in planten en bijen in relatie tot de toepassing

*In 3.2.1 wordt beschreven welke residuen van de neonicotinoïden en fipronil via de opname van planten terecht komen in voor bijen mogelijk aantrekkelijke producten: nectar, stuifmeel en guttatievloeistof.*

*In 3.2.2 worden de in de bijenkast in stuifmeel (bijenbrood) honing en bijenwas en op bijen zelf aangetroffen concentraties behandeld. Als ze worden aangetroffen is met redelijke zekerheid blootstelling van de bijen aan de orde.*

*De data behandeld in Hoofdstuk 3.2 zijn verzameld in Tabel 1.*

### 3.2.1 Translocatie van residuen in planten, nectar en stuifmeel

Verschillende studies hebben de translocatie van imidacloprid vanuit zaadbehandeling naar verschillende onderdelen van zonnebloemen (*Helianthus annuus*) onderzocht. In een kas-experiment vonden Schmuck *et al.* (2001) in



zonnebloemen behandeld met 0.7 mg <sup>14</sup>C-imidacloprid per zaadje (Gaucho WS; 700 g/kg) een gemiddeld gehalte aan imidacloprid van 3.9±1.0 µg/kg stuifmeel en 1.9±1.0 µg/kg in nectar. In nectar was alleen imidacloprid aanwezig, terwijl in pollen 85% van de residuen aanwezig was als imidacloprid; er werden geen metabolieten gedetecteerd. In een veldstudie werd bij een dosering van 1mg per zaad (dat is 30% hoger dan de geadviseerde dosering) geen imidacloprid teruggevonden in nectar, stuifmeel of honingbijen, terwijl in de bladeren van de zonnebloemen 7 µg/kg imidacloprid en 5 µg/kg van de hydroxy-metabooliet werd gemeten (Schmuck *et al.*, 2001). Slechts 5% van de <sup>14</sup>C-imidacloprid dosis (1 mg per zaad) was opgenomen door van het zaad gedurende vier weken groei van het zonnebloemplantje in een groeikamer, bij bloei werd geschat dat 90% nog in de bodem aanwezig was. In de bladeren werd vooral imidacloprid gevonden (ongeveer 50% van het totaal <sup>14</sup>C) samen met drie metabolieten (30-50% van het <sup>14</sup>C). Imidacloprid concentraties namen af van de eerste bladeren naar de topbladeren; niveaus in stuifmeel waren <0.5-36 µg/kg (Laurent & Rathahao, 2003). De imidaclopridgehalten in zonnebloemplanten namen in de tijd af, tot het moment dat het bloemhoofd werd gevormd, daarna namen ze weer toe. Imidacloprid concentraties in planten verschilden tussen zonnebloem cultivars, met gemiddelde gehalten in de bloemen van 5 tot 10 µg/kg (Bonmatin *et al.*, 2003). In de bovengenoemde veldstudie werden ook zonnebloemen verbouwd op gronden die in de jaren daarvoor een imidaclopridbehandeling hadden gehad en nog <2 tot 18 µg/kg imidacloprid bevatten. De zonnebloemen kregen geen imidaclopridbehandeling. Er werd geen imidacloprid gevonden in pollen en nectar, en ook niet in bijen die gedurende 2-3 dagen konden foerageren op de zonnebloemen (detectiegrens 1.5 µg/kg) (Schmuck *et al.*, 2001).

Bonmatin *et al.* (2003) onderzochten maïs- en zonnebloemmonsters op imidacloprid. Alle gewassen hadden een zaadbehandeling ontvangen. In 58% van de pollenmonsters werd imidacloprid aangetroffen, met een gemiddeld gehalte van 3 µg/kg (range 1-11 µg/kg) in zonnebloemen en 3.5 µg/kg in het stuifmeel van maïs. Wanneer deze gewassen het volgende jaar opnieuw op dezelfde grond werden verbouwd (zonder zaadbehandeling; gemiddeld nog 6 µg/kg in de grond) werd geen imidacloprid in het pollen aangetroffen (< 1 µg/kg) (Charvet *et al.*, 2004).

Girolami *et al.* (2009) vonden dat een deel van het imidacloprid dat door de maïskiemplant was opgenomen via zogenaamde guttatievloeistof (druppels aan de bladranden en top) kan worden uitgescheiden. Uitscheiding van guttatievloeistof is beperkt tot de eerste drie weken na kiemen (Girolami *et al.*, 2009; Thompson, 2010) en is sterk afhankelijk van (lucht-) vochtigheid, temperatuur, groeistadium, waterstress, bewortelingsdiepte en de waterpotentiaal van de bodem (Tapparo *et al.*, 2011). Tijdens de eerste drie weken na kieming kunnen de imidacloprid concentratie erg hoog zijn. Via een zaadbehandeling met 0.5 mg per zaad (Gaucho 350 FS), varieerden de imidacloprid concentraties in de guttatievloeistof van planten opgekweekt in het laboratorium 47±9.9 tot 83.8±14.1 mg/l (Girolami *et al.*, 2009). Vergelijkbare concentraties van residuen van clothianidin (23.3±4.2 mg/l van planten behandeld met 1.25 mg per zaad als Poncho) en thiamethoxam (11.9±3.32 mg/l; 1 mg per zaad als Cruiser 350 FS) werden gevonden in de guttatievloeistof (Girolami *et al.*, 2009). Tapparo *et al.* (2011) beschreven een afname van imidacloprid concentraties in guttatievloeistof van maïsplanten met een dosering van 0.5 mg per zaad (Gaucho) en gekweekt in de kas, van 80.1 mg/l na 1 dag tot 17.3 mg/l na 8-10 dagen, maar de concentraties namen weer toe tot 60.1 mg/l in de volgende tien dagen. Bij een dosering van 1.25 mg per zaad, varieerden de imidacloprid concentraties in guttatievloeistof die werden verzameld van de toppen van de bladeren tijdens de eerste zes dagen na kieming van 103 tot 346 mg/l, terwijl in het 'bekertje' gevormd door de bladeren 8.2-120 mg/l werd gemeten. In guttatievloeistof verzameld van planten in het veld op de eerste dag na kieming varieerde de concentratie imidacloprid van 77 tot 222 mg/l (Tapparo *et al.*, 2011). Vergelijkbare patronen en concentraties worden ook gevonden voor clothianidin (7.3-102 mg/l) en thiamethoxam (2.9-40.8 mg/l) (Tapparo *et al.*, 2011). Thiamethoxam concentraties in guttatievloeistof namen toe bij een afnemend vochtgehalte van de bodem, van 14-155 mg/l bij planten gekweekt onder natte omstandigheden, tot 34-1154 mg/l bij droge omstandigheden (Tapparo *et al.*, 2011). Tenslotte bleek dat de guttatievloeistof van planten in een veld naast een plot met clothianidin behandelde maïs (1.25 mg per zaad; Poncho) altijd minder dan 30 µg/l clothianidin bevatte. Dus concentraties in guttatievloeistof kunnen heel hoog zijn, het gaat daarbij vooral om heel jonge planten. Er zijn gegevens van een paar soorten planten.

### 3.2.2 Residuen in door bijen verzameld stuifmeel en in bijen, honing en was

Neonicotinoïde residuen in planten en plantendelen worden pas belangrijk voor bijen als die blootgesteld worden aan de residuen. De meest relevante maatstaf voor blootstelling van bijen is de concentratie waarin de stoffen worden gevonden in door bijen verzameld plantenmateriaal, zoals stuifmeel, en in bijenproducten zoals bijenbrood, honing en bijenwas, en daarnaast concentraties in de bijen zelf. Tabel 1 vat de gerapporteerde neonicotinoïde insecticide concentraties in bij-gerelateerde producten uit de literatuur samen.

Een aantal studies werd uitgevoerd in Europa en in Noord Amerika. Een paar studies betroffen een grootschalige analyse van monsters verzameld over een groot gebied en in verschillende jaren (Genersch *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2011), terwijl andere een min of meer landelijk onderzoek deden in één of twee bemonsteringsjaren (Pirard *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2010; Garcia-Chao *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010). Een enkele studie beperkte zich tot een klein aantal monsters (Bacandritsos *et al.*, 2010) of gaf niet aan hoeveel monsters werden genomen en geanalyseerd (Cutler en Scott-Dupree, 2007). In een aantal studies werd een hele grote reeks van pesticiden gemeten in verschillende bijen-gerelateerde producten (Bernal *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2009); Mullin *et al.*, 2010; Genersch *et al.*, 2010), waar andere zich slechts op neonicotinoïden richtten. Een paar studies onderzochten ook metabolieten.

Een uitgebreide inventarisatie van imidacloprid in pollen, honing en bijen werd uitgevoerd door Chauzat *et al.* (2006, 2009, 2011). Het onderzoek betrof een vijftal gebieden verspreid over Frankrijk, waarbij in elk gebied bij vijf imkers de kasten werden bemonsterd gedurende 3 jaar, met 4 bemonsteringen per jaar. In totaal werden 185 pollen-, 239 honing- en 187 bijenmonsters geanalyseerd. Imidacloprid werd gevonden in 40.5%, 21.8% resp. 11.2% van deze monsters, terwijl de metaboliet 6-chloornicotinezuur aanwezig was in 33.0%, 17.6% resp. 18.7% van de monsters. Gehalten aan imidacloprid in pollen, honing en bijen waren resp. >0.2-5.7 (gem. 0.9), >0.3-1.8 (gem. 0.7) en >0.3-11.1 (gem. 1.2) µg/kg, terwijl die aan 6-chloornicotinezuur resp. >0.2-9.3 (gem. 1.2), >0.3-10.2 (gem. 1.2) en >0.3-1.7 (gem. 1.0) µg/kg bedroegen (Chauzat *et al.*, 2011). Onbekend is op welke schaal imidacloprid is toegepast in de gebieden waarin bemonstering van de bijen plaatsvond.

Een vergelijkbare studie in België, met eenmalige bemonstering van bijen en bijenwas, leverde slechts in 5 van de 109 monsters een detecteerbaar imidacloprid signaal, met gehalten <0.084 µg/kg (Pirard *et al.*, 2007). Een andere studie in België, in een gebied waar naar schatting 13.2% van de maïs was behandeld met imidacloprid, leverde geen detecteerbare concentraties imidacloprid in bijen en bijenwas op (detectiegrens 0.05 µg/kg); in 8,4 van de honingmonsters werd imidacloprid gemeten, maar steeds onder de grens van kwantificering (0,5 µg/kg) (Nguyen *et al.*, 2009). De oorsprong van deze imidacloprid is onduidelijk, omdat maïs geen nectar levert, en er geen zonnebloemteelt in de buurt was aangetroffen.

Van de andere geanalyseerde neonicotinoïden waren thiacloprid en acetamiprid aanwezig in 5,4% van de stuifmeelmonsters in Noord Amerika, terwijl thiacloprid ook werd gevonden in 1,9% van de wasmonsters (Mullin *et al.*, 2010) (Tabel 1). Ook in Duitsland was thiacloprid de meest teruggevonden neonicotinoïde, gevonden in 33% van de stuifmeelmonsters met concentraties oplopend tot 199 µg/kg (Genersch *et al.*, 2010). In stuifmeel verzameld door bijen 1 dag en 6 dagen na een bespuiting van appelbomen met Calypso 480 SC in een dosis van 0,2 kg/ha (ongeveer 0,1 kg actieve stof/ha) werden respectievelijk 60 en 30 µg/kg thiacloprid residuen gevonden. In bijenbrood werd geen thiacloprid aangetroffen (detectiegrens 10 µg/kg) (Smodis Skerl *et al.*, 2009).

De beste maat voor recente blootstelling en beschikbaarheid in biologische processen zijn de concentraties in de bijen zelf. Het onderzoek van Chauzat *et al.* (2011) vond imidacloprid in 11,2 % van de bijenmonsters, en de belangrijkste metaboliet 6-chloornicotinezuur werd in 18,7% van de monsters teruggevonden. De gemiddelde concentraties waren respectievelijk 1,2 (>0,3-11,2) en >0,3-1,7) µg/kg. Andere studies vonden geen imidacloprid in honingbijen. Alleen in de studie van Bacandritsos *et al.* (2010) werden hogere concentraties imidacloprid gemeten in honingbijen. Dit onderzoek betrof echter maar vijf monsters. Zoals Tabel 1 toont werden geen andere neonicotinoïden gedetecteerd in honingbijen in de andere inventarisaties in Europa en noord Amerika.

De lage residu niveaus in honingbijen worden waarschijnlijk vooral verklaard door het snelle imidacloprid metabolisme in de honingbij *A. mellifera*. Na blootstelling aan suikerwater met een dosering van 20, 50 of 100 µg <sup>14</sup>C-imidacloprid/kg honingbij, bleek de halfwaardetijd van <sup>14</sup>C-imidacloprid 4-5 uur (Suchail *et al.*, 2004a,b). De belangrijkste metabolieten waren 4- en 5-hydroxy-imidacloprid en olefin. De olefin concentratie piekte na ongeveer 4

uur, terwijl de hydroxy metaboliet(en) meteen na toediening verschenen, en vervolgens in concentratie afnamen (Suchail *et al.*, 2004b) of een piek vertoonden na ongeveer 4 uur (Suchail *et al.*, 2004a). De totale hoeveelheid van imidacloprid en metabolieten samen in de bijen nam af met een halfwaardetijd van 25 uur (Suchail *et al.*, 2004a). Imidacloprid was de belangrijkste stof in het abdomen (38% van de geaccumuleerde <sup>14</sup>C) meteen na toediening. In de kop werden vier metabolieten gevonden, met imidacloprid altijd ≤5% van de opgenomen dosis, en met olefin en 4- en 5-hydroxy-imidacloprid als de belangrijkste metabolieten na 24 uur en 30 uur respectievelijk. Imidacloprid en metabolieten werden ook in andere delen van het bijenlichaam gevonden (hemolymfe, middendarm, rectum) met de grootste hoeveelheden in de thorax (Suchail *et al.*, 2004a). Het is onbekend in hoeverre de aan receptoren gebonden (effectieve) stof wordt mee gemeten in de bepalingen, als alleen de vrije moleculen worden gemeten zou dat een onderschatting kunnen zijn. De metabolismestudies zijn met relatief hoge concentraties gedaan. Acetamiprid werd zelfs nog veel sneller gemetaboliseerd in bijen, met een halfwaardetijd van 25 minuten na orale toediening met suikerwater (100 µg/kg), waarbij vier metabolieten ontstonden. De belangrijkste metaboliet had een piekwaarde na 8 uur, overeenkomend met ongeveer 48% van de dosis, de andere metabolieten bereikten maximale niveaus van 22-25%. Na 72 uur bevatten de bijen slechts metabolieten. Het metabolisme van acetamiprid lijkt weefsel-specifiek en vertoont een vergelijkbare verdeling over het lichaam van de bij als dat van imidacloprid (Brunet *et al.*, 2005).

### *Fipronil*

Girolami *et al.* (2009) vonden geen fipronil in de guttatievloeistof van jonge maïsplanten, die een zaadbehandeling van 1 mg/zaad (Regent 500 FS) hadden gehad en waren gekweekt in het laboratorium.

Kadar en Faucon (2006) analyseerden 60 pollenmonsters, genomen van 5 kasten bij 6 verschillende imkers in het Indre district in Frankrijk, een gebied waar maïs en zonnebloemen worden verbouwd en dus een grote kans is op blootstelling. In 2 van de 60 monsters werden fipronil en de desulfinyl metaboliet (foto-degradatie-product) gedetecteerd in gehalten <0.1 µg/kg.

Een uitgebreide inventarisatie van fipronil in pollen, honing en bijen werd uitgevoerd door Chauzat *et al.* (2006, 2009, 2011). Het onderzoek betrof een vijftal gebieden verspreid over Frankrijk, waarbij in elk gebied bij vijf imkers de kasten werden bemonsterd gedurende 3 jaar, met 4 bemonsteringen per jaar. In totaal werden 185 pollen-, 239 honing- en 187 bijenmonsters geanalyseerd. Fipronil en metabolieten werd gevonden in 3.2-6.5% resp. 3.7% van de pollen- en bijenmonsters, terwijl geen residuen werden aangetroffen in honing (detectiegrens 0.3 µg/kg).

Gemiddelde gehalten aan fipronil en de desulfinyl en sulfonmetabolieten bedroegen resp. 1.2, >1.0 en 1.7 µg/kg in pollen en resp. 0.5, 1.2 en 0.4 µg/kg in de bijen (Chauzat *et al.*, 2011).

In een vergelijkbare studie in België, met eenmalige bemonstering van bijen en bijenwas, werd geen fipronil gevonden in de 109 geanalyseerde monsters (detectiegrens 0.011 µg/kg) (Pirard *et al.*, 2007).

Studies in Spanje, uitgevoerd in 2008-2009, vonden geen residuen van fipronil of de carboxamide, desulfinyl-, sulfide- en sulfon- metabolieten in honing (93 monsters van 73 imkers in noordwest Spanje; detectiegrens 0.41-0.58 µg/kg) (Garcia-Chao *et al.*, 2010). In opgeslagen pollen verzameld in diverse regio's in Spanje werd fipronil in 3 van de 61 monsters (1-5 µg/kg) gemeten (Higes *et al.*, 2010). Ook in 3.7% van de 845 voorjaarsmonsters werd fipronil aangetroffen (1-4 µg/kg), maar niet in 176 najaarsmonsters (detectiegrens 0.07 µg/kg) (Bernal *et al.*, 2010). Een studie in twee regio's (Cuenca en Andalucia) in Spanje, waarbij bijenstanden waren geplaatst bij zonnebloemvelden die al dan niet een zaadbehandeling met fipronil hadden gehad, of in de natuur ver van landbouw, toonde geen residuen van fipronil en metabolieten aan in stuifmeel uit pollenvallen noch uit de raat (bijenbrood, Bernal *et al.*, 2011). De LOQ (Limit of quantification ofwel de laagste nog te kwantificeren concentratie) was 0,5 µg/kg, de LOD (detectiegrens) 0,2 µg/kg. Wel werden andere chemicaliën aangetroffen, met als meest aangetroffene het acaricide chloorfenvinfos, door imkers illegaal gebruikt tegen varroa (maar ook erg schadelijk voor bijen). In de gebieden met zonnebloem was het aandeel zonnebloemstuifmeel in het totaal 40 tot 77%. Op grond van deze getallen berekenen de auteurs dat hoogstens 1/1000 van de LD<sub>50</sub> kan worden opgelopen via deze weg.

Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in Noord-Amerika en Canada. Fipronil-residuen werden aangetroffen in 2 van 140 bijenmonsters (9.9-3060 µg/kg), 1 van de 350 pollenmonsters (28.5 µg/kg) en 3 van de 208 bijenwasmonsters (1.1-35.9 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010).

Tabel 1. Overzicht van literatuurgegevens over residuen van neonicotinoiden in bijen en door bijen verzameld stuifmeel en honing.

Substraat	Land/ gebied/ landgebruik/ ecosysteem	Belangrijkste gewas/ plantensoort	Experimentele opzet en statistische stof analyses	No. monsters	% monsters positief	concentratie ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ vers gewicht)	referentie
<b>Stuifmeel</b>							
	Frankrijk; 4 landbouw + geen gegevens 1 natuur regio		24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; X2 analyse om frequenties van pesticide voorkomen te vergelijken tussen jaren en gebieden	185	40.5	0.9	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, tussen gebieden; frequentie in 2009, 2011 2003 sign. hoger dan in 2005; veel andere pesticiden gevonden
	Spanje, 11 verschillende regio's	Zonnebloem dominant in 11.5%, wilde vegetatie in 78.7% en gemengd in 9.8% van de monsters	stufmeel uit raten; X2 analyse om pesticide aanwezigheid te vergelijken tussen ongezone (ontvolkte) en symptoomloze volken.	61	0	<0.4	Geen significante verschillen in Higes <i>et al.</i> , 2010 pesticiden residuen tussen gezonde en ongezone groepen volken; 9 andere pesticiden gevonden
	Spanje 17 regio's	wilde vegetatie in 47.8%, gewassen in 38.3% v d monsters (10.4% zonnebloem, 7.8% Luzerne, 9.5% granen)	opgeslagen stuifmeel van 448 + 92 lente en 397 + 84 herfst monsters in 2006 + 2007, resp. ; statistische analyse niet toepasbaar voor imidacloprid	1021	0	<0.4	veel pesticiden gevonden in 42% en 31% van de lente- en herfstmonsters, respectievelijk
	USA (Florida, California, geen gegevens Pennsylvania of 13 staten) + monsters van buiten USA en Canada		2007/ 2008 overzicht incl. 13 bijenstanden in Florida+Californië, 47 volken in Pennsylvania boomgaard en van 'andere' monsters; geen verdere data analyse	350	2.9 0.29*	3.1 53.3	veel pesticiden gevonden Mullin <i>et al.</i> , 2010
	Duitsland, hele land	belangrijkste nectarplant: koolzaad ( <i>Brassica napus</i> , 11-37%), zonnebloem ( <i>Helianthus annuus</i> ; 3-4%) mais ( <i>Zea mays</i> ; 16-22%)	landdekkend onderzoek; veel bijenhouders; 2005 + 2006 (50 standen; n=105 en 2007 (n=110 bijenstanden); bemonsterd na koolzaad bloei; geen verdere data analyse	215	0.47* 33 0 0.93	3 - <0.1 -	veel pesticiden gevonden Genersch <i>et al.</i> , 2010
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha veld; behandeld 400 g AI/kg zaad (=32 g/ha) +control; 4 bijenvolken per veld gedurende 21-d; bemonsterd met 14-d intervallen; monsters pooled per veld en monsterdag; geen verdere data-analyse	geen gegevens	weinig	- - - -	Cutler & Scott- Dupree, 2007 (behandeld); <0.5 (controle)

Substraat	Land/ gebied/ landgebruik/ ecosysteem	Belangrijkste gewas/ plantensoort	Experimentele opzet en statistische stof analyses	No. monsters	% monsters positief	concentratie (µg/kg vers opmerkingen gewicht)	referentie
<b>Honing</b>							
	Frankrijk; 4 landbouw + geen gegevens 1 natuur regio		24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; X2 analyse om de frequenties van pesticide aanwezigheid te vergelijken tussen jaren en gebieden	239	21.8	0.7 >0.3-1.8	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2011 geen verschillen tussen jaren en gebieden
	België verschillende gebieden	geen gegevens	monitoringgeen verdere details	109	4.6	<0.084	Pirard <i>et al.</i> , 2007
	België, verschillende gebieden	mais (0.05-2.48% van gewas behandeld)	Augustus-Oktober 2004 (na de bloei van <i>Zea mays</i> ; geen verdere data- analyse	48	8.4	0.275 >0.05 <0.5	Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	Noordwest Spanje	geen gegevens	73 bijenstanden geen verdere data- analyse	91	0	<2.33 <0.51	Garcia-Chao <i>et al.</i> , 2010
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha velden; behandeld 400 g Al/kg zaad (=32 g/ha) +control; 4 bijenvolken per veld gedurende 21-d; bemonsterd met 14-d intervallen; geen verdere data-analyse	geen gegevens	weinig	<0.5-0.93 (behandeld); <0.5 (controle)	Cutler & Scott- Dupree, 2007
<b>Honingbijen</b>							
	Frankrijk; 4 landbouw + geen gegevens 1 natuur regio		24 locaties, 120 volken; 4x per jaar; Okt 2002 - Sept 2005; X2 analyse om frequenties van pesticide voorkomen te vergelijken tussen jaren en gebieden	187	11.2	1.2 >0.3-11.1	Chauzat <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2011 geen verschillen tussen gebieden en jaren
	België, verschillende gebieden	geen gegevens	monitoring; geen verdere details	99	0	<0.1	Pirard <i>et al.</i> , 2007
	België, verschillende gebieden	mais (0.05-2.48% van gewas behandeld)	Augustus-Oktober 2004 (na de bloei van <i>Zea mays</i> ; geen verdere data- analyse	48	0	<0.05	Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	USA (Florida, California, geen gegevens Pennsylvania of 13 staten) + buiten USA en Canada		2007/ 2008 overzicht incl. 13 bijenstanden in Florida+California; 47 volken in Pennsylvania boomgaard en van 'andere' monsters; geen verdere data analyse	140	0	<2.0 <1.0 <1.0 <5.0	veel pesticiden gedetecteerd Mullin <i>et al.</i> , 2010
	Griekenland, Peloponnesus regio	geen gegevens	Bijenstanden met bijen die atypisch gedrag vertoonden; geen verdere data- analyse	5	60	27 14-39	Detectiegrenzen niet vermeld Bacandritsos <i>et al.</i> , 2010
					0	<LOD	
					0	<LOD	
					0	<LOD	

Substraat	Land/ gebied/ landgebruik/ ecosysteem	Belangrijkste gewas/ plantensoort	Experimentele opzet en statistischestof analyses	No. monsters	% monsters positief	concentratie (µg/kg vers opmerkingen gewicht)	referentie
						Gemiddeld# range in positieve monsters	
<b>Bijenwas</b>	België, verschillende gebieden,	geen gegevens	monitoring; geen verdere details	98	0	<0.1	Pirard <i>et al.</i> , 2007
	België, verschillende gebieden,	mais (0.05-2.48% van gewas behandeld)	Augustus-Oktober 2004 (na de bloei van <i>Zea mays</i> ); geen verdere data-analyse	48	0	<0.05	Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	USA (Florida, California, Pennsylvania of 13 staten) + monsters van buiten USA en Canada	geen gegevens	2007/ 2008 overzicht incl. 13 bijenstanden in Florida+Californië; 47 volken in Pennsylvania boomgaard en van 'andere' monsters; geen verdere data analyse	208	0.96 1.9 0 0	- 2.4-13.6 0.1 <1.0-8.0 <1.0 <5.0	veel pesticiden aangetroffen Mullin <i>et al.</i> , 2010
	Guelph, Canada	<i>Brassica napus</i>	1 ha velden; behandeld 400 g Al/kg zaad (=32 g/ha) +control; 4 bijenvolken per veld gedurende 21-d; bemonsterd met 14-d intervallen; geen verdere data-analyse	geen gegevens	weinig	- <0.5 ( <i>behandeling en controle</i> )	Cutler & Scott-Dupree, 2007

\* slechts één monster positief

# wanneer geen residuen zijn gemeten, wordt de detectiegrens vermeld (LOD, Limit of Detection)

Tabel 2.

Overzicht van de letale en sub-letale effecten van imidacloprid op individuele (organisme niveau) honingbijen (*Apis mellifera*, hommels (*Bombus impatiens*) en solitaire bijen, zoals bepaald in verschillende studies door orale- of contact-blootstelling onder laboratorium- en (semi-)veldcondities (LC50 = concentratie die 50% sterfte veroorzaakt; LD50 is dosis die 50% sterfte veroorzaakt; NOEC = no observable effect concentration = hoogste concentratie waarbij geen effect waarneembaar is; NOED = no-observed effect dose = hoogste dosis waarbij geen effect waarneembaar is; LOEC = lowest observable effect concentration = laagste concentratie waarbij nog een effect is waargenomen; PER = proboscis extension reflex).

<b>Soort</b>	<b>Blootstelling</b>	<b>Neveneffecten</b>	<b>Referentie</b>
<i>Apis mellifera</i>	Lab+contact: individuele bijen (acuut; geen informatie over de concentratierange)	LD <sub>50</sub> -24uur: 18 ng/bij	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: acute blootstelling aan 0,12 en 12 ng/bij Lab en semi-veld+oraal: 24 µg/kg in suikersiroop	Reductie associatief leren bij 12 ng/bij	Decourtye <i>et al.</i> (2004a) en (2004b)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: acute blootstelling aan 0,2-3,2 mg/l Lab+oraal: chronische blootstelling (geen info over concentraties)	AFgenomen foerageeractiviteit bij de voedselbron en bij de ingang van de kast; effect op leervermogen. LD <sub>50</sub> -48uur: 30 ng/bij LOEC op overleving van winterbijen: 24 µg/kg LOEC op associatief leren via PER test op winterbijen (12 µg/kg) en zomerbijen (12 µg/kg)	Decourtye <i>et al.</i> (2003)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+contact: acute blootstelling aan 1,25-20 ng/bij	LOEC voor PER gewinning: 1,25 ng/bij LOEC voor mobiliteit: 1,25 ng/bij; mobiliteit verminderd bij 2,5-20 ng/bij	Lambin <i>et al.</i> (2001)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: acute blootstelling aan 0,1 en 81 ng/bij	LD <sub>50</sub> -48uur: tussen 41 en > 81 ng/bij; NOED: ≤ 1,25 ng/bij; 33% verminderde opname van sucrose bij 81 ng/bij	Nauen <i>et al.</i> (2001)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+contact: acute blootstelling aan 40-154 ng/bij Lab+oraal: acute blootstelling aan 0,7 mg/zaad Lab+oraal: chronische blootstelling (39 dagen) aan zonnebloemnectar + 0,002-0,02 mg/kg	LD <sub>50</sub> -48uur: 441 ng/bij NOEC voor mortaliteit, eet-activiteit, wasraatproductie, broedproductie en vitaliteit: 0,02 mg/kg	Schmuck <i>et al.</i> (2001)
<i>Apis mellifera</i>	Samenvatting van data van meer dan 30 lab- en (semi-) veldtestentesten.	Repellent anti-eet effect bij 500-1000 µg/l Geen negatieve effecten verwacht bij residuconcentraties < 20 µg/l	Maus <i>et al.</i> (2003)
<i>Apis mellifera</i>	Veld- +oraal: chronische blootstelling	NOEC voor intraspecifieke communicatie: 10 µg/l NOEC voor overleving, foerageeractiviteit, volkswontwikkeling, broed status en veranderingen in pollen/nectar voorraden: 20 µg/l	Kirchner (1999)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: acute blootstelling aan 10-10.000 µg/l Lab+oraal: jonge bijen chronisch (10 dagen) blootgesteld aan 0,1; 1 en 10 µg/l	LD <sub>50</sub> -48uur: 60 ng/bij 50% mortaliteit	Suchail <i>et al.</i> (2001)
<i>Bombus impatiens</i> <i>Osmia lignaria</i> <i>Megachile rotundata</i>	Lab+contact: acute blootstelling via een Potter spuitoren (geen info over de concentratierange)	LC <sub>50</sub> -48uur: 322 mg/l LC <sub>50</sub> -48uur: 7 mg/l LC <sub>50</sub> -48uur: 17 mg/l	ScottDupree <i>et al.</i> (2009)

Tabel 3. *Letaal effect concentraties van neonicotinoïden (moederstof en metaboliëten) voor werkers van de honingbij (Apis mellifera) via orale en contactblootstelling zoals gevonden in verschillende laboratoriumonderzoeken.*

Neonicotinoïde	Blootstelling	LD <sub>50</sub> (µg/bij)	Referenties
<b>Moederstof</b>			
Acetamiprid	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de onconcentratierange) Contact met droog residu + oraal: 100 mg/l (acuut; 2 dagen blootstelling bij contact en 3 dagen bij orale blootstelling)	24uur: 7,07 48uur: 14,5 (oraal) + 8,09 (contact) onschadelijk	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011) Laurino <i>et al.</i> (2011)
Clothianidin	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange) Contact met droog residu: 75-1,5 mg/l (2 dagen blootstelling) Oraal: 75 mg/l-7,5 µg/l (acuut; 3 dagen)	24uur: 0,022 (contact); 48uur: 0,044 (contact) + 0,003 (oraal) ; 100% sterfte bij 15mg/l na 48uur 48uur: 0,003 µg/l	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011); Laurino <i>et al.</i> (2011) Laurino <i>et al.</i> (2011)
Dinotefuran	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,075 (contact) 48uur: 0,023 (oraal)	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011)
Nitenpyram	Contact: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 0,138 (contact)	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
Thiacloprid	Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24uur: 14,6 (contact); 24,2 (contact); 48uur: 38,8 (contact)+ 17,3 (oraal) onschadelijk	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Elbert <i>et al.</i> (2000); Decourtye & Devillers (2011) Laurino <i>et al.</i> (2011)
Thiamethoxam	Contact droog residu +oraal: 144 mg/l (acuut; 2 dagen blootstelling bij contact) Contact+oraal: individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange) Contact droog residu: 100-1 mg/l (2 dagen blootstelling)	24uur: 0,03 (contact) 48uur: 0,024 (contact)+ 0,005 (oraal) ; 100% sterfte bij 100 mg/l na 6 uur 48 uur: 0,004 µg/l	Iwasa <i>et al.</i> (2004); Decourtye & Devillers (2011); Laurino <i>et al.</i> (2011)
<b>Metaboliëten</b>			
N-demethyl acetamiprid	Contact individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: > 50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
6-chloor-pyridimethyl alcohol	Contact individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: > 50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
6-chloor-nicotinezuur	Contact individuele bij (acuut; geen info over de concentratierange)	24 uur: > 50	Iwasa <i>et al.</i> (2004)
Oleofin	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange) Oraal: 10-10.000 µg/kg (acuut); 0,1-10 µg/l (chronisch; 10 dagen)	48 uur: > 0,036 48 uur: 0,028 (acuut)/(chronisch); 30% mortaliteit met 1 µg/l na 125 uur	Nauen <i>et al.</i> (2001); Suchail <i>et al.</i> (2001)
5-OH-imidacloprid	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange) Oraal: 1,25-20 mg/l (acuut) Oraal: 10-10.000 µg/kg (acuut); 0,1-10 µg/l (chronisch; 10 dagen)	48 uur: 0,159 48 uur: 0,153 48 uur: 0,258 (acuut)/(chronisch); 40% mortaliteit met 1 µg/l na 125 uur	Nauen <i>et al.</i> (2001); Decourtye <i>et al.</i> (2003); Suchail <i>et al.</i> (2001)
DiOH-imidacloprid	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: > 0,049	Nauen <i>et al.</i> (2001)
Urea-metaboliëten	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: > 100	Nauen <i>et al.</i> (2001)
6-chloornicotinezuur	Oraal: acuut (geen info over de concentratierange)	48 uur: > 122	Nauen <i>et al.</i> (2001)





**Tabel 4.** *Overzicht van de concentraties imidacloprid die letale en subletale effecten veroorzaken op (micro-)volksniveau bij honingbijen (Apis mellifera) en hommels (Bombus terrestris, Bombus impatiens), vastgesteld in verschillende onderzoeken via orale en contactblootstelling onder laboratorium- en (semi-) veldomstandigheden (no observed effect concentration=NOEC; PER = proboscis extension reflex).*

Soort	Blootstelling	Toxiciteit	Referentie
<i>Apis mellifera</i>	Veld+oraal: 0,5-5 µg/l in suikersiroop (chronisch)	NOEC voor overleving: 5 µg/l NOEC voor broed, foerageeractiviteit van adulten, populatieniveau van adulten, aantal ramen met broed na overwintering en de algemene vitaliteit van de volken: 5 µg/l	Faucon <i>et al.</i> (2005)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: 100-1000 µg/l (acuut)	500-1000 µg/l: bijen verdwenen bij de kast of voederplek tot wel 24 uur lang 100 µg/l: geen effect op terugkeersnelheid	Bortolotti <i>et al.</i> (2003)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: 0,12 and 12 ng/bij in suikersiroop (acuut)	Toename van de cytochroomoxidase-labeling, negatief effect op de PER tests bij 12 ng/bij maar niet bij 0,12 ng/bij Negatief effect op de PER test	Decourtye <i>et al.</i> (2004a, 2004b)
	Lab+oraal: 24µg/kg in suikersiroop (24u)		
	Semiveld+oraal: 24 µg/kg in suikersiroop (24u)	Verminderde foerageeractiviteit, activiteit bij de kastingang , saccharoseconsumptie en de grootte van het broednest	
<i>Apis mellifera</i>	Veld+oraal: foeragerend op maisvelden behandeld met imidacloprid (chronisch; geen informatie over de dosis)	Geen relatie tussen met imidacloprid behandelde maisvelden en de mortaliteit van Nguyen <i>et al.</i> (2009) bijenvolken op bijenstandens	
<i>Apis mellifera</i>	Semiveld+oraal: 40-6000 µg/l in suikersiroop (acuut)	LOEC voor foerageergedrag: 50 µg/l >1.200 µg/l: afwijkingen in het terugkeren op een voederplek	Yang <i>et al.</i> (2008)
<i>Apis mellifera</i>	Lab+oraal: >100 µg/kg (chronisch)	NOEC overleving: 2.20 µg/kg in zonnebloemnectar 20 µg/l: afname in foerageeractiviteit; >100 µg/l: reductie van foerageergedrag gedurende 30-60 min > 50 µg/l: toename van de tijdsduur tussen opeenvolgende bezoeken aan een voeder tafel	Schmuck (1999) en Schmuck <i>et al.</i> (2001)
<i>Apis mellifera</i>	Semiveld+oraal: 48 µg/kg in suikersiroop (chronisch)	Beïnvloeding van de siroopconsumptie, foerageeractiviteit en de oppervlakte van Ramirez-Romero <i>et al.</i> (2005) het broednest	
<i>Bombus terrestris</i>	Lab+oraal: 10-25 µg/kg in suikersiroop+6-16 µg/kg in pollen (chronische blootstelling over 85 dagen)	-Toegenomen mortaliteit van werksters na 30 dagen -Geen effect op voedselconsumptie en het ontluiken van mannetjes; maar bij 10 µg/kg in suikersiroop + 6 µg/kg in stuifmeel: reductie van de hoeveelheid broed	Tasei <i>et al.</i> (2000)
<i>Bombus terrestris</i>	Veld+oraal: foeragerend op planten geteeld uit met imidacloprid (0,7 mg/zaad) behandelde zonnebloemzaden (chronische blootstelling: 9 dagen)	Geen effect op de foerageeractiviteit en de vitaliteit van de volkjes	Tasei <i>et al.</i> (2001)
<i>Bombus terrestris</i>	Lab+oraal: 200 mg/l-10 µg/l in suikerwater (chronisch 11 weken) -test zonder foerageren -test met foerageren Semiveld+oraal: 20-2 µg/l in suikerwater (chronisch 2 weken)	Test zonder foerageren: LC <sub>50</sub> : 59 µg/l; EC <sub>50</sub> : 37µg/l; NOEC voor reproductie: 20 µg/l Test met foerageren: LC <sub>50</sub> : 20 µg/l; EC <sub>50</sub> : 3.7 µg/l; NOEC voor reproductie: <2.5 µg/l NOEC voor broed, volksgroei en foerageeractiviteit: 2 µg/l	Mommaerts <i>et al.</i> (2010); Mommaerts & Smagghe (2011)

Soort	Blootstelling	Toxiciteit	Referentie
<i>Bombus occidentalis/Bombus impatiens</i>	Lab+oraal: 7-30 ng/g pollen (chronisch: twee keer per week)	NOEC voor broed, aantal mannetjes, koninginnen en werksters, het gewicht van de werksters, de stuifmeelconsumptie en de foerageervaardigheid op complexe kunstbloemen: 7 µg/kg	Morandin & Winston (2003)
<i>Bombus impatiens</i>	Veld+droog residu (acute blootstelling) -granulaat+sputten: 0,45 kg/ha -sputten+irrigatie: 0,34 kg/ha -sputten zonder irrigatie: 0,34 kg/ha	Geen effect op de vitaliteit van volkjes en op het foerageergedrag Geen effect op de vitaliteit van de volkjes, op het defensieve gedrag van werksters noch op de foeragevoorkeuren Afname van de aantallen broedkamers, honingpotten, aantal werksters, het gewicht van de volkjes en effect op de foeragevoorkeuren	Gels <i>et al.</i> (2002)

### 3.3 Berekende blootstelling uit voedselgebruik en residuniveaus

*In hoofdstuk 3.3 wordt uitgerekend aan welke hoeveelheid neonicotinoiden en fipronil bijen worden blootgesteld als ze alleen maar zouden eten van de bronnen met de hoogst aangetroffen concentraties residuen. Dit is een worst case scenario, want meestal zijn de concentraties lager, en eten bijen gevarieerd (dus ook van onverdachte bronnen). Bovendien wordt gerekend met die bijen die de meeste nectar (nectarhaalsters) of stuifmeel (de voedsterbijen) eten. De meeste bijen eten veel minder nectar en geen stuifmeel. De voor de berekeningen gebruikte concentraties komen uit Tabel 1.*

*De berekende worst case blootstelling wordt vergeleken met de toxiciteitsgegevens: komt de opgedane hoeveelheid in de berekende (worst case) blootstelling dichtbij de letale dosis dan is er een risico. In dat geval zijn veldstudies vereist om schade in de praktijk uit te sluiten.*

*Blootstelling via water wordt hier niet behandeld: over concentraties in het oppervlaktewater hebben we geen gegevens gevonden, blootstelling via guttatievloeistof is besproken in 3.2.*

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar of honing en stuifmeel) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais et al (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale konden oplopen. Voor de andere stoffen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig openbare gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

#### Resultaat voor nectar

##### *Imidacloprid*

Gevonden concentraties in nectar van zonnebloem (1,9 µg/kg, Schmuck *et al.*, 2001 en Bonmatin *et al.*, 2001) zouden een geaccumuleerde dosis geven van maximaal 4,3 nanogram per bij in 7 dagen (Rortais *et al.*, 2005). Dit is het worst case scenario, want dit is gebaseerd op de aanname van volledig voeden op nectar met de genoemde concentratie aan imidacloprid, en op het gebruik door een nectar foerageerster. Foerageren voor nectar is de meest energie-intensieve taak in het bijenvolk, een nectar foerageerster gebruikt 224-899 mg suiker in 7 dagen. Omdat zonnebloemnectar ongeveer 40% suiker bevat, heeft een bij 2,5 \* (224-899) = 560-2248 mg nectar nodig. Met een concentratie van 1,9 ng/g levert dat na een week een dosis imidacloprid op van 1,06 - 4,27 ng/bij, dus maximaal  $4,27/7 = 0,61$  ng/bij per dag. De Toxicity Exposure Ratio (TER) is dan  $LD_{50}$  (oraal) / PEC (Probable Exposure Concentration), in dit geval:  $TER = 3,7 \text{ ng} / 0,61 = 6,07$  (-24,28). Bij een TER > 10 wordt het risico als laag tot verwaarloosbaar beschouwd, bij een TER < 10 wordt het doen van veldonderzoek geëist.

##### *Clothianidin, Thiamethoxam, Thiacloprid, Acetamiprid en Fipronil*

Ook voor clothianidin kan op vergelijkbare manier de TER worden berekend (zie Tabel 5), voor Thiamethoxam, Acetamiprid en Fipronil zijn helaas geen gegevens over concentraties in nectar beschikbaar.

##### *Clothianidin*

De gevonden concentratie van 2.24 µg/kg in nectar van koolzaad (Cutler & Scott-Dupree, 2007), met een suikergehalte van 470g/kg (Creswell, 1999), zou een nectar-foerageerster in de loop van een week foerageren maximaal een geaccumuleerde dosis van 1,07 tot 4,28 ng kunnen opleveren. De TER = 6,56 – 26,3.

*Thiacloprid*

Eén heel hoge gevonden waarde (Johnson *et al.*, 2011) van 33 µg/kg in honing zou een maximaal geaccumuleerde dosis geven van 9,24 tot 37,1 nanogram per bij, maximaal 5,3 ng per dag.  $TER = 17320 / 5,3 = 3268$

Tabel 5. Berekening van de TER voor nectarfoerageersters op basis van gegevens uit Rortais *et al.*, (2005): suikerbehoefte van een nectarfoerageerster is (voor 7 dagen) 224-899 mg.

A: Stof	B: % suiker nectar	C: nectar behoefte mg	D: Conc. stof in nectar µg/kg	E: dosis totaal (=C*D) ng/bij	F: PEC (E/7) ng/bij.dag	G: LD <sub>50</sub> (oraal) ng/bij	TER (=G/F)
Imidacloprid	40%	560-2248	1,9	1,06-4,27	max: 0,61	3,7	6,07
Clothianidin	47%	476-1912	2,24	1,07-4,28	max: 0,61	4	6,56
Thiamethoxam			-				-
Fipronil			-				-
Thiacloprid	80%	280-1123	33	9,2-37,1	max: 5,3	17.320	3268
Acetamiprid			-				-

**Resultaat voor Stuifmeel**

Via stuifmeel zouden vooral de voedsterbijen belast worden, zij consumeren in de 8-10 dagen dat ze voedster zijn 65 mg stuifmeel. Als larve neemt een bij 5 mg stuifmeel op.

*Imidacloprid*

Dit zou gebaseerd op een concentratie in stuifmeel van mais van 3,4 µg/kg (Bonmatin *et al.*, 2003) een belasting per bij van 0,2 ng imidacloprid opleveren (in 10 dagen, per dag 0,02) en een TER van  $3,7/0,02 = 168$ .

*Thiamethoxam*

De ene (heel hoge) waarde van thiamethoxam gevonden in stuifmeel van 53 µg/kg (Mullin *et al.*, 2010) zou een voedster in tien dagen een dosis van 3,44 ng opleveren, 0,344 ng per dag.  $TER = 14,5$  De gehalten gevonden door Krupke *et al.* (2012) in stuifmeel direct van maisplanten (1,7 µg/kg) en in pollenkorfjes verzameld door bijen (1,2 – 7,4 µg/kg) zouden leiden tot een dosis van 0,078 – 0,481 ng per bij in 10 dagen, 0,0078 – 0,0481 ng per bij per dag. De TER = 104 tot 641.

*Clothianidin*

Via 2,24 µg/kg in stuifmeel (Cutler & Scott-Dupree, 2003) zou een voedster met 0,15 ng worden belast.  $TER = 267$ . Krupke *et al.* (2012) vonden echter hogere concentraties in stuifmeel van mais (3,9 µg/kg) leidend tot een TER = 152.

*Thiacloprid:*

Mullin *et al.* (2010) vonden 1,3 µg/kg in pollen. Dat zou een belasting geven van 0,08 ng per bij. De hoogste gevonden waarde (115 µg/kg; Johnson *et al.*, 2011) zou 7,47 ng per bij betekenen.  $TER = 17320 / 0,75 = 23093$ .

*Acetamiprid*

De aanwezigheid in 3.1% van de pollenmonsters (gem. 1.9 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010) zou aan een voedster een geaccumuleerde dosis van 0,124 ng/bij opleveren, 0,0124 per dag.  $TER = 14530 / 0,0124 = 1,2 * 10^6$ . De hoogste concentratie van 124 µg/kg levert een TER = 17.938.

*Fipronil*

1,2 µg/kg in stuifmeel (Chauzat *et al.*, 2005) zou 0,08 ng opleveren per 10 dagen (0,008 ng/bij per dag), de hoge concentratie gevonden door Mullin *et al.* (2010) (een enkel monster met een concentratie van 28 µg/kg) zou 1,82 ng per voedsterbij geven over 10 dagen. Per dag is dat 0,182 ng/bij. TER in eerste geval  $4,2/0,008 = 525$ , in het tweede geval  $4,2/0,182 = 23$ . Dat betekent dat blootstelling aan fipronil via het stuifmeel geen mortaliteitsrisico vormt voor honingbijen.

**Tabel 6.** Berekening van de TER voor voedsterbijen op basis van gegevens uit Rortais *et al.*, (2005): voedsterbijen consumeren in de 8-10 dagen dat ze voedsterbij zijn 65 mg stuifmeel. De hoogste concentraties uit de literatuur zijn gebruikt.

A: Stof	B: plantensoort	Referentie	D: Conc. stof in stuifmeel  µg/kg	E: dosis totaal (=65*D)  ng/bij	F: PEC (E/10)  ng/bij.dag	G: LD <sub>50</sub> (oraal)  ng/bij	TER (=G/F)
Imidacloprid	mais	Bonmatin <i>et al.</i> , 2003	3,4	0,22	0,022	3,7	168
Clothianidin	mais	Krupke <i>et al.</i> , 2012	3,9	0,254	0,025	3,8	152
Thiamethoxam	?	Mullin <i>et al.</i> , 2010	53	3,44	0,344	5	14,5
Fipronil	?	Mullin <i>et al.</i> , 2010	28	1,82	0,182	4,2	23
Thiacloprid	?	Johnson <i>et al.</i> , 2011	115	7,47	0,75	17.320	23.093
Acetamiprid	?	Mullin <i>et al.</i> , 2010	124	8,06	0,81	14.530	17.938

Uitgangspunt bij deze berekening is dat de gevonden residu concentraties in nectar en stuifmeel (voornamelijk van zonnebloem, mais en koolzaad) representatief zijn voor veel meer gewassen. Helaas zijn er weinig gegevens in de openbare literatuur om dat te staven. Peer reviewed publicatie van de wel aanwezige gegevens in de toelatingsdossiers zouden deze lacune kunnen opvullen.

## Conclusie

In deze worst case benadering (gebaseerd op maximaal ingeschat gebruik door bijen, en uitgaande van volledige afhankelijkheid van verontreinigde nectar of stuifmeel) ontstaat geen risico voor acute toxiciteit via blootstelling door stuifmeel. De gevonden concentraties zijn dusdanig dat steeds een TER > 10 wordt gevonden, en derhalve zelfs veldstudies overbodig zijn.

Langdurige blootstelling via nectar zou, bij 100% afhankelijkheid van de verontreinigde nectar, voor nectarfoerageerders mogelijk een risico op sterfte opleveren bij imidacloprid (zonnebloem) en clothianidin (koolzaad). Beide toepassingen zijn niet toegelaten in Nederland, waardoor dit concrete risico hier niet relevant is. Het risico zou relevant kunnen zijn als de gevonden concentraties in nectar van koolzaad en zonnebloem representatief zijn voor nectar van andere plantensoorten.

Er moeten meer gegevens over de aanwezige concentraties residuen in nectar en stuifmeel in diverse gewassen worden gegenereerd of beschikbaar gemaakt.

Daar waar de TER < 10 is moeten veldstudies uitwijzen of schade optreedt (sub-letaal of letaal) op volksniveau. De resultante van mogelijk moeilijk te onderscheiden sub-letale effecten kan een verminderde 'performance' van het volk als geheel opleveren. Het spreekt voor zich dat dergelijke veldstudies voldoende groot van opzet moeten zijn om statistisch betrouwbare conclusies op te leveren (Creswell, 2010).

### 3.4 Monitoring van volken van imkers in de praktijk

Naast het opzetten van gerichte veldproeven is het ook mogelijk om in de praktijk te kijken wat er gebeurt met volken van imkers bij praktijktoepassingen van middelen. Omdat je eigenlijk niets omtrent de opzet van de studie in de hand hebt (en allerlei factoren variëren) moeten zulke monitoringen liefst groot worden opgezet. Twee recente publicaties tonen in Noord Amerika (VanEngelsdorp *et al.*, 2012) en Europa, China, Turkije en Israël (Van der Zee *et al.*, 2012) in heel grote monitoringen op basis van gegevens van de imkers de omvang van de bijenvolksterfte in recente jaren. Een monitorstudie kan naast andere factoren ook veel informatie geven over welke pesticiden, en in welke concentraties, worden aangetroffen in bijenvolken in de praktijk (zie vorige paragraaf).

Omdat de Franse imkers al jaren aangeven dat hun volken achteruitgaan bij foerageren op de zonnebloemdracht, en de honingooft van zonnebloemen ook terugloopt, werd een monitoring opgezet (Chauzat *et al.*, 2005, 2009 & 2011). Allereerst werd gekeken welke stoffen te vinden waren in de pollen-ladingen die bijen oogsten. Tevens werden op vijf locaties in Frankrijk een 25-tal volken intensief gevolgd. Hoewel allerlei stoffen werden teruggevonden (inclusief de varroa-bestrijdingsmiddelen en ook neonicotinoïden) kon geen verband met sterfte en achteruitgang van de volken worden aangetoond. Wel waren er verbanden met de verzorging van de volken (die liet wel eens wat te wensen over) en ziekten, o.a. Amerikaans vuilbroed.

Ook in Duitsland is een grote monitoring over vier jaren uitgevoerd (Genersch *et al.*, 2010), waaraan alle bijenonderzoeksinstituten meededen. Diverse andere partijen droegen bij aan het onderzoek: overheid, boerenorganisaties, imkerbonden, chemische industrie. Men gebruikte 10 volken per imker, bij 120 imkers verspreid over het hele land. De sterfte was in de vier jaren dat het onderzoek heeft gelopen niet erg hoog, en er konden geen verbanden worden aangetoond met de pesticiden, noch met het al dan niet foerageren op bijv. koolzaad (met zaadcoating met neonicotinoïden). Slechts drie factoren gaven een significant verband met de sterfte: de hoogte van de varroabesmetting in de herfst, de mate van besmetting met de virussen ABPV en DWV in de herfst, en de leeftijd van de koningin.

Een grote monitoring in de Verenigde Staten en Canada (Mullin *et al.*, 2010) liet zien dat er 98 stoffen konden worden aangetoond in bijen, in was, in stuifmeelvoorraden, in honing. Daaronder waren neonicotinoïden, maar ook allerlei andere stoffen, waaronder de door imkers toegepaste middelen tegen varroa en andere ziekten. Een verband met de sterfte van bijen en volken werd niet aangetoond.

In België bleek geen negatief verband tussen de teelt van maïs met imidacloprid zaadcoating en de ontwikkeling noch sterfte van bijenvolken (Nguyen *et al.*, 2009).

In Nederland is nog niet op grote schaal gemonsterd naar residuen van pesticiden, wel is er onder 170 imkers over het hele land gekeken naar de sterfte en het ziektekiemen profiel en de aanwezige milieuverontreiniging op bijen (zwarte metalen) door [bijen@wur](mailto:bijen@wur) (nog te publiceren).

Voor clothianidin kon de veldstudie van Cutler & Scott-Dupree (2007) geen schade in de bijenvolken (bijen en broedontwikkeling) aantonen na foerageren van de bijen op bloeiend koolzaad dat was geteeld uit met clothianidin gecoat zaden. Ook de overwintering van de volken was normaal nadien. De studie van Cutler & Scott-Dupree (2007) werd in de meta-analyse van Creswell (2011) als een van de twee bruikbare aangemerkt, omdat met een voldoende groot aantal volken werd gewerkt en deze lang genoeg (over de winter) werden gevolgd. Overigens was de scheiding tussen controle- en met clothianidin behandelde velden niet 100%, hetgeen de claim van een 'realistic worst case' enigszins relativeert.

In de grote monitoring studie van Mullin *et al.* (2010) werd clothianidin niet aangetroffen, in geen van de bijenmatrices, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Thiamethoxam werd in slechts één stuifmeelmonster aangetroffen (van de 350, in een concentratie van 53,3 µg/kg), maar in geen van de andere bijenmatrices, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Ze vonden wel 98 andere pesticiden en metabolieten in mengsels tot concentraties van 214 mg/kg in stuifmeel. Volgens de auteurs representeert dit de opmerkelijk zware belasting met toxische residuen waaraan het broed en de adulte bijen via voedsel blootstaan.

In de jarenlange grote monitoring in Duitsland (Genersch *et al.*, 2010) werden vele pesticiden (waaronder de acariciden tegen varroa) teruggevonden in bijenvolken. Clothianidin werd niet gevonden (werd wel op geanalyseerd). In de vier jaren monitoren werd thiamethoxam niet aangetroffen. Of het in de analyse was opgenomen wordt niet echt duidelijk. Er werden in deze studie geen verbanden ontdekt tussen de residuen en de wintersterfte. Een dergelijk verband werd wel gevonden met: 1) hoge varroabesmetting in oktober; 2) infectie met het deformed wing

virus (DWW) en acute bijen paralyse virus (ABPV) in de herfst; 3) de leeftijd van de koningin; en 4) de sterkte / zwakte van de volken in de herfst bij het inwinteren. De auteurs benadrukken wel dat dit niet het laatste woord is en dat er meer onderzoek nodig is om de rol van pesticiden in de gezondheid op lange termijn van bijenvolken vast te stellen.

## Conclusie

Uit de monitoringen bleek geen verband tussen neonicotinoïden en bijensterfte. Dat hoeft echter niet te betekenen dat er ook met zekerheid geen verband is; de gegevens zijn niet zodanig dat een verband tussen sterfte en neonicotinoïden volledig uit te sluiten is. Wanneer residuen werden aangetroffen waren het diverse, waardoor een oorzakelijk verband aanwijzen lastig is. Wel werd soms een verband tussen sterfte en andere factoren dan blootstelling aan neonicotinoïden aangetoond. Uit de monitoringen kan ook niet *linea recta* worden aangetoond dat die andere verbanden wel oorzakelijke verbanden zijn.

## 3.5 Risk assessment en vervolgonderzoek

Het huidige schema vereist op tier-1 acute toxiciteitstesten op volwassenbijen en op broed. Om echter de impact van neonicotinoïden OEPP/EPPO in het veld in te schatten moeten de testen behalve met hogere concentraties ook met veldrelevante concentraties worden uitgevoerd. Voor neonicotinoïden is inmiddels aangetoond dat ze in het voedsel van bijen worden opgenomen (nectar, stuifmeel) en in het nest terecht komen, in opslag of voor direct gebruik als voedsel voor bijen en hun larven (H 3.2). Ook in de was van de raten komen ze terecht. Wu *et al.* (2010) vonden geen verhoogde sterfte van larven die in sterk vervuilde wasraten werden opgekweekt, maar wel een vertraagde ontwikkeling. Deze broedraten bevatten een hele cocktail van residuen, waaronder enkele neonicotinoïden (in lage concentraties). Het is ook niet uitgesloten dat de vervuilde raten ziektekiemen bevatten. Het is dus nodig dat de neveneffecten van neonicotinoïden op broed worden onderzocht en dat 'no observable effect levels' (NOEL) worden vastgesteld.

Bij het onderzoek met honingbijen moet steeds onderkend worden dat het voedsel door een bij wordt opgenomen en doorgegeven aan de nestgenoten door trophallaxis. Een eerste studie liet geen verschil zien wanneer bijen individueel werden gevoed met imidacloprid vergeleken met groepsgewijs, omdat de  $48\mu\text{-LD}_{50}$  van 25 ng/bij niet verschilde tussen beide (Decourtye en Devillers, 2010). Toch bevelen we aan in toekomstige studies meer rekening te houden met de voedseloverdracht omdat het waarschijnlijk is dat er verdunning van de stof optreedt bij het doorgeven aan nestgenoten.

Op Tier-2 niveau wordt de NOEL, vastgesteld in Tier-1, gebruikt om de chronische orale toxiciteit vast te stellen bij individuele volwassen bijen. Acute toxiciteit geeft een eerste indicatie voor het echte risico maar het is nog steeds een incomplete meting. Daarom moeten potentiële neveneffecten na langdurige blootstelling aan neonicotinoïden worden vastgesteld (contact en oraal). Honingbijen zijn in de rapportages tot dusver blootgesteld tot een maximum van 10-11 dagen (laboratorium test) en 39 dagen (veld test). Het belang van een meer gestandaardiseerde aanpak voor wat betreft de leeftijd van de bijen, volksgrootte en de juiste blootstelling werd bevestigd door het 'Cox proportional hazard model' van Dechaume-Moncharmont *et al.* (2003) met een orale blootstelling aan 4 en 8  $\mu\text{g/l}$  imidacloprid gedurende 60 dagen.

Tier-2 onderzoek moet zowel larvale als volwassen stadia onderzoeken omdat de stoffen in het voedsel voorkomen, in stuifmeel en nectar. Volwassen bijen consumeren meer nectar dan stuifmeel, terwijl larvale stadia meer stuifmeel dan nectar gebruiken (Rortais *et al.*, 2005). Bij de volwassen bijen is het cruciaal om te weten hoe de bijen foerageren op het gewas, gebruiken ze stuifmeel of nectar of beide? Zoals al aangegeven worden neonicotinoïden in zowel stuifmeel als nectar aangetroffen, maar de residuanalyses zijn tot dusver vooral aan stuifmeel gedaan, en bovendien aan slechts een paar plantensoorten. Het is daarom hard nodig meer data te verzamelen over de residu-niveaus van neonicotinoïden in nectar, omdat het lastig is en bovendien misleidend kan zijn toxiciteitsgegevens verkregen met stuifmeel te vertalen naar nectar. Halm *et al.* (2003) bevestigden de noodzaak van een betere standaardisatie van de bijen-categorieën in het risk assessment, omdat op grond van literatuur gegevens de blootstelling aan imidacloprid hoger was voor winterbijen, nectarhaalsters en voedsterbijen dan voor larven,



wasproducerende bijen en stuifmeelhaalsters. Deze auteurs stellen voor om in plaats van de LD<sub>50</sub> of LC<sub>50</sub> de verhouding tussen de voorspelde omgevingsconcentratie (PEC) en de voorspelde geen-effect-concentratie (PNEC) te gebruiken om het risico in te schatten (PEC/PNEC).

Higher tier risk assessments worden uitgevoerd op volksniveau, om de sociale wisselwerking tussen individuen mee te nemen. De higher tier fase van het risk assessment is nodig om ferme conclusies te kunnen trekken over de toepasbaarheid van de stof onder veldomstandigheden. De resultaten zoals tot dusver voor neonicotinoiden (voornamelijk imidacloprid) verkregen onder laboratorium omstandigheden geven geen goede inschatting van de echte effecten op honingbijen in het veld. Honingbijen hoefden maar een paar signalen/ aanwijzingen te gebruiken in een complex doolhof in laboratorium studies, terwijl visueel leren in de natuur of het veld heel complex is. Yang *et al.* (2008) gebruikten bijen die getraind waren voorafgaand aan het risk assessment testen. Het markeren van (veel) bijen is echter heel erg arbeidsintensief. Decourtye *et al.* (2011) bevestigden een microchip op de rug van de bijen om sub-letale effecten van lage concentraties fipronil op het aantal foerageertrips vast te stellen. Voor hommels ontwierpen Mommaerts *et al.* (2010) een bioassay dat het mogelijk maakt in het laboratorium al sub-letale effecten van imidacloprid op foerageergedrag mee te nemen, zoals van vrij vliegende hommels in kassen.

Zoals al opgemerkt bij Tier-1, zal de relevantie van de testen sterk toenemen als wordt gewerkt met inbegrip van de veld-relevante concentraties. Dit was ook een van de belangrijkste aanbevelingen van Creswell (2010) naar aanleiding van zijn meta-analyse van 14 studies (veld en laboratoriumstudies, vooral gepubliceerde studies).

De veldrisicoanalyse moet alle mogelijke routes van blootstelling meenemen. Blootstelling aan neonicotinoiden via stof uit de zaaimachines is een veel gerapporteerde oorzaak van acute bijensterfte, vooral bij hoge luchtvochtigheden (Girolami *et al.*, 2011; Marzaro *et al.*, 2011).

Blootstelling zou ook kunnen optreden doordat bijen guttatievloeistof van bladeren van planten opnemen. Hoewel deze blootstellingsroute vaak als belangrijk wordt beschouwd zijn de data nog niet duidelijk. Zoals gerapporteerd door Thompson (2010) is de vloeistof voornamelijk 's morgens vroeg aanwezig en is het onvoldoende bekend in hoeverre dat overeenkomt met het tijdstip dat bijen foerageren voor water, en in hoeverre juist deze bron van water gebruikt wordt. Het is ook niet bekend in hoeverre residuen die achterblijven op het blad na indrogen van de guttatievloeistof een bron van blootstelling blijven (Thompson, 2010). Tapparo *et al.* (2011) rapporteerden dat imidacloprid concentraties in guttatievloeistof geen logisch verband hielden met de op de zaden aangebrachte dosis. Daarom, zolang geen eindconclusies kunnen worden getrokken is het raadzaam deze blootstellingsroute mee te nemen in het risicoanalyseschema voor neonicotinoiden en fipronil.

Blootstelling door oppervlaktewater dat verontreinigd is met neonicotinoiden uit omringende teelten zou in sommige gevallen in principe kunnen optreden. De concentraties zijn echter zelden dusdanig dat schade kan optreden en het oppervlaktewater in sloten is slechts een van de mogelijk bronnen van water voor bijen. Behalve in het vroege voorjaar en in perioden van grote hitte gebruiken bijen niet veel water (Seeley, 1995).

Tenslotte: het vaststellen van de risico's van het optreden van negatieve neveneffecten van neonicotinoiden door veldexperimenten met hele bijenvolken over voldoende lange perioden blijft de finale en onmisbare stap omdat het veld een complexe omgeving is waarin allerlei factoren de toxiciteit van de stoffen kan beïnvloeden. Wat betreft sociale wisselwerking tussen de bijen: bij andere sociale bijen dan honingbijen zoals hommels, kan dit al in een eerdere fase van het risk assessment, onder tier-1 worden meegenomen. Een gestandaardiseerde test met microvolkjes maakt het mogelijk letale en sub-letale effecten van neonicotinoiden op reproductie en gedrag van hommels te evalueren.



## 4. Conclusies en aanbevelingen

Neonicotinoïden zijn een belangrijke groep van insecticiden met bewezen effectiviteit in de bestrijding van belangrijke economische plagen zoals luizen, sprinkhanen en witte vliegen. De wijde toepassing van deze insecticiden, met een wereld marktwaarde van \$ 1 miljard, is te danken aan het selectieve werkingsmechanisme bij lage doseringen (Aliouane *et al.*, 2009). Neonicotinoïden werken als neurotoxinen in op het zenuwstelsel van de insecten via wisselwerking met de nAcetylCholinereceptoren. Met de bedoeling om potentiële gevaren van neonicotinoïden voor bijen vast te stellen hebben we in dit rapport alle beschikbare peer reviewde gegevens samengevat.

De belangrijkste conclusies zijn:

1. Gewasbeschermingsmiddelen zijn één van de mogelijke oorzaken van de sterfte van honingbijenvolken.
2. De neonicotinoïden en fipronil worden in Nederland toegepast, en kunnen derhalve in potentie ook hier een rol spelen bij de sterfte van bijenvolken.
3. Er is een grote variatie in de mate van giftigheid van de verschillende neonicotinoïden: de giftigste voor bijen (imidacloprid) is bijna 5000 keer giftiger dan de op een na minst giftige voor bijen (thiacloprid). De hoge giftigheid geldt ook voor fipronil.
4. De giftigheid uit zich in laboratoriumexperimenten in mortaliteit en bij lage doses (sub-letale doses) in verstoringen van gedrag, voortplanting en ziekteverstand van de bijen.
5. In veldproeven met normale velddoseringen werd echter geen schade door de middelen aan bijen (-volken) aangetoond. De blootstelling bleef mogelijk onder de schadedrempel, of de proeven hadden onvoldoende statistisch vermogen om verschillen aan te tonen.
6. De middelen worden als residu gevonden in stuifmeel van planten en in nectar: door hierop te foerageren en er van te eten kunnen bijen blootgesteld worden.
7. Hierdoor zou acute sterfte kunnen optreden, maar ook sterfte op de lange duur (door langdurige blootstelling aan lage doseringen).
8. Doseringen die geen sterfte geven kunnen wel eventuele schade veroorzaken: dit zijn sub-letale effecten.
9. De worst case blootstelling berekend uit de gevonden residu concentraties in stuifmeel gecombineerd met de stuifmeelconsumptie bleef onder de letale doses. Dat betekent dat deze residuen geen risico voor (letale effecten op) bijen vertegenwoordigen.
10. De worst case blootstelling berekend uit de gevonden residuen in nectar gecombineerd met de maximale nectarconsumptie bleef in twee gevallen (imidacloprid en clothianidin) niet onder het risiconiveau. Schade is echter niet gebleken in veldtesten.
11. Het niet zien van schade in veldtesten is geen absolute garantie dat er geen (nadelige) effecten zijn: sub-letale effecten zijn lastig aan te tonen en te kwantificeren.
12. Blootstelling via water (guttatievloeiwater van planten en oppervlaktewater) behoort tot de mogelijkheden.
13. De rol van guttatie is onwaarschijnlijk omdat er geen aanwijzingen zijn dat bijen hiervan oogsten, maar is niet volledig uit te sluiten.

14. Over de rol van oppervlaktewater als blootstellingsroute ontbreken gegevens.
15. Grote monitoringstudies toonden residuen aan in stuifmeel, nectar / honing en bijenwas in de bijenkast, evenals op de bijen zelf. Er was geen relatie tussen aanwezigheid van residuen en bijensterfte aantoonbaar.
16. Er werden relaties gevonden tussen bijensterfte en diverse andere factoren dan pesticiden.
17. De huidige toetsing in Europa volgens het risk assessment schema van middelen zoals neonicotinoïden en fipronil voldoet om bijen te beschermen tegen schade door deze middelen.
  - a) Dit geldt voor alle blootstellingsroutes (acuut: bespuiting, stof; oraal: stuifmeel, nectar, guttatievloeistof).
  - b) Er is geen informatie over oppervlaktewater als blootstellingsroute beschikbaar, de rol is waarschijnlijk beperkt.

Wij kunnen geen oordeel vellen over de beoordeling door het Ctgb omdat wij geen inzage hebben in de beoordelingsdossiers. De studies in de beoordelingsdossiers zijn niet op kwaliteit getoetst via peer review.

### *Aanbevelingen*

We concluderen dat het huidige OEPP/EPPO risk assessment schema voor systemische gewasbeschermingsmiddelen en biociden adequaat is voor neonicotinoïden, omdat het effecten op diverse stadia (larvaal en adult) en op zowel individueel als heel volk niveau meeneemt. Dat neemt niet weg dat er nog enkele aanbevelingen worden gedaan.

Bij gecalculeerd risico op schade (door blootstelling via bovengenoemde routes) worden in het toetsingsschema veldstudies vereist.

1. Vanwege mogelijke sub-letale en chronische effecten zijn goede (gedetailleerde, statistisch krachtige en langdurige) veldstudies noodzakelijk. De huidige zijn vaak te klein van opzet (statistiek), en te beperkt in de verzamelde data.
2. Studies moeten worden uitgevoerd met veldrealistische concentraties van de stoffen (naast eventueel hogere en lagere concentraties) en met realistische doseringen van eventuele interactiefactoren (zoals besmettingen met ziekteverwekkers).
3. Er moeten voldoende gegevens verzameld worden over residuen in allerlei gewassen waarbij de middelen (zullen) worden toegepast.
4. Er bestaat een schat aan vertrouwelijke toetsingsgegevens in de toelatingsdossiers. Deze moeten waar mogelijk, eventueel geanonimiseerd, worden gepubliceerd in wetenschappelijke peer gereviewde tijdschriften, zodat de wetenschappelijke kennis sterk vergroot wordt en geen onderzoek hoeft te worden overgedaan.
5. Concentraties van neonicotinoïden in oppervlakte water moeten worden onderzocht en gepubliceerd, evenals eventuele blootstelling van bijen via deze route.

## **4.1 Antwoord op de hoofdvraag**

De hoofdvraag die dit rapport beantwoordt is:

*Geeft de open beschikbare peer reviewed wetenschappelijke literatuur aanwijzingen dat met de huidige toelatingsbeoordeling ontoelaatbare risico's voor bijen zijn ontstaan?*

Er is op grond van peer reviewed literatuur geen aanwijzing dat de huidige toegepaste toelatingsbeoordeling belangrijke wetenschappelijke gegevens gemist heeft.

## 4.2 Aandachtspunten en perspectief

Neonicotinoïden worden via xyleem en floëem getransporteerd in planten. De tot zover aangetroffen residuen in nectar (gemiddeld 2 µg/kg) en stuifmeel (gemiddeld 3 µg/kg) waren lager dan de acute en chronische giftigheidsniveaus; er is echter een groot tekort aan betrouwbare data omdat analyses zijn uitgevoerd vlakbij de detectiegrenzen, en maar voor een paar plantensoorten. Ook de niveaus gevonden in door bijen verzamelde (en opgeslagen) en geproduceerde matrices waren laag. We bevelen daarom aan meer onderzoeken naar residuen uit te voeren omdat de gegevens nu voornamelijk zijn gebaseerd op slechts een paar grotere studies (uitgevoerd aan bijenstanden in Frankrijk, Duitsland en de Verenigde Staten). Bovendien kunnen we er vanuit gaan dat de grootschalige toepassing van neonicotinoïden op termijn zal leiden tot accumulatie van neonicotinoïden in de omgeving. Ontwikkeling van minder persistente neonicotinoïden is daarom geboden.

Er bestaat echter de noodzaak om meer te testen met veld-relevante concentraties, en veld-relevante blootstellings- en beoordelingsperiodes. Met name bij honingbijen moeten bij neveneffectbeoordeling de volken over de winter gevolgd worden, inclusief de voorjaarsontwikkeling daarna. Hoe kan anders iets gezegd worden over het effect van een stof op overwintering?

Het moet echter gezegd dat het scoren van sub-letale effecten op foeragegedrag en leergedrag / geheugen heel lastig en intensief is. Omdat zowel het genoom van de honingbij (*A. mellifera*) als dat van hommels (*B. terrestris*, *B. impatiens*) bekend is kan daaruit veel extra informatie gehaald worden om de complexe (netwerk) mechanismen onder natuurlijke omstandigheden te begrijpen. Dan kunnen behandelingen met pesticiden zoals neonicotinoïden een indicatie opleveren welke processen op moleculair niveau gaan lopen en in verband gebracht kunnen worden met de blootstelling. Een goed voorbeeld is de beschikbaarheid van een micro-array van de hersenen van de honingbij (Alaux, 2009). In de toekomst kunnen zulke nieuwe mogelijkheden ingebouwd worden in de toetsingschema's.

De nieuwere en veiliger neonicotinoïden, zoals de cyano-groep ten opzichte van de nitro-groep, is een goed voorbeeld van verdere ontwikkeling van milieuveiliger stoffen die het voorkomen van verschillende nAChR's in bijen benut. Hierbij moeten we opmerken dat de giftigheid van neonicotinoïden kan toenemen door synergistische effecten met andere stoffen, zoals aangetoond door Iwasa *et al.* (2004) voor mengsels met daarin een cyano-groep neonicotinoïde. Daarom moet het zoeken naar veiliger stoffen meteen gepaard gaan met onderzoek van de potentiële synergistische effecten van mengsels van andere stoffen met neonicotinoïden. Op dit moment ontbreekt dergelijk onderzoek.

Tenslotte: tijdens de voorbereiding van dit rapport werden we geconfronteerd met het feit dat resultaten / gegevens over concentraties, neveneffecten en risk assessments weliswaar beschikbaar zijn, maar veel data zijn verspreid en/of niet publiek beschikbaar. We adviseren een betere samenwerking tussen industrie, universiteiten en overheid wat kan leiden tot een beter risk assessment. Dat zal op zijn beurt helpen om heldere antwoorden te geven op de vragen en zorgen van de maatschappij en media.



## 5. Beschikbare literatuur per actieve stof

Voor de Nederlandse overheid is het van belang te weten in hoeverre de in Nederland geregistreerde toelatingen zich verhouden tot de gegevens uit de internationale peer reviewed literatuur. Daarom wordt hieronder de literatuur per stof behandeld beginnend met een summiere opsomming van de in Nederland geregistreerde toepassingen, en de in de Nederlandse toelating gebruikte getallen voor de acute giftigheid ( $LD_{50}$ ) (gegevens van de toelatingsinstantie Ctgb).

Dan volgen de in de openbaar beschikbare peer reviewed literatuur gevonden gegevens over acute giftigheid en chronische (sub-) letale giftigheid en sub-letale giftigheid.

De hier gevonden getallen worden vergeleken met de in de toelatingsprocedure gebruikte getallen voor giftigheid (zie boven).

Vervolgens wordt gekeken welke concentraties van het middel en eventuele metabolieten aangetroffen worden in voor bijen relevante matrices: stuifmeel, nectar, guttatievloeistof. Waar mogelijk wordt ook vastgesteld in hoeverre de stoffen in de bijenkast terecht komen, in honing, stuifmeelvoorraad (bijenbrood), de was van de bijenraat. Waar mogelijk worden binnen (veld-) studies deze gegevens gekoppeld aan de effecten op bijen. Met behulp van vastgestelde eindtermen voor giftigheid voor bijen ( $LD_{50}$ ; NOEC enz.) wordt onderzocht in hoeverre de (mogelijke) blootstelling in het veld, kort of langdurig, risico oplevert.

Tenslotte zijn er de monitoringen van bijenvolken waarbij is gezocht naar allerlei correlaties van bijensterfte met diverse factoren, waaronder de systemische pesticidenresiduen. Correlaties met sterfte kunnen in de monitoringen ook worden gevonden met allerlei andere factoren, ondanks aanwezigheid van residuen in die volken.

### **Doublures**

Doordat de hier behandelde literatuur dezelfde is als die in het hoofddocument zullen er veel doublures met de eerdere tekst optreden. Hier staan ze echter per stof gerubriceerd, en kunnen ze gekoppeld worden aan de in Nederland geregistreerde toelatingen.

## 5.1 Imidacloprid

### 5.1.1 Toepassingen (Ctgb):

Imidacloprid wordt in Nederland toegepast onder diverse merknamen voor diverse toepassingen als gewasbeschermingsmiddel: (water- of olie dispergeerbaar granulaat om te spuiten of aan te druppelen/gieten bij diverse gewassen, zoals kool, appel en peer (ruim voor de bloei), bloemisterijgewassen en bloembolgewassen buiten en onder glas, pennenteelt van witlof, boomkwekerij en grondbehandeling bij aardappelen). Daarnaast zaadcoatings in mais, suiker- en voederbieten, sla, andijvie, kool en prei. Voor niet professioneel gebruik zijn plantenstaafjes beschikbaar voor sierplanten in potten en bakken en granulaat voor gebruik als oplossing in water voor fruitbomen, siergewassen en gazon. Voor graszodenteelt en de greens van golfbanen is granulaat in de handel. Imidacloprid is ook de actieve stof in een aantal biociden, gebruikt tegen kakkerlakken, mieren en vliegen.

### 5.1.2 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,081 µg actieve stof /bij

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,0037 µg actieve stof / bij

### 5.1.3 Acute giftigheid literatuur

Een studie uitgevoerd door 7 verschillende onderzoekscentra in Europa rapporteerde de volgende acute toxiciteitsgegevens voor imidacloprid: LD<sub>50</sub> (contact)-48u: 49-102 ng/bij (Nauen *et al.*, 2001). Bij vergelijking met vroegere studies is er een lagere gevoeligheid; Stark *et al.* (1995) en Suchail *et al.* (2000) vonden een LD<sub>50</sub>-waarde die gelegen was tussen 6,7 -23,8 ng/bij.

Naast contact werd ook de orale toxiciteit van imidacloprid onderzocht: over verschillende studies varieerden de berekende LD50 (oraal)-48u-waarden tussen 41 ng/bij en >81 ng/bij, en de NOED-waarde was ≤1,5 ng/bij (Nauen *et al.*, 2001). In een studie van Decourtye *et al.* (2003) was de LD50-waarde lager, namelijk 30 ng/bij na 48u. Algemeen dient opgemerkt te worden dat orale blootstelling aan hoge imidaclopridconcentraties (bijvoorbeeld 81 ng/bij) een reductie van de suikerwateropname veroorzaakt van gemiddeld 33% (Nauen *et al.*, 2001). Naast de moedercomponent, zijn ook de dochtercomponenten van imidacloprid niet veilig voor honingbijen (Nauen *et al.*, 2001; Suchail *et al.*, 2001; Decourtye *et al.*, 2003). Nauen *et al.* (2001) concludeerden dat componenten met een nitroguanidine farmacofoor (terug te vinden in oleofin-, hydroxy- en dihydroxy-imidacloprid) toxisch zijn; de respectievelijke LD<sub>50</sub>-waarden (oraal) zijn >36 ng/bij, >49 ng/bij en 159 ng/bij terwijl metabolieten zonder deze farmacofoor (urea-metabooliet, 6-chloornicotinezuur) niet toxisch zijn; de respectievelijke LD<sub>50</sub>-waarden (oraal) waren >99.500 ng/bij en 121.500 ng/bij (Nauen *et al.*, 2001).

### 5.1.4 Chronische blootstelling

Decourtye *et al.* (2001) bestudeerden de effecten na een chronische blootstelling (oraal) gedurende 11 dagen aan 4-40 µg/kg imidacloprid op individuele werksters. Hier gaf enkel 4 µg/kg geen mortaliteit significant verschillend van de controle.

In een studie van Suchail *et al.* (2001) werden honingbijen gedurende 10 dagen oraal blootgesteld aan 0,1; 1 en 10 µg/L imidacloprid en zijn metabolieten. Mortaliteit startte 72u na behandeling en resulteerde in 50% mortaliteit 8 dagen na de start van de behandeling.

Decourtye *et al.* (2003) rapporteerden een LOEC-waarde van 24 en 120 µg/kg voor respectievelijk imidacloprid en zijn metabooliet 5-OHimidacloprid na chronische orale blootstelling van winterbijen.

In een semi-veldproef waarbij honingbijkasten chronische blootgesteld werden gedurende 39 dagen aan zonnebloemnectar verrijkt met imidacloprid aan 2; 5; 10 en 20µg/kg werd geen verhoogde directe mortaliteit waargenomen in vergelijking met de controle (Schmuck *et al.*, 2001). Eenzelfde besluit werd ook genomen door Faucon *et al.* (2005). Bovendien toonden zij aan dat er geen uitgestelde mortaliteit optrad ten gevolge van de



behandeling met imidacloprid aangezien de werkstermortaliteit niet hoger was gedurende de volgende winter (geen blootstelling aan imidacloprid). Deze bevindingen zijn in overeenstemming met Cresswell (2011). Zijn meta-analyse van 14 gepubliceerde studies over effecten van imidacloprid op honingbijen onder laboratorium en semi-veldcondities toont aan dat realistische veldconcentraties van imidacloprid in het voedsel geen letale effecten veroorzaken op honingbijen.

### 5.1.5 Sub-letale effecten (gedrag)

Naast toxiciteit veroorzaakt imidacloprid wanneer toegediend in subletale doses/concentraties neveneffecten op belangrijke processen zoals het oriëntatie- en leervermogen. Door middel van de 'olfactory learning en memory' bio-toets toonden Decourtye *et al.* (2004a) aan dat het leerproces negatief beïnvloed wordt gedurende de conditionering van de reflex (=uitduwen van de proboscis, proboscis extension reflex, PER) wanneer honingbijen gevoed werden met een sucrose oplossing met aan 24 µg/kg imidacloprid. Ook andere studies rapporteerden een dergelijk effect (Lambdin *et al.*, 2001; Decourtye *et al.*, 2001, 2003). Decourtye *et al.* (2003) demonstreerden dat ook de impact van imidacloprid op het leervermogen van bijen verschillend is naargelang winter- of zomerbijen gebruikt werden in de studie. Bij zomerbijen was de LOEC-waarde op het leergedrag 12 µg/kg terwijl deze 48µg/kg bedroeg voor winterbijen. Decourtye *et al.* (2004b) toonden ook via histochemische analyse aan dat imidacloprid (na orale toediening van 0.12 en 12 ng/bij) interfereert met het metabolisme van de hersenen van de blootgestelde bijen door een verhoogde cytochroom oxidase enzymactiviteit in de 'mushroom body'. Decourtye *et al.* (2004b) toonden via de PER bio-toets een effect aan op het middellange maar niet op het korte geheugen met 12 ng imidacloprid per bij. Gebruik makend van eenzelfde bio-toets demonstreerden Guez *et al.* (2001) dat het aantal testen nodig vooraleer er een gewenning optreedt van het uitduwen van de proboscis bij stimulatie van de antennen beïnvloed wordt door imidacloprid (contactdosering 0.1, 1 en 10 ng/bij). Bovendien was dit effect ook verschillend naargelang de leeftijd van de bij; bijvoorbeeld 7-dagen oude bijen hadden significant meer testen nodig alvorens gewenning optrad dan 7-dagen oude bijen in de controlegroep, vanaf 8 dagen oud was dit juist andersom. Yang *et al.* (2008) vonden een significant effect op het foerageerinterval (=tijdsinterval tussen 2 bezoeken aan dezelfde voedingsplaats). Wanneer honingbijen behandeld waren met imidacloprid was dit tijdsinterval >300s tegenover <300s in de controle; de LOEC-waarde was 50 µg/L. Bovendien dient er opgemerkt te worden dat er bij blootstelling aan concentraties van imidacloprid hoger dan 1200 µg/L abnormaal gedrag werd waargenomen waardoor sommige bijen niet meer in staat waren om de weg terug te vinden naar het voedsel. Negatieve effecten op de foerageeractiviteit en suikerwaterconsumptie werden ook waargenomen na een orale blootstelling (in het suikerwater) aan 48 µg/kg imidacloprid in een vliegkooi in het laboratorium (Ramirez-Romero *et al.*, 2005). Hier dient opgemerkt te worden dat de geteste concentratie 16 keer hoger is dan de gemiddelde gerapporteerde veldconcentratie in het pollen van zonnebloemen.

In tegenstelling tot de waarnemingen in het laboratorium rapporteerden verschillende semiveldstudies geen effecten op de volken. Chronische orale blootstelling tot 20µg/kg veroorzaakte geen neveneffecten (Schmuck *et al.*, 2001). Ook in een andere semiveldstudie waarbij honingbijkasten chronisch blootgesteld werden aan een sacharosesiroop verrijkt met imidacloprid aan 0,5 of 5 µg/L, werden geen neveneffecten waargenomen op de populatie van volwassen bijen en het voorkomen van ziektes (Faucon *et al.*, 2005). Daarentegen werd er een significant verhoogde frequentie genoteerd van pollentransport door volwassen bijen tijdens de periode van foerageeractiviteit en was het aantal gesloten broedcellen hoger in de nesten behandeld met imidacloprid. Deze effecten verdwenen wanneer de nesten niet langer gevoed werden met suikerwater verrijkt met imidacloprid. Ook volgens de meta-analyse van Cresswell (2011) zou het algemeen functioneren van de bijen dalen met 6 tot 20% ten gevolge van een blootstelling aan imidacloprid in het voedsel.

### 5.1.6 Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

#### *Translocatie van residuen in planten*

Verschillende studies hebben de translocatie van imidacloprid vanuit zaadbehandeling naar verschillende onderdelen van zonnebloemen (*Helianthus annuus*) onderzocht. In een kas-experiment vonden Schmuck *et al.* (2001) in zonnebloemen behandeld met 0.7 mg <sup>14</sup>C-imidacloprid per zaadje (Gaucho; 700 g/kg WS) een gemiddeld gehalte

aan imidacloprid van  $3.9 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  pollen en  $1.9 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  in nectar. In nectar was alleen imidacloprid aanwezig, terwijl in pollen 85% van de residuen aanwezig was als imidacloprid; er werden geen metabolieten gedetecteerd. In een veldstudie werd bij dezelfde dosering geen imidacloprid teruggevonden in nectar, pollen of honingbijen, terwijl in de bladeren van de zonnebloemen  $7 \mu\text{g}/\text{kg}$  imidacloprid en  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  van de hydroxy-metabooliet werd gemeten (Schmuck *et al.*, 2001). In dezelfde veldstudie werden ook zonnebloemen verbouwd op gronden die in de jaren daarvoor een imidacloprid behandeling hadden gehad en nog  $<2$  tot  $18 \mu\text{g}/\text{kg}$  imidacloprid bevatten. De zonnebloemen kregen geen imidacloprid behandeling. Er werd geen imidacloprid gevonden in pollen en nectar, en ook niet in bijen die gedurende 2-3 dagen konden foerageren op de zonnebloemen (detectiegrens  $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Schmuck *et al.*, 2001).

Bonmatin *et al.* (2003) onderzochten maïs- en zonnebloemmonsters op imidacloprid. Alle gewassen hadden een zaadbehandeling ontvangen. In 58% van de pollenmonsters werd imidacloprid aangetroffen, met een gemiddeld gehalte van  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  (range  $1-11 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) in het stuifmeel van zonnebloemen en  $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  in het stuifmeel van maïs. Wanneer deze gewassen het volgende jaar opnieuw op dezelfde grond werden verbouwd (zonder zaadbehandeling; gemiddeld nog  $6 \mu\text{g}/\text{kg}$  in de grond) werd geen imidacloprid in het pollen aangetroffen ( $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Charvet *et al.*, 2004).

Slechts 5% van de imidacloprid dosering (1 mg/kg zaad; 30% hoger dan aanbevolen dosering) werd opgenomen vanuit het zaad, hetgeen leidde tot gehalten in zonnebloempollen van  $<0.5-36 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Laurent & Rahahao, 2003).

Girolami *et al.* (2009) vonden dat een deel van het door de kiemplant van maïs opgenomen imidacloprid via zogenaamde guttatievloeistof kan worden uitgescheiden. Dit betreft de druppeltjes vloeistof die aan het bladuiteinde hangen; uitscheiding van guttatievloeistof lijkt beperkt te blijven tot de eerste drie weken na kieming (Girolami *et al.*, 2009; Thompson, 2010). In die periode zijn de concentraties imidacloprid echter ook bijzonder hoog. Gerolami *et al.* (2009) vonden in de vloeistof van planten gekweekt in het laboratorium met een zaadbehandeling van 0.5 mg/zaad (Gaucho 350 FS) gemiddeld  $47 \pm 9.96$  mg/l; in een ander experiment werd gemiddeld  $83.8 \pm 14.1$  mg/l gemeten. Hoewel ook melding wordt gemaakt van monsternamen aan planten in het veld, worden daarvan geen gehalten gerapporteerd. Het belang van guttatievloeistof voor bijen is niet helemaal duidelijk. Deze vloeistof wordt vroeg in de ochtend aan de planten gevonden; of dat correspondeert met het moment waarop bijen of andere bestuivers actief zijn en in welke mate ze deze vloeistof opnemen is niet duidelijk. Evenmin is duidelijk of residuen die na opdrogen van deze vloeistof op het blad achterblijven een bron van blootstelling kunnen zijn (Thompson 2010).

Naast bovengenoemde studies worden in de literatuur ook nog enkele onduidelijke of minder op de Nederlandse situatie van toepassing zijnde studies gerapporteerd. Zo deden Krischik *et al.* (2007) een studie met *Fagopyrum esculentum* (boekweit), in potten behandeld met Marathon (1% imidacloprid). Op basis van de in het artikel gepresenteerde gegevens is de dosis niet goed in te schatten. Een normale dosis leidde tot concentraties van 16, 2.4 resp.  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  aan imidacloprid, de hydroxy-metabooliet resp. de olefin-metabooliet in de nectar. Het is echter onduidelijk hoe deze gehalten zijn bepaald of afgeleid uit de concentraties in mg/kg die de auteurs ook noemen. Een vergelijkbaar probleem doet zich voor met de studie van Choudhary & Sharma (2008), die geen residuen van imidacloprid terugvonden in de nectar en pollen van mosterd (*Brassica juncea*) behandeld met 21 g imidacloprid per kg zaad. De nectar en pollen werden 'geëxtraheerd' van bijen, maar onduidelijk is hoe lang de bijen op het gewas konden foerageren.

## 5.1.7 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

### *Residuen in pollen, honing, was en bijen*

Een uitgebreide inventarisatie van imidacloprid in pollen, honing en bijen werd uitgevoerd door Chauzat *et al.* (2006, 2009, 2011). Het onderzoek betrof een vijftal gebieden verspreid over Frankrijk, waarbij in elk gebied bij vijf imkers de kasten werden bemonsterd gedurende 3 jaar, met 4 bemonsteringen per jaar. In totaal werden 185 pollen-, 239 honing- en 187 bijenmonsters geanalyseerd. Imidacloprid werd gevonden in 40.5%, 21.8% resp. 11.2% van deze monsters, terwijl de metabooliet 6-chloornicotinezuur aanwezig was in 33.0%, 17.6% resp. 18.7% van de monsters. Gehalten aan imidacloprid in pollen, honing en bijen waren resp.  $>0.2-5.7$  (gem. 0.9),  $>0.3-1.8$  (gem. 0.7) en  $>0.3-11.1$  (gem. 1.2)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , terwijl die aan 6-chloornicotinezuur resp.  $>0.2-9.3$  (gem. 1.2),  $>0.3-10.2$  (gem. 1.2) en

>0.3-1.7 (gem. 1.0) µg/kg bedroegen (Chauzat *et al.*, 2011). Onbekend is op welke schaal imidacloprid is toegepast in de gebieden waarin bemonstering van de bijen plaatsvond.

Een vergelijkbare studie in België, met eenmalige bemonstering van bijen en bijenwas, leverde slechts in 5 van de 109 monsters een detecteerbaar imidacloprid signaal, met gehalten <0.084 µg/kg (Pirard *et al.*, 2007). Een andere studie in België, in een gebied waar naar schatting 13.2% van de maïs was behandeld met imidacloprid, leverde evenmin detecteerbare concentraties imidacloprid in bijen en bijenwas (detectiegrens 0.05 µg/kg); in honing werd gemiddeld 0.275 µg/kg imidacloprid gemeten (Nguyen *et al.*, 2009). De oorsprong van deze imidacloprid is onduidelijk, omdat maïs geen nectar levert, en er geen zonnebloemeteelt in de buurt was aangetroffen.

Studies in Spanje, uitgevoerd in 2008-2009, vonden geen residuen van imidacloprid in honing (93 monsters van 73 imkers in noordwest Spanje; detectiegrens 2.33 µg/kg) (Garcia-Chao *et al.*, 2010) of in opgeslagen pollen (diverse regio's in Spanje; 61 resp. 845 voorjaars- + 176 najaarsmonsters; detectiegrens 0.4 µg/kg) (Higes *et al.*, 2010 resp. Bernal *et al.*, 2010). De laatstgenoemde studie vond ook geen residuen van de metaboliet chloornicotinezuur in de pollenmonsters (Bernal *et al.*, 2010).

In een beperkte studie in Griekenland, waarbij 5 imkers die last hadden van verhoogde bijensterfte werden bezocht, werd in 3 van de 5 bijenmonsters imidacloprid (14-38 µg/kg) gevonden, maar er werd geen imidacloprid gedetecteerd in de suiker of 'sugar patty' (Bacandritos *et al.*, 2010).

Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in de Verenigde Staten en Canada. In 2 van de 208 monsters bijenwas werd imidacloprid aangetroffen (2.4-13.6 µg/kg) en in 2.9% van de pollenmonsters (gemiddeld 3.1 µg/kg). In pollen werd ook eenmaal de olefin-metabooliet gevonden en eenmaal de hydroxy-metabooliet. In bijen werden geen imidacloprid-residuen gevonden (detectiegrens 2.0 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010).

## 5.1.8 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD50

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van maïs en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

### Resultaat

Imidacloprid: De gevonden concentraties in nectar van zonnebloem (1,9 µg/kg, Schmuck *et al.*, 2001 en Bonmatin *et al.*, 2001) zouden een geaccumuleerde dosis geven van maximaal 4,3 nanogram per bij in 7 dagen (Rortais *et al.*, 2005). Dit is het worst case scenario, want gebaseerd op volledig voeden op nectar met de genoemde concentratie aan imidacloprid, en op het gebruik door een nectarfoerageerster. Foerageren voor nectar is de meest energie intensieve taak in het bijenvolk, een nectarfoerageerster gebruikt 224-899 mg suiker in 7 dagen. Omdat zonnebloemnectar ongeveer 40% suiker bevat, heeft een bij  $2,5 * (224-899) = 560-2248$  mg nectar nodig. Met een concentratie van 1,9 ng/g levert dat na een week een dosis imidacloprid op van 1,06 - 4,27 ng/bij, dus maximaal  $4,27/7 = 0,61$  ng/bij per dag. De Toxicity Exposure Ratio (TER) is dan  $LD_{50}$  (oraal) / PEC (Probable Exposure Concentration), in dit geval:  $TER = 3,7 \text{ ng} / 0,61 = 6,07$ . Een  $TER > 10$  wordt als een laag tot geen risico gerekend.

Via stuifmeel zouden vooral de voedsterbijen belast worden, zij consumeren in de 8 dagen dat ze voedster zijn 65 mg stuifmeel. Als larve neemt een bij nog 5 mg stuifmeel op. Dat zou gebaseerd op een concentratie in stuifmeel van 3,4 µg/kg (Schmuck *et al.*, 2001) een belasting per bij van 0,2 ng imidacloprid opleveren (in 10 dagen, per dag 0,02) en een  $TER$  van  $3,7/0,02 = 185$ .

### 5.1.9 Metabolisme en bio-accumulatie

Imidacloprid wordt vlot gemetaboliseerd door de honingbij *Apis mellifera*. Na blootstelling via suikerwater aan doseringen van 20, 50 of 100 µg <sup>14</sup>C-imidacloprid/kg bij werden halfwaardetijden gemeten van 4-5 uur (Suchail *et al.*, 2004a,b). Deze doseringen liggen dicht bij de LD50 van 50 µg/kg bij (Suchail *et al.*, 2004b). De voornaamste metabolieten zijn 4/5-hydroxy-imidacloprid en olefin. Olefin bereikte de hoogste concentratie na ca. 4 uur terwijl de hydroxy-metaboliet(en) ofwel direct na beëindiging van de blootstelling verschenen en dan in concentratie afnamen (Suchail *et al.*, 2004b) of ook een piek vertoonden na ca. 4 uur (Suchail *et al.*, 2004a). De totale hoeveelheid imidacloprid en metabolieten in de honingbijen nam af met een halfwaardetijd van 25 uur (Suchail *et al.*, 2004a).

### 5.1.10 Monitoring van volken van imkers in de praktijk

Naast het opzetten van gerichte veldproeven is het ook mogelijk om in de praktijk te kijken wat er gebeurt met volken van imkers bij praktijktoepassingen van middelen. Omdat je eigenlijk niets omtrent de opzet van de studie in de hand hebt (en allerlei factoren variëren) moeten zulke monitoringen liefst groot worden opgezet. Een monitorstudie kan naast andere factoren ook veel informatie geven over welke pesticiden en in welke concentraties worden aangetroffen in bijenvolken in de praktijk (zie vorige paragraaf).

Omdat de Franse imkers al jaren aangeven dat hun volken achteruitgaan op de zonnebloemdracht, en de honingooft van zonnebloemen ook terugloopt, werd een monitoring opgezet (Chauzat *et al.*, 2005, 2009& 2011). Allereerst werd gekeken welke stoffen te vinden waren in de pollen-ladingen die bijen oogsten. Tevens werden op vijf locaties in Frankrijk een 25-tal volken intensief gevolgd. Hoewel allerlei stoffen werden teruggevonden (inclusief de varroa-bestrijdingsmiddelen en ook neonicotinoïden) kon geen verband met sterfte en achteruitgang van de volken worden aangetoond. Wel waren er verbanden met de verzorging van de volken (die liet wel eens wat te wensen over) en ziekten, o.a. Amerikaans vuilbroed.

Ook in Duitsland is een grote monitoring over vier jaren uitgevoerd (Genersch *et al.*, 2010), waaraan alle bijenonderzoeksinstituten meededen. Diverse partijen droegen bij aan het onderzoek: boerenorganisaties, imkerbonden, chemische industrie. Men gebruikte 10 volken per imker, bij 120 imkers verdeeld over het hele land. De sterfte was in de vier jaren dat het onderzoek heeft gelopen niet erg hoog, en er konden geen verbanden worden aangetoond met de pesticiden, noch met het al dan niet foerageren op bijv. koolzaad (met zaadcoating met neonicotinoïden). Slechts drie factoren gaven een significant verband met de sterfte: de hoogte van de varroabesmetting in de herfst, de mate van besmetting met de virussen ABPV en DWV in de herfst, en de leeftijd van de koningin.

Een grote monitoring in de Verenigde Staten en Canada (Mullin *et al.*, 2010) liet zien dat er 98 stoffen konden worden aangetoond in bijen, in was, in stuifmeelvoorraden en in honing. Daaronder waren neonicotinoïden, maar ook allerlei andere stoffen, waaronder de door imkers toegepaste middelen tegen varroa en andere ziekten. Een verband met de sterfte van bijen en volken werd niet aangetoond.

In België bleek geen negatief verband tussen de teelt van maïs met imidacloprid zaadcoating en de ontwikkeling noch sterfte van bijenvolken (Nguyen *et al.*, 2009).

In Nederland is nog niet op grote schaal gemonsterd naar residuen van pesticiden, wel is er onder 170 imkers over het hele land gekeken naar de sterfte, het ziektekiemenprofiel en de aanwezige milieuverontreiniging bij bijen (zware metalen) door [bijen@wur](mailto:bijen@wur) (nog te publiceren).

## 5.2 Clothianidin

### 5.2.1 Toepassingen (Ctgb)

Clothianidin wordt toegepast voor de coating van bietenzaad en zaad voor snij- en korrel-mais. Clothianidin heeft geen niet-professionele toepassingen en wordt niet als biocide gebruikt.

### 5.2.2 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,04426 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,00379 µg a.s./bij. LD<sub>50</sub> metaboliet TZNG = 3,9 µg/bij

### 5.2.3 Acute giftigheid literatuur

Bailey *et al.* (2005) toonden met behulp van een contacttest aan dat clothianidin een hogere toxiciteit heeft in vergelijking met andere pesticiden zoals carbofuran. Na spuittoepassing kan ook toxiciteit optreden ten gevolge van residuen. Volgens Bailey *et al.* (2005) veroorzaakten residuen van clothianidin net zoals van spinosad en imidacloprid geen werkstermortaliteit. Ook vonden dezelfde auteurs geen effect wanneer honingbijen gevoed werden met pollen afkomstig van een veld behandeld met deze insecticiden.

### 5.2.4 Chronische blootstelling

Wu *et al.* (2011) maten clothianidin in (lege) broedramen van bijen in de Verenigde Staten van Amerika. Een van de dertien monsters bevatte clothianidin in een concentratie van 35 µg/kg. De raten bevatten ook heel veel andere residuen, vooral ook van door imkers gebruikte middelen tegen varroa (duizenden µg/kg). Bij het kweken van bijenlarven in dergelijke raten bleken ze in een kooiproef veel trager te ontwikkelen. Maar aan welke van de gifstoffen in de hele cocktail dat uiteindelijk gelegen heeft is niet vast te stellen. Bovendien is niet zeker dat de raten niet ook besmet waren met (vele) ziektekiemen.

### 5.2.5 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

*Residuen in pollen, honing, was en bijen*

In honing, nectar, pollen en was van honingbijen, die werden blootgesteld in velden van *Brassica napus* (koolzaad) behandeld met 4 g/kg clothianidin, werden geen kwantificeerbare residuen gemeten. De maximaal gemeten hoeveelheden bedroegen 0.93, 2.24, 2.59 resp. <0.9 µg/kg (Cutler and Scott-Dupree, 2007).

In een beperkte studie in Griekenland, waarbij 5 imkers die last hadden van verhoogde bijensterfte werden bezocht, werd geen clothianidin gevonden in bijen, suiker of 'sugar patty' (Bacandritos *et al.*, 2010).

Girolami *et al.* (2009) vonden 23.3±4.2 mg/l clothianidin in de guttatievloeistof van jonge maïsplanten die een zaadbehandeling van 1.25 mg/zaad (Poncho) hadden gehad en waren gekweekt in het laboratorium.

Zie ook de studie van Wu *et al.* (2011) boven: in een enkele raat uit een hele serie werd clothianidin aangetroffen (die raat werd vervolgens gebruikt voor een proef), als een van de aanwezige residuen van een hele cocktail. Andere middelen (vooral die tegen varroa) waren veel vaker en in veel hogere concentraties aanwezig.

### 5.2.6 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD<sub>50</sub>

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van maïs en nectar van zonnebloemen

soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens in de openbare literatuur over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

### Resultaat

Clothianidin: de gevonden 2.24 µg/kg in nectar van koolzaad (Cutler & Scott-Dupree, 2003) (suiker gehalte 470 g/l; Creswell 1999) zou een nectarfoerageerster in de loop van een week foerageren maximaal een geaccumuleerde dosis van 1,07 tot 4,28 ng kunnen opleveren, per dag 0,153 - 0,611 ng/bij. De orale LD<sub>50</sub> is 4 ng/bij. Dat resulteert in een TER = 6,56 – 26,3. Een TER > 10 geldt als geen of laag risico.

Via stuifmeel zouden vooral de voedsterbijen belast worden, zij consumeren in de 8 dagen dat ze voedster zijn 65 mg stuifmeel. Als larve neemt een bij nog 5 mg stuifmeel op. Via 2,24 µg/kg in stuifmeel (Cutler & Scott-Dupree, 2003) zou een voedster met 0,15 ng worden belast in 10 dagen, per dag 0,015. De TER = 4/0,015 = 267. Krupke *et al.* (2012) vonden echter hogere concentraties in stuifmeel van mais (3,9 µ/kg). Deze concentratie zou leiden tot een opname door een voedster van 0,25 ng per bij, en 0,025 per dag over een periode van 10 dagen. De TER = 4 / 0,025 = 160. Krupke *et al.* (2012) vonden nog veel hogere concentraties in door bijen verzameld stuifmeel (max. 88µg/kg). Deze hoge gehalten moeten echter zijn veroorzaakt door het zaaien van gecoate zaden tijdens de bloei (stofdrift) in verband met de proef. (De hoogste concentratie zou leiden tot een dosis in tien dagen van 5,72 ng per bij, 0,572 per dag. De TER = 7,6).

## 5.2.7 Monitoring van volken van imkers in de praktijk

Zie de gegevens bij imidacloprid. De grote veldstudie van Cutler & Scott-Dupree (2007) kon geen schade in de bijenvolken (bijen en broedontwikkeling) aantonen na foerageren van de bijen op bloeiend koolzaad dat was geteeld uit met clothianidin gecoate zaden. Ook de overwintering van de volken was normaal in de winter na de blootstelling. In de grote monitoring studie van Mullin *et al.* (2010) werd clothianidin niet aangetroffen, in geen van de in de bijenkast aangetroffen componenten, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Ze vonden wel 98 andere pesticiden en metabolieten in mengsels tot concentraties van 214 mg/kg in stuifmeel. Volgens de auteurs representeert dit de opmerkelijk zware belasting met toxische residuen waaraan het broed en de adulte bijen via voedsel blootstaan.

In de jarenlange grote monitoring in Duitsland (Genersch *et al.*, 2010) werden vele pesticiden (waaronder de acariciden tegen varroa) teruggevonden in bijenvolken. Clothianidin werd niet gevonden (werd wel op geanalyseerd). Er werden in deze studie geen verbanden ontdekt tussen de residuen en de wintersterfte. Een verband werd wel gevonden met:

1. een hoge varroabesmetting in oktober
2. infectie met het deformed wing virus (DWW) en acute bijen paralyse virus (ABPV) in de herfst
3. de leeftijd van de koningin
4. de sterkte / zwakte van de volken in de herfst bij het inwinteren

De auteurs benadrukken dat dit niet het laatste woord is en dat er meer onderzoek nodig is om de rol van pesticiden op de gezondheid op lange termijn van bijenvolken vast te stellen.

## 5.3 Thiamethoxam

### 5.3.1 Toepassingen (Ctgb):

Thiamethoxam wordt toegepast voor gewasbehandeling (bespuiting) bij aardappelen, bol- + knolbloemgewassen, bloemisterij gewassen, boomkwekerij en vaste planten, tevens voor grondbehandeling bij aardappel, en voor zaadbehandelingen van mais, erwten, peulen en kapucijners, bieten, sla en andijvie. Tevens voor niet-professioneel gebruik in sierplanten binnenshuis. Daarnaast is er nog een biocide tegen vliegen.

### 5.3.2 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,024 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,005 µg a.s./bij

NB ook getallen voor hommels beschikbaar: Contact LD<sub>50</sub>: 0,11 µg formulering (WG 25%) per werkster; LD<sub>50</sub> oraal: 0,02 µg formulering (WG 25%) per hommel werkster.

### 5.3.3 Chronische blootstelling

Een chronische blootstelling gedurende 11 dagen via contact of oraal veroorzaakte geen significante honingbijmortaliteit: 10% bij 1 ng/bij en 20% bij 0,1 ng/bij (Aliouane *et al.*, 2009).

Wu *et al.* (2011) maten thiamethoxam in (lege) broedramen van bijen in de Verenigde Staten van Amerika. Een van de dertien monsters bevatte thiamethoxam in een concentratie van 38 µg/kg. De raten bevatten ook heel veel andere residuen, vooral ook van door imkers gebruikte middelen tegen varroa (duizenden µg/kg). Bij het kweken van bijenlarven in dergelijke raten bleken deze in een kooiproef veel trager te ontwikkelen. Maar aan welke van de gifstoffen in de hele cocktail dat uiteindelijk gelegen heeft is niet vast te stellen. Bovendien is niet zeker dat de raten niet ook besmet waren met (vele) ziektekiemen.

### 5.3.4 Sub-letale effecten (gedrag)

Blootstelling aan subletale doses/concentraties resulteert in subletale effecten op de honingbij. Acute contact en orale blootstelling aan subletale doses (0,1; 0,5; 1 ng/bij) had geen effect op de 'locomotor activity', 'sucrose en water responsiveness' (El Hassani *et al.*, 2008). Contactblootstelling aan 1 ng/bij (= 1/5 van de LD50-waarde) had een significant effect op het leervermogen en 0.1 ng/bij (contact) had een significant effect op het geheugen van honingbijen na 24uur (Aliouane *et al.*, 2009). Daarnaast was er ook een significante daling van de 'sucrose responsiveness' wanneer bijen oraal blootgesteld waren aan 1 ng/bij, maar dit effect verdween bij een lagere dosis (0,1 ng/bij). Er werden geen effecten waargenomen op de activiteit van de bijen, en hun 'water responsiveness' en waterconsumptie.

### 5.3.5 Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

Girolami *et al.* (2009) vonden 11.9±3.32 mg/l thiamethoxam in de guttatievloeistof van jonge maisplanten die een zaadbehandeling van 1 mg/zaad (Cruiser 350 FS) hadden gehad en waren gekweekt in het laboratorium.

### 5.3.6 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

*Residuen in pollen, honing, was en bijen*

In een beperkte studie in Griekenland, waarbij 5 imkers die last hadden van verhoogde bijensterfte werden bezocht, werd geen thiamethoxam gevonden in bijen, suiker of 'sugar patty' (Bacandritos *et al.*, 2010).

Studies in Spanje, uitgevoerd in 2008-2009, vonden geen residuen van thiamethoxam in honing (93 monsters van 73 imkers in noordwest Spanje; detectiegrens 0.51 µg/kg) (Garcia-Chao *et al.*, 2010)

Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in de Verenigde Staten en Canada. Thiamethoxam werd niet gevonden in bijen of was, en in slechts 1/(350) pollenmonster (53.3 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010).

Wu *et al.* (2011) maten thiamethoxam in (lege) broedramen van bijen in de Verenigde Staten van Amerika. Een van de dertien monsters bevatte thiamethoxam in een concentratie van 38 µg/kg. De raten bevatten ook heel veel andere residuen, vooral ook van door imkers gebruikte middelen tegen varroa (duizenden µg/kg).

### 5.3.7 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD<sub>50</sub>

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

#### *Resultaat*

Thiamethoxam: er zijn geen concentraties in nectar / honing beschikbaar in de literatuur

De ene (heel hoge) waarde van thiamethoxam gevonden in stuifmeel van 53 µg/kg (Mullin *et al.*, 2010) zou een voedster in tien dagen een dosis van 3,44 ng opleveren, 0,344 ng per dag. TER = 14,5 De gehalten gevonden door Krupke *et al.* (2012) in stuifmeel direct van maisplanten (1,7 µg/kg) en in pollenkorfjes verzameld door bijen (1,2 – 7,4 µg/kg) zouden leiden tot een dosis van 0,078 – 0,481 ng per bij in 10 dagen, 0,0078 – 0,0481 ng per bij per dag. De TER = 104 tot 641.

### 5.3.8 Monitoring van volken van imkers in de praktijk

In de grote monitoring studie van Mullin *et al.* (2010) in 23 staten van de VS en een provincie van Canada werd thiamethoxam in 1 stuifmeelmonster aangetroffen (van de 350, in een concentratie van 53,3 µg/kg), maar in geen van de andere bijen matrices, hoewel er wel op werd geanalyseerd. Ze vonden wel 98 andere pesticiden en metabolieten in mengsels tot concentraties van 214 mg/kg in stuifmeel. Volgens de auteurs representeert dit de opmerkelijk zware belasting met toxische residuen waaraan het broed en de adulte bijen via voedsel blootstaan. In de vierjaren monitoren in Duitsland (Genersch *et al.*, 2010) waarin vele stoffen waaronder veel acariciden tegen varroa werden gevonden werd thiamethoxam niet aangetroffen. Of het in de analyse was opgenomen wordt niet echt duidelijk.



## 5.4 Thiacloprid

### 5.4.1 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 38.82 µg a.s./bij 480)

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 17.32 µg a.s./bij

### 5.4.2 Acute giftigheid literatuur

Elbert *et al.* (2000) rapporteerden een contact LD<sub>50</sub>-waarde na 24 uur van 24,2 µg/bij, Iwasa *et al.* (2004) 24,2 µg/bij (24 uur) en Decourtye & Devillers (2011) 38,8 µg/bij (48 uur). De orale LD<sub>50</sub> (48 uur) was 17,3 µg/bij (Decourtye & Devillers, 2011).

### 5.4.3 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

In pollen verzameld 1 resp. 6 dagen na bespuiting van appelbomen in Slovenië met Calypso SC 480 in een dosis van 0.2 kg/ha (ca. 0.1 kg Al/ha) werden thiacloprid-gehalten van 60 resp. 30 µg/kg gemeten. In bijenbrood werd geen thiacloprid gedetecteerd (detectiegrens 10 µg/kg) (Smodis Skerl *et al.*, 2009).

Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in Noord-Amerika en Canada. Thiacloprid werd gevonden in 1.9% van de 208 monsters bijenwas (gem. 0.1 µg/kg) en in 5.4% van de pollenmonsters (gem. 1.3 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010).

In de monitoring in Duitsland was in 2006 thiacloprid het meest gevonden insecticide: in 9 van de 105 monsters (bijenbrood). In 2007 zat het zelfs in 62 van de 110 monsters bijenbrood. Zie bij de andere middelen: er werd geen verband met sterfte van de volken gevonden.

### 5.4.4 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD<sub>50</sub>

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden ophopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

#### Resultaat

Thiacloprid: één heel hoge gevonden waarde (Johnson *et al.*, 2011) van 33 µg/kg in honing zou een maximaal geaccumuleerde dosis geven van 9,24 tot 37,1 nanogram per bij, maximaal 5,3 ng per dag. TER = 17320 / 5,3 = 3268.

Mullin *et al.* (2010) vonden 1,3 µg/kg in pollen. Dat zou een belasting geven van 0,08 ng per bij. De hoogste gevonden waarde (115 µg/kg; Johnson *et al.*, 2011) zou 7,47 ng per bij betekenen. TER = 17320/ 0,75 = 23093.

## 5.5 Acetamiprid

### 5.5.1 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = ~8.09 µg a.s./bij

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = ~ 14.53 µg a.s./bij

### 5.5.2 Acute giftigheid literatuur

Studies die de acute toxiciteit beschouwen zijn beperkt tot Iwasa *et al.* (2004). Zij rapporteerden een LD50-24u (contact) van 7,1 µg/bij. Ook dochtercomponenten kunnen toxisch zijn. De dochtercomponenten van acetamiprid zijn N-dimethyl-acetamiprid, 6-chloor-3-pyridylmethanol en 6-chloor-nicotinezuur. Blootstelling aan deze metabolieten met 50 µg/bij veroorzaakte geen toxiciteit (Iwasa *et al.*, 2004).

### 5.5.3 Chronische blootstelling

Aliouane *et al.* (2009) vonden geen significante toegenomen werkstermortaliteit na chronische (11 dagen) orale en contact blootstelling aan 1 µg/bij acetamiprid. De waargenomen mortaliteit in controle en behandelde bijen was gelijk (20-26%) na 11 dagen.

### 5.5.4 Sub-letale effecten (gedrag)

Verschillende studies onderzochten de subletale effecten na blootstelling aan subletale doses/concentraties op honingbijen.

El Hassani *et al.* (2008) vonden een stijging in de 'locomotor activity': Er werd namelijk een langere afstand gewandeld wanneer honingbijen acuut contact behandeld waren met subletale doses (0,1 en 0,5 µg/bij). Bij orale acute blootstelling werden deze effecten niet waargenomen. Dit werd recent bevestigd door Aliouane *et al.* (2009) na een orale chronische blootstelling (gedurende 11 dagen) aan 0,1 µg/bij acetamiprid, wat een verdunning is van 1/100 van de LD<sub>50</sub> waarde.

De 'sucrose responsiveness' van bijen die acuut contact behandeld werden met subletale doses (0,1 en 0,5 µg/bij) was niet beïnvloed. Herhaling van eenzelfde test maar na een acute orale blootstelling resulteerde in een significant verlaagde 'sucrose responsiveness' (El Hassani *et al.*, 2008). In tegenstelling, een chronische orale blootstelling aan de laagste dosis (0,1 µg/bij) had geen effect op de 'sucrose responsiveness' (Aliouane *et al.*, 2009).

De 'water responsiveness' van bijen was gelijk met de controle wanneer werksters acuut oraal blootgesteld werden, maar was significant hoger bij chronische blootstelling aan 0,1 µg/bij (El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Contact blootstelling (0,1 en 0,5 µg/bij) resulteerde in een dosis-afhankelijke stijging van de 'water responsiveness' van de bijen. Op andere subletale eindpunten zoals waterconsumptie werd geen effect waargenomen na chronische blootstelling aan 0,1 µg/bij (Aliouane *et al.*, 2009).

De 'olfaction learning and memory' bio-toets toonde aan dat acetamiprid (0,1 µg/bij) interfereerde met het 'lange termijn geheugen' (El Hassani *et al.*, 2008).

### 5.5.5 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in Noord-Amerika en Canada. Acetamiprid werd niet aangetroffen in bijen of bijenwas (detectiegrens 5.0 µg/kg), maar wel in 3.1% van de pollenmonsters (gem. 1.9 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010).

In een beperkte studie in Griekenland, waarbij 5 imkers die last hadden van verhoogde bijensterfte werden bezocht, werd geen acetamiprid gevonden in bijen, suiker of 'sugar patty' (Bacandritos *et al.*, 2010).

In de Duitse monitoring (Genersch *et al.*, 2010) was acetamiprid de derde meest voorkomende stof (2 van de 105 monsters bijenbrood).

### 5.5.6 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met LD<sub>50</sub>

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden ophopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

#### *Resultaat*

De aanwezigheid in 3.1% van de pollenmonsters (gem. 1.9 µg/kg) (Mullin *et al.*, 2010) zou aan een voedster een geaccumuleerde dosis van 0,124 ng/bij opleveren, 0,0124 per dag.  $TER = 14530 / 0,0124 = 1,2 * 10^6$ .

### 5.5.7 Metabolisme en bio-accumulatie

Acetamiprid werd snel gemetaboliseerd in bijen, met een halfwaardetijd van 25 minuten na orale toediening via suikerwater (100 µg/kg bij) en onder vorming van 4 metabolieten. De belangrijkste metaboliet had een piek corresponderend met ongeveer 48% van de dosis na 8 uur, de andere drie metabolieten bereiken maxima van 22-25%. Na 72 uur waren alleen nog metabolieten aanwezig in de bij. Het metabolisme van acetamiprid lijkt weefselspecifiek te zijn (Brunet *et al.*, 2005).

## 5.6 Flonicamid

### 5.6.1 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = >51.1 mg a.s./bij (getest in formulering Teppeki)

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = >53.3 mg a.s./bij (getest in formulering Teppeki)

### 5.6.2 Acute giftigheid literatuur

In een studie in de kas, met een bespuiting van katoenplanten, waar de bijen meteen na opdrogen van de planten aan werden blootgesteld, werd geen enkele schade geconstateerd. In dezelfde opzet stierf met Thiamethoxam 100% van de bijen (Thomazoni *et al.*, 2009).

## 5.7 Fipronil

### 5.7.1 Toepassingen (Ctgb):

Fipronil is in Nederland geregistreerd voor zaadcoating bij diverse koolsoorten en uien en sjalotten, en als biocide tegen kakkerlakken.

### 5.7.2 LD<sub>50</sub> (Ctgb)

Acute contact toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,00593 µg/bij (=5,9 ng/bij)

Acute orale toxiciteit: LD<sub>50</sub> = 0,00417 µg/bij (= 4,2 ng/bij) LC<sub>50</sub>=0,160 mg/kg dieet

Ook gegevens over twee metabolieten:

MB 46136 (sulfonmetaboliet): LD<sub>50</sub> acuut oraal = 0,0064 µg/bij(=6,4 ng/bij)

RPA 200761 (carboxamide metaboliet): NOEC = 10,3 mg/kg dieet (equivalent aan 0,29 µg/bij).

### 5.7.3 Acute giftigheid literatuur

Studies waarbij honingbijen blootgesteld zijn aan acute doses/concentraties zijn beperkt. Mayer *et al.* (1999) rapporteerden een contact LD<sub>50</sub>-waarde voor honingbij van 0,013 µg/bij(=13 ng/bij).

De enantiomeren van fipronil zijn toxisch voor honingbijen. Li *et al.* (2010) rapporteerden 50% mortaliteit na 48u bij 3,4 ng/bij (contact) en 0,05 mg/L (oraal).

### 5.7.4 Chronische blootstelling

Chronische blootstelling aan fipronil resulteerde in een hoge mortaliteit van honingbijwerksters. Decourtye *et al.* (2005) rapporteerden een mortaliteit van 41 en 91% bij orale blootstelling aan respectievelijk 2,2 en 9 µg/L fipronil via het suikerwater. Ook chronische blootstelling aan een lagere dosis, van 0,1 ng/bij gedurende de eerste 11 dagen na adultontluiking resulteerde in 100% werkstermortaliteit en dit al 1 week na behandeling (Aliouane *et al.*, 2009).

In tegenstelling tot laboratoriumproeven demonstreerde een veldstudie waarbij *Brassica napus* bloemen bespoten werden met 0,014 en 0,028 kg fipronil per ha geen mortaliteit bij de blootgestelde honingbijen (Mayer *et al.*, 1999).

### 5.7.5 Sub-letale effecten (gedrag)

Een oudere studie van Mayer *et al.* (1999) toonde aan dat orale blootstelling via het suikerwater aan 100 en 500 mg/L fipronil resulteerde in een significante reductie van het bezoek van honingbijen aan voedsel (=flessen met suikerwater). De meer recente literatuur bevestigt dat subletale concentraties van fipronil (1,0-0,5-0,1-0,01 ng/bij) verantwoordelijk zijn voor subletale effecten op de honingbij (El Hassani *et al.*, 2005, 2009; Aliouane *et al.*, 2009; Bernadou *et al.*, 2009).

Een eerste eindpunt van effect is de 'water en sucrose responsiveness'. Om de 'water en sucrose responsiveness' te testen wordt het uitduwen van de proboscis gescoord wanneer de antennen respectievelijk gestimuleerd worden met water en suiker. El Hassani *et al.* (2005) vonden een significante daling van de 'sucrose responsiveness' bij een dosis van 1,0 ng/bij en dit 1 uur na contactbehandeling. Dit effect werd ook waargenomen wanneer honingbijen gedurende 11 dagen, vanaf een week na adultontluiking chronisch blootgesteld werden via de voeding (oraal) aan een 100x lagere dosis (0,01 ng/bij) (Aliouane *et al.*, 2009). Fipronil had via een chronische orale blootstelling geen effect op de waterconsumptie en 'water responsiveness' van honingbijen (Aliouane *et al.*, 2009).

Een tweede eindpunt van effect is 'olfactory learning and memory'. Neveneffecten op deze belangrijke processen worden gescoord door middel van de 'proboscis extension reflex' (PER). Hier worden bijen in aanwezigheid van een suiker geconditioneerd aan een bepaalde geur zodat ze in aanwezigheid van de geur en afwezigheid van de suiker

de proboscis uitduwen. Door dit te herhalen na verschillende tijdstippen na het initieel aanleren van de reflex kan de geheugencapaciteit getest worden. Gebruik makend van deze experimentele procedure toonden Decourtye *et al.* (2005) aan dat fipronil het leervermogen van bijen reduceert. Ook El Hassani *et al.* (2009) rapporteerden dat injectie (in 1 µl volume) van 0,1 ng fipronil /bij in de thorax een effect had op 'olfactory learning and memory'. Bij een hogere concentratie van 0,5 ng/bij werd dit niet meer waargenomen.

Een derde eindpunt is het effect op het 'antennal tactile learning'. Een laboratoriumstudie waarbij individuele honingbijen via contact behandeld werden met een subletale dosis van fipronil aan 0,5 ng/bij toonde een lager, maar niet significant effect op het 'antennal tactile learning' (Bernadou *et al.*, 2009).

Een vierde eindpunt is de 'locomotor activity'. De impact op de 'locomotor activity' wordt geëvalueerd door gebruik te maken van een plexiglasendoos met een glasplaat aan de voorzijde. Deze plaat wordt verlicht en vervolgens wordt de activiteit elke 3 seconden geregistreerd gedurende 3 minuten. El Hassani *et al.* (2005) vonden geen negatief effect op de 'locomotor activity' bij fipronil bij concentraties van 1,0; 0,5 en 0,1 ng/bij na orale en topische behandeling. Ondanks het feit dat er geen effect werd gevonden met hogere fipronil concentraties rapporteerden Aliouane *et al.* (2009) een significant lagere 'locomotor activity' bij lagere concentraties. Bijvoorbeeld de bijen bleven langer immobiel bij een contactbehandeling met fipronil van 0,01 ng/bij. Naast een verlaagde effectiviteit namen dezelfde auteurs ook een significante stijging waar in de waterconsumptie van de bijen. Tot slot leidde een chronische orale blootstelling met fipronil aan 0,01 ng/bij gedurende 11 dagen vanaf dag 8 na adultontluiking tot een verhoogde agressiviteit tussen de bijen die gepaard ging met het frequent wapperen van de vleugels en het verspreiden van het alarmferomoon (Aliouane *et al.*, 2009).

Decourtye *et al.* (2011) demonstreerden met behulp van een nieuwe methode die gebruik maakt van een microchip om de locatie van de bij te lokaliseren, dat een orale blootstelling aan een subletale dosis van fipronil, zijnde 0,3 ng/bij (=LD<sub>50</sub>/20), een reductie veroorzaakt van het foeragegedrag (aantal foerageervluchten).

Een veldstudie van Mayer *et al.* (1999) toonde aan dat er geen subletale effecten waren op het foeragegedrag van honingbijen wanneer fipronil gespoten werd in doseringen van 0,014 en 0,028 kg ai/ha op *Brassica napus* bloemen.

## 5.7.6 Gevonden concentraties in planten in relatie tot de toepassing

Girolami *et al.* (2009) maten de residuniveaus van fipronil in guttatievloeistof van planten gekweekt uit behandelde zaden. Fipronil werd echter nooit boven de detectielimiet aangetroffen. Dit bevestigt dat blootstelling aan fipronil via guttatievloeistof geen risico vormt.

## 5.7.7 Monitoring van bijenvolken inclusief residuen onderzoek

### *Residuen in pollen, honing, was en bijen*

Girolami *et al.* (2009) vonden geen fipronil in de guttatievloeistof van jonge maïsplanten, die een zaadbehandeling van 1 mg/zaad (Regent 500 FS) hadden gehad en waren gekweekt in het laboratorium.

Kadar en Faucon (2006) analyseerden 60 pollenmonsters, genomen van 5 kasten bij 6 verschillende imkers in het Indre district in Frankrijk, een gebied waar maïs en zonnebloemen worden verbouwd en dus een grote kans is op blootstelling. In 2 van de 60 monsters werden fipronil en de desulfinyl metaboliet (foto-degradatie-product) gedetecteerd in gehalten <0.1 µg/kg.

Een uitgebreide inventarisatie van fipronil in pollen, honing en bijen werd uitgevoerd door Chauzat *et al.* (2006, 2009, 2011). Het onderzoek betrof een vijftal gebieden verspreid over Frankrijk, waarbij in elk gebied bij vijf imkers de kasten werden bemonsterd gedurende 3 jaar, met 4 bemonsteringen per jaar. In totaal werden 185 pollen-, 239 honing- en 187 bijenmonsters geanalyseerd. Fipronil en metabolieten werd gevonden in 3.2-6.5% resp. 3.7% van de pollen- en bijenmonsters, terwijl geen residuen werden aangetroffen in honing (detectiegrens 0.3 µg/kg).

Gemiddelde gehalten aan fipronil en de desulfinyl- en sulfonmetabolieten bedroegen resp. 1.2, >1.0 en 1.7 µg/kg in pollen en resp. 0.5, 1.2 en 0.4 µg/kg in de bijen (Chauzat *et al.*, 2011).

In een vergelijkbare studie in België, met eenmalige bemonstering van bijen en bijenwas, werd geen fipronil gevonden in de 109 geanalyseerde monsters (detectiegrens 0.011 µg/kg) (Pirard *et al.*, 2007).

Studies in Spanje, uitgevoerd in 2008-2009, vonden geen residuen van fipronil of de carboxamide, desulfinyl-, sulfide- en sulfonmetabolieten in honing (93 monsters van 73 imkers in noordwest Spanje; detectiegrens 0.41-0.58

$\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Garcia-Chao *et al.*, 2010). In opgeslagen pollen verzameld in diverse regio's in Spanje werd fipronil in 3 van de 61 monsters (1-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) gemeten (Higes *et al.*, 2010). Ook in 3.7% van de 845 voorjaarsmonsters werd fipronil aangetroffen (1-4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), maar niet in 176 najaarsmonsters (detectiegrens 0.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Bernal *et al.*, 2010). Een studie in twee regio's (Cuenca en Andalucia) in Spanje, waarbij bijenstanden waren geplaatst bij zonnebloemvelden die al dan niet een zaadbehandeling met fipronil hadden gehad, of in de natuur ver van landbouw, toonde geen residuen van fipronil en metabolieten aan in stuifmeel uit pollenvallen noch uit de raat (bijenbrood, Bernal *et al.*, 2011). De LOQ (limit of quantification ofwel de laagst nog te kwantificeren concentratie) was 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de LOD (detectiegrens) 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Wel werden andere chemicaliën aangetroffen, met als meest aangetroffene het acaricide chloorfeninfos, door imkers illegaal gebruikt tegen varroa (maar ook erg schadelijk voor bijen). In de gebieden met zonnebloem was het aandeel zonnebloemstuifmeel in het totaal 40 tot 77%. Op grond van deze getallen berekenen de auteurs dat hoogstens 1/1000 van de  $\text{LD}_{50}$  kan worden opgelopen via deze weg. Opmerkelijk was dat de varroabesmetting bij de bemonstering voor het inwinteren varieerde van 1 tot 38% (in 50% was het hoger dan 17%). In alle volken werd ook *Nosema ceranae* aangetroffen. Een uitgebreide inventarisatie van bestrijdingsmiddelresiduen vond plaats in bijenwas, pollen en honingbijen in Noord-Amerika en Canada. Fipronil-residuen werden aangetroffen in 2 van 140 bijenmonsters (9.9-3060  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 1 van de 350 pollenmonsters (28.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en 3 van de 208 bijenwasmonsters (1.1-35.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Mullin *et al.*, 2010).

### 5.7.8 Verwachte maximale blootstelling vergeleken met $\text{LD}_{50}$

Wanneer gevonden residuniveaus (in nectar, stuifmeel of water) worden gecombineerd met de verwachte consumptie door bijen (op grond van literatuur) kan worden uitgerekend aan welke doses bijen worden blootgesteld. Rortais *et al.* (2005) concludeerden voor imidacloprid dat bijen via stuifmeel van mais en nectar van zonnebloemen soms een dosis tot dichtbij de letale dosis konden oplopen. Voor de andere middelen hebben wij naar analogie ook een inschatting gemaakt. Er zijn echter nog maar weinig gegevens over concentraties in nectar, terwijl uit de publicatie van Rortais *et al.* (2005) duidelijk wordt dat nectar / honing vanwege de hoge suiker/energieconsumptie de belangrijkste orale blootstellingsroute is.

#### Resultaat

Fipronil: geen concentraties beschikbaar in nectar / honing.  
 Stuifmeel: 1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in stuifmeel (Chauzat *et al.*, 2005) zou 0,08 ng opleveren per 10 dagen (0,008 ng/bij per dag), de hoge concentratie gevonden door Mullin (een enkel monster met een concentratie van 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) zou 1,82 ng per voedsterbij geven over 10 dagen. Per dag is dat 0,182 ng/bij per dag. TER in eerste geval  $4,2/0,008 = 525$ , in het tweede geval  $4,2/0,182 = 23$ . Dat betekent dat blootstelling aan fipronil via het stuifmeel geen risico vormt voor honingbijen.

### 5.7.9 Metabolisme en bio-accumulatie

Over het metabolisme van fipronil in bijen is weinig bekend. Er zijn enkele studies uitgevoerd naar het metabolisme van fipronil in plaagorganismen, o.a. in *Diabrotica virgifera virgifera* ('western corn root worm'; Scharf *et al.*, 2000), de maisboorder *Ostrinia nubilalis* (Durham *et al.*, 2002), en de rijststengelboorders *Chilo suppressalis* en *Sesamia inferens* (Fang *et al.*, 2008). Fipronil werd in al deze organismen, na topicale toediening, opgenomen en omgezet in de sulfon-metabooliet. De omzettingssnelheid verschilde tussen de twee geteste soorten rijststengelboorders (Fang *et al.*, 2008) en was hoger in fipronil-resistente populaties van *D. virgifera virgifera* dan in niet-resistente populaties (Scharf *et al.*, 2000). Opname van fipronil in larven van de steekmug *Aedes aegypti* vindt plaats zowel vanuit het water als vanuit het voedsel (Chaton *et al.*, 2001). De relevantie van deze studies voor opname en metabolisme van fipronil in bijen is onduidelijk.





## Verantwoording en dankwoord

Dit werk werd uitgevoerd in opdracht van en gefinancierd door het Nederlandse Ministerie van Ecomische Zaken, Landbouw en Innovatie (Project BO-12.01-001-003-PRI-1) en het Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek (FWO)-Vlaanderen (België).

Veel mensen hebben tijdens het schrijven van dit rapport input en kritiek geleverd. De auteurs zijn hen daarvoor erkentelijk. Speciaal willen we Dr. Wil Tamis van het CML van de Universiteit Leiden en Ir. Jacoba Wassenberg van het Ctgb bedanken voor hun input. Daarnaast enkele collega's van Plant Research International: Ing. Bram Cornellisen, Dr. Coby van Dooremalen, Sjef van der Steen Msc., Dr. Willem Jan de Kogel en Dr. Piet Boonekamp.



## 6. Literatuur

- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP & LeConte Y, 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environm. Microbiology* 12(3),774-782.
- Alaux C, F Ducloz, D Crauser & Y Le Conte 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* online doi: 10.1098/rsbl.2009.0986
- Alaux C, Sinha S, Hsadsri L, Hunt GJ, Guzman-Novoa E, De Grandi-Hoffman G, Uribe-Rubio JL, Southey BR, Rodriguez-Zas S, Robinson GE. 2009. Honey bee aggression supports a line between gene regulation and behavioural evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15400-15405
- Aliouane Y, Adessalam K, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effect on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28: 113-122.
- Alix A, Chauzat MP, Duchard S, Lewis G, Maus C, Miles MJ, Pilling ED, Thompson HM, Wallner Klaus (2009) Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10: Honeybees – proposed scheme. *Julius-Kuhn Archive*423:27-33
- Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:335-340.
- Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J, Haris B. 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* 36: 623-633.
- Bernadou A, Démarets F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M. 2009. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiol*: 1099-1106.
- Bernal J, Garrido-Bailon E, del Nozal MJ, Gonzalez-Porto AV, Martin-Hernandez R, Diego JC, Jimenez JJ, Bernal JL, Higes M. 2010. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology* 103:1964-1971.
- Bernal J, Martin-hernandez R, Diego JC, Nozal MJ, Gozalez-Porto AV, Bernal JL & Higes M, 2011. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Manag Sci* on line, DOI10.1002/ps.2188
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER. 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry* 75:2027-2033.
- Bonmatin JM, PA Marchand, R Charvet, I Moineau, ER Bengsch & ME Colin 2005. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *J. Agric Food Chem* 53, 5336-41
- Bortolotti, L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S & Porrini C 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology* 56, 63-67
- Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP. 2005. In vivo metabolic fate of [C-14]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* 61:742-748.
- Charvet R, Katouzian-Safadi M, Colin ME, Marchand PA, Bonmatin JM. 2004. Systemic insecticides: New risk for pollinator insects. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 62:29-35.
- Chaton PF, Ravanel P, Meyran JC, Tissut M. 2001. The toxicological effects and bioaccumulation of fipronil in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in aqueous medium. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 69:183-188.
- Chauzat MP, Carpentier P, Martel AC, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Madec F, Aubert M, Faucon JP. 2009. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental Entomology* 38:514-523.
- Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology* 99:253-262.
- Chauzat MP, Martel AC, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P, Faucon JP. 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera Apidae) to monitor pesticide presences in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30:103-111.
- Chauzat, M. P., J. P. Faucon, A. C. Martel, J. Lachaize, N. Cougoule, and M. Aubert. 2006. A survey on pesticide residues in pollen loads collected by honey-bees (*Apis mellifera*) in France. *J. Econ. Entomol.* 99: 253-262.

- Chauzat, MP, Carpentier P, Martel AM, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, LaChaize J, Madec F, Aubert M & Faucon JP 2009. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environ. Entomol.* 38(3): 514-523
- Choudhary A, Sharma DC. 2008. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). *Environmental Monitoring and Assessment* 144:143-150.
- Comité Scientifique et Technique de l'Etude Multifactorielle des Troubles des abeilles (CST), 2003. Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles. Rapport final. 106 pp.
- Cresswell JE (1999) The influence of nectar and pollen availability on pollen transfer by individual flowers of oil-seed rape (*Brassica napus*) when pollinated by bumblebees (*Bombus lapidarius*). *J Ecol* 87:670–677
- Cresswell JE. 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20: 149-157.
- Cutler GC & Scott-Dupree CD, 2007. Exposure to Clothianidin seed treated canola has no long-term impact on honey bees. *J. Econ. Entomol* 100, 765-772
- Cutler GC, Scott-Dupree CD. 2007. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *Journal of Economic Entomology* 100:765-772.
- De la Rúa P., R. Jaffé, R. Dall'Olio, I. Muñoz & J. Serrano 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Review. Apidologie* 40, 263-284
- Decourtye A & Devillers J 2010. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *In: ST Thany (ed.) 'Insect nicotinic acetylcholine receptors'* Landes Bioscience and Springer Science + Business media. pp. 85-95.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delègue MH. 2004b. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 78: 83-92.
- Decourtye A, Devillers J, Aupinel P, Brun F, Bagnis C, Fourrier J, Gauthier M. 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20: 429-437.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S *et al.* 2004a. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 410-419.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delegue MH. 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 242-250.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delegue MH. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci* 59: 269-278.
- Decourtye A, Le Metayer M, Pottiau H, Tisseur M, Odoux JF, Pham-Delegue MH. 2001. Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid. *Hazard of Pesticides to Bees*, 113-117.
- Decourtye A, Mader E, Desneux N, 2010 Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41, 264–277
- Durham EW, Siegfried BD, Scharf ME. 2002. In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Pest Management Science* 58:799-804.
- El Hassani AK, Dacher M, Garry V *et al.* 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 653-661.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C. 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 82: 30-39.
- El Hassani AK, Dupuis JP, Gauthier M, Armengaud C. 2009. Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invert Neurosci* 9: 91-100.
- Elbert C, Erdelen C, Kuehnhold J, Nauen R, Schmidt HW, Hattori Y. 2000. Thiacloprid: a novel neonicotinoids insecticide for foliar application. Brighton Crop Protection Conference, Brighton, UK. *Pest and Diseases* 2(a): 21-26.
- Fang Q, Huang CH, Ye GY, Yao HW, Cheng JA, Akhtar ZR. 2008. Differential fipronil susceptibility and metabolism in two rice stem borers from China. *Journal of Economic Entomology* 101:1415-1420.
- Faucon JP, Aurières C, Drainudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel A-C, Zeggane S, Chauzat M-P, Aubert MFA. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manag Sci* 61: 111-125.

- Faucon, J. P., C. Aurières, P. Drajnudel, L. Mathieu, M. Ribière, A. C. Martel, S. Zeggane, M. P. Chauzat, and M. Aubert. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manag. Sci.* 61: 111-125
- Fischer D, Moriarty T (2011) Pesticide risk assessment for pollinators: Summary of a SETAC Pellston Workshop. Pensacola FL (USA): Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)
- Fries I. 2010 *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103:73-79.
- Garcia-Chao M, Jesus Agruna M, Flores Calvete G, Sakkas V, Llompart M, Dagnac T. 2010. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta* 672(1-2, Sp. Iss. SI).
- Genersch E, 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 87-97
- Genersch E, Von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332–352
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. 2009. Translocation of Neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology* 102:1808-1815.
- Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D, Tapparo A (2011) Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *J Appl Entomol* doi 10.1111/j1439-0418.2011.01648x
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP (2001) Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 76: 183-191.
- Halm MP, Rortais A, Arnold G, Tasei JN, Rault S. 2006. New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science & Technology* 40:2448-2454.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Martinez-Salvador A, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto AV, Meana A, Bernal JL, del Nozal MJ, Bernal J. 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2:243-250.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT et al (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23: 371-378.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA & Frazier M 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41, 312-331
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* 16:1422-1430
- Kadar A, Faucon JP. 2006. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9741-9746.
- Kluser S, Neumann P, Chauzat M-P & Pettis JS 2011. UNEP Emerging Issues: Global Honey Bee Colony Disorder and Other Threats to Insect Pollinators 12 pages  
([http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global\\_Bee\\_Colony\\_Disorder\\_and\\_Threats\\_insect\\_pollinators.pdf](http://www.unep.org/dewa/Portals/67/pdf/Global_Bee_Colony_Disorder_and_Threats_insect_pollinators.pdf))
- Köhler A, Pirk CWW, Nicolson SW 2012. Honey bees and nectar nicotine: deterrence and reduced survival versus potential health benefits. *Journal of Insect Physiology* 58: 286-292
- Krischik VA, Landmark AL, Heimpel GE. 2007. Soil-applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding *Anagrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environmental Entomology* 36:1238-1245.
- Krupke C H, 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
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol* 48: 129-134.
- Laurent FM, Rathahao E. 2003. Distribution of [C-14] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:8005-8010.
- Li X, Bao C, Yang D, Zheng M, Li X, Tao S 2010. Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers. *Environ Toxicol Chem* 29: 127-132.

- Maini S, Medrzycki P & Porrini C, 2010. The puzzle of honey bee losses: a brief review. *Bull of Insectology* 63, 153-160
- Mayer DF, Lunden JD. 1999. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *J Apicult Res* 38: 191-197.
- Morandin LA & Winston ML 2003. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environ Entomol* 32, 555-63
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcroft S, Simonds R, vanEngelsdorp, D & Pettis JS 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PlosOne* 5 (3), e9754. doi:10.1371
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 57: 577-586.
- Neumann P & Carreck NL 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49, 1-6
- Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Thirionet B, Verheggen FJ, Berkvens D, De Pauw E & Haubruge E. 2009. Does Imidacloprid Seed-Treated Maize Have an Impact on Honey Bee Mortality? *J. Econ. Entomol.* 102(2): 616-623
- Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Thirionet B, Verheggen FJ, Berkvens D, De Pauw E, Haubruge E. 2009. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *Journal of Economic Entomology* 102:616-623.
- OEPP/EPPO, 2010. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10: Honeybees. *OEPP/EPPO Bulletin* 40, 323-331.
- Pettis J S, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, published online 13 jan 2012. DOI 10.1007/s00114-011-0881-1
- Pirard C, Widart J, Nguyen BK, Deleuze C, Heudt L, Haubruge E, De Pauw E, Focant JF. 2007. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1152:116-123.
- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delegue MH (2005) Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens, F 2005. Modes of Honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71-83
- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36:71-83.
- Scharf ME, Siegfried BD, Meinke LJ, Chandler LD. 2000. Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate- and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. *Pest Management Science* 56:757-766.
- Schmuck R (1999). No causal relationship between Gaucho seed dressing in sunflowers and the French bee syndrome. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52: 257-299.
- Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O et al (2001) Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57: 225-238.
- Schmuck R, Stadler T, Schmidt HW, 2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotiny insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Manag Sci* 59:279-286
- Scott-Dupree CD, Conroy L & Harris CR 2009. Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens*, *Megachile rotundata* and *Osmia lignaria*. *J Econ Entomol.* 102, 177-182
- Seeley T, 1995. *The wisdom of the hive. The social physiology of honey bee colonies.* Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Smodis Skerl MI, Velikonja Bolta S, Basa Cesnik H, Gregorc A. 2009. Residues of Pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83:374-377.

- Stark JD, Jepson PC, Mayer DF. 1995. Limitation to the use of topical toxicity data for prediction of pesticide side-effect in the field. *J Econ Entomol*: 1081-1088.
- Suchail S, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces LP. 2004a. In vivo distribution and metabolisation of C-14-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* 60:1056-1062.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. 2004b. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* 60:291-296.
- Suchail S, Guez D and Belzunces LP. 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* 20: 2482-2486.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1901-1905.
- Tasei JN, Lerin J & Ripault G 2000. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest Manag Sci* 56, 784-788
- Tasei JN, Ripault G & Rivault E 2001. Hazards of imidacloprid seed coating to *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) when applied to sunflower. *J Econ Entomol* 94, 623-627
- Thompson HM. 2010. Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. *Pest Management Science* 66:1157-1162.
- Thompson HM, Maus C (2007) The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Manag Sci* 63:1058-1061
- VanEngelsdorp D, *et al.* 2012. A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research* 51(1): 115-124
- Van der Zee R, *et al.* 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research* 51(1): 100-114
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui HE, Belzunces LP, Delbac F (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6:e21550
- Von Der Ohe, W & Janke M 2009 Bienen im Stress. Schäden entstehen wenn verschiedene Faktoren zusammenkommen. *Allgemeine Deutsche ImkerZeitung* 2009/4, 10-11.
- Wehling M, Von der Ohe, W, Brasse D, Forster R (2009) Colony losses – interactions of plant protection products and other factors. *Julius Kühn Archiv* 423:153-154
- Wu JY, Anelli CM & Sheppard WS, 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PlosOne* 6 (2), e14720.
- Wu JY, Smart MD, Anelli CM, Sheppard WS 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, Accepted manuscript doi: 10.1016/j.jip.2012.01.005
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL & Chang LH 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101, 1743-48
- Yang EC, Chuang YC, Cheng YL *et al.* 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101: 1743-1748.

